A2型インフルエンザ生ワクチンに関する研究

中 村 観 善*

KANZEN NAKAMURA: STUDIES ON THE LIVE
VACCINE OF THE INFLUENZA A 2.

〔受稿 12月27日1960〕

緒 言

インフルエンザウイルス(以下IVと略記)の人経鼻接種実験はAndrewes等¹⁾以来多数の報告がある。そのうち活性IV浮遊液が予防接種材料として利用出来る見通しを暗示したものもあるが²⁾⁴⁾⁵⁾⁹⁾²⁴⁾、必ずしも好結果が得られず、ある実験では抗体上昇が全くみられないか又は不充分であり⁸⁾¹¹⁾²²⁾²³⁾²⁸⁾、又他の実験では発熱その他の著明な症状を惹起するため、各研究者の使用した材料はインフルエンザの予防接種に利用出来なかつた¹²⁾¹²⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²⁸⁾³²⁾。

ソ連においてはインフルエンザ生ワクチンに関する独自の研究が進められ、SmorodintsevとZhdanov³⁶⁾によつて総括された。我国には和気朗³⁸⁾³⁹⁾⁴⁰⁾によつて、その研究の一端が紹介されている。

然しソ連の生ワクチンの実験³²⁾を追試したIsaacs等の実験²²⁾は失敗に終つた。我国においては福見¹⁴⁾も生ウイルスの接種を試みたが発熱したため以後の実験を中止した。奥野等²⁷⁾による我々の研究室における初期の実験も同様な結果になつた(後述)。したがつて英米、我国等においては、インフルエンザワクチンと言へば不活化ワクチンを意味し、生ワクチンは全く顧られない現状である。

これらのインフルエンザ生ワクチンに関する研究が不成功に終つた原因は、IVの弱毒化が不満足であつたためだと考え、先づIVを弱毒化する研究を企てた。その結果、所期の目的とする弱毒株を得ることが出来、且つこのウイルスはインフルエンザの予防の目的に利用できるのではないかとこの所見を得た。

実験材料及び実験方法

1) ウイルス株及び継代方法

1957年当研究室で分離されたインフルエンザA 2、奥田及び衣笠の2株を用いた。継代には8~13日(主には10~11日)孵化鶏卵を用い、主として48時間(時には72時間)培養した後その感染漿尿液を生理食塩水で 10^{-3} 時には 10^{-4} 以上、稀には 10^{-2} 又は限界附近に稀釈し、その0.1mlを次代卵の漿尿腔に接種した。人体接種に先だち、このウイルスはマウスに対して、病原性のないことをたしかめた。

2) 接種材料

感染漿尿液を3,000rpm 30分遠心しその上清を接種材料とした。沈渣については毎回無菌性を調べた。接種と同時に材料の感染価を測定した。

3) 接種方法

鼻腔注入法と吸入法が用いられた。注入の場合は5ccの注射器、1/2注射針及びガラス管を用い、的確で安全に実施するため特別の工夫をした。吸入の場合はガラス又は合成樹脂のネブライザーを被接種者の鼻孔より1~2cmの所に近づけ(直接には触れない)噴霧し深呼吸又は普通の呼吸によつて吸入させた。ネブライザーに空気を送るため、少人数の時は2連球、人数の多い時はエアーコンプレッサーを用いた。接種に当つてはなるべく少量から注意深く実施していった。

4) 接種対象は18才以上の大人で大部分女子であつた。初期には接種に先だつてくわしいアンケートを取り、最も安全と思われるものに実施した。

5) 接種材料の感染価測定

材料を生理食塩水で10倍段階稀釈し、それぞれ3~5個の11日発育鶏卵の漿尿腔に0.1mlづつ接種した。2日培養後各卵より少量の漿尿液をとり血球凝集反応により感染の有無を判定した。感染価の計算はReed and Muenchの方法による。

* 大阪大学微生物病研究所 ウイルス学部 (主任 奥野良臣教授)

6) 血球凝集抑制 (以後 HI と略す) 価の測定

接種時間及び2～5週間後採血し、分離した血清を-20°Cに保存し、使用前に56°Cで30分非動化して、そのまま用いた。2倍段階希釈した血清0.25mlに16凝集単位/mlのウイルス液0.25mlを混じり30分室温に放置後0.5%ニワトリ血球浮遊液0.5mlを混じり、室温に1時間静置後管底像又は傾斜させて血球の流れ具合により判定した。HI 価は完全凝集阻止する最高血清希釈倍数で示した。

抗原は奥田株の新しい感染漿尿液又はグリセリンを加えて保存したものを用いた。抗体上昇を調べる場合一對の血清は同時に測定した。

7) 補体結合反応

V抗原としては奥田株感染漿尿液の低速遠心上清を20,000rpm, 45分遠心沈澱をもとの1/2量のPBS (磷酸緩衝食塩水) に浮遊しその低速遠心上清を用いた。S抗原としては感染漿尿膜10%乳剤の低速遠心上清を20,000rpm, 45分遠心上清を更に35,000rpm, 60分遠心し、沈澱をもとの量のPBSに浮遊し、氷で冷しながらニワトリの血球を加え残ったV抗原を吸着し去った残りをを用いた。

2倍段階希釈血清0.1ml, 補体2単位, 抗原0.1mlを加え37°Cで1時間放置後感作血球を加え全体を0.5mlとし時々振盪しながら37°Cで1時間後判定した。50%溶血を示す最高血清希釈倍数を補体結合抗体価とした。

8) 中和試験

10^3 - 10^4 EID₅₀/mlのウイルス液と等量の4倍段階希釈血清を混合し、1時間37°Cの放置後、3コづつの10～11日卵漿尿腔に0.1mlづつ接種した。2コ以上の卵に感染しない血清最高希釈倍数を中和価とした。

実験成績

1) 孵化鶏卵継代と実験結果

以前奥野等²⁷⁾がすでに簡単に報告した様に、奥田株3代及び衣笠株7代の材料を当研究所の志願者に接種したところ、定型的なインフルエンザの症状を起した。すなわち、奥田株3代の材料を未罹患者3名、罹患者 (回復後まもないもの) 3名、計6名に吸入させたところ、未罹患者3名は定型的なインフルエンザの症状を呈した。潜伏期は、1人は24時間で他の2人は48時間であつた。罹患者3名は異常がなかつた。又衣笠株7代の材料を未罹の者3名、罹患者3名、計6名に吸入させた場合、未罹患者のうち2名は潜伏期48時間の後定型的な発症をした。罹患者のうち1名は24時

間、後軽度のインフルエンザ様症状を示した。

奥田株52代の材料を医学生2人に吸入させたところ、1は4倍のHI抗体上昇を示し、4日後より数日間軽いカゼ様の症状を示したが接種と関係があつたかどうかは不明である。他の1人はHI抗体上昇及び臨床症状はいづれもなかつた。

奥田株64代の材料を前記2名を含む3名に接種したところ、2人に5～11日後から軽微なカゼ様症状が数日持続したが、HI抗体上昇は認められなかつた。全体として何か副作用を持つ様な印象を受けた。

奥田株88-143代の材料を用いたとき、副作用なく抗体上昇を認めることが出来た。この間に株の性質には著明な変化は認められなかつた。すなわち奥田株114代の材料を極めて少量宛10人に吸入法で接種した

Table 1 Antibody response following inhalation of Okuda strain of 90th egg passage.

Name	HI antibody titer		Clinical reactions
	Before inhalation	21 days after	
Y.	16>	128	Headache
K.	16>	256	Headache
N.	16	128	—
A.	16>	64	—
O.	16>	64	—

Table 2 Antibody response following inhalation of Kinugasa strain of 119th egg passage.

Name	HI antibody titer		Clinical reactions
	Before inhalation	About 1 month after	
km.	16>	128	—
Oo.	16>	128	—
Yu.	16>	128	—
I.	16>	128	Headache
So.	16>	512	—
OK.	16>	512	—
H.	16>	128	Lassitude
Ma.	16>	512	Headache
U.	64	512	—
Oz.	16>	64	—
Ya.	256	512	—
Ki.	16	64	—
Sm.	16>	128	—
Mi.	16>	64	—

所、いずれも臨床症状は認めなかつたが2名に著明なHI抗体上昇を認めた。次に奥田株88代の材料を5名に、前よりやゝ多く接種したところ全員にHI抗体を認め、1名発熱したが他のものは全く症状がなかつた。発熱は24時間後に始まり38.2°Cに達したが数時間で下熱した。奥田株90代の材料を5名に接種したところ、結果はほぼ同様であつたが発熱者はなく、軽度の頭痛を訴えたものが2名あつた。頭痛は29時間の潜伏期の後あらわれ半日間位持続した(Table 1)。奥田株143代の材料を用いた場合、15人中13人に4倍以上のHI抗体上昇を認めた。1名37.4°Cの発熱があつた以外は軽度の頭痛を訴えたものが数名あつただけである。

衣笠株に於ても同様な結果を得た。衣笠株119代の材料を10秒吸入法で14人に接種した結果、最初から高い抗体価を示した1人以外は全ての人にHI抗体が上昇した。2名頭痛を訴えた以外は副作用はなかつた。

(Table 2)。

2) 接種方法の比較

注入法により各鼻孔より0.2mlづつ合計0.4mlを用

いたもの、同じ材料を10秒間吸入法により0.01ml用いたものと比較したところ、前者の抗体は上昇は7/12、後者は9/12で材料の消費量が吸入法によつた場合はわずかに約1/40であるにもかかわらず同等以上の抗体上昇率を得たので、その他の実験は全て吸入法によつた。ネブライザーに送る空気の圧力が高い場合は多量の大粒の水滴が飛散し、材料の消費が著しく増大した。同一ネブライザー同一材料で0.06ml/10sec、(水滴を含む)吸入した場合抗体上昇は9/18で、0.007 ml/10sec、(微細な霧のみ)吸入した場合抗体上昇は11/22であり、両者に著しい効果の差はなかつた。10秒吸入法と1分吸入法を比較すると、接種材料の感染価が高い場合は10秒吸入法で十分であり、吸入させると発熱するものがあつた。然し材料の感染価が低い場合は60秒吸入法の方がやゝ効果がよい様に思われる。(Table 3)

3) 抗体上昇

適当な条件で接種すれば、ほとんど副作用なしに大多数のものにHI抗体上昇がみられることはすでに述べた。

Table 3 Antibody response and clinical signs following inhalation of various materials.

Strain and passage number	Virus materials				Number of inhaled subjects	Number showing the increase in HI antibody titer							Clinical signs
	EID ₅₀ /ml	Hemagglutination unit/ml	Time for inhalation (sec.)	Sprayed volume for one person (ml)		0	2	4	8	16	32	64 fold	
Okuda 92*	10 ^{5.5}	8192	10	0.02	6	6							—
Okuda 92	10 ^{6.8}	512	10	0.013	11	9			1			1	—
Okuda 92	10 ^{6.8}	512	60	0.08	12	8		3	1				—
Okuda 102	10 ^{8.75}	4096	10	0.06	18	7	2	4	2		3		—
Okuda 102	10 ^{8.75}	4096	10	0.007	21	8	3	3	3	4			—
Okuda 92	10 ^{9.5}	8192	10	0.01	9		2		2	3	1	1	1/9 Headache
Okuda 99	10 ^{9.8}	4096	10	0.01	12	3		5	2	2			2/12 Headache
Kinugasa 119	10 ^{9.25}	4096	10	0.06	14		1	1	3	6		3	3/14 Headache
Okuda 99	10 ^{9.8}	4096	60	0.06	12	3**		1	5	2	1		3/12 Fever
Kinugasa 107	10 ^{9.5}	4096	60	0.04	7	4***			1	2			3/7 Fever

* Irradiated by ultraviolet light.

** Two of these persons had fever.

*** Three of these persons had fever.

抗体上昇と接種材料の感染価とは密接な関連があつた。血球凝集価及び先に述べた様に噴霧量とはあまり関連がなかつた。紫外線照射により大部分のウイルスを不活化した材料はほとんど抗体上昇をおこさなかつた (Table 3, 4)。

発熱頭痛等の副作用のあつたものに特に HI 抗体上昇のみられないものが多かつた。副作用のあつた10人中8人まで HI 抗体上昇がみられなかつたのに反し、副作用のなかつた21人中19人まで HI 抗体上昇を認めた。

HI 抗体の上昇及び中和抗体、補体結合抗体の上昇については Table 4 を参照されたい。HI 抗体の上昇したものには中和抗体の上昇もみられた。HI 抗体上昇のなかつた者にも補体結合抗体上昇のみられるもの

があつた。

4) 副作用

副作用と接種材料の感染価及び吸入時間との間に密接な関係があつた。材料の感染価が低く、抗体上昇が接種者の半数以下にみられる様な場合には全く副作用はおこらなかつた。接種量 (材料の感染価及び吸入時間を総合して接種量と呼ぶ) が適当であるとき、一部のものに一過性の全身倦怠感、違和感、頭痛等がみられるのみであつた。それらは軽度の場合が多く、強いて詮索されて始めて「そう云えば翌日からだの具合が変だつた」等と気付く場合が少くない。頭痛は極めて一過性で持続時間は数時間のものが多く、12時間以上のものはほとんどなかつた。潜伏期間は10~20時間のものが多いが、もつと短い場合もあつた。

Table 4 Antibody response by various serological test.

Group	Name	Clinical reactions	HI antibody titer		Neutralizing antibody titer		Complement fixing antibody			
			Before	After	Before	After	Anti-S titer		Anti-V titer	
							Before	After	Before	After
Subcutaneous injection of inactivated vaccine*	Ish.	—	16>	512	4	1024	2	4	8	16
	Ya.	—	32	512	4	256	4	4	8	32
	Yo.	Fever	32	512	16	256≤	2>	2>	8	32
	Im.	—	16	512	4	256	2>	2>	4	32
Inhalation of ultraviolet irradiated material	A.	—	16>	16>			2>	2>	4>	4>
	T.	—	16>	16>			2>	2>	4>	4>
	Ha.	—	16>	16>	4	16	2	2	8	8
	Sh.	—	16>	16>	4>	4>	2	2>	4	4
	Ho.	—	16>	16>	4	4	4	4	8	8
	N.	—	16>	16>	4>	4>	2	2	4	4
Inhalation of active virus material with HI antibody response	S.	—	16>	256	4>	64	2>	2>	4>	8
	O.	—	32	256	4	64	2>	2>	4	8
	Mt.	—	16>	128	4	64	4	4	4	16
	K.	—	16>	128	16	256	2	4	4>	16
	F.	—	16>	64	4	64	2	8	4>	16
	Mr.	—	32	512	16	256	16	16	16	32
	I.	—	16	256	4	64	8	16	16	32
Inhalation of active virus material without HI antibody response	O.	Fever	16>	16>	4>	4>	2	16	4>	16
	Mkz.	Fever	16>	16>	4>	4>	2>	2>	4>	4>
	K.	—	16>	16>	4>	4>	4	8	4	8
	Nsm.	Fever	16>	16>	4>	4	2	32	4>	32
	Nkm.	Fever	16>	16>	4>	4>	2>	2>	4>	4
	Nsg.	Fever	16>	16>	4>	4>	2>	2>	4>	4>

* Containing influenza A1 (Oomachi), A2 (Adachi) and B (Setagaya), 130, 175 and 105 CCA.

接種量が相当多い時は発熱するものがあつた。接種量が多いほど発熱も高率であり、少人数4回の接種実験ではそれぞれ3/7, 3/18, 2/8, 3/12に達したが、接種量が比較的多くない時には偶発的で1/16, 1/10に過ぎなかつた。発熱の場合、潜伏期は24時間前後のものが多かつた。相当急激に発熱し、時には38℃以上に達する。数時間で下熱するものが多く、高熱に達したもので12時間後にはほぼ下熱し、24時間後なお微熱が残ることはほとんどなかつた。この発熱は自然感染の場合と異り経過が極めて速やかで、鼻炎、咳嗽などの局所症状はほとんどともなわなかつた。

5) 再分離

奥田株接種後発熱なく HI 抗体上昇の著明であつた5人の接種3日後の含嗽液をペニシリン及びストレプトマイシンを加え遠心し、その上清を3～4個ずつの10～11日卵漿尿腔に接種し2代継代した。

奥田株接種後発熱し HI 抗体上昇のなかつた2人の接種3日後の含嗽液を同様処理後8～10日卵3～4個ずつの羊膜腔に接種し2代継代した。又衣笠株接種後発熱し抗体上昇のなかつた1人の接種翌日の含嗽液も同様に接種継代した。血球凝集反応によつて、いずれも、ウイルスの存在を認めなかつた。

6) 同居感染

阪大看護学校において同学年に同じ宿舎で生活している28人を4グループに分けて接種を行なつた。それぞれのグループで接種時の抗体価の高いもの (HI価32以上)はそれぞれ2/10, 0/5, 0/5, 0/7で特に後のグループに於て抗体価の高いものが多いと云うことはなかつた。なお接種期間は互に91, 22, 97日はなれていた。第4グループ接種を行つてから約40日後、大部分前記学生と同一宿舎で生活している阪大病院職員を対象として予防接種が行なわれた。接種時抗体価の高いものは13/85であつたが特に高いものはなかつた。同時に調べたところでは第2, 3, 4グループで抗体上昇のみられた各1名は共に高い HI 抗体価を保持していた。国立大阪病院でも同じ宿舎で生活している者を3グループに分け、46日及び17日の期間において接種を行なつたが、接種時に HI 抗体価の高かつたものはそれぞれ6/33, 11/47, 4/40で、特に後のグループに抗体価の高いものが多いとは考えられない。

接種の行なわれた後、非接種者間に発熱その他インフルエンザ様症状が発生したと思ふ事実は認められない。

以上の事より同居感染はなかつたものと推定する。

考 按

1) 弱毒株について

初期の文献ではフェレット¹⁾又はマウス³⁵⁾に馴化させ培養した材料について研究され、動物通過により弱毒化が可能であると思われる結果が報告されている⁹⁾。然し鶏卵培養がたやすくなつてからは主に卵馴化株について研究されて来た。Francis等¹²⁾は動物に百数十代継代した後、孵化鶏卵培養20～35代にいたつてもなお免疫原性及び病原性を持つてゐることを示した。然るにソ連のRitova及びEvstigneeva³⁰⁾はIVは鶏卵を15～25代通過することにより免疫性も病原性もなくなり、もはや生ワクチンとして不適当であることを報告している。従つて免疫原性と鼻咽頭粘膜における生存能力がまだあまり低下していない株を使う必要があると考えられた。そして卵継代4～6代の材料がワクチンとして使用出来るという³⁰⁾⁴²⁾。然し鶏卵継代株には必ずしも容易に満足すべきものが得られないという³⁶⁾。

我々が鶏卵培養3代及び7代の材料を接種した時、大多数のものが定型的なインフルエンザの症状を示した。この様な継代数の少いウイルスは弱毒化がまだ不十分だと考え、更に長期継代を試みた。この実験結果はソ連のデータと異なるが、これは接種方法の違いによるものだろうか (後述)。

我々は100代前後継代した株において、病原性がほとんどなく免疫原性が充分あることを証明した。2株とも同様であつた。しかもこの性質は継代数の相当広い範囲において変らないものと考えられる。

ソ連の学者は古い株より失われた抗原性と人鼻咽頭粘膜における生存増殖性を回復するため、感受性のある人鼻咽頭粘膜又は人胎児肺組織培養通過させることによつて新しい弱毒株を作つたといわれるが³⁴⁾³⁶⁾³⁹⁾⁴⁰⁾我々の成績ではそういう株を作る必要はないと考えられる。

孵化鶏卵継代に当つては早く変異をおこさせる意図をもつて相当濃厚に継代した。OD変異⁶⁾より想像してそうしたわけだか、果して濃厚継代の方が早く病原性がなくなるか、変異は突然変異によるものかなどの点は結論に達していない。

2) 抗体上昇について

被接種者の血中 HI 抗体上昇率はかなり高いので、我々のものは予防接種に充分利用出来ると考えられ

る。

従来インフルエンザ生ワクチンにおいては、主にウイルスの生死を問題にし、感染価にそれほど注意しない傾向がある様に思われるが、我々の実験によると接種材料の感染価は重要な要素である。増殖力が強いと思われるソ連のワクチンでも、ウイルスが生存しているのに抗体上昇が認められず、疫学的に無効であつた³³⁾。又 Fadeeva はワクチンの保存によつて接種者よりのウイルスの分離率が低下したことを知り、株の性質が変化したためだと苦しい解釈をつけた²⁹⁾。これらはおそらく材料の感染価が下つていたためだと思われる。抗体上昇をおこさせるにはかなり多量の活性ウイルスを必要とすることは Deuchman 等¹⁰⁾ の実験によつても明らかである。これはおそらく弱毒株の増殖には特に制約があるためまたは接種した全てのウイルスが増殖に好都合な場所に到達しないためであろう。

ソ連においては再分離率と抗体上昇率が並行することが強調されているが³⁰⁾⁴¹⁾、再分離が出来なくても抗体上昇を認めた場合は報告されており¹²⁾¹⁸⁾、再分離が出来ても血中 HI 抗体上昇をおこさない場合もあり得る²¹⁾。接種ウイルスの生存期間がかなり短くとも接種条件によつては抗体上昇が起るかも知れない。又 IV が上部気道だけでなく下部気道においてもよく増殖し、特に鶏卵継代株は上部気道に対する親和性が失われるのではないだろうか。

活性 IV 接種実験において、何らかの症状を示したものに抗体上昇が著しかつたという報告がある³⁵⁾。発熱と抗体上昇との間にはあまりはつきりした関連が認められないことを示す報告もある¹²⁾¹⁷⁾²³⁾。発熱をおこしてしかも血中 HI 抗体の上昇しない例はいくつかの報告にみることが出来る¹¹⁾¹⁸⁾²²⁾。然るに我々のデーターは発熱その他何らかの副作用のあつたものに限つて抗体上昇率が低い結果になつている。これは単なる確率的なものと解釈するよりむしろ、副作用と HI 抗体上昇のみられないことの間には何らかの関連があると考えべきではないだろうか。

3) 接種方法について

注入法を用いた感染実験は失敗した場合が¹¹⁾¹¹⁾²²⁾ 多く、吸入法を用いた場合は成功することが¹²⁾¹³⁾¹⁷⁾¹⁸⁾³²⁾ 多かつた。Henle 等¹⁸⁾ はこの 2 方法を比較し吸入法がより確実な接種法であることを示した。彼はこの理由として IV の侵入門戸は鼻咽頭粘膜よりむしろもつと下部の気道粘膜にあるためだろうと考えた。

然るにソ連においては各鼻孔に 0.5ml づつピペット

で注入する方法²⁾⁴²⁾、又は各鼻孔に 0.1~0.5ml づつ噴霧器で吹き込むという注入法に近い方法¹⁰⁾²⁵⁾²⁶⁾³⁰⁾³⁷⁾⁴⁰⁾、が用いられている。また粉末のまま吸入させる方法も用いられている³³⁾³⁴⁾³⁶⁾³⁹⁾。

我々の実験においては、100 代近く鶏卵継代した株にもかかわらず、注入法を用いた場合にも被接種者の約 60% に 4 倍以上の抗体上昇を認めた。これはソ連のデーターと異なるが理由はよくわからない。我々の接種材料の方が感染価が高かつたためだろうか。

吸入法において、エアーコンプレッサーの圧力を高めると、微細な霧と共に水滴も混入し、材料消費量は著しく増大したにもかかわらず効果はあまり変らなかつた。このことより微細な霧のみが有効であり水滴はあまり意味がないと考えられる。従つてネブライザーに送る空気の圧力は水滴の飛散しない最大のものが最も有効であろう。

吸入法と注入法を比較すると、吸入法においては材料消費を 1/20 以下にすることが出来、接種時の不快感が少く、ピペットや噴霧器の先をいちいち消毒する必要がなく、一人接種所要時間は 10 秒でよく、然も注入法よりも一様な効果が期待出来るから、生ワクチンの実施においては、吸入法は注入法よりすぐれた方法であると考えられる。

4) 副作用について

動物及び鶏卵で継代した IV 材料を用いる感染実験において、臨床像が自然感染の異なる場合の多いことを知ることが出来る。その主な点の一つは発熱その他の症状の持続期間が短いことである。大部分が 48 時間以内であつたという報告が多いが¹²⁾¹³⁾¹⁸⁾、大部分が 24 時間以内であつたという報告もある。他の一つは鼻咽頭炎、咳等の局所症状が軽度であるか¹³⁾、又はほとんどみられないことである¹²⁾²⁸⁾。このことは IV は動物及び卵通過によつて性質が変化することを示すものと考えられる。

ソ連のワクチンにおいては副作用の持続は 48 時間のものが多く、鼻炎等の局所症状がみられると報告されているが²⁵⁾、我々のワクチンでは全身症状の持続は 24 時間以内であり、局所症状はほとんどない。このことは我々の株はより弱毒化が進んだ株であり、ウイルスの人体における生存増殖持続期間が短くなり、鼻咽頭粘膜に対する病原性はすでになくなつたことを示すものではないだろうか。

発熱率が接種量に非常に関係することはすでに Chalkina⁹⁾ が指摘しているが、我々はあらためて確認

することが出来た。接種量の少ない時は、スウィルが増殖するにしても発熱をおこすほどの多量に到らないためであろう。

接種量の多い場合発熱を主とした副作用を生じたが、その症状は不活化ワクチンを多量に注射した場合³³⁾とよく似ている。しかし発熱をとまわず、違和感、全身倦怠、頭痛等に終始し、然もこの中には潜伏期が数時間以内のものもあり、これは動物に対するインフルエンザの毒性¹⁵⁾¹⁶⁾と同様な性質のものではないかと考えられる。いずれにしても原因はIV粒子自身の毒作用であろう。Acceleration¹⁸⁾を考える必要はないであろう。

5) 同居感染と再分離

Francis¹¹⁾は生ワクチンの欠点は他人へ感染する恐れのあることであると指摘している。活性IV接種実験において、同居感染を疑わせる報告¹²⁾は少いが、再分離に成功した実験³⁾⁷⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²²⁾³⁵⁾は少なく、その場合には同居感染の危険があつたと考えられる。人から人へ感染して行く場合、IVは人での増殖性を回復してゆく³⁴⁾³⁶⁾と思われるが、同時に毒力回復の危険性を否定出来ない。IVの再分離率と再分離可能期間によってワクチンの効果を判定しようとするソ連学者の見解³⁴⁾³⁶⁾³⁹⁾には賛成出来ない。

副作用があつても再分離の困難な例は今までに報告されており¹²⁾、長期継代株にこの傾向が強い様である¹⁸⁾。

例数が少いので更に確かめる必要はあるが、我々の実験においては同居感染は認められず再分離も出来なかつた。このことはワクチンとして好都合である。

6) 人体内におけるウイルスの増殖

鶏卵培養において、IV接種量が一定感染価以上であるとき、接種量の広いはんにわたつて常にほぼ一定の最終ウイルス量を得る。又インフルエンザの自然感染においては感染したか否かが重要であり、多量に感染したか少量であつたかはあまり重要でないと思われる。然るに我々のワクチンは接種量によって著しくその反応を異にする。このことは、この弱毒株は人体内で少くとも増殖に一定の限度があることを暗示する。

では一体接種されたウイルスは増殖するのであろうか。我々の場合接種に用いられたウイルス量は40HV(血球凝集単位)で十分である。このうち呼吸時に噴霧されたものは利用されないと考えられるし、吸入におけるロス、再呼出される量(Heubner¹⁹⁾によると50

～80%)を考えると体内にとり入れられたウイルス量は普通不活化ワクチンとして使われている量の少くとも1/100以下であろう。活性ウイルスが不活化ウイルスと比較して特に抗原性が高いとは考えられない²⁰⁾、又吸入による場合は注射による場合よりも能率が悪いと考えられるので²⁹⁾、もし増殖しないのであればこれだけの抗体上昇はみられないはずである。

又ワクチン接種者にS抗体の上昇がみられたことは、体内におけるIVの増殖を示すものと思われる²¹⁾。紫外線照射材料(S抗原は減少していないと思われる)を接種した場合にはS抗体が生じなかつたことより漿尿液中のS抗原によつて生じた抗体ではないと考えられる。

紫外線照射材料によつてはほとんど抗体上昇がみられなかつたことは活性ウイルスの必要を物語るものであり、人体内におけるウイルスの増殖を裏付けるものと考ええる。

再分離が出来なかつたからといってウイルスの完全増殖を否定出来ない。増殖しても早く消失するかも知れないし、下部気道においてのみ増殖するので分離が困難なのかも知れない。しかし不完全増殖の存在も否定出来ない。

7) 生ワクチン成功の条件

今日までのIV接種実験において、副作用少くして抗体上昇を得ることに失敗した主要原因として、1)株、2)接種方法、3)接種量、に対する考察の不足をあげることが出来る。

注入法を用いて抗体上昇がみられない場合、これを直ちに、用いた株はすでに免疫原性を失なつているからだと解釈したのは²²⁾³⁰⁾、正しくない。卵を相当長期継代した株でも吸入法によれば抗体上昇を得ることが出来るにもかかわらず、ソ連においては注入法によつて抗体上昇をおこす様な鼻咽頭粘膜に於て増殖力の強い株をつくることに専念した。

吸入法によつては発熱がさけられないと考えたのは¹⁸⁾、接種量及び株に対する考察が足りなかつたためであろう。今日のソ連に於てもこの考えは支配的だと考えられる³⁴⁾。

材料をかなり稀釈して接種した実験では抗体上昇のみられない場合があるが²²⁾²³⁾、この失敗の原因は多くは接種量にあると思われる。この原因を株の性質のみに帰するのは早計であろう。

要するに、吸入法による場合は病原性のない弱毒株で接種量が適切であること、注入法による場合は鼻咽

頭粘膜における増殖力が強く且つ病原性のない株でしかも材料は適当な感染価を持つこと、が必要であると思われる。

8) 従来報告された生ワクチンとの比較

インフルエンザ生ワクチンに関する研究はソ連以外のものは無いに等しいので、ソ連一派のものと我々のものと比較する。我々のワクチンの長所としては

- (1) 抗体上昇率は高率である
- (2) 接種方法がより簡単である
- (3) 副作用はソ連の場合より短期間であり鼻炎等の局所症状がほとんどない。
- (4) 接種材料がソ連の場合の 1/10 以下で十分であり、極めて経済的である。
- (5) 他人に感染することによつてウイルスが毒力を回復する可能性が少い。
- (6) 卵継代数に著しい制限がないので株製造、保存、ワクチンの製造等が容易である。
- (7) 人胎児組織培養等の特殊な操作を必要としない。

欠点としては

- (1) まれに高熱を出す場合がある。然し一過性であり接種量を下げることによりさけられる。
- などをあげることが出来る。

総 括

1) インフルエンザA2. 奥田及び衣笠の2株を孵化鶏卵漿尿腔に継代すると、奥田株3代及び衣笠株7代の材料では定型的に発病したが、100代前後継代することにより発病することなしに大多数の接種者に抗体上昇を示す弱毒変異株を得ることが出来た。

2) 奥田株に於ては88代及び143代の材料において著明な性質の差は認められなかつた。

3) 著明な副作用をみることにしに、4倍以上抗体上昇率を70~80%以上にすることが可能である。

4) 副作用として、頭痛、全身倦怠、違和感、発熱等の全身症状が主で、鼻炎等の局所症状は殆んどともなわなかつた。副作用の経過は極めて一過性で接種後24時間以内に始まり、持続は24時間以内であつた。

5) 接種方法としては注入法より吸入法がはるかに能率的である。

6) 効果は主に材料の感染価と吸入時間に関係し、材料の血球凝集価には殆んど関係がなく、噴霧の際混ざる大粒の水滴は材料消費を増加させるだけで効果を増加させなかつた。

7) 紫外線により不活化操作を加えたものを接種すると、対照群には著明抗体上昇がみられたにもかかわらず、殆んど抗体上昇がみられなかつた。

8) 約 10^9 EID₅₀/ml の材料を10秒間吸入させた場合、殆んど副作用がなく、大部分のものに血中 HI 抗体上昇を認めた。材料消費量は1人につき0.01mlで十分であつた。

9) 接種材料のEID₅₀が低い時は血清HI抗体上昇率が悪かつた。

10) 高い感染価を持つ材料を60秒吸入させると、発熱等の強い副作用があつた。

11) 副作用のあつたものにはかえつて HI 抗体上昇の認められないものが多かつた。

12) HI 抗体の上昇以外に、中和抗体、補体結合抗体の上昇がみられた。HI 抗体上昇のみられないものにも著しい補体結合抗体のみられる場合があつた。

13) 再分離は成功しなかつた。

14) 同居感染は認められなかつた。

15) 奥田及び衣笠の2株の間に著明な性質の差は認められなかつた。

16) 我々の得た弱毒株が人体内において増殖するかどうかについて考察された。

以上の結果より、我々の得た弱毒ウイルスはインフルエンザの予防に使用出来る見通しがついたものと考ええる。

謝 辞

この研究は Volunteers の積極的な協力と奥野教授の指導に負うところが大きい。鶏卵継代に当つては多くは同輩五十嵐章君と共に仕事をした。実験に際し、微研職員、阪大看護学校34年度入学生、国立刀根山病院看護学生の協力を得た。又予防接種に際し、国立大阪病院及び阪大病院の方々に検査材料を提供していただいた。予防接種は当研究室各位及び国立大阪病院藤田利和氏の協力によつた。多数の貴重な協力によりこの研究が一応の結果をまとめて報告する段階に到つたことは、全協力者と共に喜びとしたい。

投稿に当つて御校閲を賜つた奥野教授に深謝する。

REFERENCES

- 1) Andrewes, C. H., Laidlaw, P. P. and Smith, W. (1935): Influenza: Observations on the recovery of virus from man and on the antibody content of human sera. Brit. J. Exp. Path. **16**, 566-582.
- 2) Berlyant, M. L. (1960): Epidemiological

- effectiveness of live influenza vaccines of A 2 and A, Al, B types. *Vopr. Virusol.* No.1, 50-52. 3) Bull, D. R. and Burnet, F. M. (1943): Experimental immunization of volunteers against influenza B. *Med. J. Austral.* 1, 389-394. 4) Burnet, F. M. (1942): Influenza B: II. Immunization of human volunteers with living attenuated virus. (*Med. J. Austral.* 1, 673-674. 5) Burnet, F. M. (1943): Immunization against epidemic influenza with living attenuated virus. *Med. J. Austral.* 1, 385-389. 6) Burnet, F. M. and Bull, D. R. (1943): Changes in influenza virus associated with adaptation to passage in chick embryos. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 21, 55-69. 7) Burnet, F. M. and Foley, M. (1940): The results of intranasal inoculation of modified and unmodified influenza virus strains in human volunteers. *Med. J. Austral.* 2, 655-659. 8) Burnet, F. M. and Lush, D. (1938): Influenza virus on the developing egg: The antibodies of experimental and human sera. *Brit. J. Exp. Path.* 19, 17-29. 9) Chalkina, O. M. (1938): Immunological changes in the blood of men, vaccinated against the virus of epidemic influenza. *Arch. Sci. Biol. St. Pétersb.* 52, 126-131. 10) Deuchman, G. I., Grigorieva, A. G. and Venustov, N. V. (1958): The effect of concentration of live virus in the anti-influenza vaccine on its immunogenic activity. *Vopr. Virusol.* No. 6, 357-362. 11) Francis, T., Jr. (1940): Intranasal inoculation of human individuals with the virus of epidemic influenza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 43, 337-339. 12) Francis, T., Jr., M. D., F. A. P. H. A., Harold, E., Pearson, M. D., Jonas, E., Salk, M. D., Philip, N. and Brown, M. D. (1944): Immunity in human subjects artificially infected with influenza virus, Type B. *Am. J. Publ. Health* 34, 317-334. 13) Francis, T., Jr., Salk, J. E., Pearson, H. E. and Brown, P. N. (1944): Protective effect of vaccination against induced influenza A. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 55, 104-105. 14) 福見秀雄 Personal communication. 15) Hale, W. H. and McKee, A. P. (1945): Intracranial toxicity of influenza virus for mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 59, 81-84. 16) Henle, W. and Henle, G. (1945): Observations on the toxicity of influenza viruses. *Science* 102, 398-400. 17) Henle, W., Henle, G. and Stokes, J., Jr. (1943): Demonstration of efficacy of vaccination against influenza type A by experimental infection of human beings. *J. Immunol.* 46, 163-175. 18) Henle, W., Henle, G., Stokes, J., Jr. and Maris, E. P. (1946): Experimental exposure of human subjects to viruses of influenza. *J. Immunol.* 52, 145-165. 19) Heubner, W. (1925): Über Inhalationsapparate. *Klin. Wehnschr.* 44, 2099-2102. 20) Hirst, G. K., Rickard, E. R., Whitmann, L. and Falsfall, F. L. (1942): Antibody response of human beings following vaccination with influenza viruses. *J. Exp. Med.* 75, 495-511. 21) Hoyle, L. and Fairbrother, R. W. (1937). Antigenic structure of influenza viruses; The preparation of elementary body suspensions and the nature of the CF-antigen. *J. Hyg., Camb.* 37, 512-520. 22) Isaacs, A., Negroni, G. and Tyrrel, D. A. J. (1957): Infection of volunteers with asian influenza virus. *Lancet* 2, 886-887. 23) Isaacs, A. and Roden, A. T. (1956): Administration of live influenza virus to volunteers. *Lancet* 2, 697-699. 24) Mauson, J. and Swan, C. (1943): Intranasal vaccination of humans with living, attenuated influenza virus strains. *Med. J. Austral.* 1, 394-399. 25) Mikulinskaya, R. M. et al. 1959: A study on the epidemiological effectiveness of influenza vaccination in Kharkov in October 1957. *Vopr. Virusol.* No. 4, 407-411. 26) Ogeinik, I. I. and Yagodinsky, V. N. (1960): An experience of influenza vaccination in military unit. *Vopr. Virusol.* No. 2, 244-245. 27) 奥野良臣・安田慶輝・石井澄夫・菅井利治・榎原繁・植田亮・深江省三. (1957): 最近数年間の大阪に於けるインフルエンザについて. *日本公衆衛生雑誌*, 4, No. 11, 232-232. 28) Personnel of naval laboratory research unit No. 51. (1944): Experimental human influenza. *Am. J. Med. Sci.* 207, 306-314. 29) Quilligan, J. J., Jr. and Francis, T., Jr. (1947): Serological response to intranasal administration of inactive influenza virus in children. *J. Clin. Invest.* 26, 1079-1087. 30) Ritova, V. V. and Evstigneeva, N. A. (1960): Onvaccinal strains of influenza virus. *Vopr. Virusol.* No. 2, 172-178. 31) Salk, J. E. (1948): Reactions to concentrated influenza virus vaccines. *J. Immunol.* 58, 369-395. 32) Salk, J. E., Pearson, H. E., Brown, P. N. and Francis, T., Jr. (1944): Protective effect of vaccination against induced influenza B. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 55, 106-107. 33) Smirnova, M. F., Vasilieva, V. P., Shevchenko, L. F., Sereda, V. N. and Shaikhet, G. H. (1958): A study on the efficacy of anti-influenza vaccination. *Vopr. Virusol.* No. 2, 107-108. 34) Smorodintsev, A. A. (1957): A living anti-influenza vaccine and antiinfluenza serum for influenza prophylaxis and treatment. *Proceedings, Third International Meeting of Biological Standardization*, p. 97-101. 35) Smorodintseff, A. A., Tushinsky, M. D., Drobyshevskaya, A. I., Korovin, A. A. and Osetroff, A. I. (1937): Investigation of volunteers infected with the influenza virus. *Am. J. Med. Sci.* 194, 159-170. 36) Smorodintsev, A. A. and Zhdanov, V. M. (1957): Result and immediate

tasks of the study of live influenza vaccine. Vopr. Virusol. No.2, 67-72. 37) Unanov, S. S. (1959): Specific prophylaxis of influenza. Vopr. Virusol. No.1, 15-19. 38) 和気朗 (1955): ソヴェトのウイルス学 (Ⅰ)—インフルエンザを中心に—自然 **10**, 7月号, 38-44. 39) 和気朗 (1955): ソヴェトのウイルス学 (Ⅱ)—新しいインフルエンザワクチン—自然 **10**, 8月号, 36-45. 40) 和気朗 (1957): インフルエンザの生ワクチン. ソヴェト医学 **5**, No. 1, 13-17.

41) Zakstelskaya, L. Ya., Yakhno, M. A. and Efimova, V. A. (1957), Immunogenic properties of live influenza vaccine and course of influenza cases in the vaccinated. Vopr. Virusol. No.4, 213-219. 42) Zhdanov, V. M., Ritova, V. V., Orlova, A. V., Sokolova, N. N. and Golygina, L. A. (1957): The characteristics of influenza virus strains isolated in 1957. Lancet **2**, 735-736. (Vopr. Virusol. 1959, No.1, 19-23.)