

ブタにおけるトリ、ブタおよびヒトインフルエンザウイルスの伝播についての調査 —沖縄県のブタにおけるトリ、ブタおよびヒトインフルエンザウイルスの抗体調査—

大野 惇・糸数 清正・大城 直雅・久高 潤・安里 龍二
徳村 勝昌・石田 正年*・根路 銘国昭*

Study of Transmissions of Influenza Virus in Swine

—Serological Study of Avian, Swine and Human Influenza Virus Antibodies in Swine on Okinawa Island—

Atsushi OHNO, Kiyomasa ITOKAZU, Naomasa OSHIRO, Jun KUDAKA, Ryuji ASATO
Katsumasa TOKUMURA, Masatoshi ISHIDA and Kuniaki NEROME

要旨: 沖縄県内のブタにおける動物及びヒトウイルスの伝播について抗体調査を実施した。ヒトの間で今日も流行しているA/ソ連型を代表するA/Yamagata/32/89(H1N1)とA/ホンコン型を代表するA/Kitakyusyu/159/93(H3N2)ウイルスに対する肥育豚のHI抗体陽性率は、前者が7.0%、後者が13.5%であり、後者の方が約2倍高く、免疫応答も比較的高い傾向を示した。さらに、スペインかぜの子孫であるヒト由来のブタ型インフルエンザウイルスを代表するA/New Jersey/8/76(Hsw1N1)ウイルスに対しては61.5%と極めて高いHI抗体陽性率を示し、県内の肥育豚に高い割合で浸淫していることが明らかとなった。このことから、今後、さらに継続した監視とヒトへの遡上を調査する必要性が強く示唆された。また、今回使用した2株のトリ由来ウイルスに対する抗体は検知されず、トリウイルス遺伝子のブタへの侵入は調査した200頭のブタでは否定された。

Key words: Okinawa Prefecture, Swine, Influenza virus, Antibody

I はじめに

1976年米国ニュージャージー州フォートディックスでブタ型(Hsw1N1)インフルエンザウイルスがヒトの間で流行^{1) 2)}し、わが国のブタにおいても1977年以降ブタ型インフルエンザウイルスが蔓延するようになり^{3) 4) 5)}、各地でHsw1N1ウイルスが分離されるようになった。しかし、1978年に神奈川県⁶⁾、1980年に愛媛県⁷⁾および1989年と1990年に長崎県⁸⁾のそれぞれのブタインフルエンザ発症豚から、これまでのウイルスとは抗原型の異なるウイルスが分離され、遺伝子解析によって遺伝子集合型のH1N2型ウイルスであることが、Nerome et al.(1983, 1985)^{9) 10)}によって確認され注目されている。一方、ヒトの間で流行しているA型インフルエンザウイルスは、トリから供給されブタを経由して感染すると想定されており、トリとヒトウイルスの交雑機構が豚に残っていることが、新型ウイルス出現の必要条件となっている可能性が高い。このことから、ウイルスの保存場所として豚の役割が一層注目されるようになった^{11) 12)}。そこで、今回ブタに潜む可能性が高いと考えられているスペインか

ぜウイルスの子孫であるHsw1N1ウイルスの分布を調べ、さらに、トリやヒトウイルスのブタにおける浸淫を予備調査し、新型ウイルス流行の予測体制への一助にするために、県内のブタにおけるトリ、ブタおよびヒトインフルエンザウイルスの抗体調査を実施した。

II 材料および方法

表1に示すとおり、供試材料は1994年1月から3月までに沖縄本島南部のと畜場に搬入された県内産の肥育豚20頭を用い、地域的分布を比較するために沖縄本島を北部地域と中・南部地域に分けて実施した。

赤血球凝集阻止(hemagglutination inhibition:HI)試験には日本インフルエンザセンターより分与されたヒ

表1. 供試材料.

- | |
|--------------------------------------|
| 1. 調査期間: 1994年1月~3月 (3~4週間間隔で4回) |
| 2. 調査対象: と畜場に搬入された肥育豚 (6~7カ月令) |
| 3. 対象地域: 沖縄本島北部、中南部地域の2地域 |
| 4. 検体: 豚血清 (1地域25頭, 2地域, 4回, 合計200頭) |

* 国立予防衛生研究所

ト由来のブタ型インフルエンザウイルスとしてA/New Jersey/8/76(Hsw1N1), ヒト由来のインフルエンザウイルスとしてA/ホンコン型(H3N2)を代表するA/Kitakyusyu/159/93(H3N2)およびA/ソ連型(H1N1)を代表するA/Yamagata/32/89(H1N1), さらに, トリ由来のインフルエンザウイルスとしてA/Duch/Czeck/56(H4)およびA/Turkey/England/1/63(H7N7)のウイルス抗原5株を使用した(表2)。これらのウイルス抗原はすべて10日齢の発育鶏卵に接種し増殖させ, ホルマリンで不活化したものを抗原分析に供した。

ブタ血清中のインヒビターの除去はJensen(1961)¹³⁾のアラバマ法に準じ, 被検血清0.1mlに0.05mlの0.8%トリプシン溶液を加え56℃30分間加温し, これに, 0.3mlの1/90モルKIO₄試薬を加えた混合液を室温で60分間以上反応させ, 次いで, 0.3mlの1%グリセリン含食塩水を加えてKIO₄の反応を停止させた。さらに, 非特異

表2. 使用ウイルス抗原.

ヒト由来のインフルエンザウイルス	
A/Yamagata/32/89(H1N1), A/Kitakyusyu/159/93(H3N2)	
ヒト由来のブタ型インフルエンザウイルス	
A/New Jersey/8/76(Hsw1N1)	
トリ由来のインフルエンザウイルス	
A/Duch/Czeck/56(H4), A/Turkey/England/1/63(H7N7)	

的赤血球凝集物質を除くために, 0.25mlの100%鶏赤血球を加え全量を1mlにし, 室温で60分間放置した。その後, 鶏赤血球を2,000rpm 15分で遠心分離して上清をHI試験に供した。HI試験は4HA単位の抗原および0.5%鶏赤血球を用いてマイクロタイター法により実施した。HI価は抗原および赤血球液を加えた最終濃度で示し, 80倍以上を陽性とした。

III 結果

ヒト由来インフルエンザウイルス2株に対するHI抗体価の分布成績を表3に示した。200検体中HI抗体陽性頭数(陽性率)はヒト由来ウイルス2株のうち, A/Yamagata/32/89(H1N1)株に対しては14頭(7.0%), A/Kitakyusyu/159/93(H3N2)株に対しては27頭(13.5%)であり, 後者の方が約2倍抗体陽性率が高かった。また, A/Yamagata/32/89(H1N1)株の抗体価はほとんど80倍に集中しており, 全体的に免疫応答も低い傾向を示した。これに比べ A/Kitakyusyu/159/93(H3N2)株の抗体価は半数近くが160倍から640倍にあり免疫応答も比較的強い傾向を示した。これらのことから, ブタにおけるウイルスの保存の程度もA/ホンコン型に顕著であることが示唆された。

2株のトリ由来インフルエンザウイルスに対するHI抗体価の分布成績を表4に示した。A/Duch/Czeck/56(H4)株およびA/Turkey/England/1/63(H7N7)株の2株に

表3. A/Yamagata/32/89(H1N1) および A/Kitakyusyu/159/93(H3N2)に対するHI抗体価の分布.

Date	Area	Antigen A/Yamagata/32/89					Antigen A/Kitakyusyu/159/93							
		<40	40	HI titer 80	160	320	positive total (%)	<40	40	HI titer 80	160	320	640	positive total (%)
11, Janu	North	21		4			4/25(16)	17	3	3	1	1		5/25(20)
	South	24		1			1/25(4)	25						0/25(0)
	P.Sum	45		5			5/50(10)	42	3	3	1	1		5/50(10)
15, Feb	North	21	3	1			1/25(4)	22	1	2				2/25(8)
	South	25					0/25(0)	25						0/25(0)
	P.Sum	46	3	1			1/50(2)	47	1	2				2/50(4)
08, March	North	20	3	2			2/25(8)	24	1					0/25(0)
	South	18	3	4			4/25(16)	16	3	4	2			6/25(24)
	P.Sum	38	6	6			6/50(12)	40	4	4	2			6/50(12)
29, March	North	22	2	1			1/25(4)	24	1					0/25(0)
	South	20	4		1		1/25(4)	6	5	6	6	1	1	14/25(56)
	P.Sum	42	6	1	1		2/50(4)	30	6	6	6	1	1	14/50(28)
Total		171	15	13	1		14/200(7.0)	159	14	15	9	2	1	27/200(13.5)

Positive: HI titer 80 ≤

表4. A/Duch/Czeck/56(H4) および A/Turkey/England/1/63(H7N7)に対するHI抗体価の分布.

Antigen		A/Duch/Czeck/56				A/Turkey/England/1/63					
Date	Area	HI titer				positive total (%)	HI titer				positive total (%)
		<40	40	80	160		<40	40	80	160	
11,Janu	North	25				0/25(0)	25				0/25(0)
	South	25				0/25(0)	25				0/25(0)
	P.Sum	50				0/50(0)	50				0/50(0)
15,Feb	North	25				0/25(0)	25				0/25(0)
	South	25				0/25(0)	25				0/25(0)
	P.Sum	50				0/50(0)	50				0/50(0)
08,March	North	25				0/25(0)	25				0/25(0)
	South	25				0/25(0)	25				0/25(0)
	P.Sum	50				0/50(0)	50				0/50(0)
29,March	North	25				0/25(0)	25				0/25(0)
	South	25				0/25(0)	25				0/25(0)
	P.Sum	50				0/50(0)	50				0/50(0)
Total		200				0/200(0)	200				0/200(0)

表5. A/New Jersey/8/76(Hsw1N1)に対するHI抗体価の分布.

Antigen		A/New Jersey/8/76(Hsw1N1)								
Date	Area	<40	40	80	HI titer	positive total (%)				
					160	320	640	1280	2560	
11,Janu	North	3	4	6	5	4	0	3		18/25(72)
	South	25								0/25(0)
	P.Sum	28	4	6	5	4	0	3		18/50(36)
15,Feb	North	1	5	10	4	4	1			19/25(76)
	South	5	7	7	6					13/25(52)
	P.Sum	6	12	17	10	4	1			32/50(64)
08,March	North	3	3	3	5	6	2	3		19/25(76)
	South	1	2	2	2	8	8	1	1	22/25(88)
	P.Sum	4	5	5	7	14	10	4	1	41/50(82)
29,March	North	4	5	4	6	2	4			16/25(64)
	South	5	4	5	7	1	2	1		16/25(64)
	P.Sum	9	9	9	13	3	6	1		32/50(64)
Total		47	30	37	35	25	17	8	1	123/200(61.5)

Positive:HI titer 80≦

対するHI抗体は今回調査したブタ200頭からは検出されず、調査したいずれのブタにもトリ由来ウイルスの侵入を受けていないことが明らかとなった。

表5にブタ型インフルエンザウイルスに対するHI抗体価の分布成績を示した。A/New Jersey/8/76(Hsw1N1)株に対しては123頭(61.5%)と非常に高いHI抗体陽性率を示した。また、51頭ものブタが320倍以上のHI抗体を保有しており、さらに、1,280倍以上の極めて高い抗体価を保有したブタが9頭も検出された。A/New Jersey/8/76(Hsw1N1)株について図1~4に地域別・採取日別、

図5に全体のHI抗体価の分布状況を示し、図6にHI抗体価の経時的分布を示した。地域別の抗体分布状況を比較してみたが、北部地域と中・南部地域では全体的に有意差は見られなかった。しかし、1月より2月、2月より3月と経時的にHI抗体陽性率が上昇していく傾向にあった。このように、A/New Jersey/8/76(Hsw1N1)株に対するHI抗体価の分布は特に注目すべき挙動を示しており、沖縄県内のブタのなかでブタ型インフルエンザウイルスが活発な動きをしていることが示された。

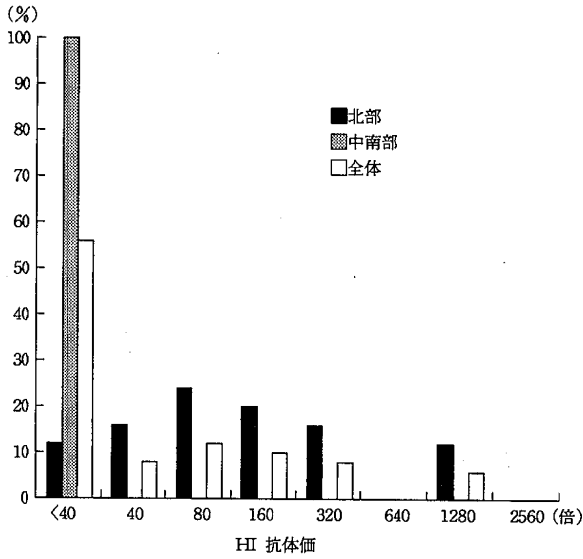


図1. A/New Jersey/8/76(Hsw1N1)に対するHI抗体価の分布(1月11日).

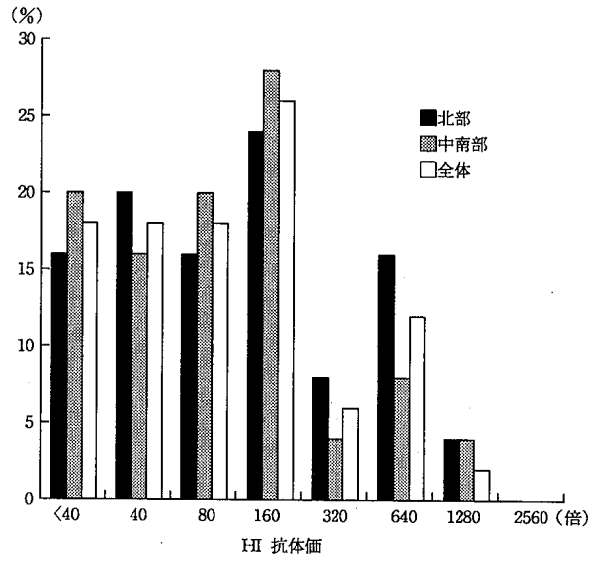


図4. A/New Jersey/8/76(Hsw1N1)に対するHI抗体価(3月29日).

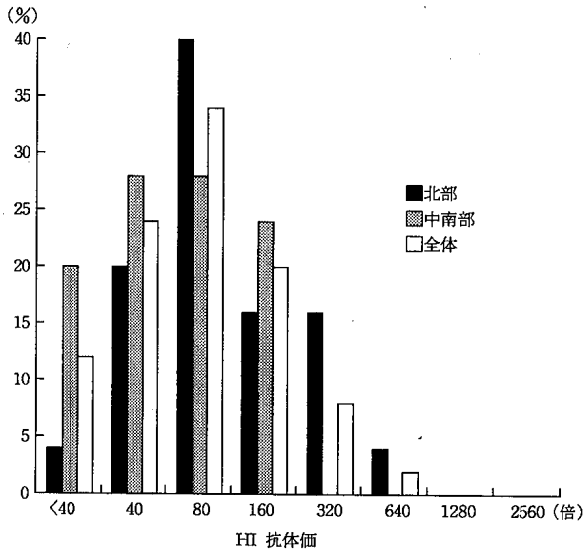


図2. A/New Jersey/8/76(Hsw1N1)に対するHI抗体価の分布(2月15日).

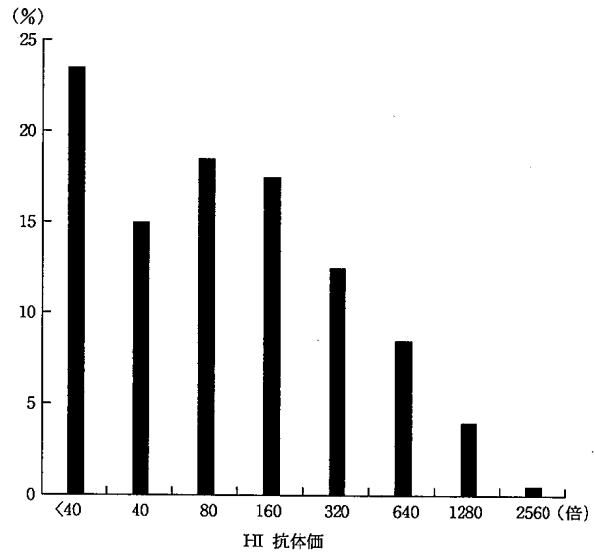


図5. A/New Jersey/8/76(Hsw1N1)に対するHI抗体価全体の分布.

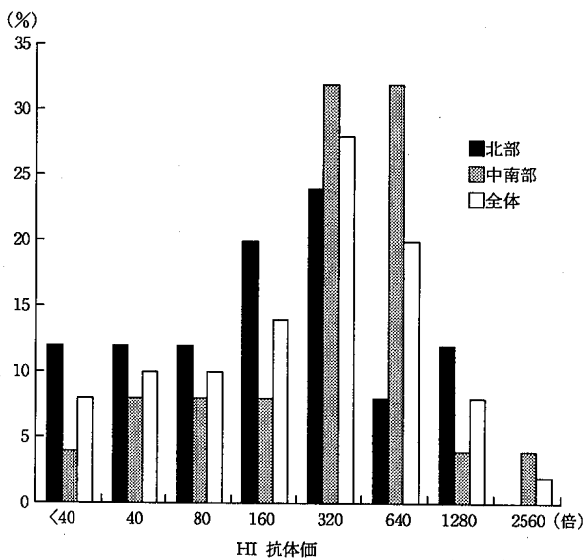


図3. A/New Jersey/8/76(Hsw1N1)に対するHI抗体価の分布(3月8日).

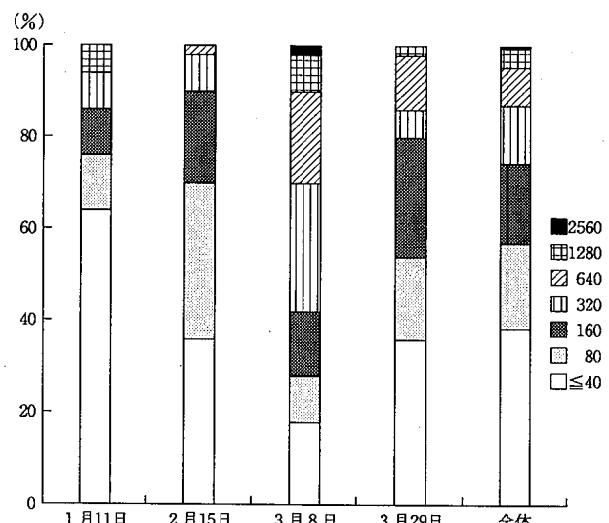


図6. A/New Jersey/8/76(Hsw1N1)に対するHI抗体価の経時的分布.

IV 考察

今回の調査結果より、ヒトで流行しているソ連型とホンコン型は比較的低い抗体保有率であるがブタに伝播しており、変異を強く抑えられて保存されている可能性が示唆された。しかし、これらのブタにおけるHI抗体価の分布が高くないことや、ブタの飼育地におけるヒトとの接触が極めて限られていることから、ヒト型ウイルスの一過性の感染も否定できない。いずれにしろ、ヒトに流行しているウイルスは明らかにブタに感染していることは事実であり、今後のウイルス分離による変異型ウイルスの特質もヒト型ウイルスの流行予測を実施していく上で重要であると思われる。

最近、イタリア地方のブタにトリ型インフルエンザウイルスの拡大が確認され、新型ウイルスの登場にも高い注目を集めている。これを裏付けるかのように、オランダの子供で発見されたホンコン型ウイルスの中にトリ型ウイルスの遺伝子が確認されている。このことを予備調査するため、沖縄県のブタにおけるトリ由来ウイルス2株に対するHI抗体分布を調べたが、観測点の限られたブタの中にはこの知見が確認できなかった。今後より多くのウイルス抗原とブタの調査頭数を増やすことによる継続した調査の必要があると考えられる。

しかし、ヒト由来のブタ型インフルエンザウイルスでスペインかぜの子孫ウイルスを代表し、米国で実際にヒトで流行したA/New Jersey/8/76(Hsw1N1)株に対する抗体保有率と抗体価の分布は非常に高く、また、地域別の抗体分布状況についても有意な地域差は見られず、沖縄県内のブタにブタ型インフルエンザウイルスに対する抗体が広く分布していることが明らかとなった。これらのことから、すでに沖縄県内にこのウイルスが侵入し、伝播力を増してブタからブタへと濃厚なウイルス感染をくり返していることが強く示唆された。さらに、このような高いHI抗体保有率は他府県の調査報告^{8) 14) 15)}では見あたらないことから、沖縄県における活発な動きが何を意味しているのか、また、すでにヒトに侵入をはじめているのかも含めて、今後継続的な調査の中でウイルスの存在を証明するために積極的なブタからのウイルス分離が不可欠であると考えられる。

<謝辞>

稿を終えるにあたり、本調査を行なう際に検体採取にご協力いただきました沖縄県中央食肉衛生検査所大城孝喜所長、同検査第2課喜久嶺政男課長および同検査第2課の諸先生方に深謝いたします。

なお、本研究は平成6年度厚生省科学研究費特別研究事業新型インフルエンザウイルス流行予測についての調査研究班、班長（主任研究者）：国立予防衛生研究所 根路銘国昭、班員（分担研究者）：沖縄県衛生環境研究所 比嘉政昭により行った。

V まとめ

沖縄県のブタにもヒトで流行しているインフルエンザウイルスが伝播していることが明らかとなった。この傾向は、ソ連型ウイルスよりホンコン型ウイルスに強いことが示された。また、トリ型ウイルスに対する感染の形跡は確認できなかった。スペインかぜの子孫であるブタ型ウイルスの伝播は予想以上のものであった。今回調査したブタの61%強がブタ型ウイルスに汚染されていることが明らかとなった。他府県と比較しても、抗体価の高さと抗体分布の数は群を抜くものであり、今後、このウイルスの伝播力が強くなりつつあることを示すものと受けとめて調査すべきであろう。

1. ヒト由来株のHI抗体陽性率は、A/Yamagata/32/89株が7.0%、A/Kitakyusyu/1/93株が13.5%で、後者の方が約2倍高く、また、免疫応答も比較的強い傾向を示した。
2. トリ由来の2株に対するHI抗体は検出されず、今回の調査ではトリ型ウイルスの侵入は否定され感染は確認されなかった。
3. ブタ型ウイルスA/New Jersey/8/76株に対するHI抗体陽性率は61.5%と高率で、また、抗体価が1,280倍以上もの極めて高い価を示したブタが9頭おり免疫応答も非常に強いことから、高い頻度でブタ型ウイルスが浸淫していることが示唆された。
4. 今後、継続的な調査の中で積極的なブタからのウイルス分離が必要である。

VI 参考文献

- 1) Palese, P. and Schulman, J. L. (1976) RNA pattern of swine influenza virus isolated from man is similar to those swine influenza viruses. *Nature*, 256:528.
- 2) Goldfield, M., Bartley, J. D., Pizzuti, W., Bluck, H. C., Altman, R. and Halperin, W. E. (1977) Influenza in New Jersey in 1976: isolation of influenza A/New Jersey/76 virus at Fort Dix. *J. Infect. Dis.*, supplemental

- issue, 136:s347.
- 3) 芝田充男・篠川至・庭山清八郎・岩瀬勇雄 (1978) Aブタ1型インフルエンザウイルスの分離と疫学調査. 日本医事新報, 2841:43-49.
 - 4) Sugimura, T., Ogawa, T. and Tanaka, Y. (1980) Res. Vet. Sci., 31:345.
 - 5) Nerome, K., Ishida, M., Oya, A. and Oda, K. (1982) The possible origin H1N1(Hsw1N1) virus in the population of Japan and antigenic analysis of the isolates. J. gen. Virol., 62:171.
 - 6) Sugimura, T., Yonemochi, H., Ogawa, T. and Tanaka, Y. (1980) Arch. Virol., 66:271-274.
 - 7) Yasuhara, H., Hirahara, T. and Nakai, M. (1983) Microbiol. Immunol., 27:43-50.
 - 8) 林和彦・橋本哲二・向原要一・久住呂毅・毛利卓 (1993) 長崎県におけるH1N2型ウイルスによる豚インフルエンザの流行. 日獣会誌, 46:459-462.
 - 9) Nerome, K., Sakamoto, S., Yano, N., Yamamoto, T., Kobayashi, S., Webster, R. G. and Oya, A. (1983) Antigenic characteristics and genome composition of a naturally occurring recombinant influenza virus isolated from pig in Japan. J. gen. Virol., 64:171.
 - 10) Nerome, K., Yoshioka, Y., Sakamoto, S., Yasuhara, H. and Oya, A. (1985) Characteristics of a swine recombinant influenza virus isolated in 1980 : recombination between swine and the earliest Hong Kong (H3N2) viruses. Vaccines 3, supplement: 267.
 - 11) Nerome, K., Kanegae, Y., Yoshioka, Y. and Oya, A. (1991) J. gen. Virol., 72:693-698.
 - 12) Kanegae, Y., Sugita, S., Shortridge, K.F., Yoshioka, Y. and Nerome, K. (1994) Origin and evolutionary pathways of the H1 hemagglutinin gene of avian, swine and human influenza viruses: cocirculation of two distinct lineages of swine virus. Arch. Virol., 134:17-28.
 - 13) Jensen, K. E. (1961) Diagnosis of influenza by Serologic methods. Amer. Rev. Resp. Dis., 83:120-124.
 - 14) 石田正年・根路銘国昭・中山幹男・大谷明・須田光男・三島洋・古橋圭介・小林一郎・小田和正 (1979) 日本におけるブタ型インフルエンザの浸淫. 臨床とウイルス, 7:189-194.
 - 15) 森田盛大・庄司キク・原田盛三郎・鈴木正則・斉藤志保子・石田名香雄 (1980) 秋田県内の豚におけるA型インフルエンザウイルスの感染状況. 秋田県衛生科学研究所報, 24:105-109.