

1988-89に分離されたインフルエンザA(H1N1)型 ウイルスのウイルス学的及び血清学的検討

跡部里香 小澤 茂 中村美奈子 三木 康

Virological and Serological Study on Influenza Virus A(H1N1) isolated in 1988-1989

Rika ATOBE, Shigeru OZAWA, Minako NAKAMURA
and Yasushi MIKI

本県では、1989年1月から3月にかけてインフルエンザ様の流行があり、集団かぜが発生した6校(A~F)及び医療機関で採取した検体について検査を行った結果、インフルエンザA(H1)型ウイルスの感染によるものと判明した。インフルエンザウイルスの分離の際の指標としてヒヨコ血球とモルモット血球を用いて、赤血球凝集活性(HA活性)を測定している。しかし、1988-89年流行期に分離された株(以下89年分離株と略す)は、モルモット血球ではHA活性を測定することができたが、ヒヨコ血球では凝集が認められなかった。そこで以前の分離株との相違を検討する目的で、今回分離されたウイルスと、1981年に分離されたインフルエンザA(H1)型ウイルスについてHA活性を比較した。

従来、血清検査においては主として赤血球凝集抑制(HI)反応を用い、複雑な操作を必要とする中和(NT)反応は行っていない。今回は、集団発生で得られた被検血清についてHI反応だけでなく、NT反応、補体結合(CF)反応及び一元放射補体結合(SRCF)反応を実施し、若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

1. ウイルス分離材料

1月から3月にかけて集団発生があった6校で採取した60名の咽頭ぬぐい液、及び県内医療機関で採取した咽頭ぬぐい液を用いた。

2. 被検血清

1月から3月かけて集団発生があった6校54名から採取した対血清を用いた。

3. ウイルス分離

ウイルス分離は、MDCK細胞(最終濃度5 μ g/mlアセチルトリプシン添加イーグルMEM培地使用)を用い、34 $^{\circ}$ C 7日間培養した。インフルエンザウイルスの分離の際の指標としては、0.33%生後24時間ヒヨコ血球と0.33%モルモット血球を用い、赤血球凝集(HA)反応を行った。陰性の検体については盲継代を行い、再びHA活性が陰性であった場合にはウイルス分離陰性とした。

分離ウイルスは国立予防衛生研究所に送付し、抗原分析を依頼した。

4. HA活性の比較

HA活性の比較に用いたウイルスは、1981年に分離されたA/山梨/149/81(H1)、A/山梨/193/81(H1)、A/山梨/195/81(H1)、A/山梨/201/81(H1)及び、89年に分離されたA/山梨/29/89(H1)、A/山梨/31/89(H1)、A/山梨/53/89(H1)の計7株である。この7株をMDC K細胞に継代するとともにヒヨコ血球とモルモット血球でHA反応を行い、これを2代から10代まで続けた。

5. 血清抗体価の測定

血清は武田薬品製のRDEで4倍に希釈し、37 $^{\circ}$ C 18時間放置した後、50%ヒヨコ血球と50%モルモット血球で血清中の血球に対するインヒビターを除去し、非働化したものを被検血清とした。

HI反応は、ウイルス、リケッチア検査¹⁾の方法に準じて行った。抗原には、デンカ生研製のワクチン株A/山形/120/86(H1N1)と衛研分離株を使用した。

SRCF反応は、デンカ生研のSRCFプレート生研(S抗原)を用いた。SRCF単位は、

SRCF単位 (u)

$$= \frac{\text{被検血清で得られた不溶リングの(直径)}^2}{\text{参照血清で得られた不溶リングの(直径)}^2} \times \text{参照血清のSRCF(u)}$$

で求めた。

CF反応は、デンカ生研 (S抗原) を用いマイクロタイター法²⁾に準じて行った。

NT反応は、100TCID₅₀に調製した抗原と希釈血清を34℃ 1時間中和した後、マイクロプレートで培養したMDCK細胞に接種し34℃で1時間吸着させた。1回ハンクス液で洗浄した後、イーグルMEM維持培地 (最終濃度 2 μg/ml アセチルトリプシン添加) を加えて34℃で4日間培養した。トリプシン存在下で培養しているためCPEが不明瞭だったので、0.33%モルモット血球を用いてHA反応を行い終末点を測定した。抗原としてはA/山梨/51/89(H1)を用いた。

結果および考察

1. ウイルス学的検討

(1) 分離ウイルス株の抗原性状

分離されたウイルスについて抗原性状を比較するため、ワクチン株であるA/山形/120/86(H1N1)と、A/福島/2/88(H1N1)に対するフェレットの抗血清を用いた抗原分析の結果を表1に示した。A/福島/2/88(H1N1)の抗血清では、Homologousとほとんど同様の高HI価で分離株を抑制していた。一方A/山形/120/86(H1N1)

表1 インフルエンザウイルスA(H1)型の抗原変異

ウイルスの型 A(H1N1)	変異の程度	株数(分離比%)
A/山形/120/86	同じHI価か 2倍程度変異	18 (67)
	4倍程度変異	6 (22)
	8倍程度変異	2 (7)
	16倍程度変異	1 (4)
A/福島/2/88	同じHI価か 2倍程度変異	27 (100)

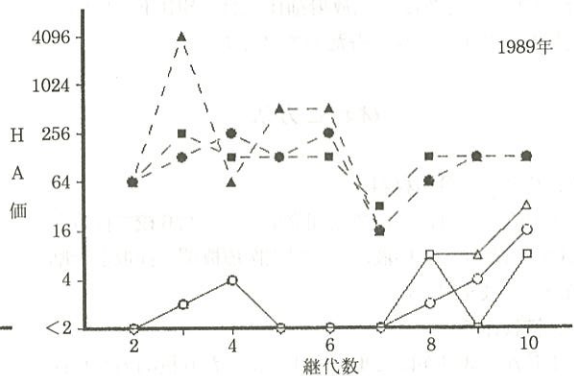
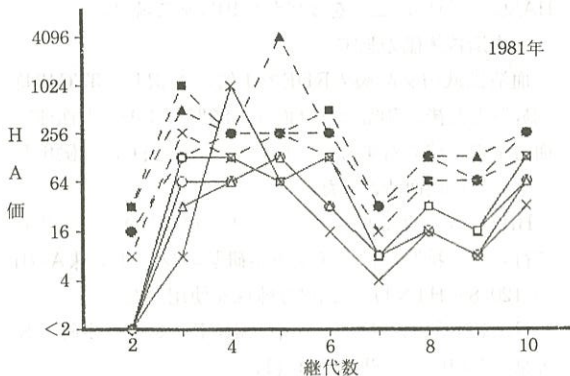


図1 分離ウイルス株のHA活性

—ヒヨコ血球
---モルモット血球

抗血清に対し、同じHI価または2倍程度変異した分離株が67%、4倍程度変異した分離株が22%であった。以上のことから、89年分離株はシーズンを通してA/福島/2/88(H1N1)に抗原性が類似し、またワクチン株A/山形/120/86(H1N1)と著しい抗原性のずれはなかったと考えられる。ただ、ワクチン株に対して8~16倍程度と大きく変異した分離株が11%あり、このほとんどがシーズン前半に葦崎保健所管内で分離されたものであった。このことから、県下全体に流行したウイルスとは異なったルートにより侵入し、流行したウイルスがあったのではないかと考えられる。

(2) 分離ウイルス株のHA活性

81年分離株と89年分離株の継代におけるHA価の変動を図1に示した。81年分離株の2代目は、89年に比べてモルモット血球では低いHA活性を示し、ヒヨコ血球に対してはHA活性が認められなかった。これは、分離時から今まで凍結保存してあった2代継代株を融解して用いたためと思われる。しかし81年分離株は3代継代すると、2種の血球に対するHA活性が共に上昇し、4~10代継代株ではモルモット血球で128~256倍の価を示し、ヒヨコ血球ではそれよりも1~2管低い価を示した。これに対し、89年分離株はモルモット血球では常に高いHA価を示していたが、ヒヨコ血球ではほとんどHA価の上昇がみられず、中には10代まで継代しても8倍以下のものもあった。

初代インフルエンザウイルスがニワトリ血球に対してHA活性がないことは、以前からO-D変異として知られている³⁾が、2~3代継代するとほとんどの分離株がモルモット血球と同程度のHA活性を、ヒヨコ血球に対して示すようになる。村上ら⁴⁾、松本ら⁵⁾も、われわれと同様に、1988-89シーズンに分離された株には、ニワトリ血球にHA活性を持たない株が存在していることを報告しており、この現象は1988-89冬期流行株の1つの特徴であると考えられる。また松本らはこの原因について、

分子構造の予備調査からレセプターに関するアミノ酸の変化ではなく、レセプター結合領域周辺の分子構造の立体的変化のためではないかと示唆している。

(3) ワクチン接種の有無とウイルス分離

今回検査を行った6校のうちウイルス分離陽性の者が多かったB、C校では、ワクチン接種者が被検者の半数を占めていた。ワクチン接種の有無とウイルス分離の関連性をみると、ワクチン接種を行った感染確認者（ウイルス学的、血清学的検査による確認者）6名中ウイルス分離陽性者3名（50%）、未接種の感染確認者10名中ウイルス分離陽性者9名（90%）であり、ワクチン接種を行った者の方がウイルスの分離率が低かった。

以上のことから今回の流行では、ワクチンが咽頭でのウイルスの増殖を抑えて、伝播を弱めた可能性が示唆さ

れる。これについて今後のインフルエンザの流行に際して、例数を増やして詳細に検討したいと考えている。

2. 血清学的検討

1988-89シーズンのインフルエンザA(H1N1)型ウイルスの流行は全般に小規模であった。集団かぜの報告は89年になってから始まり、1月第3週～2月第1週にピークを示した。集団かぜの報告のあった学校のうち、インフルエンザA(H1)型ウイルスによる流行があった6校（A～F）の検査結果を表2に示した。また6校のうち、抗体の上昇に違いがみられたB、C校の検査結果を図2に示した。

B校ではワクチン株、分離株のどちらかを抗原に用いても大幅なHI抗体価の上昇が認められたが、C校ではワクチン株を抗原に用いると、ウイルスが分離されてい

表2 1988-89年 集団かぜ検査結果

発生月日 (1989)	ウイルス 分離陽性者数 (%)	血 清 学 的 検 査						インフル エンザA型 感染確認者数 (%)
		4倍以上の抗体上昇者数 (%)				C F抗体価 上昇者数 (%)	S R C F抗体価 上昇者数 (%)	
		H I 反応		N T 反応				
		ワクチン株	分 離 株					
A. 1.23	3/11 (27)	5/ 9(56)	8/ 9(89)	—	8/ 9(89)	—	8/11(73)	
B. 1.30	7/10 (70)	9/10(90)	9/10(90)	10/10(100)	9/10(90)	—	10/10(100)	
C. 2. 2	5/10 (50)	2/10(20)	4/10(40)	4/10(40)	5/10(50)	4/10(40)	5/10(50)	
D. 2. 3	3/10 (30)	1/ 9(11)	1/ 9(11)	3/ 9(33)	5/ 9(56)	4/ 9(45)	6/10(60)	
E. 2.21	1/ 9 (11)	1/ 7(14)	1/ 7(14)	—	2/ 7(29)	2/ 7(29)	3/ 9(33)	
F. 3. 8	2/10 (20)	4/ 9(45)	4/ 9(45)	—	3/ 9(33)	4/ 9(45)	4/10(40)	
計	21/60 (35)	22/54(41)	27/54(50)	17/29(59)	32/54(59)	14/35(40)	36/60(60)	

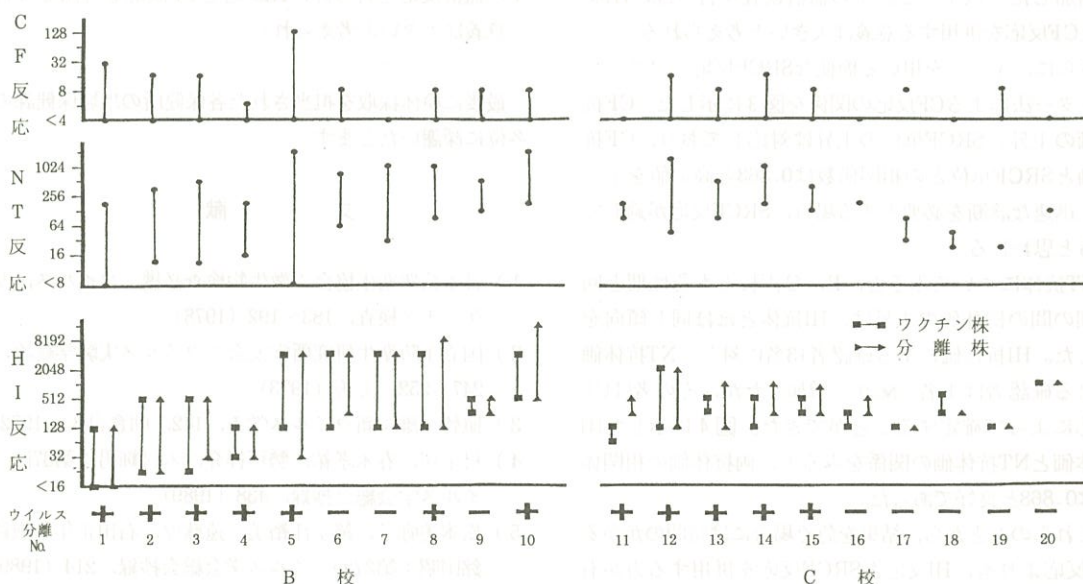


図2 B、C校の集団かぜ検査結果

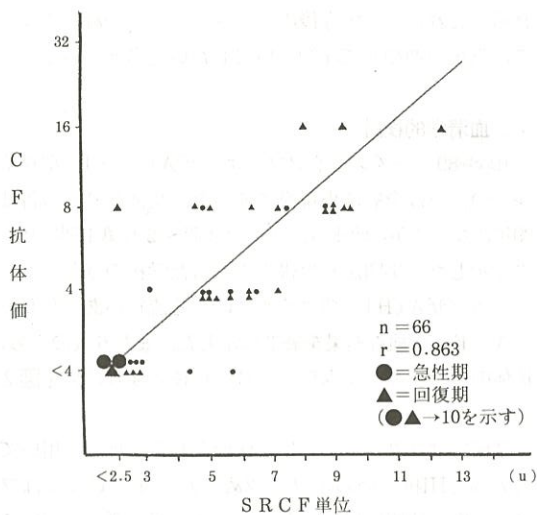


図3 C F 反応と SRCF 反応の関係

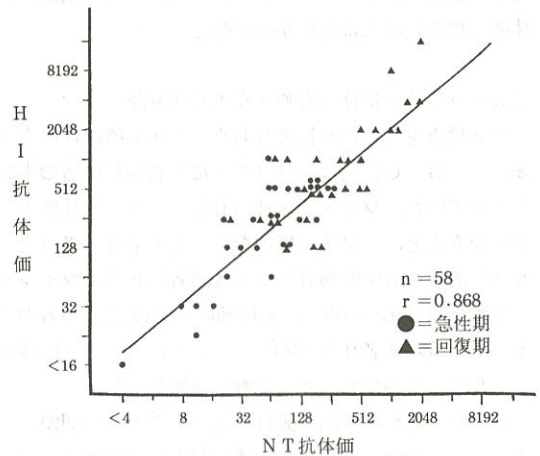


図4 H I 反応と N T 反応の関係

も、HI抗体価の有意な上昇が認められた者は少なかった。しかし抗原に分離株を用いることにより、血清学的確認者が2名増加した。A～F校全体でも表2が示すように22名(41%)から27名(50%)と増加した。

CF反応を併用してみると図2に示すように、HI反応では急性期から回復期の上昇が2～4倍と低い者(No.4, 9, 14, 15, 19)を、CF反応を行うことによって感染者と確定できた。一方No.7のように、HI, NT抗体価が大きく上昇しているにもかかわらず、ウイルス分離陰性でCF抗体価が全く上昇しなかった者もあり、この場合はCF反応だけでは感染者と確認できなかった。またA～F校全体でも表2に示すように、HI反応では27名(50%)だった感染確認者がCF反応では32名(59%)に増加した。以上のことから血清検査を行う際、HI反応とCF反応を併用する意義は大きいと考えられる。

さらに、キットを用いる簡便なSRCF反応とマイクロタイター法によるCF反応の関係を図3に示した。CF抗体価の上昇とSRCF単位の上昇は対応しており、CF抗体価とSRCF単位との相関係数は0.863と高い値を示した。迅速な診断を必要とする場合、SRCF反応が適していると思われる。

NT抗体についてみると、B, C両校とも急性期と回復期の間の抗体価の上昇は、HI抗体とはほぼ同じ傾向を示した。HI抗体価による確認者13名に対し、NT抗体価による確認者は1名(No.9)増加したが、その者はCF反応によって確定することができた。図4に示したHI抗体価とNT抗体価の関係をみると、両抗体価の相関係数は0.868と良好であった。

これらのことから、結果を急ぐ場合には時間のかかるNT反応よりも、HI反応とSRCF反応を併用する方が有用であると考えられる。

まとめ

1988-89年に流行したインフルエンザA(H1)型ウイルスについて種々のウイルス学的、血清学的検査を行った結果、以下の知見を得た。

1. 89年に分離されたウイルスは、ヒヨコ赤血球では赤血球凝集が認められず、10代継代した後もHA活性の有意な上昇は認められなかった。
2. 89年に分離されたウイルスの多くは、抗原性がワクチン株A/山形/120/86(H1N1)と類似していた。またA/福島/2/88(H1N1)と同タイプであった。
3. HIとNT, CFとSRCFにはそれぞれ良好な相関関係がみられた。
4. 血清反応を行う際、HI反応とCF反応を併用して行う意義は大きいと考えられた。

最後に検体採取を担当された各保健所の地域保健課の各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 日本公衆衛生協会：微生物検査必携 ウイルス，リケッチア検査，183～192(1978)
- 2) 国立予防衛生研究所学友会：ウイルス実験学総論，247～252，丸善(1973)
- 3) 植竹久雄：新ウイルス学I，142，朝倉書店(1972)
- 4) 村上司，春木孝祐，勢戸祥介，木村輝男：第37回ウイルス学会総会抄録，438(1989)
- 5) 松本美弥子，鐘ヶ江裕美，遠藤淳，石田正年，根路銘国昭：第37回ウイルス学会総会抄録，214(1989)