

Relationship between Trypsin-dependent Replication and Antigenic Variation of Influenza B Viruses Newly Isolated from Recent Epidemic

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7901

B型インフルエンザ流行分離ウイルス株のトリプシン 依存性増殖と抗原性変異の関連性

金沢大学がん研究所ウイルス部 (主任: 波田野基一教授)

飯 田 英 侃

(昭和61年9月9日受付)

従来、頻用されている発育鶏胎児 (developing chick embryo, DCE) 以外に、イヌ腎由来 MDCK 細胞 (MDCK cells, M) 及び M にトリプシン (trypsin, T) を添加した系 (MDCK plus trypsin, MT) を用い、1981年、福井県流行の風邪様疾患から、総計 42 株の B 型インフルエンザウイルスを分離した。分離ウイルス株の赤血球凝集素 (hemagglutinin, HAnin) 抗原性は大部分がワクチン標準株のそれに近かったが、MT 系分離の B/福井/356/81 と B/福井/363/81 の両株は標準株と異なっていた。そこで、B/福井/363/81 株の MT 系で、径の小さなブラック (1~2 mm) と大ききブラック (3~4 mm) よりウイルスクローンをそれぞれ分離して SP および LP 株とした。これら両クローン株の MT 系増殖後の HAnin 抗原性をみると、SP 株では、末クローン化親株と同じく、標準株とは異なっていたが、LP 株では標準株のそれに近かった。一方、両株の MT と M 系での増殖性を比べると、MT 系では両株ともほぼ同じ高い増殖性を示した。しかし、M 系での SP 株増殖は微々たるもので、MT 系におけるその約 $1/10^6$ に過ぎないのに、M 系での LP 株増殖は MT 系におけるそれと同じ程度によく増殖した。即ち、SP 株の増殖には T が必須で、LP 株は逆に T 非依存性であった。SP と LP 株間にみられた HAnin 抗原性の差をさらに、HAnin 蛋白を指令するウイルスゲノム RNA 分節の電気泳動度として比較した。その結果、両株由来の HAnin RNA 分節には本法で検出し得る差は見出せなかった。しかしながら、ウイルス増殖、放出に関係するといわれる neuraminidase (NA) 蛋白を指令するウイルスゲノム RNA 分節には、両株間で差があり、SP 株の NA 活性が実際に LP 株の約 1/2 という事実と有意に対応すると思われた。以上の結果から、1981年、福井県での B 型インフルエンザ流行は、少なくとも 2 種の異なる抗原性ウイルスによる混合感染が考えられた。そして、上記、SP 及び LP 両株類似ウイルスが同一試料に混在した場合、宿主細胞及び継代条件の差により、増殖性の差とも相まって、HAnin 抗原性や NA 活性の宿主による選択変異の起こる可能性が示唆された。

Key words B 型インフルエンザウイルス, トリプシン依存性, 赤血球凝集素, 抗原性, ウイルス RNA 分節

インフルエンザウイルスは、その特徴的なウイルス内部蛋白即ち、ribonucleoprotein (RNP) および matrix protein の抗原性の違いによって A, B および C の三つの型に分類される¹⁾。これらのインフルエンザウイルスによって引き起こされる感染症“インフルエンザ”の流行は、ウイルス感染時における宿主の免疫程

度やウイルスの抗原変異の大きさにより規模は一様ではないが、ほぼ毎年ヒトの間で繰り返されている。世界的規模で起こる大流行 (pandemic) は、主として A 型においてより顕著に認められ、過去においてアジア風邪や香港風邪にみられたような大流行が、およそ 10 数年に一度の割合で繰り返されてきた。一方、B 型

Abbreviations: CPE, cytopathic effect; DCE, developing chick embryo; HA, hemagglutination; HAnin, hemagglutinin; HAI, hemagglutination inhibition; HAU, hemagglutination units; LP, B/LP (large plaque)/1/81; M, MDCK; MDCK cells, Mardin and Dardy canine Kidney cells; MEM, Eagle's minimum essential medium; MT, MDCK-trypsin;

インフルエンザウイルスは、1940年、Francis²⁾によりヒトインフルエンザの病原体として分離されたが、いまだA型ウイルスにみられるような劇的な抗原変異 (antigenic shift) は報告されておらず、抗原変異とインフルエンザ流行との関係はA型にみられるほど明確ではない。しかし、分離株の抗原分析の結果より、抗原決定基である血球凝集素 (hemagglutinin: HAnin) およびノイラミニダーゼ (neuraminidase: NA) での抗原変遷 (antigenic drift) はA型ウイルスと同様に生じていること³⁾が報告されている。

従来、自然界からのインフルエンザウイルスの分離には、一般に、株化細胞に比べ初代培養細胞の方がより高いウイルス感受性を示すことから、ハムスター、サルおよび子牛などの腎臓初代培養細胞が用いらてきた⁴⁾。しかしながら、飛田ら^{5)~7)}は、Mardin and Dardyによって樹立化されたイヌ腎臓細胞 (MDCK) が実験室内で継代されたAおよびB型インフルエンザウイルスの代表株、さらに自然界から新たに分離された流行株に対しても高い感受性を示すことを報告した。

著者は、このMDCK細胞を用い、1975年から現在までインフルエンザ流行時に自然界より数多くのインフルエンザウイルスを分離してきた。その結果、MDCK細胞のB型インフルエンザウイルスに対する感受性は発育鶏胎児 (developing chick embryo, DCE) に比べより高く、近年にみられた2回の流行時には高率にウイルス分離が見られ、自然界からのインフルエンザウイルス分離には極めて有益な細胞であることが示された⁸⁾⁹⁾。この様にインフルエンザウイルス分離には、通常DCEないしMDCK細胞を用いる方法が確立されているが、近年、使用細胞の違いにより、HA抗原に選択変異の生じることが報告され^{10)~12)}、従来のDCEのみの分離ではみられなかった問題が新たに提起されるようになった。著者も、最近のB型インフルエンザ流行時に、従来より行われているDCEに加え、MDCK細胞 (M) およびMDCK細胞-trypsin (MT) 系を用いてウイルス分離を行った。その結果、使用細胞の差および同一細胞での継代法の違いによりHAnin抗原に変異を起し、NA活性も変化したウイルスが分離できた。そこで使用した三つの系 (DCE, M および MT) による分離結果を述べるとともに、HAnin変異株の生物学的性状とウイルスゲノムRNAについて検討を行い、変異株の出現機序を明らかにせんとした。

材料および方法

I. 使用細胞と培養条件

MDCK細胞は国立公衆衛生院、飛田清毅博士により分与され、同氏の方法^{5)~7)}に従い培養調整した。すなわち、継代にはEagle's minimum essential medium (MEM) 培地に10%牛胎児血清を加えて培養した。ウイルス分離培地としては3倍量のアミノ酸と2倍量のグルコースを含むMEM培地にファンギソン (注射用アンホテリシン) (三共製薬) 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とトリプシン (1:250) (Difco製) を最終濃度15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になる様に添加し使用した。ウイルス分離継代に際し、MDCK細胞にトリプシンを添加した場合をMT系とし、トリプシン非添加の場合をM系とした。

II. ウイルス分離材料の調整

福井県下の各保健所管内の集団発生施設およびK小児科外来のインフルエンザ様疾患患者を対象に95名の咽頭うがい液 (8ml MEM) の採取を行い、1500 \times g, 30分の遠心後、上清に25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のファンギソンを加え、直ちに -70°C に凍結し、必要に応じて使用した。

III. MDCK細胞によるウイルス分離

MDCK細胞を用いた自然界からのインフルエンザウイルス分離には、2本の単層培養されたチューブ (15 \times 105mm) を用い、Dulbeccoのリン酸緩衝液、(phosphate-buffered saline) (PBS) pH 7.4で細胞面を1回洗浄し、それぞれ0.2mlの検体を接種した。吸着は 34°C で30分行い、PBSで細胞面を1回洗浄後、Tを含む維持液を1ml宛て加え、 34°C で静置培養し細胞変性効果 (cytopathic effect, CPE) の出現を観察した。分離ウイルスはすべてMT系で増殖させ -70°C で保存し、必要に応じて使用した。

IV. 発育鶏胎児 (DCE) によるウイルス分離

DCEによるウイルス分離には8~9日齢のDCEを使用し、1検体当たり5個を用いた。検体は、羊膜腔内と尿膜腔内にそれぞれ0.2mlずつ接種し 34°C で3日間培養した。ウイルス分離の確認は、羊水および尿液をそれぞれ採取し、0.5%のモルモットおよびニワトリ赤血球を用いた凝集反応を行い、管底像より判定した。2代継代後も血球凝集が認められない検体は分離陰性とした。分離ウイルスは、直ちに -70°C に凍結し必要に応じて使用した。

V. 使用ウイルス株と保存ウイルス株の調整

MOI, multiplicity of infection; NA, neuraminidase; PBS, phosphate buffersaline; PFU, plaqueforming units; RDE, receptor destroying enzyme; RNP, ribonucleoprotein; SP, B/SP (small plaque)/11/81; TCID, tissue culture infection dose

B型ウイルス標準株としてインフルエンザワクチン株、B/神奈川/6/73 および B/シンガポール/222/79 株を使用した。これらの株は国立予防衛生研究所、武内安恵博士により分与された。1981～1982年冬季の集団発生から MT 系で分離された株として B/福井/363/81 株および B/福井/364/81 株を主に使用した。これらのウイルスはすべて MT 系で 34°C 72 時間培養を行い、その上清を -70°C に保存し必要に応じて使用した。

VI. 使用ウイルスの免疫血清

B/神奈川/6/73 株と B/シンガポール/222/79 株の 2 つの標準株および新分離ウイルス株 B/福井/363/81 株と B/福井/364/81 株、そして B/福井/363/81 株からブラック純化されたクローンウイルス株 LP 株および SP 株ウイルスは、すべて MT 系で増殖させ、赤血球凝集価で 128 倍に調整し、ニワトリ翼下静脈内に初回 5 ml を、その後、1 週間隔で 3 ml を 2 回追加免疫した。最終免疫後 7 日目に全採血を行い、血清成分を分離して免疫血清として使用した。

VII. フェレット免疫血清による抗原分析

フェレット抗血清を用いた抗原分析は、国立予防衛生研究所武内安恵博士により行った。

VIII. 赤血球凝集 (hemagglutination, HA) 反応および赤血球凝集抑制 (hemagglutination inhibition, HAI) 反応

HA および HAI 反応はすべて常法¹³⁾に従いマイクロタイター法で行った。ニワトリ赤血球は 0.5% になるよう PBS で調整した。HA 価は、完全凝集を示すウイルス液の最高希釈倍数をもって表した。

HAI 価の測定は、16 単位 (16 HA units, HAU) のウイルス量を用い、ウイルスの血球凝集を完全に阻止した抗体の最終希釈倍数を HAI 価とした。被検血清および対照血清の非特異的凝集抑制物質は、receptor destroying enzyme (RDE) (デンカ生研) 処理で除去し、また非特異的赤血球凝集物質はニワトリ赤血球 (0.025 ml) による 0°C、30 分吸収で除去し、かかる処理血清を HAI 試験に供した。

IX. ウイルス感染価の測定

使用ウイルスの感染価測定⁷⁾はブラック法で行った。60 mm シャーレ (Falcon) に培養された MDCK 細胞を 2 回 PBS で洗浄後、希釈ウイルス液を 0.2 ml 宛て接種し 34°C 40 分吸着を行った。first overlay medium として 0.6% 寒天を含む増殖用培地を 5 ml 加え、34°C で 3 日間 0.5% CO₂-incubator 内で培養後、さらに 0.6% の寒天を含む second overlay medium を 3 ml 重層し、翌日ブラック数を算定し、plaque-forming unit (PFU)/ml で表現した。

X. ウイルスクローニング法

B/福井/363/81 株感染 MDCK 細胞上に形成されたブラックのうちブラックサイズの大きい (径が 3 mm 以上) ものと小さい (径が 1～2 mm) ものから、それぞれウイルスを分離後連続 3 回ブラック純化した。これらクローンウイルスを MT 系で増殖させ、CPE の最高時に培養液を回収し、遠心 (1500×g, 15 min) 上清を -70°C に保存した。

XI. 中和抗体価測定法

中和抗体価測定は、トランスファープレート (ダイナテック社) を用いた微量中和試験法¹⁴⁾¹⁵⁾で行った。56°C 30 分間の熱処理で非働化された被検血清をダイリュウター (0.025 ml) で吸い上げ、細胞維持液 (0.025 ml) を満たしたトランスファープレートで 2 倍階段希釈 (4 系列) を行った。ウイルスは、100 tissue culture infections dose 50 (TCID₅₀)/0.025 ml を用い、ドロップで 0.025 ml 宛て血清希釈列に加え、混和後 37°C で 1 時間反応を行った。反応後は更に、あらかじめ 0.05 ml 維持液を加えたプレートに培養された MDCK 細胞上に静かに重ね液を移したのち取り除き、CO₂-incubator で培養した。ウイルス対照として、100 TCID₅₀ のウイルス液を 100 倍希釈 (4 系列) し、1 TCID₅₀/0.025 ml に調整後、MDCK 細胞上に同様に接種し、半数 (2 系列) に CPE が出現したところ (培養 4～6 日後) で判定を行った。血清力価は半数の細胞 (2 系列) で CPE が抑えられる血清希釈倍数で表した。

XII. クローンウイルスの増殖試験

シャーレ (径 35 mm) に密に単層培養された MDCK 細胞にクローン化ウイルスを MOI=1 になる様感染させ 34°C で 40 分吸着を行った。吸着後、PBS で 1 回洗浄し、維持用培地を加えてトリプシン存在下と非存在下で静置培養を行い、24、48 および 72 時間後の細胞外産生ウイルスを MT 系によるブラック法⁷⁾と赤血球凝集法により測定を行った。

XIII. ウイルス RNA の解析

B/神奈川/3/76, LP および SP ウイルス液 1 ml をシャーレ (径 100 mm) 中の MDCK 細胞に接種し、34°C 45 分吸着を行った。吸着後維持液で 1 回洗浄し、³²P (60 μCi/ml) (日本アイソトープ協会) を含む維持液 5 ml を添加して 48 時間標識した。その後、維持液中に産生されたウイルス粒子を回収後、30% と 60% のショ糖を用いた密度勾配遠心法で精製した。ウイルス粒子からの RNA の抽出、6 M 尿素を含むポリアクリルゲル電気泳動およびウイルス RNA とウイルス遺伝子の解析は植田らの方法¹⁶⁾¹⁸⁾に従った。

XIV. ノイラミニダーゼ (NA) 活性の測定

ノイラミニダーゼ (neuraminidase) 測定の供試ウ

ウイルスは MT 系で増殖させた LP と SP 株を用い、1500×g, 30 分の遠心後、両株の HAnin 価を統一し検査に供した。測定法は fetuin を基質とした WHO の標準測定法¹⁹⁾²⁰⁾で行いブタノール層の吸光度を 549 nm の波長で測定した。

成 績

I. 1981～1982 年の冬期におけるインフルエンザウイルス分離とその HAnin 抗原性

1. ウイルス分離率に与える使用細胞系の影響

1981～1982 年にかけてのウイルス流行時に M, MT および DCE の 3 つの異なる系を用いて同一検体からウイルス分離を試み被験者 95 名中 21 名から総計 42 株の B 型インフルエンザウイルスを分離した。19 名 (20%) では M および MT 系いずれにおいても B 型インフルエンザウイルスが分離され、かつ 2 名では MT 系のみで分離された。これに反し、DCE 系による分離は、本流行時、極めて効率が悪く、M および MT 系において B 型インフルエンザウイルスが分離された 2 名 (2 株) においてのみ分離されたに留まった。上述の如く M と MT 系による分離率はほぼ同じであったが、CPE の出現は MT 系の方が M 系に比べ約 1 日早く、産生ウイルスの HA 価も 2～3 倍高い結果が得られた。

2. 使用宿主細胞系の差異による分離ウイルス抗原性の変動

上述の新分離株 42 株の抗原性状を HAI 反応により検討した。抗原標準株として用いたワクチン株 (B/シンガポール/222/79) の抗血清 (ニワトリ血清) に対し、ホモウイルス (B/シンガポール/222/79 株) との反応で得られる HAI 値と同値 (1:1024) を示した株、1/2 の HAI 値低下が見られた株、1/4 以下の低下を示した株は各々 16 (38%)、14 (33%)、12 株 (29%) であった。この結果より、ニワトリ抗血清を用いた HAI 反応で調べた限りでは、自然界での流行株の主流 (同値および 1/2 低下の計 71%) は、ワクチン株 B/シンガポール/222/79 に近い HAnin 抗原性状をもつことが推測された。

次に、これらの流行から得た 42 株の上記の実験で特に標準株抗血清に対し変異を示した 2 株と標準株に近い性状を示した 3 株についてももう一つの標準株 B/神奈川/3/76 および上記 B/シンガポール/222/79 のフェレット抗血清を使い、抗原分析を行った。この二つの標準株同志の間でも、抗 B/神奈川/3/76 フェレット血清を用いた時、HAI 値は 1/8 の開き (256 と 32) がみられた。即ち、MT 系分離 B/福井/363/81 株と B/福井/356/81 株は、抗 B/神奈川/3/76 血清に対し、HAI

値が 1/8 以下の低値を示し、同時に抗 B/シンガポール/222/79 血清でも 1/2 以下の低値を示したがこれらのウイルス株は、従来の DCE を用いた系では通常検出し得ない HAnin 変異と思われた (表 1)。そこで、MT 系で分離され、最も HAnin 抗原性に大きな違いを示した B/福井/363/81 株と同じ MT 系で分離し、より両標準株に近い性状を示す B/福井/364/81 株の 2 株を選び、更にニワトリ抗血清を用い HAnin 抗原性状を検討した。免疫血清をニワトリで調整したので宿主細胞の影響を出来るだけ抑える目的で、両株ウイルスの増殖系を MDCK 細胞から DCE 系に変え、増殖させたウイルスでの HAI 反応を行った (表 2)。MT 系で分離された時に認められた B/福井/363/81 株の特徴的 HAnin 抗原性状 (1/8 以下の HAI 値の変動) は、DCE 系で増殖させると、両抗血清 (ニワトリ) で、1/4 の変動に止まった。一方、B/福井/364/81 株は、DCE で増殖させても、HAI 値の変動は少なく (1/2～1/4) MT 分離時に比較的近い HAnin 抗原性状をしめした。

表 2 と同じ、MT 系分離直後に保存した両株 (B/福井/363/81 と B/福井/364/81) ウイルスの HAI を行ったのが表 3 である。抗血清は同じでも、表 2 と異なり B/福井/363/81 株の MT 系増殖ウイルスは、2 つの標準株の 1/8 の HAI 値となり、B/福井/364/81 株は標準株と同じか 1/2 の変動にすぎなかった。

これらより、ウイルス増殖の宿主細胞、MT 系と DCE 系の違いによる HAnin 抗原性の変動は、流行時分離株中の HAnin 抗原変異株の中でも B/福井/363/81 株に著しいと思われた。

3. ウイルス継代法の影響

上記のごとく、自然界から MT 系で分離した B/福井/363/81 株は増殖宿主細胞の違いによりその HAnin 抗原性の変異をもたらすことから、ウイルス増殖系を MT から M または DCE 系に変え、増殖継代法および増殖宿主細胞の差により HAnin 抗原変異の起こる可能性についてさらに検討した (図 1)。

表 2, 3 の実験で用いた 2 種類の抗血清に対し、MT 由来株は、MT 系の条件下で継代を繰り返しても産生ウイルスの HAnin 抗原性には 5 継代に亙り、全く変化が見られず、分離時の HAnin 抗原性状の持続が見られた。一方、継代法を MT から M 系に変えると、標準抗原に対する抗血清 (抗 B/神奈川/3/76 および抗 B/シンガポール/222/79 血清) への HAI 価は上昇した。即ち双方の抗血清値 (ホモ標準ウイルス抗原に対する HAI 値、1:512 および 1:1024～2048) により一層近づき 2 代の継代で 4 倍～8 倍の上昇を示し、その後は、2 代以降 5 代の継代まで一定の HAI 価を示

Table 1. Hemagglutination inhibition (HAI) titer of ferret anti-sera against influenza B viruses newly isolated by MT system*

Antigens**	HAI titers of ferret antiserum	
	anti-B/Kanagawa/3/76	anti-B/singapore/222/79
Reference virus		
B/Kanagawa/3/76	256(1)	64(1)
B/Singapore/222/79	32(1/8)	64(1)
Newly isolated virus		
B/Fukui/356/81	32(1/8)	<32(<1/2)
B/Fukui/362/81	128(1/2)	64(1)
B/Fukui/363/81	<32(<1/8)	<32(<1/2)
B/Fukui/364/81	128(1/2)	64(1)
B/Fukui/365/81	128(1/2)	64(1)

*MDCK cells were cultured in the medium containing trypsin(15 μ g/ml).
Refer to materials and methods in detail.

**Viruses were grown in MT system.

Table 2. Hemagglutination inhibition(HAI)titer of chicken antisera against newly isolated influenza B viruses grown in DCE* system

Antigen	HAI titers of chicken antiserum	
	anti-B/Kanagawa/3/76	anti-B/Singapore/222/79
Reference virus**		
B/Kanagawa/6/73	512(1)	1024(1/2)
B/Singapore/222/79	256(1/2)	2048(1)
Newly isolated virus		
B/Fukui/363/81(DCE-1)	128(1/4)	512(1/4)
B/Fukui/364/81(DCE-1)	128(1/4)	1024(1/2)

*Developing chick embryo.

**Reference virus were grown in MT system.

Table 3. Hamagglutination inhibition (HAI) titer of chicken antisera against influenza B viruses grown in MT System*

Antigen	HAI titers of chicken antisera	
	anti-B/Kanagawa/3/76	anti-Singapore/222/79
Reference virus		
B/Kanagawa/3/76	512(1)	512(1/2)
B/Singapore/222/79	256(1/2)	1024(1)
Newly isolated virus		
B/Fukui/363/81	32(1/8)	128(1/8)
B/Fukui/364/81	256(1/2)	1024(1)

*Refer to the footnote of Table 1.

した。この変異は宿主細胞を DCE 系に変えることにより更に早く認められ、1代継代を行うことで8倍~16倍の上昇が観察され、以後は5代まで一定の HANin 抗原性を示した。

II. 野外分離株の抗原性変化についての実験的 pursuit

1. B/福井/363/81 株ウイルスのクローニング

継代法の違いや使用宿主細胞の相違により、HANin 抗原に変異をもたらす要因の一つとして MT 系で自然界より分離されたウイルス試料中に HANin 抗原性を異にするウイルスが混在し、同時に、増殖能が宿主細胞で異なる可能性が考えられる。これを実証するごとく、MT 系で分離した B/福井/363/81 株を MT 系で2回継代後、MDCK 細胞上でブラックを形成させるとサイズの異なる二種類のブラックが出現した。出現ブラック数の比はサイズの小さいブラック 130 ケに対し大きなブラックは 1 ケと小ブラックがその主流であった。そこで大小それぞれのブラックよりウイルスのクローニングを行い、総計 39 株 (大ブラック: 5,

小ブラック: 34) のウイルスクローンを分離した。得られた大小2種類のブラック由来ウイルスを更に MT 系で3回連続ブラッククローニングを行い、小ブラックおよび大ブラック形成株の代表株として各々に B/SP/11/81 株 (SP 株) と B/LP/1/81 株 (LP 株) を選び以下の実験を行った。

2. クローン化ウイルスの HANin 抗原性

B/福井/363/81 株が宿主細胞継代法の違いにより HANin 抗原性に相違を生じることから、クローン化ウイルス SP 株および LP 株の HANin について検討した。MT 系において連続8代ウイルス継代を繰り返しても抗 B/神奈川/3/76 血清に対する HAI 価は、SP 株で 128 倍、LP 株で 512 倍の HAI 価を維持し全く変化は見られなかった。

更に、抗 SP および LP 株ニワトリ血清を作り、B/神奈川/3/76 株ウイルスとそのニワトリ抗血清を標準ウイルス抗原および抗血清として、これらの間の交叉 HAI 試験を行った (表 4)。SP 株は B/神奈川/3/76 抗血清に対し、ホモ HAI 価の 1/8 の HAI 価を示し、MT 系由来の親の未クローン化 B/福井/363/81 株により近い性質を有することがわかった。一方、LP 株はホモ HAI 価の 1/4 の HAI 価を示し標準株 B/神奈川/3/76 により近い HANin 抗原性状を有することが判明した。しかし後述のごとく、トリプシン非存在下では、SP 株の増殖は見られず、従って M 系増殖ウイルスを用いての SP 株の HANin 抗原性状を検討することは出来なかった。これに対し LP 株は MT および M 系の条件でもウイルスは同様に増殖し、産生されたウイルスの HANin 抗原性状は抗 B/神奈川/6/73 ニワトリ血清に対し、共に HAI 価 512 倍を示し、宿主細胞継代法の違いによる HANin 抗原性の差は生じなかった。

3. LP および SP 株の交差中和試験

HANin 分子がウイルス感染症の中和に関与していることは明らかであり、上記 2. で述べた HANin 抗原性の違いが HAI 抗体価のみならず中和抗体価にも変化を与えている可能性が考えられる。そこで、LP および SP 両株の抗原性の違いを中和抗体価の差異で測定した (表 5)。抗 B/神奈川/3/76 ニワトリ血清の中和抗体価はホモの B/神奈川/3/76 株に対しては 1000 倍であったが、LP 株に対しては 150 倍、SP 株に対して 62 倍であった。抗 LP 血清 (ホモ 1190 倍) を用いた組み合わせでは、B/神奈川/3/76 株は 256 倍、SP 株は 708 倍であり、抗 SP 血清 (ホモ 1050 倍) では B/神奈川/3/76 株は 94 倍、LP 株は 842 倍であった。これら交差中和試験からも HAI 抗体価で見られた抗原性の差とほぼ同様な違いが中和抗体価からも認めることが出

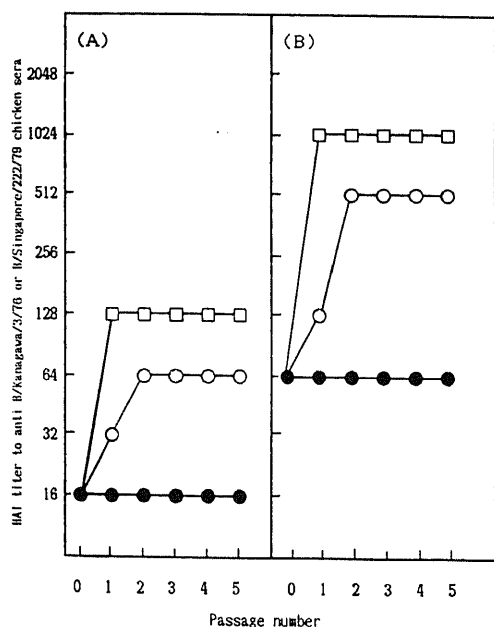


Fig. 1. Change in antigenicity of virus strain B/Fukui/363/81 serially passaged in developing chick embryos, MDCK cell culture, or MDCK cell culture containing trypsin. At each passage level, the antigenicity of virus hemagglutinin was examined by hemagglutination inhibition (HAI) reaction.

(A), anti-B/Kanagawa/3/76 serum; (B), anti-B/Singapore/222/79 serum. Developing chick embryos, □; MDCK cell culture, ○; MDCK cell culture containing trypsin, ●.

来た。

4. クローンウイルス株の増殖に対するトリプシンの影響

SP株の増殖はMT系においてのみ良好に認められ、M系ではごく僅かしか見られなかったことより、その増殖はトリプシンに依存することが示唆された。そこで各種濃度のトリプシン存在下のMDCK細胞上で、SP株の増殖性を検討した。トリプシン濃度が0~20 µg/mlになる様、維持液に添加し、SP株のウイルス産生をHA価で測定した(図2)。0および5 µg/mlのトリプシン存在下では、細胞外産生ウイルスは認められず、10 µg/ml以上のトリプシン存在下で初めてその産生が見られた。10~20 µg/ml濃度でのウイルス産生量は、HA価で測定した場合、96時間後64 HA価のウイルスが産生されたので以後の実験には15 µg/mlのトリプシンを使用した。

次に、トリプシン存在下と非存在下でLP、およびSP両株の細胞外産生ウイルス量を経時的にHA価および感染価(PFU/ml)で測定した。この際LP株またはSP株をMOI約1でMDCK細胞に接種し、24、48および72時間後の細胞外放出ウイルス量を測定した。

LP株については細胞外放出ウイルス量をHA価で測定した時、トリプシン存在下では128~256 HAU/0.025 ml、トリプシン非存在下でもほぼ同様な値(64~128 HAU/0.025 ml)を示した。感染価で測定した時、感染後24時間ではトリプシン存在下では 5.4×10^7 PFU/mlを示し、トリプシン非存在下での値 1.3×10^7 PFU/mlに比べやや高い傾向が見られたが、48時間以後の産生量には有意差は認められなかった(図3(A))。一方SP株については、ウイルス量をHA価で測定した時トリプシン存在下では64 HAU/0.025 ml以上の値を示したが、トリプシン非存在下では2 HAU/0.025 ml以下を示し極めて低かった。この事は感染価で測定した時も同様に認められた。即ちトリプシン存在下での感染価は $7.2 \times 10^7 \sim 1.9 \times 10^8$ PFU/mlであったのに対し、トリプシン非存在下では $1.8 \times 10^3 \sim 4.8 \times 10^3$ PFU/mlにすぎなかった。

5. LPおよびSP株ウイルスRNAの解析

LPとSP株の間で見られる生物学的性状(HAIや中和反応)の違いが、単に宿主による修飾なのかあるいは、遺伝子レベルの変異に基づくものかを明らかにするためにウイルスRNAの解析を行った。

Table 4. Cross hemagglutination inhibition (HAI) test of influenza B virus clones, SP and LP, isolated from B/Fukui/363/81

Antigen*	HAI titers of chicken antisera		
	Kanagawa/3/76	SP	LP
B/Kanagawa/3/76	2048(1)*	128(1/16)	512(1/4)
SP	128(1/8)	2048(1)	1024(1/2)
LP	512(1/4)	1024(1/2)	2048(1)

*Viruses were grown in MT system.

Table 5. Cross neutralization test* of influenza B virus clones SP and LP, isolated from B/Fukui/363/81

Antigen****	Neutralization titer** of chicken antisera		
	B/Kanagawa/3/76	SP	LP
B/Kanagawa/3/76	1000(1.000)***	94(0.089)	256(0.215)
SP	62(0.063)	1050(1.000)	708(0.594)
LP	150(0.150)	842(0.801)	1190(1.000)

*An amount of 0.25ml (100TCID₅₀) of each virus was mixed with equal volume of each diluted anti-serum in transferplate. After 1 hr reaction period at 37°C, the remaining infectivity was determined by inoculation of the samples into MDCK cell cultures as described in Materials and Methods.

**Neutralization titer was expressed as the highest dilution of anti-serum that neutralizes 50% of original infectivity.

***Ratios of neutralization titers.

****Viruses were grown in MT system.

図4には HANin および NA 両 RNA 分節の泳動パターンを示した。HANin RNA 分節の移動度は両ウイルス株間で同様であり、この実験に用いた一次元電気泳動で検出出来るような構造上の差異はないと推察された。しかしながら、NA RNA 分節の移動度は両者間で差を認めた。即ち、SP 株の NA RNA 分節は移動度が遅く HANin RNA 分節とほぼ同位置に見られ、両者のウイルスの NA RNA 分節構造ないし分子量に差があることが明らかになった。このことは、NA の生物活性に違いがある可能性を示唆した。

6. LP と SP 株ウイルスの NA 活性の比較

MT 系で増殖させた LP および SP 株のウイルスの NA 活性を測定し比較した。表6に示したごとく、両ウイルスの粒子数を HA 価でほぼそろえて同一にし、fetuin を基質とした場合、SP 株の NA 活性は LP 株の値のほぼ半分を示し、活性は明らかに低かった。

考 察

自然界からのインフルエンザウイルス分離は、1940年、Burnet²¹⁾により開発された発育鶏胎児 (DCE) を用いる方法がその主流をなしてきた。しかしながら、

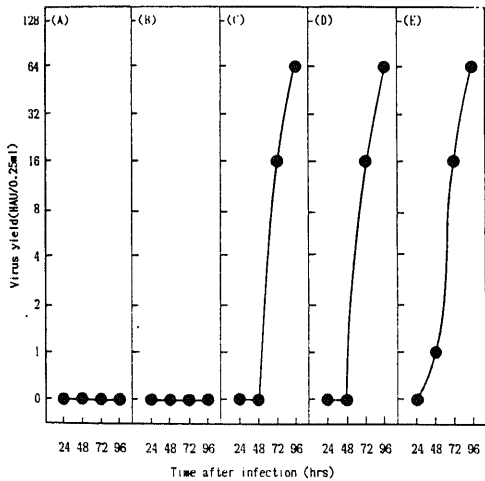


Fig. 2. Effect of various concentrations of trypsin on hemagglutinin (HANin) production of SP strain virus in MDCK culture. MDCK cell cultured in petri dishes (35 mm diameter) were infected with SP strain virus at a multiplicity of approximately 1 PFU/cell. After 40 min. adsorption, MT of maintenance medium containing (A) 0, (B) 5, (C) 10, (D) 15 or (E) 20 μg/ml of trypsin was added to the cultures. At the indicated time after infection, viruses released into the medium were determined by HA reaction.

インフルエンザウイルスに高い感受性を示す犬腎由来継代 (MDCK)細胞-Trypsin (MT)の系⁵¹⁶⁾が確立されて以来、風邪患者からのウイルス分離には従前より使用されている DCE に加えて、これが広く用いられる様になった。著者も 1981~1982 年にかけての福井県下の冬期インフルエンザ流行時の患者材料より MDCK 細胞-Tripsinの有 (MT), 無 (M)の系と DCE の系を用い総計 42 株の B 型インフルエンザウイルスを分離した。DCE での分離はわずか 2 株であったが、MT 系では 21 株、M 系では 19 株であった。以上のことから B 型ウイルス分離には、MDCK 細胞を用いるの方が圧倒的に効率よく分離されることが明らかとなり、既に報告⁷⁾¹¹⁾¹²⁾²²⁾²³⁾されている結果と同様な結

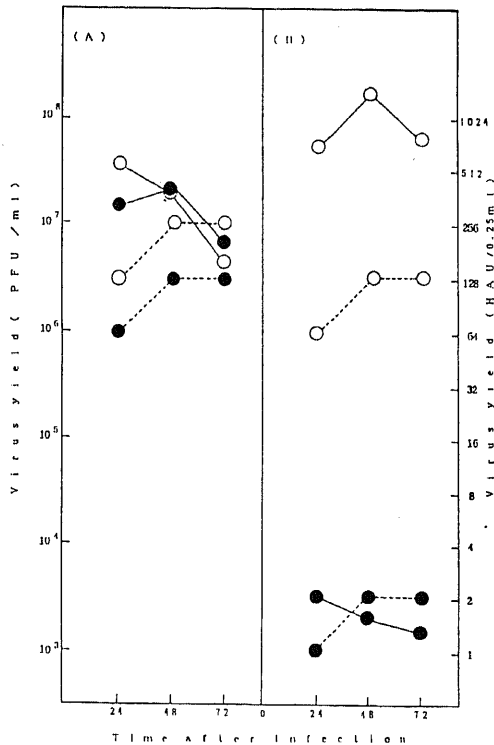


Fig. 3. Effect of trypsin on the production of cloned viruses, LP and SP, in MDCK cultures. MDCK cultures in petri dishes (35 mm diameter) were infected with LP or SP at a multiplicity of 1 PFU/cell. After 40 min. adsorption, 2 ml of maintenance medium containing trypsin (15 μg/ml) was added to the cultures. At the indicated time after infection, amounts of infectious viruses (PFU/ml) or hemagglutinin titer (HAU)(dotted line) of viruses released into the medium were determined. (A), LP; (B), SP. Presence of trypsin, ○; Absence of trypsin, ●.

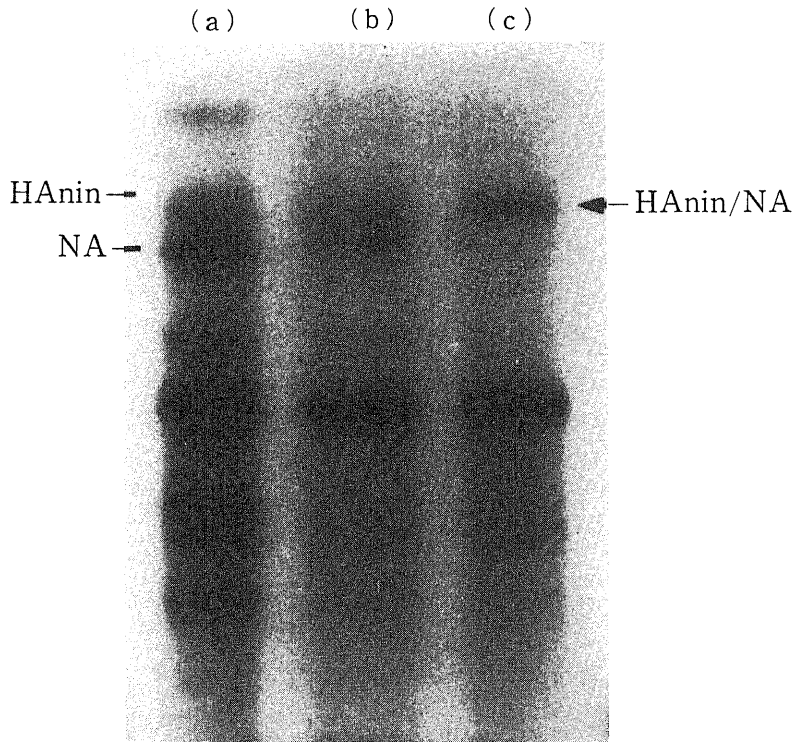


Fig. 4. Electrophoretic pattern of RNA derived from reference B/Kanagawa/3/76 strain and cloned viruses, LP and SP. B/Kanagawa/3/76-, LP- or SP-infected MDCK cultures were labeled with ^{32}P ($60 \mu\text{ci/ml}$) and radio-labeled viruses were purified as described in Materials and Methods. RNA was extracted from purified viruses and electrophoresed in 2.8% polyacrylamide gel containing 6 M urea for 14 hours. Lane (a), B/Kanagawa/3/76; Lane (b), LP, Lane (c), SP.

Table 6. Neuraminidase activity* of two clones, SP and LP, isolated from influenza virus B/Fukui/363/81

Virus	Neuraminidase activity(OD 549 nm)of virus solution diluted by			
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16
SP	0.29	0.16	0.08	0.04
LP	0.65	0.38	0.17	0.10

*SP and LP virus were grown in MT system. Thirty two HAU/0.25 ml of both viruses were serially diluted by 2-fold steps. These diluted viruses were incubated with fetuin for neuraminidase activity assay at OD 549 nm.

論に達した。

しかし、こうした分離率とは別に、この系により得られた分離ウイルスの HANin 抗原性は、DCE 系分離のそれと時に異なることも知られ¹⁰⁾¹²⁾、分離に使う宿主細胞の選択と分離株の抗原分析には注意が必要とい

われている。しかし、我々が今回得た MT 系による分離ウイルスの大部分は標準株 B/シンガポール/222/79 と同様な性状を示していた。しかし、MT 系でのみ分離された B/福井/356/81 株と B/福井/363/81 株の 2 株にはかなり大きな違いが見られた。通常 Webster²⁰⁾ によると B 型インフルエンザウイルスの HANin 抗原の変異率は 10^8 に 1 つ以下で A 型に比較し約 1/1000 の低率と言われている。また、B 型ウイルスの保有はヒト以外の動物にはいまだ発見されておらず²⁵⁾、したがって動物界で遺伝子プールが欠如していることなど、このウイルスの抗原変異の特性を明確に説明している。しかし、著者が分離した二つの MT 系由来株に見られた様な HANin 抗原性状の変異もこうしたモノクローナル抗体を使用した解析で考えられることであり、多くの報告が行われている^{26)~31)}。しかし、ポリクローナル抗体を用いた詳細な報告はみられていない。

そこで、B/福井/363/81 株について宿主を DCE に

変えて増殖を行い得られたウイルスの抗原性を調べたところ、HANin 抗原性状に変化が見られ標準株と同様な性状を示すようになった。即ちウイルスを増殖させるときの宿主の違いが、抗原性に大きな違いを生じさせていることが示唆された。そこで、B/福井/363/81株を選びその生物性状をより詳細に調べることによりこのような現象がどの様な機序で起こり得るかについて検討した。まず、B/福井/363/81株の HANin 抗原性が宿主の違いでどの様になるかを DCE, M, MT の系で調べた。本ウイルスは MT 系で継代する限り継代前と全く変わらぬ安定な HANin 抗原性を示すが、宿主を DCE に変えると変化して 1 代の継代で標準株と同様な抗原性を示すようになった。この変化は、速やかに起こっていることが推測された。M 系継代では 2 代継代により安定な抗原性を示したがそれは、DCE の系に近い抗原性、即ち標準株に近いものであった。

こうした現象の起こり得る可能性としては、B/福井/363/81 株試料中のウイルスは純粋に単一として存在するが、ウイルス増殖時の宿主の違い、あるいは宿主の培養条件の違いにより抗原性が異なるのではないかという考え方である。インフルエンザウイルスの HANin は NA と同様に 5～8% の糖を含む糖蛋白抗原として知られており^{32,33}、その分子中の特定のアミノ酸配列 (Asn-X-Ser 或は Asn-X-Thr) に宿主特異的な糖鎖が付加されて成熟する³⁴⁻³⁷。従って宿主が異なれば糖鎖が異なり、抗原性に影響を与えることは十分考えられることである³⁸⁻⁴¹。それゆえ、宿主細胞の違いによる HANin の抗原性の違いはある程度予測されるが、ここで見られた変異は宿主細胞の違いばかりでなく、継代法の違いによっても HANin 抗原性に差が認められており、興味ある現象と思われる。

しかし、使用している抗体はポリクロナール抗体であり、殆どすべての抗原決定基が反応しなくなるとは考え難く、また宿主が変わっても標準株と同様な抗原性を示すウイルスが多いことから、B/福井/363/81 株の如き宿主依存性抗原変化は一般に説明し難いものと考えられる。そこで、抗原分析に用いた B/福井/363/81 株の試料中には 2 種類以上のウイルスが混在している可能性が示唆された。即ち(1)MT の系では非常によく増殖できるが DCE では増殖しにくいウイルス (抗原性は標準株と異なる)；(2)その逆に DCE では比較的好く増殖するが MT 系ではそれほど増殖性を示さないといったウイルスの存在が考えられる。後者の可能性を証明するために B/福井/363/81 株より MT 系でプラークサイズの大小を指標に計 39 株のウイルスをクローン化し、その内の 2 株を選び、以後のモデル実験の使用ウイルスとした。即ち、プラークサイズ

は径が 1～2 mm のものを SP 株、3～4 mm のものを LP 株とした。両ウイルスを MT 系で増殖させ抗原性を調べたところ、SP 株の HANin 抗原性は、親株 (B/福井/363/81 株)と同様な性状 (標準株よりずれた HANin 抗原性)が見られ、LP 株は標準株に近いものであった。次に SP 株と LP 株を MT 系で増殖させた時は SP 株の増殖速度は LP 株に比べやや遅いが感染性ウイルスの産生量は圧倒的に高かった。また M 系で増殖させた時は、逆に LP が高く SP 株はほとんど産生されなかった。通常、インフルエンザウイルスの増殖にはウイルスの HANin 糖蛋白の解裂⁴²⁻⁴⁷が必須とされている。しかし、MDCK 細胞を用いた場合、B 型ウイルスはこの HANin 解裂に必要な酵素プラスミン (plasmin) は血清中のプラスミノゲン活性化因子によって供給されることにより、トリプシンに代表される蛋白分解酵素を外から添加しなくとも、ウイルス増殖は可能とされている⁷。しかし、集団発生時に患者からウイルス分離を行うに際し、自然界での流行の型を予測することは困難なため、通常トリプシン存在下 (MT 系) で分離が行われている。かかる条件下で考えると、MT 系で分離され、MT 系で親ウイルス B/福井/363/81 株を継代した場合、標準株と抗原性が大きく異なる SP 株型ウイルスが産生量で LP 株を凌駕し、その結果、SP 株型ウイルスが多数を占める結果として標準株と異なる HANin 抗原性状を示したものと考えられる。逆に M 系で B/福井/363/81 株を継代すると標準株に近い LP 株型ウイルスが大多数を占める結果として、標準株に近い性状を示したことが考えられる。DCE に SP 株、LP 株を接種した場合はおそらく M 系と同様な結果が得られると推測され、今後、さらに確かめる必要があるものと思われる。

次に以上のごとく、HAI 試験や中和試験において SP、LP 両株の抗原性に違いを認めたが、これらの相違は HANin 分子の構造の差によることが想像される。しかし、同一細胞で増殖させた両ウイルスの HANin ポリペプチドの小さな違いを電気泳動等で明らかにするのは困難と考え、より鋭敏に差違を検出し得ると思われる HANin 指令 RNA 分節の電気泳動による移動度を比較した。しかしながら、HANin RNA 分節には検出出来得る様な差違は見出し得なかった。ところが、NA を指令する RNA 分節には明らかな差違があり、NA のポリペプチド構造に違いがある可能性が示されたので、NA 活性を比較した。ノイラミダーゼはウイルス粒子表面にあって、ウイルス遺伝子 RNA の中の、NA RNA 分節により指令され生成される酵素であり、その作用はウイルスが増殖後宿主細胞表面から遊出するのを助ける機能を持つと考えられている^{48,49}。

しかしながら、ウイルス増殖における正確な役割は今のところ不明であるが、Klenk らは⁵⁰⁾ノイラミニダーゼ活性のあるウイルスはシアル酸残基をもたず、エンペローブをもつウイルスでノイラミニダーゼ活性のないものは、シアル酸残基を持つところから、ウイルスのノイラミニダーゼはウイルスの成熟になんらかの役割を演じているものと報告している。また、柴田らは⁵¹⁾温度感受性株を用いた実験から NA 活性の欠損によりウイルスの細胞内増殖が遅延することを報告している。著者が最近の流行から MT 系により分離した SP 株は NA 活性が LP 株に比べ 1/2 しかないことから、HAnin の解裂がされにくく、その為 SP 株は外部からの蛋白分解酵素が大量に供給されない限り、HAnin 分子の HA₁ と HA₂ への解裂は困難で、従って、M 系では感染性ウイルスの産生が抑制されるものと考えられる。この結果は SP, LP 両株の抗原性の違いを直接説明出来るものではないが、両株類似のウイルスが同一試料に混在した場合には、宿主細胞の違いまたは同一細胞でも継代培養条件の違いで、両者の量的関係が変動を来し、その試料の示す抗原性がどちらかのウイルスの抗原性状に片寄ることを示す一つの証拠と考えられる。以上のことから、ポリクロナール抗体を用いた著者の実験からも B 型インフルエンザの流行様式は、A 型ウイルスと異なり自然界で多数の変異株が同時に流行する可能性を有していることが明らかとなった。このことは、現在使用しているワクチン株は DCE で分離した株のみが使用されているので、こうした事実は今後、ワクチン株の選定にあたり具体的な問題を提起するものと考えられる。

結 論

インフルエンザウイルス流行時における自然界からのインフルエンザ B 型ウイルスの分離を試み、分離ウイルス株の性状を検討し以下の結論を得た。

1. 1981~1982 年にかけて冬期福井県下の流行時に患者より DCE, M および MT 系で分離されたインフルエンザウイルス 42 株は、すべて B 型であった。
2. 従来、頻用されて来た DCE によるウイルス分離は、わずか 2 株にすぎなかったが、M 系では 19 株、MT 系では 21 株が分離され、B 型ウイルスは DCE に比べ MDCK 細胞にはるかに高い感受性を示した。
3. 分離ウイルス株の HAnin 抗原性は、大部分が B 型ウイルスワクチン標準株に近い性状であった。しかし、MT 系で分離された B/福井/356/81 および B/福井/363/81 の両株は標準株に比べ、1/8 以下の有意の HAI 価の差を示し、HAnin 抗原性に相違がみられた。
4. B/福井/363/81 株は MT 系で継代した場合、そ

の HAnin 抗原性は一定で標準株と異なる抗原性を維持しつづけた。しかし、継代宿主を DCE に変えると抗原性は 1 代継代で標準株と同じ性状となり、M 系では 2 代の継代で標準株に近い性状を示した。

5. B/福井/363/81 株を MT 系でブラックを形成させると、ブラックの直径が 1~2 mm を示すもの (SP 株) と 3~4 mm を示すブラック (LP 株) が出現した。その比はおおよそ SP 130 ケに対し LP は 1 ケで、各々から 3 回連続のクローニングで、B/SP/11/81 株 (SP 株) と B/LP/1/81 株 (LP 株) の 2 種のクローンを得た。

6. SP 株の HAnin 抗原性はクローニング前の親株と同様な性状を示し、LP 株は標準株と同じ性状であった。

7. SP 株の MT 系での増殖速度は LP に比べやや遅いが、感染性粒子の産生は圧倒的に高い値を示した。しかし、M 系での増殖では逆に LP 株が高い産生量を示し、SP 株は極軽微な増殖に過ぎず、SP 株のトリプシン依存性増殖が明らかにされた。

8. 6 M 尿素を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動では、SP, LP 両株の HAnin を指令するウイルス RNA 分節には検出出来るような差は見られなかった。しかし、NA を指令するウイルス RNA 分節に明らかな違いを見た。

9. SP, LP 両株のウイルス粒子当りのノイラミニダーゼ活性値の比較では、SP 株は LP 株に比べ酵素活性は 1/2 であった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った波田野基一教授に深謝致します。また本研究の機会を与えて下さいました福井県衛生研究所松田漸前所長および小林卓現所長に厚く感謝致します。さらに懇切な御教示、御援助を頂いた金沢大学がん研究所ウイルス部、田中淳之助教授、国立公衆衛生院微生物部植田昌宏博士、福井県衛生研究所微生物課の関係各位に深く謝意を表します。

文 献

- 1) 小笠原一夫, 阿多実茂, 波多野基一: 医科微生物学, 294-298 頁。朝倉書店, 東京, 1978.
- 2) Francis, T.: A new type of virus from epidemic influenza. *Science*, **92**, 405-408 (1940).
- 3) 村尾美代子, 岡田正次郎: インフルエンザ B/香港/72 型ウイルス株と B/Seattle/1/49 との抗原的關係, *感染症誌*, **58**, 275-284 (1984).
- 4) 水谷裕迪: ウイルス実験学各論 (国立予防衛生研究所学友会編), 31-53 頁, 丸善, 東京, 1967.
- 5) Tobita, K.: Permanent canine kidney

(MDCK) cells for isolation and plaque assay of influenza B viruses. *Med. Microbiol. Immunol.*, **162**, 23-27 (1975).

6) Tobita, K., Sngiura, A., Enomoto, C. & Furuyama, M.: Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med. Microbiol. Immunol.*, **162**, 9-14 (1975).

7) 飛田清毅: MDCK 細胞によるインフルエンザウイルスの分離. *臨床とウイルス*, **4**, 58-61 (1976).

8) 飯田英侃, 小林桂子, 松田 漸: MDCK-トリプシンにおけるインフルエンザウイルス分離. 第19回日本感染症学会中日本地方会総会演説抄録, **22** (1976).

9) 飯田英侃, 小林桂子, 松本和男, 松田 漸, 笠原智寿子: 1981-1982年福井県におけるインフルエンザ流行. 第41回日本公衆衛生学会総会抄録, **712** (1982).

10) 渡辺 淳, 竹内司尚, 菅谷憲夫, 石田正年, 根路銘国昭, 中島捷久: A および B 型インフルエンザウイルスの宿主制御による選択変異について. 第33回日本ウイルス学会総会演説抄録, **1045** (1985).

11) 梶 哲夫, 尾西 一, 木村晋亮: 培養細胞によるインフルエンザウイルスの分離-発育鶏胎児との比較およびその問題点-. *臨床とウイルス*, **5**, 333-338 (1977).

12) 梶 哲夫: トリプシン添加 MDCK 細胞系で新たに分離されたインフルエンザウイルスの抗原分析. *十全医会誌*, **91**, 1081-1094 (1982).

13) 井上 栄, 水谷裕迪: ウイルス実験学総論 (国立予防衛生研究所), 214-225 頁, 丸善, 東京, 1973.

14) 赤尾頼幸, 志賀 定: マイクロタイターによるウイルス微量中和反応. *臨床検査*, **16**, 9-20 (1972).

15) 赤尾頼幸, 志賀 定: ミクロプレートによる中和抗体価の測定法. *臨床とウイルス*, **5**, 344-350 (1977).

16) Palese, P. & Schulman, J. L.: Differences in RNA patterns of influenza A virus. *J. Virol.* **17**, 876-884 (1976).

17) Ueda, M., Tobita, K., Sugiura, A. & Enomoto, C.: Identification of hemagglutinin and neuraminidase genes of influenza B virus. *J. Virol.*, **25**, 685-686 (1978).

18) 根路銘国昭, 杉浦 昭, 植田昌宏: ウイルス実験学各論 (国立予防衛生研究所学友会編), 308-330 頁, 丸善, 東京, 1982.

19) 根路銘国昭, 水谷裕迪: *臨床ウイルス学手技編*, 148-150 頁, 講談社, 東京, 1978.

20) 根路銘国昭: MDCK 細胞におけるインフルエンザ

ウイルスの分離. *臨床病理*, **35**, 111-124 (1978).

21) Stuart-Harris & C. H. Schild, G. C.: インフルエンザ (杉浦, 飛田, 根路銘訳) 1-25 頁, 講談社, 東京, 1978.

22) 古山宗成, 緒方正名, 上羽 修, 石田立夫: MDCK 細胞によるインフルエンザウイルスの分離-発育鶏卵との比較-. *臨床とウイルス*, **4**, 314-318 (1976).

23) 梶 哲夫, 尾西 一, 木村晋亮, 波田野基一: Trypsin 添加 MDCK 細胞および VERO 細胞を用いた小児上気道疾患からの Myxo, Paramyxo virus 分離成績. *ウイルス*, **26**, 95 (1976).

24) Webster, R. G. & Berton, M. T.: Analysis of antigenic drift in the haemagglutinin molecule of influenza B virus with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, **54**, 243-251 (1981).

25) Preira, H. G.: Influenza, antigenic spectrums. *Progress in Medical. Virology*, **11**, 46-69 (1969).

26) 菅谷憲夫, 三田村敬子, 武内司尚, 佐野はつ, 根路銘国昭, 石田正年: 小児科臨床からみた B 型インフルエンザの流行とモノクローナル抗体による HA 抗原分析. *感染症誌*, **58**, 181-185 (1984).

27) 石田正年, 根路銘国昭, 大谷 明: 昨シーズンにおける B 型インフルエンザウイルスの変異とワクチン株の選定. 第33回日本ウイルス学会総会演説抄録, **1044** (1985).

28) Schmidt, N. J., Ota, M. & Fox, V. L.: Monoclonal antibodies for rapid, strain-specific identification of influenza virus isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **16**, 763-765 (1982).

29) Schild, G. C., Oxford, J. S., Jong, J. C. & Webster, R. G.: Evidence for host-cell selection of influenza virus antigenic variants. *Nature*, **303**, 706-709 (1983).

30) Webster, R. G., Kendal, A. P. & Gerhand, W.: Analysis of antigenic drift in recently isolated influenza A (H₁ N₁) viruses using monoclonal antibody preparations. *Virology*, **96**, 258-264 (1979).

31) 喜田 宏: 鳥類インフルエンザウイルス. *ウイルス*, **34**, 109-119 (1984).

32) Ada, G. L., & Gottschalk, A.: The component sugars of the influenza-virus particle. *Biochem. J.*, **62**, 686-689 (1956).

33) Frommhagen, L. H., Knight, C. A., & Freeman, N. K.: The ribonucleic acid, and lipid, and polysaccharide constituents of influenza virus preparations. *Virology*, **8**, 176-197 (1959).

- 34) Compans, R. W.: Influenza virus proteins, Association with component of the cytoplasm¹. *Virology*, **51**, 6-70 (1973).
- 35) Hay, A. T.: Studies on the formation of the influenza virus envelope. *Virology*, **60**, 398-418 (1974).
- 36) Klenk, H./D., Wollert, W., Rott, R. Scholtissek, C.: Association of influenza virus proteins with cytoplasmic fractions. *Virology*, **57**, 28-41 (1974).
- 37) Stanley, P., Gandhi, S. S., & White, D. O.: The polypeptides of influenza virus. Synthesis of the hemagglutinin¹. *Virology*, **53**, 92-106 (1973).
- 38) Nakamura, K., & Compans, R. W.: Glycopeptide components of influenza viral glycoproteins. *Virology*, **86**, 432-442 (1978).
- 39) Shulze, I. T.: The structure of influenza virus. 1. The polypeptides of the virion. *Virology*, **42**, 890-904 (1970).
- 40) 中村喜代人: インフルエンザウイルス糖タンパク質の糖鎖, 蛋白質, 核酸, 酵素. **1**, 30-40 (1980).
- 41) 山根誠久, 有川二郎, 小田切孝人, 石田名香雄: インフルエンザ A, B の糖組成. 第 25 回日本ウイルス学会総会演説抄録, 379 (1977).
- 42) Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M. & Blodorn, J.: Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*, **68**, 426-439 (1975).
- 43) Compans, R. W., Klenk, H. D., Caliguri, L. A., & Choppin, P. W.: Influenza virus protein 1. Analysis of polypeptides of the virion and identification of spike glycoproteins. *Virology*, **42**, 880-889 (1970).
- 44) Appleyard, G. & Maber, H. B.: Plaque formation by influenza viruses in the presence of trypsin. *J. gen. Virol.*, **25**, 351-357 (1974).
- 45) Lazarowitz, S. & Choppin, P. W.: Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology*, **68**, 440-454 (1975).
- 46) Klenk, H. D., Scholtissek, C., & Rott, R.: Inhibition of glycoprotein biosynthesis of influenza virus by D-glucosamine and 2-deoxy-D-glucose. *Virology*, **49**, 723-734 (1972).
- 47) Lazarowitz, S. G., Compans, R. W., & Choppin, P. W.: Influenza virus structural and nonstructural proteins in infected cells and their plasma membranes. *Virology*, **46**, 830-843 (1971).
- 48) Wilson, I. A., Skehel, J. J. & Wiley, D. C.: Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, **289**, 366-378 (1981).
- 49) Stuart-Harris, & C. H. Schild, G. C.: インフルエンザ (杉浦, 飛田, 根路銘訳) 35-40 頁, 講談社, 東京, 1978.
- 50) Klenk, H. D., Compans, R. W. & Choppin, P. W.: An electron microscopic study of the presence or absence of neuraminic acid in enveloped viruses. *Virology*, **42**, 115-137 (1970).
- 51) 柴田伸一郎, 青木 秀, 高田利彦, 山本 典, 山本直彦, 西山幸黄, 前野幸一郎: B 型インフルエンザウイルスの増殖におけるノイラミニダーゼの役割. 第 33 回日本ウイルス学会演説抄録, 1070 (1985).

Relationship between Trypsin-dependent Replication and Antigenic Variation of Influenza B Viruses Newly Isolated from Recent Epidemic Hidetada Iida, Department of Virology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920—J. Juzen Med. Soc., 95, 820—833 (1986)

Key words: antigenicity, B type influenza virus, hemagglutinin, trypsin-dependency, viral RNA segment

Abstract

Madin Darby canine Kidney cell (MDCK, M) and MDCK plus trypsin MT systems besides developing-chick embryo conventionally used were examined for isolation of epidemic influenza B viruses. During 1981 epidemic, a total of 42 strains of influenza B virus were isolated in Fukui Prefecture. The antigenicity of hemagglutinin (HANin) of most isolates nearly resembled that of the vaccination standard strain, whereas the antigenicity of HANin B/Fukui/356/81 and B/Fukui/363/81 strains isolated by MT system clearly differed from that of the standard strain.

As variants forming large (3~4 mm diameter) or small (1~2 mm diameter) plaque size were observed in B/Fukui/363/81 strain grown in MT system, a small plaque variant and a large plaque one were isolated as cloned viruses; they were designated SP and LP. In an examination of HANin antigenicity of these two clones grown in MT system, the HANin antigenicity one of SP clone clearly varied from that of the standard strain, showing the HANin antigenicity of parental uncloned strain, but the HANin antigenicity one of LP clone was similar to that of the standard strain. When the replicating ability of these two clones in both M and MT systems was compared, both clones showed nearly the same and high growth in MT system. On the other hand, the replication of SP clone in M system was much restricted, showing only 10^{-5} times as strong as that in MT system, while LP clone propagated well in both M and MT systems. Therefore, trypsin was an essential factor for the propagation of SP clone but not for LP clone.

Since the different HANin antigenicity was observed between SP and LP clones, virus genome RNA segment encoding HANin was analysed by electrophoresis. No detectable electrophoretic difference in HANin RNA segment was found between SP and LP clones. However, the RNA segment for neuraminidase (NA), which might be concerned in virus release from the infected cells, showed a distinctly varied pattern between both clones. This result seems significantly to correspond with the fact that NA activity of SP clone was about half of LP clone.

From these results, a mixed-infection at least with two antigenically different subtype strains was considered at 1981 influenza B epidemic in Fukui Prefecture. Furthermore, it was suggested that the selection of antigenic variants of the HANin and/or the NA might occur with virus replicating ability by differences of host cells and culture conditions, when SP- and LP- like viruses coexist in a specimen.