

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

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/2297/9037

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

金沢大学がん研究所ウイルス部 (主任: 波田野基一教授)

梶 哲 夫

(昭和57年12月16日受付)

トリプシンを添加した犬腎由来の MDCK 細胞 (MT) 系は、古典的な系のふ卵令 10 日の発育鶏卵 (10 dE) 系と共に、インフルエンザウイルスの分離に用いられている。この MT 系での、インフルエンザウイルスの増殖は、10 dE 系より若干高い感受性を保有していることが示された。赤血球凝集 (HA) 抗原性の違いは MT 系や 10 dE 系で分離された A 型ウイルスでは認められなかった。インフルエンザ B 型ウイルス株 (B/石川/1/76) では、MT 系分離ウイルスと 10 dE 系分離ウイルス間で有意に HA 抗原性の違いが認められた。その違いは、MT 系分離ウイルス免疫マウス血清を用いた時にみられ、一方、10 dE 系分離ウイルス免疫血清を用いると検出されなかった。ウイルスの継代系を MT 系と 10 dE 系で相互に変えるとき、MT 系分離ウイルスの HA 抗原性が不可逆的な変化を示す一方、10 dE 系分離ウイルスではなんの変化も示さなかった。また、クローニング実験では、MT 系分離ウイルスが同一の HA 抗原性を示すウイルスであったのに対し、10 dE 系分離ウイルスでは、HA 抗原性が 10 dE 系分離ウイルス型と MT 系分離ウイルス型を示すウイルスが混在していた。これらの結果は、ウイルス HA 抗原の安定性がウイルスの増殖に用いた宿主細胞により異なっていることを強く示唆している。HA 抗原性の場合と同様な差異が MT 系分離ウイルスの中和における抗原性でも示された。この B 型ウイルスにおける HA および中和における抗原性が分離や増殖の系として用いた細胞により違いを生ずるという現象は、1980 年に MT 系で新たに分離された他のインフルエンザ B 型株でも認められた。

Key words MDCK 細胞・トリプシン・インフルエンザウイルス・HA 抗原

インフルエンザの流行は、毎年のように世界各地に発生し、そこでは異なる抗原型のウイルスが分離されることも多い。この変異は特に A 型インフルエンザウイルスで最も強くおき、不連続変異の場合は以前の流行ウイルス株とはまったく異なるウイルスの出現さえみられている¹⁾¹⁴⁾。

インフルエンザウイルスの分離方法としては、発育鶏卵の羊膜腔内および漿尿膜腔内への接種という方法¹⁵⁾¹⁶⁾が従来主に行われてきた。しかし、至適発育鶏卵の常時使用体制をとることは、受精卵の入手ルートの確立などの問題があり、どこの施設でも簡単に実施で

きる状況にはない。加うるに、患者材料からのインフルエンザウイルス分離に必須とされる羊膜腔内接種には、技術的にある程度の熟練が必要とされる。これに比較し、細胞変性効果の鏡検観察によりウイルスの増殖を知る培養細胞法を用いると、発育鶏卵法の羊水や漿尿液採取後の赤血球凝集反応によるウイルス増殖確認などより、操作がより容易という利点がある。このため、インフルエンザウイルスの分離目的にサル腎初代培養細胞が従来よく用いられてきた¹⁶⁾。ただ、この分離系では、インフルエンザ A 型株に感受性が低く、また初代培養細胞ゆえに入手面での制約もある。著者ら

Studies on Antigenicity Analysis of Influenza Viruses Newly Isolated by Trypsin-added MDCK Cell System. **Tetsuo Kaji**, Department of Virology (Director: Prof. M. Hatano), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

は、簡単な処理（維持液中へのトリプシン添加）によりパラミクソウイルスの分離に VERO 細胞(カニクイザル腎由来継代培養細胞)系が有用な系になることをさきに報告し¹⁷⁾、また Itoh らも同様の事実を述べている¹⁸⁾。一方、1975年に Tobita らは、同様のインフルエンザウイルス増殖可能な継代培養細胞系としてトリプシン添加 MDCK 細胞(犬腎由来継代培養細胞)系を見出し¹⁹⁾、患者材料からのインフルエンザウイルスの分離にも使用可能なことを示した^{20)~22)}。

これらウイルス分離への細胞感受性とは別に、インフルエンザ防疫上必須の問題として分離ウイルスの抗原性、特に赤血球凝集素(hemagglutinin, 以下 HA と略)の抗原分析が行われる。飛田²¹⁾、古山ら²²⁾は免疫血清としてニワトリ血清を用い、従来よりの発育鶏卵法分離ウイルスとトリプシン添加 MDCK 細胞法での分離ウイルスを比較し、抗原分析上差異のないことを報告し、後者の方法がインフルエンザウイルス分離方法としてきわめて有用であることを示した。

この様な状況下で、著者も患者材料を用いてのウイルス分離を試みた。ついで、マウス免疫血清を用いてトリプシン添加 MDCK 細胞法と発育鶏卵法により分離されたウイルスの抗原分析を行ったところ、従来記載なき 2, 3 の新事実を見い出したので以下述べてみたい。

材料と方法

1. 使用細胞と培養条件

MDCK 細胞は、国立公衆衛生院の杉浦博士より分与を受け、飛田の方法²¹⁾に準拠して培養調整を行った。すなわち、単層を形成した MDCK 細胞を phosphate buffered saline, pH 7.5 (以下 PBS と略) で 2 回洗浄し、トリプシン (Difco 1:250) 0.5 mg/ml, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 0.16 mg/ml を含む PBS で室温 5 分間の前処理を行う。前処理液を除去後、新たに同組成のトリプシン液を加え、分散した細胞を増殖培養液である Eagle's minimal essential medium (以下 MEM と略) え最終濃度 10% の牛胎児血清を添加した液に再浮遊した。再浮遊は、細胞濃度が $1.0 \sim 1.5 \times 10^6$ cells/ml になるように調整して行い、その後 37°C で増殖させた。VERO 細胞は、増殖培養液として 2% 仔牛血清加 MEM を用い、 $6 \sim 7 \times 10^4$ cells/ml に調整した。アフリカミドリザル腎初代培養細胞 (African green monkey kidney cell, 以下 AGMK と略) は、Flow 社より購入し、増殖培養液 (10% 仔牛血清加 MEM) に $2 \sim 3 \times 10^6$ cells/ml として、いずれも 37°C でチューブに増殖させた。

2. ウイルス分離方法

1) ウイルス分離材料の調整

集団かぜおよびインフルエンザ様疾患の患者計 1,056 人から綿棒で咽頭ぬぐい液を採取し、これを 0.2% 牛血清アルブミン加 MEM (抗生物質含有) 4~5 ml 中に浸漬後、前報の方法¹⁷⁾で調整した。

2) 培養細胞によるウイルス分離

培養細胞を用いてのウイルス分離には細胞を培養したチューブあたり 0.2 ml の検体を接種した。各検体毎に 2 本のチューブを使用して、接種後は 35°C で静置培養した。VERO 細胞の場合、検体接種後の維持液としてトリプシン (Difco 1:250) を 1 ml あたり 4 μ g 含む MEM を用いた (以下 VT 系と略)。この VT 系と AGMK 系は共に前報¹⁷⁾の方法でウイルス分離を試みた。MDCK 細胞の場合、飛田²¹⁾の方法に準拠したトリプシン添加 MDCK 細胞 (以下 MT 系と略) 系とし、その概略は次の通りである。検体接種後の維持液として、ビタミン、グルコースをそれぞれ 4 倍量、2 倍量に増強し、かつトリプシン (Difco 1:250) を最終濃度で 20 μ g/ml になるように加えた MEM を用い、チューブあたり 1.5 ml を加えた。添加したビタミンは 100 倍濃度の GIBCO 社製のものを用いた。細胞変性効果の観察は、4~7 日間行い、観察終了日を未接種対照チューブの細胞がガラス面より剥離しはじめた翌日とした。ウイルスの分離陽性もしくは陰性の判断は、細胞変性効果と赤血球吸着反応で行い、共に陰性の場合、2 代目への継代は実施せず、分離陰性とした。赤血球吸着反応の方法は、VT での方法¹⁷⁾と同様で、採血後 2 週間以内で溶血のないモルモット赤血球の 0.2% 浮遊 PBS をチューブあたり 0.5 ml を加え、4~6°C, 30 分間の静置後、赤血球の細胞表面における吸着の有無を鏡検した。

3) 発育鶏卵によるウイルス分離

ふ卵令 9~10 日目の発育鶏卵 (以下 10 dE と略) を用い、ツベルクリン注射器で羊膜腔内、漿尿膜腔内にそれぞれ 0.2 ml ずつ検体を接種した。ウイルス分離の可否は、採取液のモルモット赤血球ならびにニワトリ赤血球の両 PBS 浮遊液 (0.33%) による赤血球凝集反応で判断し、2 代継代後も反応が陰性の場合をウイルス分離陰性とした。

3. 免疫血清の作製

免疫原として用いたインフルエンザウイルスは、著者が分離した株で、A 型では香港かぜ型 (H3) の 2 亜型 (A/石川/30/76: A/Victoria/75 型, A/石川/3/75: A/東京/75 型) の MT 系分離継代株ならびに 10 dE 系分離継代株、計 4 株のウイルスである。B 型のウイルスとしては、同様の分離継代ウイルス (B/石川/1/76) を用いた。各ウイルスは、免疫原として使用する

時には、赤血球凝集反応価を128倍に調整し、ウイルス株1つにつき5匹のマウスを使用した。免疫は腹腔内に1回1匹あたり2mlのウイルス液を接種して行い、4日後に同様の追加免疫を行った。採血は、追加免疫後2週間目に行い、5匹分をプールして免疫血清とした。なお、B型ウイルス免疫血清としてMT系で分離後、トリプシンを含有していない維持液を用いたMDCK細胞（以下Mと略）系で11代継代したウイルス株による免疫血清をも同様にして作製した。

4. インフルエンザウイルスの同定

インフルエンザウイルスの同定は、自家製免疫マウス血清もしくは国立予防衛生研究所より分与を受けた標準抗血清（ニワトリまたはフェレット）を用い、赤血球凝集抑制反応で行った。

5. ウイルスの赤血球凝集反応価および抗血清の赤血球凝集抑制抗体価の測定

赤血球凝集反応価および赤血球凝集抑制抗体価（hemagglutination inhibition antibody titer, 以下HAI価と略）の測定は、すべてマイクロタイター法²³⁾により実施した。赤血球は0.4%ニワトリ赤血球、希釈液にはPBSを使用した。赤血球凝集反応価測定は、ウイルス液を希釈後、赤血球浮遊液を加えマイクロミキサーで混和、4°C、1時間静置後の凝集像で判定し、完全凝集を示す最高希釈度をそのウイルスの赤血球凝集反応価とした。HAI価の測定には、まず希釈血清に一定量の抗原ウイルス液（16 hemagglutinin units）を加え、混和後室温で1時間抗原抗体反応を行わせた。その後、赤血球浮遊液を加えて赤血球凝集反応価測定と同様に反応させて判定した。HAI価は、完全凝集抑制を示した血清の最高希釈倍数で表わした。使用抗血清は、receptor destroying enzyme（武田薬品工業K.K.製）を血清の3倍量加え、37°C、一夜放置後、56°Cで1時間の加熱処理により非特異的抑制物質の不活化を行い、赤血球凝集抑制反応に供した。

6. 中和抗体価の測定

中和抗体価の測定は、日本脳炎における中和抗体価測定法²⁴⁾に準拠して行なった。すなわち、100~300 plaque forming units/0.5 mlに調整したウイルス液と種々の希釈段階の血清とを等量混合し、37°Cで1時間の中和反応を行わせた。この反応混合液0.5 mlを直径60 mmのプラスチックシャーレで単層を形成したMDCK細胞に接種した。37°Cで1時間ウイルス吸着後、1次重層液（MTにおける維持液中に最終濃度で約1%になるようにDifco社製のnoble agarを加えた）を4 ml重層した。34°C、3日間培養後、neutral redを0.2 mg/ml含む同組成の2次重層液でさらに重層して染色し、その翌々日に出現plaquesを計測した。中和抗体価は、

plaques数を抗血清との反応なき対照の50%に減少させるに必要な抗血清の希釈度をグラフ上より求め、その希釈倍数で表わした。なお、培養はすべてCO₂ incubator内で実施した。

7. インフルエンザウイルスのクローニング

B/石川/1/76株のMT系または10 dE系分離継代ウイルスをMDCK細胞に感染させ、34°Cで連続3回single plaque isolationによりクローニングし、さらにMT系で1回増殖させたウイルスをクローンウイルスとした。

8. インフルエンザウイルスの継代

ウイルスはすべて10⁻³希釈を行って、次に継代した。これは、原液継代でおきるVon Magnus現象による不完全ウイルスの出現²⁵⁾とその影響をさけるためである。継代系としては、MT, M, 10 dEの3系を使用した。

成 積

1. MDCK細胞の増殖条件とトリプシン耐性

MT系で必須とされているトリプシンの添加¹⁹⁾（20 μg/ml）は、細胞を良好な状態に維持する上でかなり過酷な条件であり、VERO細胞でもこの条件下での維持は困難である。それゆえ、ウイルス分離増殖での感受性をMDCK細胞で維持する条件の再検討を行った。すなわち、培養時の細胞濃度と増殖培養日数を組合せ、トリプシン必須濃度（20 μg/ml）含有維持液下での細胞変性効果観察可能日数を比較した。その結果、1.2×10⁶ cells/mlで4日間培養した場合、最低でも4日間の維持が可能であった。ついで、2.5×10⁵ cells/mlで3日間培養、6×10⁴ cells/mlで5日間培養の条件が優れていた。よって、これらの中で、1.2×10⁵ cells/mlで4日間培養の条件を実験に使用することにした。

2. インフルエンザウイルス分離への各系の感受性

MT系のインフルエンザウイルス分離増殖への感受性を調べるため、既知（ウイルス分離陽性）の患者咽頭ぬぐい液を希釈して接種し、ウイルスの検出限界をMT, 10 dE, VT（パラミクソウイルスの分離に有用な系¹⁷⁾）の3分離系で比較した（表1）。A（H3）型ウイルス保有患者咽頭ぬぐい液を用いた場合、MT系は10倍希釈まで接種チューブすべてが分離陽性となり、その確認もすべてが細胞変性効果で行われた。一方10 dE系では原液接種ですべて分離陽性となったが、10倍希釈以上での陽性は皆無であった。VT系の場合、原液接種チューブ4本中1本のみが分離陽性で、しかもその確認は赤血球吸着反応以外ではできなかった。他方、B型ウイルス保有患者咽頭ぬぐい液を用いた場合、MT系は原液接種3本中2本、10倍希釈接種で4本中1本が分離陽性となった。これに比較し、10 dE系は原液接

種卵3個中1個のみで分離陽性となったにすぎず、VT系では原液接種(6本)でさえも分離陽性は1本もなかった。これらより、患者材料よりのA(H3)型とB型の両ウイルスにおけるMT系感受性は、他の2系より約10倍程度高いものと思われた。なお、A(H1)型ウイルス保有患者咽頭ぬぐい液を用いての検討はできなかったが、飛田の報告²¹⁾によると10dE系との感受性の差はほとんどないとされている。

3. 各分離系におけるインフルエンザウイルス分離状況

1975年12月から1980年4月までの約4年半の間に、石川県衛生公害研究所に送付された1,056人のインフルエンザ様疾患患者の咽頭ぬぐい液を用い、合計217株のインフルエンザウイルスを分離した(分離率25%)。これらのウイルスは、様々な抗原型や生物活性を持っていると考えられるので、各分離系別の比較を行った。分離系としては、MT、10dEの2系に加え、上述の実験よりインフルエンザウイルス分離系としては不適と判断されたVT系の代わりにAGMK系をも

使用した。患者材料中、これら3系の併用を行わなかった例があるので、これを除外すると、併用時の分離株総数は191株であった。この分離インフルエンザウイルスのHA抗原型はA(H1)、A(H3)、Bの3型に大別され、それぞれの分離株数は66株、99株、26株であった(表2、表3)。

次に、各分離系毎の各型ウイルス分離株数を、表2に示した。A(H1)型ウイルスはMT系で55株、10dE系で57株分離され、この型の分離総株数のそれぞれ83%、86%と分離可能なウイルスの大半がこれら両系で分離されている一方、AGMK系では1株のみと合わせて低い分離率(1.5%)であった。同様に、A(H3)型ウイルスではMT系で82株(83%)、10dE系も78株(79%)とやはり大半がこの2系で分離されている。しかし、ここでもAGMK系では、低い分離率を示したにすぎなかった。このように、A型ウイルスに対する分離状況の比較からは、MT系と10dE系との間には有意な分離率の差が認められず、この2系は単独使用でも大半のウイルスの分離が可能であった。しかし、

Table 1. Comparative susceptibility of 10dE, MT and VT system to influenza virus isolation from diluted patient's samples

virus samples	system	No. of positive*/No. of inoculated tubes		
		dilution of sample		
		1:1	1:10	1:100
type A sample	10dE	4/4	0/4	0/4
	MT	4/4	4/4	0/4
	VT	1/4	0/4	0/4
type B sample	10dE	1/3	0/5	0/5
	MT	2/3	1/4	0/4
	VT	0/6	N.D.**	N.D.**

* positive sign; cytopathic effect & hemadsorption in MT.
hemagglutination in 10dE.
hemadsorption in VT

** N.D.; not done.

Table 2. Comparison of virus numbers isolated by each system (10dE, MT, AGMK) from patients' samples.

virus type	No. of isolated viruses	No. of isolated viruses by		
		10dE	MT	AGMK
A (H1)	66	57(86%)	55(83%)	1(1.5%)
A (H3)	99	78(79%)	82(83%)	9(9%)
B	26	8(31%)	23(89%)	4(15%)
Total	191	143(75%)	160(84%)	14(7%)

() ; No. of isolated viruses by each system/total No. of each type viruses isolated (%)

一般のウイルス分離に繁用される AGMK 系でのインフルエンザウイルス分離は少なく、ほとんどが見逃されてしまった。B 型ウイルスにおいては、分離株総数 26 株と少なかったが、各系別分離株数を比較してみると、MT 系が 23 株(89%)、10 dE 系は 8 株(31%)、AGMK 系では 4 株(15%)であった。この場合、MT、AGMK の 2 系は A 型ウイルスにおける傾向と同様であったが、10 dE 系のみではかなり低い分離率を示し、若干 A 型ウイルスの場合とは異なっていた。

集団かぜなど病因ウイルスの究明を可能な限り追求する必要のある場合、上記の分離系各単独使用による見逃し率がある程度以上あることは問題である。そこで、このような場合における単一の系のみを使用することの可否、すなわち、MT および 10 dE の両系を併用する必要性について、単独系使用による見逃し率で検討した。各型別にみると、A (H1) 型ウイルスの場合は MT、10 dE 両系共に分離された株が 46 株(69%)と大半を占めていた。ところが、MT 系のみで 9 株(14%)が、また 10 dE 系のみで 11 株(17%)がもう一方の系で分離されていない株であり、単独系使用による見逃し率が 15% 近くあった。A (H3) 型ウイルスにおいては、上記と同様に共通分離株数が 61 株(62%)と大半を占める一方、MT 系のみで 21 株(21%)、10 dE 系のみで 17 株(17%)と単独系使用による見逃し率は 20% 近くであった。さらに、B 型ウイルスにおいては、単独系、特に MT 系のみでの分離株数は多くなった(MT 系のみ 18 株、69%)が、10 dE 系のみでは 3 株(12%)、共通分離株は 5 株(19%)にすぎなかった。全体としてみると、どちらか一方のみの系で分離された株数は A、B 両型合計 79 株(41%)になり、単独系使用による見逃し率は約 20% と比較的大きな割合であった(表 3)。

4. 分離系の違いによる HA 抗原性の比較

MT と 10 dE の両系はインフルエンザウイルス分離に対し高い感受性を示したが、分離株の交差赤血球凝

集抑制反応による HA 抗原性の分析を行い、分離系の違いが HA 抗原性に影響するかどうかを検討した(表 4、表 5)。従来、抗原分析に用いられているウイルスは、通常 10 dE 系分離継代株であり、抗血清もこれで免疫して作製されている。ここでは、抗血清として MT 系または 10 dE 系分離継代ウイルスをマウスに免疫した血清を使用した。また、抗原としては免疫原ウイルス株(患者分離株)以外に、1975 年のワクチン株の 2 株(A/東京/6/73、B/岐阜/2/73)および 1976 年のワクチン株(A/熊本/22/76)をも加えて使用した。なお、ワクチン株にはいずれも市販(武田薬品工業 K.K. 製)の 10 dE 系分離継代株を用い、A 型ワクチン株の HA 抗原型は H3 型である。ここで免疫原(抗原)として選ばれた A (H3) 型患者分離株は、2 つの antigenic drift¹¹⁾としてそれぞれ異なる H3 HA 抗原性(A/Victoria/75 型として A/石川/30/76 株、A/東京/75 型として A/石川/34/75 株)の代表株であり、B 型ウイルス分離株としては B/石川/1/76 株が用いられた。Victoria 型(A/石川/30/76 株)においては、ホモの組合せの HAI 価は、10 dE 系分離継代または MT 系分離継代ウイルス免疫血清のいずれも 1024 倍であった。同時に、免疫原または抗原に使用したウイルスの分離継代系がヘテロである組合せでの HAI 価は、1024 倍と 1024 倍、または 1024 倍と 512 倍でほとんど差はなかった。同じことは東京型(A/石川/34/75 株)でも認められ、分離継代系の違いによる HA 抗原性での有意な差は生じなかった。その反面、2 つの型(Victoria 型と東京型)のウイルス株間には 4~8 倍程度 HAI 価に差があり、antigenic drift として認められている(表 4)。

一方、B/石川/1/76 株においては、10 dE 系分離継代ウイルス免疫血清を用いた場合、抗原ウイルスの分離継代系が異なっても HAI 価は共に 512 倍と変わらず、A (H3) 型株の場合と同様の成績が得られた。ところが、MT 系分離継代ウイルス免疫血清を用いると、ホモの組合せである MT 系分離継代ウイルスとは 2048

Table 3. Comparative frequency of influenza virus isolation from patients' samples by 10dE and MT system

virus type	No. of isolated viruses	10dE(+)* MT (+)*	10dE(+)*	MT(+)*
A (H1)	66	46 (69%)**	11 (17%)**	9 (14%)**
A (H3)	99	61 (62%)**	17 (17%)**	21 (21%)**
B	26	5 (19%)**	3 (12%)**	18 (69%)**
Total	191	112 (59%)**	31 (16%)**	48 (25%)**

(+)*; positive isolation by each system

(**)**; No. of isolated viruses by each system/total No. of each type viruses isolated (%)

倍の HAI 価を示し、ヘテロの 10 dE 分離継代ウイルスを抗原としたときの HAI 価 (256 倍) との間に 8 倍の有意差が認められた。あまつさえ、ワクチン株の B/岐阜/2/73 株 (10 dE 系分離継代) ウイルスとの反応が 512 倍と、この新分離 B 型株 10 dE 系分離継代ウイルスの値 (256 倍) とあまり区別のつかない値を示した (表 5)。このことは、B 型ウイルスのあるものでは、MT 系分離継代ウイルス免疫血清を用いた場合、抗原分析上ある種の混乱を引起しかねないことを示唆している。

5. B/石川/1/76 株ウイルスの分離継代系の違いによる HA 抗原性の差の検討

表 5 にみられた B/石川/1/76 株の MT 系分離継代ウイルス免疫血清の使用時に認められた分離継代系による HA 抗原性の差が何に由来するのかを検討するため、以下の実験を実施した。なお、このウイルスの MT 系分離継代ウイルスを MT ウイルス、10 dE 系分離継代ウイルスを 10 dE ウイルスと略する。さらに、MT ウイルス免疫血清を抗 MT (抗 MT-1 : ホモ HAI 価 2048 倍、ヘテロ HAI 価 256 倍および抗 MT-2 : ホモ HAI 価 512 倍、ヘテロ HAI 価 64 倍の各力価をもつ 2

種)、10 dE ウイルス免疫血清を抗 10 dE と略した。同時に、抗 MT でホモ (MT ウイルス抗原による) HAI 価に近い HAI 価を示す HA 抗原性を MT 型、ヘテロの 10 dE ウイルス抗原による HAI 価に近い値を示す HA 抗原性を 10 dE 型と略記することにする。

1) 継代による HA 抗原性の変化

分離継代系の違いにより生ずる HA 抗原性の差を究明するため、継代系を変えた時の HA 抗原性の変化を調べた。患者材料中にもしも異なる 2 つ以上のウイルスが含まれていて、それぞれの分離継代系で増殖の容易な方のウイルスが主となって増殖分離されたため表 5 の現象がおきる可能性がある。その場合、分離後、継代数の少ないウイルスではまだ両者が混在したままである確率は高く、継代系の変換で一方のウイルスが優位となって出現し、その結果として HA 抗原性の相互変換を生ずることが期待されると考えた。そこで、継代実験用 MT ウイルスとしては MT 系で分離した直後のウイルスまたはそれを M で 1 代継代したウイルスを用い、10 dE ウイルスとしては 10 dE 系での分離継代歴が計 2 代であるウイルスを選んだ。

Table 4. Cross HAI test of influenza A (H3) viruses isolated and subsequently passaged by 10dE or MT system

antigen	antibody	anti A/Ishikawa/30/76		anti A/Ishikawa/34/75	
		(10dE-4)**	(MT-2)**	(10dE-4)**	(MT-2)**
vaccin strain (1975) : A/Tokyo/6/73 (com. 10dE)*		256	256	32	64
” A/Kumamoto/22/76 (com. 10dE)*		512	512	64	32
A/Victoria/75 type : A/Ishikawa/30/76 (10dE-4)*		1024	1024	64	64
” ” (MT-2)*		512	1024	128	128
A/Tokyo/75 type : A/Ishikawa/34/75 (10dE-4)*		256	256	1024	1024
” ” (MT-2)*		256	256	2048	1024

()* ; isolation and following passage times of antigen viruses grown in each system.

()** ; isolation and following passage history of virus employed for mice immunization as immunogen.

Table 5. Cross HAI test of influenza B virus isolated and subsequently passaged by 10dE or MT system

antigen	antibody	anti B/Ishikawa/1/76	
		(10dE-3)**	(MT-1, M-1, MT-1)**
vaccin strain (1975) B/Gifu/2/73	(com. 10dE)*	64	512
B/Ishikawa/1/76	(10dE-3)*	512	256
”	(MT-1, M-1)*	512	2048

()*, ()** ; see Table 4

MT ウイルスの場合、MT 系継代により HAI 価(ホモの組合せ HAI 価に該当)に若干の低下(2倍)がみられたが、10代継代後もほぼ元の HAI 価を示し、その HA 抗原性が MT 型を安定に維持していることを示唆した。ところが、この MT ウイルスの 10 dE 系継代では 2代目で早くも HAI 価に変化をきたし、ヘテロの 10 dE 型 HA 抗原性への変化を示した。さらに、MT 系よりトリプシンを除いただけである M 系継代によってさえ、6代継代以後の HAI 価が 512 倍から 256 倍となり、10 dE 型 HA 抗原性への変化を示した(図 1)。

一方、10 dE ウイルスの場合、MT ウイルスとは異なり、MT または M の系で 10代継代しても、その HAI 価に有意な変化はなく、10 dE 型 HA 抗原性が維持されていることを示した(図 2)。

また、元は MT 型だが 10 dE 系あるいは M 系継代で 10 dE 型に HA 抗原性が変化したウイルス(図 1)の

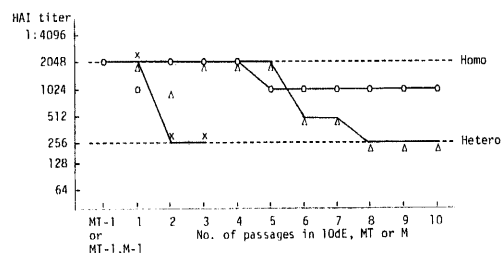


Fig. 1 Effect of passages in 10dE, MT or M on the HA antigenicity of MT-isolated virus (B/Ishikawa/1/76). Viruses were diluted to 10^{-3} at respective passages. HAI test for HA antigenicity was done by anti MT - 1 mouse serum. Passage system; 10dE (x—x), MT (o—o), M (Δ—Δ). HAI test; hemagglutination inhibition test. HA; hemagglutinin.

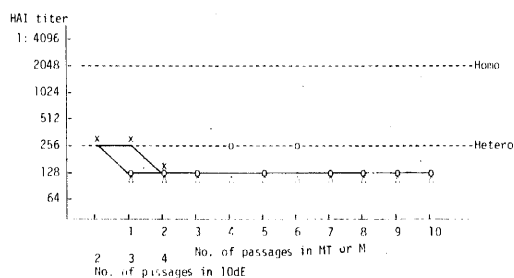


Fig. 2 Effect of passages in 10dE, MT or M on the HA antigenicity of 10dE-isolated virus (B/Ishikawa/1/76). Experimental conditions and symbols were the same as shown in Fig. 1, except original virus (10dE-isolated) employed.

MT 系継代を行ったが、元の MT 型へ HA 抗原性が戻る兆候を示すような HAI 価の変化はなく、10 dE 型 HA 抗原性のままとどまっていることを示唆した(図 3)。

これらの結果は、HA 抗原性の変化が MT 型から 10 dE 型への変化を示す一方、その逆の変化がおきなかったことを示唆している。

2) クローニングによる混在ウイルスの検出

上述の結果は、1) に述べた 2 種以上の異なるウイルスが原患者材料中に混在していた可能性を完全に否定してはいない。それゆえ、さらにこの可能性について検討するため、クローニングによる混在ウイルスの検出を試みた。それぞれの HA 抗原型を示すウイルス 2 株 (MDCK 細胞系 12 代分離継代ウイルス: 抗 MT - 2 における HAI 価=512 倍ならびに 10 dE 系 3 代分離継代ウイルス: 抗 MT - 2 における HAI 価=64 倍) を MT 系でクローニングして、それぞれにつき 15 クローンずつ計 30 クローンを得た。その内訳は、plaque size により s (small, 径 1 mm 未満), m (middle, 径 1~3 mm), l (large, 径 3 mm 以上) の符号を付した 3 種類でそれぞれ 5 クローンずつとした。クローニング前の親株における plaques の各 size における割合は、MT ウイルスよりも 10 dE ウイルスの方が小さいものがやや多い (MT ウイルス: 1 44%・s 14%, 10 dE ウイルス: 1 23%・s 19%) 傾向を認めた。しかし、クローニング中これらの size が均一化する傾向は認められず、3 回目のクローニング後も様々の size の plaques を形成した。

得られたクローンの HA 抗原性を示すものとして、抗 MT - 2 における HAI 価の形で表 6 に示した。MT ウイルス由来の 15 クローンの HAI 価はすべてが 512 倍で、異なる HA 抗原型ウイルスの存在は検出できず、親株と同一の MT 型 HA 抗原性を示した。一方、10 dE

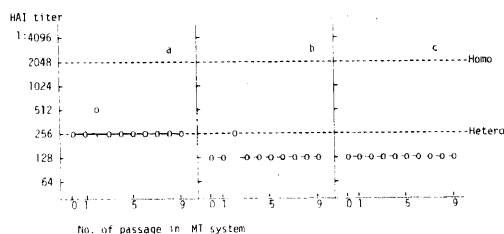


Fig. 3 Effect of passages in MT system on the HA antigenicity of 10dE-isolated or 10dE-type viruses (B/Ishikawa/1/76). Experimental conditions were the same as shown in Fig. 1, except original viruses (a; passaged history = MT - 1, M - 11. b; = MT - 1, 10dE - 3. c; = 10dE - 2, M - 10).

ウイルス由来の各クローンは、MT ウイルスの場合とは異なり、HAI 価の分布が 32 倍から 512 倍に広がり、そこには異なる HA 抗原性を示す複数の種類のウイルスが含まれていることを示した。これら各クローンを HAI 価で 10 dE 型(32~64 倍)と MT 型(256~512 倍)で試みに区分すると、10 dE 型が 7 クローン、MT 型が 5 クローンとなり、中間型(HAI 価 128 倍)は 3 クローンであった。この結果は、予想以上に 10 dE ウイルスには MT 型 HA 抗原性を示すウイルスが含まれていることを示唆した。

3) ウイルスの中和抗原性と HA 抗原性の関連

HA 抗原性の差が中和反応におけるウイルスの抗原性(以下中和抗原性と略)、すなわち各免疫血清における中和抗体価に反映することは、HA がインフルエンザウイルスの中和に関与する主要な表面抗原²⁶⁾であることから、充分に考えられる。また、中和抗原性についての検討から、分離継代系の違いによる HA 抗原性の差の

原因がわかるかも知れない。そこで、HA 抗原性の異なる各型ウイルスについて、分離継代系の差が中和抗原性におよぼす影響を検討し、結果を表 7 に示した。

抗 MT-1 を用いた場合、ホモの組合せの MT ウイルスでは中和抗体価が 9000 倍であり、ヘテロの組合せの 10 dE ウイルスはその約 1/10 の 820 倍となり、かなり中和抗体価に差が認められた。一方、HA 抗原性が 10 dE 型を示す MT 系分離後 M 系で 11 代継代したウイルス(以下 M ウイルスと略)の中和抗体価は、MT ウイルスの約半分で 10 dE ウイルスの約 5 倍に相当する値(4700 倍)を示していた。また、MT ウイルスを 10 dE 系、10 dE ウイルスを MT 系でそれぞれ継代すると、中和抗体価は初期の値に比較し、それぞれ約 1/5(9000 倍より 1600 倍)、約 2 倍(820 倍より 1620 倍)に変化した。

抗 10 dE を用いた場合の中和抗体価は、ホモの組合せの 10 dE ウイルスで 4000 倍、ヘテロの組合せの MT

Table 6. Distribution of HAI titer by each cloned virus derived from 10dE-, or MT-isolated virus

HAI titer by anti MT-2 serum	clone of B/Ishikawa/1/76	
	(MT-1, M-1, MT-13)*	(10dE-3, MT-3)*
32	—	s-7
64	—	s-6, s-9, s-10 m-8, m-9, m-10 <i>Parent virus**</i>
128	—	s-8, l-7, l-10
256	—	l-6, l-8, l-9
512	s-1, s-2, s-3, s-4, s-5 m-1, m-2, m-3, m-4, m-5 l-1, l-2, l-3, l-4, l-5 <i>Parent virus**</i>	m-6, m-7

*; isolation and passage history of cloned viruses.

**; Parent virus was isolated and passaged by 10dE (3 times), or MDCK cells (12 times).

Table 7. Cross neutralization (NT) test and HAI test of B/Ishikawa/1/76 viruses

virus	anti B/Ishikawa/1/76 mice sera					
	(10dE-3)**		(MT-1, M-1, MT-1)**		(MT-1, M-11)**	
	HAI	NT	HAI	NT	HAI	NT
B/Ishikawa/1/76 (10dE-4)*	512	4000	128	820	128	410
” (10dE-3, MT-3)*	256	2300	128	1620	128	1050
” (MT-1, M-1, MT-1)*	256	2350	1024	9000	256	2200
” (MT-1, 10dE-3)*	256	3600	128	1600	128	950
” (MT-1, M-11)*	256	1900	128	4700	128	1800

()*, ()**; see Table 4

ウイルス, M ウイルスでは, 両者共 10 dE ウイルスの値の約半分 (2350 倍と 1900 倍) であった。そこでの継代系変換による影響をみると, 10 dE 系から MT 系への変換で中和抗体価は約半分 (4000 倍から 2300 倍), MT 系から 10 dE 系で約 1.5 倍 (2350 倍から 3600 倍) 変化したが, 抗 MT-1 の場合と同条件下での変化よりは若干程度は低かった。一方, M ウイルス免疫血清 (以下抗 M と略) を用いた場合は, 継代系の違いに伴う中和抗体価の変化が抗 MT-1 の場合と同様の傾向であった。

これらを通観すると, 抗 MT-1 を用いた場合は継代系の違いによるウイルスの HAI 価と中和抗体価のいずれの変化も比較的大きく, 抗 10 dE の場合は継代系の違いによる両抗体価の変化は共に小さいという相関性が認められた。また, 抗 M を用いた場合, HAI 価の変化は小さいが, 中和抗体価の変化は比較的大という抗 MT と抗 10 dE の場合の中間的関係が得られた。

3. 新鮮分離インフルエンザ B 型ウイルス株の HA 抗原性と分離継代系の関係

B/石川/1/76 株ウイルスで認められた分離継代系の違いに基づくと思われる HA 抗原性の差の発生という現象が, このウイルス株に特有な現象か, あるいは, 他のインフルエンザ B 型ウイルス株でも認められるような比較的小さい現象であるのかを, 1980 年の B

型インフルエンザ流行時に新しく分離された 4 株 (B/石川/1/80, B/石川/7/80, B/石川/9/80, B/石川/15/80) のウイルスで検討した。その結果, これらのウイルス株の内 1 株 (B/石川/9/80) でこの現象が認められ, 抗 MT-2 における HAI 価の差は 4 倍 (MT 系分離ウイルス HAI 価 128 倍, 10 dE 系分離ウイルス HAI 価 32 倍) であった (表 8)。また, この現象が他の培養細胞系を用いた時にもみられるかどうかを検討するため, AGMK 系で分離されたウイルスについても調査した。AGMK 系により分離可能となったウイルスには, この様な現象は認められず, 逆に本現象をおこすようなウイルス (B/石川/9/80) は AGMK 系で分離できないのではないかと思われた。

考 察

インフルエンザウイルスの分離系として, 従来より 10 dE が用いられてきているが, サーベイランスなど日常的調査における分離系としては, いろいろと難点が多い。一方, 他のウイルスでは, 初代培養細胞や 10 dE などの系を用いる代わりとして株化継代培養細胞が様々な工夫の後, 使用されるようになってきた^{26)~28)}。その工夫の 1 つとして, 各種ウイルスのトリプシン処理や維持液中へのトリプシン添加がある¹⁷⁾¹⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾。

同様の試みは, インフルエンザウイルスでも行われ,

Table 8. Comparison of HA antigenicity on several influenza B virus strains newly isolated by different system

virus		anti B/Ishikawa/1/76	
		(10dE-3)**	(MT-1, M-1, MT-1)**
B/Ishikawa/1/76	(10dE-4)*	512	64
〃	(MT-1, M-1, MT-1)*	256	512
B/Ishikawa/1/80	(10dE-1)*	256	128
〃	(MT-1)*	256	128
〃	(AGMK-1)*	128	128
B/Ishikawa/7/80	(10dE-2)*	256	128
〃	(MT-1)*	256	128
〃	(AGMK-1)*	256	128
B/Ishikawa/9/80	(10dE-2)*	128	32
〃	(MT-1)*	128	128
B/Ishikawa/15/80	(10dE-2)*	128	64
〃	(MT-2)*	128	64
〃	(AGMK-1)*	128	64

(*)*, (**) **: see Table 4

いくつかの報告が MDCK 細胞を用いてなされた^{19)~22)}。著者は、本論文において、MT 系がインフルエンザウイルスの分離系として実用的に使用しうるかどうかを、分離増殖への感受性と分離ウイルスの HA 抗原性の 2 面から検討した。

患者の咽頭ぬぐい液で、分離可能な希釈限界の比較によるインフルエンザウイルスに対する感受性の検討では、A(H3)型においては MT 系が 10 dE 系の約 10 倍近い感受性を示し、B 型ウイルスにおいても MT 系は 10 dE 系より感受性が若干高かった(表 1)。しかし、パラミクソウイルスの分離で有用とされている VT 系¹⁷⁾¹⁸⁾は、A、B 両型共低い感受性を示し、インフルエンザウイルス分離には実用的でなかった。

この MT 系のインフルエンザウイルス高感受性を有用性として実際に検討するために、1975 年末より 1980 年上期までの 6 年間に、MT を主として 10 dE、AGMK の 3 系で共にインフルエンザウイルス分離を試み、得られた 191 株について各系の比較を行なった(表 2)。A 型の 2 つの HA 抗原型 (H1・H3) では共に、MT 系または 10 dE 系それぞれで 8 割近いウイルス株が分離され、共に高い感受性のあることが示された。ここで、前述の希釈限界比較法で認められた MT 系の 10 dE 系に対する優位性は示されなかった。この原因として、第 1 に各分離系におけるウイルス増殖の難易が関与しているのかも知れないが、接種量が両系で異なる(検体あたり、10 dE 系 0.8 ml、MT 系 0.4 ml) こと、すなわち接種ウイルス量の多少も考慮する必要がある。これを検討するため、両系の内どちらか一方のみの系でしか分離されていないウイルス株の数を調査した。A 型のウイルスでは 2 つの HA 抗原型 (H1・H3) 共に MT または 10 dE のいずれか一方のみの系でしか分離されていないウイルス株数が全体の 2 割近くに達していた(表 3)。これらの結果は、A 型ウイルスの分離系として、MT と 10 dE の両系を使用する上で感受性に関する問題はあまりないと考えられる。しかし、B 型ウイルスにおける検討の結果は、MT 系のみでの使用で約 9 割のウイルス株を分離している一方、10 dE 系のみでは約 3 割の株数で、MT 系のウイルス分離における有用性を示唆した。したがって、サーベイランスの様に日常的に実施する必要のある調査に関しては、MT 系のみを使用することでもインフルエンザウイルスを分離する目的はほぼ達せられると考える。しかし、集団かぜ発生時検査のように、ウイルス分離の見逃しが許されがたい時は、MT と 10 dE の両系を併用する必要性が、これらの結果から示唆される。一方、ウイルス分離検査に繁用される AGMK 系は、インフルエンザウイルス分離株数がかなり少なく、この系のみでし

か分離されない株がないことから、VT 系と同様に上述の目的には使用しがたい(表 2、表 3)。

MT 系がインフルエンザウイルス分離系としてきわめて有用である一方、流行規模の予測やワクチン株選定など防疫上の重要な指標となる抗原分析上の問題(分離ウイルスの抗原変異度検討)にも影響しないことが、真にインフルエンザウイルス分離系として MT 系が有用であるために必要である。それは、MT 系という従来の 10 dE 系とまったく異なる分離系の使用により、MT 系分離ウイルスと従来の 10 dE 系分離ウイルス間で、同一患者由来株の HA 抗原性に差を生ずることがあると、抗原分析において混乱の発生する恐れがあるためである。そこで、両系分離ウイルスを用いた交差赤血球凝集抑制反応を実施した。

A 型ウイルスについては、H3 HA 抗原型の中、さらに antigenic drift として差のある Victoria 型および東京型のウイルスにより、また B 型ウイルスについては、B/石川/1/76 株を用いて検討した。その結果、A 型ウイルスにおいては、分離系の違いによる HAI 価の有意な差、すなわちウイルス HA 抗原性の差は認められず、この場合の MT 系使用による問題はあまりないと考えられる(表 4)。しかし、B 型ウイルスにおける同様の検討結果は、免疫血清として MT 系分離継代ウイルス免疫マウス血清を用いると、分離継代系の違いで 8 倍も HAI 価が異なるという問題点を示した(表 5)。この抗原分析上の難点も、10 dE 系分離継代ウイルス免疫マウス血清を用いれば避けられるので、この点に留意すれば、インフルエンザウイルス分離に MT 系を用いることには特に支障はなく、またきわめて有用であると考える。

B/石川/1/76 株ウイルスでみつけだされた分離継代系の違いによる HA 抗原性の差を生ずる原因としては、以下の 3 つが考えられる。第 1 の原因としては、HA 抗原構造の不安定さのため、安定型としてある細胞増殖系で増殖後に別の抗原型に変化し、他の細胞増殖でみられる元の抗原型とは異なるようになったことが考えられる。第 2 には、HA 抗原性の異なる複数のウイルスが患者材料中に共存し、それぞれが分離系の各々における増殖の難易度により選択され、一方の抗原型ウイルスが優位にある混合ウイルスである可能性も考えられる。第 3 には、トリプシンがウイルス粒子の表面構造に直接作用し、結果としてみかけ上トリプシン自身の作用を受けていない 10 dE 系増殖ウイルスとは異なるウイルスとして表現されていることも考えられる。これらの理由の可否を知るため、継代・クローニング・中和反応などの実験を行った。

継代数を重ねたり、継代系を相互に変換すると、第

1の理由が妥当である場合、一方通行的なHA抗原性の変化(不安定型から安定型)がおきると予想され、また第2の理由によるならば、HA抗原性の相互変換がおきる可能性が高いと予測される。一方、第3の理由によるならば、トリプシンを含んでいるかどうかだけの違いを示す系であるMT系とM系への継代により容易にHA抗原性が変化すると考えられる。継代実験で得られた結果は、MT型ウイルスのHA抗原性が10dE系またはM系の継代で容易に10dE型に変化した反面、元のMT型抗原性を維持したのはMT系継代のみであった。また、10dE型HA抗原性は、いずれの方法で継代してもMT型への変化はなく、元のままを示した。さらにMT型より10dE型にHA抗原性を变化させたウイルスは、MT系継代を9代繰返しても、MT型に復帰することはなかった(図1、図2、図3)。これらの結果は、第1の抗原構造の不安定さがHA抗原性に反映している可能性を最も強く示唆しているが、第2の理由を完全に否定するものではない。それは、MT型ウイルスが10dE系やM系ではほとんど増殖せず、その結果、10dE型からMT型へのHA抗原性変換がみられない可能性もあるからである。第3のトリプシンの直接作用については、トリプシンが確かにHAに作用し、それを分割するという報告³¹⁾はなされている。しかし、今回の結果は、M系継代でMT型から10dE型へのHA抗原性の変化はみられるものの、逆になく、また、想定される現象がウイルス粒子の本質的な変化をもたらすとは考えにくいことから、ほぼ否定されたと考える。

第2の理由が本現象の原因と仮定すると、クローニング実験により得られるクローンは、分離増殖系の変換がそのHA抗原性に影響しない10dEウイルス由来のものはすべて10dE型のHA抗原性を示し、逆に変化を示すMTウイルス由来のものには10dE型の抗原性を示すクローンが含まれている可能性があることを予測させる。一方、第1の理由を是とすれば、クローニングによりMT型から変化したと思われる10dE型ウイルスには、10dE型とは異なるHA抗原性(元のMT型)を示すクローンの残存が期待される。クローニングの結果は、10dEウイルス由来クローン中にMT型と思われるHA抗原性のクローンがみられる一方、MTウイルス由来クローンはすべてMT型のHA抗原性を示すクローンであった(表6)。このことは、継代実験の結果と同様、第1の理由が妥当である可能性を強く示唆している。ただ、クローニングで得られたクローン数がそれぞれ15個ずつでしかないことから、これより少ない確率でMTウイルス中に10dE型のHA抗原性をもつウイルスが混在している可能性までは否

定できない。

次に、HA抗原性とも関連する中和抗原性の検討結果は、中和抗原性にも分離継代系の違いによる差が存在することを示した(表7)。しかし、その差は継代系の変化に伴う可逆的な変化を示したので、インフルエンザウイルスで知られている宿主依存性抗原³²⁾が、中和抗原性には強く関与していると考えられる。一方、同様の10dE型HA抗原性を示す10dEウイルスとMウイルスの二者間でも中和抗原性に大きな差が認められた。ところがHAI価で8倍の差があるにもかかわらず、MTウイルスとMウイルス間の中和抗原性には大きな差がなかった。これらの事実は、HA抗原が中和反応に関与していることまでは否定しないが、HAI価の差が中和抗体価の差として必ずしも正確に反映されていないこともあるように思われる。

B/石川/1/76株ウイルスでみられたHA抗原性の分離継代系の違いによる差の出現という現象が、このウイルスに限定される特殊な現象か、あるいは少なくともインフルエンザB型ウイルスではある確率でおこりうる現象で、それほど特殊ともいえない現象であるのかを、1980年の分離B型ウイルス株で検討した。その結果、4株中3株では分離継代系の違いによるHA抗原性の差は検出できなかったものの、残りの1株(B/石川/9/80)では認められ、そのHAI価における差は4倍であった(表8)。このことは、分離継代系の違いによりHA抗原性に差を生ずるという現象は、決して特殊なものではなく、B型ウイルスではある確率でおこりうる現象であることを示唆している。

B/石川/1/76株ウイルスについては、継代によりモルモットやニワトリ赤血球に対する凝集能が変化する現象であるO-D変異^{11),33)}や、血清中のインヒビターに対する感受性についても、若干の検討を行った。いずれもMTウイルスと10dEウイルス間に有意な差はなく、HA抗原性の差の発生に関与している可能性は考えられなかった。また、抗MTでみられたこの現象は、人のインフルエンザB型ウイルス罹患患者対血清を用いた赤血球凝集抑制反応でも検出することが可能であった。

結 論

インフルエンザウイルス分離系として、MT(トリプシン添加MDCK細胞)系が従来の10dE(ふ卵令10日目の発育鶏卵)系と同様に使用しうることについて検討した。この検討の途中でみだされたB/石川/1/76株ウイルスでの分離継代系の違いによるHA(hem-agglutinin)抗原性の差の発生原因についても追求し、以下の成績を得た。

1. MT系は10dE系と同様かもしくは若干高いインフルエンザウイルス感受性を示し、感受性という面では分離系としてきわめて有用であると判断された。

2. インフルエンザウイルスの交差赤血球凝集抑制反応により、分離系の違いによるHA抗原の分析面における影響を検討したところ、A型ウイルスではその影響はなく問題がなかった。一方、B型ウイルス、特にB/石川/1/76株においては、免疫血清にMT系分離継代ウイルス免疫マウス血清を用いると、分離系の違いによるHA抗原性の差としてMT系分離継代ウイルスと10dE系分離継代ウイルスの間で赤血球凝集抑制反応抗体価に8倍の差が認められた。このことは、実際のインフルエンザウイルス分離にMT系を用いることが、HA抗原を分析する上で混乱を引起す可能性を示唆している。しかし、10dE系分離継代ウイルス免疫マウス血清を用いたHA抗原分析では本現象がみられなかったため、この点に留意すれば、MT系のインフルエンザウイルス分離面への応用には支障がないと思われた。

3. B/石川/1/76株での分離系によるHA抗原性の違いについて検討したところ、HA抗原性の継代系変換による変化は、MT系分離継代ウイルス型から10dE系あるいはトリブシン非添加MDCK細胞系による継代で10dE系分離継代ウイルス型へ一方通行的におき、逆は認められなかった。

4. クローニングによりMT系分離継代ウイルス中には10dE系分離継代ウイルス型のHA抗原性を示すウイルスの混在はみられなかったが、10dE系分離継代ウイルス中にはMT系分離継代ウイルス型のHA抗原性を示すクローンがいくつか検出された。3.と4.の事実は、両分離系におけるHA抗原性の違いが、ウイルスHA抗原の不安定型から安定型への変換による可能性を示唆している。

5. 中和反応における抗原性にも、分離系による差が認められた。この場合の継代系変換による変化は、増殖細胞の影響が強くなる相互変換性の変化を示し、中和反応における抗原性には宿主細胞由来の抗原が強く作用していると考えられた。

6. 他のB型ウイルス株においても、本現象がおきるかを、1980年の分離株で検討した結果、4株中1株に同様の現象を認めた。したがって、本現象はB/石川/1/76株だけに限定される特殊な現象ではなく、少なくともインフルエンザB型ウイルスにおいてある確率でおこりうるということが判明した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導・御校閲を賜った波田野基

一教授ならびに本研究の機会を与えて下さいました石川県衛生公害研究所の三根晴雄元所長、河野俊一前所長および石田宗治現所長の方々に深謝するとともに、御助言、御協力をいただいた金沢大学がん研究所ウイルス部の諸先生方ならびに石川県衛生公害研究所微生物部の関係各位に心より感謝の意を表します。

本論文の要旨の一部は、第24回日本ウイルス学会総会(1976年、名古屋市)および第17回日本細菌学会中部支部総会(1980年、名古屋市)で発表した。

文 献

- 1) Magill, T. P. & Francis, T. Jr.: Antigenetic differences in strains of human influenza virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **35**, 463 - 466 (1936).
- 2) Magill, T. P. & Francis, T. Jr.: Antigenetic differences in strains of epidemic influenza virus. *Brit. J. Exp. Path.*, **19**, 273 - 284 (1938).
- 3) Archetti, I. & Horsfall, F. L.: Persistent antigenetic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J. Exp. Med.*, **92**, 441 - 462 (1950).
- 4) Hilleman, M. R., Mason, R. P. & Buesher, E. L.: Antigenic pattern of strains of influenza A and B. *Proc. Soc. Exp. Med.*, **92**, 229 - 235 (1950).
- 5) Meyar, H. M., Hilleman, M. R., Miesse, M. L., Grawford, I. P. & Bankhead, A. J.: New antigenetic variant in Far East influenza epidemic. *Proc. Soc. Exp. Med.*, **95**, 609 - 616 (1957).
- 6) Choppin, P. W., Osterhout, S. & Tamm, I.: Immunological characterization of New York strain of influenza A virus from 1957 pandemic. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **98**, 513 - 520 (1958).
- 7) 福見秀雄: インフルエンザ-抗原原罪説と抗原循環説一., *日本医事新報*, **2266**, 29 - 32 (1962).
- 8) Fukumi, H.: Epidemiology of influenza viewed from the antigenetic variation of the virus, Working conference on myxovirus infection. The Japan-United States Cooperation Medical Science Program., **2-4**, 43 - 62 (1968).
- 9) 庭山清八郎: インフルエンザウイルスの抗原変異, *新潟県医師会雑誌*, **280**, 2 - 4 (1973).
- 10) 庭山清八郎, 芝田充男, 岩瀬勇男, 馬場貞義: インフルエンザウイルスの抗原変異について, *ウイルス*, **25**, 200 (1975).
- 11) 小笠原一夫・阿多実茂・波多野基一: *医科微生物学*, 294 - 298頁, 東京, 朝倉書店, 1978.
- 12) 乗木秀夫: *インフルエンザ研究の進歩(加地編)*,

- 30 - 48 頁, 東京, 近代出版, 1976.
- 13) 芝田充男: 新潟県におけるインフルエンザについて, 新潟医学会雑誌, **92**, 653 - 693 (1978).
- 14) Schild, G. C.: インフルエンザ (杉浦・飛田・根路銘 訳), 67 - 79 頁, 東京, 講談社, 1978.
- 15) 吉野亀三郎: ウイルス実験学 総論 (国立予防衛生研究所学会編), 113 - 129 頁, 東京, 丸善, 1973.
- 16) 川名林治: インフルエンザ研究の進歩 (加地編), 87 - 98 頁, 東京, 近代出版, 1976.
- 17) 梶哲夫・尾西一・木村晋亮・波多野基一: 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 の分離成績, ウイルス, **26**, 95 (1976).
- 18) Ito, H., Morimoto, Y., Iwase, I., Doi, Y., Sanpe, T., Nakajima, M., Okawa, S., Kato, T., Ishikawa, M. & Muramatsu, S.: Effect of trypsin on viral susceptibility of Vero cell culture, Cero-pithcus kidney line. Japan. J. Med. Sci. Biol., **23**, 227 - 235 (1970).
- 19) Tobita, K., Sugiura, 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).
- 20) Tobita, K.: Permanent canine kidney (MDCK) cells for isolation and plaque assay of influenza B viruses. Med. Microbiol. Immunol., **162**, 23 - 27 (1975).
- 21) 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).
- 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) 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学会編), 214 - 225 頁, 東京, 丸善, 1973.
- 24) 大谷明・奥野剛: ウイルス実験学 各論 (国立予防衛生研究所学会編), 147 - 154 頁, 東京, 丸善, 1967.
- 25) 小笠原一夫・阿多実茂・波多野基一: 医科微生物学, 251 - 252 頁, 東京, 朝倉書店, 1978.
- 26) Wallis, C., Melnick, J. L. & Rapp, F.: Effects of pancreatin on the growth of reovirus. J. Bacteriol., **92**, 155 - 160 (1969).
- 27) 緒方隆之・清水明・山田堅一郎・酒井真英・北岡正美: コウモリ腎細胞培養のアルボウイルスに対する感受性について, ウイルス, **22**, 317 (1972).
- 28) 吉井孝男・名高克郎・甲野札作: 急性出血性結膜炎 (AHC) ウイルスの非霊長類系細胞における増殖, 第 25 回日本ウイルス学会総会演説抄録, 191 (1977).
- 29) Gifford, G. E. & Klappen, D. G.: Enhancement of vaccinia virus plaque formation by trypsin. Proc. Soc. Exp. Biol., **126**, 515 - 517 (1967).
- 30) Morimoto, Y., Doi, Y. & Itoh, H.: Effects of trypsin on replication of type 4 parainfluenza virus in Vero cell culture under fluid overlay. Japan. J. Med. Sci. Biol., **23**, 1 - 11 (1970).
- 31) Klenk, H.D., Rott, R., Orlich, M. & Blödorn, J.: Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. Virology, **68**, 426 - 439 (1975).
- 32) Laver, W. G. & Webster, R. G.: The structure of influenza virus. IV. Chemical studies of the host antigen. Virology, **30**, 104 - 115 (1966).
- 33) 水谷裕迪: ウイルス実験学 各論 (国立予防衛生研究所学会編), 34 頁, 東京, 丸善, 1967.

Studies on Antigenicity Analysis of Influenza Viruses Newly Isolated by Trypsin-added MDCK Cell System Tetsuo Kaji, Department of Virology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920—J. J. J. Soc., **91**, 1081—1094 (1982)

Key words: MDCK cell, trypsin, influenza virus, HA antigen.

Abstract

MDCK cells (derived from the canine kidney) supplemented by trypsin (MT) system have been used for influenza virus isolation in addition to the classical system embryonated eggs incubated for ten days at 38°C (10dE) system. This MT system was shown to have slightly higher susceptibility to influenza virus growth than those of 10dE system. No antigenic differences in hemagglutinin (HA) were observed between MT- and 10dE-isolated type A viruses. In

a influenza type B virus strain (B/Ishikawa/1/76), HA antigenicity of MT-isolated virus clearly differed from those of 10dE-isolated one; the difference occurred when anti-MT-isolated virus mouse serum was used for its analysis, but was not detected by anti-10dE-isolated virus immune serum. Exchanges of cell system between MT and 10dE for virus passages reproducibly caused irreversible conversion of HA antigenicity in MT-isolated type B virus strain with a contrast to no effects in the case of 10dE-isolated virus strain. In addition, cloning experiments revealed that MT-isolated virus consisted of homogeneous MT-type viruses in HA antigenicity while 10dE-isolated virus was usually shown to be virus mixed with MT- and 10dE-type HA antigenicity. These two evidences strongly suggest that HA antigenic stability of influenza type B virus differs depending on host cells employed for virus growth. Similar differences observed in the above HA antigenicity were also found in neutralizing antigenicity of MT-isolated virus. This phenomenon in which both HA and neutralizing antigenicity of type B virus clearly showed a difference dependent on the cell system employed for isolation and growth was also observed in another strain of influenza type B virus newly isolated by MT system in 1980.