

インフルエンザウイルスの細胞培養
による分離方法の確立とその疫学的
解析への応用

中村和幸

1991

学位申請論文

インフルエンザウイルスの細胞培養
による分離方法の確立とその疫学的
解析への応用

中 村 和 幸

1 9 9 1

目次

I	緒言	1
II	材料と方法	3
1.	浮遊培養細胞を用いたインフルエンザウイルス分離法	3
1)	浮遊細胞培養装置	3
2)	MDCK細胞の培養液および培養法	3
3)	ESK細胞の培養液および培養法	4
4)	患者咽頭ぬぐい液中のウイルス濃度の定量法	4
5)	血球凝集素(HA)活性の測定法	4
6)	濃度別浮遊培養細胞へのインフルエンザウイルス標準株の接種	4
7)	至適濃度の浮遊培養細胞へのインフルエンザウイルス標準株の 接種	5
8)	単層培養細胞へのインフルエンザウイルス標準株の接種	5
9)	患者検体からのウイルス分離法	6
2.	MDCK凍結保存細胞を用いたインフルエンザウイルス分離法	6
1)	細胞の凍結保存法	6
2)	凍結保存細胞へのインフルエンザウイルス標準株の接種	6
3)	患者検体からのウイルス分離法	7
3.	インフルエンザウイルス分離指標の判定法	7
1)	検体採取法および培養法	7
2)	検体中のウイルス濃度の定量法	8
3)	血球凝集素(HA)活性の測定法	8
4)	ノイラミニダーゼ(NA)活性の測定法	8

4.インフルエンザ流行の疫学的測定法	8
1)検体採取法	8
2)インフルエンザウイルスの分離法	9
3)インフルエンザウイルス以外のウイルスの分離法	9
4)患者血清血球凝集抑制(HI)抗体価の測定法	10
5.インフルエンザウイルスの抗原変異分析法	10
1)交差HI試験による抗原分析法	10
2)HA遺伝子塩基配列の解析法	10
i. 解析に用いたインフルエンザウイルスとウイルスRNAの精製	10
ii. 塩基配列の決定法	10
iii.解析に用いたプライマー	11
III 成績	11
1.インフルエンザウイルス分離方法についての検討	11
1)MDCK浮遊培養細胞についての成績	11
i. 浮遊細胞培養の成績	11
ii. MDCK浮遊培養細胞のインフルエンザウイルス分離における 至適細胞濃度の選定	11
iii.MDCK浮遊培養細胞と単層培養細胞のインフルエンザウイルス 標準株についての感受性の比較	13
iv. 患者検体からのウイルス分離成績	13
2)ESK浮遊培養細胞についての成績	14
i. 浮遊細胞培養の成績	14
ii. ESK浮遊培養細胞のインフルエンザウイルス分離における 至適細胞濃度の選定	14
iii.ESK浮遊培養細胞, ESK単層培養細胞およびMDCK単層培養細胞の インフルエンザウイルス標準株についての感受性の比較	15

iv. 患者検体からのウイルス分離成績	16
3)MDCK凍結保存細胞についての成績	17
i. MDCKおよびESK凍結保存細胞の生存率	17
ii. MDCK凍結保存細胞のインフルエンザウイルス標準株に対する 感受性	17
iii.患者検体からのウイルス分離成績	18
2.インフルエンザウイルス分離指標についての検討	18
1)HA活性についての成績	18
i. A(H1N1)型インフルエンザウイルス	18
ii. A(H3N2)型インフルエンザウイルス	19
iii.B型インフルエンザウイルス	19
2)NA活性についての成績	20
i. 患者うがい液中のウイルス濃度	20
ii. ウイルス分離成績	20
iii.NA活性とHA活性との関係	21
3.インフルエンザ流行についての疫学的検討	22
1)ウイルス分離成績	22
i.医療定点における成績	22
ii.タイ国チェンマイにおける成績	24
2)インフルエンザ流行期の患者血清HI抗体価とインフルエンザ感染 およびワクチン接種との関係	26
3)インフルエンザ流行前のHI抗体保有状況	30
4.インフルエンザウイルスの抗原変異および進化	34
1)交差HI試験による抗原分析	34
i. 医療定点で分離されたインフルエンザウイルスの抗原分析	34
ii.タイ国チェンマイで分離されたインフルエンザウイルスの 抗原分析	38

2)HA遺伝子塩基配列の解析	41
i. 1986～89年間に分離されたA(H1N1)型ウイルスのA/USSR/90/77と 比較してのHA遺伝子塩基配列の解析	41
ii. 1987～89年間に分離されたA(H3N2)型ウイルスのA/Bangkok/1/79 と比較してのHA遺伝子塩基配列の解析	42
IV 考察	43
1.インフルエンザウイルス分離方法についての検討	43
1)MDCK浮遊培養細胞を用いたインフルエンザウイルス分離	44
2)ESK浮遊培養細胞を用いたインフルエンザウイルス分離	46
3)MDCK凍結保存細胞を用いたインフルエンザウイルス分離	49
2.インフルエンザウイルス分離指標についての検討	50
1)HA活性についての検討	50
2)NA活性についての検討	51
3.インフルエンザ流行についての疫学的検討	53
1)インフルエンザウイルスおよびその他のウイルスの分離状況	54
i. 医療定点における分離状況	54
ii. タイ国チェンマイにおける分離状況	57
2)インフルエンザ流行期の患者血清HI抗体価とインフルエンザ感染 およびワクチン接種との関係	60
3)インフルエンザ流行前のHI抗体保有状況と流行との関係	66
4.インフルエンザウイルスの抗原変異および進化	68
1)交差HI試験による抗原変異の分析	69
i. 医療定点で分離されたインフルエンザウイルスの抗原変異	69
ii. タイ国チェンマイで分離されたインフルエンザウイルスの 抗原変異	70

2)HA遺伝子塩基配列の解析による分子進化についての検討	73
-特に, 前駆波ウイルスとの関係について-	
i. 1986~89年間に分離されたA(H1N1)型ウイルスのA/USSR/90/77 と比較してのHA遺伝子の変異	73
ii. 1987~89年間に分離されたA(H3N2)型ウイルスのA/Bangkok/1/79 と比較してのHA遺伝子の変異	74
V 総括	76
1. インフルエンザウイルス分離方法についての検討	76
2. インフルエンザウイルス分離指標についての検討	77
3. インフルエンザ流行についての疫学的検討	78
4. インフルエンザウイルスの抗原変異および進化	80
VI 謝辞	84
VII 文献	85
付表 (1~44)	98
付図 (1~34)	126

I 緒言

インフルエンザウイルスは人の病原ウイルスとして最も早い1933年に患者から分離発見され[79], 1930年代後半から1940年代にかけて, すでに何種類かのワクチンが開発されているが[3,14], いまだにその流行を防ぐことは不可能な状態にある。

インフルエンザを制圧することのできない最も大きな原因は, インフルエンザウイルスが抗原変異により休むことなく進化論的な変化を続けていることによる。インフルエンザウイルスの変異は, おもにそのエンベロープを構成する2種類の糖蛋白, 血球凝集素とノイラミニダーゼの部分で生じることが明らかにされているが[1,75], インフルエンザについて生態学的にあるいは疫学的に研究を進めていくためには, このようなインフルエンザウイルスの変異を的確に捉え, ウイルスの進化の方向を見極めていかなければならない。

インフルエンザはわが国においては毎年周期的に冬期に流行し, その流行は突発的に始まり爆発的に拡大して行く。このような流行形態をとるインフルエンザについては疫学的なアプローチが最も必要な疾病と考えられるが, その流行像についてさえも, いまだに不明な点が多く残されている。

このようなインフルエンザについて, その流行実態を正確に把握し, 抗原変異と流行とのかかわり合いなどを明らかにしていくためには, ウイルス検索を丹念に行い, 疫学的な解析を積み重ねて行くことが必要である。

インフルエンザウイルスの検出法としては培養細胞や発育鶏卵を用いて培養を行う方法[17,36,90,91]と, 蛍光抗体法[11,72,76,78]やELISA法[5,12,95], RIA法[44]などにより検体中のウイルスを, 直接または一度細胞へ接種した後証明する方法とが考えられる。個人の病原診断のための方法としては, 直接ウイルスを証明する方法が迅速性, 簡便性などの点で優れている。しかし, 疫学的研究を目的とする場合は培養によりインフルエンザウイルスを分離し, 流行実態を把握すると共に分離ウイルスについて抗原性の変異, 進化などウイルス学的性状について検討を加えて行くことが必要である。

このような目的でインフルエンザウイルス分離を行う場合, 現在行われてい

る方法は煩雑で、日時を要するため長期間にわたって大量の検体を効率よく、迅速に処理することは困難である。

そのため、ただちに使用可能な状態の細胞を常時十分量用意できる方法として、攪はん培養による浮遊細胞培養法についての検討を行い、インフルエンザウイルス分離への応用を試みた。

浮遊細胞培養については、始めに最も広くインフルエンザウイルスの分離に用いられているMDCK細胞（イヌ腎由来株化細胞，ATCC.CCL.34）について検討し、ついでインフルエンザウイルスに高い感受性を持つことが明らかにされているが[46,98]，患者検体への応用についてはまだ報告されていないESK細胞（豚腎由来株化細胞，ATCC.CCL.184）について検討した。

また、浮遊細胞培養法の補助的手段として凍結保存細胞を直接ウイルス分離に用いる方法についても検討した。

その結果、これらの方法は、多量の検体を効率的かつ迅速に処理できる方法として、十分疫学調査に応用し得るものと思われた。

特にESK細胞については、患者検体からのウイルス分離において、MDCK細胞以上にインフルエンザウイルスに対して高い感受性を持つことが明らかになった。

また、インフルエンザウイルスの分離指標としては、ニワトリ赤血球による血球凝集素(HA)活性[81]が通常用いられているが、分離効率を高めるためモルモット赤血球の使用について検討した。さらに、インフルエンザウイルスの特徴的な性質のひとつであるノイラミニダーゼ(NA)活性[59]の分離指標への応用についても検討を加えた。

以上のような方法を用いて、長野県内においてインフルエンザ様疾患の継続的な監視を行い疫学的解析を試みた。県内2ヶ所の医療定点において1986年1月から1989年7月までの間、インフルエンザ様患者から咽頭ぬぐい液と血液を採取しウイルス分離と血清抗体価の検査を行った。ウイルス分離については、このほかにインフルエンザウイルスのグローバルな流れに大きな影響を与えていると考えられている東南アジアの一地域であるタイ国チェンマイにおいて1986年から1989年まで毎年8月に調査を行った。ウイルス分離は6種類の細胞を用いて、インフルエンザウイルス以外のウイルスについても検索を行った。

ウイルス分離成績から、インフルエンザウイルスおよびその他のウイルスに

ついでに流行実態を把握すると共に、インフルエンザについては流行期を特定し、インフルエンザウイルス以外のウイルスの関与による修飾が排除された成績について疫学的検討を行った。また、流行前の免疫状況を知るため例年10月に健康な県内住民から血液を採取し血清抗体価の調査も行った。

分離されたインフルエンザウイルスについては抗血清を用いた抗原分析を行い抗原変異の動きを明らかにした。

また、インフルエンザウイルスの追跡調査の中で、冬期を中心としたインフルエンザ流行の終息後、あるいは流行の末期に主流行ウイルスとは異なった型のウイルスが分離され、このウイルスが次の流行期の流行ウイルスになるという現象が観察された。このような現象については、すでにGlezenら[18,19]によって前駆波現象として報告されているが、その生態学的な意義についてはまだ明らかにされていない。

そこで、前駆波ウイルスを捕捉することのできたA(H1N1)型およびA(H3N2)型ウイルスについては、次の流行ウイルスとの遺伝学的関連性の解明を目的にHA遺伝子についての塩基配列の解析を行った。

II 材料と方法

1. 浮遊培養細胞を用いたインフルエンザウイルス分離法

1) 浮遊細胞培養装置

図 1 に示したように、浮遊細胞培養はスピナーフラスコ(Bellco社製)を用いた攪はん培養で行った。37°Cのふ卵器内にマグネチックスターラーを設置し、その上にマグネチックスターラーからの熱の影響を避けるため高さ約2.5 cmの台を設け、この台の上に内壁にシリコンコーティングを施したスピナーフラスコを置いた。また、ふ卵器の外に回転数調整のためのスライダックと電圧を一定に保ち安定した回転を得るためのスタビライザーを置き、マグネチックスターラーに接続した。

2) MDCK細胞の培養液および培養法

培養液は表 1 に示したように Joklik 浮遊培養液に、新生仔牛血清を10%、

29.5 mg/mlのトリプトースリン酸ブロス液を10%， および30 mg/mlのメチルセルロース液を3%添加したものをを用いた。この培養液を用いて調整した細胞浮遊液をスピナーフラスコにいれ、200 rpmで攪はん培養を行った。培養開始後、細胞濃度を $3\sim 5\times 10^5$ cells/mlの間に保つために、2日目毎に50 mlの新しい培養液を追加した。

3)ESK細胞の培養液および培養法

培養液は、MEM Joklik浮遊培養液に新生仔牛血清を10%， 30 mg/mlのメチルセルロースを3%添加したもので、おおよびこれにポリペプトン（大五栄養化学製）をそれぞれ5%、10%、15%添加したものを使用した。これらの培養液を用いて調製した $3.4\sim 4.8\times 10^7$ cells/bottleの細胞浮遊液100 mlをスピナーフラスコに入れ、200 rpmで攪はん培養を行った。培養開始後、7日間毎日細胞数を算定し、細胞濃度が $5\sim 7\times 10^5$ cells/mlになるように適宜新しい培養液を追加した。

4)患者咽頭ぬぐい液中のウイルス濃度の定量法

根路銘の変法[65]を用いて、ブラック法により患者検体中のウイルス量を算定した。すなわち、シャーレ(60x16 mm)内面のMDCK単層培養細胞をPBS(-)で2回洗浄後、6段階に10倍希釈した患者検体0.2 mlを接種し1時間吸着後、表 2、表 3 により調製した重層用寒天培地を5 ml分注した。3日間CO₂ふ卵器で静置培養後、表 4 に示した第2次重層寒天培地2 mlを分注し、翌日ブラック数を算定した。

5)血球凝集素(HA)活性の測定法

検体接種後の培養液の一部をマイクロピペットで取り出し、マイクロプレートを用いて8段階に2倍希釈し、0.5%ニワトリ赤血球を加えた。その後、室温に1時間静置し判定した。希釈はマルチチャンネルピペットを用いて行い、希釈液は0.1%牛血清アルブミン添加のPBS(-)を用いた。

6)濃度別浮遊培養細胞へのインフルエンザウイルス標準株の接種

MDCK細胞については、浮遊培養細胞を1%牛血清アルブミン添加のEagle's ME

Mで2回洗った後、同じ液で調製した 2.2×10^7 cells/mlの細胞浮遊液を8段階に2倍希釈し、この細胞浮遊液に患者検体中のウイルス濃度の平均値であった 4.4×10^3 PFU/mlに希釈したインフルエンザウイルスA/熊本/37/79(H1N1), A/Bangkok/1/79(H3N2), およびB/Singapore/222/79を接種しHA産生を観察した。

ESK細胞については、細胞浮遊液をMDCK細胞と同様に1%牛血清アルブミン添加のEagle's MEMで洗った後、 2.4×10^7 cells/mlの細胞浮遊液を8段階に2倍希釈し、それぞれにウイルスを接種しHA価を測定した。ウイルスはA/USSR/92/77(H1N1), A/東京/1/77(H3N2), およびB/神奈川/3/76を患者検体中のウイルス濃度の平均値であった 4.6×10^3 PFU/mlに希釈したものを使用した。

細胞への接種には、MDCK, ESK細胞共に12ウエルのマルチディッシュ(LINBRO社製)を用いた。各希釈の細胞浮遊液0.1 mlへウイルス液0.2 mlを接種し、1時間吸着後0.7 mlの表 5 に示した細胞維持液を分注した後、CO₂ふ卵器で34°C静置培養し、MDCK細胞については5日間、ESK細胞については7日間HA価を測定した。

7) 至適濃度の浮遊培養細胞へのインフルエンザウイルス標準株の接種

MDCK細胞については、12ウエルのマルチディッシュを用いて図 2 に示した方法で行った。すなわち、浮遊培養細胞を、1%牛血清アルブミン添加のEagle's MEMで2回洗った後、表 5 に示した細胞維持液で調製した0.1 mlの 5.5×10^6 cells/mlの細胞浮遊液にウイルス液0.2 mlを接種した。ウイルス液はII,1,6)と同じものを用いた。1時間吸着後同じく表 5 に示した細胞維持液を0.7 ml分注した後、CO₂ふ卵器で34°C静置培養し、7日間HA価を測定した。

また、ESK細胞については 6.0×10^6 cells/mlの細胞浮遊液を用いてMDCK細胞と同様に行った。ウイルス液はMDCK細胞と同様にII,1,6)と同じものを用いた。

8) 単層培養細胞へのインフルエンザウイルス標準株の接種

12ウエルのマルチディッシュを用いて培養したMDCKおよびESK単層培養細胞をPBS(-)で2回洗った後、II,1,6)と同じウイルス液0.2 mlを接種し、34°Cで1時間吸着後1.5 mlの表 5 に示した細胞維持液を分注した。その後、浮遊培養細胞の場合と同様に、CO₂ふ卵器で34°C静置培養し、MDCK細胞については5日間、ESK細胞については7日間HA価を測定した。

9)患者検体からのウイルス分離法

ウイルス分離には咽頭ぬぐい液を用いた。検体採取後の保存液には、1%牛血清アルブミン添加のEagle's MEMにペニシリン、ストレプトマイシンをそれぞれ1000 U/ml, 1000 μ g/ml, さらにファンギゾンを2 μ g/ml添加した液を使用し、2000 rpm, 20分遠心後の上清を分離用検体として用いた。

MDCKおよびESK浮遊培養細胞への検体の接種は、II, 1, 7)と同様に行った。34°Cで5日間培養後、HA価を測定しニワトリ免疫血清を用いて血球凝集抑制(HI)試験により同定した。また、MDCKおよびESK単層培養細胞への検体の接種は、II, 1, 8)と同様に行った。HA価の測定および分離ウイルスの同定法は、浮遊培養細胞の場合と同様である。

2. MDCK凍結保存細胞を用いたインフルエンザウイルス分離法

1)細胞の凍結保存法

MDCKおよびESK細胞の単層培養細胞をトリプシン-EDTAで分散した後、10% DMSO, 10%新生仔牛血清添加のEagle's MEMで 6.0×10^6 cells/mlの細胞浮遊液を調製し、1 mlずつテフロンチューブに分注した。このテフロンチューブをガーゼに包み、発泡スチロールの箱に入れたまま-80°Cのフリーザーで凍結した。

その後、1ヶ月に1本ずつ取り出しニグロシン染色[33]を行い、6ヶ月間細胞の生存率を調べた。

細胞の生存率の算定は次のようにして行った。凍結保存細胞を微温湯で融解後、Hanks' BSSで2回洗い、0.05%ニグロシン溶液で10倍に希釈し、室温30分染色後、Tatai式血算盤を用いて全細胞数と死細胞数を数え、その差を生細胞数として百分率で表した。

2)凍結保存細胞へのインフルエンザウイルス標準株の接種

インフルエンザウイルス標準株は、A/熊本/37/79(H1N1), A/新潟/102/81(H3N2), B/Singapore/222/79を使用した。これらのウイルスを患者咽頭ぬぐい液中の平均ウイルス量であった 4.6×10^3 PFU/ml[53]に希釈し実験に用いた。

凍結保存細胞を微温湯で融解し、1%牛血清アルブミン添加のEagle's MEMで

2回洗った後、表 5に示した細胞維持液でESK細胞での至適細胞濃度であった 6.0×10^6 cells/mlに戻し、0.1 mlずつ12ウェルのマルチディッシュに分注した。

この細胞浮遊液に0.2 mlのウイルス液を接種し、1時間吸着後同じく表5に示した細胞維持液を0.7 ml分注し、34°CのCO₂ふ卵器で培養した。培養後5日間HA価を測定した。HA価の測定はII,1,5)と同様に行った。

3)患者検体からのウイルス分離法

インフルエンザ様患者の咽頭ぬぐい液をMDCK凍結保存細胞へ接種し、ウイルス分離を行った。また、同じ検体をMDCK単層培養細胞へも接種し成績の比較を行った。凍結保存細胞への接種は図 3 に示した方法で行った。単層培養細胞への接種はII,1,8)と同様に行った。

検体接種後毎日観察し、CPEの進展に応じて3~5日後にII,1,5)と同様にHA価を測定し、ニワトリ免疫血清を用いてHI試験により同定した。

3.インフルエンザウイルス分離指標の判定法

1)検体採取法および培養法

1%牛血清アルブミン添加のEagle's MEMに、ペニシリンを1000 U/ml、ストレプトマイシンを1000 μ g/ml、およびファンギゾン₂を2 μ g/mlになるように添加した液を検体保存液として、うがい液あるいは咽頭ぬぐい液を採取し、2000 rpm、20分遠心後の上清をMDCK細胞、LLC-MK2細胞（アカゲザル腎由来株化細胞、ATCC.CCL.71）および発育鶏卵へ接種した。

MDCK細胞については単層培養細胞、浮遊培養細胞、あるいはトリプシン-EDTAで分散後の細胞浮遊液をウイルス分離に用いた。LLC-MK2細胞については単層培養細胞およびトリプシン-EDTAで分散後の細胞浮遊液をウイルス分離に用いた。単層培養細胞および浮遊培養細胞への接種はII,1,7)および8)に述べた方法によった。細胞浮遊液への接種は、著者らが早期実験室診断を目的に試みてきた細胞浮遊液へ直接検体を接種する方法[50]で行った。すなわち、単層培養細胞をトリプシン-EDTAで分散後、 2×10^6 cells/mlに調製した細胞浮遊液1 mlに検体0.2 mlを接種した。

発育鶏卵は10日齢のものを使用し、尿膜腔および羊膜腔へ検体を0.2 mlずつ

接種した。検体接種後34°Cで4~5日間培養し、初代培養で十分なHA活性およびNA活性が得られなかったものについては、さらに、もう1代培養を繰り返し再びHA活性、NA活性を測定した。

分離ウイルスの同定はニワトリ免疫血清を用いたHI試験によった。

2) 検体中のウイルス濃度の定量法

MDCK細胞を用いたブラック法によりII,1,4)と同様に行った。

3) 血球凝集素(HA)活性の測定法

HA価は培養液、尿膜腔液および羊水をマイクロプレートを用いて8段階に2倍希釈し、0.5%ニワトリ赤血球あるいは0.5%モルモット赤血球をそれぞれに加え、室温に1時間置いた後判定した。HA価測定のための希釈液は、0.1%牛血清アルブミン添加のPBS(-)を用いた。

また、ニワトリ赤血球およびモルモット赤血球の分離指標としての有用性の検討のため、流行毎に型別の平均HA価およびニワトリ赤血球に対するHA価とモルモット赤血球に対するHA価との相関係数を算定した。

平均HA価は幾何平均値を求め、相関係数はSpearmanの順位相関係数を求めた。

4) ノイラミニダーゼ(NA)活性の測定法

ノイラミニダーゼによりフェチュインから遊離したN-アセチルノイラミン酸を過ヨウ素酸酸化でβ-フォルミルピルビン酸に変え、チオバルビツール酸で発色させるWHO標準法に準じて行った[67,85]。

4. インフルエンザ流行の疫学的測定法

1) 検体採取法

ウイルス分離用の検体としては、インフルエンザ様患者の咽頭ぬぐい液を用いた。咽頭ぬぐい液の採取に当たっては、1%牛血清アルブミン添加のEagle's MEMにペニシリンを1000 U/ml、ストレプトマイシンを1000 μg/ml、ファンギゾンを2 μg/ml加えた液を検体保存液として用いた。

検体は長野県内2ヶ所の医療定点（松本市、須坂市）およびタイ国チェンマイ

のチェンマイ大学付属病院で採取した。医療定点で採取した検体は、直接または保健所を經由して凍結状態のまま搬入された。チェンマイで採取した検体の一部は現地でウイルス分離に使用したが、残りはドライアイスで凍結したまま持ち帰り、医療定点の検体と同様にその後の検査を行った。

2) インフルエンザウイルスの分離法

初代培養はMDCKおよびESK浮遊培養細胞を用いて行い、初代培養でウイルスの得られなかった検体については、それぞれの細胞の単層培養細胞を用いて、もう一代培養を繰り返した。

浮遊培養細胞への接種は、MDCK,ESK細胞共に 6.0×10^6 cells/mlの細胞浮遊液を用いてII,1,7)の方法と同様に、図2に示した方法で行った。単層培養細胞への接種はII,1,8)と同様にして行った。また、検体の数あるいは時期などの状況により、補助的手段としてMDCK凍結保存細胞をウイルス分離に用いた。

凍結保存細胞への接種はII,2,3)に示した図3の方法に従った。いずれも5日間培養を行った。HA価の測定にはモルモット赤血球を用いた。

2代培養でHA活性陰性の検体については、NA活性を測定し吸光度0.05以上の検体については、再度培養を繰り返した。分離ウイルスは、ニワトリ免疫血清を用いてHI試験により同定した。チェンマイのインフルエンザ様患者については、MDCK凍結保存細胞を現地へ持参し、初代培養はチェンマイ大学医学部微生物学教室において行った。ESK細胞およびその他の細胞についての検査は、検体を持ち帰り他の検体と同じに行った。

3) インフルエンザウイルス以外のウイルスの分離法

LLC-MK2, HEp-2, FL, Vero, RD-18S単層培養細胞を用いてウイルス分離を行った。細胞の培養には24ウエルのマルチディッシュを使用した。

LLC-MK2細胞については、MDCK,ESK細胞の場合と同じ細胞維持液を使用し、MDCKおよびESK単層培養細胞と同じ方法で接種を行った。その他の細胞については、細胞増殖液として10%新生仔牛血清加のEagle's MEMを使用し、検体接種後の細胞維持液としては2%新生仔牛血清加のEagle's MEMを用いた。初代培養陰性の検体については、2代まで継代した。

同定は、パラインフルエンザウイルスについてはHI試験、アデノウイルス、エンテロウイルスについては中和試験、単純ヘルペスウイルスについてはモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法[20]によった。

4)患者血清血球凝集抑制(HI)抗体価の測定法

常法[36]に従って行った。すなわち、患者血清1容にRDE3容を加え37°C一夜感作後、56°C1時間加熱しRDEを不活化した後、7段階に2倍希釈した。これにHA価16倍に調製した抗原を加え1時間感作後、さらに0.5%のニワトリ赤血球を加え室温に1時間静置後HI抗体価の判定を行った。希釈液にはPBS(-)を用いた。

5.インフルエンザウイルスの抗原変異分析法

1)交差HI試験による抗原分析法

それぞれ、その年のワクチン株を中心とした標準株のフェレット感染血清を用いて、II,4,4)と同様に常法[36]に従って交差HI試験を行った。

一部のウイルスについては、ニワトリおよびマウス免疫血清を用いた。

2)HA遺伝子塩基配列の解析法

i.解析に用いたインフルエンザウイルスとウイルスRNAの精製

表6に、解析を行ったA(H1N1)型およびA(H3N2)型ウイルスの株名と継代歴を示した。長野県で分離したウイルスを中心に、国内各地およびチェンマイで分離されたウイルス、A(H1N1)型9株、A(H3N2)型15株について解析を行った。

それぞれのウイルスをMDCK細胞を用いて37°Cで培養し、そのウイルス液をベックマンSW28ローターを用いて、30~60%のしょ糖密度勾配遠心により精製した。

ウイルスRNAの抽出は、精製ウイルスを0.01M Tris·HCl, 0.01M KCl, 0.0015 M MgCl₂, 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS)および500 μg Proteinase Kを含む溶液で56°C, 20分処理した後、ホットフェノール法により行った[70]。

ii.塩基配列の決定法

HA遺伝子の塩基配列はウイルスRNAを直接鋳型にしてダイデオキシ法[49,74]により決定した。

iii. 解析に用いたプライマー

A(H1N1)型ウイルスのHA遺伝子については11種類、A(H3N2)型ウイルスについては7種類の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた。

A(H1N1)型ウイルスHA遺伝子については、A/PR/8/34のHA遺伝子[96]の5-15, 161-171, 310-321, 527-540, 598-610, 802-814, 1025-1039, 1173-1187, 1338-1352, 1446-1458, および1584-1596番目の塩基の位置に対応するオリゴヌクレオチドを用いた。最初の四つのプライマーはStevensら[80]により用いられたものと同じである。また、A(H3N2)型ウイルスのHA1領域については、A/愛知/2/68のHA遺伝子[94]の11-25, 149-163, 277-289, 449-461, 565-577, 714-728, および883-897番目の塩基に対応するオリゴヌクレオチドを用いた。

III 成績

1. インフルエンザウイルス分離方法についての検討

MDCKおよびESK浮遊培養細胞、MDCK凍結保存細胞を用いたインフルエンザウイルス分離の方法についての検討を行った。

1) MDCK浮遊培養細胞についての成績

i. 浮遊細胞培養の成績

図4に示したように、 2.3×10^7 cells/bottleの細胞が、2日目には 4.8×10^7 cells/bottle, 4日目には 6.9×10^7 cells/bottleに増加し、7日目には 1.1×10^8 cells/bottleとなり5.5倍の細胞が得られた。

ii. MDCK浮遊培養細胞のインフルエンザウイルス分離における至適細胞濃度の選定

患者検体中のウイルス濃度をブラック法により定量し、その平均的なウイルス量に希釈したインフルエンザウイルス標準株を各種濃度の浮遊培養細胞へ接種しウイルス分離に適した細胞濃度を求めた。

i)患者咽頭ぬぐい液中のウイルス濃度

1983年3月に採取したインフルエンザ様患者の中から任意に選んだウイルス分離陽性の10検体について、咽頭ぬぐい液中のウイルス量をブラック法により定量したところ、表7に示したように $2.5 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^4$ PFU/mlの間に分布しており、平均値は 4.4×10^3 PFU/mlであった。

ii)濃度別MDCK浮遊培養細胞のHA産生

国立予防衛生研究所から分与されたインフルエンザウイルスA/熊本/37/79(H1N1), A/Bangkok/1/79(H3N2), およびB/Singapore/222/79を患者検体中のウイルス濃度の平均値であった 4.4×10^3 PFU/mlに希釈し、各種濃度の浮遊培養細胞に接種しHA産生を観察した。

表8に示したように、A/熊本/37/79(H1N1)についての接種翌日のHA活性はすべて陰性であった。 5.5×10^6 , 2.8×10^6 , 1.4×10^6 , 7.0×10^5 cells/mlでは、2日目からHA活性が認められ、 5.5×10^6 および 2.8×10^6 cells/mlでは、4日目以降256倍の高いHA価を示した。

しかし、 1.1×10^7 cells/mlでは4日目に、 3.5×10^5 cells/mlでは3日目によりやくHA活性が認められたが高いHA価は得られなかった。 2.2×10^7 および 1.8×10^5 cells/mlでは7日間まったくHA産生が認められなかった。

A/Bangkok/1/79(H3N2)についても、A/熊本/37/79(H1N1)同様接種翌日はHA活性が認められなかったが、 5.5×10^6 , 2.8×10^6 , 1.4×10^6 , 7.0×10^5 cells/mlでは、2日目からHA活性が認められ、 5.5×10^6 cells/mlでは4日目以降512倍の高いHA活性が得られた。

1.1×10^7 , 2.8×10^6 , および 1.4×10^6 cells/mlでも4日目ないし5日目には256倍のHA価が得られたが、 7.0×10^5 および 3.5×10^5 cells/mlでは高いHA活性は得られなかった。

2.2×10^7 および 1.8×10^5 cells/mlでは、A/熊本/37/79(H1N1)同様7日間まったくHA産生が認められなかった。

B/Singapore/222/79についても、接種翌日は前二者同様HA活性は認められなかった。しかし、 5.5×10^6 , 2.8×10^6 , 1.4×10^6 , 7.0×10^5 および 3.5×10^5 cells/ml

では2日目からHA活性が認められるようになり、特に 5.5×10^6 cells/mlでは4日目から、 2.8×10^6 cells/mlでは5日目に512倍のHA活性が認められた。

1.1×10^7 cells/mlでは256倍、 1.4×10^6 cells/mlでは128倍、 7.0×10^5 cells/mlでは64倍のHA活性が得られた。 2.2×10^7 および 1.8×10^5 cells/mlでは、前2者同様HA活性は認められなかった。

iii. MDCK浮遊培養細胞と単層培養細胞のインフルエンザウイルス標準株についての感受性の比較

III, 1, 1), ii, ii)で用いたウイルスを、至適細胞濃度であった 5.5×10^6 cells/mlのMDCK浮遊培養細胞および単層培養細胞へ接種しHA産生を観察した。

図5に示したように、A/熊本/37/79(H1N1)については浮遊培養細胞、単層培養細胞共に接種翌日はHA活性陰性であったが、両者とも2日目からHA産生が認められた。浮遊培養細胞では3日目にHA価128倍を示し、4日目にはピーク値の256倍となった。単層培養細胞では3日目に256倍となり、5日目には512倍のピーク値に達した。

A/Bangkok/1/79(H3N2)については、浮遊培養細胞、単層培養細胞共に2日目からHA産生が認められ、5日目には共にピーク値の512倍のHA価を示した。

B/Singapore/222/79については、浮遊培養細胞、単層培養細胞共に4日目にピーク値の512倍のHA活性を示した。

iv. 患者検体からのウイルス分離成績

1984年1～2月に採取した161検体について、MDCK浮遊培養細胞および単層培養細胞を用いてウイルス分離を行い成績の比較をしたところ、表9に示したように、MDCK浮遊培養細胞で112株(分離率69.6%)、単層培養細胞で109株(分離率67.7%)のウイルスが分離された。浮遊培養細胞で分離され、単層培養細胞で分離されなかったウイルスが7株、逆に単層培養細胞で分離され、浮遊培養細胞で分離されなかったウイルスが4株認められた。

検査を行った161検体から116株のウイルスが分離されたが、すべてA(H1N1)型のインフルエンザウイルスであった。

2)ESK浮遊培養細胞についての成績

i.浮遊細胞培養の成績

図 6 に示したようにポリペプトンを含まない培養液では 4.0×10^7 cells/bottleの細胞が7日後には 9.9×10^7 cells/bottleとなり2.5倍の増加を示したのみであった。しかし、ポリペプトン5%添加の培養液では 3.4×10^7 cells/bottleの細胞が、3日目に 4.4×10^7 、5日目には 9.2×10^7 と徐々に増加し、7日目には 2.6×10^8 cells/bottleとなり7.6倍の増加を示した。

ポリペプトン10%添加の培養液では、当初の 4.8×10^7 cells/bottleの細胞が3日目には 6.6×10^7 、5日目には 1.4×10^8 に増加し、7日目には 3.9×10^8 cells/bottleとなり8.1倍に増加した。また、ポリペプトン15%添加の培養液では 4.5×10^7 cells/bottleの細胞が3日目には 6.9×10^7 、5日目には 1.3×10^8 に増加し、7日目には 3.0×10^8 cells/bottleとなり6.7倍に増加した。

ii.ESK浮遊培養細胞のインフルエンザウイルス分離における至適細胞濃度の選定

患者検体中のウイルス濃度をブラック法により定量し、その平均的なウイルス量に希釈したインフルエンザウイルス標準株を各種濃度のESK浮遊培養細胞へ接種し、ウイルス分離に適した細胞濃度を求めた。

i)患者咽頭ぬぐい液中のウイルス濃度

1981年の流行時に採取したウイルス分離陽性の検体を任意に選び、咽頭ぬぐい液中のウイルス濃度を定量したところ、表 10 に示したように $5.0 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^4$ PFU/mlの間に分布していた。平均値は 4.6×10^3 PFU/mlであった。

ii)濃度別ESK浮遊培養細胞のHA産生

ウイルスは国立予防衛生研究所から分与されたインフルエンザウイルスA/US SR/92/77(H1N1)、A/東京/1/77(H3N2)、およびB/神奈川/3/76を患者検体中のウイルス濃度の平均値であった 4.6×10^3 PFU/mlに希釈したものを使用した。このウイルス液を各種濃度の細胞浮遊液に接種しHA価を測定した。

表 11 に示したように、A/USSR/92/77(H1N1)で最も良いHA産生を示した細胞

濃度は 6.0×10^6 cells/mlで、2日目からHA活性陽性となり、3日目には128倍、4日目以降は256倍のHA価を示した。 3.0×10^6 cells/mlでも4日目以降は128倍のHA活性を示し、比較的よいHA産生が認められた。

しかし、 1.2×10^7 cells/ml以上および 1.5×10^6 cells/ml以下の細胞濃度でのHA活性は低く、特に 1.9×10^5 cells/mlおよび 2.4×10^7 cells/mlでは7日間まったくHA産生が認められなかった。

A/東京/1/77(H3N2)でも同様に 6.0×10^6 cells/mlでのHA産生が最も良く、2日目64倍、3日目128倍とHA価が上昇して行き、4日目以降は512倍のHA活性を示した。 1.2×10^7 cells/mlおよび 3.0×10^6 cells/mlでも比較的良いHA産生が認められ、128倍から256倍のHA価を示したが、 1.5×10^6 cells/ml以下の細胞濃度でのHA産生は不良で、 1.9×10^5 cells/mlでは7日間HA活性が認められなかった。また、最も細胞濃度の高い 2.4×10^7 cells/mlでもHA活性は認められなかった。

B/神奈川/3/76ではA/東京/1/77(H3N2)同様 3.0×10^6 、 6.0×10^6 および 1.2×10^7 cells/mlで比較的良いHA産生が認められた。最も良いHA産生が認められたのは、前二者同様 6.0×10^6 cells/mlで2日目からHA活性陽性となり、4日目以降は512倍のHA価を示した。 2.4×10^7 cells/mlおよび 1.9×10^5 cells/mlではHA活性が認められなかった。

以上のように、3種類のウイルスはいずれも 6.0×10^6 cells/mlで最も良いHA産生が得られた。

iii. ESK浮遊培養細胞、ESK単層培養細胞およびMDCK単層培養細胞のインフルエンザウイルス標準株についての感受性の比較

III, 1, 2), ii, ii)で用いたウイルスを、至適細胞濃度であった 6.0×10^6 cells/mlのMDCK浮遊培養細胞および単層培養細胞へ接種しHA産生を観察した。

図7に示したように、A/USSR/92/77(H1N1)を接種した細胞でのHA産生は、2日目から陽性になり、ESK単層培養細胞およびMDCK単層培養細胞でのHA価は32倍、ESK浮遊培養細胞でのHA価は16倍であった。

その後ESK浮遊培養細胞は4日目にHA価128倍のピーク値に達したが、ESK単層培養細胞では5日目にピーク値に達しHA価256倍を示した。MDCK単層培養細胞は4日目にピーク値の256倍のHA活性を示した。

A/東京/1/77(H3N2)を接種した細胞では、接種2日後にはESK浮遊培養細胞を除き、他はすべてHA陽性になった。ESK浮遊培養細胞も3日目以降はHA陽性となり、5日目にはピーク値の256倍を示した。ESK単層培養細胞では4日目にHA価64倍、5日目以降は512倍のHA価を示した。MDCK単層培養細胞はESK細胞より1日早い4日目に256倍のピーク値に達した。

B/神奈川/3/76を接種した細胞では、A/USSR/92/77(H1N1)と同様2日目以降すべて陽性となった。ESK浮遊培養細胞は5日目にピーク値のHA価256倍を示したが、ESK単層培養細胞も同じく5日目にピーク値に達した。MDCK単層培養細胞は、3日目に256倍のピーク値に達した。

iv.患者検体からのウイルス分離成績

1982年1月～5月の間に採取した131検体、および1983年1月～3月の間に採取した200検体の合わせて331検体のインフルエンザ様患者の咽頭ぬぐい液を検体として用いた。

1982年の131検体からは表 12 に示したように、ESK浮遊培養細胞で75株(分離率57.3%)、ESK単層培養細胞で70株(分離率53.4%)、MDCK単層培養細胞で68株(分離率51.9%)のインフルエンザウイルスが分離された。

ESK浮遊培養細胞で分離され、MDCK単層培養細胞で分離されなかったウイルスは7株あったが、逆にESK浮遊培養細胞で分離されず、MDCK単層培養細胞で分離されたというケースは認められなかった。

また、ESK単層培養細胞で分離され、MDCK単層培養細胞で分離されなかったウイルスは5株、MDCK単層培養細胞で分離され、ESK単層培養細胞で分離されなかったウイルスは3株であった。

検査を行った131検体中の76検体からインフルエンザウイルスが分離されたが、このうち63検体からはすべての方法でウイルスが分離された。分離されたウイルスは、1982年1月から3月まではB型インフルエンザウイルス(45株)、4月から5月にかけてはA(H3N2)型ウイルス(31株)であった。

1983年の200検体からは143株のインフルエンザウイルスが分離されたが、方法別のウイルス分離数は表 13 に示したように、ESK浮遊培養細胞で141株(分離率70.5%)、ESK単層培養細胞で138株(分離率69.0%)、MDCK単層培養細胞で137株

(分離率68.5%)であった。

ESK浮遊培養細胞で分離され、MDCK単層培養細胞で分離されなかったウイルスは6株、逆にMDCK単層培養細胞で分離され、ESK浮遊培養細胞で分離されなかったウイルスは2株であった。

また、ESK単層培養細胞で分離され、MDCK単層培養細胞で分離されなかったウイルスは5株、MDCK単層培養細胞で分離され、ESK単層培養細胞で分離されなかったウイルスは4株であった。

分離されたウイルスはすべてA(H3N2)型のインフルエンザウイルスであった。

3)MDCK凍結保存細胞についての成績

i.MDCKおよびESK凍結保存細胞の生存率

図 8 に示したように、MDCK細胞の生存率は1ヶ月後95.2%、2ヶ月後97.9%、3ヶ月後95.8%、4ヶ月後96.3%、6ヶ月後96.0%であった。このように、MDCK細胞は-80℃保存で95%以上の高い生存率を示した。

ESK細胞の生存率は1ヶ月後73.6%、2ヶ月後77.7%、3ヶ月後76.9%、4ヶ月後76.6%、5ヶ月後79.8%、6ヶ月後77.5%であった。ESK細胞も80%近い生存率を示したが、MDCK細胞に比較し低い生存率であった。

ii.MDCK凍結保存細胞のインフルエンザウイルス標準株に対する感受性

患者咽頭ぬぐい液中の平均ウイルス量であった 4.6×10^3 PFU/ml[53]に調整したインフルエンザウイルス、A/熊本/37/79(H1N1)、A/新潟/102/81(H3N2)、B/Singapore/222/79をESK浮遊培養細胞での至適細胞濃度であった 6.0×10^6 cells/mlのMDCK凍結保存細胞に接種し、HA産生を調べた。

ウイルス接種後5日間HA産生を観察したところ、図 9 に示したとおりA/熊本/37/79(H1N1)については、2日後8倍、3日後64倍とHA価が上昇して行き、4日目以降は256倍のピーク値を示した。

A/新潟/102/81(H3N2)については、2日後4倍、3日後に32倍とA/熊本/37/79(H1N1)に比較しやや低いHA産生を示したが、4日目以降は256倍のHA価を示した。B/Singapore/222/79については、2日目に16倍のHA価を示し、3日目には256倍のピーク値に達した。

iii. 患者検体からのウイルス分離成績

1983年1月～3月にかけて採取した200名のインフルエンザ様患者からMDCK凍結保存細胞およびMDCK単層培養細胞を用いてウイルス分離を行ったところ、表14に示したとおり凍結保存細胞で136株(分離率68.0%)、単層培養細胞で137株(分離率68.5%)のインフルエンザウイルスが分離された。

分離されたウイルスはすべてA(H3N2)型のインフルエンザウイルスであった。

2. インフルエンザウイルス分離指標についての検討

分離指標としてのHA活性、NA活性についての検討を行った。

1) HA活性についての成績

A(H1N1)型インフルエンザウイルスについては、1981年、1984年、1986年、A(H3N2)型インフルエンザウイルスについては、1981年、1983年、1985年、また、B型インフルエンザウイルスについては、1981年、1982年、1986年のそれぞれ3回の流行時に、MDCK細胞の単層培養細胞あるいは浮遊培養細胞の初代培養で分離されたウイルスについて、ニワトリ赤血球およびモルモット赤血球に対するHA活性を調べた。

i. A(H1N1)型インフルエンザウイルス

表15、および図10に示したように1981年71株、1984年71株、1986年20株の合計162株について流行毎にHA活性を調べた。

モルモット赤血球に対するHA価は4倍から512倍以上の間に分布していたのに対し、ニワトリ赤血球に対するHA価はモルモット赤血球を用いた場合に比較し、低い値のものが多く4倍から128倍の間に分布していた。流行毎のモルモット赤血球HA価とニワトリ赤血球HA価との相関係数は、1981年0.490、1984年0.634、1986年0.579と低い値を示していた。

また、モルモット赤血球に対しては、1981年、1984年、1986年の各流行期に分離されたウイルスはすべてHA活性陽性であったが、ニワトリ赤血球に対しては1981年36株(50.7%)、1984年34株(45.0%)、1986年9株(45.0%)の計79株(48.8%)がHA活性陰性であった。

また、図11に示したように、流行毎の平均HA価もモルモット赤血球の45.0、

23.9, 87.4に対して, ニワトリ赤血球では8.2, 6.9, 19.3と低い値を示していた。ニワトリ赤血球に対する平均HA価はモルモット赤血球に対するHA価に比較し低いものが多いため, 初代培養で同定に必要な16倍以上のHA価が得られなかったウイルスの数は, モルモット赤血球の17株(10.5%)に対し, ニワトリ赤血球では134株(82.7%)にも昇っていた。

ii. A(H3N2)型インフルエンザウイルス

表 15, および図 12 に示したように1981年14株, 1983年69株, 1985年50株の合計133株について, A(H1N1)型ウイルスと同様流行毎にHA活性を調べた。

モルモット赤血球に対するHA価は8倍から512倍以上の間に, ニワトリ赤血球に対するHA価は4倍から512倍以上の間に分布し, ほぼ同様の分布状況を示した。

流行毎のモルモット赤血球HA価とニワトリ赤血球HA価との相関係数は, 0.882, 0.798, 0.807で, A(H1N1)型ウイルスに比べ良い相関を示した。

また, モルモット赤血球に対しては, A(H1N1)型ウイルスと同様すべてHA活性陽性であったが, ニワトリ赤血球に対しては1981年の分離株のうちの1株が, 初代培養でのHA活性陰性であった。

平均HA価を図 11 に示したが, 流行毎の平均HA価はモルモット赤血球の78.0, 62.7, 122.8に対し, ニワトリ赤血球では71.2, 55.6, 79.9であった。

初代培養で同定に必要な16倍以上のHA価が得られなかったウイルスの数は, モルモット赤血球の1株(0.8%)に対し, ニワトリ赤血球では5株(3.8%)であった。

iii. B型インフルエンザウイルス

表 15, および図 13 に示したように, 1981年24株, 1982年51株, 1985年50株の合計125株について, 前2者同様流行毎にHA活性を調べた。

各流行毎のモルモット赤血球に対するHA価は8倍から512倍以上の間に, ニワトリ赤血球に対するHA価は4倍から512倍以上の間に分布し, ほぼ同様の分布状況を示した。流行毎のモルモット赤血球HA価とニワトリ赤血球HA価との相関係数も, 0.837, 0.838, 0.865でA(H3N2)型ウイルス同様良い相関を示した。

また, 125株すべてが, モルモット赤血球およびニワトリ赤血球に対しHA活性を示した。

図 11 に示したように、流行毎の平均HA価はモルモット赤血球の67.8, 96.2, 149.1に対し、ニワトリ赤血球では32.0, 72.3, 124.0であった。

初代培養で同定に必要な16倍以上のHA価が得られなかったウイルスの数は、モルモット赤血球の1株に対し、ニワトリ赤血球では10株であった。

2)NA活性についての成績

1980年2月に採取した20名のインフルエンザ様患者のうがい液を検体として、MDCK細胞, LLC-MK2細胞の単層培養細胞, トリプシン-EDTAで分散した細胞浮遊液および発育鶏卵を用いてウイルス分離を行いNA活性とHA活性を測定した。

また、20検体すべてについてMDCK単層培養細胞を用いて、ブラック法[65]によりウイルス濃度の定量を行った。

i.患者うがい液中のウイルス濃度

患者検体中のウイルス量は、1.0 PFU/ml未満から 1.5×10^4 PFU/mlの間に分布し、その平均値は 1.7×10^3 PFU/mlであった。

ii.ウイルス分離成績

HA活性を分離指標としたウイルス分離成績を表 16 に示した。発育鶏卵では初代に12株のウイルスが分離されたが、残りの8検体からは2代継代によってもウイルスは分離されなかった。

また、LLC-MK2単層培養細胞では初代に12株、2代に1株の合計13株が分離され、LLC-MK2細胞浮遊液では初代に10株、2代に1株の合計11株が分離された。MDCK単層培養細胞では初代に14株のウイルスが分離されたが、初代分離陰性の6検体は2代継代によってもウイルスは分離されなかった。MDCK細胞浮遊液では初代に9株、2代に2株の合計11株のウイルスが分離された。分離されたウイルスはすべてA(H1N1)型のインフルエンザウイルスであった。

検体中のウイルス濃度が 5.0×10^2 PFU/ml以上の検体からは、いずれの分離方法でもHA活性を持ったウイルスが分離され安定した成績が得られた。しかし、 2.0×10^2 PFU/ml以下のウイルス濃度では分離成績にばらつきが見られ、1.0 PFU/ml未満の検体からはウイルスは分離されなかった。

iii. NA活性とHA活性との関係

1代目および2代目のすべての培養液および尿膜腔液を検体として、NA活性とHA活性を測定した、HA活性とNA活性の分布を図14に示した。HA価は4倍未満から512倍、NA活性は吸光度0.001から1.921の間に分布していたが、同じHA価を持った検体であってもそれぞれの持つNA活性にはかなり広い幅が認められた。

すなわち、HA価4倍の検体に対するNA価は吸光度0.08~0.317の間に、HA価8倍の検体に対するNA価は吸光度0.140~0.439の間に、HA価16倍の検体に対するNA価は吸光度0.217~0.459の間に、HA価32倍の検体に対するNA価は吸光度0.312~0.955の間に分布していた。また、HA価64倍の検体に対するNA価は吸光度0.615~1.102の間に、HA価128倍の検体に対するNA価は吸光度0.952~1.556の間に、HA価256倍の検体に対するNA価は吸光度1.248~1.715の間に、HA価512倍の検体に対するNA価は吸光度1.600~1.921の間に分布していた。

一方、HA価4倍未満の検体のNA価は吸光度0.001~0.098の間に分布し、NA活性を保有しているものと保有していないものが認められた。そして、このNA活性を持った検体からは次代の培養により十分なHA活性を持ったウイルスが分離された。

そこで、分離指標としてのNA活性の有用性について検討するため、2代継代後もHA活性が認められなかったグループと2代継代することによりHA活性を持ったウイルスの得られたグループについて、HA活性、NA活性およびウイルス濃度との関係について調べた。

表17は2代継代後もウイルスが分離されなかった検体のHA活性、NA活性、ウイルス濃度を示したものである。ウイルス濃度は1.0 PFU/ml未満から 5.0×10^1 PFU/mlで、2代継代後もHA活性は4倍未満、NA活性は吸光度0.001~0.022であった。

表18は初代培養のHA活性は4倍未満であったが、2代継代することによりHA活性を持ったウイルスが得られた検体のHA活性、NA活性、ウイルス濃度を示したものである。ウイルス濃度は5.0 PFU/mlから 2.0×10^2 PFU/mlで、初代のHA活性はすべて陰性であったが、NA活性は吸光度0.051~0.098の間に分布していた。

そして、これらの検体の2代継代後のHA活性は16~128倍、NA活性は吸光度0.337~1.365であった。

3. インフルエンザ流行についての疫学的検討

県内2ヶ所の医療定点において、インフルエンザ様患者から咽頭ぬぐい液と血液を採取しウイルス分離と血清抗体価の検査を行った。患者血清については可能な限り回復期血清も採取した。

また、タイ国チェンマイにおいて、わが国の流行閉期にあたる8月に、インフルエンザ様患者から咽頭ぬぐい液を採取しウイルス検索を行った。ウイルス分離については、インフルエンザウイルス以外のウイルスについても同時に検索を行った。

医療定点については、それぞれの地区のウイルス分離成績からインフルエンザ流行期を特定し、その間に検体が採取された患者を、ウイルス検査成績によりインフルエンザ感染者と非感染者に分け疫学的解析を行った。

また、流行前の免疫状況を知るため例年10月に健康な県内住民から血液を採取し血清抗体価の調査も行った。

1) ウイルス分離成績

i. 医療定点における成績

松本市および須坂市の医院を定点として、1986年1月から1989年7月までの間に2293名のインフルエンザ様患者の咽頭ぬぐい液を採取しウイルス検索を行った。その結果、1986年1月から1989年7月までの間に医療定点の検体から890株のウイルスが分離された。

その内訳はインフルエンザウイルス658株、パラインフルエンザウイルス44株、コクサッキーウイルス31株、エコーウイルス59株、アデノウイルス83株、単純ヘルペスウイルス15株であった。

医療定点における日別の検体数とウイルス分離状況を図 15-1~11 に示した。

i) 1986~87年のインフルエンザ流行期およびその前後のウイルス分離成績

表 19 に1986年1月から1987年6月までの成績を示した。また、インフルエンザウイルスについての医療定点別の分離状況を図 16 に示した。

この間に790検体から295株のウイルスが分離された。インフルエンザウイル

スはA(H1N1)型が202株, A(H3N2)型が20株分離された。A(H1N1)型ウイルスは、1986年4～5月に合わせて20株、1986年12月から1987年5月にかけて182株分離された。A(H3N2)型ウイルスは1986年1～2月に19株分離され、その後1987年5月に1株分離された。

パラインフルエンザウイルスは1型が1986年10～12月に3株、1987年4～6月に6株分離された。エンテロウイルスについては、コクサッキーウイルスB1型が1986年7～8月を中心に4株、B2型が1986年10月に3株分離され、エコーウイルス7型が1986年8～12月にかけて21株分離された。また、アデノウイルスは1型4株、2型8株、3型4株、5型6株、6型1株と合わせて23株分離された。アデノウイルスは、ほぼ年間を通じて散発的に分離された。単純ヘルペスウイルス1型は1986年3～4月、7～11月、1987年5～6月に合計13株分離された。

ii)1987～88年のインフルエンザ流行期およびその前後のウイルス分離成績

表 20 に1987年7月から1988年6月までの成績を示した。この間のインフルエンザウイルスについての医療定点別の分離状況を図 17 に示した。

794検体についてウイルス検索を行い369株のウイルスを分離した。インフルエンザウイルスはA(H1N1)型が1988年5月に1株、A(H3N2)型が1988年1～6月にかけて123株、B型が1988年2～5月にかけて182株分離された。

パラインフルエンザウイルスは12株分離されたが、1型が1988年4～6月にかけて7株、2型が1987年12月に1株、3型が1987年7月、1988年5～6月に合わせて4株分離されている。

エンテロウイルスはコクサッキーウイルスB型とエコーウイルスが分離された。

コクサッキーウイルスについては、B3型が1987年8～11月にかけて9株、B4型が8～9月に2株、B5型が9月に1株分離された。エコーウイルスについては、18型が1988年2月、6月に合わせて5株分離された。

アデノウイルスはこの間に33株分離されたが、その内訳は1型が3株、2型が2株、3型が24株、5型が3株、6型が1株であった。アデノウイルスは年間を通じて分離されたが、3型は1987年9月から1988年1月にかけて集中的に分離されている。

単純ヘルペスウイルス1型は、1988年5月に1株分離された。

iii)1988～89年のインフルエンザ流行期およびその前後のウイルス分離成績

1988年7月から1989年7月までの成績を表 21 に示した。また、医療定点別のインフルエンザウイルス分離状況を図 18 に示した。

この間に、709検体から226株のウイルスが分離された。インフルエンザウイルスはA(H1N1)型が、1988年11月から1989年2月にかけて128株分離された。また、A(H3N2)型は1989年3月に1株、B型は1989年4月に1株分離された。

パラインフルエンザウイルスは23株分離されたが、1型が1988年7月に1株、1989年2月および4～5月に合わせて10株、2型が1988年11月および1989年5月に1株ずつ分離され、3型が1988年7月に2株、12月に1株、1989年4～5月に7株分離された。エンテロウイルスは今回もコクサッキーウイルスB型とエコーウイルスが分離された。コクサッキーウイルスはB4型が1988年11～12月に4株、1989年4～7月に4株分離され、B5型が1989年7月に4株分離された。

エコーウイルスは6型が1988年10～11月に7株、14型が1989年6月に1株分離され、18型は1988年7月に19株、9～10月に6株と合わせて25株分離された。

アデノウイルスは1型7株、2型4株、3型12株、5型3株、6型1株と合わせて27株分離された。アデノウイルスは季節的な集積性はほとんどなく年間を通じて分離されている。単純ヘルペスウイルス1型は1989年5月に1株分離されている。

ii.タイ国チェンマイにおける成績

1986～89年にかけて、毎年8月にチェンマイ大学付属病院を主な定点としてインフルエンザ様患者から、合わせて560検体を採取しウイルス検索を行った。

その結果、211株のウイルスが分離された。分離されたウイルスはインフルエンザウイルス134株、パラインフルエンザウイルス9株、コクサッキーウイルス8株、エコーウイルス14株、アデノウイルス15株、単純ヘルペスウイルス9株、未同定ウイルス22株であった。

i)1986年8月のウイルス分離成績

チェンマイ大学付属病院のほかにランパンおよびランプーンの病院で検体を採取した。合わせて84検体を採取し、うち15検体からウイルスが分離された。

分離されたウイルスは、表 22 に示したようにインフルエンザウイルスA(H1

N1)型が3株, パラインフルエンザウイルス1型が3株, エコーウイルス7型が2株, アデノウイルス1型が3株, 単純ヘルペスウイルス1型が3株, 未同定ウイルスが1株であった.

最も分離率の高かったのは小児科で, 33検体から7株のウイルスが分離された.

ii)1987年8月のウイルス分離成績

この年はチェンマイ大学付属病院のほかにウィンパオの山岳民族の集落で, 合わせて144検体を採取した. ウイルスは28検体から分離された.

分離されたウイルスは, 表 23 に示したようにインフルエンザウイルスA(H1N1)型が5株, B型が8株, パラインフルエンザウイルス3型が4株, コクサッキーウイルスB3型が5株, アデノウイルス1型, 2型, 6型, 7型が各1株, および単純ヘルペスウイルス1型が2株であった.

小児科で採取された90検体からは20株のウイルスが分離され, 最も高い分離率を示した.

iii)1988年8月のウイルス分離成績

この年はこれまでの経験から定点をチェンマイ大学小児科に絞り検体採取を行った. 表 24 に示したように200検体を採取し, うち95検体からウイルスを分離した.

分離されたウイルスは, A(H3N2)型インフルエンザウイルスが51株, パラインフルエンザウイルス3型が2株, コクサッキーウイルスB5型が1株, エコーウイルス6型が4株, 18型が8株, アデノウイルス2型が4株, 3型, 5型, 8型が各1株, 単純ヘルペスウイルス1型が3株, 未同定ウイルスが19株であった.

iv)1989年8月のウイルス分離成績

この年もチェンマイ大学小児科を定点として, 表 25 に示したように132検体を採取し, 73株のウイルスを分離した. 分離されたウイルスは, インフルエンザウイルスA(H1N1)型が36株, A(H3N2)型が21株, B型が10株, コクサッキーウイルスB2型が2株, アデノウイルス2型が1株, 単純ヘルペスウイルス1型が1株, 未同定ウイルスが2株であった.

2)インフルエンザ流行期の患者血清HI抗体価とインフルエンザ感染およびワクチン接種との関係

1986～87年, 1987～88年, 1988～89年の3回のインフルエンザ流行について, ウイルス分離成績からインフルエンザ流行期を特定し, その間に検体が採取されたインフルエンザ様患者について, 検査成績からインフルエンザ感染者と非感染者とに分け, インフルエンザ感染とHI抗体価, ワクチン接種との関係などについて集計した. なお, 平均抗体価は幾何平均値を用いた.

i.1986～87年の流行期についての成績

ウイルス分離成績から特定した, 須坂市のインフルエンザ流行期(12月24日～2月12日)および松本市の流行期(12月15日～2月23日)に採取された271検体についての成績を表 26 に示した.

血清抗体価測定のための抗原としては, 流行時に分離されたA/長野/38/87(H1N1)を用いた.

インフルエンザウイルスは177名(65.3%)から分離された.

年齢群別の分離率は, 0～4才で54.5%, 5～14才で60%台, 15～29才では70～80%台であった. 30才以上の年齢層も50～59才の25.0%を除き60～70%台の高い分離率を示した. ワクチン接種者は94名(34.7%)であったが, 19才以下の年齢層に限られていた. 接種率は, 10～14才で64.7%, 5～9才で57.1%, 15～19才で14.3%, 0～4才で4.5%であった.

血清を採取した147名のうち, インフルエンザウイルスが分離されるか, または対血清でHI抗体価の有意の上昇が認められた患者, すなわちインフルエンザ感染者は114名であった. また, 147名中の33名についてはインフルエンザ感染が確認されず, 非感染者と考えられた.

図 19 にインフルエンザ感染者の年齢群別, ワクチン接種歴別の抗体価を示した.

血清を採取したインフルエンザ感染者114名のうち62名からは, 回復期血清も採取した. 114名中のワクチン接種者は24名(21.1%), 非接種者は90名(78.9%)であった. 急性期血清の平均抗体価はワクチン接種者31.1倍, 非接種者23.5倍で

あった。年齢別にみると0～19才の年齢層の急性期血清平均抗体価27.9倍に対して20才以上の成人の平均抗体価は20.9倍であった。

回復期血清平均抗体価は、0～19才の年齢層で213.1倍、20才以上の成人では106.5倍であった。また、ワクチン接種者の回復期血清平均抗体価は166.0倍、非接種者の回復期血清平均抗体価は143.7倍であった。

ウイルス検査の結果、インフルエンザ感染が確認されなかった33名の患者の急性期血清抗体価とワクチン接種歴を図20に示した。

33名中の21名からは回復期血清も採取したが、抗体価に変動が認められなかったため省略した。

インフルエンザ感染が確認されなかったかぜ患者33名のうちワクチン接種者は14名、非接種者は19名でワクチン接種率は42.4%であった。ワクチン接種者の急性期血清平均抗体価は115.9倍、ワクチン非接種者の平均抗体価は37.0倍であった。また、128倍以上の抗体保有者の割合は36.4%(12名)であった。

ii. 1987～88年の流行期についての成績

このシーズンのインフルエンザ流行期、須坂市2月16日～4月14日まで、松本市2月1日～4月25日までの間に採取された、430検体についての成績を表27に示した。

血清抗体価測定のための抗原としては、流行時に分離されたA/長野/61/88(H3N2)およびB/長野/117/88を用いた。

インフルエンザウイルスは284株(66.0%)分離された。その内訳はA(H3N2)型が104株、B型が180株であった。ワクチン接種者は156名(36.3%)であった。

最も分離率が高かったのは20～29才の77.8%であった。その他の年齢層も30～49才の40～50%台を除きすべて60%以上の高い分離率を示した。また、ワクチン接種者は5～9、10～14才の年齢層に多く認められ、それぞれの接種率は49.7、63.3%であった。また、0～4才では15.5%、15～19才では25.0%、20～29才では11.1%、その他の年齢層では10%以下の接種率であった。

血清が採取されたインフルエンザ感染者は138名であった。そのうち40名については回復期血清も採取した。138名のうち48名はA(H3N2)型インフルエンザ感染者であり、90名はB型インフルエンザ感染者であった。

図 21 にインフルエンザ感染者の年齢群別の抗体検査成績を示した。図 22 にA(H3N2)型インフルエンザウイルス感染者のA/長野/61/88(H3N2)およびB/長野/117/88に対する急性期血清抗体価を示した。また、図 23 にB型インフルエンザウイルス感染者のA/長野/61/88(H3N2)およびB/長野/117/88に対する急性期血清抗体価を示した。

A(H3N2)型インフルエンザ感染者の急性期血清の平均抗体価は34.4倍、B型インフルエンザ感染者の急性期血清の平均抗体価は20.8倍であった。

また、A(H3N2)型ウイルス感染者の回復期血清抗体価の平均値は154.6倍、B型ウイルス感染者の回復期血清抗体価の平均値は57.0倍であった。

A(H3N2)型ウイルス感染者の0～19才の年齢層の急性期血清平均抗体価は53.8倍、20才以上の成人の平均抗体価は42.7倍であった。回復期血清抗体価の平均値は0～19才の年齢層で512.0倍、20才以上の成人では137.2倍であった。

B型ウイルス感染者については、0～19歳の年齢層の急性期血清抗体価の平均値16.3倍に対し、20才以上の平均抗体価は17.2倍とほぼ同じであった。回復期血清抗体価の平均値は0～19才の年齢層で94.2倍、20才以上の成人で28.2倍であった。

また、A(H3N2)型インフルエンザ感染者のB型ウイルスに対する急性期血清平均抗体価は32.0倍、B型インフルエンザ感染者のA(H3N2)型ウイルスに対する急性期血清平均抗体価は104.8倍であった。

インフルエンザ感染者の急性期血清抗体価は、A(H3N2)型ウイルス感染者の中に7名、B型ウイルス感染者に2名の128倍の抗体保有者が認められたのを除き、他はすべて64倍以下であった。

血清が採取されたA(H3N2)型ウイルス感染者48名中ワクチン接種者は17名(35.4%)、非接種者は31名(64.6%)であり、A(H3N2)型ウイルスに対する平均抗体価はワクチン接種者44.3倍、非接種者29.9倍であった。また、血清が採取されたB型ウイルス感染者90名中のワクチン接種者は41名(45.6%)、非接種者は49名(54.4%)であった。B型ウイルスに対する平均抗体価はワクチン接種者24.0倍、非接種者18.4倍であった。

図 24 および図 25 にインフルエンザ感染が確認されなかった患者のA/長野/61/88(H3N2)およびB/長野/117/88に対する年齢群別の急性期血清抗体価を示し

た。

血清を採取したインフルエンザ非感染者47名のうち、ワクチン接種者は17名(36.2%)、非接種者は30名(63.8%)であった。A(H3N2)型ウイルスに対する平均抗体価は104.1倍であったが、ワクチン接種者の平均抗体価301.0倍に対し、非接種者の平均抗体価は57.0倍であった。また、B型ウイルスに対する平均抗体価は37.6倍であったが、ワクチン接種者の平均抗体価は100.2倍、非接種者の平均抗体価は26.6倍であった。

iii. 1988～89年の流行期についての成績

ウイルス分離成績から特定した、須坂市のインフルエンザ流行期(12月5日～2月1日)および松本市の流行期(12月6日～1月31日)に採取された216検体についての成績を表28に示した。また、図26にインフルエンザ感染者の年齢群別の抗体検査成績を示した。

血清抗体価測定のための抗原としては、流行時に分離されたA/長野/1605/88(H1N1)を用いた。

インフルエンザウイルスは123名から分離され、分離率は56.9%であった。分離されたインフルエンザウイルスはすべてA(H1N1)型ウイルスであった。ワクチン接種者は44名(20.4%)認められた。

ウイルス分離率が最も高かったのは、15～19才の年齢層の87.5%であった。10～14才の年齢層では63.6%、0～4才および40～49才では60.0%、30～39才では55.0%、20～29才では52.4%、50～59および60才以上では20～30%台の分離率であった。ワクチン接種率は10～14才の年齢層で54.5%、5～9才では34.1%、20～29才では14.3%、15～19才では3.1%であった。

血清を採取した67名のうちインフルエンザ感染者は33名で、そのうち29名からは回復期血清も採取した。33名中ワクチン接種者は1名のみであった。

急性期血清の平均抗体価は28.8倍、回復期血清の平均抗体価は178.9倍で有意の抗体上昇を示していた。急性期血清抗体価は128倍の1名を除き、他はすべて64倍以下であった。

年齢別に見ると、0～19才の年齢層の急性期血清平均抗体価43.9倍に対し、20才以上の成人の平均抗体価は23.4倍であった。回復期血清抗体価も0～19才の

年齢層の平均値512.0倍に対し、20才以上の成人の平均値は102.8倍であった。

ワクチン接種者の急性期血清抗体価は64.0倍、非接種者の平均抗体価は28.1倍であった。ワクチン接種者の回復期血清抗体価は128.0倍、非接種者の回復期血清抗体価の平均値は181.0倍であった。

図 27 にインフルエンザ感染が確認されなかった患者の年齢群別の抗体検査成績を示した。

インフルエンザ感染が確認されなかったかぜ患者34名のうち、ワクチン接種者は4名(11.8%)、非接種者は30名(88.2%)であった。

急性期血清の平均抗体価は47.1倍であったが、ワクチン接種者の平均抗体価は152.2倍、非接種者の平均抗体価は40.3倍であった。

3)インフルエンザ流行前のHI抗体保有状況

長野県内に居住する0～60歳以上までの9年齢区分各25名をめやすに毎年10月に採血し、HI抗体価を測定した。

i. 1986年10月の成績

9年齢区分234検体について、ワクチン株であるA/Bangkok/10/83(H1N1)、A/山形/120/86(H1N1)、A/福岡/C29/85(H3N2)、B/茨城/2/85、および1986年春の小流行から分離されたA/長野/223/86(H1N1)を抗原としてHI抗体価を測定した。

年齢群別の抗体検査成績を表 29 に示した。また、同じく図 28 に年齢群別の抗体保有状況を示した。

ワクチン株に対する抗体保有率はA/Bangkok/10/83(H1N1) 79.1%、A/山形/120/86(H1N1) 65.0%、A/福岡/C29/85(H3N2) 80.8%、B/茨城/2/85 66.7%であった。また、前駆波ウイルスA/長野/223/86(H1N1)に対する抗体保有率は53.8%であった。

A/Bangkok/10/83(H1N1)に対する年齢群別の抗体保有率は、0～4才の年齢群では27.3%と低い保有率であったが、10～19才の年齢群では100%近い高い保有率を示した。20才以上の成人層も70%以上の高い抗体保有率を示していた。128倍以上の抗体保有者の占める割合は、0～4才の年齢層では18.2%と低い値であったが、10～19才の年齢群では80%以上の保有率を示した。成人層も20～29、30～39およ

び40～49才では60%付近の高い抗体保有率を示していた。50才代では27.3%，60才以上の年齢層では40.0%とやや低い抗体保有率であった。

1986年春の小流行から分離され、急遽ワクチン株に加えられたA/山形/120/86(H1N1)に対する年齢群別の抗体保有率は、0～4才の年齢群で22.7%，20～29才の年齢群で37.5%と低い値を示したが、10～19才および30～39才の年齢群では80%以上の高い保有率であった。その他の年齢層は60%台の抗体保有率であった。

128倍以上の抗体保有者の占める割合は、最も少ない20～29才の年齢層で4.2%，最も多い15～19才の年齢層でも40.6%であった。その他の年齢層については、5～14才で30%台、40～59才で15～20%台、60才以上の年齢層でやや高い32.0%であった。

A/福岡/C29/85(H3N2)に対しては、0～4才の年齢層で45.5%とやや低かったが、その他の年齢層は5～19才では96%台、成人層も60～80%以上の高い抗体保有率を示した。

128倍以上の高い抗体の保有率は10～14才の年齢層では90.0%と高い値を示し、5～9，15～19才でも70%以上の保有率であった。50～59才の年齢層では最も低い18.2%の抗体保有率であったが、その他の年齢層は30～40%台の保有率であった。

B/茨城/2/85に対する抗体保有率は、15～19才で96.9%，10～14才で86.7%，20～29才で83.3%と比較的高く、0～4才の36.4%を除き他の年齢層は40～60%台の抗体保有率であった。

128倍以上の抗体保有率は10～14才の年齢層で92.3，15～19才で67.7%，20～29才で45.8%と比較的高い値を示したのを除き、他の年齢層での保有率は低かった。

前駆波ウイルスA/長野/223/86(H1N1)に対する、年齢群別の抗体保有率は、同じ時期に分離されたA/山形/120/86(H1N1)に比較し全般的に低い値を示していた。

すなわち、最も低い0～4才の年齢層では18.2%，最も高い15～19才でも78.1%の抗体保有率であった。20～29才では25.0%，30～39，40～49，50～59および60才以上の年齢層では40～50%台の保有率であった。また、5～14才の年齢層では60～70%台の抗体保有率であった。年齢群別の128倍以上の抗体保有率は0～4，20～29，30～39および40～49才の年齢層では非常に低く3～4%台であった。最も高い5～9才の年齢層でも25.0%で、その他の年齢層は10%台であった。

ii. 1987年10月の成績

9年齢区分225検体について、ワクチン株であるA/山形/120/86(H1N1), A/福岡/C29/85(H3N2), B/茨城/2/85, B/長崎/1/87および1987年春に分離されたA/長野/1046/87(H3N2)を抗原としてHI抗体価を測定した。

年齢群別の抗体検査成績を表30に示した。また、同じく図29に年齢群別の抗体保有状況を示した。

ワクチン株に対する抗体保有率は、A/山形/120/86(H1N1) 75.1%, A/福岡/C29/85(H3N2) 76.0%, B/茨城/2/85 70.2%, B/長崎/1/87 37.3%であった。また、1987年5月に分離されたA/長野/1046/87(H3N2)については66.2%の抗体保有率であった。

A/山形/120/86(H1N1)に対する年齢群別の抗体保有率は、60才以上の40.0%を除きすべて50%以上の高い値を示した。特に10~19才の年齢群では90%以上の抗体保有率を示し、5~9才でも90%近い保有率であった。また、20~29, 30~39, 40~49および50~59才の年齢層においても70~80%台の保有率であった。

128倍以上の抗体保有者の占める割合は、10~14才の年齢層で92.0%と最も高い値を示し、5~9才でも83.3%であった。60才以上では16.0%と低い値であったが、20才以上の成人層も40%付近の比較的高い保有率を示した。

A/福岡/C29/85(H3N2)に対しては、すべての年齢層で50%以上の抗体保有率を示したが、特に5~14才では100%, 15~19才でも96.2%の保有率であった。128倍以上の抗体保有者は、10~14才で72.0%, 0~4才で52.0%, 15~19才で42.3%と比較的高い値であったが、成人層は10~20%台であった。

B/茨城/2/85に対する年齢群別の抗体保有率は、10~14才で100%の保有率を示したのを始め、15~19, 20~29才の年齢層でも90%以上の保有率を示した。0~4, 40~49, 50~59才では40%台の抗体保有率であった。

128倍以上の抗体保有者の占める割合は、10~19才では70~80%であったが、5~9, 20~29才では40~50%であり、それ以上の年齢層では20%付近であった。

B/長崎/1/87に対する年齢群別の抗体保有率は、10~14才の年齢層で84.0%, 15~19才で69.2%, 5~9才で50.0%と若年齢層で比較的高かったが、成人層では20~29才の32.0%, 30~39才の16.0%, 40~49才の11.5%と非常に低い抗体保有率

であった。しかし、50～59才では25.0%、60才以上で36.0%と高齢者は、壮年層に比較しやや高い抗体保有率を示した。

また、年齢群別の128倍以上の抗体保有率は、10～14才で24.0%、15～19才で38.5%であった。20才以上の成人層では20～29才の年齢層に2名、50～59才に同じく2名認められたただけであった。

1987年5月に分離されたA/長野/1046/87(H3N2)に対しては、0～4才で60.0%、5～9才で95.8%、10～14才で88.0%、および15～19才の年齢層で88.5%の高い抗体保有率を示した。20才以上の成人層も40～60%以上の高い抗体保有率であった。

128倍以上の高い抗体保有者の占める割合も5～9才では91.7%、0～4才では44.0%、10～14才では40.0%、15～19才では26.9%であった。20才以上の成人層は、60才以上の24.0%を除き10%付近の保有率であった。

iii. 1988年10月の成績

9年齢区分222検体について、ワクチン株であるA/山形/120/86(H1N1)、A/福岡/C29/85(H3N2)、A/四川/2/87(H3N2)、B/長崎/1/87 および1988年5月に分離されたA/長野/1396/88(H1N1)を抗原としてHI抗体価を測定した。

年齢群別の抗体検査成績を表31に示した。また、同じく図30に年齢群別の抗体保有状況を示した。

ワクチン株に対する抗体保有率はA/山形/120/86(H1N1) 79.7%、A/福岡/C29/85(H3N2) 78.4%、A/四川/2/87(H3N2) 59.5%、B/長崎/1/87 43.7%であった。また、1988年5月に分離されたA/長野/1396/88(H1N1)は81.1%の抗体保有率であった。

A/山形/120/86(H1N1)に対しては、5～9才で92.0%、10～14才で95.5%、15～19才の年齢層で96.4%と90%以上の高い抗体保有率を示し、その他の全ての年齢層で60%以上の高い抗体保有率を示した。

年齢群別の128倍以上の抗体保有率も、10～14才で90.9%、5～9才で72.0%、15～19才で60.2%と高い値を示した。その他の年齢層も60才以上の12.0%を除き、20～30%以上の抗体保有率であった。

A/福岡/C29/85(H3N2)に対して、10～14才で100%、15～19才で96.4%、5～9才で96.0%と高い抗体保有率を示した。その他の年齢層も50%以上の高い抗体保有率

であった。128倍以上の抗体保有者の占める割合は5～9, 10～14才で80%台, 15～19才で60.7%, 0～4才で45.5%であったが, 成人層では10～20%台であった。

A/四川/2/87(H3N2)に対しては, 10～14才の年齢層で95.5%, 5～9および15～19才では70%台であったが, 30～39才では36.0%と低い値を示していた。その他の年齢層は40～60%の抗体保有率であった。

128倍以上の抗体保有率は, 15～19才で28.8%, 10～14才で22.7%であったが, 40～49才では0%, 60才以上では4.0%と非常に低い値を示した。その他の年齢層は10%付近の保有率であった。

B/長崎/1/87に対して, 10～14才の年齢層は95.5%の抗体保有率を示し, 5～9才では76.0%, 15～19才では67.9%, 20～29および60才以上では40.0%の保有率であった。その他の年齢層は10～20%台の抗体保有率であった。

128倍以上の抗体保有者の占める割合は, 10～14才で59.1%, 5～9才で20.0%, 15～19才で17.9%であった。しかし, それ以外の年齢層では40～49才で1名, 60才以上の年齢層で2名認められたのみであった。

A/長野/1396/88(H1N1)に対する抗体保有率は, 10～14才では100%, 5～9才で96.0%, 15～19才で89.3%, 50～59および60才以上で84.0%, 20～29才で80.0%と高い値を示した。その他の年齢層も0～4才の54.5%を除き70%付近の抗体保有率であった。128倍以上の抗体保有率は10～14才で77.3%, 5～9才で60.0%と比較的高い値を示したが, その他の年齢層では10～20%台の保有率であった。

4. インフルエンザウイルスの抗原変異および進化

医療定点およびチェンマイで分離されたインフルエンザウイルスについて抗血清を用いた抗原分析を行うと共に, 前駆波ウイルスを捕捉することのできたA(H1N1)型およびA(H3N2)型ウイルスについては, HA遺伝子塩基配列の解析を行った。

1) 交差HI試験による抗原分析

i. 医療定点で分離されたインフルエンザウイルスの抗原分析

i) 1986～87年の流行期を中心に分離されたインフルエンザウイルスの抗原分析

A(H1N1)型ウイルスの標準株であるA/Brazil/11/78, A/Bangkok/10/83, A/山

形/120/86, A/横浜/4/86の抗血清を用いて, 1986~87年の流行時に医療定点で分離されたインフルエンザウイルスおよび1986年春に分離された前駆波ウイルスについて抗原分析を行った。

表 32 に示したようにこの年のA(H1N1)型ウイルスのワクチン株であったA/山形/120/86抗血清の抗体価4096倍に対して, 1986年4月に分離された前駆波ウイルスA/長野/223/86およびA/長野/232/86は2048倍, A/長野/238/86は4096倍であった。

また, 流行期間中に分離されたウイルスのうちA/長野/851/86, A/長野/42/86, A/長野/45/86およびA/長野/60/86は, A/山形/120/86抗血清に対するHI抗体価が2048倍, A/長野/853/86, A/長野/38/86, A/長野/47/86およびA/長野/63/86はA/山形/120/86の抗体価と同じ4096倍であった。

また, A/Brazil/11/78抗血清の抗体価1024倍に対して, A/長野/238/86の64倍を除き他はすべて128倍であった。A/Bangkok/10/83抗血清の抗体価512倍に対し, A/長野/223/86, A/長野/232/86, A/長野/851/86は32倍未満, A/長野/238/86ほか5株は32倍, A/長野/47/86およびA/長野/63/86は64倍であった。

また, A/横浜/4/86抗血清の抗体価1024倍に対して, A/長野/238/86, A/長野/851/86, A/長野/45/86およびA/長野/47/86は1024倍, A/長野/223/88ほか6株は2048倍であった。

1986年春およびその冬の流行期に分離されたウイルスは, いずれもA/山形/120/86に近い抗体パターンを示した。

ii)1987~88年の流行期を中心に分離されたインフルエンザウイルスの抗原分析

A(H3N2)型ウイルスおよびB型ウイルスについて抗原分析を行った。A(H3N2)型ウイルスについてはワクチン株であるA/福岡/C29/85, およびA/大阪/156/87, A/京都/1/87, A/四川/2/87の4種類の抗血清を用いて, 1987年5月に分離されたA/長野/1046/87, およびその冬の流行期に分離されたウイルスについて行った。

B型ウイルスについては, ワクチン株であったB/茨城/2/85とB/長崎/1/87, およびB/長崎/3/87, B/Victoria/2/87, B/山形/16/88の5種類の抗血清を用いて行った。

A(H3N2)型インフルエンザウイルス：A(H3N2)型ウイルスについての抗原分析の成績を表 33 に示した。ワクチン株であったA/福岡/C29/85 抗血清の抗体価1024倍に対して、前駆波ウイルスA/長野/1046/87は256倍であった。流行期に入ってから分離されたウイルスのうち、A/長野/1260/88、A/長野/317/88およびA/長野/420/88はA/福岡/C29/85に近い512倍の抗体価を示したが、A/長野/1151/88他10株は、A/福岡/C29/85 抗血清に対して、前駆波ウイルスA/長野/1046/87とほぼ同じ128～256倍の抗体価を示した。A/福岡/C29/85 抗血清の抗体価に近い値を示したA/長野/1260/88、A/長野/317/88およびA/長野/420/88は、他の抗血清についてもA/福岡/C29/85と同じ抗体パターンを示した。A/福岡/C29/85 抗血清に対して、128～256倍の抗体価を示した前駆波ウイルスA/長野/1046/87および流行期に分離されたA/長野/1151/88他10株は、他の抗血清に対しても共にA/大阪/156/87に近い抗体パターンを示した。

B型インフルエンザウイルス：表 34 に流行期に分離されたB型ウイルスの抗原分析の成績を示した。B/長野/111/88、B/長野/117/88、B/長野/134/88、B/長野/118/88、B/長野/104/88およびB/長野/372/88は、ワクチン株の一つであったB/茨城/2/85抗血清の抗体価2048倍に対して32～64倍、もう一つのワクチン株のB/長崎/1/87抗血清の抗体価1024倍に対しても32～64倍、B/山形/16/88抗血清の抗体価1024倍に対してはすべて32倍未満であった。1987年春の流行から分離されたB/長崎/3/87抗血清に対しては128～256倍とホモ抗体価に近い値を示した。

また、B/長野/1398/88はB/山形/16/88抗血清の抗体価1024倍に対して、2048倍の抗体価を示したが、他の抗血清に対しては32倍未満から32倍とほとんど交差が認められなかった。

このように、B/長崎/3/87類似のウイルスとB/山形/16/88類似のウイルスとが確認された。

iii) 1988～89年の流行期を中心に分離されたインフルエンザウイルスの抗原分析

主流行ウイルスであったA(H1N1)型ウイルスについては、ワクチン株であったA/山形/120/86、およびA/S.Carolina/6/88、A/福島/2/88の3種類の抗血清を用いて抗原分析を行った。

また、A(H1N1)型インフルエンザの流行終息後に分離された、A(H3N2)型の前駆波ウイルスについては、ワクチン株であったA/福岡/C29/85、A/四川/2/87、およびA/大阪/156/87、A/京都/1/87、A/秋田/4/88、A/北海道/20/89の6種類の抗血清を用いて抗原分析を行った。

同じく、A(H1N1)型インフルエンザの流行終息後に分離された、B型の前駆波ウイルスについては、ワクチン株であるB/長崎1/87、およびB/長崎/3/87、B/山形/16/88、B/愛知/5/88の4種類の抗血清を用いて抗原分析を行った。

A(H1N1)型インフルエンザウイルス：このシーズンの流行ウイルスであったA(H1N1)型ウイルスの抗原分析の結果を表 35 に示した。前駆波ウイルスA/長野/1396/88は、ワクチン株A/山形/120/86抗血清の抗体価1024倍に対して、同じく1024倍の抗体価を示した。

流行期に分離されたA/長野/1598/88他12株も前駆波ウイルスA/長野/1396/88とほぼ同じ抗体価を示した。これらのウイルスはA/福島/2/88抗血清およびA/S.Carolina/6/88抗血清に対しても、それぞれ1024～2048倍および512～1024倍とほぼ同じ抗体パターンを示した。

また、同じ流行期に分離されたA/長野/1669/89、A/長野/1672/89およびA/長野/579/88は、ワクチン株A/山形/120/86抗血清の抗体価1024倍に対して、256倍と2管低い値を示した。

A/福島/2/88抗血清およびA/S.Carolina/6/88抗血清に対しても、この3株のウイルスは1024～2048倍および128～256倍と同じ抗体パターンを示した。

以上のように、A/山形/120/86とほぼ同じ抗体パターンを示すウイルスとそれから2管ほど変異したウイルスとが混在していた。

A(H3N2)型インフルエンザウイルス：A(H3N2)型ウイルスの抗原分析の成績を表 36 に示した。A(H1N1)型ウイルスの流行終息後分離された前駆波ウイルスA/長野/1749/89は、ワクチン株A/福岡/C29/85抗血清の抗体価1024倍に対して256倍、もう一つのワクチン株A/四川/2/87抗血清の抗体価1024倍に対して512倍であったが、A/北海道/20/89抗血清の抗体価1024倍に対しては同じく1024倍で、このA/北海道/20/89と良く似た抗体パターンを示した。その後1989～1990年の流行期に分離されたA(H3N2)型ウイルスの多くは前駆波ウイルスA/長野/1749/89と同じ抗体パターンを示した。

B型インフルエンザウイルス：表 37 にB型ウイルスの抗原分析の結果を示した。A(H1N1)型ウイルスによるインフルエンザ流行終息後の1989年4月に分離されたB/長野/722/89は、ワクチン株であるB/長崎/1/87抗血清の抗体価1024倍に対して64倍、B/山形/16/88抗血清の抗体価1024倍に対して32倍未満、B/愛知/5/88抗血清の抗体価128倍に対しては同じく128倍の抗体価を示した。1989～1990年の流行期に分離されたB/長野/34/90、B/長野/80/90、B/長野/590/90およびB/長野/692/90は、B/長崎/1/87抗血清に対しては、1989年4月に分離されたB/長野/722/89とほぼ同様の抗体価を示したが、B/山形/16/88抗血清に対しては256～512倍、B/愛知/5/88抗血清に対してはすべて32倍未満であった。

ii. タイ国チェンマイで分離されたインフルエンザウイルスの抗原分析

i) 1986年8月に分離されたインフルエンザウイルスの抗原分析

A(H1N1)型ウイルスのワクチン株であったA/Bangkok/10/83、A/山形/120/86およびA/熊本/37/79、A/東京/103/83の4種類の抗血清を用いて抗原分析を行った。抗原分析の成績を表 38 に示した。チェンマイで分離されたウイルスA/Chiang Mai/8/86、A/Chiang Mai/27/86、およびA/Chiang Mai/45/86は、A/山形/120/86抗血清の抗体価2048に対して同じく2048倍、A/Bangkok/10/83抗血清の抗体価2048倍に対して64～128倍、A/東京/103/83抗血清の抗体価2048倍に対して128～256倍と、A/山形/120/86とほとんど同じ抗体パターンを示した。

ii) 1987年8月に分離されたインフルエンザウイルスの抗原分析

A(H1N1)型ウイルスおよびB型ウイルスについて抗原分析を行った。A(H1N1)型ウイルスについては、ワクチン株であったA/山形/120/86およびA/熊本/37/79、A/Bangkok/10/83、A/山形/32/89の抗血清を用いて抗原分析を行い、B型ウイルスについては、この年のワクチン株のひとつであったB/長崎/1/87およびB/Victoria/2/87、B/長崎/3/87、B/山形/16/88、さらにチェンマイで分離されたB/Chiang Mai/5/87の5種類の抗血清を用いて抗原分析を行った。

A(H1N1)型インフルエンザウイルス：A(H1N1)型ウイルスの抗原分析の成績を表 39 に示した。抗原分析を行った3株ともA/熊本/37/79抗血清の抗体価256倍に対して32倍未満、A/Bangkok/10/83抗血清の抗体価256倍に対して32倍未満から32

倍， A/山形/32/89抗血清の抗体価1024倍に対して128倍と， ほとんど同じ抗体パターンを示した。

しかし， A/山形/120/86抗血清に対しては， この抗血清の抗体価2048倍に対してA/Chiang Mai/33/87では256倍と3管の差が認められたのに対し， A/Chiang Mai/39/87およびA/Chiang Mai/101/87では1024倍でその差は1管であった。

このように， A/山形/120/86類似のウイルスと3管ほど変異したウイルスとが確認された。

B型インフルエンザウイルス： B型ウイルスの抗原分析の成績を表 40 に示した。 B/長崎/3/87抗血清の抗体価128倍に対して， チェンマイで分離されたB型ウイルスB/Chiang Mai/5/87， B/Chiang Mai/18/87， B/Chiang Mai/45/87， B/Chiang Mai/83/87およびB/Chiang Mai/87/87は， いずれもB/長崎/3/87とほぼ同じ64～128倍の抗体価であった。

B/山形/16/88抗血清に対しては， まったく交差が認められなかった。 その他， B/長崎/1/87， B/Victoria/2/87およびB/Chiang Mai/5/87抗血清に対する抗体パターンは， B/長崎/3/87とほぼ同じであった。

iii)1988年8月に分離されたインフルエンザウイルスの抗原分析

A(H3N2)型ウイルスのこの年のワクチン株であったA/福岡/C29/85およびA/新潟/102/81， A/Philippines/2/82， A/四川/2/87の4種類の抗血清を用いて抗原分析を行った。

抗原分析の成績を表 41 に示した。 A/四川/2/87抗血清の抗体価1024倍に対して， A/Chiang Mai/64/88は1024倍と同じ抗体価を示したが， その他のA/Chiang Mai/11/88他11株は， A/四川/2/87抗血清に対し64～256倍の抗体価で2管以上の差が認められた。

また， A/福岡/C29/85抗血清の抗体価512倍に対して， A/Chiang Mai/72/88， A/Chiang Mai/77/88， A/Chiang Mai/78/88は256倍， A/Chiang Mai/11/88他9株は128倍の抗体価を示した。 また， A/Philippines/2/87抗血清の抗体価512倍に対し， チェンマイで分離されたウイルスは64～128倍の抗体価であった。 A/新潟/102/81抗血清については， まったく交差が認められなかった。

この年チェンマイで分離されたウイルスは， A/四川/2/87類似のウイルスとA

/福岡/C29/85の変異ウイルスであった。

iv)1989年8月に分離されたインフルエンザウイルスの抗原分析

A(H1N1)型, A(H3N2)型およびB型の3種類のウイルスについて抗原分析を行った。

A(H1N1)型ウイルスについては, ワクチン株であったA/山形/120/86, および1987年チェンマイで分離したA/Chiang Mai/39/87, A/Chiang Mai/101/87, およびA/Bangkok/10/83, A/山形/32/89の5種類の抗血清を用いて抗原分析を行った。

A(H3N2)型については, この年のワクチン株であったA/四川/2/87 およびA/新潟/102/81, A/Philippines/2/82, A/福岡/C29/85, A/秋田/4/88の5種類の抗血清を用いて抗原分析を行った。

また, B型ウイルスについては, ワクチン株であったB/愛知/5/88, B/山形/16/88およびB/USSR/100/83, B/長崎/1/87と1987年8月にチェンマイで分離したB/Chiang Mai/5/87の5種類の抗血清を用いて抗原分析を行った。

A(H1N1)型インフルエンザウイルス: A(H1N1)型ウイルスについての抗原分析の結果を表 42 に示した。A/山形/120/86抗血清の抗体価2048倍に対して, A/Chiang Mai/27/89, A/Chiang Mai/62/89およびA/Chiang Mai/108/89は512倍と3管の差が認められた。

しかし, A/Chiang Mai/28/89, A/Chiang Mai/71/89, A/Chiang Mai/73/89, A/Chiang Mai/105/89およびA/Chiang Mai/120/89は1024~2048倍の抗体価であった。1987年8月にチェンマイで分離されたA/Chiang Mai/39/87, A/Chiang Mai/101/87抗血清に対して, A/Chiang Mai/27/89, A/Chiang Mai/62/89およびA/Chiang Mai/108/89の3株については2~3管の差が認められたが, その他のウイルスではほとんど差は認められなかった。

すなわち, A/山形/120/86類似のウイルスと2管程度の変異ウイルスとが確認された。

A(H3N2)型インフルエンザウイルス: A(H3N2)型ウイルスの抗原分析の結果を表 43 に示した。A/Chiang Mai/52/89, A/Chiang Mai/80/89およびA/Chiang Mai/86/89の3株は, A/秋田/4/88抗血清の抗体価1024倍に対して同じく1024倍, A/四川/2/87抗血清の抗体価1024倍に対して256~512倍, A/福岡/C29/85抗血清

の抗体価2048倍に対して256倍で、A/秋田/4/88とほぼ同じ抗体パターンを示した。A/Chiang Mai/48/89およびA/Chiang Mai/111/89は、A/四川/2/87抗血清に対して512倍および1024倍、A/福岡/C29/85抗血清に対して32および64倍、A/秋田/4/88抗血清に対して64倍とA/四川/2/87とよく似た抗体パターンを示した。

また、A/Chiang Mai/9/89およびA/Chiang Mai/51/89は、A/秋田/4/88抗血清に対して512倍、A/四川/2/87抗血清に対して128倍と3管差、A/福岡/C29/85抗血清に対して64および128倍と4～5管差を示した。

このように、A/四川/2/87と同タイプのウイルス、A/秋田/4/88とほぼ同じ抗体パターンを示すウイルス、さらにこれらのウイルスからやや変異したウイルスとが分離された。

B型インフルエンザウイルス：抗原分析の成績を表44に示した。抗原分析を行ったB/Chiang Mai/26/89、B/Chiang Mai/36/89、B/Chiang Mai/76/89、B/Chiang Mai/96/89およびB/Chiang Mai/117/89は、B/山形/16/88抗血清の抗体価1024倍に対して512倍、B/愛知/5/88抗血清の抗体価128倍に対して32倍未満、B/長崎/1/87抗血清の抗体価512倍に対し32倍未満ないし32倍、1987年チェンマイで分離されたB/Chiang Mai/5/87抗血清の抗体価512倍に対しすべて32倍未満で、B/山形/16/88と同じ抗体パターンを示していた。

2)HA遺伝子塩基配列の解析

1986～89年の間に医療定点および国内各地で分離されたインフルエンザウイルス、さらにタイ国チェンマイで分離されたインフルエンザウイルスについてHA遺伝子塩基配列の解析を行い、非流行期に分離されたいわゆる前駆波ウイルスと次の流行期に分離されたウイルスとの遺伝学的関連性を明らかにすることを目的に進化系統樹を作製した。

i.1986～89年の間に分離されたA(H1N1)型ウイルスのA/USSR/90/77と比較してのHA遺伝子塩基配列の解析

図31に1986～89年の間に分離された9株のA(H1N1)型ウイルスのHA遺伝子について、A/USSR/90/77と比較しての塩基配列の変異と変化したアミノ酸を示した。

A/USSR/90/77 のHA遺伝子の塩基配列と比較して、解析を行った9株のウイルスの少なくとも96の位置で塩基配列の変異が起きていた。進化系統樹上の主流の変異が56、株特異的変異が35、未決定変異が5であった。

主流の変異のうち38はHA1領域で、18はHA2領域で起こっていた。これらの塩基の変異は、43の残基におけるアミノ酸の変化を伴っていた。そのうち、36はHA1、7はHA2領域のポリペプチドの変化であった。塩基の変異は、HA遺伝子上に散在していたが、アミノ酸の変化はHA1ポリペプチドの125番目と227番目のアミノ酸の残基の間に集中していた。

図 32 に1986～89年の間に分離された、A(H1N1)型ウイルスの進化系統樹を示した。

A/USSR/90/77とA/山形/120/86のHA遺伝子の間には、進化系統樹の主流において54の塩基の変異が認められたが、A/山形/120/86とA/長野/1396/88との間には、2個の塩基の変異が認められただけであった。

1986年春に分離された前駆波ウイルスA/長野/238/86、A/山形/120/86、A/東京/770/86、および1986～87年の流行期に分離されたA/長野/38/86、およびA/長野/174/87は、進化系統樹における主流の幹の同じ点から分岐した二つの側枝上に位置していた。

1986～87年のインフルエンザ流行が終息した後、1988年春にわが国で最初に分離されたA(H1N1)型ウイルスであるA/長野/1396/88はA/山形/120/86から2個主流の変異を生じていた。そして、その冬の1988～89年のインフルエンザ流行期に分離されたA/長野/1605/88、A/長野/1669/89、およびA/広島/C21/88は5個の塩基を共有した同一側枝上から分岐していた。

ii. 1987～89年の間に分離されたA(H3N2)型ウイルスのA/Bangkok/1/79と比較してのHA遺伝子塩基配列の解析

図 33 に、1987～89年の間に分離された15株のA(H3N2)型ウイルスについて、A/Bangkok/1/79と比較しての塩基の変異を変化したアミノ酸と共に示した。

A/Bangkok/1/79のHA遺伝子と比較し、解析を行った15株のウイルスのHA遺伝子の少なくとも77の位置で塩基の変異が起きていた。

これらの変異は進化系統樹の主流における変異が37、株特異的変異が34、A/

Bangkok/1/79株特異的変異が1, 未決定変異が5であった。

これらの塩基の変異は, 28のアミノ酸残基の変化を伴っていた。塩基の変異はHA1遺伝子全体に散在していたが, 大部分のアミノ酸の変化はHA1ポリペプチドの124番目と213番目のアミノ酸残基の間に集中していた。

1985~89年に分離されたA(H3N2)型ウイルスの, HA遺伝子の塩基の変異に基づいた進化系統樹を図 34 に示した。

1985年に分離された5株についてはNakajimaら[49]のデータを用いた。A/山形/96/85とA/長野/1749/89のHA遺伝子の間には, 進化系統樹の主流で15の塩基の変異が認められた。

1987年春に全国でただ1例分離されたA/長野/1046/87は, その冬の流行ウイルスA/長野/1185/88, A/蒲田/421/87, および1988年8月に東京都およびチェンマイで分離されたA/蒲田/612/88, A/Chiang Mai/156/88と共に, 進化系統樹上の同じ点から出た三つの側枝の上に位置していた。

同じく1987~88年の流行期に分離されたA(H3N2)型ウイルスA/東京/1276/87, A/千葉/38/88および1988年8月に分離されたA/神奈川/107/88は1987年に中国で分離されたA/四川/2/87と同様にA/長野/1046/87から進化系統樹の主流の塩基が1個変異した点から分岐した側枝上に位置していた。

また, 同様に1987~88年の流行期に分離されたA(H3N2)型ウイルスであるA/長野/184/88およびA/神戸/768/88はA/四川/2/87からさらに進化系統樹の主流で塩基が1個変異した位置から出た同じ側枝上に位置していた。

1989年冬期に, 分離されたA/長野/1749/89, A/愛知/1/89, A/蒲田/13/89は1987~88年の流行期に分離されたA/神戸/768/88 から進化系統樹の主流で塩基が7個変異した位置から出た同じ側枝上に位置していた。

IV 考察

1. インフルエンザウイルス分離方法についての検討

インフルエンザの疫学的研究においては, 調査期間を通じて膨大な量の検体についてウイルス検索を行わなければ, 流行実態を正確に把握することは困難である。また, インフルエンザは一旦流行が始まると短期間に爆発的に拡大す

るため、集中的に大量の検体を処理することが必要になる。

このようなインフルエンザのウイルス検査においては精度の高さと共に、迅速化、効率化が要求される。インフルエンザウイルスの分離には、通常発育鶏卵や培養細胞が用いられているが発育鶏卵を用いる方法は10～11日齢の発育鶏卵を使用しなければならないため、インフルエンザのように突発的に大流行を起こすような疾病では対応し難い場合が多い。

また、培養細胞についても現在行われている単層培養細胞を用いる方法は、単層細胞の形成を待たなければならないため、検体接種までに2～3日の猶予を余儀なくされることが多い。

そのため、ただちに使用可能な状態の細胞を常時十分量用意できる方法として、スピナーフラスコを用いた攪はん培養による浮遊培養細胞についての検討を行い、インフルエンザウイルスの分離に応用した。

浮遊細胞培養法については、ローラドラムを用いる方法[10]、ロータリーシェーカーを用いる方法[43,47]、スピナーフラスコを用いる方法[8,22,42,68,88]などが行われているが、近年培養細胞を用いた基礎的実験[89,103]およびハイブリドーマやハイブリドーマを用いてのモノクローナル抗体の作製[9,34]には、もっぱらスピナーフラスコを用いる方法が応用されている。

そこで、本研究においてもスピナーフラスコを用いての浮遊細胞培養法について検討を行った。

また、浮遊細胞培養法の補助的手段として凍結保存細胞を直接ウイルス分離に用いる方法についても検討した。

1) MDCK浮遊培養細胞を用いたインフルエンザウイルス分離

Gaushら[17]、飛田ら[90,91]により、MDCK細胞が流行株を含めたインフルエンザウイルスに高い感受性を持ち、インフルエンザウイルスのブラック定量化、あるいはブラック法による患者検体からのウイルス分離が可能であることが明らかにされて以来、この細胞は広くブラッククロニングなどを含めた患者からのウイルス分離、インフルエンザウイルスについての基礎的研究などに利用されている。

MDCK細胞の感受性が発育鶏卵に劣らないことは、梶ら[29]、古山ら[16]によ

っても明らかにされているが、梶らはその中でMDCK細胞をウイルス分離に用いることにより、発育鶏卵、あるいはMK細胞、Vero細胞を用いた場合に比較して、3~4日早くウイルスの確認ができたと報告している。

著者ら[50]も先に、患者発生からウイルス同定までに要する日数を短縮することを目的として、トリプシン-EDTAで分散したMDCK細胞の浮遊液へ直接検体を接種する方法により発育鶏卵、あるいは単層培養細胞を用いる方法に匹敵する分離成績の得られたことを報告したが、この方法によれば単層細胞の形成を待たずに検体を接種できるので、従来の方法に比べさらに2~3日早く病原決定を行うことができる。

しかし、不意の発生に対処できるようにするためには、継代日の異なる継代系をいくつか持ち、常にフルシートの培養瓶を準備しておかなければならない。

そこで、インフルエンザの突発的な発生に備え、常時使用可能な状態の細胞を、十分量用意できる方法としてMDCK細胞の浮遊培養法を検討したところ、スピナーフラスコを用いて攪はん培養を行うことにより、ウイルス分離あるいは単層培養細胞としてブラック法その他に使用するのに十分な量の細胞を得ることができた。

浮遊培養細胞の患者検体からのウイルス分離への応用に先だって、ウイルス分離に適した細胞濃度を求めるため、患者咽頭ぬぐい液中の平均的ウイルス濃度であった 4.4×10^3 PFU/mlのウイルス液を各種濃度の細胞浮遊液へ接種し、HA産生を観察したところ、 $3.5 \times 10^5 \sim 5.5 \times 10^6$ cells/mlまでは細胞濃度が高くなるに従って、次第にHA産生が良くなり、 5.5×10^6 cells/mlで最も良いHA産生が得られた。しかし、 1.1×10^7 cells/mlではHA産生は逆に低下し、 2.2×10^7 cells/mlではHA産生は全く認められなかった。

以上の成績からウイルス分離に最も適した細胞濃度として 5.5×10^6 cells/mlを選び、インフルエンザ流行期における患者検体からのウイルス分離には、この濃度の細胞浮遊液を用いた。

1.1×10^7 cells/ml以上の細胞濃度では、HA産生の低下が認められたが、このような傾向、すなわち低いm.o.i.でのHA産生の低下は、これまでの実験においても観察され報告してきた[51]。韓ら[32]もアカバネウイルスの浮遊培養において低いm.o.i.ではウイルスの増殖が悪くなることを認め、ウイルスの細胞へ

の吸着などに単層培養細胞を用いた場合とは異なった条件があるように思われると指摘しているが、インフルエンザウイルスの浮遊培養細胞におけるHA産生においても、同様の条件の影響を受けているものと考えられる。

このようなHA産生の相違については、その機構などについて今後さらに検討を加えていくことが必要と思われる。

また、 4.4×10^3 PFU/mlの標準ウイルス液を単層培養細胞および 5.5×10^6 cells/mlの浮遊培養細胞へ接種しHA産生を観察したところ、5日後には全てのウイルスおよび接種方法においてピーク値に達し、ほぼ同等の感受性を持つことが確認された。検体接種後の培養日数については、5日間が適当と考えられた。

以上のような実験結果から、患者検体からのウイルス分離に最適と思われた図2の方法により、161検体についてウイルス分離を行ったところ、浮遊培養細胞では112株、単層培養細胞では109株のウイルスが分離され、浮遊培養細胞はインフルエンザウイルス分離において高い感受性を示した。

これらのウイルスの大部分は、初代培養で十分なHA活性を持っていたため浮遊培養細胞を用いた方法では、検体搬入後5日目にウイルスを同定することができた。

このように、浮遊培養細胞をウイルス分離に応用することにより、突発的なインフルエンザの発生にも十分対処することができ、また従来からの方法に比較し、より早い病原決定を行うことができた。

2) ESK浮遊培養細胞を用いたインフルエンザウイルス分離

ESK細胞は広いウイルス感受性を持ち、各種のウイルス検査に用いられているが、特にブタバルボウイルスに高い感受性を持つため、このウイルスについての各種試験に用いられてきた。

ESK細胞のインフルエンザウイルス感受性については、1978年村上ら[46]が各種のトリインフルエンザウイルスを用いて、TCIDの測定を行いMDCK細胞よりも高い感受性を示したことを報告している。

また、1979年山岸ら[98]はヒトインフルエンザウイルスを用いて、MDCK細胞を含めた各種の培養細胞についてCPEおよびブラック法により感受性を調べたところ、ESK細胞とSK-K細胞が特に高い感受性を示したことを報告している。

このように、ESK細胞は各種のインフルエンザウイルスに対して高い感受性を持つことが明らかにされているが、この細胞を直接患者検体からのウイルス分離に用いた成績は報告されていない。

著者らはこれまでインフルエンザウイルスの分離にはMDCK細胞を使用してきたが、ESK細胞を患者検体からのウイルス分離に応用するために、この細胞の浮遊培養法についての検討を行うと共に、浮遊培養細胞のウイルス感受性についての検討を行った。

浮遊培養における培養液については、使用する細胞と目的に応じて基礎培養液にペプトン、TPB、ラクトアルブミン、イーストエキストラクト、トランスフェリン、インシュリン、セレナイトなど各種の添加剤を加えた培養液が工夫されている[6,32,34,43,88]。

ESK細胞はポリペプトンを添加した培養液により単層培養における細胞増殖が旺盛になることが確認されたので、浮遊培養液に濃度を変えて添加し、浮遊培養における細胞増殖を観察した。

その結果、浮遊培養においても細胞増殖が増強され、100 mg/mlのポリペプトンを10%添加した培養液で最も良い細胞増殖が得られた。しかし、ポリペプトンを10%あるいは15%添加した培養液ではクランプの形成が認められたのに対し、5%添加の培養液では増殖性はやや低かったものの、単離した状態の良い細胞を得ることができた。

そのため、ESK浮遊培養細胞のインフルエンザウイルス標準株に対する感受性についての検討は、100 mg/mlのポリペプトン5%添加の培養液で培養した細胞を用いて行った。

また、ウイルス分離に適した細胞濃度を求めるための実験に先だって、この実験に使用するウイルス濃度を定めるため、MDCK細胞の場合と同様に、患者咽頭ぬぐい液中のウイルス濃度をブラック法により定量したところ、平均的なウイルス濃度は 4.6×10^3 PFU/mlであった。これは以前、著者ら[51]が患者うがい液中のウイルス濃度を定量した際の平均的ウイルス量 1.5×10^3 PFU/mlに比較し、約3倍のウイルス濃度であった。

インフルエンザウイルス分離用の検体としては、うがい液が使用される場合が多いが、小児では十分なうがいの困難な場合が多いことなどを考慮すると、

分離用の検体としては咽頭ぬぐい液の方がより優れているものと思われる。

咽頭ぬぐい液中の平均的ウイルス濃度であった 4.6×10^3 PFU/mlに希釈したインフルエンザウイルス標準株を、各種濃度の浮遊培養細胞へ接種しHA産生を観察したところ、3種類のウイルスはいずれも 6.0×10^6 cells/mlで最も良いHA産生が得られ、それ以上および以下の細胞濃度ではHA産生が悪くなり、 2.4×10^7 cells/mlおよび 1.9×10^5 cells/mlでは全くHA活性が認められなかった。

そのため、ウイルス分離に最も適した細胞濃度として 6.0×10^6 cells/mlを選び、浮遊培養細胞と単層培養細胞のインフルエンザウイルス感受性についての比較検討、および患者検体からのウイルス分離にはこの濃度の細胞浮遊液を用いた。ESK浮遊培養細胞およびESK単層培養細胞でインフルエンザウイルス標準株はいずれも良く増殖し、MDCK単層培養細胞に劣らないHA産生が認められた。

しかし、ESK細胞でのHA産生はMDCK細胞に比較し1~2日遅れる傾向が認められた。すなわち、MDCK細胞ではウイルス接種後3~4日でピークに達したのに対し、ESK細胞では4~5日後にピーク値を示した。そのため、ESK細胞についても患者検体からのウイルス分離に当たっては、検体接種後5日間の培養は必要と思われる。

インフルエンザ様患者331名の咽頭ぬぐい液から分離されたインフルエンザウイルスの数は、ESK浮遊培養細胞で216株、ESK単層培養細胞で208株、MDCK単層培養細胞で205株であった。ESK浮遊培養細胞で最も多くのウイルスが分離されている。

以上のように浮遊培養におけるESK細胞は、ポリペプトンを添加した培養液を使用することにより高い増殖性を示し、インフルエンザウイルスにも高い感受性を持っていた。

流行期におけるルーチン検査では、1日に何回も検体が搬入されるという状態が何日も続くことが多い。このような場合にも浮遊培養では同一条件の直ちに使用可能な状態の細胞を常時大量に準備しておけるため、突発的なインフルエンザの発生にも無理なく対処することができる。そして、検体搬入時の即時対応が可能となるため単層細胞の形成を待って検体をまとめて接種するよりは、はるかに早く病原決定を行うことができる。

浮遊培養は細胞を良い状態に保つための適正な細胞濃度の維持、雑菌、かび

等による汚染防止など維持管理がやや煩雑ではあるが、3～4ヶ月のインフルエンザ流行期に限ることを考慮に入れれば、インフルエンザの早期実験室診断に有効な方法と思われる。

3)MDCK凍結保存細胞を用いたインフルエンザウイルス分離

インフルエンザウイルス分離への浮遊培養細胞の応用により、インフルエンザの突発的発生や連続的発生にも無理なく対応することが可能になったが、定期的に浮遊培養細胞の準備が十分でない場合の補助的手段として、また細胞培養のための十分な設備や経験のない検査室でもインフルエンザウイルス分離を行える方法として、凍結保存細胞へ直接検体を接種する方法について検討した。

インフルエンザウイルスに高い感受性を持つことが確認されているMDCK細胞およびESK細胞について、低温における細胞の生存状態を観察した。

その結果、MDCK細胞は6ヶ月間95%以上の高い細胞生存率を示したのに対し、ESK細胞の生存率は80%以下であった。そこで、以後の実験はMDCK凍結保存細胞を用いて行った

MDCK凍結保存細胞のインフルエンザウイルスに対する感受性を調べるため、標準株を接種しHA産生を観察したところ、いずれのウイルスも3～4日後には256倍のHA価を示し、患者検体からのウイルス分離に応用するのに十分な感受性を持っていた。

インフルエンザ様患者200名の検体について、MDCK凍結保存細胞および単層培養細胞を用いてウイルス分離を行ったところ143検体からA(H3N2)型のインフルエンザウイルスが分離された。凍結保存細胞で136株、単層培養細胞で137株のウイルスが分離され、ほぼ同等の感受性を示した。ウイルス分離に使用する凍結保存細胞は凍結時に細胞数を算定して、 6.0×10^6 cells/mlに調整しておけば、検体接種のたびに細胞数を数える必要はない。

凍結保存細胞への接種は原則として、検体搬入当日に行ったため、3～5日目にはインフルエンザウイルスの同定型別を行うことができた。

インフルエンザの流行期前に十分量の細胞を凍結保存しておくことにより、突発的なインフルエンザの発生にも容易に対処することができるものと思われる。

2. インフルエンザウイルス分離指標についての検討

インフルエンザウイルスのエンベロップを構成する2種類の糖蛋白、血球凝集素(HA),とノイラミダーゼ(NA)の持つ作用のうちHA活性はインフルエンザウイルスの分離指標としてニワトリ赤血球を用いて最も良く利用されている。

しかし、NA活性はインフルエンザウイルスの持つ特徴的な性質のひとつであるにもかかわらず分離指標としては、ほとんど利用されていない。

そこで、NA活性の分離指標への応用を試みると共に分離指標としてのHA活性についても検討を加えた。

1) HA活性についての検討

インフルエンザウイルスは多くの動物の赤血球に対してHA活性を持つことが知られているが、その中でHA活性測定のために使用する赤血球としてはニワトリ、モルモットおよびヒトO型赤血球が推奨されている[35,36,81,102]。分離当初のインフルエンザウイルスがニワトリ赤血球よりも、モルモットやヒトO型赤血球に対して、より高いHA活性を持つことは、O-D変異として良く知られている。

しかし、一般的にはニワトリ赤血球が単独で用いられる場合がほとんどで、モルモットやヒトO型赤血球は特別の場合を除き用いられていない。

著者らは、これまでのインフルエンザ流行期のウイルス検査のさいに、モルモット赤血球を併用することにより、高い分離率の得られることを何回か経験した。

そこで、1981年から1986年までに発生したA(H1N1), A(H3N2), およびB型インフルエンザウイルスの、それぞれ3回の流行時に、初代培養で分離されたインフルエンザウイルスのニワトリおよびモルモット赤血球のHA活性を調べ、モルモット赤血球の分離指標としての有用性について検討した[56]。

1981,1984,1986年の3回の流行時に分離された162株のA(H1N1)型ウイルスは、すべてモルモット赤血球に対するHA活性を持っていたが、そのうちの79株(48.8%)は、ニワトリ赤血球に対してHA活性を示さなかった。

そのため、A(H1N1)型ウイルスの流行時に、ニワトリ赤血球に対するHA活性だけを分離指標として、培養を初代で打ち切った場合、分離ウイルスの約半数を見落としてしまう危険性がある。流行毎の平均HA価も、A(H1N1)型ウイルスでは

モルモット赤血球とニワトリ赤血球の間に大きな差が認められた。

A(H3N2)型ウイルスについては、1981,1983,1985年の流行期に分離された133株のHA活性を調べた。

モルモット赤血球に対するHA活性は、ニワトリ赤血球に対するHA活性に比較し、いずれも高い値を示していたが、A(H1N1)型ウイルスほどの大きな差は認められなかった。

1981,1982,1985年の3回の流行時に分離された、125株のB型ウイルスのHA活性は、A(H3N2)型ウイルスと同様にモルモット赤血球とニワトリ赤血球の間に大きな差は認められなかった。しかし、モルモット赤血球に対する平均HA価は、各流行時ともニワトリ赤血球よりも高い値を示していた。

このように、HA活性に大きな差のあったA(H1N1)型ウイルスではもちろんであるが、HA活性陽性率に大差なく、比較的相関も良かったA(H3N2)型ウイルスおよびB型ウイルスにおいても、ニワトリ赤血球での平均HA価はモルモット赤血球での平均HA価に比較し、低い値を示していた。

そのため、ニワトリ赤血球を分離指標に用いた場合、初代培養で同定に必要な16倍以上のHA価を持ったウイルスを得られず、さらにもう1代の培養を必要とする例が多く認められた。

すなわち、モルモット赤血球を用いた場合、初代培養で同定できなかったウイルスの数は19株(4.5%)であったが、ニワトリ赤血球では初代で同定できなかったウイルスの数は、合わせて149株(35.5%)にも昇っていた。

インフルエンザのように突発的に発生し、爆発的に流行を起こすような疾病の病原検索は迅速性が要求されるため、初代培養で十分なHA活性を持ったウイルスを分離することが必要になってくる。

このようなことから、HA活性を分離指標とする場合、モルモット赤血球を用いることが望ましいと考えられる。

2)NA活性についての検討

インフルエンザウイルス粒子表在抗原のひとつであるノイラミニダーゼ(NA)はウイルス分離にさいして有効な分離指標となり得ると指摘されているが[59, 66],NA活性を分離指標として実際にウイルス分離を行った成績はまだ報告され

ていない。

そこで、インフルエンザ流行期の患者のうがい液20検体についてMDCK細胞、LLC-MK2細胞および発育鶏卵を用いて、HA活性およびNA活性を分離指標としてウイルス分離を行い、分離指標としてのNA活性の有用性について検討した[52]。

i. HA活性を指標としたウイルス分離成績と検体中のウイルス濃度

インフルエンザ様患者20名のうがい液から、発育鶏卵で12株、MDCK単層培養細胞で14株、MDCK細胞浮遊液で11株、LLC-MK2単層培養細胞で13株、LLC-MK2細胞浮遊液で11株のインフルエンザウイルスが分離された。このように、LLC-MK2細胞はインフルエンザウイルスに対して発育鶏卵、あるいはMDCK細胞とほぼ同等の感受性を示した。

この細胞は、インフルエンザウイルス以外にパラインフルエンザウイルス、エンテロウイルスなどについても高い感受性を持つことから[15]、呼吸器疾患の病原検索のための細胞としては、優れた増殖系であると考えられる。

また、検体中のウイルス濃度が 5.0×10^2 PFU/mlの検体からは、いずれの分離方法でもHA活性を持ったウイルスが分離され安定した成績が得られた。

しかし、 2.0×10^2 PFU/ml以下のウイルス濃度では分離成績にばらつきが見られ、 1.0 PFU/ml未満の検体からはウイルスはまったく分離されなかった。

このように、検体中のウイルス濃度は分離成績を左右する大きな要因となっていた。そのため、ウイルス分離にあたって、よりウイルス濃度の高い検体を使用できるよう、検体保存液の組成、検体の採取および輸送の方法などについて検討を加えていくことが必要と思われる。

ii. NA活性とHA活性との関係

1代目および2代目のすべての培養液および尿膜腔液を検体として、NA活性とHA活性を測定した。HA活性が4倍以上の検体は例外なく、ほぼHA活性に見合ったNA活性を持っていたのに対し、HA活性4倍未満の検体には、NA活性を保有しているものと保有していないものが認められた。

そこで、このHA活性4倍未満の検体について、2代継代後もHA活性が認められなかったグループと2代継代することによりHA活性を持ったウイルスの得られた

グループについて、HA活性、NA活性およびウイルス濃度との関係について調べた。

2代継代後もウイルスが分離されなかった検体のウイルス濃度は、1.0 PFU/ml未満から 5.0×10^2 PFU/mlで、2代継代後もHA活性は4倍未満、NA活性は吸光度0.001~0.022であった。

また、初代培養のHA活性は4倍未満であったが、2代継代することによりHA活性を持ったウイルスが得られた検体のウイルス濃度は、5.0 PFU/mlから 2.0×10^2 PFU/mlで、初代のHA活性はすべて陰性であったが、NA活性は吸光度0.051~0.098の間に分布していた。そして、これらの検体の2代継代後のHA活性は16~128倍、NA活性は吸光度0.337~1.365に上昇し、十分なHA活性とNA活性を持ったウイルスが得られた。

このことから、HA活性が陰性であっても培養を打ち切る前にNA活性を調べ、少なくとも吸光度0.05以上の活性が認められたものについては、さらにもう1代継代を重ねることによって、分離効率を高めることができるものとする。

NA活性はHA活性よりも高い精度と感度で測定できることから、インフルエンザウイルスはもちろん、HA産生の不安定なパラインフルエンザウイルスについては特に有効な分離指標になるものと思う。

3. インフルエンザ流行についての疫学的検討

インフルエンザは、わが国においては例年冬期を中心に周期的に流行を繰り返しているが、近年厚生省の結核・感染症サーベイランス事業や伝染病流行予測事業などによる監視体制が整ってきたこともあって、流行期のインフルエンザウイルスの動向についてはほぼ十分な情報が得られていると考える。

しかし、流行期以外のインフルエンザウイルスについての動向の把握は、まだ十分とは言えない。これら、流行期以外の時期に出現したウイルスは、抗原変異および進化の程度や方向についての情報を提供し、流行ウイルスの推定などについても示唆を与えるなど、インフルエンザの疫学にとって非常に大きな意味を持っている[18, 19, 61, 62]。

また、インフルエンザ流行は、わが国だけにとどまらず世界的な流行の流れの中にあり、国内における流行も諸外国、特に東南アジア諸国と深い関連性を

持っている [12,13].

すなわち、東南アジア諸国は気温などの気候の関係から、インフルエンザの流行期が定まっていないため、わが国におけるような季節集積性がなく、年間を通じて散発的な小流行を繰り返すという形で起こっている。

このように、流行が発生しても大きな流行とならないため、強固な集団免疫が形成されず、免疫の過疎地帯となっている。そのため、インフルエンザウイルスはレザバーの状態にくすぶったまま残留していると考えられている [12].

また、これらの地域においては家畜と人が密着した生活をしていること、家畜の間に種々のインフルエンザウイルスが見いだされること、これまでの新型ウイルスの多くが東南アジアで発生していることなどから、新型インフルエンザウイルスの発生地として注目されている [78].

そこで、年間を通して医療定点においてインフルエンザ様患者から検体を採取すると共に、東南アジアの一地域であるタイ国チェンマイにおいても例年わが国の流行閉期にあたる8月に検体を採取し、インフルエンザウイルスおよび、その他のウイルスについて病原検索を行った。

医療定点の検体については可能な限り対血清を採取し、血清抗体価の測定を行った。さらに、ウイルス検査の成績からインフルエンザ流行期を特定し、インフルエンザ感染と血清抗体価、ワクチン接種などとの相互関係を調べ疫学的検討を行った。また、流行前の免疫状況と流行との関係を知るため、例年10月に健康な県内住民から血液を採取し血清抗体価の調査も行った。

1)インフルエンザウイルスおよびその他のウイルスの分離状況

i.医療定点における分離状況

インフルエンザ様疾患について、わが国において年間を通してインフルエンザウイルス以外のウイルスも含めて、ウイルス検索を行った成績はまだあまり報告されていないが、著者らは [54,55,57], 1983年からMDCK, HEp-2, FL, Vero細胞、後にこれらの細胞にLLC-MK2, RD-18S細胞を加えて、インフルエンザ様患者からのウイルス分離を年間を通して行い報告してきた。

この調査の中で著者らは、初代培養で陽性の成績が得られた検体について直ちに同定に必要なウイルス量の確保のため、インフルエンザウイルスについて

は12ウエル，その他のウイルスについては24ウエルのプレートを用いてきた。

一方，沼崎ら[63,64]は96ウエルのマイクロプレートを用いて，HEF，HEp-2，VeroおよびMDCK細胞を培養し，小児急性気道感染症患者からのウイルス分離を行うことにより良い成績の得られたことを報告している。

沼崎らにより分離されたウイルスはインフルエンザウイルス，パラインフルエンザウイルス，RSウイルス，ムンプスウイルス，アデノウイルス，エンテロウイルス，単純ヘルペスウイルス，サイトメガロウイルスなどであった。

また，Montanaroら[45]，Sutmollerら[83]，Popow-Krauppら[71]，Wuら[97]，Ongら[69]はそれぞれの地域で，インフルエンザ様疾患のウイルス検索を行っているが，分離されたウイルスはインフルエンザウイルス，パラインフルエンザウイルス，アデノウイルス，エンテロウイルス，RSウイルス，単純ヘルペスウイルスなどで，著者らおよび沼崎らのわが国における成績と大きな差は認められなかった。

著者らのウイルス検索では，HEp-2細胞を用いたにもかかわらずRSウイルスを捕捉することができなかったが，これは定点の位置的關係から検体採取後直ちに，細胞へ接種することができなかったこと，検体の保存，輸送を理想的な状態で行うことができなかったことなどによると考えられる。RSウイルスについては，検体から直接ウイルスを検出する方法[4,28]についても検討して行きたい，またライノウイルスについてもHEL細胞を用いるなどして，疫学的な監視を行っていきたいと考えている。

i)1986～87年のインフルエンザ流行期およびその前後のウイルス分離状況

1986～87年のインフルエンザ流行期における流行ウイルスはA(H1N1)型ウイルスであったが，その前の4，5月にGlezenら[18,19]により報告された前駆波と思われるA(H1N1)型ウイルスの小流行が認められた。この，4，5月の小流行からA(H1N1)型ウイルスが20株分離され，ついでその冬の流行期に同じ型のウイルスが182株分離された。

1986年春のA(H1N1)型ウイルスの小流行は，長野県のほか神奈川，宮城，山形，山梨，富山，東京など東日本を中心とした各地に認められた[37,40]。

このように，春先に分離されたA(H1N1)型ウイルスは，次の流行ウイルスの先

駆けとして疫学的に大きな意味を持っていた。

この年、パラインフルエンザウイルスはインフルエンザ流行期の前後を中心に、コクサッキーウイルスは夏期を中心に分離された。また、エコーウイルス7型が6～11月にかけて高い頻度で分離され、このウイルスの流行のあったことが確認された。エコーウイルス7型は、この年全国的な流行ウイルスとして多数分離されていた[37]。アデノウイルスおよび単純ヘルペスウイルスは年間を通じて散発的に分離された。

ii)1987～88年のインフルエンザ流行期およびその前後のウイルス分離状況

1987～88年冬期のインフルエンザ流行は、A(H3N2)型とB型ウイルスの混合流行であった。

流行期間中にA(H3N2)型ウイルスは123株、B型ウイルスは82株分離された。このうち、A(H3N2)型ウイルスについては、前駆波ウイルスが分離された。1987年5月に分離されたA(H3N2)型の前駆波ウイルスは、この時期全国で唯一の分離例であったが、次の流行ウイルスについて大きな示唆を与えていた[60]。B型ウイルスについては、医療定点で前駆波を捕捉することはできなかったが、1987年春に九州、四国地方で前駆波ウイルスによる小流行が認められた[38,41]。

この年のB型前駆波ウイルスの活動は九州、四国地方に限局していたと考えられる。

パラインフルエンザウイルスは、インフルエンザ流行期の末期を中心に、アデノウイルスは前年と同様に年間を通じて散発的に分離された。また、コクサッキーウイルスB3型が10月を中心に他のウイルスに比較し数多く分離されたが、このウイルスは1987年のエンテロウイルスの流行ウイルスとして全国的にも多数分離された[38]。

iii)1988～89年のインフルエンザ流行期およびその前後のウイルス分離状況

1988～89年のインフルエンザ流行期の流行ウイルスは、A(H1N1)型ウイルスで128株分離されたが、この年も、流行の前駆波と思われる同型のウイルスが1988年5月に1株分離された。

A(H1N1)型の前駆波ウイルスは、長野県のほか青森、神奈川、山形などでも確

認された[27,39].

また、1989年3月と4月には次のシーズンの前駆波と見られるA(H3N2)型ウイルスとB型ウイルスが1株ずつ分離されている。

この年、パラインフルエンザウイルスはインフルエンザ流行終了後を中心に、コクサッキーウイルスはインフルエンザ流行期の前後を中心に分離された。アデノウイルスは例年のように期間を通じて散発的に分離されている。

また、エコーウイルス18型が7月を中心に多数分離されたが、このウイルスは同じ時期に全国的に数多く分離され、かなり大規模な流行を起こしていたことが確認された[39].

以上のように、年間を通して、綿密にウイルス検索を行うことによって、インフルエンザについては流行ウイルスの実態を正確に把握することができた。

また、流行ウイルスのほとんどを流行前に前駆波ウイルスとして捉えることができた。

さらに、インフルエンザ流行の最盛期には、インフルエンザ以外のかぜ患者は非常に少ないこと、インフルエンザ流行期の前後を中心にインフルエンザウイルス以外のウイルスによるかぜ患者が多く存在することなどが明らかにされた。また、年毎に流行ウイルスが入れ替わるエンテロウイルスの流行についても、その実態を捉えることができた。

エンテロウイルス感染症は多様な病像を示し、糞便から最もよく分離されるが、インフルエンザ様患者の咽頭ぬぐい液からのウイルス検索によっても流行実態の把握が可能であった。

ii. タイ国チェンマイにおける分離状況

インフルエンザの流行は世界的な流行の流れのなかにあり、わが国での流行も諸外国、特に東南アジア諸国と深い関連を持っている。

そのため、わが国での流行に先駆け東南アジアでインフルエンザウイルスの検索を行うことにより、変異株を早期に捕捉したり、その冬の流行ウイルスを事前に推定したりすることを目的に、毎年8月にタイ国チェンマイのチェンマイ大学付属病院小児科をおもな定点として、インフルエンザ様患者のウイルス検索を行った。

タイ国におけるインフルエンザウイルスについては、すでに過去の流行時の現地における流行状況やわが国のインフルエンザ流行との関係などについて山地ら[99,101], Takeuchiら[87]により報告されている。しかし、その他のインフルエンザ様疾患の原因ウイルスについては、現地における監視体制が十分でないこともあって、その実態についてはあまり明らかにされていない[92,93]。

そこで、著者らは限られた地域における、短期間の調査という制約の中ではあったが、インフルエンザウイルス以外のウイルスについても病原検索を行った。

i)1986年8月のウイルス分離状況

1986年チェンマイの患者からは15株のウイルスが分離された。

インフルエンザウイルスについては、その冬わが国での流行ウイルスとなったA(H1N1)型ウイルスが3株分離された。

A(H1N1)型ウイルスは、1986年春に東日本を中心に各地で分離されたことから、次期流行ウイルスとして有力視されていたが、チェンマイで8月に同じタイプのウイルスが分離されたことにより、次期流行ウイルスの予測についてさらに強い支持が得られた。

インフルエンザウイルス以外のウイルスとしてはパラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、およびこの年のわが国におけるエンテロウイルスの流行ウイルスであった、エコウーウイルス7型[37]が分離されている。

ii)1987年8月のウイルス分離状況

1987年チェンマイの患者からは28株のウイルスが分離された。インフルエンザウイルスについては、A(H1N1)型ウイルス5株とB型ウイルスが8株分離された。

B型ウイルスについては、1987年春に四国、九州地方を中心に小流行が認められたため、次期流行ウイルスの候補にあげられていたが、医療定点でのウイルス検索では、前駆波として捉えることができなかった。しかし、チェンマイでこの型のウイルスが分離されたことにより、次の流行期における流行ウイルスについて大きな示唆を得ることができた。

その他のウイルスとしては、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、およびわが国においてこの時期に多数分離されたコクサッキーウイルスB3型[38]が、インフルエンザウイルス以外のウイルスとしては最も多く分離された。

1986年に引続き1987年も、チェンマイにおいて最も高い頻度で分離されたエンテロウイルスと、わが国における流行ウイルスが良く一致していた。

iii)1988年8月のウイルス分離状況

1988年チェンマイの患者からは95株のウイルスが分離された。インフルエンザウイルスについては、わが国における前の流行期の流行ウイルスであったA(H3N2)型ウイルスが51株分離された。この型のウイルスは医療定点の検体から1989年3月に1株分離された。

その他のウイルスとしてパラインフルエンザウイルス、コクサッキーウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、およびエコーウイルス18型が多数分離された。エコーウイルス18型は医療定点の検体からも多数分離され、全国的にも大きな流行のあったことが確認されている[39]。

iv)1989年8月のウイルス分離状況

1989年チェンマイの患者からは73株のウイルスが分離された。インフルエンザウイルスについてはA(H1N1)型ウイルスが36株、A(H3N2)型ウイルスが21株、B型ウイルスが10株と3種類のウイルスが分離された。この年、長野県においてはA(H1N1)型ウイルスによるインフルエンザ流行終息後の3、4月に、前駆波と思われるA(H3N2)型ウイルスとB型ウイルスが1株ずつ分離されていた。

その他のウイルスとしてはコクサッキーウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルスが分離された。

エンテロウイルスについては、この年わが国においても長野県においても特定のウイルスの流行は認められず、チェンマイにおいてもコクサッキーウイルスB2型が2株分離されたのみであった。

以上のように、チェンマイでの調査によりわが国における次期流行ウイルスのすべてを捕捉することはできなかったが、わが国でのインフルエンザ流行に

ついて多くの示唆を得ることができた。

インフルエンザウイルス以外のウイルスの種類は医療定点における分離ウイルスとほぼ同じであった。そして、エンテロウイルスについてはわが国の流行ウイルスとチェンマイで数多く分離されたウイルスが良く一致し、インフルエンザウイルス同様エンテロウイルスについても、グローバルな流行の流れの中にある可能性が強く示唆された。

2)インフルエンザ流行期の患者血清HI抗体価とインフルエンザ感染およびワクチン接種との関係

インフルエンザの疫学調査、特にワクチン効果などについての調査においては、冬期を中心としたインフルエンザ流行期の、主として臨床診断による患者報告数などから流行期を推定し、血清診断に基づき効果判定がなされるのが普通である。

この場合、杉浦[82]、本間ら[23]が指摘しているように、ワクチンの効果が過大に評価される危険性がある。

また、患者報告数から推定された流行期の「かぜ患者」即インフルエンザ患者として処理されがちであるが、インフルエンザ以外の「かぜ」をインフルエンザと判断することにより、誤った評価を行う危険性がある。

インフルエンザの正しい流行像を把握し、その実態について解析を行うためには、ウイルス分離成績に裏付けされたデータについて疫学的な検討を行い、インフルエンザウイルス以外のウイルスによる修飾を排除することが必要である。

しかし、インフルエンザのように、対象が地域的にも、年齢的にも広範囲にわたり、しかも一旦流行が始まると短期間に爆発的に拡大して行くような疾病について、疫学的解析に十分なウイルス分離成績を得ることは、これまでのウイルス分離方法では困難であった。

著者ら[50,51,52,53,56,58]は、インフルエンザの疫学的解析に必要な多量の検体を効率的、かつ迅速に処理する方法について検討し、フィールド調査に応用し得ることを報告してきた。

これらの方法を用いて、1986～87年、1987～88年、1988～89年の3回のインフ

ルエンザ流行について、ウイルス分離成績からインフルエンザ流行期を特定し、その間に検体が採取されたインフルエンザ様患者について、ウイルス検査成績からインフルエンザ感染者と非感染者とに分け、インフルエンザ感染とHI抗体価、ワクチン接種との関係などについて検討を加えた。

i. 1986～87年の流行期についての検討

年齢群別の分離率は、50才代の25.0%、0～4才の54.5%を除き他の年齢層は、若年齢層から高齢者まで60%以上の高い値を示した。また、ワクチン接種者は19才以下の年齢層に限られ、成人の接種者は皆無であった。

インフルエンザ感染者の急性期血清平均抗体価はワクチン接種者31.1倍、非接種者23.5倍でワクチン接種者がやや高かったが、あまり大きな差は認められなかった。回復期血清の平均抗体価はワクチン接種者166.0倍、非接種者143.7倍といずれも有意の上昇を示した。

また、血清を採取したインフルエンザ感染者114名中110名(96.5%)は急性期血清抗体価が64倍以下で、個人レベルでの感染防御に有効と言われている128倍以上の抗体価を保有していた者はわずか4名(3.5%)のみであった。

また、114名のインフルエンザ感染者の中に24名(21.1%)のワクチン接種者が存在していたが、抗体価128倍の1名を除き、いずれも流行ウイルスに対して感染防御には不十分な64倍以下の抗体保有者であった。

年齢別にみると0～19歳の年齢層の急性期血清平均抗体価27.9倍に対して20歳以上の成人の平均抗体価は20.9倍でやや低い値を示していた。高齢者については、60歳以上の年齢層ではもちろんのこと40～50歳代についても急性期血清抗体価がいずれも32倍以下で基礎抗体のレベルが非常に低い状態にあった。

回復期血清平均抗体価は、0～19歳の年齢層で213.1倍とかなり高い抗体上昇を示したのに対し、20歳以上の成人では106.5倍と低いレベルにとどまっていた。成人では若年齢層に比較し、感染後の抗体産生が十分ではなかった。

インフルエンザ感染が確認されなかったかぜ患者33名のうちワクチン接種者は14名、非接種者は19名でワクチン接種率は42.4%であった。これはインフルエンザ感染者の21.1%に比較すると約2倍の接種率であった。

また、128倍以上の抗体保有者の割合は36.4%(12名)でインフルエンザ感染者

における3.5%と比較すると約10倍の値を示していた。

33名のインフルエンザ非感染者のうちワクチン接種者の急性期血清平均抗体価は115.9倍、ワクチン非接種者の平均抗体価は37.0倍であった。ワクチン接種者については、インフルエンザ感染者中のワクチン接種者の平均抗体価31.1倍と比較すると、感染防御に有効な値に近いHI抗体価を保有していたが、ワクチン非接種者は感染を免れてはいたものの、その急性期血清平均抗体価は非常に低い値を示していた。

ii. 1987～88年の流行期についての検討

インフルエンザウイルスは、40～49才の42.9%を除き各年齢層とも50%以上の高い率で分離された。また、5～9、10～14才の年齢層のワクチン接種率は50～60%と比較的高い値を示したが、それ以外の年齢層におけるワクチン接種率は非常に低く、成人ではわずかに5名の接種者が認められたのみであった。

血清を採取した185名のうち、インフルエンザ感染が確認された患者は138名であった。138名のうち48名はA(H3N2)型インフルエンザ感染者であり、90名はB型インフルエンザ感染者であった。

A(H3N2)型インフルエンザ感染者の、このウイルスに対する急性期血清の平均抗体価34.4倍に対して、同じA(H3N2)型インフルエンザ感染者のB型ウイルスに対する平均抗体価は32.0倍と、共にほとんど差の認められない低い値を示していた。しかし、B型インフルエンザ感染者のB型ウイルスに対する急性期血清の平均抗体価20.8倍に対して、B型インフルエンザ感染者のA(H3N2)型ウイルスに対する平均抗体価は104.8倍と非常に高い値を示していた。

すなわち、A(H3N2)型ウイルスに対する急性期血清抗体価が、A(H3N2)型インフルエンザ感染者では低い値を示していたのに対し、B型インフルエンザ感染者では非常に高い値を示していた。

一方、B型ウイルスに対する急性期血清抗体価は、A(H3N2)型インフルエンザ感染者およびB型インフルエンザ感染者共に低い値を示していた。

そのため、このシーズンのインフルエンザ流行においては、A(H3N2)型ウイルスに対して強い免疫を持ち、A(H3N2)型ウイルスの感染を免れた人がB型ウイルスに感染し、A(H3N2)型ウイルスおよびB型ウイルスのいずれにも十分な免疫を

保持していなかった人が、A(H3N2)型ウイルスに感染したと考えられる。

インフルエンザ感染者の急性期血清抗体価は、A(H3N2)型ウイルス感染者の中に7名、B型ウイルス感染者に2名の128倍の抗体保有者が認められたのを除き、他はすべて64倍以下であった。

A(H3N2)型ウイルス感染者の回復期血清抗体価の平均値は154.6倍で有意の抗体上昇を示していたが、B型ウイルス感染者の回復期血清抗体価の平均値は57.0倍で抗体価の上昇は良くなかった。

血清が採取されたA(H3N2)型ウイルス感染者のワクチン接種率は35.4%で、その平均抗体価は44.3倍であった。非接種者の29.9倍に比較するとやや高い値であったが、ワクチン接種者、非接種者共に抗体レベルは低い状態にあった。

また、血清が採取されたB型ウイルス感染者のワクチン接種率は45.6%で、ワクチン接種者が半数近くに及んでいたが、B型ウイルスに対する平均抗体価はワクチン接種者24.0倍、非接種者18.4倍といづれも非常に低い値を示していた。

年齢別の抗体保有状況について見ると、A(H3N2)型ウイルス感染者の0～19才の年齢層の急性期血清平均抗体価の53.8倍に対して、20才以上の成人の平均抗体価は42.7倍とやや低く、回復期血清抗体価の平均値も0～19才の年齢層の512.0倍に対して、20才以上の成人は137.2倍と感染による免疫応答は若年層でより鋭敏であった。

B型ウイルス感染者については、0～19才の年齢層の急性期血清抗体価の平均値16.3倍に対し、20才以上の平均抗体価は17.2倍とほぼ同じであった。回復期血清抗体価の平均値は0～19才の年齢層で94.2倍、20才以上の成人で28.2倍と年齢層により差は認められたが、いずれも非常に低い値を示していた。

血清を採取したインフルエンザ非感染者47名のうち、17名(36.2%)がワクチン接種者であった。A(H3N2)型ウイルスに対する平均抗体価は104.1倍であったが、ワクチン接種者の平均抗体価301.0倍に対し、非接種者の平均抗体価は57.0倍であった。ワクチン接種者は感染防御に十分な抗体を保有していたが、非接種者は感染を免れてはいたが十分な抗体を保有してはいなかった。

また、B型ウイルスに対する平均抗体価は37.6倍であったが、ワクチン接種者の平均抗体価は100.2倍、非接種者の平均抗体価は26.6倍でA(H3N2)型ウイルス同様ワクチン接種者は高い抗体価を保有していた。

iii. 1988～89年の流行期についての検討

インフルエンザウイルス分離率は50才以上の年齢層で20～30%台、5～9才の年齢層で40%台であった以外は、すべて50%以上の高い値を示し、特に15～19才の年齢層では87.5%の分離率を示した。ワクチン接種率は、最も接種者の多かった5～14才の年齢層でも30～50%台と年々減少し、それ以外の年齢層の接種者はわずか6名であった。

血清を採取した67名のうちインフルエンザ感染者は33名で、そのうちワクチン接種者は1名のみであった。

急性期血清の平均抗体価は28.8倍、回復期血清の平均抗体価は178.9倍で有意の抗体上昇を示していた。急性期血清抗体価は128倍の1名を除き、他はすべて64倍以下であった。

年齢別に見ると、0～19才の年齢層の急性期血清の平均抗体価43.9倍に対し、20才以上の成人の平均抗体価は23.4倍と1/2に近い値であった。回復期血清抗体価も0～19才の年齢層の平均値512.0倍に対し、20才以上の成人の平均値は102.8倍で若年齢層との間に大きな差が認められた。

インフルエンザ感染が確認されなかったかぜ患者34名のうち、ワクチン接種者は4名(11.8%)、非接種者は30名(88.2%)であった。

急性期血清の平均抗体価は47.1倍であったが、ワクチン接種者の平均抗体価は152.2倍で、感染防御に十分と思われる高い抗体価を保有していた。

このように、インフルエンザ流行期を特定し流行期のかぜ患者をウイルス分離成績および抗体検査成績からインフルエンザウイルス感染者と非感染者に分け、血清抗体価やワクチン接種について検討することにより、次のような点が明らかになった。

1986～87年の須坂市および松本市におけるインフルエンザ流行期は、12月中旬から2月下旬までであった。松本市は須坂市に比較し、流行の開始が1週間程早く、終息が10日程遅かった。1987～88年のインフルエンザ流行は、例年になく遅い2月上旬に始まり4月下旬まで続いた。この年も松本市は須坂市に比べ、流行の開始が半月程早く、終息も半月程遅かった。1988～89年のインフルエンザ流行は例年よりも早い、11月下旬～12月上旬に始まり2月上旬に終息した。

この年は須坂市、松本市共にほぼ同じ時期に開始し、同じ時期に終息している。インフルエンザウイルス分離率は、全般的に若年齢層で高かったが予想以上に高齢者からも高い率で分離された。

そのため、インフルエンザの増幅集団として防疫対策の対象となっている児童、生徒に限らず、青壮年および高齢者についても感受性集団としての認識を新たにし、対応して行くことが必要と思われる。

ワクチン接種者は、ほとんどが5～14才の年齢層に限られ、その他の年齢層におけるワクチン接種者はごく少数であった。5～14才の年齢層のワクチン接種率も年々減少する傾向が認められた。

インフルエンザ感染者の急性期血清抗体価は、ワクチン接種の有無に関わらず非常に低く、流行株に対して128倍以上の抗体保有者はほとんどいなかった。

感染により、多くは抗体価の有意の上昇を示したが、成人では抗体の上昇が十分でない例が認められた。

インフルエンザ非感染者の急性期血清の抗体価は感染者に比較して明らかに高く、特にワクチン接種者で感染を免れていた人の多くは128倍以上の、感染防御に十分な強い免疫を保有していた。

通常、個人レベルの感染防御には128～256倍の抗体価が必要であると言われているが、この調査においても同様の傾向が伺えた。

このような抗体調査はワクチン株を用いて行われる場合が多いが、流行ウイルスとワクチン株の間に、交差HI試験による抗原変異があまり認められない場合でも、実際に患者血清について抗体価を測定するとかなりの差が認められることが多い。そのため、血清抗体価と感染防御などについて考える場合、代表的な流行ウイルスを抗原として用いた成績について検討することが必要と思われる。

インフルエンザ感染者の中にも多くのワクチン接種者が存在したが、ほとんどは128倍に満たない低抗体保有者であった。このような、インフルエンザ感染者および非感染者の成績から、現行のワクチンでもアジュバントや、接種方法に改良を加え接種によって流行ウイルスに対して、確実に128倍以上の抗体が獲得できれば、十分効果を発揮できるものと考えられる。

また、若年齢層は基礎抗体が高く、免疫応答が鋭敏で感染により高い抗体を

獲得するが、成人、特に高齢者は基礎抗体が低く、感染によっても抗体が有意に上昇しない例が多く認められた。

高齢者のインフルエンザ感染について、高橋ら[84,86]、加地[30]は高齢者の流行ウイルスに対する抗体保有状況やインフルエンザ流行時の死亡率、死亡割合の状況、および感染時の臨床症状などから、ワクチン接種の必要性を強く説いている。また、河合ら[31]は1967～78年の12年間の超過死亡について検討し、ほとんどのインフルエンザ流行時に死亡率が期待値をはるかに超える超過死亡が認められたと報告している。超過死亡の多くは65才以上の高齢者や心臓血管系疾患、気管支肺疾患などいわゆるハイリスク群に属する人々に起こると考えられている[82]。

本調査において、高齢者は若年齢者に劣らず高い率でインフルエンザに感染し、しかも基礎抗体が低く、感染による抗体上昇も悪いこと、さらに積極的なワクチン接種が全くなされていないことなどが明らかになった。

そのため、成人、特にインフルエンザ感染により致命的な被害を受け易い高齢者については、ワクチン接種を励行し基礎抗体をあげて行くことが必要と思われる。

3)インフルエンザ流行前のHI抗体保有状況と流行との関係

i.1986～87年の流行と抗体保有状況

A(H1N1)型インフルエンザウイルスであるA/Bangkok/10/83に対しては、これまでの流行により各年齢層とも高い抗体保有率を示していた。しかし、1986年春の分離株であるA/山形/120/86およびA/長野/223/86に対しては、20才以上の年齢層での抗体保有率がやや低く、特にA(H1N1)型ウイルスの非流行期に出生した20～29才の年齢層は、他の年齢層に比較して低い抗体保有率を示していた。

A(H3N2)型ウイルスであるA/福岡/C29/85については、1985～86年の流行期にこの型のウイルスが流行したこともあって、各年齢層とも高い抗体保有率を示し、128倍以上の高い抗体価を持った人の割合も多かった。

また、B型ウイルスであるB/茨城/2/85に対しては、10才代では抗体保有率、抗体レベル共にかなり高い値を示していたが、30～50才の年齢層では抗体保有率も低く、128倍以上の高い抗体価を持つ人の割合も非常に少ない状態であった。

1986～87年冬期のインフルエンザ流行については、1986年春に長野県始め東日本各地でA/山形/120/86 に代表されるA(H1N1)型ウイルスによる小流行のあったことや[37,40]、この変異ウイルスに対する抗体保有状況などから、A(H1N1)型であろうと予想された。そして、その冬の流行は予想されたようにA(H1N1)型ウイルスによるものであったが、その流行は例年になく規模の小さいものであった[40]。

ii. 1987～88年の流行と抗体保有状況

A(H1N1)型ウイルスであるA/山形/120/86に対しては、1986～87年のインフルエンザ流行期にこの型のウイルスが流行したため、各年齢層とも高い抗体保有率を示し、128倍以上の抗体保有者も比較的多く認められた。

A(H3N2)型ウイルスであるA/福岡/C29/85 については、抗体保有率は高いものの、128倍以上の高い抗体価を持つ人の割合は1986年に比較して少なくなっていた。特に、1987年5月に分離されたA/長野/1046/87 については、抗体保有率も低く、抗体レベルも低い水準を示していた。

B型ウイルスであるB/茨城/2/85 に対する抗体保有は、1986年と大きな差は認められなかった。しかし、1987年春の小流行から分離され急遽ワクチン株に選定されたB/長崎/1/87 に対する抗体保有率は非常に低かった。128倍以上の高い抗体価を持つ人の割合も非常に少なく、特に、20才以上の年齢層で顕著であった。

1987～88年冬期のインフルエンザ流行については、1987年春に九州、四国地方にB型ウイルスの小流行が発生したこと[38,41]、この小流行から分離されたウイルスに対して多くの人が免疫を持っていなかったことなどから、B型ウイルスの流行が予想されていた。長野県で同じ時期に前駆波と見られるA(H3N2)型ウイルスが分離されたが、たった1株だけであったことなどから流行予測的な観点からはあまり重要視されなかった。

しかし、その冬のインフルエンザ流行はA(H3N2)型とB型の混合流行となり、この春のA(H3N2)型ウイルスはたった1株であったが、次の流行ウイルスについて大きな示唆を与えていた。1987～88年冬期のインフルエンザ流行は、2種類のウイルスの混合流行となり流行期が長かったこと、1987年の春に分離されたそ

それぞれのウイルスに対する抗体保有が非常に低調であったことなどから、比較的大きな流行となった[41]。

iii. 1988～89年の流行と抗体保有状況

A(H1N1)型ウイルスであるA/山形/120/86に対しては、1986～87年の流行期にこの型のウイルスが流行したこともあって、比較的高い抗体保有状況を示していた。また、1988年春に分離されたA/長野/1396/88に対してもワクチン株であるA/山形/120/86とほぼ同様の抗体分布を示したが、5～19才の年齢層での抗体レベルがやや低い状態にあった。

A(H3N2)型ウイルスであるA/福岡/C29/85については、前の流行期にこの型のウイルスが流行したため、抗体保有率、抗体レベル共に高い値を示していた。

しかし、新しくワクチン株に加えられたA/四川/2/87に対する抗体保有率、抗体レベルは非常に低い状態にあった。

B型ウイルスであるB/長崎/1/87に対しては、前の流行期にA(H3N2)型ウイルスと共にB型ウイルスが流行したにもかかわらず、抗体保有率、抗体レベル共に非常に低い値を示していた。これは、前の流行期に流行したB型ウイルスがB/長崎/1/87とは異なった抗原性を持ったウイルスであったことによると考えられる。

1988～89年のインフルエンザ流行については、1988年春に長野、横浜、青森などでA(H1N1)型ウイルスが分離されたため[27,39]、この型のウイルスの流行が予測されていた。しかし、抗体レベルがかなり高い水準にあるため、大きな抗原変異がない限り大流行に発展する危険性は少ないと考えられた。そして、1988～89年のインフルエンザ流行は予想されたようにA(H1N1)型ウイルスによるものであったが、流行ウイルスに大きな抗原変異が認められなかったため小規模な流行のまま終息した。

4. インフルエンザウイルスの抗原変異および進化

医療定点およびチェンマイで分離されたインフルエンザウイルスについて血清を用いた抗原分析を行うと共に、前駆波ウイルスを捕捉することのできたA(H1N1)型およびA(H3N2)型ウイルスについては、HA遺伝子塩基配列の解析を行

い、前駆波ウイルスと次の流行期における流行ウイルスとの遺伝学的関連性を明かにした。

1) 交差HI試験による抗原変異の分析

i. 医療定点で分離されたインフルエンザウイルスの抗原変異

i) 1986～87年の流行期を中心に分離されたインフルエンザウイルスの抗原変異

1986～87年のインフルエンザ流行期における流行ウイルスはA(H1N1)型ウイルスであった。そして、流行期に先駆けて、1986年春にそれまでのA/Bangkok/10/83に代表されるA(H1N1)型とは抗原的に大きく変わったA/山形/120/86に代表される変異株が分離され急速ワクチン株に加えられている。

前駆波ウイルスおよび流行期に分離されたウイルスは共に、この年のワクチン株であったA/山形/120/86抗血清に対してホモ抗体価に近い値を示した。

また、A/Brazil/11/78、A/Bangkok/10/83、A/横浜/4/86抗血清に対しても、前駆波ウイルスおよび流行期に分離されたウイルスはいずれもほぼ同じパターンを示し、これらのウイルスはワクチン株であったA/山形/120/86類似のウイルスと考えられた。

ii) 1987～88年の流行期を中心に分離されたインフルエンザウイルスの抗原変異

1987～88年のインフルエンザ流行期の流行ウイルスはA(H3N2)型とB型ウイルスであった。これら2種類のウイルスは混合した形で流行していた。

1987年5月に春先のウイルスとしては、全国でただ1株の分離例であったA/長野/1046/87は、ワクチン株であるA/福岡/C29/85からやや変異した抗原性を持っていた。このウイルスは、その他のA/大阪/156/87、A/京都/1/87、A/四川/2/87抗血清に対してA/大阪/156/87とほぼ同じ抗体パターンを示した。

流行期に分離されたA(H3N2)型ウイルスは、ワクチン株であるA/福岡/C29/85類似のウイルスとそれからやや変異したA/大阪/156/87類似のウイルスの2種類であったが、流行の主流は前駆波ウイルスA/長野/1046/87とほぼ同じ抗体パターンを持つA/大阪/156/87類似のウイルスであった。

流行期に分離されたB型ウイルスは、B/長崎/3/87とほぼ同じ抗体パターンを持つウイルスと、B/山形/16/88とほぼ同じ抗体パターンを持つウイルスの2種類

であったが、主流行ウイルスはB/長崎/3/87類似のウイルスであった。

iii)1988～89年の流行期を中心に分離されたインフルエンザウイルスの抗原変異

1988～89年のインフルエンザ流行期における流行ウイルスは、A(H1N1)型ウイルスによるものであったが、1988年5月に1株前駆波ウイルスが分離されている。

前駆波ウイルスA/長野/1396/88、および流行期に分離されたA(H1N1)型ウイルスの多くはA/山形/120/86 類似のウイルスであったが、なかに2管差程度の変異株が混在していた。

A(H1N1)型インフルエンザの流行終息後、次のシーズンの先駆けと思われるA(H3N2)型ウイルスとB型ウイルスが3月、4月に1株ずつ分離された。

1989年3月に分離されたA/長野/1749/89はワクチン株とはやや異なった、A/北海道/20/89類似のウイルスであった。次の1989～90年にかけての流行期におけるA(H3N2)型の流行ウイルスは、このウイルスと同じ抗原性を持っていた。

すなわち、1989年3月に分離されたA/長野/1749/89は前駆波ウイルスとして、次の流行ウイルスについて大きな示唆を与えていた。

1989年4月に分離されたB/長野/722/89は、抗血清に対する抗体パターンからB/愛知/5/88類似のウイルスと思われた。

1989～90年の流行期に分離されたB型ウイルスは、B/山形/16/88類似のウイルスで、4月に分離されたB/長野/722/89とは異なっていた。

このように、この4月に分離されたB型ウイルスは、次の1989～90年の流行期における流行ウイルスと型は一致していたが、抗原性は大きく異なった別のウイルスであった。

ii.タイ国チェンマイで分離されたインフルエンザウイルスの抗原変異

i)1986年8月に分離されたインフルエンザウイルスの抗原変異

1986年8月のチェンマイの検体からは、A(H1N1)型ウイルスが分離された。

分離されたウイルスは、いずれもA/山形/120/86とほぼ同じ抗体パターンを示しA/山形/120/86 類似のウイルスと考えられた。

わが国での流行に先立ち、すでに8月にはチェンマイで同じタイプのウイルス

によるインフルエンザ流行のあったことが確認された。

ii)1987年8月に分離されたインフルエンザウイルスの抗原変異

1987年8月チェンマイの検体からは、A(H1N1)型ウイルスとB型ウイルスが分離された。A(H1N1)型ウイルスについては、抗原的に差異の認められる2種類のウイルスが確認された。ひとつはチェンマイで前年の8月に分離され、その冬わが国での流行ウイルスとなったA/山形/120/86類似ウイルスであったが、その他にわが国における1988～89年の流行時に分離されたウイルスと同じ抗体パターンを持つウイルスが分離された。

すなわち、わが国での流行に先立ち1987年8月には、すでにチェンマイに同じタイプのウイルスが存在していたことが明らかになった。

1987年8月にチェンマイで分離されたB型ウイルスは、1987～88年の流行期にわが国の流行ウイルスとなったB/長崎/3/87類似のウイルスであることが判明した。

長野県における医療定点での調査では、B型ウイルスの前駆波を捉えることができなかったが、チェンマイでは1986年のA(H1N1)型ウイルスと同様にわが国での流行に先駆け、5ヶ月前に同タイプのウイルスがすでに流行ウイルスとして存在していた。

iii)1988年8月に分離されたインフルエンザウイルスの抗原変異

1988年8月のチェンマイの検体からは、A(H3N2)型ウイルスが分離された。

抗原分析の結果、A/福岡/C29/85に対する抗体価が1管差のグループと2管差のグループとが認められた。前者はわが国において1987～88年の流行期に分離されたウイルスとほぼ同じと考えられるが、後者はわが国において1989～90年の流行期に分離されたウイルスと同系統のウイルスと考えられた。また、A/四川/2/87類似のウイルスも1株確認された。

iv)1989年8月に分離されたインフルエンザウイルスの抗原変異

1989年のチェンマイの検体からは、A(H1N1)型、A(H3N2)型およびB型の3種類のウイルスが分離された。

A(H1N1)型ウイルスについては、A/山形/120/86 類似のウイルスとA/山形/120/86 と2管ほどの差の認められるウイルスとが存在していた。

わが国における1988～89年の流行時に分離されたA(H1N1)型ウイルスはA/山形/120/86 類似のウイルスを主流として、なかに2～3管程度の変異株が混在していた。チェンマイにおけるウイルス構成もほぼ同じと考えられた。

A(H3N2)型ウイルスについては、A/四川/2/87 類似のウイルス、A/秋田/4/88 とほぼ同じ抗体パターンを示すわが国において1987～88年の流行時に分離されたウイルスと同タイプのウイルス、およびA/四川/2/87、A/秋田/4/88から多少変異したわが国において1989～90年の流行時に分離されたウイルスと同じタイプのウイルスとが確認された。

このように、A(H3N2)型については抗原構造の異なった新旧のウイルスが同時に混在した状態で流行していた。

B型ウイルスは、すべてB/山形/16/88類似のウイルスであった。

先に述べたように、1987年8月のチェンマイでの調査時に分離されたウイルスはすべてB/長崎/3/87類似のウイルスで、B/山形/16/88類似のウイルスは分離されなかった。

わが国の1989～90年の流行時に分離されたウイルスは、すべて8月にチェンマイで分離されたB/山形/16/88類似のウイルスと同じタイプのウイルスであった。

このように、A(H3N2)型およびB型ウイルスについては、1989～90年冬期のわが国における流行ウイルスと同じタイプのウイルスが、すでに1989年8月にチェンマイで活動していたことが明らかになった。

以上のように、タイ国においては、わが国における冬期を中心とした流行期に先駆け、その年の8月にはすでに同じ抗原変異ウイルスが流行ウイルスとなっていた。また、同じ流行期にわが国における過去の流行ウイルスと1～2年後の流行ウイルスとが同時に共存していた。山地ら[100,101]は、わが国における1983～84年のA(H1N1)型ウイルスの流行時および1980～81年のA(H3N2)型ウイルスの流行時に、流行ウイルスとして登場した抗原変異ウイルスと同様のHI抗体パターンを示すウイルスが1～2年前にタイ国で分離され、同じタイプのウイルスがわが国における流行の半年前にタイ国において流行ウイルスとなっていたと報告している。

1986年以降の流行についても同様な疫学的関連性が確認され、わが国におけるインフルエンザ流行について大きな示唆が得られた。

2) HA遺伝子塩基配列の解析による分子進化についての検討

—特に、前駆波ウイルスとの関係について—

1986～89年の間にA(H1N1)型およびA(H3N2)型インフルエンザウイルスについて、春先の非流行期に分離されたウイルスと同じ型のウイルスが次の流行期の流行ウイルスとなるという、Glezenら[18,19]によって報告された前駆波現象が観察された。

前駆波ウイルスと次の流行期における流行ウイルスとの関連性について、西川ら[62]はフィンガープリント法により遺伝学的な解明を試みたが明快な結論は得られず、ウイルス核酸の塩基配列についての解析が有力な手段になるであろうと報告している。A(H1N1)型およびA(H3N2)型ウイルスについては、HA遺伝子の塩基配列の解析により、一定方向に向かって進化を続けていることが明らかにされている[2,7,49,73]。

そこで、1986～89年の間に医療定点において分離されたウイルスを中心に、国内各地で分離されたウイルスおよびチェンマイで分離されたウイルスを含めてHA遺伝子塩基配列の解析を行い、非流行期に分離されたインフルエンザウイルスと次の流行期に分離されたインフルエンザウイルスとの遺伝学的関連性の解明を目的に、A(H1N1)型およびA(H3N2)型ウイルスについての進化系統樹を作製した。

i. 1986～89年の間に分離されたA(H1N1)型ウイルスのA/USSR/90/77と比較してのHA遺伝子の変異

1986年春に分離された前駆波ウイルスA/長野/238/86、A/山形/120/86、A/東京/770/86、および1986～87年の流行期に分離されたA/長野/38/86、およびA/長野/174/87は、進化系統樹における主流の幹の同じ点から分岐した二つの側枝上に位置しており、これらのウイルスは遺伝学的に同じ起源に由来すると考えられた。

1986～87年のインフルエンザ流行が終息した後、1988年春にわが国で最初に分離されたA(H1N1)型ウイルスであるA/長野/1396/88はA/山形/120/86から2個主流の変異を生じていた。そして、その冬の1988～89年のインフルエンザ流行期に分離されたA/長野/1605/88、A/長野/1669/89、およびA/広島/C21/88は5個の変異を共有した側枝上から分岐していた。5個の変異のうちどの変異が主流の変化であるかは今後の解析を待たなければならないが、これまでの解析結果からそのうちのいくつかは主流の変化になると考えられる。したがって、1988年春に分離されたA/長野/1396/88は、その冬の流行ウイルスの直接的な親ウイルスとは考え難かった。

ii.1987～89年の間に分離されたA(H3N2)型ウイルスのA/Bangkok/1/79と比較してのHA遺伝子の変異

1985～86年のA(H3N2)型ウイルスによるインフルエンザ流行終息後、1987年春に全国でただ1例分離されたA/長野/1046/87は、その冬の流行ウイルスA/長野/1185/88、A/蒲田/421/87、および1988年8月に東京都およびチェンマイで分離されたA/蒲田/612/88、A/Chiang Mai/156/88と共に、進化系統樹上の同じ点から出た三つの側枝の上に位置していた。そのため、これらのウイルスは遺伝学的に近縁関係にあると考えられた。

同じく1987～88年の流行期に分離されたA(H3N2)型ウイルスA/東京/1276/87、A/千葉/38/88および1988年8月に分離されたA/神奈川/107/88は1987年に中国で分離されたA/四川/2/87と同様にA/長野/1046/87から進化系統樹の主流の塩基が1個変異した点から分岐した側枝上に位置していた。そのため、前のA/長野/1046/87に代表されるグループとは異なった起源を持ち、A/四川2/87近縁のウイルスと考えられた。また、同様に1987～88年の流行期に分離されたA(H3N2)型ウイルスであるA/長野/184/88およびA/神戸/768/88はA/四川/2/87からさらに進化系統樹の主流で塩基が1個変異した位置から出た同じ側枝上に位置し、明らかに前の二つのグループとは起源を異にしていた。

このように、A/長野/1046/87は1987～88年の流行期における流行ウイルスの親ウイルスとなっただけで、起源を異にする他の系統のウイルスも混在していた。

1989年冬期に、A(H1N1)型インフルエンザ流行終息後の小流行から分離されたA/長野/1749/89、A/愛知/1/89、A/蒲田/13/89は1987～88年の流行期に分離されたA/長野/184/88から進化系統樹の主流で塩基が7個変異した位置から出た同じ側枝上に位置していた。そのため、1988年夏のウイルスは1988年冬に分離されたウイルスとは遺伝学的に近縁関係にあるとは考えられなかった。

わが国においては、同じ型のインフルエンザウイルスは1～2年の間隔をおいて流行するのが常であり、その流行は冬期を中心として季節的、周期的に発生する。

このような流行形態をとるインフルエンザ流行については、流行閉期のウイルスがどこに、どのような形で存在するかが疫学的な疑問として提起される[24,25,26]。中島ら[48]は、1978～79年にかけてのインフルエンザ流行期の流行ウイルスについて、フィンガープリント法による解析を行い、少なくとも4種類のA(H1N1)型ウイルスがわが国で活動していたことを報告し、これらのウイルスの多くは国外からの持ち込みによる可能性の高いことを示唆している。

インフルエンザウイルスはわが国へ、国外から時期を選ばず、いろいろな経路をへて持ち込まれると考えられるが、春から夏にかけての時期に持ち込まれたウイルスが、流行閉期をへて次のインフルエンザシーズンの流行ウイルスとして、流行を引き起こすということについては明確な結論が得られていなかった。

そこで、1986年以降のインフルエンザ流行のうち、前駆波ウイルスの得られた流行例について、前駆波ウイルスと流行ウイルスとの遺伝学的関連性の解明を試みたところ、1986～87年のA(H1N1)型ウイルスおよび1987～88年のA(H3N2)型ウイルスの流行については、春の分離ウイルスはその冬に分離されたウイルスの一部と遺伝学的に近縁関係にあり、次のインフルエンザ流行の親ウイルスとなっていたことが明らかになった。

このように、前駆波ウイルスのうち1986年のA(H1N1)型ウイルスおよび1987年のA(H3N2)型ウイルスについては、次の流行期の親ウイルスと考えられ、疫学的な意義が遺伝学的に明らかにされたが、一方1987～88年のA(H3N2)型ウイルスの流行期には起源の異なったウイルスも同時に流行していたことが確認された。

また、1988～89年のA(H1N1)型ウイルスの流行については前駆波ウイルスが直

接的な親ウイルスとは考え難かった。

すなわち、春先の非流行期に分離されるウイルスは、前駆波ウイルスとして次の流行ウイルスについて大きな示唆を与えてくれることは確かであるが、遺伝学的進化の方向を直接的に示していない場合のあることが明らかになった。

遺伝学的関連性が認められた前駆波ウイルスについては、流行閉期の地域社会における存在形式についてひとつの可能性が示されたが、前駆波ウイルスが次の流行期までどのような形で地域社会の中で維持されているのかについて証明されなければならない。遺伝学的関連性が認められなかった前駆波ウイルスについては、今後さらにその出現の生態学的な意義の究明が必要と思われる。

また、以上のような点からインフルエンザの流行ウイルスについて、その抗原変異や進化の方向を的確に捉えるためには、前駆波ウイルスに限らず、国内外のウイルスについて幅広く解析を加えて行くことが必要である。

V 総括

本論文は、インフルエンザウイルス分離の即時対応と効率化を目的に、分離方法と分離指標についての検討を行い、それらの方法の疫学的解析への応用と、インフルエンザウイルスの抗原変異および進化について明らかにすることを目的とし、4項目により構成されている。以下、各項目毎にその概要を示す。

1. インフルエンザウイルス分離方法についての検討

インフルエンザの突発的かつ爆発的な流行に備えて、ただちに使用可能な状態の細胞を十分量用意できる方法として、MDCK細胞およびESK細胞の攪はん培養による浮遊細胞培養法についての検討を行い、インフルエンザウイルス分離への応用を試みた。また、浮遊培養細胞を用いる方法の補助的手段として凍結保存細胞を直接ウイルス分離に用いる方法についても検討した。

MDCK細胞およびESK細胞は、MEM Joklik浮遊培養液に新生仔牛血清を10%、および30 mg/mlのメチルセルローズ液を3%添加した培養液を基礎培養液として、MDCK細胞には29.5 mg/mlのトリプトースリン酸ブロス液を10%添加した培養液、ESK細胞には100 mg/mlのポリペプトンを5%添加した培養液を使用し、スピナ

ーフラスコを用いて37°Cのふ卵器内において200 rpmで攪はん培養を行うことにより良く増殖し、単離した状態の良い細胞を十分量得ることができた。

インフルエンザウイルス標準株を各種濃度の細胞浮遊液へ接種し、HA産生を観察したところMDCK細胞は 5.5×10^6 cells/ml, ESK細胞は 6.0×10^6 cells/mlの細胞濃度で最も良いHA産生が得られた。

そこで、インフルエンザ流行期に、それぞれの細胞について至適濃度の浮遊培養細胞を用いて患者検体からのウイルス分離を行ったところ、発育鶏卵や単層培養細胞に劣らない分離成績が得られた。

また、MDCK細胞は、低温保護剤としてジメチルスルホキシドを10%添加した場合、 -80°C 保存で6ヵ月後も95%以上の生存率を示した。凍結保存細胞へインフルエンザウイルス標準株を接種しHA産生を調べたところ、単層培養細胞や浮遊培養細胞と同等の高い感受性を示した。また、患者検体からのウイルス分離において単層培養細胞に匹敵する成績が得られた。

2. インフルエンザウイルス分離指標についての検討

モルモット赤血球HA活性、およびNA活性のインフルエンザウイルス分離指標としての有用性について検討を行った。

分離されたウイルスはすべてモルモット赤血球に対してHA活性を示したが、ニワトリ赤血球に対してはHA活性を示さない例がかなり認められた。このような傾向はA(H1N1)型インフルエンザウイルスにおいて顕著で、48.8%にもおよんでいた。A(H3N2)型およびB型インフルエンザウイルスではHA活性陽性率にほとんど差が認められなかった。しかし、いずれの型のウイルスにおいてもニワトリ赤血球に対するHA活性はモルモット赤血球に比較し低い値のものが多く、初代培養では同定に必要なHA活性の得られない例が多数認められた。このように、モルモット赤血球はニワトリ赤血球に比較し高い感受性を持ち、分離指標として優れていた。

また、HA活性およびNA活性を分離指標としてウイルス分離を行い、分離指標としてのNA活性について検討したところ、HA活性が4倍以上の検体は例外なく、ほぼHA活性に見合ったNA活性を持っていたのに対し、HA活性4倍未満の検体には、NA活性を保有しているものと保有していないものと認められた。そして、吸

光度0.05以上のNA活性を持った検体からは、次代の培養により十分なHA活性を持ったウイルスが分離された。そのため、培養を打ち切る前にNA活性を測定し、吸光度0.05以上のNA活性が認められた検体については、もう1代培養を繰り返すことにより分離効率を高めることができる。

3. インフルエンザ流行についての疫学的検討

県内2ヶ所の医療定点において1986年1月～1989年7月までの間、インフルエンザ様患者についてウイルス検索を行った。また、タイ国チェンマイにおいても1986～89年まで毎年わが国の流行閉期にあたる8月に、インフルエンザ様患者のウイルス検索を行った。ウイルス分離成績から、インフルエンザウイルスなどについての流行実態を把握すると共に、インフルエンザについてはウイルス分離成績から流行期を特定し、その間に検体が採取された患者の血清抗体価とインフルエンザ感染およびワクチン接種歴などについて疫学的検討を行った。

また、流行前の免疫状況を知るため例年10月に健康な県内住民から血液を採取し血清抗体価の調査を行った。

ウイルス分離成績：医療定点における年間を通してのウイルス検索により、それぞれの地区におけるインフルエンザ流行について、流行ウイルスの種類、流行開始および終息の時期などを正確に把握することができた。また、流行ウイルスのほとんどを流行前に前駆波ウイルスとして捉えることができた。

インフルエンザウイルス以外のウイルスについても同時に病原検索を行い、インフルエンザ流行の最盛期には、インフルエンザ以外のかぜ患者は非常に少ないこと、インフルエンザ流行期の前後を中心にインフルエンザウイルス以外のウイルスによるかぜ患者が多く存在することなどを明らかにした。また、年毎に流行ウイルスが入れ替わるエンテロウイルスの流行についても、その実態を把握することができた。

タイ国チェンマイにおけるウイルス検索により、わが国の流行閉期におけるインフルエンザウイルスの動向が明らかになり、その冬のインフルエンザ流行について多くの示唆を得ることができた。また、インフルエンザウイルス以外のウイルスの種類は医療定点で分離されたウイルスとほぼ同じであったが、特にエンテロウイルスについてはわが国における流行ウイルスと良く一致し、エ

ンテロウイルスについても、インフルエンザウイルスと同様にグローバルな流行の流れの中にある可能性が示唆された。

インフルエンザ流行期の患者血清抗体価とインフルエンザ感染およびワクチン接種との関係：インフルエンザ流行期に検体を採取した医療定点のインフルエンザ様患者の成績について、疫学的検討を行ったところ次のような成績が得られた。インフルエンザ流行の開始と終息の時期については、年度により2ヶ月程の差が認められ、松本市と須坂市間では1～2週間程の差が認められた。

インフルエンザウイルス分離率は、全般的に若年齢層で高かったが高齢者からも高い率で分離された。そのため、インフルエンザの増幅集団として防疫対策の対象となっている児童、生徒に限らず、青壮年および高齢者についても感受性集団としての認識を新たにし、対応して行くことが必要と思われる。

インフルエンザ感染者の急性期血清抗体価は、ワクチン接種の有無に関わらず非常に低く、流行株に対して128倍以上の抗体保有者はほとんど認められなかった。インフルエンザ非感染者の急性期血清の抗体価は感染者に比較して明らかに高く、特にワクチン接種者で感染を免れていた人の多くは感染防御に十分な強い免疫を保有していた。インフルエンザ感染者の中にも多くのワクチン接種者が存在したが、ほとんどは128倍に満たない低抗体保有者であった。

また、若年齢層は基礎抗体が高く、免疫応答が鋭敏で感染により高い抗体を獲得するが、成人、特に高齢者は基礎抗体が低く、感染によっても抗体が有意に上昇しない例が多く認められた。

このように、高齢者は若年齢者に劣らず高い率でインフルエンザに感染し、しかも基礎抗体が低く、感染による抗体上昇も悪いこと、さらに積極的なワクチン接種が全くなされていないことなどが明らかになった。そのため、成人、特にインフルエンザ感染により致命的な被害を受け易い高齢者については、ワクチン接種を励行し基礎抗体をあげて行くことが必要と思われる。

インフルエンザ流行前の抗体保有状況と流行との関係について：1986～89年の流行ウイルスの抗原変異はすべて連続変異の範囲内にあり、新型ウイルスの出現も無かったため、抗体保有状況からの流行ウイルスの予測は困難であった。

しかし、流行の規模については、インフルエンザウイルスの流行サイクルや前駆波ウイルスの出現状況、タイ国での分離成績などにより流行が予測された

ウイルスについての抗体保有状況から、事前にある程度の推定を行うことが可能であった。また、調査を行ったすべてのウイルスに対して、低年齢層、特に5～19才の年齢層は比較的高い抗体保有率と抗体レベルを持っていたが、成人は抗体保有率、抗体レベル共に非常に低い状態にあった。そのため、現在ほとんど積極的な対策が行われていない成人層、特に高齢者については何らかの対策が必要と思われる。

4. インフルエンザウイルスの抗原変異および進化

交差HI試験による抗原分析： 医療定点およびチェンマイで分離されたインフルエンザウイルスについてワクチン株およびその他の標準株の抗血清を用いて抗原分析を行った。

1986～87年の流行期に医療定点で分離されたウイルスおよび前駆波ウイルスは共に、この年のワクチン株であったA/山形/120/86類似のウイルスであった。

1987年5月に分離された前駆波ウイルスは、ワクチン株であるA/福岡/C29/85からやや変異したA/大阪/156/87類似のウイルスであった。その冬の流行期に分離されたA(H3N2)型ウイルスは、ワクチン株であるA/福岡/C29/85 類似のウイルスとそれからやや変異したA/大阪/156/87類似のウイルスの2種類であったが、流行の主流はA/大阪/156/87類似のウイルスであった。同じ流行期に分離されたB型ウイルスは、B/長崎/3/87類似のウイルスと、B/山形/16/88類似のウイルスの2種類であったが、主流ウイルスはB/長崎/3/87類似のウイルスであった。

1988～89年の流行期の前駆波ウイルスおよび流行期に分離されたA(H1N1)型ウイルスの多くはA/山形/120/86 類似のウイルスであったが、なかにやや変異したウイルスが混在していた。1989年3月に分離されたA(H3N2)型の前駆波ウイルスはワクチン株とはやや異なったA/北海道/20/89類似のウイルスであった。1989年4月に分離されたB型の前駆波ウイルスは、B/愛知/5/88類似のウイルスであった。

また、1986年8月のタイ国チェンマイの検体から分離されたA(H1N1)型ウイルスは、A/山形/120/86 類似のウイルスであった。わが国での流行に先立ち、すでにチェンマイで同じタイプのウイルスによるインフルエンザ流行のあったことが確認された。

1987年8月のチェンマイの検体からは、A(H1N1)型ウイルスとB型ウイルスが分離された。A(H1N1)型ウイルスについては、チェンマイで前年の8月に分離され、その冬わが国での流行ウイルスとなったA/山形/120/86類似ウイルスと、わが国における1988～89年の流行時に分離されたウイルスと同じ抗体パターンを持つウイルスとが分離された。

B型ウイルスは、B/長崎/3/87類似のウイルスであった。医療定点での調査では、B型ウイルスの前駆波を捉えることができなかったが、チェンマイではわが国での流行に先駆け、5ヶ月前に同タイプのウイルスがすでに流行ウイルスとして存在していた。

1988年8月のチェンマイの検体から分離されたA(H3N2)型ウイルスは、A/福岡/C29/85に近いウイルスとそれからやや変異したウイルスとであった。前者はわが国において1987～88年の流行期に分離されたウイルスとほぼ同じと考えられるが、後者はわが国において1989～90年の流行期に分離されたウイルスと同系統のウイルスと考えられた。また、A/四川/2/87類似のウイルスも分離された。

1989年のチェンマイの検体からは、A(H1N1)型、A(H3N2)型およびB型の3種類のウイルスが分離された。A(H1N1)型ウイルスについては、A/山形/120/86類似のウイルスとA/山形/120/86からやや変異したウイルスとが存在していた。

A(H3N2)型については、A/四川/2/87類似のウイルス、A/秋田/4/88類似のわが国における1987～88年の流行ウイルス、およびA/四川/2/87、A/秋田/4/88から多少変異したわが国における1989～90年の流行ウイルスとが確認された。B型ウイルスは、すべてB/山形/16/88類似のウイルスであった。わが国の1989～90年の流行時に分離されたウイルスは、すべて8月にチェンマイで分離されたB/山形/16/88類似のウイルスであった。

以上のように、タイ国においてはわが国における冬期を中心とした流行期に先駆け、その年の8月にはすでに同じ抗原変異ウイルスが流行ウイルスとなっていた。また、同じ流行期にわが国における過去の流行ウイルスと1～2年後の流行ウイルスとが同時に共存していた。

HA遺伝子塩基配列の解析による分子進化についての検討：前駆波ウイルスを捕捉することのできたA(H1N1)型およびA(H3N2)型ウイルスについては、HA遺伝子塩基配列の解析を行い、進化系統樹を作製して、前駆波ウイルスと次の流行

期における流行ウイルスとの遺伝学的関連性を明かにした。

1986年春に分離されたA(H1N1)型の前駆波ウイルス, およびその年の流行期に分離されたA(H1N1)型ウイルスは, 遺伝学的に同一の起源に由来すると考えられた。1986~87年のインフルエンザ流行が終息した後, 1988年春にわが国で最初に分離されたA(H1N1)型ウイルスであるA/長野/1396/88はA/山形/120/86から2主流の変異を生じていた。そして, その冬の1988~89年のインフルエンザ流行期に分離されたウイルスはA/長野/1396/88とは異なった側枝上に位置していた。

そのため, 1988年春に分離されたA/長野/1396/88は, その冬の流行ウイルスの直接的な親ウイルスとは考え難かった。

また, 1986~87年のA(H1N1)型ウイルスの流行終息後, 1987年春に全国でただ1例分離されたA(H3N2)型ウイルスであるA/長野/1046/87は, その冬の流行ウイルスおよびチェンマイで分離されたA/Chiang Mai/156/88と共に, 遺伝学的に近縁関係にあり同じ起源に由来すると考えられた。同じく1987~88年の流行期に, 東京, 千葉で, また1988年8月に神奈川県で分離されたウイルスは, A/長野/1046/87に代表されるグループとは異なった起源を持ち, A/四川/2/87近縁のウイルスと考えられた。また, 同様に1987~88年の流行期に分離されたA/長野/184/88およびA/神戸/768/88は, A/四川/2/87からさらに進化系統樹の主流で塩基が1個変異した位置から出た同じ側枝上に位置し, 明らかに前の二つのグループとは起源を異にしていた。

すなわち, 前駆波ウイルスA/長野/1046/87は1987~88年の流行期における一部の流行ウイルスの親ウイルスとなっはいたが, 起源を異にする他の系統のウイルスも混在していた。

今後さらに, 病原検索を中心としたこのようなインフルエンザの疫学調査を継続し, インフルエンザウイルスの抗原変異, 進化の方向を見極め, 新型ウイルスの出現に備えることが必要と考えられる。一部の前駆波ウイルスについては, 塩基配列の解析により次の流行ウイルスとの遺伝学的関連性が明らかにされ, 流行閉期のウイルスの存在形式についてひとつの可能性が示されたが, 遺伝学的に関連性の認められなかった前駆波ウイルスについても, その出現の生態学的意義の解明が急務と思われる。また, 成人, 特に高齢者のインフルエン

ザ感染についてその感染実態をさらに明かにし、対策についても検討を加えて行くことが必要と考えられる。

VI 謝辞

本研究について、懇切な御指導と御助言をいただいた麻布大学獣医学部田淵清教授、清水武彦教授、小西信一郎教授に心より感謝いたします。また、本研究について種々御便宜をおはかりくださり、御校閲をいただいた日本医科大学山地幸雄名誉教授、元国立予防衛生研究所武内安恵博士、国立公衆衛生院微生物学部中島節子分子疫学室長、折にふれ助言と激励をいただいた国立予防衛生研究所ウイルス・リケッチャ部ウイルス第三室中山幹男主任研究官に深く感謝いたします。

長野県におけるインフルエンザの疫学調査について御指導と御鞭撻をいただき、また本論文上梓の契機を与えて下さった東京都三鷹保健所長南谷幹夫先生に深甚なる謝意を表します。

多忙な診療の中で貴重な検体を長年にわたって採取していただいた松岡医院松岡伊津夫先生、旭町医院小林英之先生に心から感謝すると共に、研究を進めるにあたり、御理解と御便宜をおはかりくださった長野県衛生公害研究所小関勇一所長、北川聡研究技監（前感染症部長）、笹井貞雄、原田行雄、堀内正次元感染症部長に厚く感謝いたします。また、本研究について種々御協力いただいた長野県衛生公害研究所感染症部の西沢修一主任研究員、小山敏枝技師、青木明美前技師、奥村千恵子主査、ほか部員諸兄に深く感謝いたします。

本研究の多くは、厚生省伝染病流行予測調査の一環として行ったものであるが、タイ国チェンマイにおける調査は日本医科大学東南アジア医学研究会の調査団の一員として行ったものであり、機会を与えてくださった関係各位に深く感謝いたします。

おわりに、本研究の一部は厚生科学研究費（流行閉期におけるウイルスの探索調査）、千葉県血清研究所（インフルエンザの疫学的研究）、大同生命厚生事業団（インフルエンザ様疾患の疫学的研究）の助成のもとに行われたことを記し心から感謝いたします。

VII 文献

1. Aymard-Henry, M., Schild, G. C., and Newman, R. W. 1973. Antigenic variation in the neuraminidases of human influenza A strains. Evidence of antigenic drift in neuraminidase pre-dating changes in haemagglutinin. *Symp. Immunobiol. Stand.* 20:39.
2. Both, C. W., Sleight, M. J., Cox, N. J., and Kendal, A. P. 1983. Antigenic drift in influenza virus H3 haemagglutinin from 1968 to 1980: Multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J. Virol.* 48:52-60.
3. Brown, J. W., Eaton, M. D., Meiklejohn, G., Lagan, J. B., and Kerr, W. J. 1941. An epidemic of influenza. Result of prophylactic inoculation of a complex influenza A distemper vaccine. *J. Clin. Invest.* 20:663-669.
4. Chonmaitree, T., Bessette-henderson, B. J., Hepler, R. E., and Lucia H. L. 1987. Comparison of three rapid diagnostic techniques for detection of respiratory syncytial virus from nasal wash specimens. *J. Clin. Microbiol.* 25:746-747.
5. Coonrod, J. D., Karathanasis, P., Betts, R. F., and Donofrio, J. C. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay of core antigens for clinical diagnosis of influenza. *J. Med. Virol.* 25:399-409.
6. Cooper, P. D., Wilson, J. N., and Burt, A. M. 1959. The bulk growth of animal cells in continuous suspension culture. *J. Gen. Microbiol.* 21:702-720.
7. Cox, N. J., Black, R. A., and Kendal, A. P. 1984. Pathways of evolution of influenza A(H1N1) viruses from 1977 to 1986 as determined by oligo-

- nucleotide mapping and sequencing studies. *J. Gen. Virol.* 70:299-313.
8. Davis, E.V., Glover, F., and McLimans, W.F. 1958. Proliferation of human amion cells (FL strain) in submerged culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 97:454-456.
 9. Doge, T.C., and Hu, W.S. 1986. Growth of hybridoma cells under different agitation conditions. *Biotechnol. Lett.* 8:683-686.
 10. Earle, W.R., Schilling, E.L., Bryant, J.C., and Evans, V.J. 1954. The growth of pure strain L cells in fluid-suspension cultures. *J. Nat. Cancer Inst.* 14:1159-1171.
 11. Espy, M.J., Smith, T.F., Harmon, M.W., and Kendal, A.P. 1986. Rapid detection of influenza virus by shell vial assay with monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 24:677-679.
 12. 福見秀雄. 1979. インフルエンザ. 新宿書房. P.169-172.
 13. 福見秀雄. 1982. インフルエンザワクチン. 医学書院. P.87-130.
 14. Francis, T., Jr., and Magill, T.P. 1936. Vaccination of human subjects with virus of human influenza. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 33:604-606.
 15. Frank, A.L., Couch, R.B., Griffis, C.A., and Baxter, B.D. 1979. Comparison of different tissue cultures for isolation and quantitation of influenza and parainfluenza viruses. *J. Clin. Microbiol.* 10:32-36.
 16. 古山宗成, 緒方正名, 上羽修, 石田立夫. 1976. 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.

17. Gaush, C.R., and Smith, T.F. 1968. Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Appl. Microbiol.* 16:588-594.
18. Glezen, W.P., Couch, R.B., and Six, H.R. 1982. The influenza herald wave. *Am. J. Epidemiol.* 116:589-598.
19. Glezen, W.P., Couch, R.B., Taber, L.H., Paredes, A., Allison, J. E., Frank, A.L., and Aldridge, C. 1980. Epidemiologic observations of influenza B virus infections in Houston, Texas, 1976-1977. *Am. J. Epidemiol.* 111:13-22.
20. Goldstein, L.C., Corey, L., McDougall, J.K., Tolentino, E., and Nowinski, R.C. 1983. Monoclonal antibodies to herpes simplex viruses: Use in antigenic typing and rapid diagnosis. *J. Infect. Dis.* 147:829-837.
21. Harmon, M.W., and Pawlik, K.M. 1982. Enzyme immunoassay for direct detection of influenza type A and adenovirus antigens in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 15:5-11.
22. Hayflick, L. 1961. The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation. *Exp. Cell Res.* 23:14-20.
23. 本間守男, 片桐進, 荒井富. 1984. インフルエンザワクチンの効果判定に関する研究. *臨床とウイルス.* 12:463-470.
24. Hope-Simpson, R.E. 1979. Epidemic mechanisms of type A influenza. *J. Hyg.* 83:11-26.

25. Hope-Simpson, R.E. 1981. The role of season in the epidemiology of influenza. *J. Hyg.* 86:35-47.
26. Hope-Simpson, R.E., and Golubev, D.B. 1987. A new concept of the epidemic process of influenza A virus. *Epidemiol. Infect.* 99:5-54.
27. 石田正年, 松本美弥子, 根路銘令子, 斉藤利憲, 遠藤淳, 根路銘国昭. 1989. 1988-89シーズンにおけるインフルエンザの流行と流行ウイルスの特徴-再び動いたA/ソ連型変異ウイルス-. 第37回日本ウイルス学会総会演説抄録. 210.
28. Jallowayski, A.A., England, B.L., Temm, C.J., Nunemacher, T.J., Bastian, J. F., MacPherson, G.A., Dankner, W.M., Straube, R.C., and Connor, J.D. 1987. Peroxidase-antiperoxidase assay for rapid detection of respiratory syncytial virus in nasal epithelial specimens from infants and children. *J. Clin. Microbiol.* 25:722-725.
29. 梶哲夫, 尾西一, 木村晋亮, 波多野基一. 1976. 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, Paramixovirus の分離成績について. 第24回日本ウイルス学会総会演説抄録. 1002.
30. 加地正郎. 1983. 抵抗力減弱宿主におけるウイルス感染症, 老人の感染症, インフルエンザを中心に. *臨床とウイルス.* 11:352-354.
31. 河合道, 福富和夫, 杉浦昭. 1980. インフルエンザと超過死亡(1966-1978). *臨床とウイルス.* 8:53-57.
32. 韓行徳, 林俊行, 石井明夫, 本橋常正. 1979. 浮遊培養におけるアカバネウイルスの増殖. 第87回日本獣医学会講演要旨. III-78.
33. 北村敬. 1976. ウイルス検査のための組織培養技術. 近代出版. P. 101.

34. Kitano, K., Sintani, Y., Ichimori, Y., Tsukamoto, K., Sasai, S., and Kida, M. 1986. Production of human monoclonal antibodies by heterohybridomas. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24:282-286.
35. 甲野礼作, 石田名香雄, 沼崎義夫. 1980. 臨床ウイルス学手技編. 講談社. p. 141
36. 国立予防衛生研究所学友会編. ウイルス実験学各論. 1982. 丸善. P. 287-328.
37. 国立予防衛生研究所, 厚生省保健医療局感染症対策室. 1987. 検出ウイルスの月別集計. 8:163.
38. 国立予防衛生研究所, 厚生省保健医療局感染症対策室. 1988. 検出ウイルスの月別集計. 9:137.
39. 国立予防衛生研究所, 厚生省保健医療局感染症対策室. 1989. 検出ウイルスの月別集計. 10:168.
40. 厚生省保健医療局感染症対策室, 国立予防衛生研究所血清情報管理室. 1988. 昭和61年度伝染病流行予測調査報告書. P32-68.
41. 厚生省保健医療局感染症対策室, 国立予防衛生研究所血清情報管理室. 1988. 昭和62年度伝染病流行予測調査報告書. P37-75.
42. McLimans, W.F., Davis, E.V., Glover, F.L., and Rake, G.W. 1957. The submerged culture of mammalian cells : The spinner culture. *J. Immunol.* 79:428-433.
43. Merchant, D.J., and Hellman, K.B. 1962. Growth of L-M strain mouse cells in a chemically defined medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 110:194-198.

44. Meurman, O., Sarkkinen, H., Ruuskanen, O., Hanninen, P., and Halonen, P. 1984. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection in children: Comparison of viral antigen detection and serology. *J. Med. Virol.* 14: 61-65.
45. Montanaro, D., Ribera, G., Attena, F., Schioppa, F., and Romane, F. 1983. Viruses associated with acute respiratory infections in children admitted in Naples, 1979-82. *Bull. W.H.O.* 61:981-986.
46. 村上洋介, 杉村崇明, 小河孝, 田中義夫, 林重美, 熊谷哲夫, 大滝俊彦. 1978. 各種培養細胞のトリインフルエンザウイルスに対する感受性. 第86回日本獣医学会講演要旨. I-62.
47. Nagle, S.C. Jr., Tribble, H.R. Jr., Anderson, R.E., and Gray, N.D. 1963. A chemically defined medium for growth of animal cells in suspension. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 112:340-344.
48. Nakajima, S., Nakajima, K., Takeuchi, Y., and Sugiura, A. 1980. Influenza surveillance based on oligonucleotide mapping of RNA of H1N1 viruses prevalent in Japan, 1978-1979. *J. Infect. Dis.* 142:492-507.
49. Nakajima, S., Takeuchi, Y., and Nakajima, K. 1988. Location on the evolutionary tree of influenza H3 haemagglutinin genes of Japanese strains isolated during 1985-6 season. *Epidemiol. Infect.* 100:301-301.
50. 中村和幸, 西沢修一. 1979. MDCK細胞浮遊液を用いたインフルエンザウイルスの分離. *感染症誌.* 53:698-703.
51. 中村和幸, 西沢修一. 1980. MDCK細胞の浮遊培養および浮遊培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離. *感染症誌.* 54:306-312.

52. 中村和幸, 西沢修一. 1982. LLC-MK2細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離と分離指標としてのノイラミニダーゼ活性について. 長野県衛公研報告. 5:1-4.
53. 中村和幸, 西沢修一. 1986. インフルエンザ様患者からのウイルス分離法についての検討 - ESK浮遊培養細胞によるインフルエンザウイルスの分離 -. 感染症誌 60:1284-1293.
54. 中村和幸, 西沢修一. 1989. ウイルス分離成績からみた1988-89シーズンのインフルエンザ様疾患. 第35回日本ウイルス学会総会演説抄録. 437.
55. 中村和幸, 西沢修一, 青木明美. 1985. インフルエンザの流行に引続き発生したコクサッキーウイルスB3型の流行について. 第59回日本感染症学会総会講演抄録. 240.
56. 中村和幸, 西沢修一, 青木明美, 松岡伊津夫, 小林英之. 1987. インフルエンザウイルス分離指標としてのHA活性についての検討. 臨床とウイルス. 15:355-360.
57. 中村和幸, 西沢修一, 青木明美, 松岡伊津夫, 小林英之. 1985. 1984年から1985年にかけての長野県におけるインフルエンザ様疾患について. 第34回日本感染症学会東日本地方会総会講演抄録. 112.
58. 中村和幸, 西沢修一, 松岡伊津夫. 1987. インフルエンザ様患者からのウイルス分離方法についての検討 - MDCK凍結保存細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離 -. 感染症誌. 61:1401-1405.
59. 中山幹男, 根路銘国昭, 石田正年, 岡田久恵. 1987. オルソ及びパラミクソウイルス検知におけるノイラミニダーゼの指標. 国立予防衛生研究所年報. XXXII:131.

60. 西川文雄, 秋田美千代, 中山幹男, 中村和幸, 鈴木博, 山地幸雄, 阿部博.
1988. 1987-88年のインフルエンザ流行-全国の発生状況より考察した東京都
蒲田地区の流行. 第36回日本ウイルス学会総会演説抄録. 201.
61. Nishikawa, F., Sugiyama, T., Akita, M., Abe, H., Suzuki, H., and Yamazi Y.
1987. Epidemiological research on the phenomenon of the influenza
herald wave. *J. Nippon Med. Sch.* 54:684-687.
62. 西川文雄, 杉山貞次, 山本紀一, 武内安恵, 秋田美千代, 阿部博, 中島節子, 鈴木
博, 山地幸雄. 1987. 東京蒲田地区のインフルエンザ流行で観察された前駆波
現象について-疫学的考察とウイルス学的解析の試み-. *臨床とウイルス*. 15:
361-368.
63. 沼崎義夫, 大島武子, 近江彰, 田中明, 大泉良文, 小松茂夫, 高木徳郎, 唐橋
実. 1986. わが国における小児急性気道感染症, 第1報 新たに開発されたマイ
クロプレート法によるウイルス分離. *感染症誌*. 60:840-848.
64. Numazaki, Y., Oshima, T., Ohmori, A., Tanaka, A., Ooizumi, Y., Komatu, S.,
Takagi, T., Karahasi, M., and Isida, N. 1987. A microplate method for
isolation of viruses from infants and children with acute respira-
tory infections. *Microbiol. Immunol.* 31:1085-1095.
65. 根路銘国昭. MDCK細胞を用いてのインフルエンザウイルスのブラック形成法
及びブラック中和法の解説と手技. 1976. 細菌製剤協会. P.12-19
66. 根路銘国昭. 1978. 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*. 特集第35号:111-123.
67. 根路銘国昭. 1980. インフルエンザウイルスの新しい命名法とノイラミニダー
ゼ抗原の分析法. *臨床とウイルス*. 8:12-17.

68. Olive, P.L., Hilton, J., and Durand, R.E. 1986. DNA conformation of chinese hamster V79 cells and sensitivity to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 107:115-124.
69. Ong, S.B., Lam, K.L., and Lam, S.K. 1982. Viral agents of acute respiratory infections in young children in Kuala Lumpur. *Bull. W.H.O.* 60:137-140.
70. Palese, P., and Schulman, J.L. 1976. Differences in RNA patterns of influenza A virus. *J. Viol.* 17 :876-884.
71. Popow-Kraupp, T., Kunz, C., and Huber, E. 1984. Respiratory virus infection in hospitalized children in Austria 1979-1982. Diagnosis by immunofluorescence. *Infection* 12:185-189.
72. Ray, C.G., and Minnich, L.L. 1987. Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.* 25: 355-357
73. Raymond, F.L., Caton, A.J., Cox, N.J., Kendal, A.P., and Brownlee, G.C. 1986. The antigenicity and evolution of influenza H1 haemagglutinin, from 1950-1957 and 1977-1983: two pathways from one gene. *Virology* 148: 275-287.
74. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467.
75. Schild, G.C., Oxford, J.S., Dowdle, W.R., Coleman, M.T., Pereira, M.S., and Chakraverty, P. 1974. Antigenic variation in current influenza A

viruses. Evidence for a high frequency of antigenic drift in the Hong Kong virus. Bull.W.H.O. 51.I.

76. Schmidt, N.J., Ota, M., Gallo, D., and Fox, V.L. 1982. Monoclonal antibodies for rapid, strain-specific identification of influenza virus isolates. J.Clin.Microbiol.16:736-765.
77. Shalit, I., McKee, P.A., Beauchamp, H., and Waner, J.L. 1985. Comparison of polyclonal antiserum versus monoclonal antibodies for the rapid diagnosis of influenza A virus infections by immunofluorescence in clinical specimens. J.Clin.Microbiol.22:877-879.
78. Shortridge, K.F., and Stuart-Harris, C.H. 1982. An influenza epicenter?. Lancet 2:812-813.
79. Smith, W., Andrewes, C.H., and Laidlaw, P.P. 1933. A virus obtained from influenza patients. Lancet 2:66-68.
80. Stevens, D.J., Douglas, A.R., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. 1987. Antigenic and amino acid sequence analysis of the variants of H1N1 influenza virus in 1986. Bull.W.H.O.65:177-180.
81. スチュワートハリス.C.H., シルド.G.C., 1978. インフルエンザ. 講談社.
P.67-79.
82. 杉浦昭. 1987. これからの予防接種, インフルエンザ対策. 臨床とウイルス. 15
:124-128.
83. Sutmoller, F., Nascimento, J.P., Chaves, J.R.S., Ferreira, V., and Pereira, M.S. 1983. Viral etiology of acute respiratory diseases in Rio de

Janeiro:First two years of longitudinal study. Bull.W.H.O. 61:845-852.

- 84.高橋修和,薩田清明.1984.高齢者のインフルエンザHI抗体保有状況並びにワクチン接種によるHI抗体産生についての検討.感染症誌.58:1177-1185.
- 85.高橋修和,三木康,小沢茂,佐藤譲,武内安恵.1977.インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ測定法について.臨床とウイルス.5:301-306.
- 86.高橋修和,三木康,小沢茂,佐藤譲,渡辺由香里.1984.インフルエンザ流行時の高齢者の死亡についての疫学的解析.感染症誌.58:764-772.
- 87.Takeuchi,Y., Nakamura,K.,Nakayama,M., Kupradinunt,S., Nishikawa,F., Suzuki,H.,Takahasi,M.,Yamazi,Y.,Takahasi,K.,Pongprote,B.,Suprasert,S., Supawadee,J., Vithayasai,V., and Damrongsak,D. 1989.Isolation of influenza virus in Thailand in the rainy seasons of 1986, 1987 and 1988.J.Nippon Med.Sch.56:201-203.
- 88.Taya,M.,Mano,T.,and Kobayashi,T.1986. Kinetic expression for human cell growth in a suspension culture system.J.Ferment Technol.64:347-350.
- 89.Taya,M.,Mano,T.,and Kobayashi,T.1986. Control of environmental factors in animal cell suspension culture system. Bioeng. Bioreact. Design.1:942-944.
- 90.Tobita,K. 1975. Permanent canine kidney (MDCK) cells for isolation and plaque assay of influenza B viruses. Med.Microbiol.Immunol.162:23-27.
- 91.Tobita,K.,Sugiura,A.,Enomoto,C., and Furuyama,M. 1975. 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.

92. University of Western Australia. 1988. Virus information exchange newsletter, for south-east Asia and the western Pacific. 5:33.

93. University of Western Australia. 1989. Virus information exchange newsletter, for south-east Asia and the western Pacific. 6:38.

94. Verhoeyen, M., Fang, R., Min Jou, W., Davos, R., Huylebroeck, D., Saman, E., and Fiers, W. 1980. Antigenic drift between the haemagglutinin of the Hong Kong influenza strains A/Aichi/2/68 and A/Victoria/3/75. Nature (Lond.) 286:771-776.

95. Walls, H.H., Harmon, M.W., Slagle, J.J., Stoksdale, C., and Kendal, A.P. 1986. Characterization and evaluation of monoclonal antibodies developed for typing influenza A and influenza B viruses. J. Clin. Microbiol. 23:240-245.

96. Winter, G., Fields, S., and Brownlee, G.G. 1981. Nucleotide sequence of the haemagglutinin gene of a human influenza virus H1 subtype. Nature. (Lond.) 292:72-75.

97. Wu, X.X., Tang, E.H., Gu, S.W., Liu, S.Q., Xie, G.Z., Liu, Y.Q., She, W.B., Zhou, C.F., Jian, M., and Liao, Y.Z. 1983. Viral isolations and serological survey on common cold and chronic bronchitis in Kunming [People's Rep. of China] from 1972-1975. Chin. J. Microbiol. Immunol. 3:80-83.

98. 山岸郭郎, 神田誠, 長峯隆, 五十嵐義晃, 吉岡勇雄, 松本稔. 1979. ブタ腎由来株

化細胞のインフルエンザウイルスに対する感受性.第53回日本感染症学会総
会学術講演会抄録.15.

99. Yamazi, Y., Shimizu, Y., Takeuchi, Y., Satsuta, K., Takahasi, M., Yoshikawa, I., Nagata, M., Panasampol, K., Vithayasai, V., Supawadee, J., Pongprote, B., Suprasert, S., Damronsak, D., Tuchinda, P., Bukkavesa, S., Thongcharoen, P., and Chatiyanda, K. 1983. Influenza virus isolated in Thailand and Manila during the period of August, 1979-August, 1981. 感染症誌. 57:46-52.
100. 山地幸雄, 鈴木博, 武内安恵, 薩田清明. 1985. 1977年以来のタイ国におけるインフルエンザ流行ウイルスについて - 日本の流行との関連 -. インフルエンザワクチン研究会, 第24回討論会記録:73-81.
101. Yamazi, Y., Suzuki, H., Watari, E., Takeuchi, Y., Ohya, A., Satsuta, K., Yunoki, A., Supawadee, J., Chatiyanda, K., and Thongcharoen, P. 1984. Analysis by monoclonal antibodies of H3N2 subtype of influenza A viruses in Japan and Southeast Asia during 1980-1982. 感染症誌. 58:113-120.
102. 柳沢謙. 1987. 微生物検査必携ウイルス・リケッチア検査. 日本公衆衛生協会. P.186
103. Zeman, E.M., Brown, J.M., Lemmon, M.J., Hirst, V.K., and Lee, W. W. 1986. A new bioreductive agent with high selective toxicity for hypoxic mammalian cells. Int.J.Radiation Oncol. Biol.Phys.12:1239-1242.

表 1. MDCK浮遊細胞培養液の組成

1) MEM Joklik浮遊培養液	770 ml
2) トリアブトース燐酸ブロス液(29.5mg/ml)	100 ml
3) 新生仔牛血清	100 ml
4) 3%メチルセルローズ液(30mg/ml)	30 ml

表 4. 第2次重層用寒天培地の組成

1) 蒸留水	20.0 ml
2) ブラック形成用培地	100.0 ml
3) 1%中性紅	0.6 ml

45°Cの恒温槽に入れ温めてから、蒸留水で調製した2%寒天液80.0mlを加える。

表 2. ブラック形成用培地の組成

1) Eagle's MEM	9.3 ml
2) 7.5% NaHCO ₃	30.0 ml
3) L-グルタミン(30mg/ml)	10.0 ml
4) ビタミン液(100x)	1.0 ml
5) 葉酸(1mg/ml)	1.0 ml
6) ビオチン(1mg/ml)	1.0 ml
7) 牛血清アルブミン(100mg/ml)	20.0 ml
8) ファンギゾン(250μg/ml)	5.0 ml
9) 蒸留水	434.0 ml

表 5. 検体接種後の細胞維持液の組成

1) Eagle's MEM	9.3 g
2) 蒸留水	932.5 ml
3) L-グルタミン(30 mg/ml)	30.0 ml
4) ビタミン液(100x)	3.0 ml
5) 葉酸(1 mg/ml)	1.0 ml
6) ビオチン(1 mg/ml)	1.0 ml
7) 牛血清アルブミン(100mg/ml)	20.0 ml
8) トリアブシン(10000 NFU/ml)	1.0 ml

7.5% NaHCO₃でPH修正

表 3. 重層用寒天培地の組成

1) 蒸留水	15.6 ml
2) ブラック形成用培地	100.0 ml
3) 10% グルコース	2.0 ml
4) 1% DEAE-デキストラン	2.0 ml
5) トリアブシン(10000 NFU/ml)	0.1 ml

45°Cの恒温槽に入れ温めてから、蒸留水で調製した2%寒天液80.0mlを加える。

表6. 塩基配列の解析に用いたインフルエンザウイルス

A(H1N1)型ウイルス

株名	分離月	継代歴
A/山形/120/86	4	発育鶏卵8代, MDCK2代
A/長野/238/86	4	MDCK5代
A/東京/770/86	4	発育鶏卵4代, MDCK4代
A/長野/38/86	12	MDCK4代
A/長野/174/87	3	MDCK3代
A/長野/1396/88	5	MDCK3代
A/長野/1605/88	12	MDCK4代
A/広島/C21/88	12	発育鶏卵2代, MDCK2代
A/長野/1669/89	1	MDCK4代

A(H3N2)型ウイルス

株名	分離月	継代歴
A/四川/2/87	4	発育鶏卵10代, MDCK2代
A/長野/1046/87	5	LLC-MK2 2代, MDCK3代
A/蒲田/421/87	11	MK1代, MDCK4代
A/東京/1276/87	12	発育鶏卵10代, MDCK2代
A/千葉/38/88	1	MDCK4代
A/長野/1185/88	2	MDCK5代
A/長野/184/88	2	MDCK5代
A/神戸/768/88	2	MDCK5代
A/蒲田/612/88	7	MK2代, MDCK4代
A/Chiang Mai/156/88	8	MDCK4代
A/神奈川/107/88	8	MDCK7代
A/愛知/1/89	1	MDCK4代
A/蒲田/13/89	1	MK1代, MDCK3代
A/長野/1749/89	3	MDCK4代
A/蒲田/248/89	5	MDCK4代

表7. MDCK浮遊培養細胞のインフルエンザウイルス分離への応用を目的として、使用ウイルス濃度を定めるために測定した、1983年冬期のインフルエンザ患者咽頭ぬぐい液中のインフルエンザウイルス濃度

No.	ウイルス濃度(PFU/ml)
1	5.5×10^3
2	1.0×10^4
3	3.5×10^2
4	3.0×10^3
5	1.5×10^4
6	1.0×10^3
7	2.5×10^2
8	3.0×10^2
9	4.5×10^2
10	8.5×10^3
平均値	4.4×10^3

表8. インフルエンザウイルス標準株を接種した濃度別MDCK浮遊培養細胞のHA産生

A/熊本/37/79(H1N1)

No.	細胞濃度(cells/ml)	接種後5日間のHA価				
		1	2	3	4	5
1	2.2×10^7	<4	<4	<4	<4	<4
2	1.1×10^7	<4	<4	<4	8	16
3	5.5×10^6	<4	16	128	256	256
4	2.8×10^6	<4	8	64	256	256
5	1.4×10^6	<4	8	8	128	128
6	7.0×10^5	<4	4	16	128	64
7	3.5×10^5	<4	<4	8	8	64
8	1.8×10^5	<4	<4	<4	<4	<4

A/Bangkok/1/79(H3N2)

No.	細胞濃度(cells/ml)	接種後5日間のHA価				
		1	2	3	4	5
1	2.2×10^7	<4	<4	<4	<4	<4
2	1.1×10^7	<4	<4	8	128	256
3	5.5×10^6	<4	64	256	512	512
4	2.8×10^6	<4	32	128	256	256
5	1.4×10^6	<4	64	64	128	256
6	7.0×10^5	<4	16	32	64	64
7	3.5×10^5	<4	<4	4	8	8
8	1.8×10^5	<4	<4	<4	<4	<4

B/Singapore/222/79

No.	細胞濃度(cells/ml)	接種後5日間のHA価				
		1	2	3	4	5
1	2.2×10^7	<4	<4	<4	<4	<4
2	1.1×10^7	<4	<4	16	256	256
3	5.5×10^6	<4	64	256	512	512
4	2.8×10^6	<4	32	256	256	512
5	1.4×10^6	<4	16	128	128	128
6	7.0×10^5	<4	8	32	64	64
7	3.5×10^5	<4	4	8	16	16
8	1.8×10^5	<4	<4	<4	<4	<4

表9. MDCK浮遊培養細胞および単層培養細胞によるインフルエンザ様患者からの
インフルエンザウイルス分離成績

	MDCK単層培養細胞		計
	(+)	(-)	
MDCK浮遊培養細胞	105	7	112(69.6%)
	4	45	49
計	109(67.7%)	52	161

表 10. ESK浮遊培養細胞のインフルエンザウイルス分離への応用を目的として、使用ウイルス濃度を定めるために測定した、1981年冬期のインフルエンザ患者咽頭ぬぐい液中のインフルエンザウイルス濃度

No.	ウイルス濃度(PFU/ml)
M-119	5.0×10
M-120	2.2×10^3
M-121	1.5×10^4
M-122	2.5×10^3
M-123	2.5×10^2
M-124	1.5×10^3
M-125	2.5×10^2
M-126	9.0×10^3
M-127	1.5×10^4
M-128	1.0×10^2
平均値	4.6×10^3

表11. インフルエンザウイルス標準株を接種した濃度別ESK浮遊培養細胞のHA産生

A/USSR/92/77(H1N1)

No.	細胞濃度(cells/ml)	接種後7日間のHA価						
		1	2	3	4	5	6	7
1	2.4×10^7	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
2	1.2×10^7	<4	<4	<4	8	64	64	64
3	6.0×10^6	<4	32	128	256	256	256	256
4	3.0×10^6	<4	32	32	128	128	128	128
5	1.5×10^6	<4	16	16	32	32	32	32
6	7.5×10^5	<4	8	8	8	16	16	16
7	3.8×10^5	<4	4	4	8	8	4	8
8	1.9×10^5	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4

A/東京/1/77(H3N2)

No.	細胞濃度(cells/ml)	接種後7日間のHA価						
		1	2	3	4	5	6	7
1	2.4×10^7	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
2	1.2×10^7	<4	4	4	128	256	256	256
3	6.0×10^6	<4	64	128	512	512	256	512
4	3.0×10^6	<4	64	128	128	128	128	128
5	1.5×10^6	<4	32	32	64	64	64	64
6	7.5×10^5	<4	16	32	16	32	32	32
7	3.8×10^5	<4	8	8	8	8	8	8
8	1.9×10^5	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4

B/神奈川/3/76

No.	細胞濃度(cells/ml)	接種後7日間のHA価						
		1	2	3	4	5	6	7
1	2.4×10^7	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
2	1.2×10^7	<4	<4	8	256	128	256	256
3	6.0×10^6	<4	16	128	512	512	512	512
4	3.0×10^6	<4	16	64	256	512	256	256
5	1.5×10^6	<4	32	64	64	64	64	64
6	7.5×10^5	<4	4	8	32	32	32	32
7	3.8×10^5	<4	<4	4	16	16	16	16
8	1.9×10^5	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4

表12. ESK浮遊培養細胞, ESK単層培養細胞およびMDCK単層培養細胞によるインフルエンザ様患者からのインフルエンザウイルス分離成績(1982年)

	ESK浮遊培養細胞		計
	(+)	(-)	
MDCK単層培養細胞 (+)	68	0	68(51.9%)
MDCK単層培養細胞 (-)	7	56	63
計	75(57.3%)	56	131
	ESK単層培養細胞		計
	(+)	(-)	
MDCK単層培養細胞 (+)	65	3	68(51.9%)
MDCK単層培養細胞 (-)	5	58	63
計	70(53.4%)	61	131

表13. ESK浮遊培養細胞, ESK単層培養細胞およびMDCK単層培養細胞によるインフルエンザ様患者からのインフルエンザウイルス分離成績(1983年)

	ESK浮遊培養細胞		計
	(+)	(-)	
MDCK単層培養細胞 (+)	135	2	137(68.5%)
MDCK単層培養細胞 (-)	6	57	63
計	141(70.5%)	59	200
	ESK単層培養細胞		計
	(+)	(-)	
MDCK単層培養細胞 (+)	133	4	137(68.5%)
MDCK単層培養細胞 (-)	5	58	63
計	138(69.0%)	62	200

表 1 4. MDCK凍結保存細胞および単層培養細胞によるインフルエンザ様患者からの
インフルエンザウイルス分離成績

	MDCK凍結保存細胞		計
	(+)	(-)	
(+)	130	7	137(68.5%)
(-)	6	57	63
MDCK単層培養細胞			
計	136(68.0%)	64	200

表15.初代培養で分離されたインフルエンザウイルスの流行年毎毎のモルモット赤血球とニワトリ赤血球に対するHA価

流行ウイルス	流行年	ウイルス株数	赤血球	HA価別のウイルス株数									
				<4	4	8	16	32	64	128	256	≥512	
A(H1N1)型 インフルエンザウイルス	1981	71	モルモット		2	10	23	26	8	2			
			ニワトリ	36	17	6	8	2	2				
	1984	71	モルモット		3	10	19	24	12	3			
			ニワトリ	34	18	10	8	1					
	1986	20	モルモット		1	1	2	2	3	4	4	3	
		ニワトリ	9	1	3	3	1	2	1				
A(H3N2)型 インフルエンザウイルス	小計	162	モルモット		4	13	31	49	41	15	6	3	
			ニワトリ	79	36	19	19	4	4	1			
	1981	14	モルモット		1	4	2	5	1	1			
			ニワトリ	1	1	1	1	3	2	5			
	1983	69	モルモット		1	5	22	20	11	8	2		
		ニワトリ			7	29	15	9	7	2			
B型 インフルエンザウイルス	1985	50	モルモット		2	3	14	13	14	4			
			ニワトリ		2	5	7	10	15	10	1		
	小計	133	モルモット		1	8	29	36	29	23	7		
			ニワトリ	1	1	3	13	36	28	26	22	3	
	1981	24	モルモット			2	6	5	10	1			
		ニワトリ		2	5	1	5	6	4	1			
B型 インフルエンザウイルス	1982	51	モルモット		2	6	20	10	9	4			
			ニワトリ		1	4	14	11	11	8	2		
	1985	50	モルモット		1	2	3	10	8	15	11		
			ニワトリ		2	3	6	9	13	11	6		
	小計	125	モルモット		1	6	15	35	28	25	15		
		ニワトリ		2	8	8	25	26	28	20	8		
合計	420	モルモット		4	15	45	93	112	72	54	25		
		ニワトリ	80	39	30	40	65	58	55	42	11		

表16.1980年2月に採取した20名のインフルエンザ様患者からの、HA活性を指標としたインフルエンザウイルス分離成績

	初代培養		2代培養	
	Mono.*	Susp.**	Mono.	Susp.
LLC-MK2細胞	12/20	10/20	1/8	1/10
MDCK細胞	14/20	9/20	0/6	2/11
発育鶏卵	12/20		0/8	

*:単層培養細胞

** :細胞浮遊液

表17.2代継代後もウイルスが分離されなかった検体のウイルス量と培養後のHA活性およびNA活性

No.	ウイルス量 (PFU/ml)	初代培養		2代培養	
		HA活性	NA活性	HA活性	NA活性
1	5.0x10	<4	0.007	<4	0.022
2	5.0	<4	0.016	<4	0.001
3	5.0	<4	0.010	<4	0.005
4*	<1.0	<4	0.006	<4	0.005

*:ウイルス量 <1.0PFU/ml の検体のHA活性およびNA活性はそれぞれのべ30検体の平均値

表18.2代継代することによりHA活性陽性となった検体のウイルス量と培養後のHA活性およびNA活性

No.	ウイルス量 (PFU/ml)	初代培養		2代培養	
		HA活性	NA活性	HA活性	NA活性
1	2.0x10 ²	<4	0.098	128	1.275
2	5.0x10	<4	0.076	16	0.337
3	5.0	<4	0.051	128	1.365
4	5.0	<4	0.082	32	0.669

表19. インフルエンザ様患者からのウイルス分離成績(1986.1-1987.7)

分離ウイルス	1986年												1987年					合計	
	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月		6月
Influenza virus				9	11							40	114	23	5		1		202
A(H1N1)型																			
A(H3N2)型	17	2														3	1	2	20
Parainfluenza virus									1	1	1								9
1型																			
B-1型			1				2	1											4
2									3										3
ECHO virus							1	1	2	11	5	1							21
7型																			
Adeno virus	1												1					1	4
1型	1																		
2			1		1	2						1			1			1	8
3									2					1				1	4
5			3	2						1									6
6									1										1
Herpes simplex virus				2	4			2	1	1	1							1	13
1型																			
分離数	19	5	6	13	12	3	4	3	5	17	7	43	115	24	5	4	6	4	295
検体数	51	47	26	32	48	21	5	3	14	37	41	100	163	78	30	29	44	21	790

表20.インフルエンザ様患者からのウイルス分離成績(1987.7-1988.6)

分離ウイルス	1987年												1988年						合計
	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月							
Influenza virus A(H1N1)型 A(H3N2)型 B型							4	23	63	16	14	3	1	1	123				
								53	116	10	3	2	2	2	182				
						1									7				
Parainfluenza virus						1									1				
	1										2	1			4				
Coxsackie virus B-3型 4 5		1	1	5	2										9				
		1	1	1											2				
			1												1				
ECHO virus								2							5				
Adeno virus							2								3				
							1				1				2				
		1	1	8	8	4	1				1	1			24				
											1	2			3				
							1								1				
														1	1				
Herpes simplex virus 1型													1		1				
分離数	2	2	4	13	10	5	9	78	179	29	25	13			369				
検体数	9	5	18	22	29	48	60	146	228	107	68	54			794				

表21.インフルエンザ様患者からのウイルス分離成績(1988.7-1989.7)

分離ウイルス	1988年												1989年					合計
	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月					
Influenza virus					1	81	38	8									128	
A(H1N1)型																	1	
A(H3N2)型																1	1	
B型															1		1	
Parainfluenza virus	1							7									11	
1型															2		2	
2型															5		10	
3型	2				1													
Coxsackie virus					1	3											8	
B-4型															1	1	4	
5型																	4	
ECHO virus				5	2												7	
6型																	1	
14型																	1	
18型	19	4	2														25	
Adeno virus	1		1	1		1											7	
1型																	4	
2型																	12	
3型					1	2	3	4	2								3	
5型		2															1	
6型																	1	
Herpes simplex virus																	1	
1型																	1	
分離数	23	2	6	8	6	88	41	19	6	11	8	3	5				226	
検体数	35	15	42	45	53	147	109	52	62	52	46	34	17				709	

表22. 1986年タイ国チェンマイのインフルエンザ'様患者からのウイルス分離成績

分離ウイルス	チェンマイ大学付属病院			Lampang 病院	Lamphun 病院	計
	小児科	内科	学生クリニック			
インフルエンザA(H1N1)型		1	1			3
インフルエンザ'ウイルス	3					3
インフルエンザ'ウイルス	1		1			2
エコーウイルス	1		2			3
アデ'ウイルス	1			1		3
単純ヘル'スウイルス	1					1
未同定	1					1
分離数/検体数	7/33	2/10	4/24	1/10	1/7	15/84

表23. 1987年タイ国チェンマイのインフルエンザ'様患者からのウイルス分離成績

分離ウイルス	チェンマイ大学付属病院			Wing Pa-pao*	計
	小児科	内科	学生クリニック		
インフルエンザ'ウイルスA(H1N1)型	4	1			5
インフルエンザ'ウイルス	7	1			8
インフルエンザ'ウイルス	1			3	4
インフルエンザ'ウイルス	2		1	2	5
ココサッキ-ウイルス	1				1
アデ'ウイルス	1				1
2	1				1
6	1				1
7	1				1
単純ヘル'スウイルス	2				2
分離数/検体数	20/90	2/12	1/12	5/30	28/144

*: 山岳民族Mong族の集落

表24. 1988年タイ国フェンマイのインフルエンザ様患者

からのウイルス分離成績

分離ウイルス	フェンマイ大学付属病院 小児科
インフルエンザウイルスA(H3N2)型	51
ハラインフルエンザウイルス 3型	2
コクサッキーウイルス B5型	1
エコーウイルス 6型	4
	18
アデノウイルス 2型	4
	3
	5
	8
単純ヘルペスウイルス 1型	3
未同定ウイルス(エンテロウイルス様)	19
分離数/検体数	95/200

表25. 1989年タイ国フェンマイのインフルエンザ様患者

からのウイルス分離成績

分離ウイルス	フェンマイ大学付属病院 小児科
インフルエンザウイルス A(H1N1)型	36
インフルエンザウイルス A(H3N2)型	21
インフルエンザウイルス B型	10
コクサッキーウイルス B2型	2
アデノウイルス 2型	1
単純ヘルペスウイルス 1型	1
未同定ウイルス(エンテロウイルス様)	2
分離数/検体数	73/132

表26. インフルエンザウイルス分離成績とワクチン接種状況(1986.12~1987.2)

旭町医院 (須崎市、内科) 1986.12.24-1987.2.12 松岡医院 (松本市、小児科) 1986.12.15-1987.2.23

年齢	旭町医院 (須崎市、内科) 1986.12.24-1987.2.12				松岡医院 (松本市、小児科) 1986.12.15-1987.2.23				合計			
	検体数	分離数	分離率	ワクチン接種数	ワクチン接種率	検体数	分離数	分離率	ワクチン接種数	ワクチン接種率	分離率	ワクチン接種率
0-4	21	11	52.4%	1	4.8%	1	1	100.0%	0	0.0%	54.5%	4.5%
5-9	27	16	59.3	16	59.3	50	32	64.0	28	56.0	62.3	57.1
10-14	27	20	74.1	18	66.7	41	22	53.7	26	64.3	61.8	64.7
15-19	12	8	66.7	1	8.7	23	19	82.6	4	17.4	77.1	14.3
20-29	21	18	85.7	0	0.0	2	1	50.0	0	0.0	82.6	0.0
30-39	25	16	64.0	0	0.0	3	2	66.7	0	0.0	64.3	0.0
40-49	7	5	71.4	0	0.0						71.4	0.0
50-59	4	1	25.0	0	0.0						25.0	0.0
60-	7	5	71.4	0	0.0						71.4	0.0
合計	151	100	66.2	36	23.8	120	77	64.2	58	48.3	65.3	34.7

表27. インフルエンザウイルス分離成績とワクチン接種状況(1988.2~4)

旭町医院 (須坂市, 内科) 1988.2.16-4.14

松岡医院 (松本市, 小児科) 1988.2.1-4.25

年齢	旭町医院 (須坂市, 内科) 1988.2.16-4.14				松岡医院 (松本市, 小児科) 1988.2.1-4.25				合計							
	検体数	分離数	分離率	ワクチン接種数	ワクチン接種率	検体数	分離数	分離率	ワクチン接種数	ワクチン接種率	分離率	ワクチン接種率				
0-4	32	19	59.4%	9	10	4	12.5%	26	17	65.4%	7	10	5	19.2%	62.1%	15.5%
5-9	38	29	76.3	13	16	16	42.1	141	93	66.0	23	70	73	51.8	68.2	49.7
10-14	20	17	85.0	5	12	10	50.0	57	38	66.7	12	26	39	68.4	71.4	63.3
15-19	11	8	72.7	1	7	2	18.2	5	3	60.0	1	2	2	40.0	68.8	25.0
20-29	14	11	78.6	5	6	2	14.3	4	3	75.0	3	0	0	0.0	77.8	11.1
30-39	16	8	50.0	5	3	1	6.3	2	1	50.0	0	1	0	0.0	50.0	5.6
40-49	14	6	42.9	2	4	1	7.1								42.9	7.1
50-59	15	10	66.7	6	4	1	6.7								66.7	6.7
60-	35	21	60.0	12	9	0	0.0								60.0	0.0
合計	195	129	65.6	58	71	37	19.0	235	155	66.0	46	109	119	50.6	66.0	36.3

表28. インフルエンザウイルス分離成績とワクチン接種状況(1988.12~1989.2)

旭町医院 (須坂市、内科) 1988.12.5-1989.2.1 松岡医院 (松本市、小児科) 1988.12.6-1989.1.31

年齢	旭町医院 (須坂市、内科) 1988.12.5-1989.2.1				松岡医院 (松本市、小児科) 1988.12.6-1989.1.31				合計			
	検体数	分離数	分離率	ワクチン接種数	ワクチン接種率	検体数	分離数	分離率	ワクチン接種数	ワクチン接種率	分離率	ワクチン接種率
0-4	14	8	57.1%	1	7.1%	6	4	66.7%	0	0.0%	60.0%	5.0%
5-9	20	6	30.0	6	30.0	21	13	61.9	8	38.1	46.3	34.1
10-14	15	5	33.3	6	40.0	29	23	79.3	18	62.1	63.6	54.5
15-19	16	14	87.5	0	0.0	16	14	87.5	1	6.3	87.5	3.1
20-29	17	8	47.1	3	17.6	4	3	75.0	0	0.0	52.4	14.3
30-39	17	11	64.7	0	0.0	3	0	0.0	0	0.0	55.0	0.0
40-49	10	6	60.0	0	0.0						60.0	0.0
50-59	13	4	30.8	0	0.0						30.8	0.0
60-	15	4	26.7	1	6.7						26.7	6.7
合計	137	66	48.2	17	12.4	79	57	72.2	27	34.2	56.9	20.4

表29. 1986年インフルエンザワクチン株および1986年4月分離株に対する年齢群別の抗体検査成績

A/Bangkok/10/83(H1N1)

年齢	検体数	保有者数	抗体価												
			保有率(%)					<32	32	64	128	256	512	1024	≥2048
0-4	22	6	27.3	16	2	2	3	3	3	1	1	1	1	1	2
5-9	28	21	75.0	7	2	2	5	3	3	4	5	5	2		
10-14	30	29	96.7	1	1	1	2	3	7	9	7	7			
15-19	32	32	100.0	3	2	10	11	4	4	1					
20-29	24	17	70.8	7	1	2	4	6	4	4	2				
30-39	25	22	88.0	3	3	4	5	5	3	2	2				
40-49	26	24	92.3	2	4	4	8	2	4	2					
50-59	22	15	68.2	7	2	7	4	1	1	1					
60以上	25	19	76.0	6	4	5	3	5	1	1					
合計	234	185	79.1	49	20	27	37	39	38	21	3				

A/山形/120/86(H1N1)

年齢	検体数	保有者数	抗体価												
			保有率(%)					<32	32	64	128	256	512	1024	≥2048
0-4	22	5	22.7	17	1	1	2	1	2	1					
5-9	28	19	67.9	9	4	5	3	3	3	2	2				
10-14	30	25	83.3	5	4	11	7	2	1						
15-19	32	28	87.5	4	6	9	9	3	3					1	
20-29	24	9	37.5	15	8			1							
30-39	25	21	84.0	4	11	5	3	1	1	1					
40-49	26	16	61.5	10	6	6	2	2	2						
50-59	22	14	63.6	8	7	2	2	2	2	1					
60以上	25	15	60.0	10	4	3	5	1	1	1					
合計	234	152	65.0	82	51	42	33	16	4	5	1				

A/福岡/C29/85(H3N2)

年齢	検体数	保有者数	抗体価												
			保有率(%)					<32	32	64	128	256	512	1024	≥2048
0-4	22	10	45.5	12	1	1	3	1	4	1					
5-9	28	27	96.4	1	1	5	6	6	9						
10-14	30	29	96.7	1	2	5	10	11						1	
15-19	32	31	96.9	1	1	5	12	7	4	2					
20-29	24	19	79.2	5	3	5	5	5	3	1					
30-39	25	21	84.0	4	5	4	5	9	3						
40-49	26	23	88.5	3	6	5	9	3							
50-59	22	14	63.6	8	6	4	1	3							
60以上	25	15	60.0	10	4	3	5	1	1	1					
合計	234	189	80.8	45	27	33	51	39	32	3	4				

B/茨城/2/85

年齢	検体数	保有者数	抗体価												
			保有率(%)					<32	32	64	128	256	512	1024	≥2048
0-4	22	8	36.4	14	3	3	1	1	3						
5-9	28	22	78.6	6	7	6	2	5	1	1					
10-14	30	26	86.7	4	2	7	12	4	1	1					
15-19	32	31	96.9	1	2	8	11	7	1	2					
20-29	24	20	83.3	4	1	8	5	5	1						
30-39	25	12	48.0	13	5	5	1	1							
40-49	26	12	46.2	14	9	2	1	1							
50-59	22	9	40.9	13	4	3	1	1							
60以上	25	16	64.0	9	2	4	3	5	1						1
合計	234	156	66.7	78	33	39	31	40	8	4	1				

A/長野/223/86(H1N1)

年齢	検体数	保有者数	抗体価												
			保有率(%)					<32	32	64	128	256	512	1024	≥2048
0-4	22	4	18.2	18	2	1	1								
5-9	28	19	67.9	9	7	5	4	2	1						
10-14	30	22	73.3	8	9	8	3	2	1						
15-19	32	25	78.1	7	8	13	2	1						1	
20-29	24	6	25.0	18	5	5	7	1							
30-39	25	13	52.0	12	5	7									
40-49	26	15	57.7	11	7	7	7	1	1						
50-59	22	9	40.9	13	4	2	1	1	1						
60以上	25	13	52.0	12	3	7									
合計	234	126	53.8	108	50	50	12	9	4	1					

表30. 1987年インフルエンザワクチン株および1987年5月分離株に対する年齢群別の抗体検査成績

A/山形/120/86(H1N1)

年齢群	検体数	保有者数	HI抗体価							
			<32	32	64	128	256	512	1024 ≥2048	
0-4	25	13	12	0	0	1	1	7	4	0
5-9	24	21	3	0	1	2	7	6	3	2
10-14	25	24	1	1	0	8	8	6	1	0
15-19	26	24	2	4	4	3	5	6	2	0
20-29	25	19	6	7	3	4	3	2	0	0
30-39	25	19	6	3	6	6	1	1	2	0
40-49	26	21	5	7	4	3	2	5	0	0
50-59	24	18	6	4	3	6	3	0	2	0
60-	25	10	15	5	1	2	1	1	0	0
合計	225	169	56	31	22	35	31	34	14	2

B/茨城/1/87

年齢群	検体数	保有者数	HI抗体価							
			<32	32	64	128	256	512	1024 ≥2048	
0-4	25	3	22	2	1	0	0	0	0	0
5-9	24	12	12	5	3	4	0	0	0	0
10-14	25	21	8	10	5	4	0	2	0	0
15-19	26	18	8	4	4	8	1	1	0	0
20-29	25	8	17	5	1	1	1	0	0	0
30-39	25	4	21	2	2	0	0	0	0	0
40-49	26	3	23	2	1	0	0	0	0	0
50-59	24	6	18	2	2	0	2	0	0	0
60-	25	9	16	5	4	0	0	0	0	0
合計	225	84	141	37	23	17	4	3	0	0

A/福岡/029/85(H3N2)

年齢群	検体数	保有者数	HI抗体価							
			<32	32	64	128	256	512	1024 ≥2048	
0-4	25	16	9	1	2	5	3	4	1	0
5-9	24	24	0	1	0	3	8	8	3	1
10-14	25	25	0	2	5	2	8	5	3	0
15-19	26	25	1	7	7	7	3	1	0	0
20-29	25	16	9	8	2	2	3	0	1	0
30-39	25	18	7	5	3	2	1	0	0	0
40-49	26	20	6	7	9	2	1	1	0	0
50-59	24	13	11	4	4	1	2	1	1	0
60-	25	14	11	4	4	5	1	0	0	0
合計	225	171	54	41	38	30	31	21	9	1

A/長野/1046/87(H3N2)

年齢群	検体数	保有者数	HI抗体価							
			<32	32	64	128	256	512	1024 ≥2048	
0-4	25	15	10	1	3	2	6	2	1	0
5-9	24	23	1	1	0	9	8	5	0	0
10-14	25	22	3	3	9	6	4	0	0	0
15-19	26	23	3	5	11	6	1	0	0	0
20-29	25	12	13	7	1	3	0	1	0	0
30-39	25	13	12	7	3	2	1	0	0	0
40-49	26	17	9	8	6	3	0	0	0	0
50-59	24	11	13	4	5	2	0	0	0	0
60-	25	13	12	3	4	5	1	0	0	0
合計	225	149	76	39	42	38	21	8	1	0

B/茨城/2/85

年齢群	検体数	保有者数	HI抗体価							
			<32	32	64	128	256	512	1024 ≥2048	
0-4	25	10	15	3	3	3	0	1	0	0
5-9	24	19	5	3	3	6	1	4	2	0
10-14	25	25	0	4	2	4	10	3	2	0
15-19	26	25	1	1	3	9	4	5	3	0
20-29	25	23	2	6	7	4	4	1	1	0
30-39	25	17	8	6	6	3	1	1	0	0
40-49	26	12	14	3	4	2	1	0	0	0
50-59	24	11	13	4	2	2	2	1	0	0
60-	25	16	9	2	9	3	2	0	0	0
合計	225	158	67	32	39	38	25	16	8	0

表31. 1988年インフルエンザワクチン株および1988年5月分離株に対する年齢群別の抗体検査成績

B/長崎/1/87

年齢群	検体数	保有者数	保有率 (%)				H I 抗体価			
			<32	32	64	128	256	512	1024	≥2048
0-4	22	6	27.3	16	4	2	0	0	0	0
5-9	25	19	76.0	6	9	5	3	2	0	0
10-14	22	21	95.5	1	6	2	9	3	1	0
15-19	28	19	67.9	9	6	8	2	2	0	1
20-29	25	10	40.0	15	9	1	0	0	0	0
30-39	25	7	28.0	18	5	2	0	0	0	0
40-49	25	2	8.0	23	1	0	0	1	0	0
50-59	25	3	12.0	22	2	1	0	0	0	0
60-	25	10	40.0	15	6	2	1	1	0	0
合計	222	97	43.7	125	48	23	15	9	1	0

A/山形/120/86(H1N1)

年齢群	検体数	保有者数	保有率 (%)				H I 抗体価			
			<32	32	64	128	256	512	1024	≥2048
0-4	22	15	68.2	7	7	0	1	4	3	0
5-9	25	23	92.0	2	3	2	6	6	4	2
10-14	22	21	95.5	1	0	1	3	7	6	4
15-19	28	27	96.4	1	2	8	8	7	2	0
20-29	25	20	80.0	5	5	7	4	3	1	0
30-39	25	19	76.0	6	8	3	4	3	1	0
40-49	25	19	76.0	6	9	5	2	0	2	1
50-59	25	17	68.0	8	6	5	3	3	0	0
60-	25	16	64.0	9	7	6	2	1	0	0
合計	222	177	79.7	45	47	37	33	34	19	7

A/長野/1396/88(H1N1)

年齢群	検体数	保有者数	保有率 (%)				H I 抗体価			
			<32	32	64	128	256	512	1024	≥2048
0-4	22	12	54.5	10	4	0	1	5	2	0
5-9	25	24	96.0	1	5	4	7	6	2	0
10-14	22	22	100.0	0	2	3	5	6	4	1
15-19	28	25	89.3	3	5	10	6	3	1	0
20-29	25	20	80.0	5	8	4	7	0	1	0
30-39	25	17	68.0	8	6	6	3	1	1	0
40-49	25	18	72.0	7	9	3	4	0	2	0
50-59	25	21	84.0	4	6	8	4	3	0	0
60-	25	21	84.0	4	11	6	3	1	0	0
合計	222	180	81.1	42	56	44	40	25	13	1

A/福岡/C29/85(H3N2)

年齢群	検体数	保有者数	保有率 (%)				H I 抗体価			
			<32	32	64	128	256	512	1024	≥2048
0-4	22	15	68.2	7	4	1	8	2	0	0
5-9	25	24	96.0	1	0	4	6	10	1	3
10-14	22	22	100.0	0	0	3	2	12	4	0
15-19	28	27	96.4	1	4	6	10	5	2	0
20-29	25	19	76.0	6	7	6	3	2	0	1
30-39	25	13	52.0	12	5	4	4	0	0	0
40-49	25	17	68.0	8	6	7	2	1	1	0
50-59	25	17	68.0	8	10	2	5	0	0	0
60-	25	20	80.0	5	6	9	3	2	0	0
合計	222	174	78.4	48	42	42	43	34	8	4

A/四川/1/87(H3N2)

年齢群	検体数	保有者数	保有率 (%)				H I 抗体価			
			<32	32	64	128	256	512	1024	≥2048
0-4	22	10	45.5	12	3	5	1	1	0	0
5-9	25	19	76.0	6	7	9	2	0	1	0
10-14	22	21	95.5	1	9	7	2	0	2	0
15-19	28	22	78.6	6	6	8	5	1	2	0
20-29	25	10	40.0	15	7	1	1	1	0	0
30-39	25	9	36.0	16	5	2	2	0	0	0
40-49	25	13	52.0	12	9	4	0	0	0	0
50-59	25	15	60.0	10	11	1	3	0	0	0
60-	25	13	52.0	12	10	2	0	1	0	0
合計	222	132	59.5	90	67	39	16	4	5	0

表32. 1986～87年に分離されたA(H1N1)型インフルエンザウイルスの抗原分析

抗原	抗 血 清		
	A/Brazil/11/78	A/Bangkok/10/83	A/山形/120/86
A/Brazil/11/78	1024	128	< 32
A/Bangkok/10/83	128	512	< 32
A/山形/120/86	64	32	4096
A/横浜/4/86	64	< 32	1024
A/長野/223/86(4月)	128	< 32	2048
A/長野/232/86(4月)	128	< 32	2048
A/長野/238/86(4月)	64	32	4096
A/長野/851/86	128	< 32	2048
A/長野/853/86	128	32	4096
A/長野/38/86	128	32	2048
A/長野/42/86	128	32	2048
A/長野/45/86	128	32	1024
A/長野/47/86	128	64	1024
A/長野/60/86	128	32	2048
A/長野/63/86	128	64	2048

表33. 1987～88年に分離されたAH3N2型インフルエンザウイルスの抗原分析表

抗原	抗 血 清		
	A/福岡/C29/85	A/大阪/156/87	A/京都/1/87
A/福岡/C29/85	1024	4096	512
A/大阪/156/87	256	4096	512
A/京都/1/87	< 32	128	256
A/四川/2/87	32	256	256
A/長野/1046/87(5月)	256	2048	512
A/長野/1151/88	128	2048	256
A/長野/1180/88	128	2048	256
A/長野/1185/88	256	2048	256
A/長野/1260/88	512	2048	1024
A/長野/1276/88	256	2048	512
A/長野/1401/88	128	4096	256
A/長野/1402/88	128	2048	256
A/長野/61/88	256	2048	512
A/長野/184/88	128	4096	512
A/長野/310/88	128	4096	1024
A/長野/317/88	512	4096	1024
A/長野/373/88	256	1024	256
A/長野/374/88	256	1024	256
A/長野/420/88	512	4096	1024

表34. 1987～88年に分離されたB型インフルエンザウイルスの抗原分析表

抗原	抗血清				
	B/茨城/2/85	B/長崎/1/87	B/長崎/3/87	B/Victoria/2/87	B/山形/16/88
B/茨城/2/85	2048	512	1024	32	<32
B/長崎/1/87	512	1024	512	256	<32
B/長崎/3/87	64	128	128	64	<32
B/Victoria/2/87	32	128	256	128	<32
B/山形/16/88	<32	32	32	32	1024
B/長野/111/88	32	64	128	32	<32
B/長野/117/88	64	64	256	64	<32
B/長野/134/88	64	64	128	32	<32
B/長野/118/88	32	32	128	64	<32
B/長野/104/88	64	64	128	32	<32
B/長野/372/88	64	32	128	64	<32
B/長野/1398/88	<32	32	<32	32	2048

表35. 1988～89年に分離されたA(H1N1)型インフルエンザウイルスの抗原分析表

抗原	抗血清		
	A/山形/120/86	A/S.Carolina/6/88	A/福島/2/88
A/山形/120/86	1024	512	512
A/S.Carolina/6/88	512	1024	256
A/福島/2/88	128	64	1024
A/長野/1396/88(5月)	1024	512	2048
A/長野/1598/88	512	1024	2048
A/長野/1605/88	1024	1024	2048
A/長野/1607/88	512	1024	2048
A/長野/1654/89	1024	512	1024
A/長野/1669/89	256	256	1024
A/長野/1672/89	256	256	2048
A/長野/1685/89	1024	512	1024
A/長野/1688/89	1024	512	1024
A/長野/533/88	2048	1024	2048
A/長野/573/88	2048	512	1024
A/長野/579/88	256	128	2048
A/長野/588/88	512	512	1024
A/長野/593/88	1024	512	1024
A/長野/593/88	1024	512	1024
A/長野/618/89	512	512	1024
A/長野/622/89	512	512	1024

表36. 1989年に分離されたA型3N2型インフルエンザウイルスの抗原分析表

抗原	抗血清					
	A/福岡/C29/85	A/大阪/156/87	A/京都/1/87	A/四国/2/87	A/秋田/4/88	A/北海道/20/89
A/福岡/C29/85	1024	2048	256	512	128	256
A/大阪/156/87	512	2048	256	512	256	256
A/京都/1/87	32	128	256	256	64	128
A/四国/2/87	128	512	512	2048	128	1024
A/秋田/4/88	256	128	256	256	1024	1024
A/北海道/20/89	256	512	256	256	256	1024
A/長野/1749/89 (3月)	256	2048	512	512	512	1024
A/長野/1868/89	128	1024	128	256	1024	1024
A/長野/1869/89	256	1024	256	256	512	2048
A/長野/1875/89	512	1024	256	512	512	2048
A/長野/1876/89	256	1024	256	1024	1024	2048
A/長野/1878/89	256	1024	256	512	512	2048
A/長野/542/89	256	1024	256	512	512	2048
A/長野/548/89	256	1024	256	256	512	2048
A/長野/1895/89	512	1024	256	256	1024	1024
A/長野/4111/89	256	512	256	256	1024	2048
A/長野/4114/89	256	512	256	256	1024	2048

表37. 1989年4月および1990年に分離されたB型インフルエンザウイルスの抗原分析表

抗原	抗血清			
	B/長崎/1/87	B/長崎/3/87	B/山形/16/88	B/愛知/5/88
B/長崎/1/87	1024	512	<32	256
B/長崎/3/87	128	256	<32	64
B/山形/16/88	64	64	1024	32
B/愛知/5/88	128	256	<32	128
B/長野/722/89(4月)	64	64	<32	128
B/長野/34/90	32	32	512	<32
B/長野/80/90	32	64	256	<32
B/長野/590/90	32	32	256	<32
B/長野/692/90	32	32	512	<32

表38. 1986年タイ国チエンマイのインフルエンザ患者から分離したA(H1N1)型インフルエンザウイルスの抗原分析表

抗原	抗血清			
	A/熊本/37/79	A/東京/103/83	A/Bangkok/10/83	A/山形/120/86
A/熊本/37/79	1024	256	<32	<32
A/東京/103/83	256	2048	<32	<32
A/Bangkok/10/83	<32	1024	2048	128
A/山形/120/86	<32	256	128	2048
A/Chiang Mai/8/86	<32	256	128	2048
A/Chiang Mai/27/86	<32	256	64	2048
A/Chiang Mai/45/86	32	128	64	2048

表39. 1987年タイ国チエンマイのインフルエンザ患者から分離したA(H1N1)型インフルエンザウイルスの抗原分析表

抗原	抗血清			
	A/熊本/37/79	A/Bangkok/10/83	A/山形/120/86	A/山形/32/89
A/熊本/37/79	256	<32	<32	<32
A/Bangkok/10/83	<32	256	<32	<32
A/山形/120/86	<32	32	2048	128
A/山形/32/89	<32	<32	2048	1024
A/Chiang Mai/33/87	<32	32	256	128
A/Chiang Mai/39/87	<32	<32	1024	128
A/Chiang Mai/101/87	<32	32	1024	128

表40. 1987年タイ国チエンマイのインフルエンザ患者から分離したB型インフルエンザウイルスの抗原分析表

抗原	抗血清			
	B/Victoria/2/87	B/Chiang Mai/5/87	B/長崎/1/87	B/山形/16/88
B/Victoria/2/87	128	64	32	<32
B/Chiang Mai/5/87	64	128	64	<32
B/長崎/1/87	64	128	512	<32
B/山形/16/88	<32	64	32	<32
B/Chiang Mai/18/87	64	64	64	<32
B/Chiang Mai/45/87	64	64	64	<32
B/Chiang Mai/83/87	64	64	32	<32
B/Chiang Mai/87/87	64	64	64	<32

表41. 1988年タイ国チエマンイのインフルエンザ患者から分離したA(H3N2)型インフルエンザウイルスの抗原分析表

抗原	抗血清			
	A/新潟/102/81	A/Philippines/2/82	A/福岡/C29/85	A/四川/2/87
A/新潟/102/81	512	512	128	<32
A/Philippines/2/82	<32	512	32	<32
A/福岡/C29/85	<32	64	512	128
A/四川/2/87	<32	<32	32	1024
A/Chiang Mai/11/88	<32	64	128	128
A/Chiang Mai/22/88	<32	64	128	256
A/Chiang Mai/27/88	<32	128	128	128
A/Chiang Mai/30/88	<32	128	128	64
A/Chiang Mai/43/88	<32	64	128	128
A/Chiang Mai/61/88	<32	64	128	64
A/Chiang Mai/64/88	<32	64	128	1024
A/Chiang Mai/66/88	<32	64	128	128
A/Chiang Mai/67/88	<32	64	128	64
A/Chiang Mai/72/88	<32	128	256	64
A/Chiang Mai/76/88	<32	128	128	128
A/Chiang Mai/77/88	<32	128	256	128
A/Chiang Mai/78/88	<32	128	256	64

表42. 1989年タイ国チエマンイのインフルエンザ患者から分離したA(H1N1)型インフルエンザウイルスの抗原分析表

抗原	抗血清			
	A/Bangkok/10/83	A/山形/120/86	A/Chiang Mai/39/87	A/山形/32/89
A/Bangkok/10/83	128	64	<32	<32
A/山形/120/86	64	2048	512	512
A/Chiang Mai/39/87	32	1024	256	64
A/Chiang Mai/101/87	<32	1024	128	512
A/山形/32/89	<32	1024	128	256
A/Chiang Mai/27/89	<32	512	64	512
A/Chiang Mai/28/89	32	2048	256	512
A/Chiang Mai/62/89	<32	512	64	256
A/Chiang Mai/71/89	<32	1024	256	128
A/Chiang Mai/73/89	<32	1024	128	256
A/Chiang Mai/105/89	<32	1024	128	256
A/Chiang Mai/108/89	<32	512	64	128
A/Chiang Mai/120/89	64	2048	256	256

表43. 1989年タイ国チエンマンマイのインフルエンザ患者から分離したA(H3N2)型インフルエンザウイルスの抗原分析表

抗原	抗血清				
	A/新潟/102/81	A/Philippines/2/82	A/福岡/C29/85	A/四川/2/87	A/秋田/4/88
A/新潟/102/81	256	128	64	<32	<32
A/Philippines/2/82	<32	256	<32	<32	<32
A/福岡/C29/85	<32	<32	2048	128	64
A/四川/2/87	<32	<32	32	1024	64
A/秋田/4/88	<32	64	256	256	1024
A/Chiang Mai/9/89	<32	32	128	128	512
A/Chiang Mai/48/89	<32	32	64	1024	64
A/Chiang Mai/51/89	<32	32	64	128	512
A/Chiang Mai/52/89	<32	64	256	256	1024
A/Chiang Mai/80/89	32	64	256	512	1024
A/Chiang Mai/86/89	32	64	256	512	1024
A/Chiang Mai/111/89	32	<32	32	512	64

表44. 1989年タイ国チエンマンマイのインフルエンザ患者から分離したB型インフルエンザウイルスの抗原分析表

抗原	抗血清				
	B/USSR/100/83	B/Chiang Mai/5/87	B/長崎/1/87	B/愛知/5/88	B/山形/16/88
B/USSR/100/83	512	<32	<32	<32	<32
B/Chiang Mai/5/87	<32	512	64	32	<32
B/長崎/1/87	128	128	512	128	<32
B/愛知/5/88	64	512	128	128	<32
B/山形/16/88	32	<32	32	<32	1024
B/Chiang Mai/26/89	<32	<32	32	<32	512
B/Chiang Mai/36/89	32	<32	32	<32	512
B/Chiang Mai/76/89	<32	<32	<32	<32	512
B/Chiang Mai/96/89	<32	<32	<32	<32	512
B/Chiang Mai/117/89	<32	<32	<32	<32	512

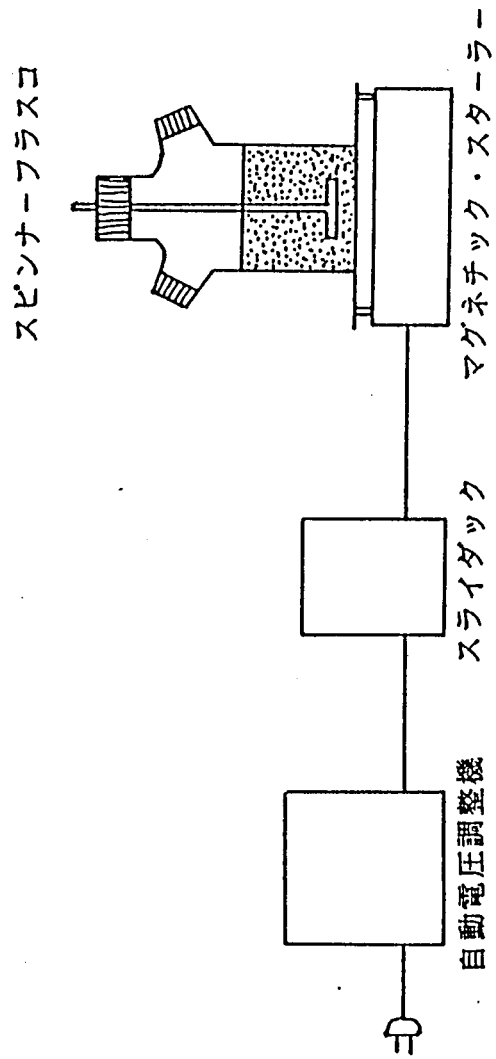


図1. 浮遊細胞培養装置

浮遊培養細胞を1%の牛血清アルブミン添加のEagle's MEMで2回洗う

↓
5.5x10⁶ cells/mlの細胞浮遊液を細胞維持液*で調製し、0.1mlずつ
各ウェルに分注する

↓ 検体接種 0.2ml

34°C, 1時間吸着

↓ 細胞維持液*分注 0.7ml

34°C, 静置培養

↓
HA価測定

図2. MDCK浮遊培養細胞によるインフルエンザウイルス分離方法
*:表5に示したEagle's MEMにグルタミン, ビタミン, 葉酸, ビオチン,
アルブミンなどを添加したインフルエンザウイルス用培養液

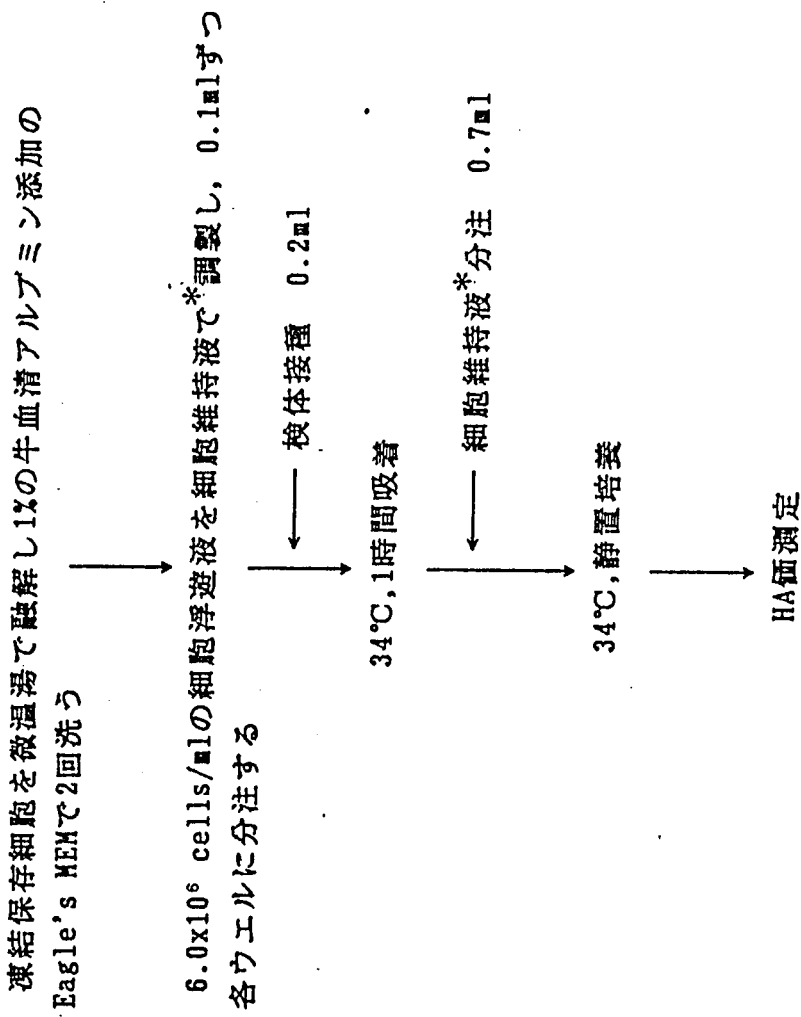


図3. MDCK凍結保存細胞によるインフルエンザウイルス分離方法
 * :表5に示したEagle's MEMにグルタミン, ビタミン, 葉酸, ビオチン, 7H7ミンなどを添加したインフルエンザウイルス用培養液

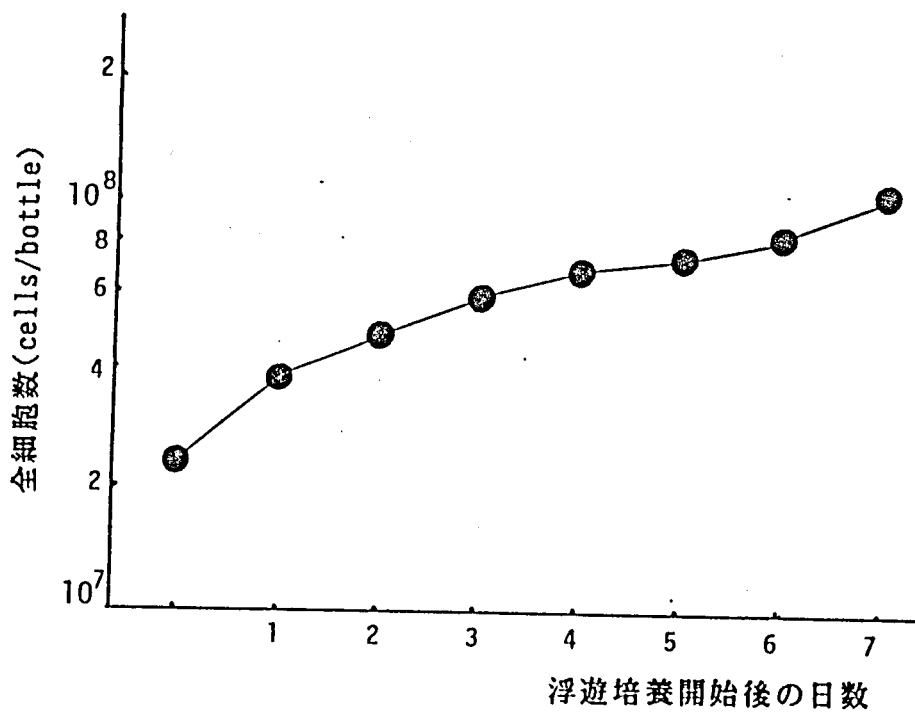


図4. MDCK細胞の浮遊培養における増殖

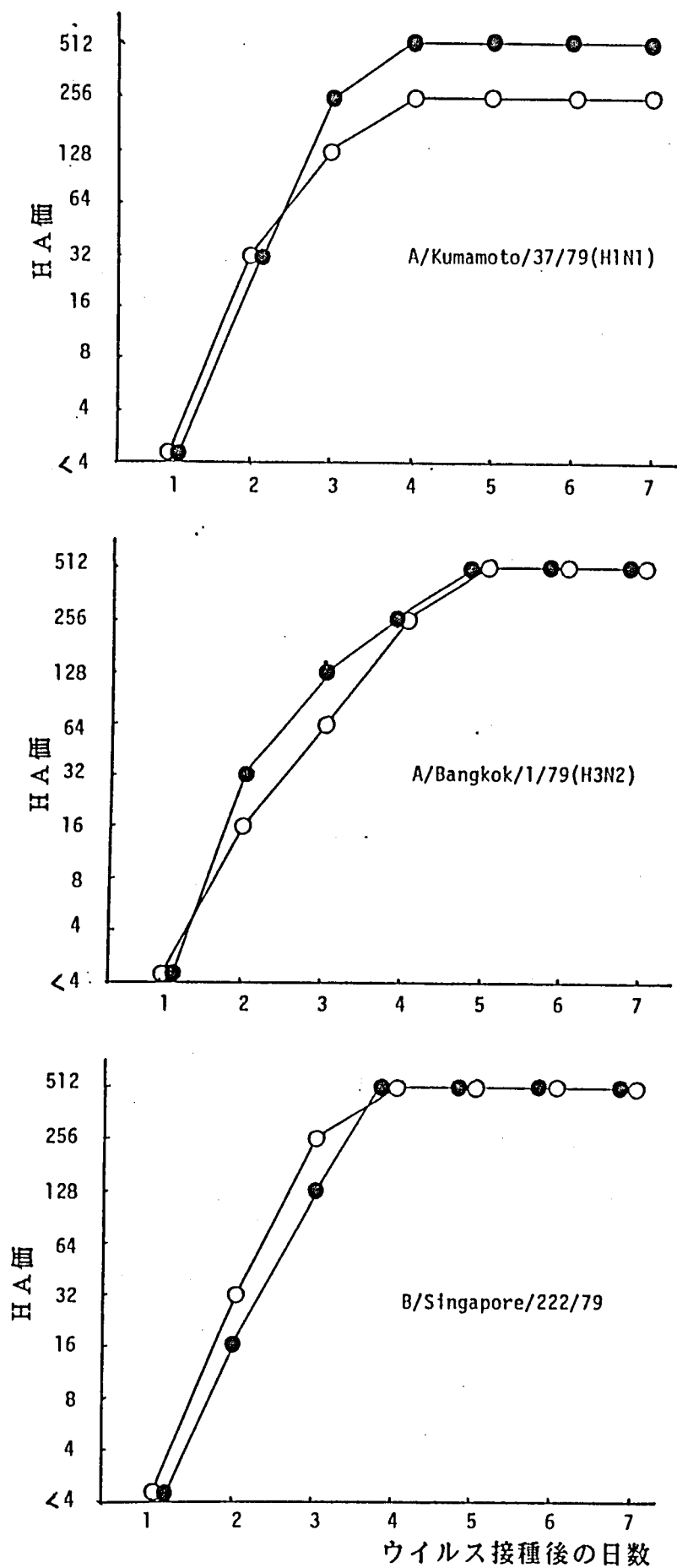


図5. MDCK浮遊培養細胞および単層培養細胞のインフルエンザウイルス標準株接種後のHA産生

○:MDCK浮遊培養細胞 ●:MDCK単層培養細胞

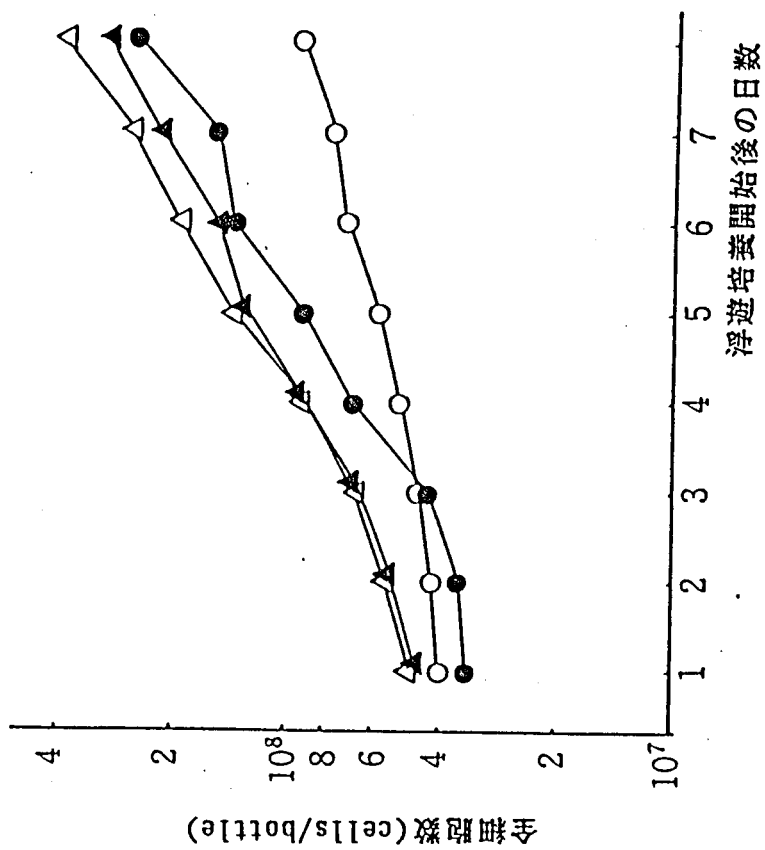


図6. ポリペプトン濃度の異なった培養液でのESK細胞の浮遊培養成績の比較

- : ポリペプトン無添加のMEM Joklik
- : ポリペプトン5%添加のMEM Joklik
- △: ポリペプトン10%添加のMEM Joklik
- ▲: ポリペプトン15%添加のMEM Joklik

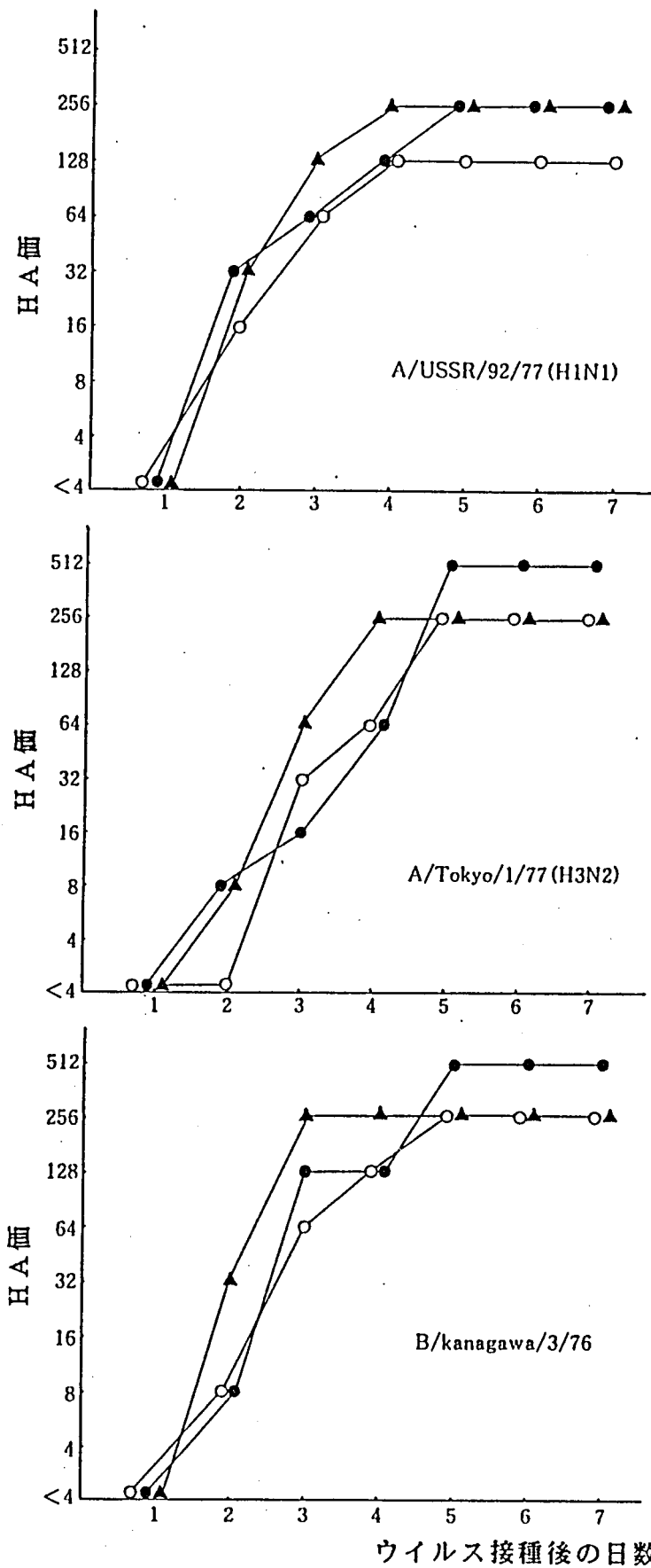


図7. ESK浮遊培養細胞, ESK単層培養細胞およびMDCK単層培養細胞のインフルエンザウイルス標準株接種後のHA産生

○: ESK浮遊培養細胞 ●: ESK単層培養細胞 ▲: MDCK単層培養細胞

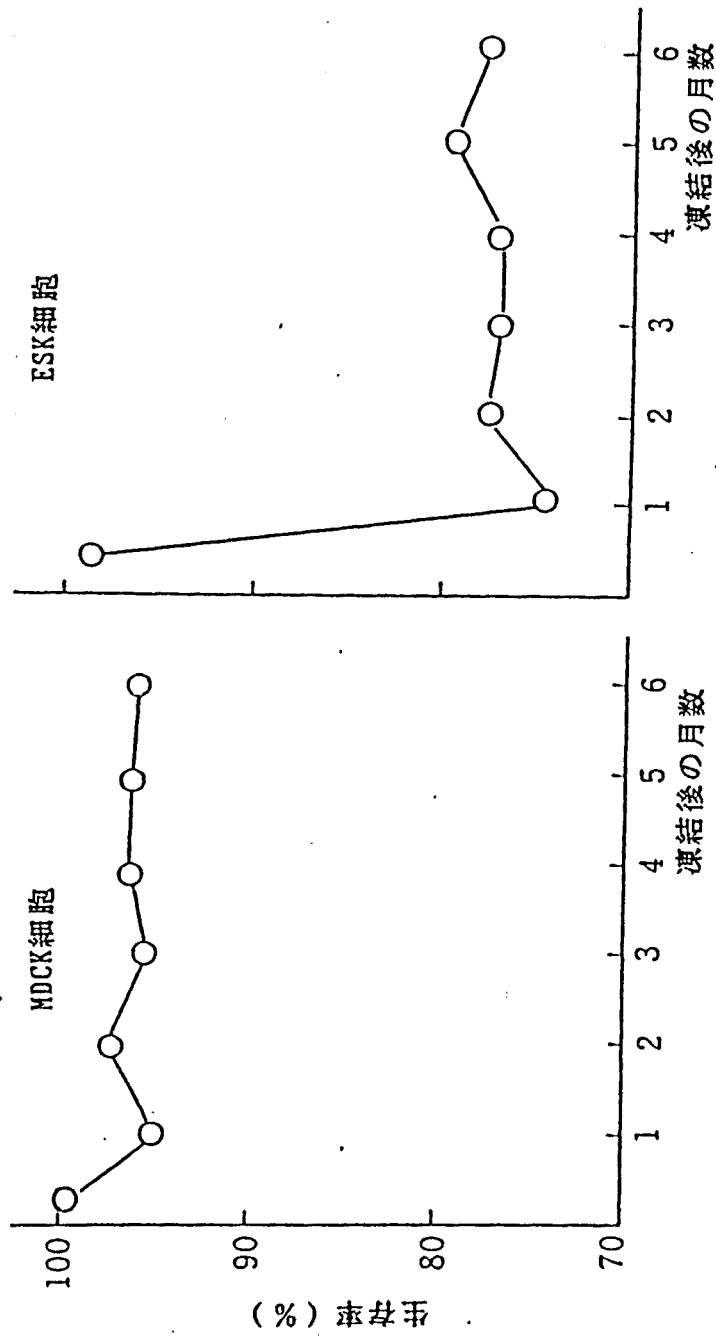


図8. MDCK細胞およびESK細胞の凍結保存後の細胞生存率

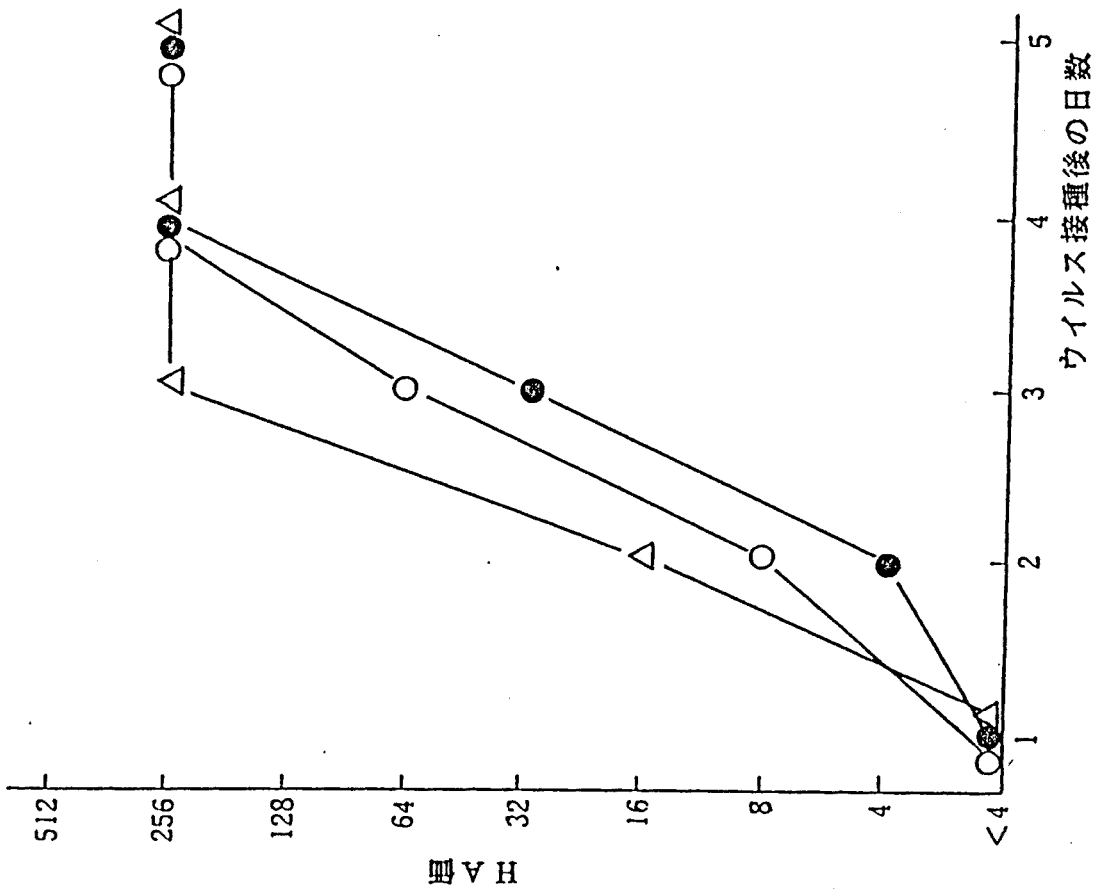
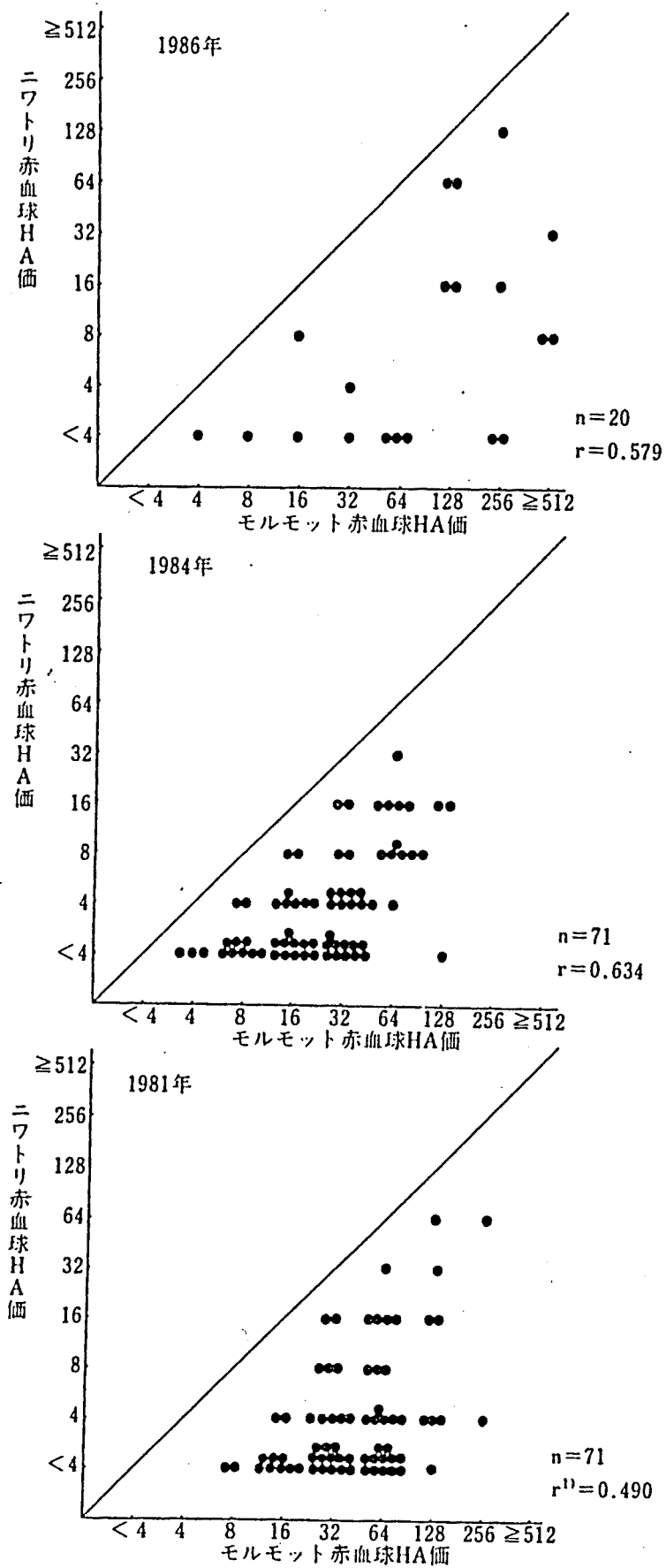


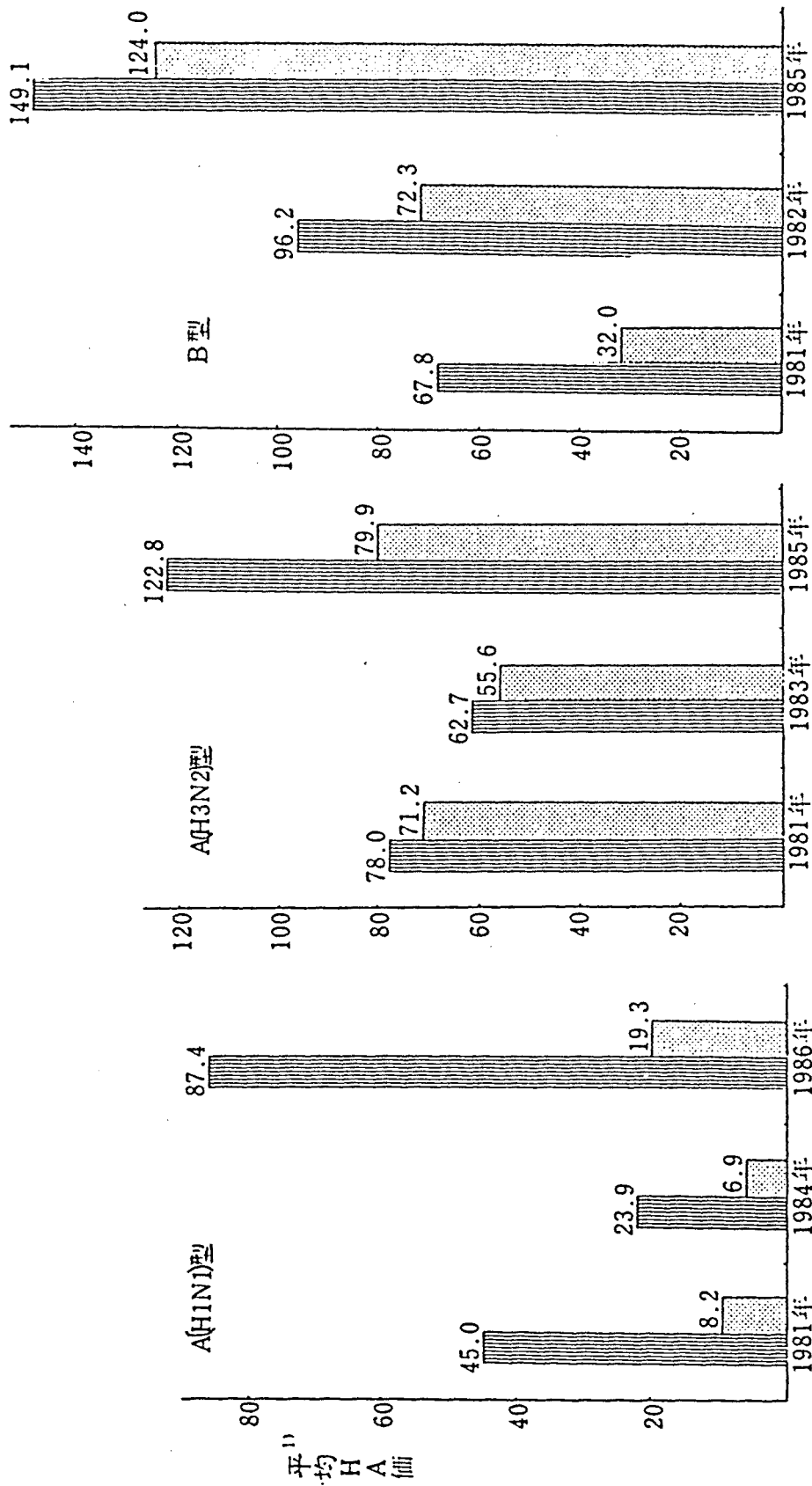
図9. MDCK凍結保存細胞のインフルエンザウイルス標準株接種後のHA産生

○: A/熊本/37/79(H1N1) ●: A/新潟/102/81(H3N2) △: B/シンガポール/222/79



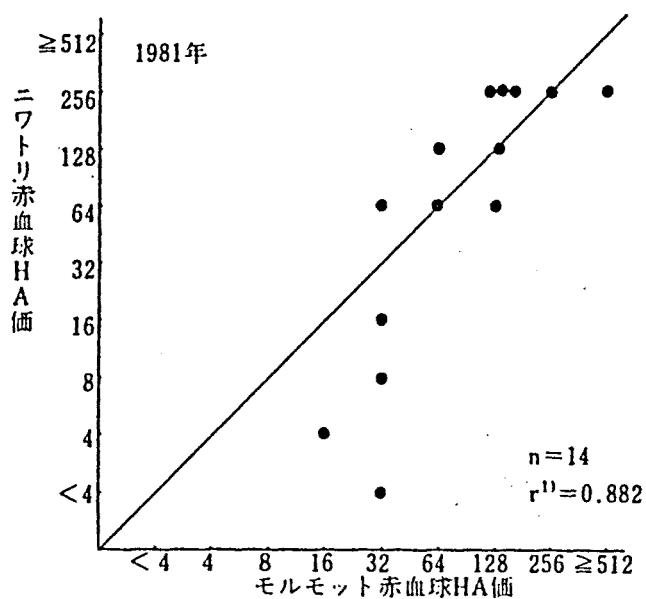
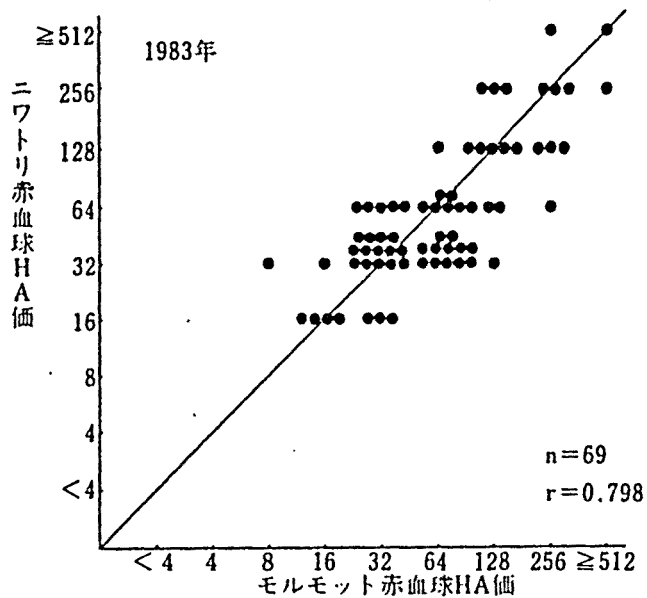
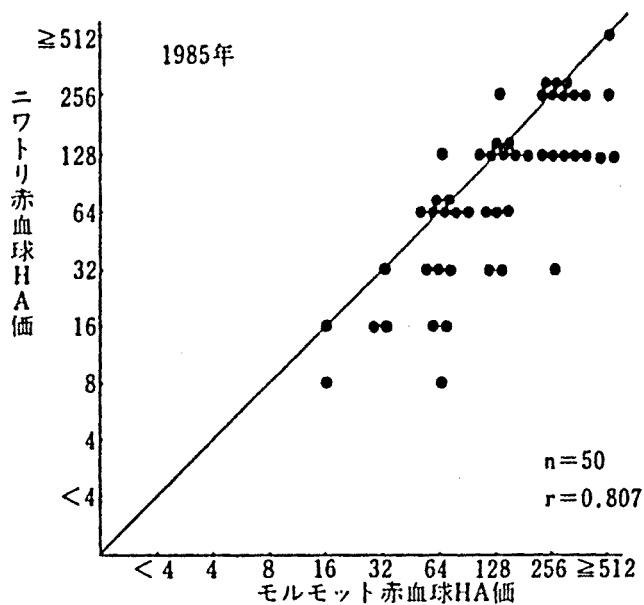
1) Spearmanの順位相関係数

図1 O. 初代培養で分離されたA(H1N1)型インフルエンザウイルスのニワトリ赤血球HA価とモルモット赤血球HA価の比較



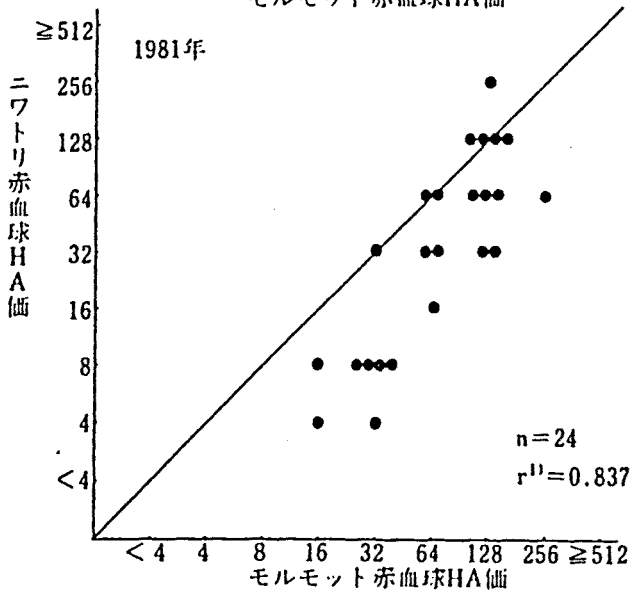
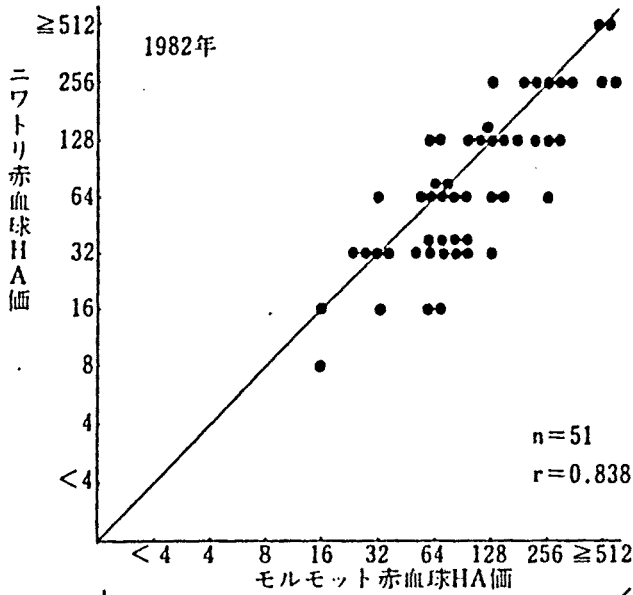
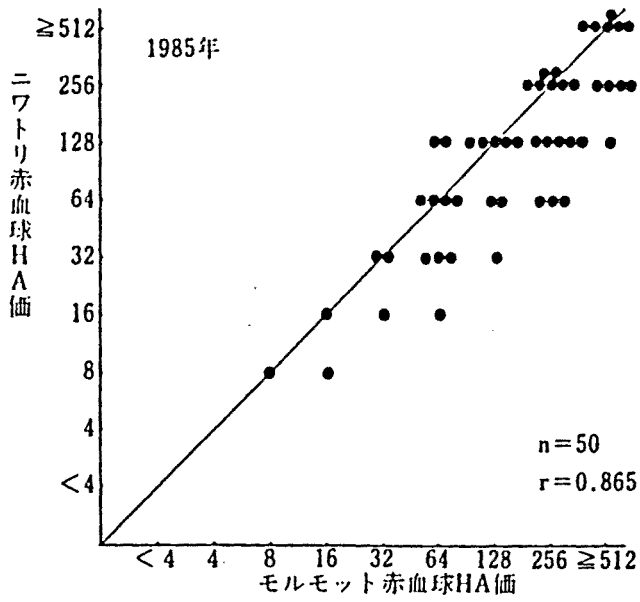
1) 平均HA価はHA価>4のウイルスについての幾何平均値、HA価≥512は512として算定

図1 1, 初代培養で分離されたインフルエンザウイルスのモルモット赤血球およびニワトリ赤血球に対する平均HA価



1) Spearmanの順位相関係数

図12, 初代培養で分離されたA(H3N2)型インフルエンザウイルスのニワトリ赤血球HA価とモルモット赤血球HA価の比較



1) Spearmanの順位相関係数

図13. 初代培養で分離されたB型インフルエンザウイルスのニワトリ赤血球HA価とモルモット赤血球HA価の比較

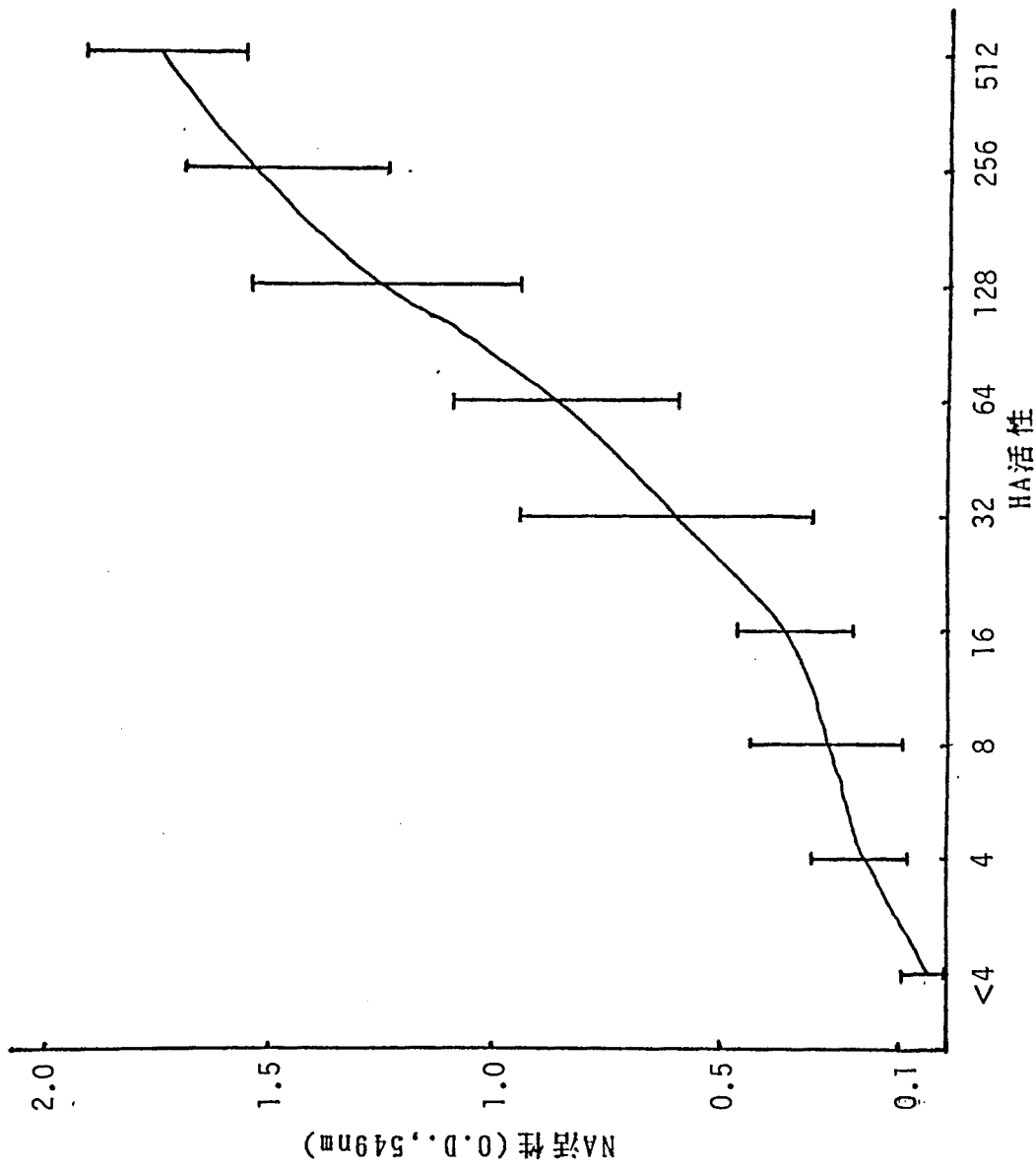
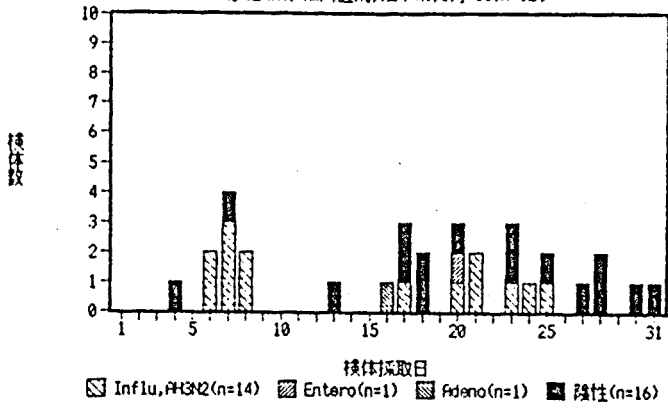
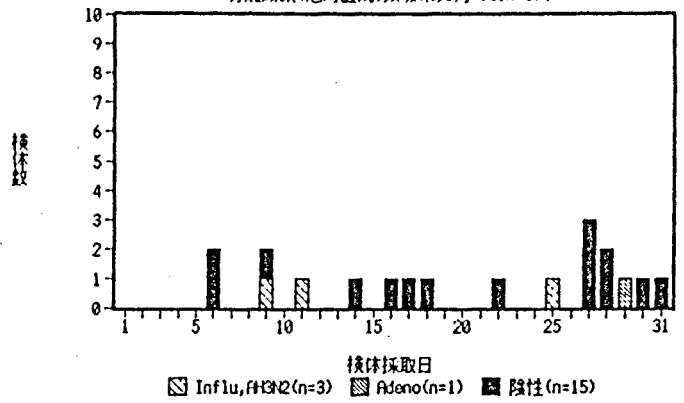


図 14. 患者検体接種後の培養液および羊水、尿膜腔液のHA活性とNA活性

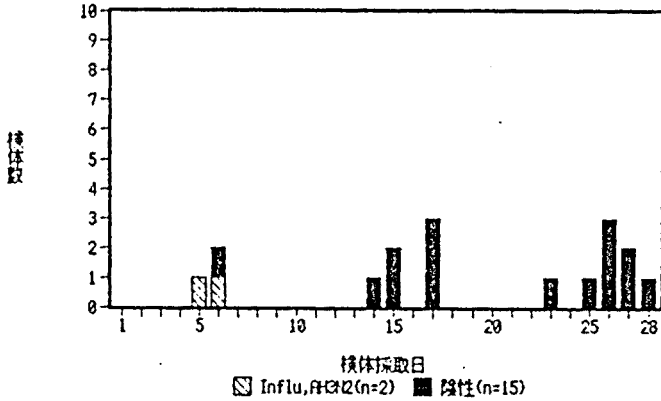
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,1月'86,n=32)



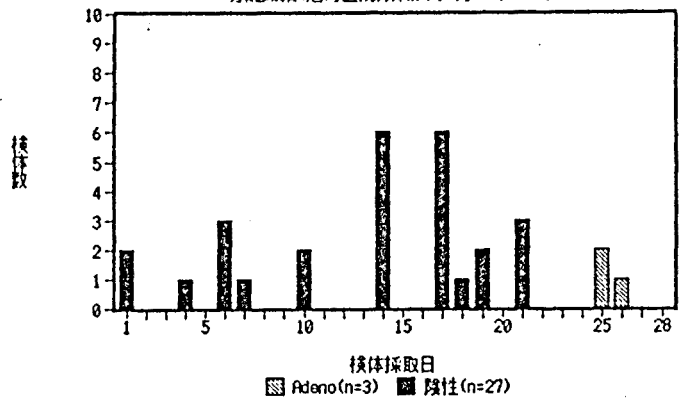
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,1月'86,n=19)



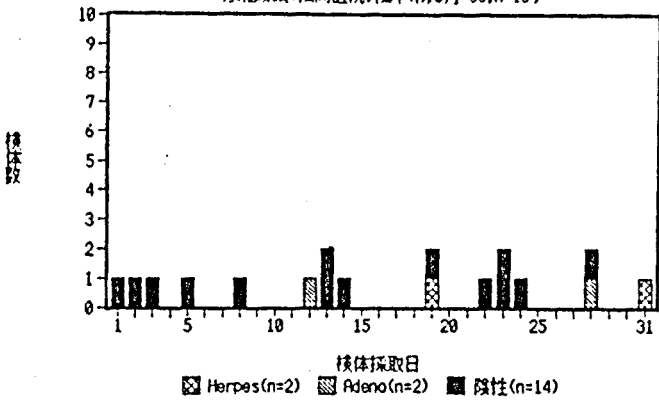
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,2月'86,n=17)



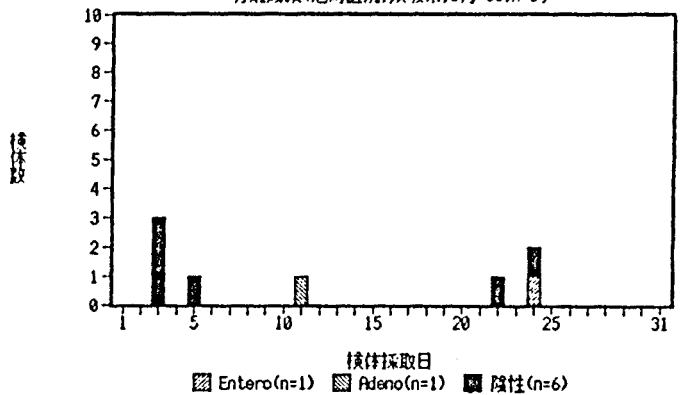
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,2月'86,n=30)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,3月'86,n=18)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,3月'86,n=8)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,4月'86,n=32)

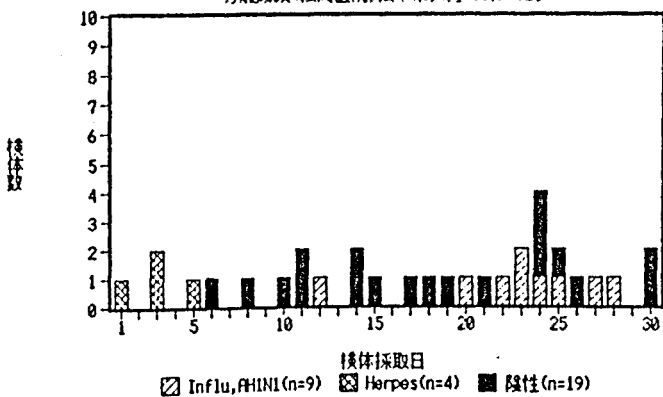
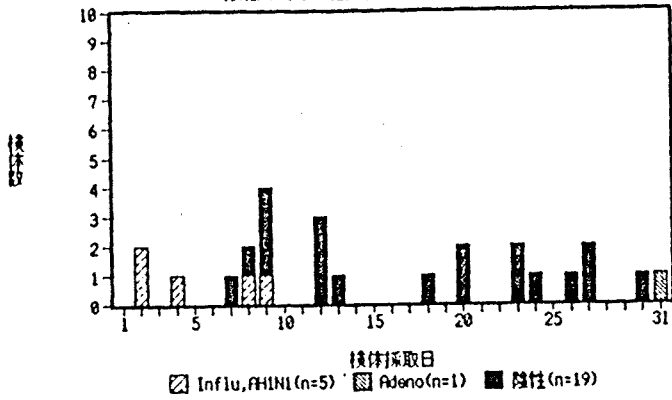
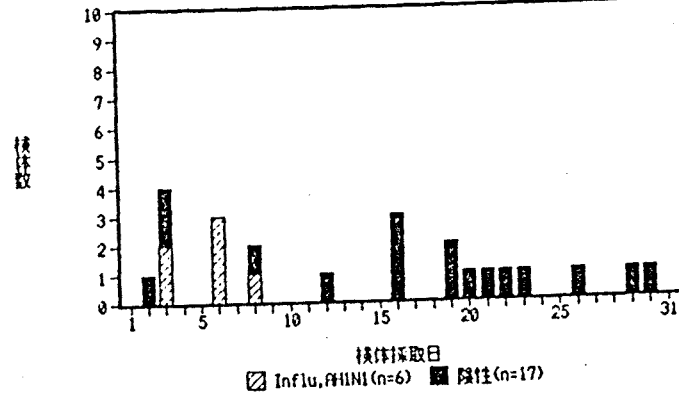


図15-1. 1986年1月~4月までの各医療定点における日別の検体数とウイルス分離成績

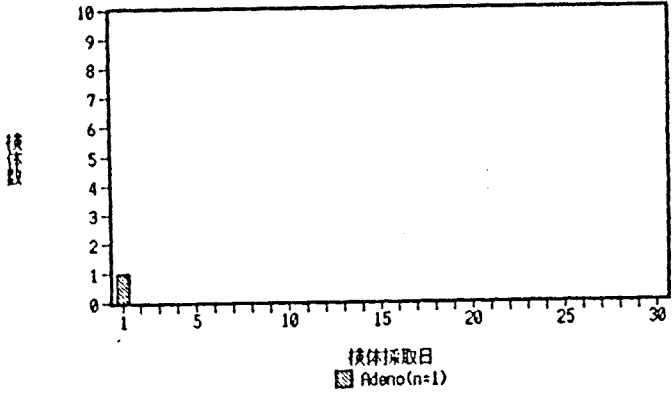
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,5月'86,n=25)



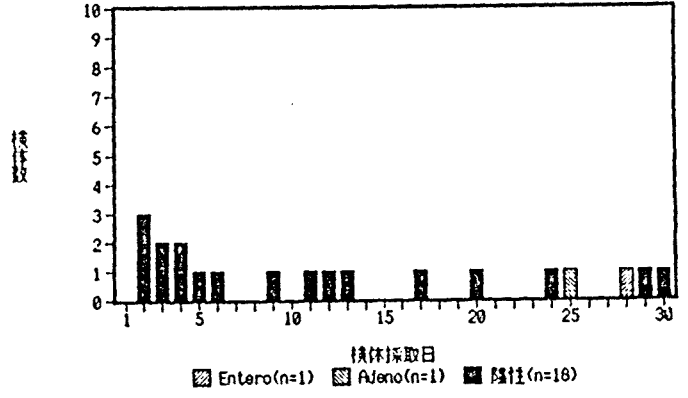
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,5月'86,n=23)



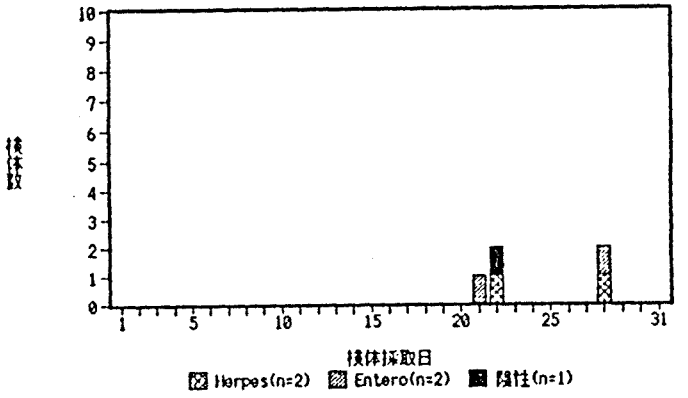
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,6月'86,n=1)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,6月'86,n=20)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,7月'86,n=5)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,8月'86,n=3)

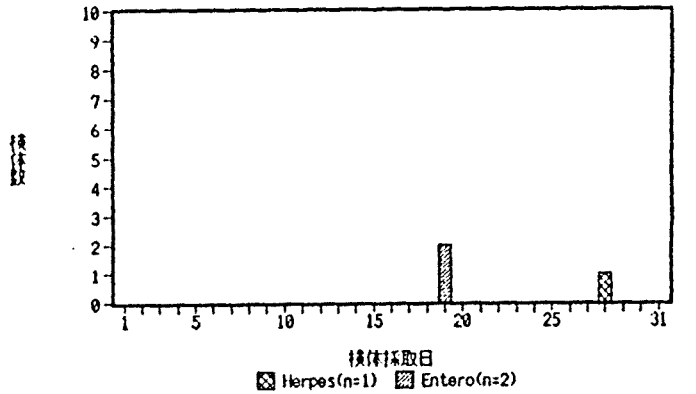
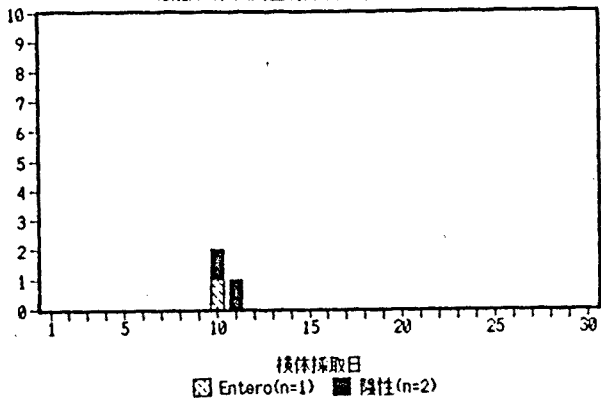
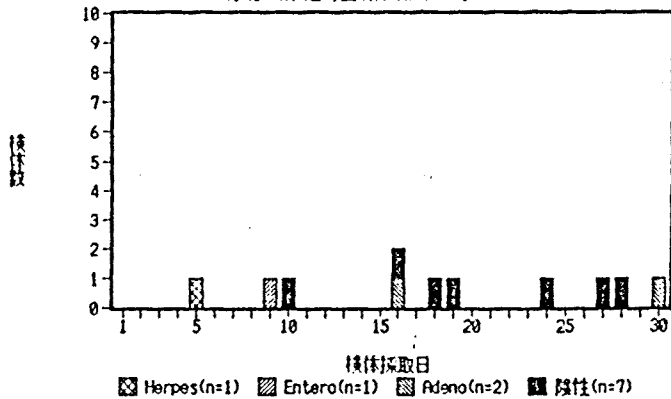


図15-2. 1986年5月～8月までの各医療定点における日別の検体数とウイルス分離成績

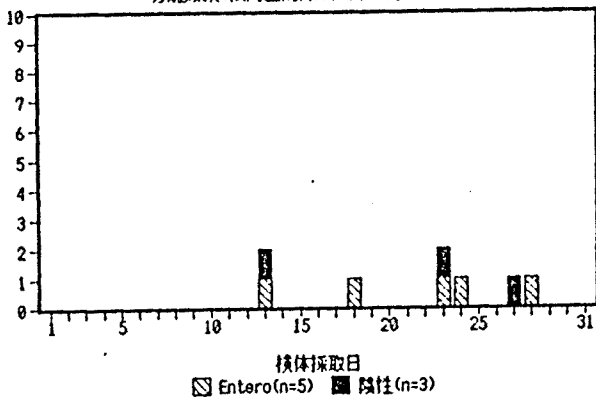
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(松岡医院,松本市,9月'86,n=3)



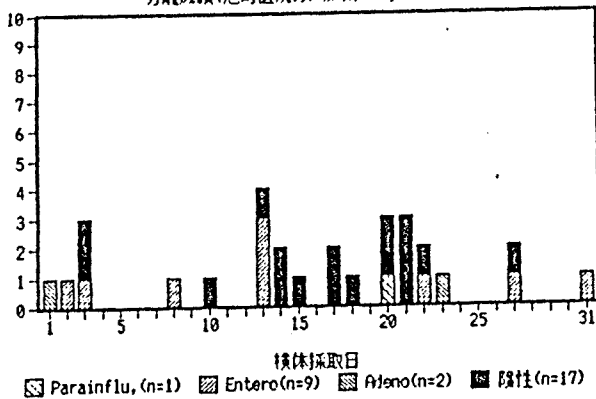
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(旭町医院,須坂市,9月'86,n=11)



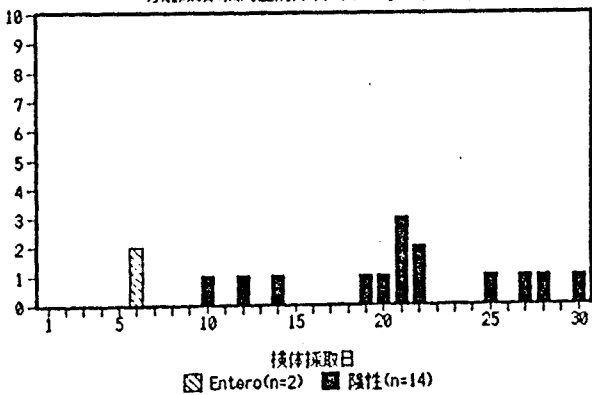
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(松岡医院,松本市,10月'86,n=8)



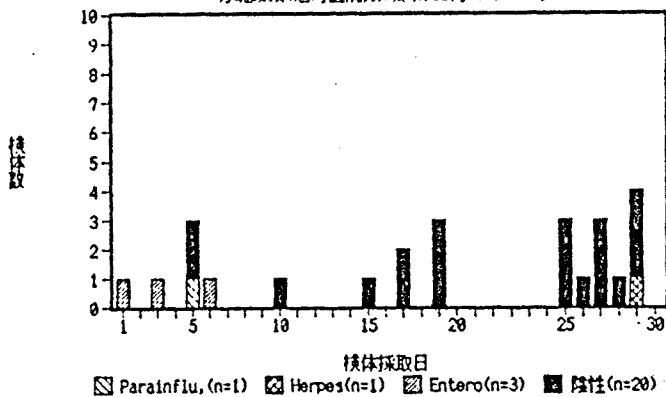
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(旭町医院,須坂市,10月'86,n=29)



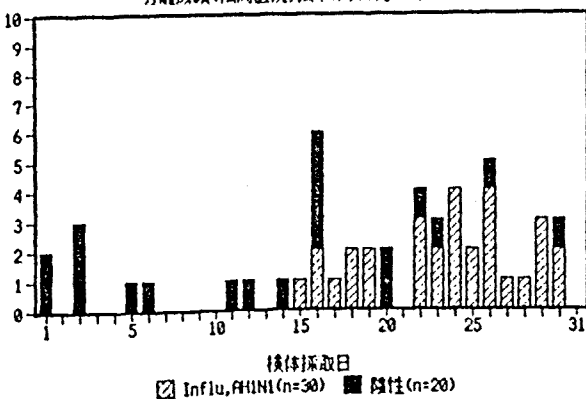
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(松岡医院,松本市,11月'86,n=16)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(旭町医院,須坂市,11月'86,n=25)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(松岡医院,松本市,12月'86,n=50)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(旭町医院,須坂市,12月'86,n=50)

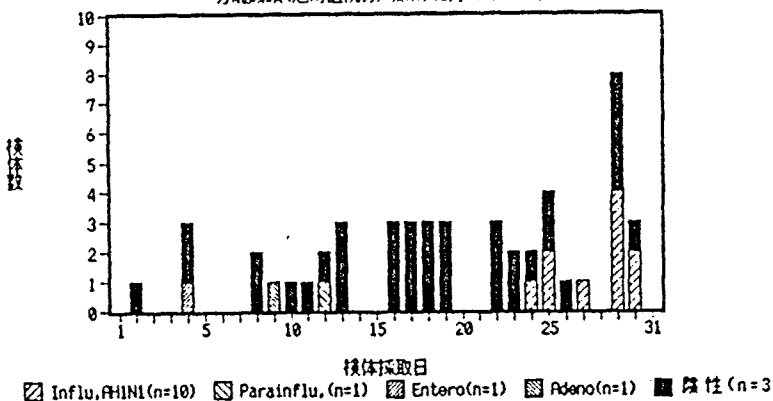
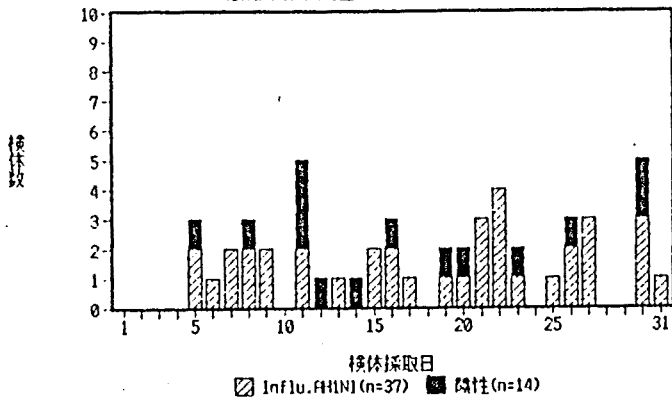
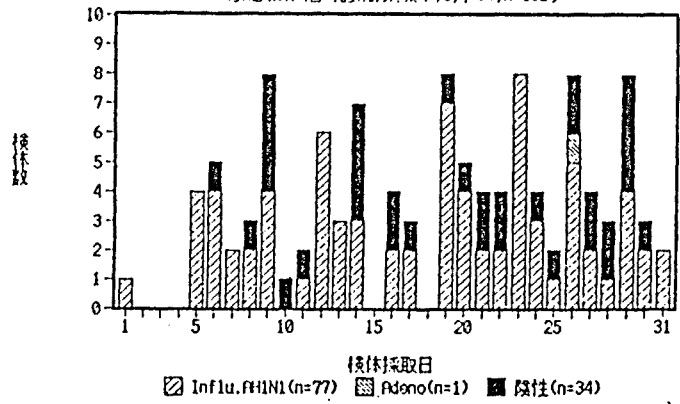


図 15-3. 1986年9月～12月までの各医療定点における日別の検体数とウイルス分離成績

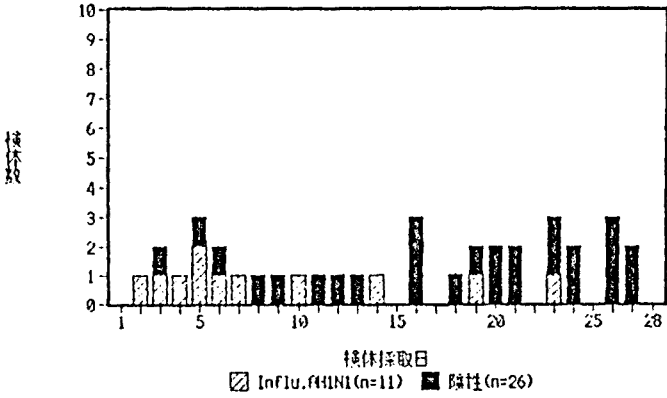
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(松岡医院,松本市,1月'87,n=51)



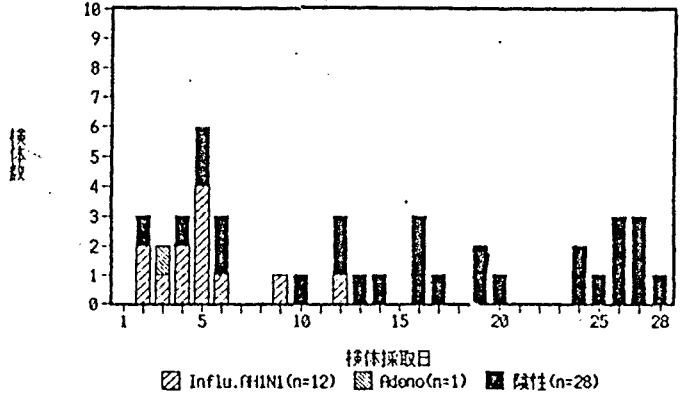
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(旭町医院,須坂市,1月'87,n=112)



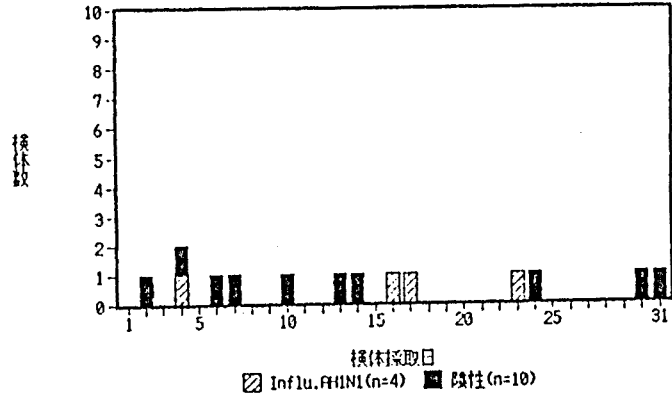
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(松岡医院,松本市,2月'87,n=37)



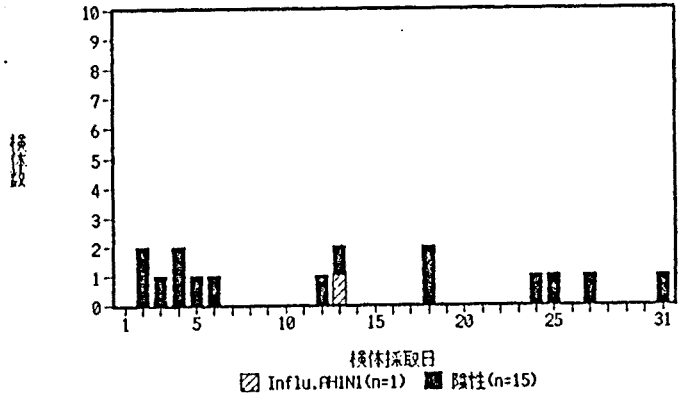
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(旭町医院,須坂市,2月'87,n=41)



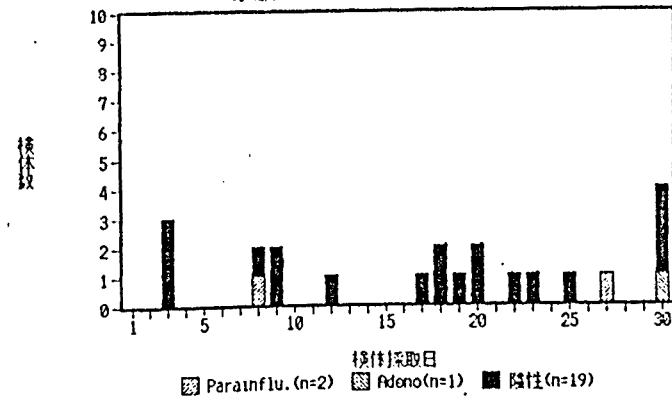
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(松岡医院,松本市,3月'87,n=14)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(旭町医院,須坂市,3月'87,n=16)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(松岡医院,松本市,4月'87,n=22)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス分離成績(旭町医院,須坂市,4月'87,n=7)

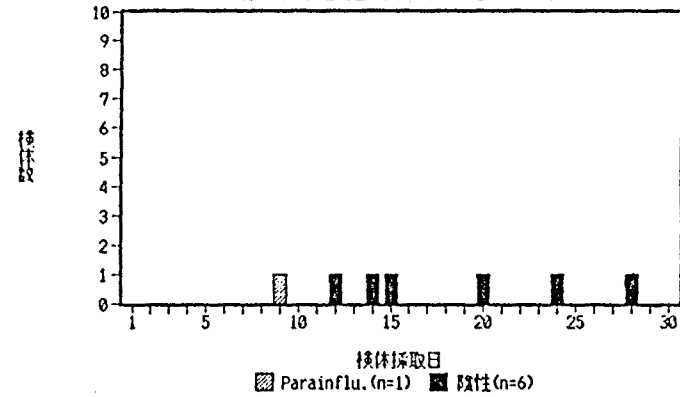
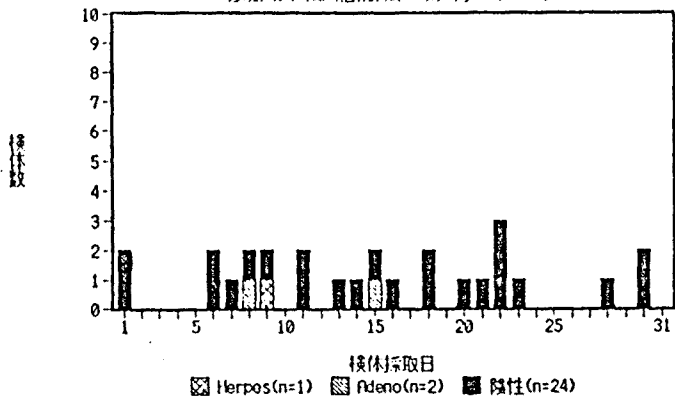
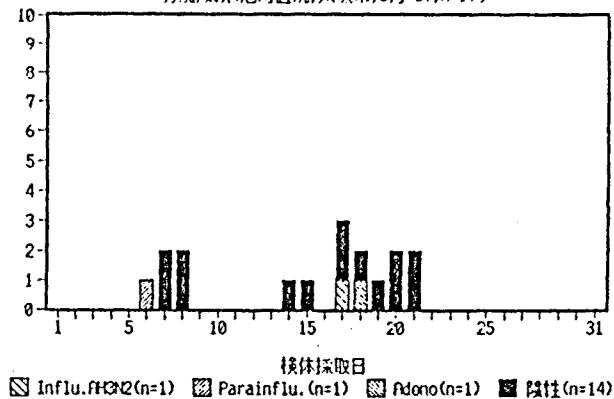


図15-4. 1987年1月～4月までの各医療定点における日別の検体数とウイルス分離成績

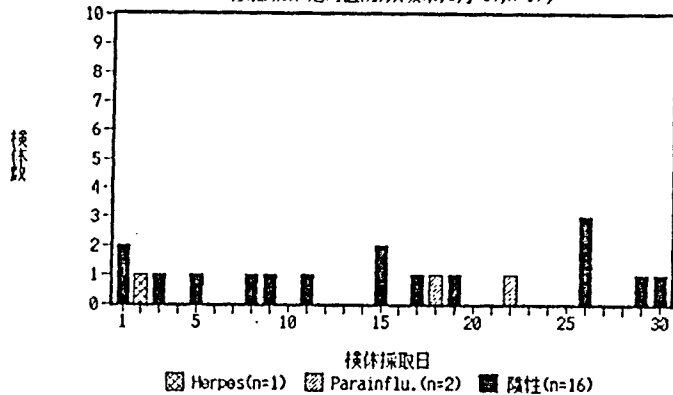
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,5月'87,n=27)



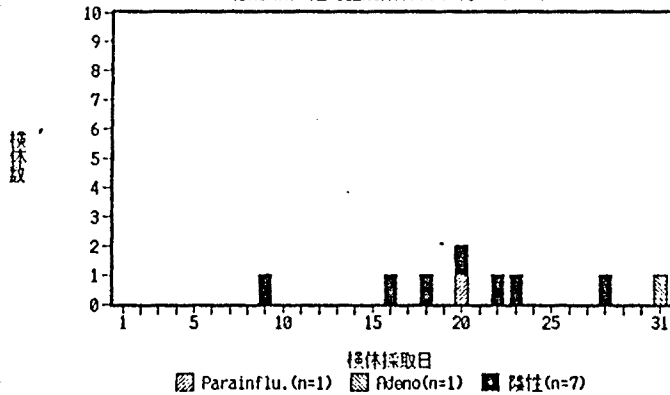
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,5月'87,n=17)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,6月'87,n=19)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,7月'87,n=9)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,8月'87,n=5)

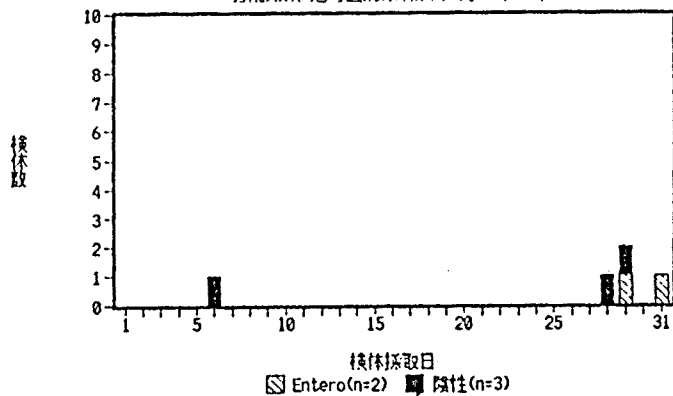
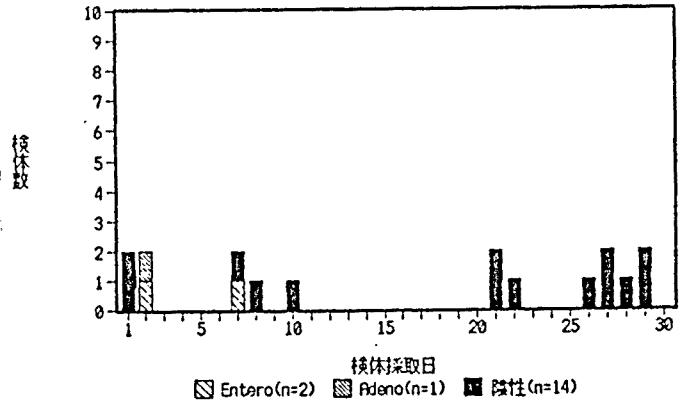
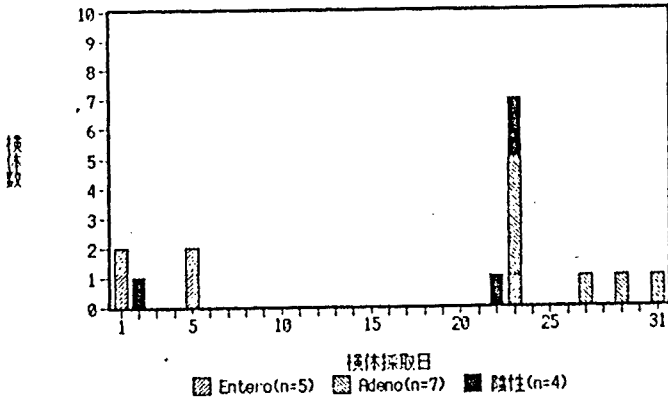


図15-5. 1987年5月~8月までの各医療定点における日別の検体数とウイルス分離成績

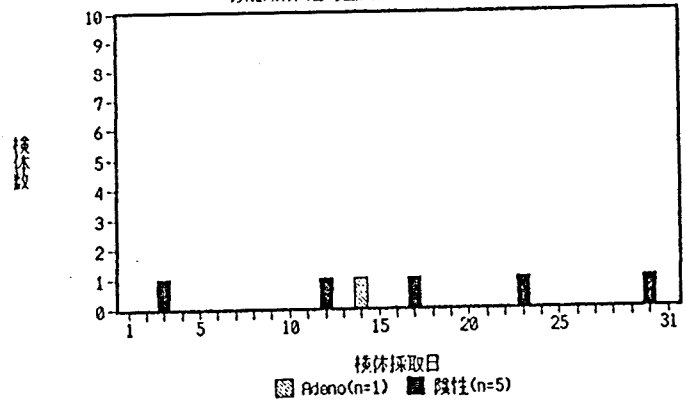
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院, 須坂市, 9月'87, n=17)



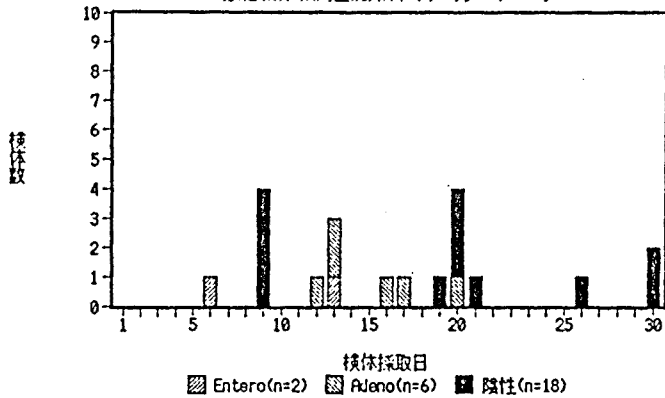
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院, 松本市, 10月'87, n=16)



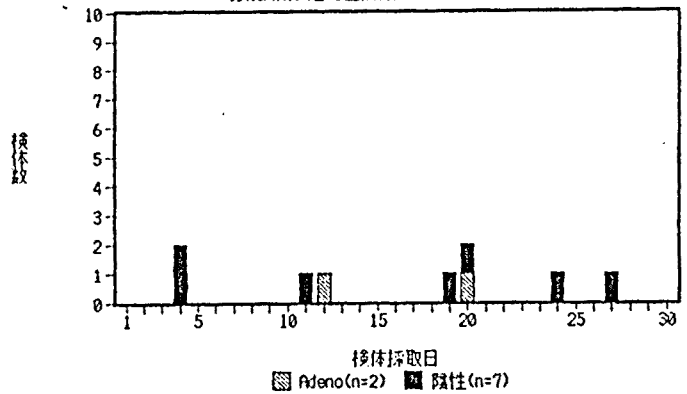
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院, 須坂市, 10月'87, n=6)



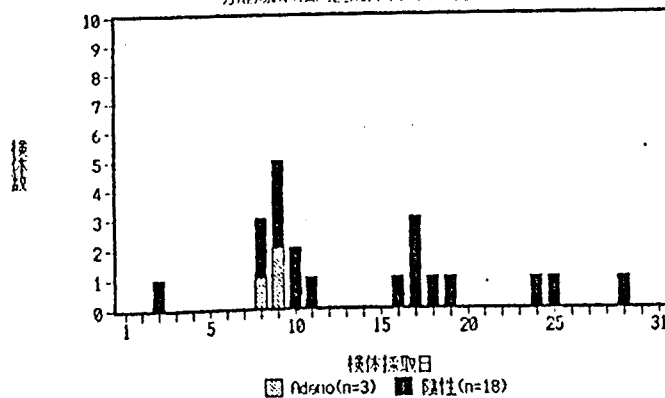
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院, 松本市, 11月'87, n=20)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院, 須坂市, 11月'87, n=9)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院, 松本市, 12月'87, n=21)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院, 須坂市, 12月'87, n=27)

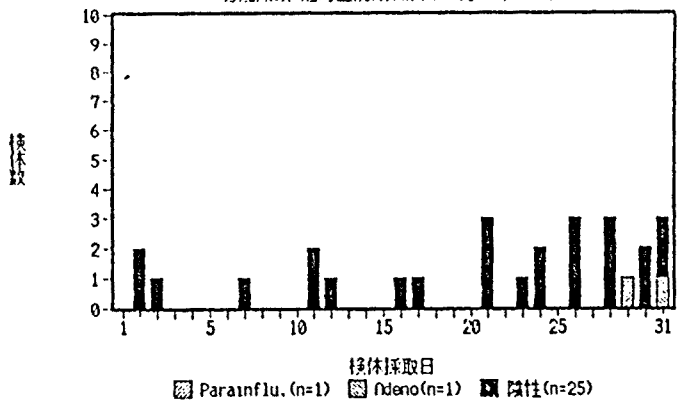
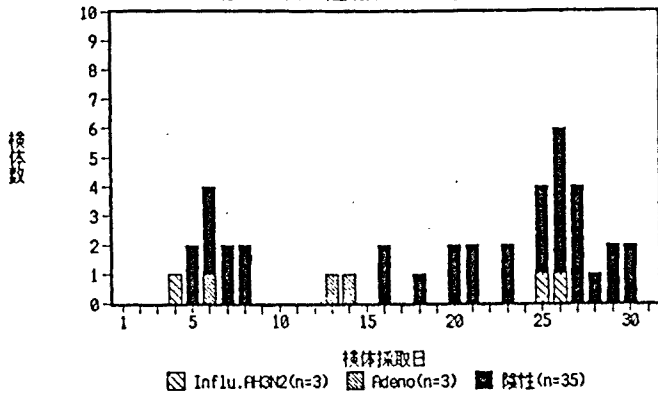
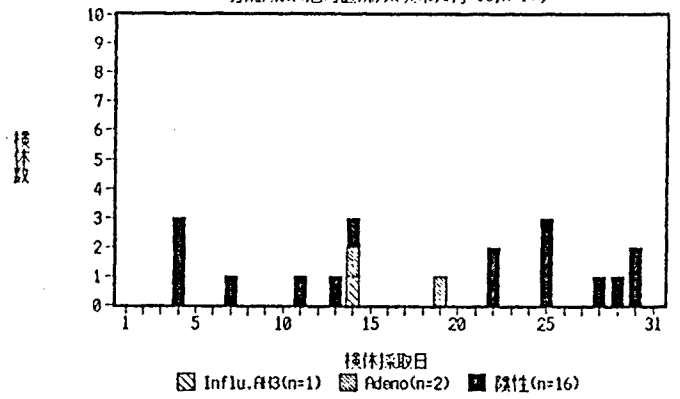


図15-6. 1987年9月～12月までの各医療定点における日別の検体数とウイルス分離成績

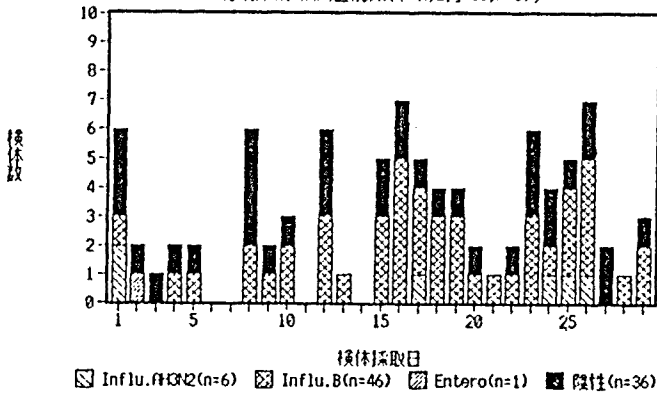
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,1月'88,n=41)



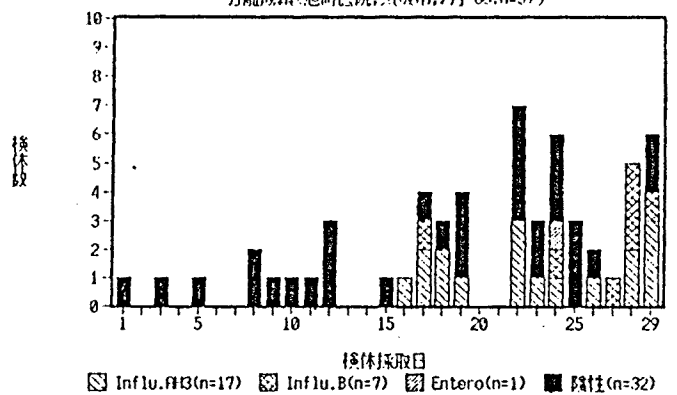
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,1月'88,n=19)



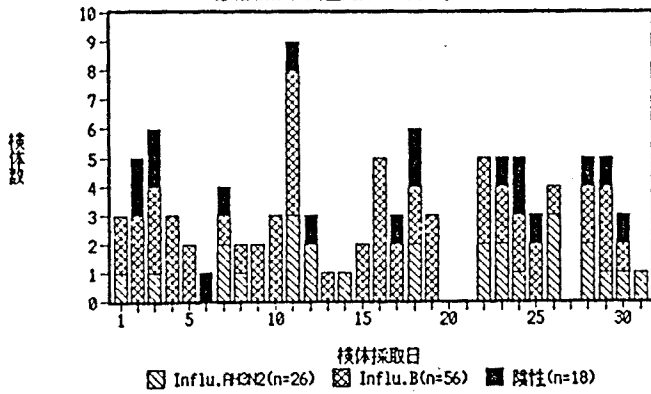
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,2月'88,n=89)



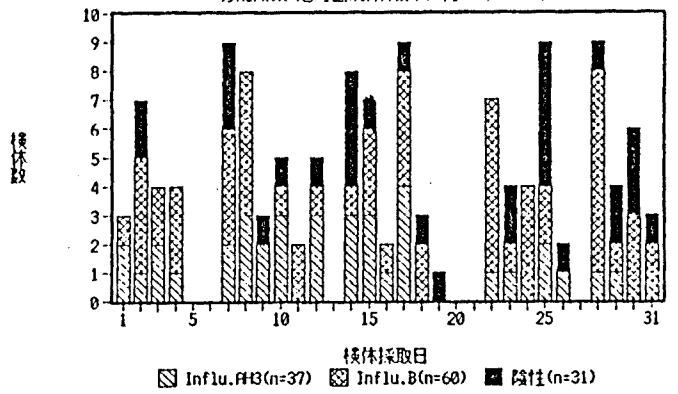
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,2月'88,n=57)



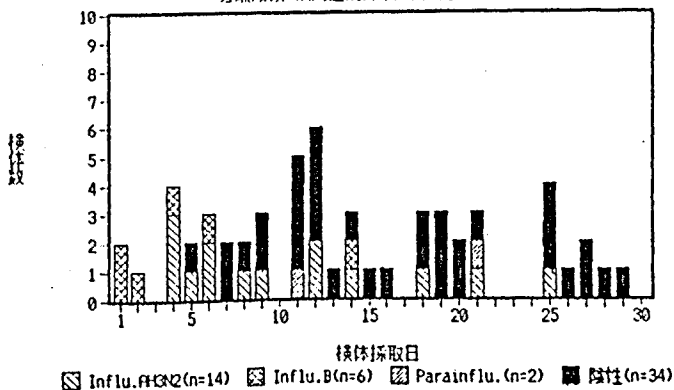
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,3月'88,n=100)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,3月'88,n=120)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,4月'88,n=56)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,4月'88,n=51)

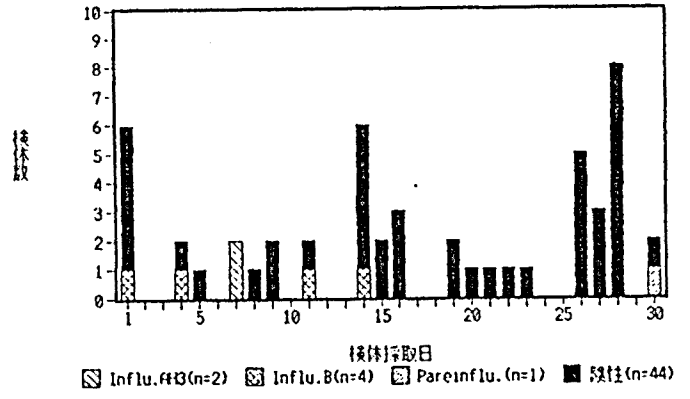
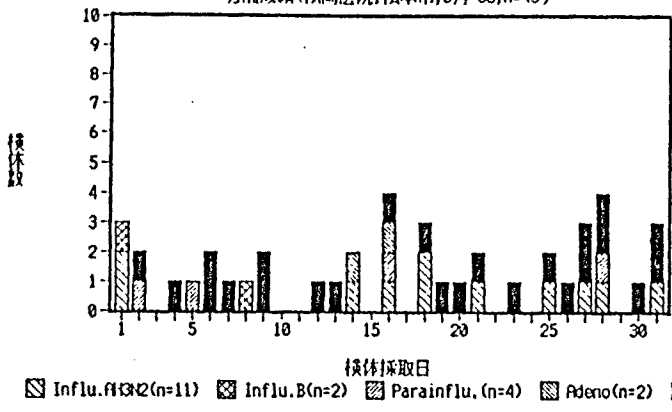
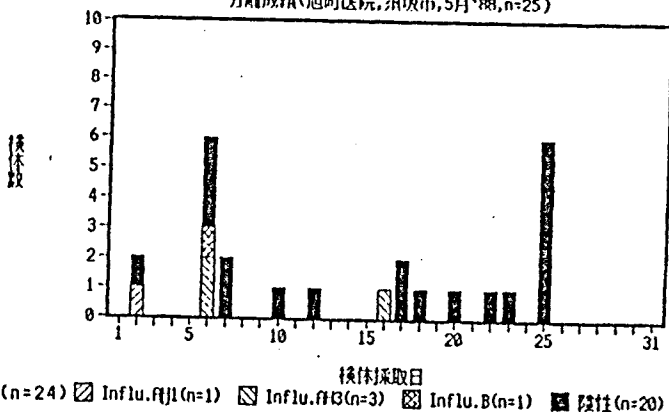


図15-7. 1988年1月~4月までの各医療定点における日別の検体数とウイルス分離成績

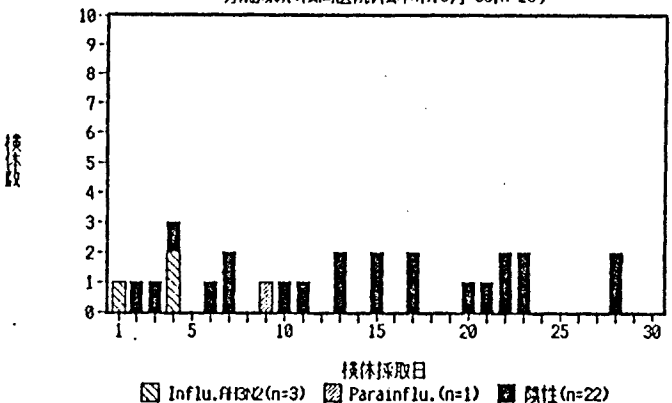
インフルエンザ患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,5月'88,n=43)



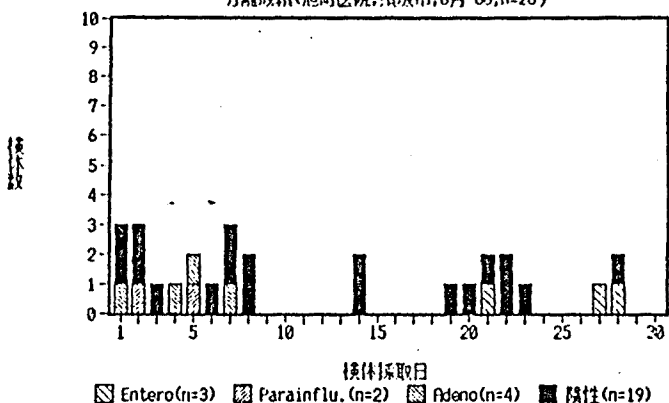
インフルエンザ患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,5月'88,n=25)



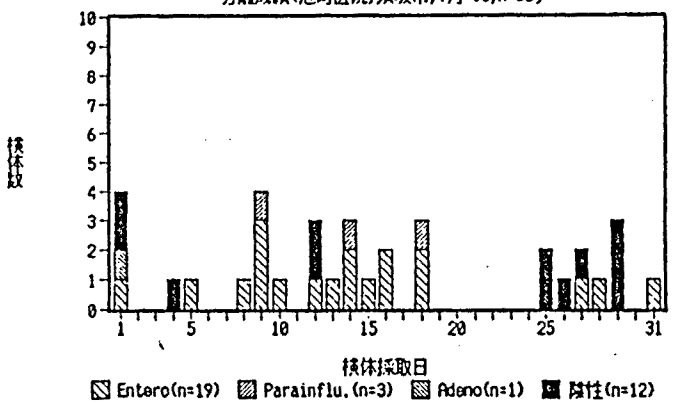
インフルエンザ患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,6月'88,n=26)



インフルエンザ患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,6月'88,n=28)



インフルエンザ患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,7月'88,n=35)



インフルエンザ患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,8月'88,n=15)

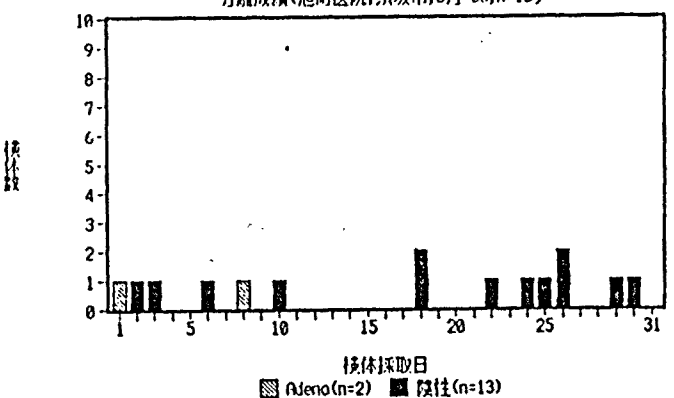
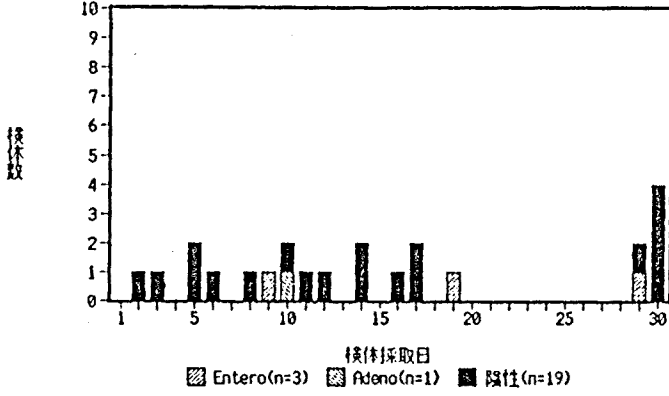
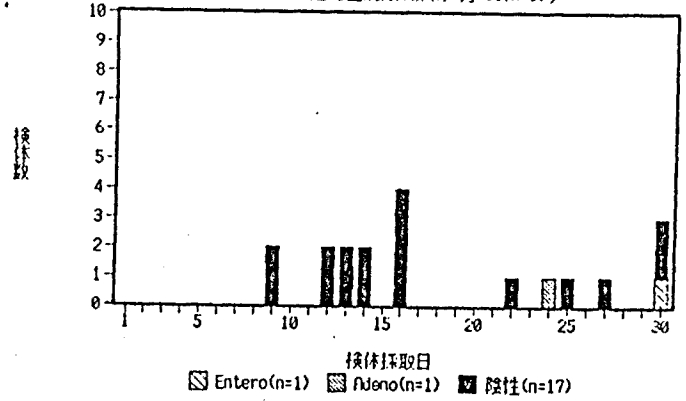


図15-8. 1988年5月～8月までの各医療定点における日別の検体数とウイルス分離成績

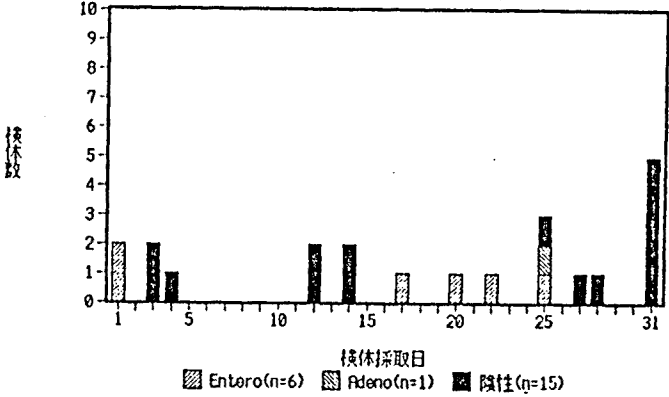
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,9月'88,n=23)



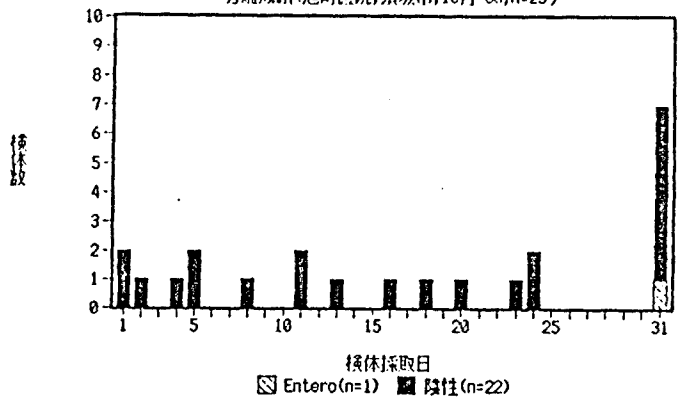
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,9月'88,n=19)



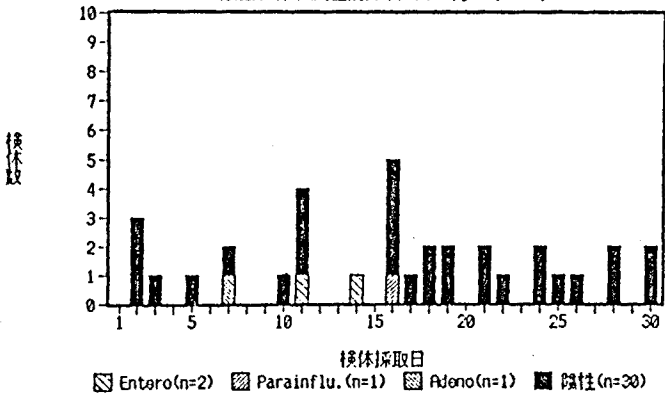
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,10月'88,n=22)



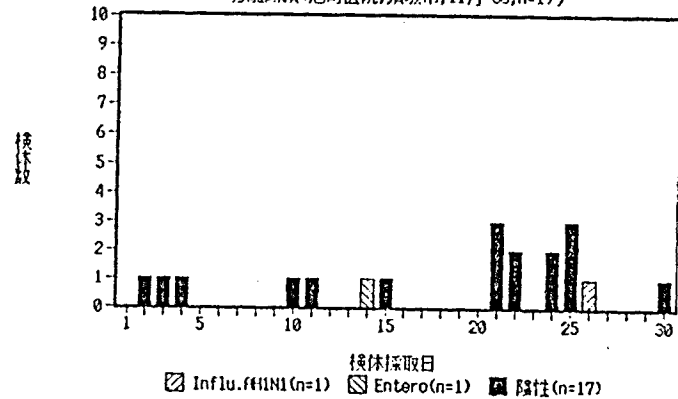
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,10月'88,n=23)



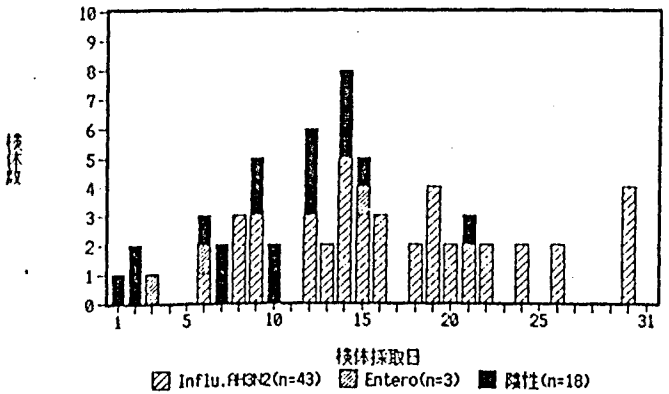
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,11月'88,n=34)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,11月'88,n=19)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,12月'88,n=64)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,12月'88,n=83)

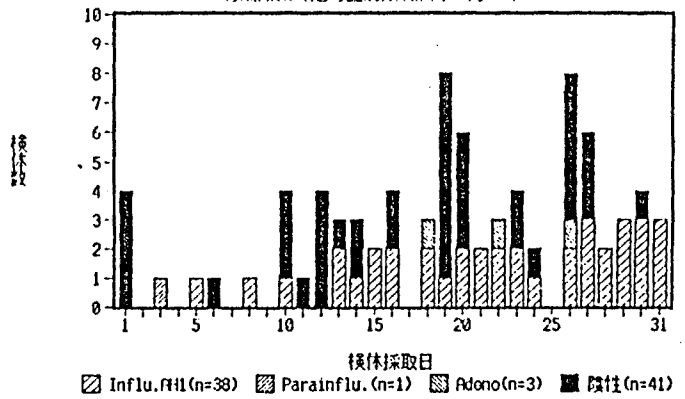
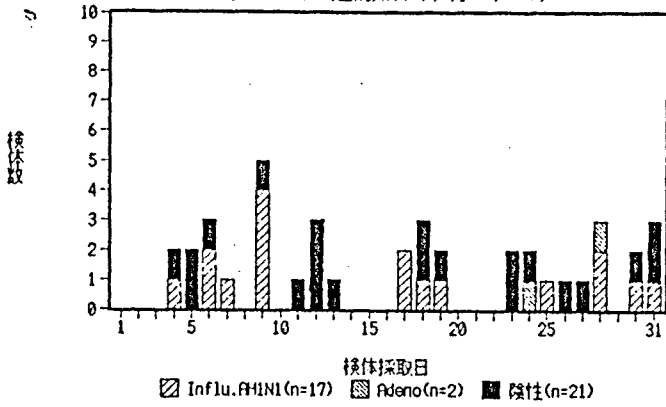
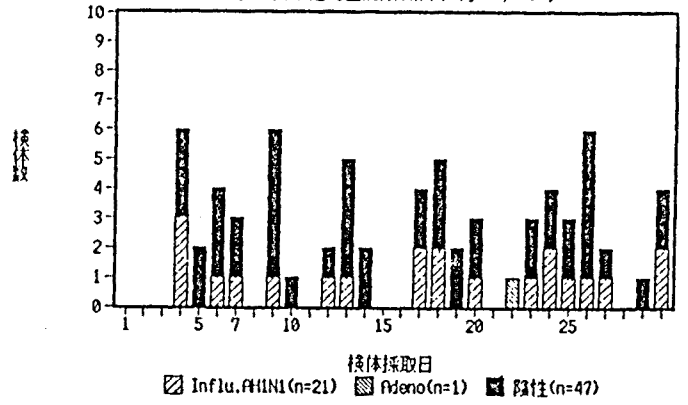


図15-9. 1988年9月~12月までの各医療定点における日別の検体数とウイルス分離成績

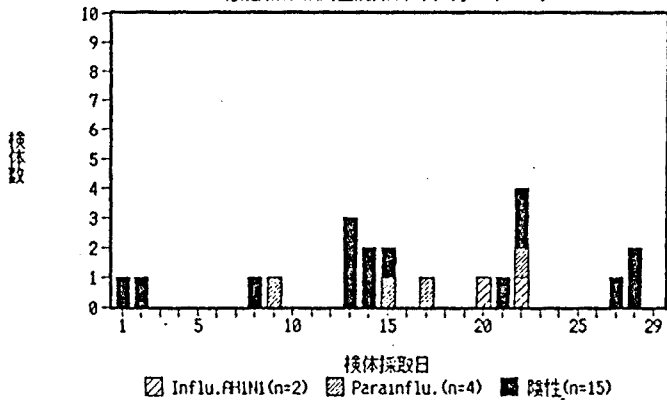
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,1月'89,n=40)



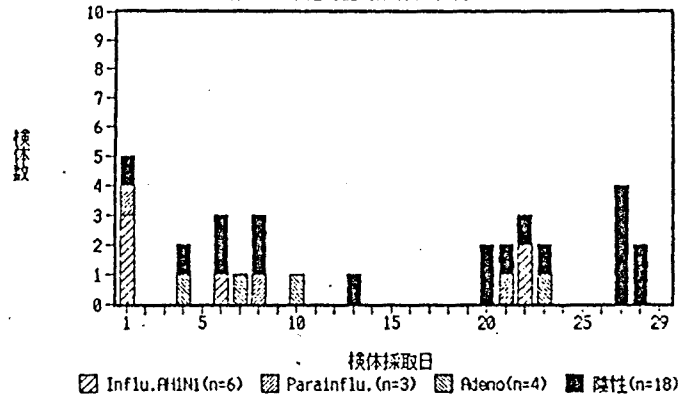
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,1月'89,n=69)



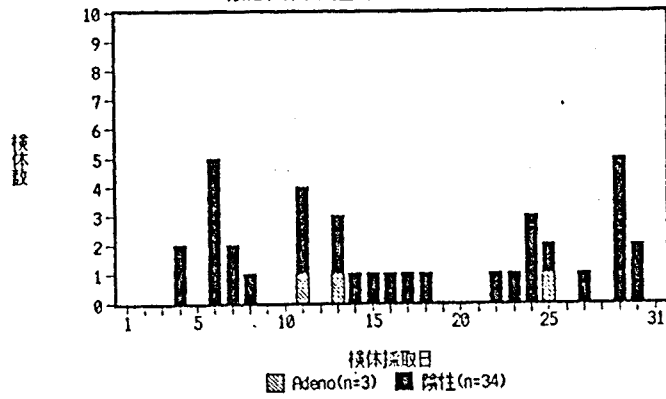
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,2月'89,n=21)



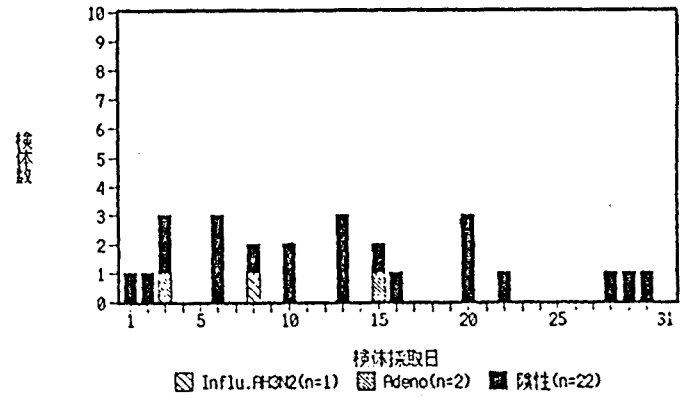
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,2月'89,n=31)



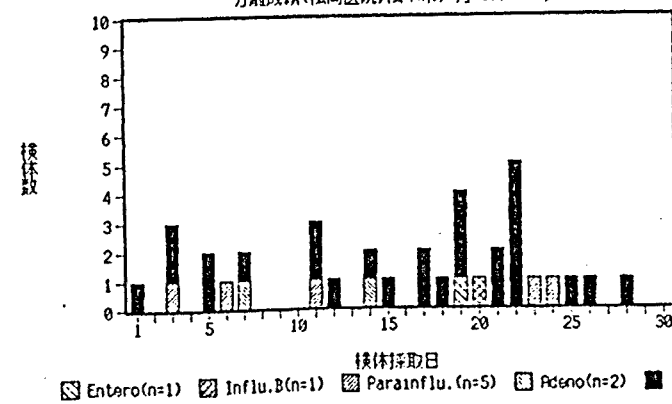
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,3月'89,n=37)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,3月'89,n=25)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,4月'89,n=36)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,4月'89,n=16)

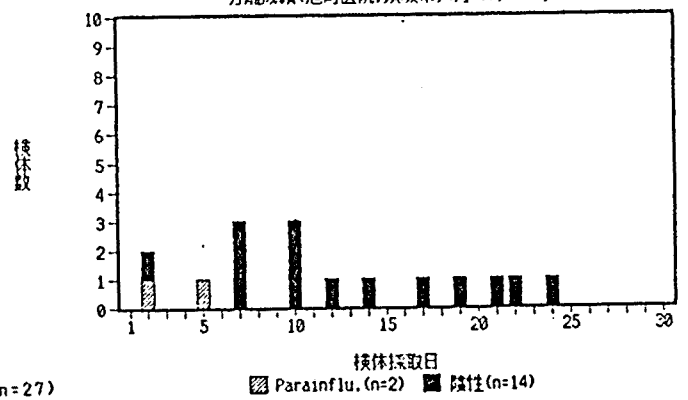
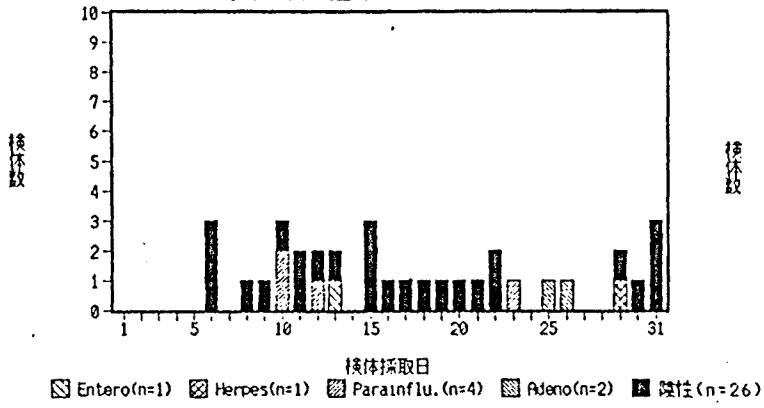
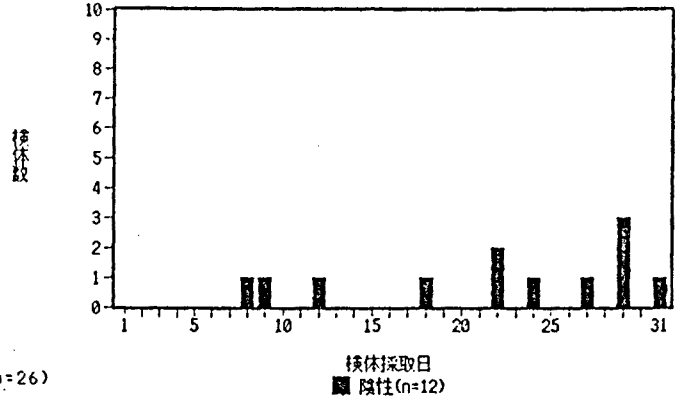


図15-10. 1989年1月~4月までの各医療定点における日別の検体数とウイルス分離成績

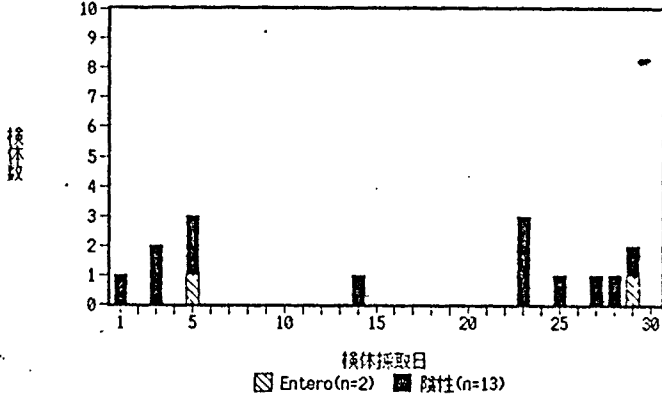
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,5月'89,n=34)



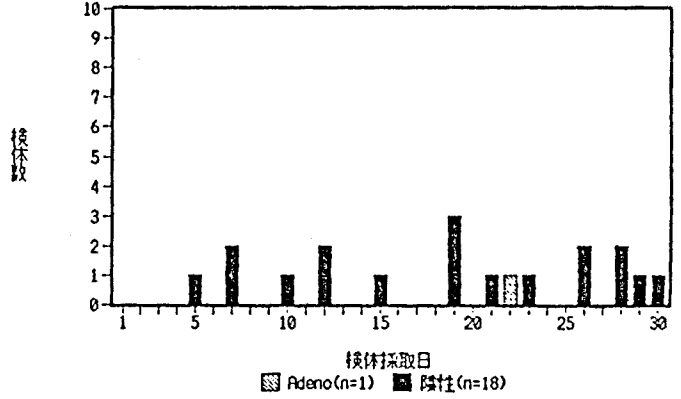
インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,5月'89,n=12)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(松岡医院,松本市,6月'89,n=15)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,6月'89,n=19)



インフルエンザ様患者からの日別ウイルス
分離成績(旭町医院,須坂市,7月'89,n=17)

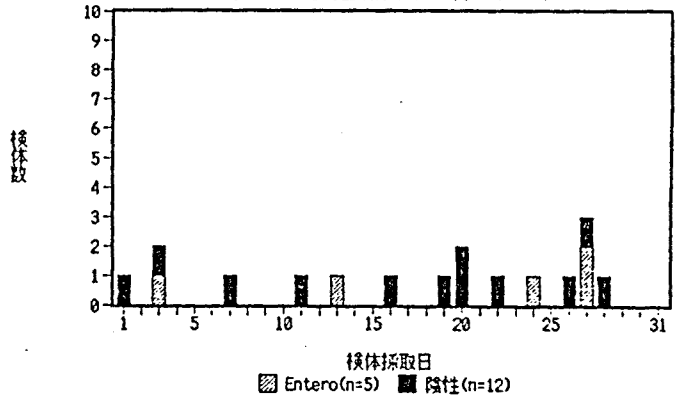


図15-11.1989年5月~7月までの各医療定点における日別の検体数とウイルス分離成績

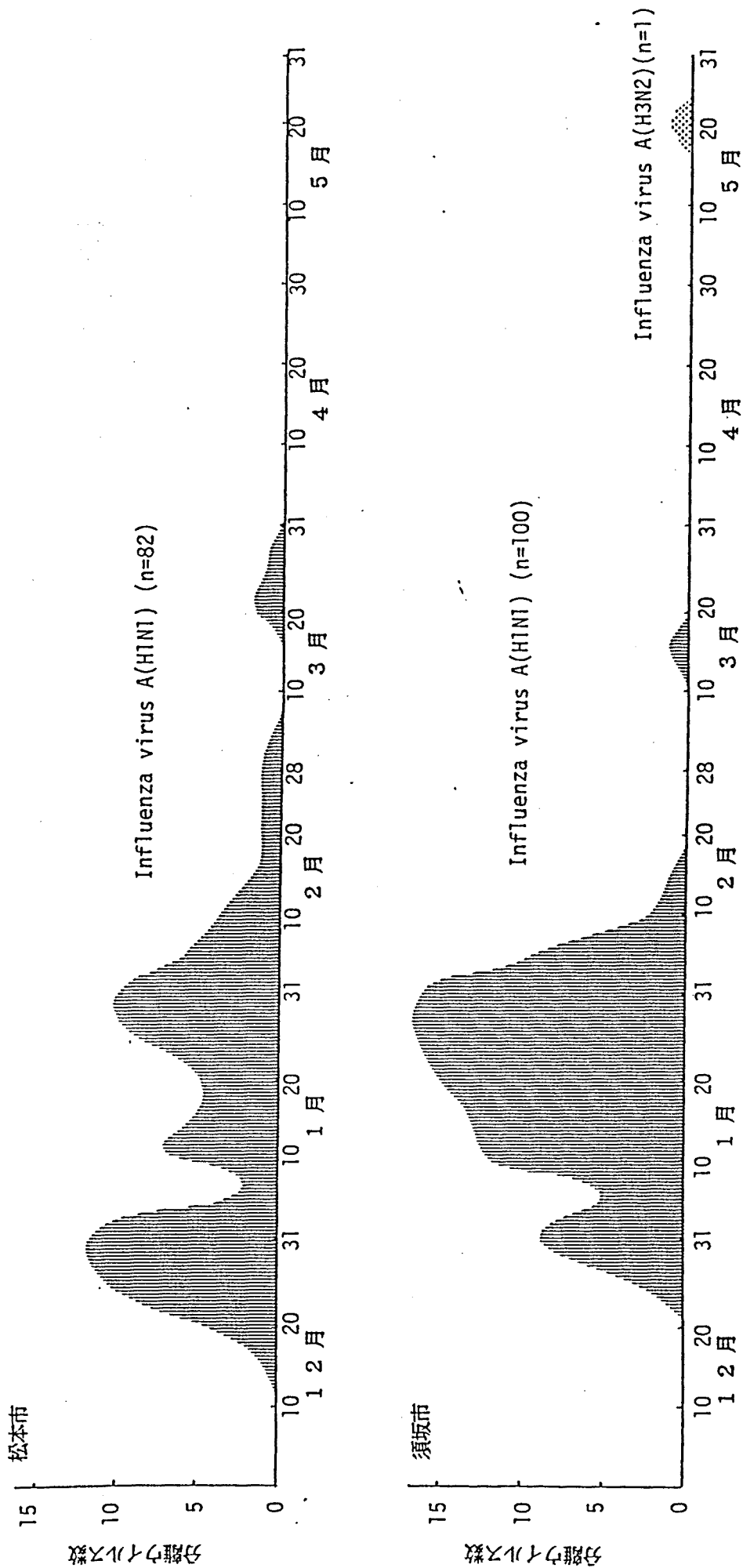


図16. 1986～87年の松本市および須坂市におけるインフルエンザウイルス分離状況

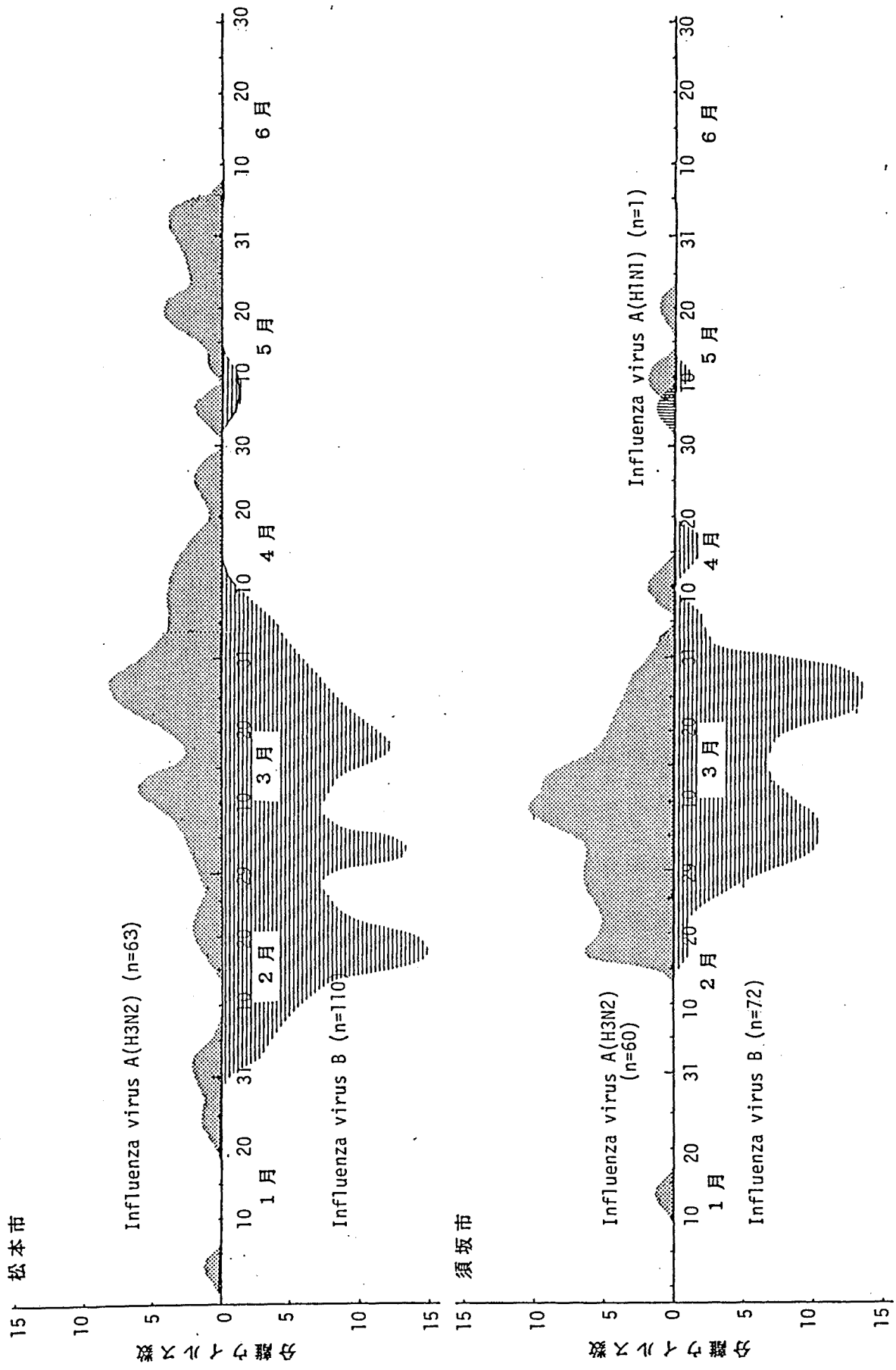


図17. 1987～88年の松本市および須坂市におけるインフルエンザウイルス分離状況

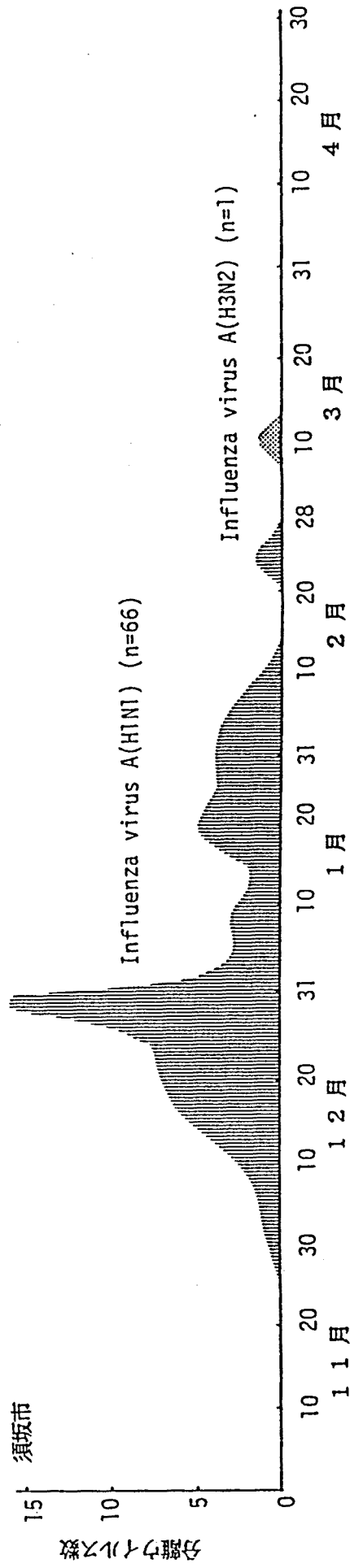
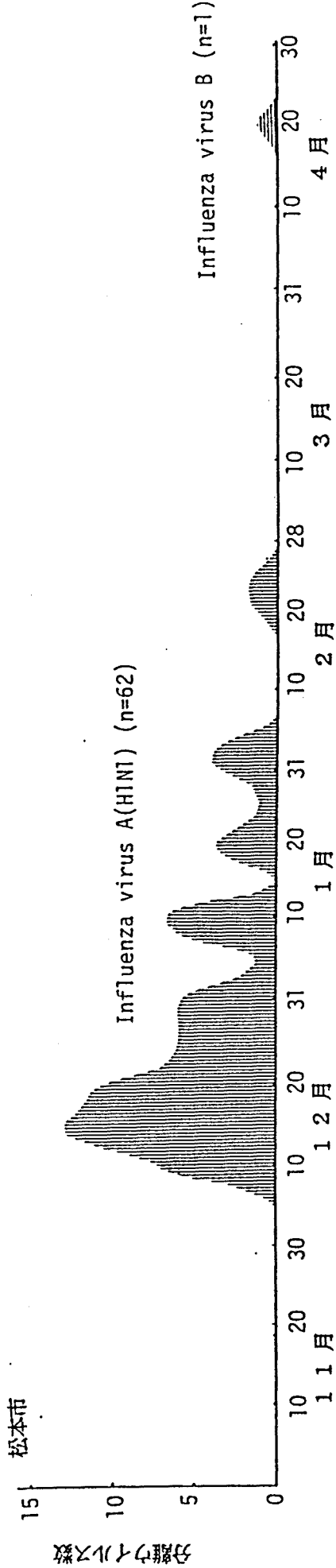


図18. 1988～89年の松本市および須坂市におけるインフルエンザウイルス分離状況

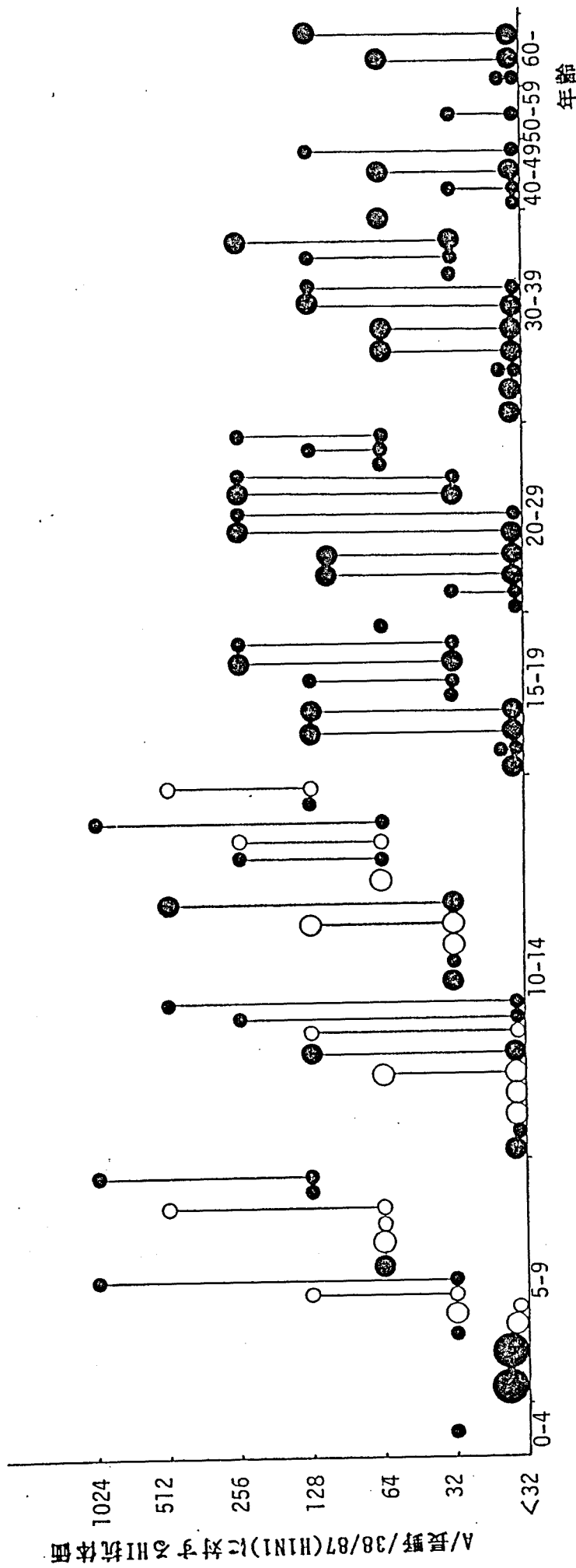


図19. 1986~87年のインフルエンザ流行期にインフルエンザに感染した患者の A/長野/38/87(H1N1)に対する

血清抗体価

○:1名 ○:2名 ○:5名

○:回復期血清抗体価(n=62) ○:ワクチン接種(+)(n=24) 急性期血清抗体価の幾何平均値 回復期血清抗体価の幾何平均値

●:急性期血清抗体価(n=114) ●:ワクチン接種(-)(n=90) ワクチン接種(+):31.1 ワクチン接種(-):23.5 ワクチン接種(+):166.0 ワクチン接種(-):143.7

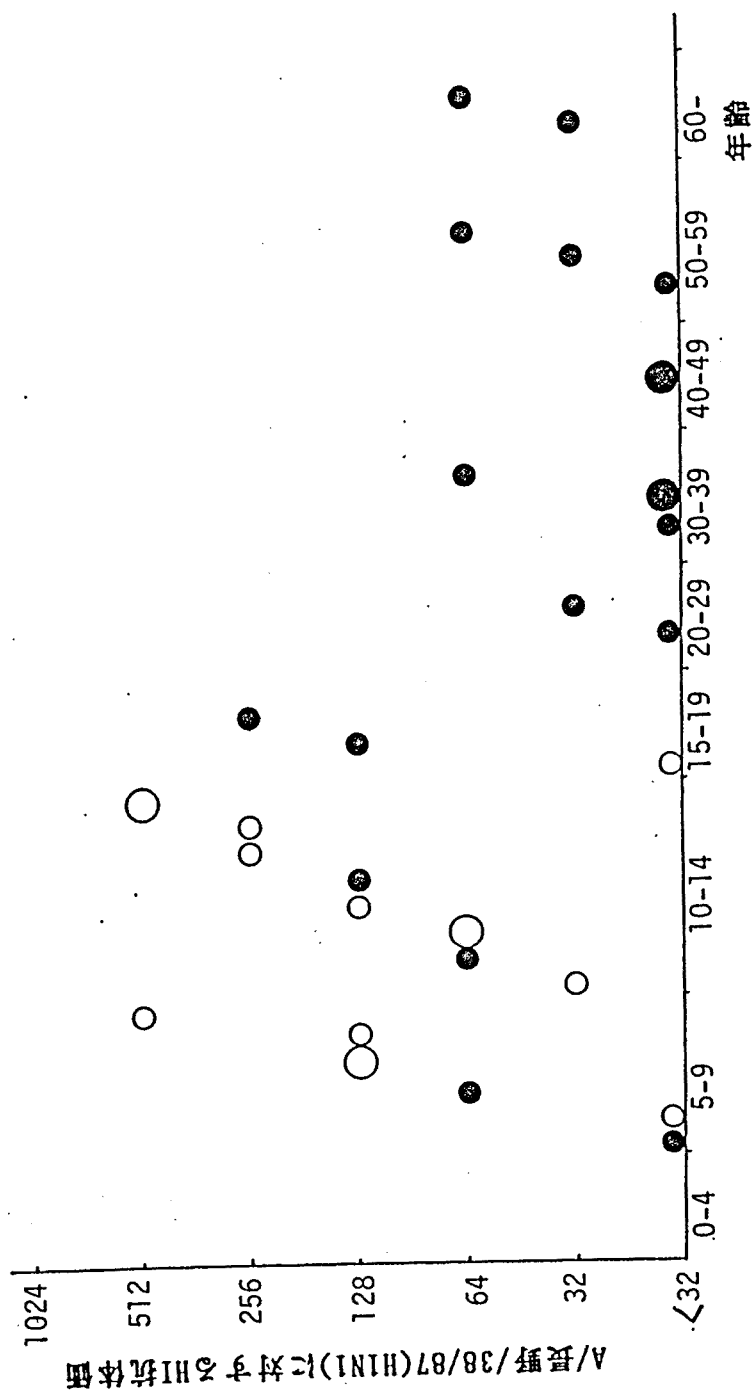


図20. 1986～87年のインフルエンザ流行期にインフルエンザ感染が確認されなかった患者のA/長野/38/87(H1N1)に対する急性期血清抗体価 (n=33)

○: ワクチン接種 (+) (n=14) ○: 1名 ワクチン接種者の急性期血清抗体価幾何平均値: 115.9
 ●: ワクチン接種 (-) (n=19) ○: 2名 ワクチン非接種者の急性期血清抗体価幾何平均値: 37.0

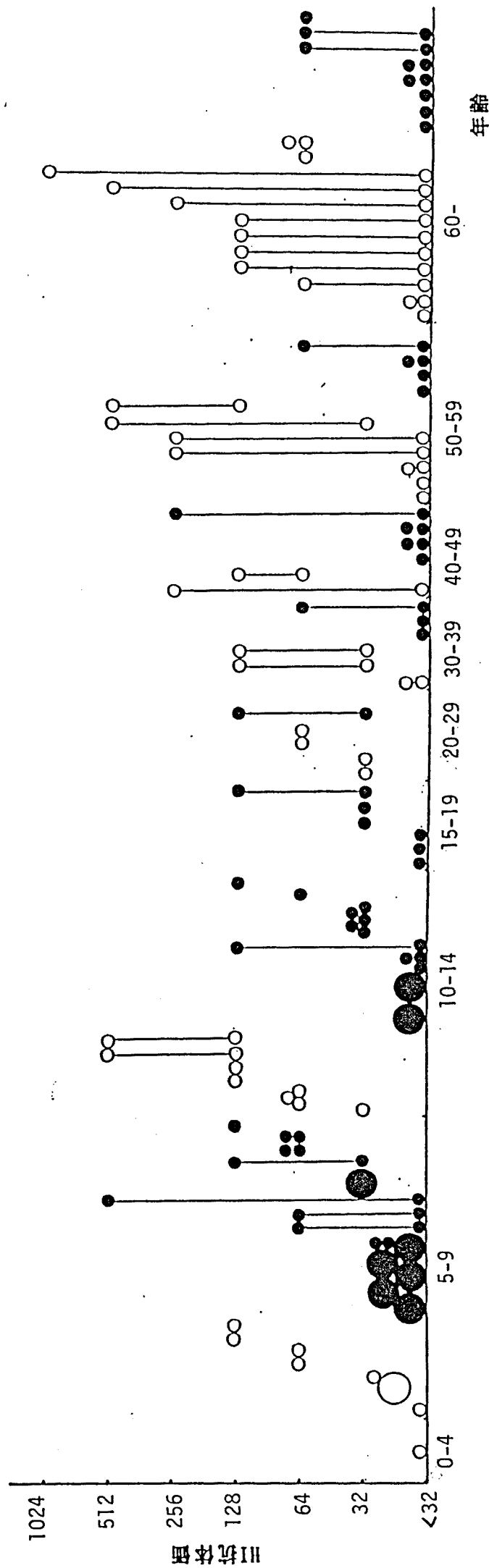


図21. 1987～88年のインフルエンザ流行期におけるインフルエンザ感染者の年齢群別血清抗体価

○: 回復期血清抗体価 (n=40)
○: 急性期血清抗体価 (n=138)

○: 1名
○: 5名

○: A/長野61/88(H3N2)に対する血清抗体価 (n=48) ●: B/長野117/88に対する血清抗体価 (n=90)

急性期血清幾何平均値: 34.4

急性期血清幾何平均値: 20.8

回復期血清幾何平均値: 154.6

回復期血清幾何平均値: 57.0

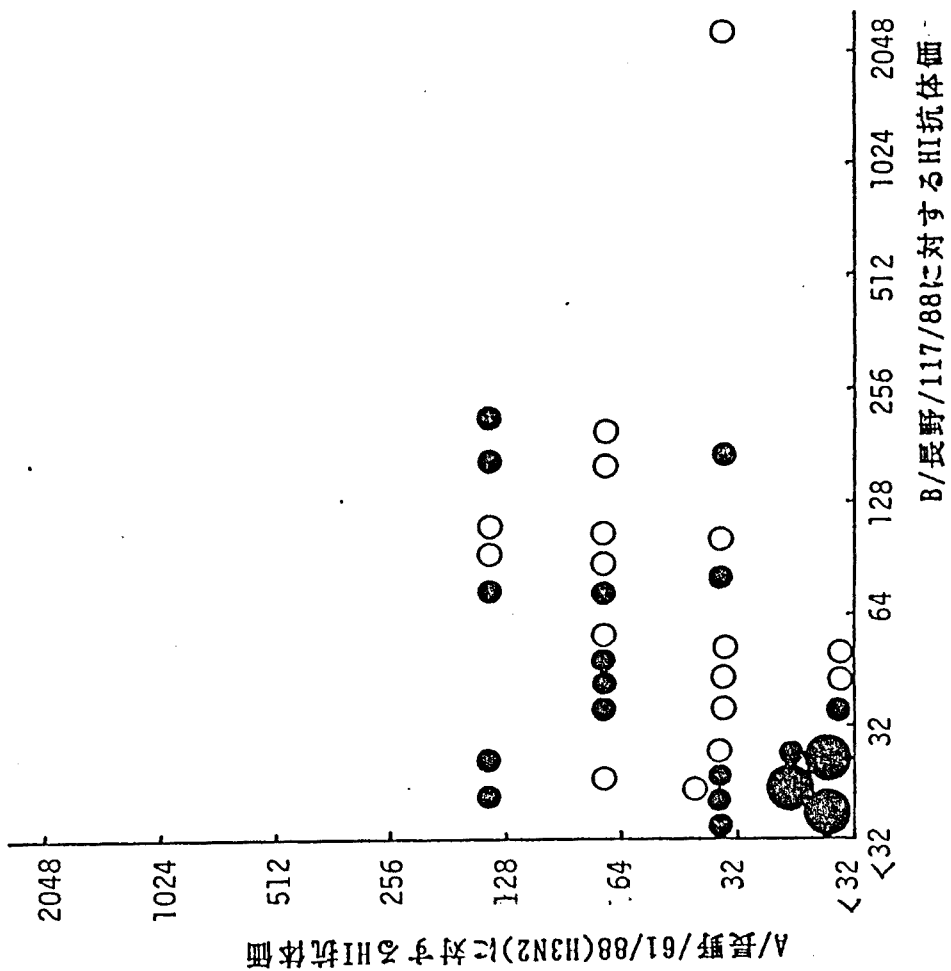
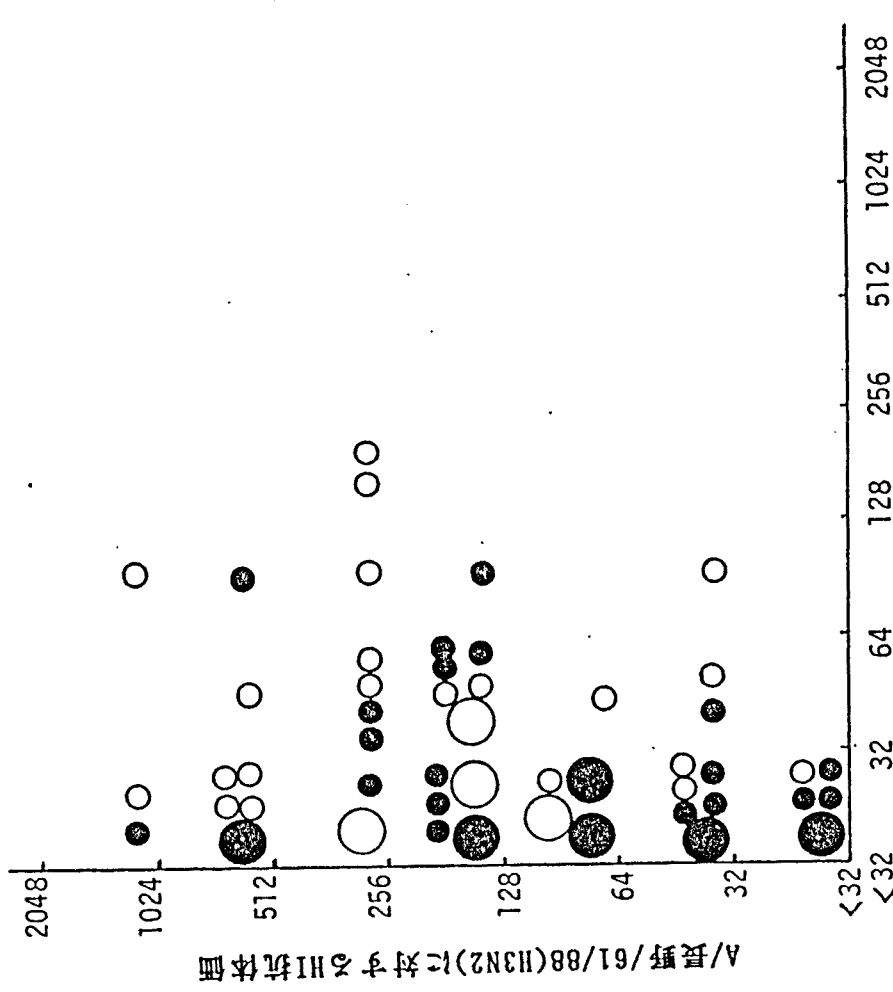


図22. 1987～88年のインフルエンザ流行期にA(H3N2)型インフルエンザに感染した患者のA/長野/61/88(H3N2)およびB/長野/117/88に対する急性期血清抗体価 (n=48)

○: 77名接種 (+) (n=17) ○: 1名 A/長野/61/88(H3N2)に対する血清抗体価の幾何平均値: 34.4
 ●: 77名接種 (-) (n=31) ○: 5名 (77名接種者の平均値: 44.3 77名非接種者の平均値: 29.9)
 B/長野/117/88に対する抗体価の幾何平均値: 32.0
 (77名接種者の平均値: 52.2 77名非接種者の平均値: 24.5)



B/長野/117/88に対するHI抗体価

図23. 1987~88年のインフルエンザ流行期にB型インフルエンザに感染した患者のA/長野/61/88(H3N2)およびB/長野/117/88に対する急性期血清抗体価(n=90)

- : ワクチン接種(+)(n=41) ○: 1名 A/長野/61/88(H3N2)に対する血清抗体価の幾何平均値:104.8
 (ワクチン接種者の平均値:146.5 ワクチン非接種者の平均値:79.1)
- : ワクチン接種(-)(n=49) ○: 5名 B/長野/117/88に対する抗体価の幾何平均値:20.8
 (ワクチン接種者の平均値:24.0 ワクチン非接種者の平均値:18.4)

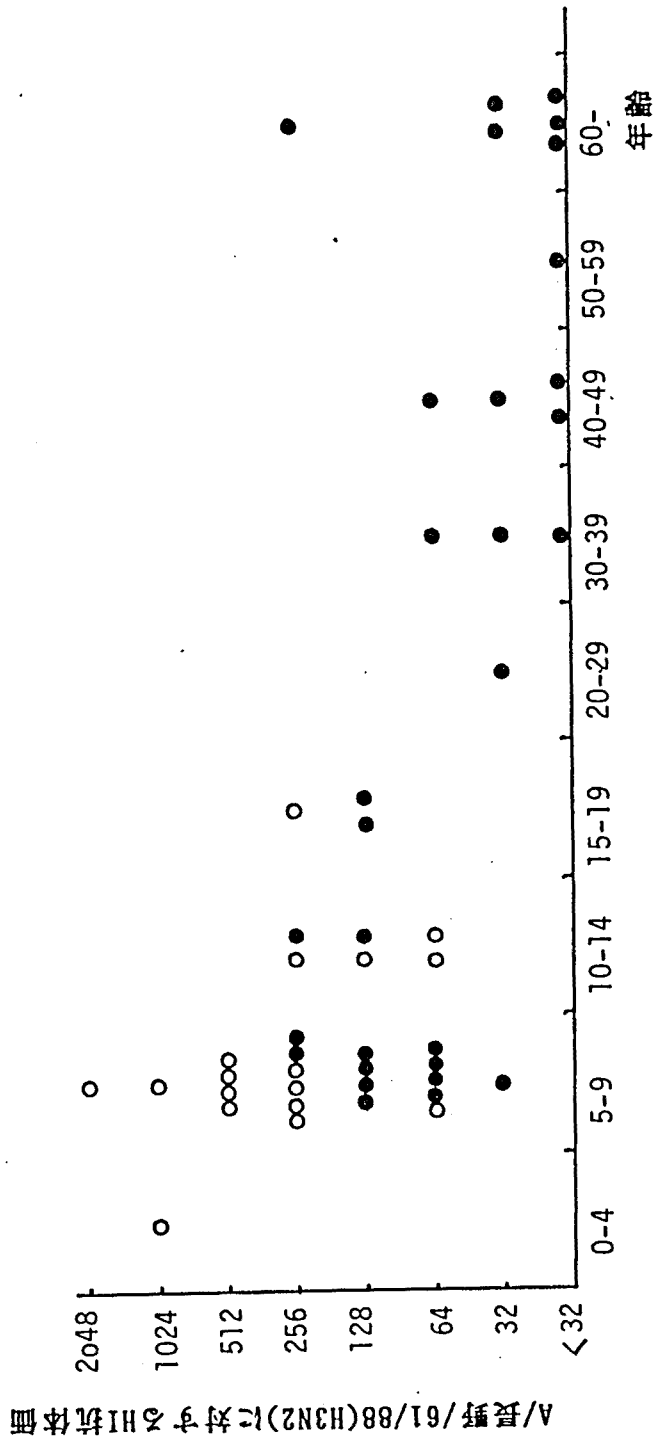


図24. 1987～88年のインフルエンザ流行期にインフルエンザ感染が確認されなかった患者のA/長野/61/88(H3N2)に対するHI抗体価

○: ワクチン接種 (+) (n=17) ワクチン接種者の急性期血清抗体価幾何平均値: 301.0
 ●: ワクチン接種 (-) (n=30) ワクチン非接種者の急性期血清抗体価幾何平均値: 57.0

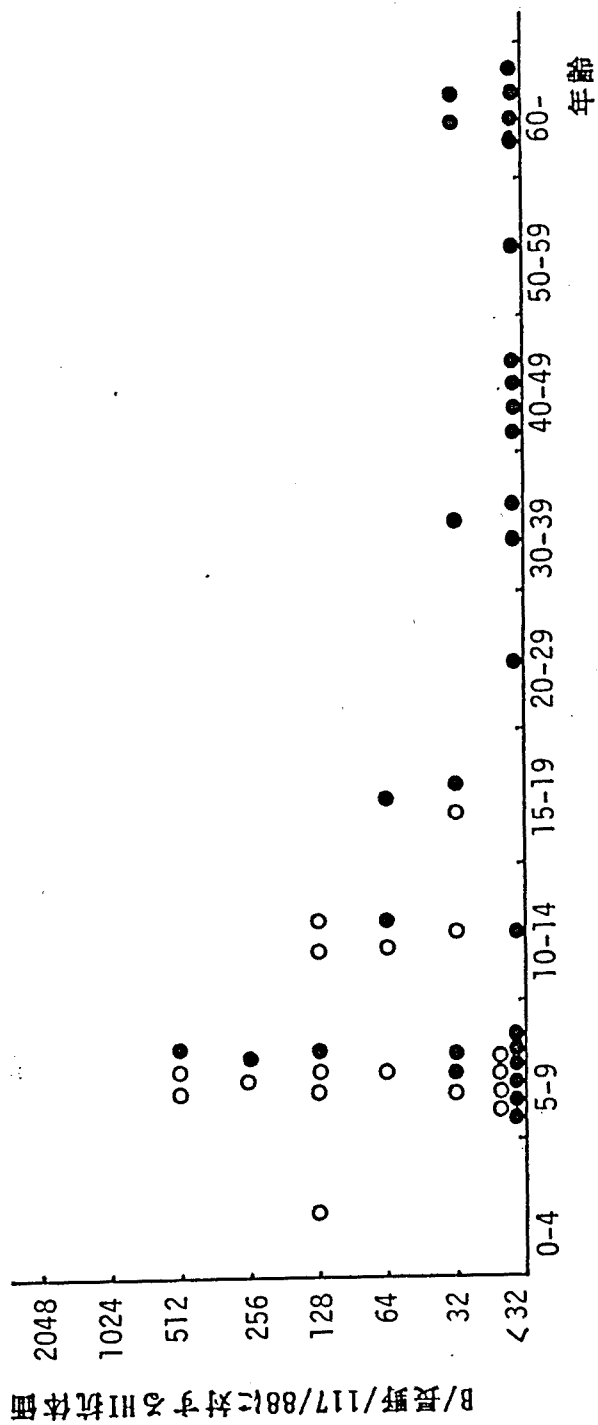


図25. 1987～88年のインフルエンザ流行期にインフルエンザ感染が確認されなかった患者のB/長野/117/88に対する急性期血清抗体価 (n=47)

○: ワクチン接種 (+) (n=17)

ワクチン接種者の急性期血清抗体価幾何平均値: 100.2

●: ワクチン接種 (-) (n=30)

ワクチン非接種者の急性期血清抗体価幾何平均値: 26.6

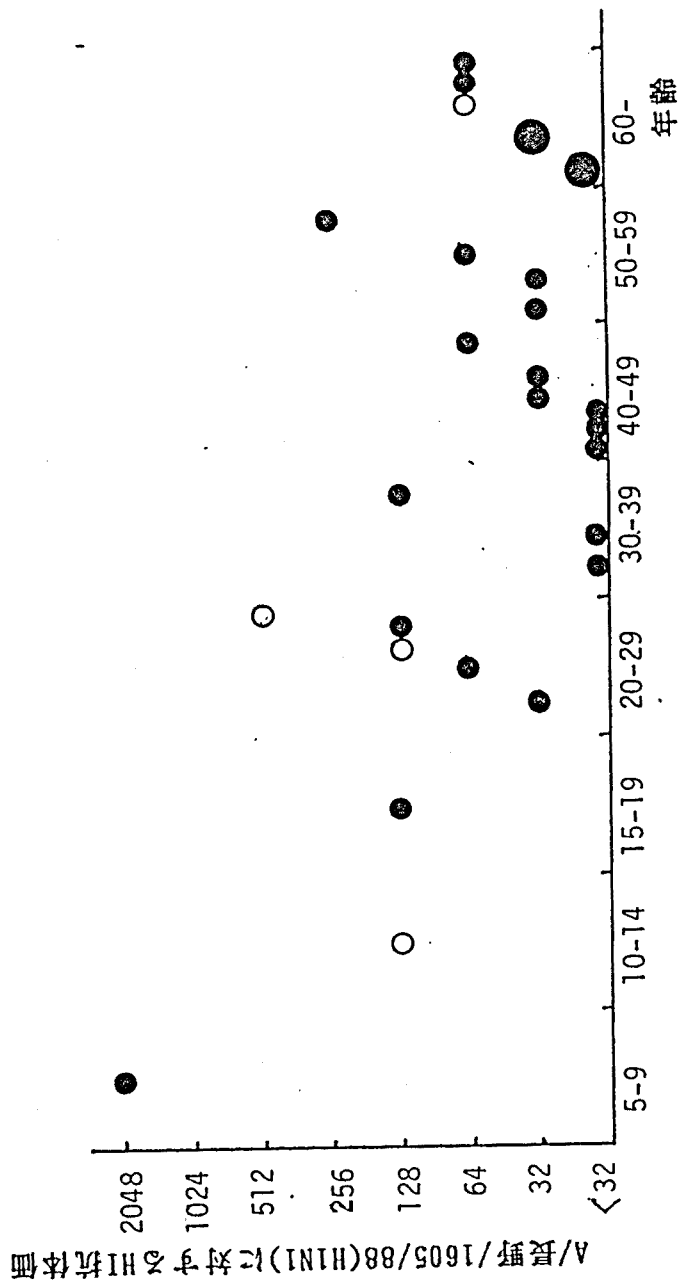


図27. 1988～89年のインフルエンザ流行期にインフルエンザ感染が確認されなかつた患者のA/長野/1605/88(H1N1)に対する急性期血清抗体価 (n=34)

○: ワクチン接種 (+) (n=4) ○: 1名 ワクチン接種者の急性期血清抗体価幾何平均値: 152.2
 ●: ワクチン接種 (-) (n=30) ○: 5名 ワクチン非接種者の急性期血清抗体価幾何平均値: 40.3

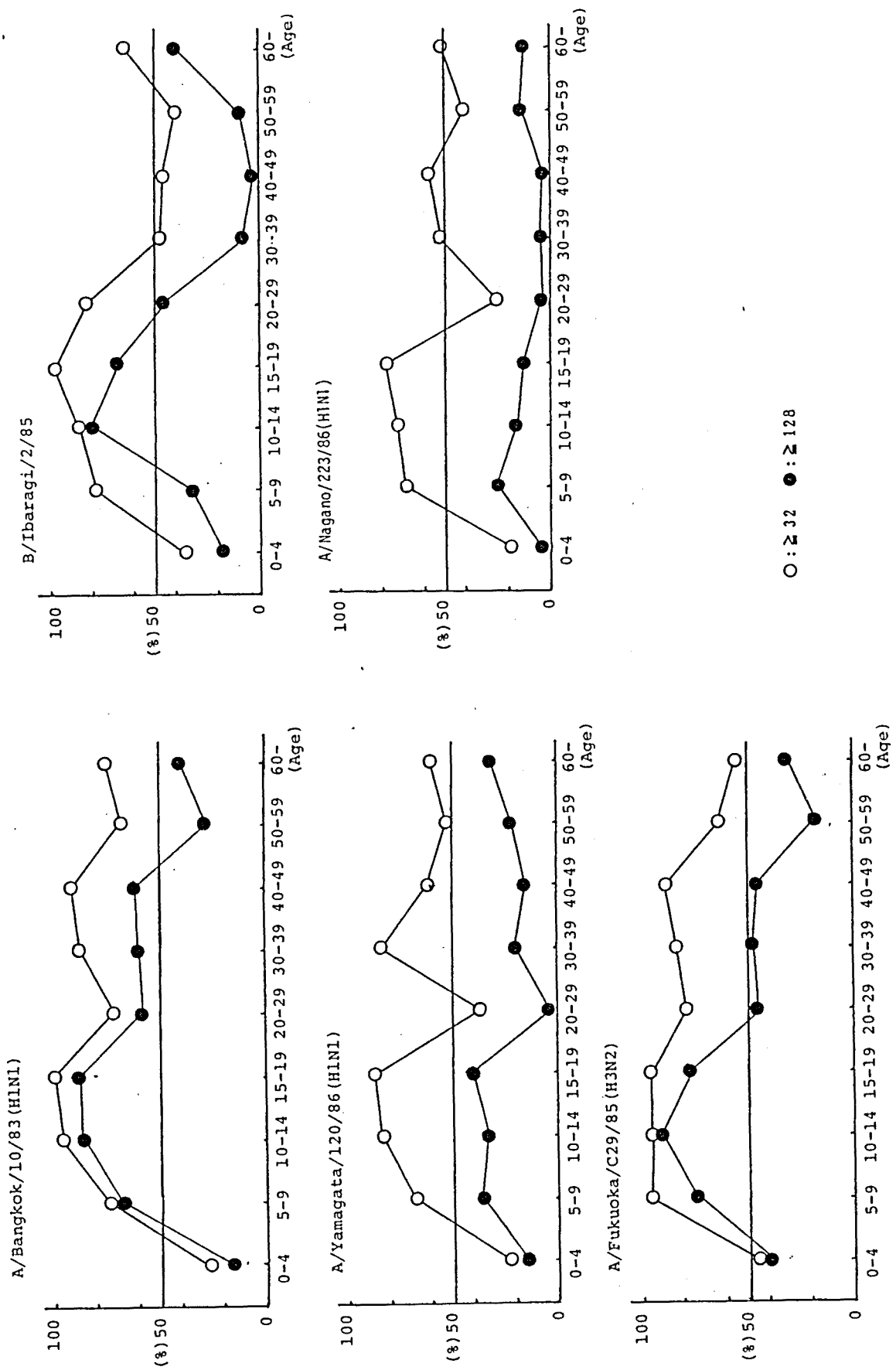


図 28 1986年度インフルエンザワクチン株および1986年4月の分離株に対する年齢群別の抗体保有状況

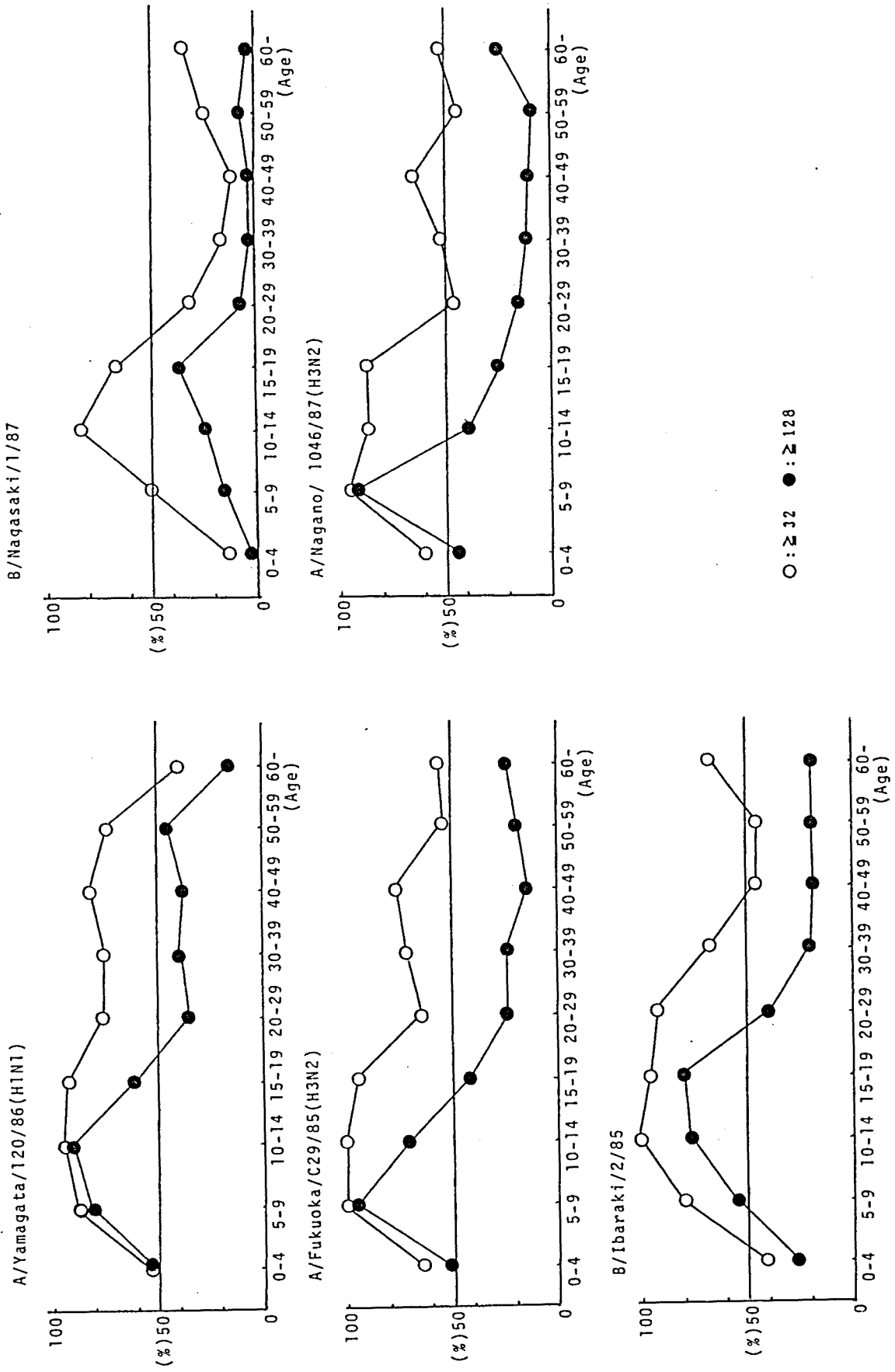


図 29 1987年度インフルエンザワクチン株および1987年5月の分離株に対する年齢群別の抗体保有状況

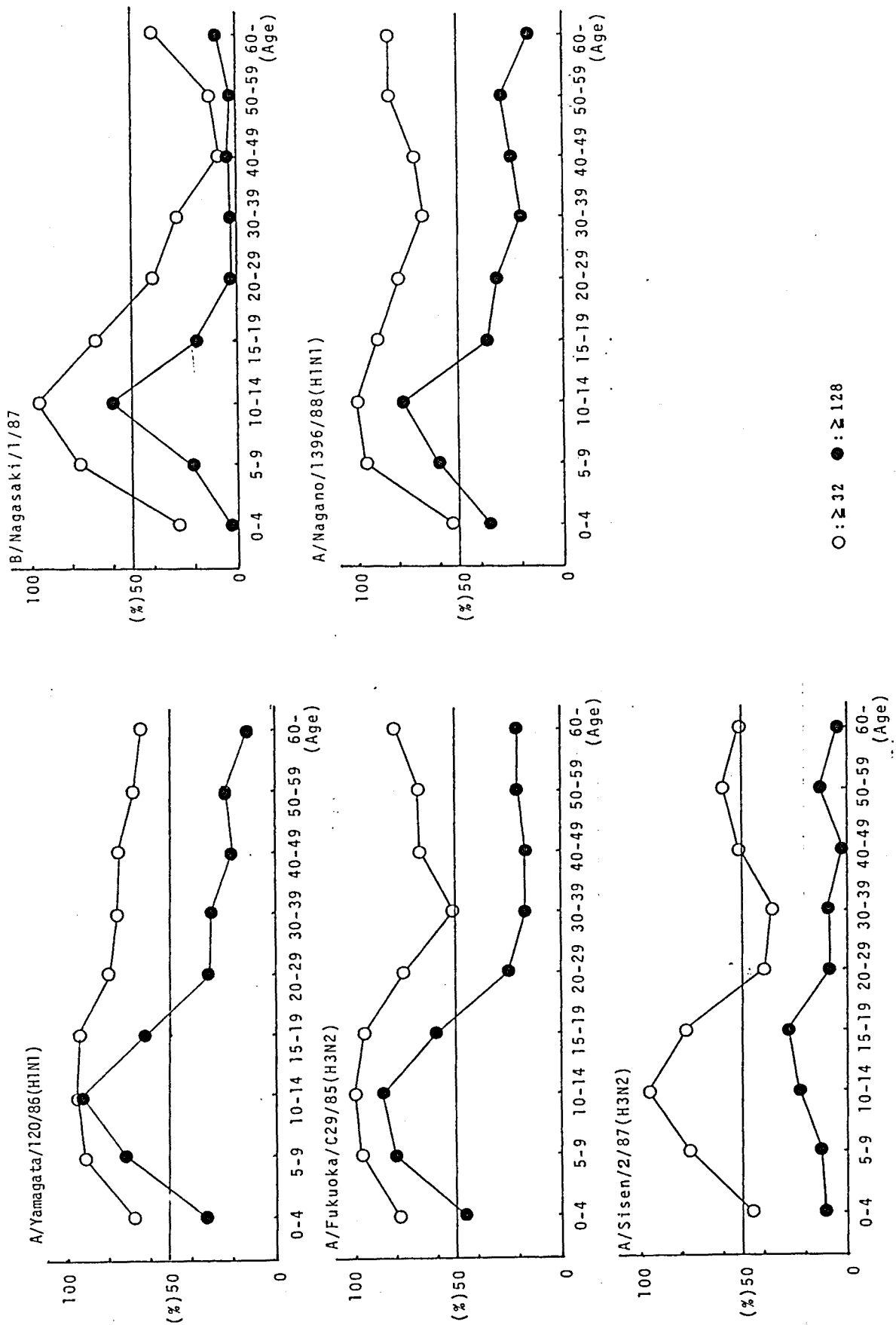


図 30.1988 年度インフルエンザワクチン株および1988年5月の分離株に対する
年齢群別の抗体保有状況

図31、A(H1N1)型インフルエンザウイルスのHA遺伝子の塩基変異

Base No.	USSR/77	YG120/86	NN238/86	TK770/86	NN38/86	NN174/87	NN1396/88	NN1605/88	HS/88	NN1669/89	A.A. No.	A.A. change	TW/86	SP/86	Base No.	USSR/77	YG120/86	NN238/86	TK770/86	NN38/86	NN174/87	NN1396/88	NN1605/88	HS/88	NN1669/89	A.A. No.	A.A. change	TW/86	SP/86
50	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A					754	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	227	A-E		
53	C						U								758	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
57	U			A							2	L-I			761	A	G												
64	C						U				4	A-V			780	C					U								
66	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	5	L-F	F	F	840	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	256	H-Y	Y	Y
69	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	6	A-T	T	T	849	G					U					259	A-S		
81	G				A						10	A-T			856	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	260a	N-S	S	S
143	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U				890	C	U				U									
146	A							G	G	G				896	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
203	A	G												912	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	279	T-A	A	A
209	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U				966	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	297	I-V	V	V
210	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C				986	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
224	A									G	56	I-M			992	C							U	U	U				
245	A	U	U	U	U	U	U	U	U	U	63	K-N	N	N	998	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G				
250	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	65	N-S	S	S	1001	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U				
252	A						G				66	I-V			1022	G		A											
266	C			U	U	U								1039	G	A										321	R-K		
297	U								A		80	S-T			1041	A	G									322	N-D		
302	G								U		81	K-N			1067	U								C					
303	A						G	G	G	G	82	K-E			1068	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U				
362	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G				1103	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G				
371	C					U								1139	U						C								
384	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C				1154	G			A	A	A			A						
401	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U				1172	G			A											
437	C				A									1205	G								A	A	A				
439	A						G				125a	K-E			1223	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U				
440	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A				1229	U	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
446	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	125c	R-S	S	S	1259	U								C					
458	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	129	K-N	N	N	1265	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C				
463	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	131	N-T	T	T	1288	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	404	K-R		
472	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	134	R-K	K	K	1312	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	412	K-R		
476	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A				1314	G	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	413	V-F		
500	G							U	U	U				1322	U						C								
505	A	G	G	G							144	K-R	K	R	1405	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	443	S-N		
545	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G				1416	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	447	A-L		
553	C						U	U	U	U	160	S-L			1435	G		A								453	S-N		
620	U					C								1448	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C				
639	G									A	189	G-R			1466	A					G								
640	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	189	E-G	G	G	1468	A	C	C		C	C	C	C	C	C	464	T-N		
649	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	192	K-R	R	R	1472	A	G	G		G	G	G	G	G	G				
651	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	193	T-A	A	A	1496	U						C							
661	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	196	R-Q			1520	A	G	G	G	G	G		G	G	G				
662	G	U	U	U	U	U	U	U	U	U	196	H	H	H	1553	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C				
664	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	197	K-T	T	T	1565	G	A												
696	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	208	N-H	H	H	1622	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C				
703	A							G	G	G	210	N-S			1628	U	G	G	G	G	G	G	G	G	G				
729	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	219	E-K	K	K	1685	C	U	U	U										
748	G		A	A	A	A	A	A	A	A	225	G-D			1718	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U				

A/USSR/92/77のHA遺伝子と比較し変異した塩基の位置だけを示した。

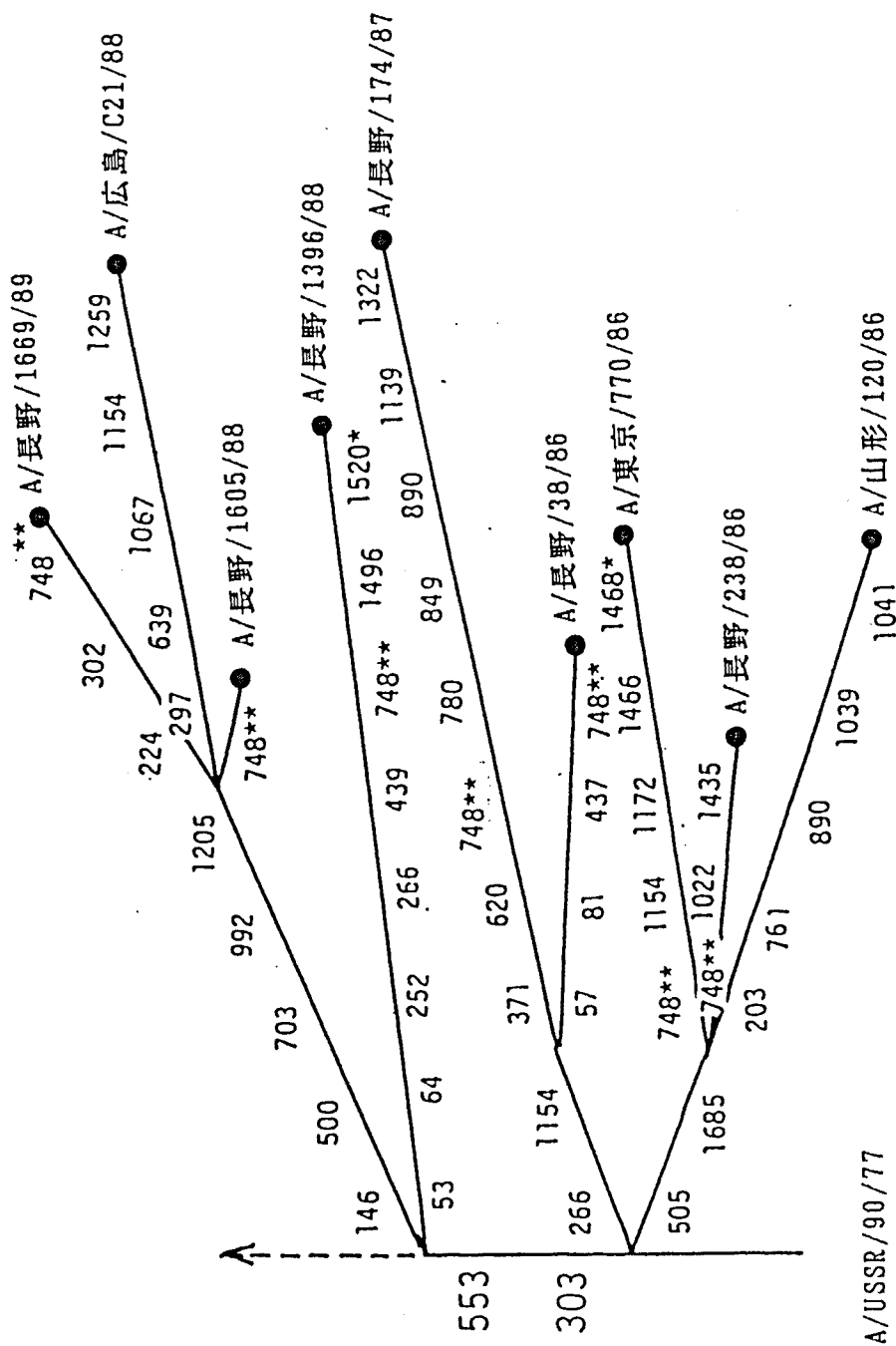


図32. 1986～89年の間に分離されたA(H1N1)型インフルエンザウイルスについての

HA遺伝子の進化系統樹

縦軸は主流の変化，横軸は株特異的变化を示す。また，図中の数字は変異した塩基の位置を示す。

*はA/USSR/90/77と同じ塩基 **は卵馴化依存性の変異に関連した変異

図33. A(H3N2)型インフルエンザウイルスのHA遺伝子HA1領域の塩基変異

Base No.	Sitchuan/87	NN1046/87	KT421/87	TK1276/87	CB/88	NN1185/88	NN184/88	KB/88	KT612/88	CM/88	KG/88	AI/89	KT13/89	NN1749/89	KT248/89	A.A. No.	A.A. change
38	U						C	C									C
54	U		C	C													-8 Y-H
75	G											A	A	A			-1 A-T
83	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		
102	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	9	S-G
125	A		U														
128	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U		
173	U																C
176	G											A	A	A	A		
177	A							G	G							34	I-V
191	U	C															
205	U	C															43 V-A
222	G	A															49 G-S
225	A																C
226	G		U														50 R-I
260	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		
272	A								G								
290	G					A											
314	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
321	G					A	A					A	A	A	A	82	E-K
324	A											G	G	G	G	83	K-E
353	A		G	G													
358	U	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	94	F-Y
383	G							A	A								
386	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G		
395	C							U	U								
414	G							U								113	A-S
419	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		
422	A					U											
428	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
434	G					A											
448	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	124	G-D
468	A									G	G	G	G			131	T-A
475	G		A					A	A							133	S-N
488	U													C			
489	G	A				A	A	A	U	A		A		A		138	A^T
508	A	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	144	D-V
521	C									U	U	U					
528	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U		

Base No.	Sitchuan/87	NN1046/87	KT421/87	TK1276/87	CB/88	NN1185/88	NN184/88	KB/88	KT612/88	CM/88	KG/88	AI/89	KT13/89	NN1749/89	KT248/89	A.A. No.	A.A. change
540	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	155	Y-H
543	G	A					A							A		156	E-K
552	A	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	159	S-Y
553	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		
565	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	163	V-A
576	A									G						166	T-A
596	U	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	173	N-K
602	C													U			
606	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U		
623	U	A															
633	A	G														186	S-G
634	G	U	U	U													
638	G		U						A	A							
643	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	189	S-I
698	G											A	A	A	A		
714	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	213	I-V
752	U								C	C							
758	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
764	A													G	G	G	
770	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
807	U													C			
809	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G		
818	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
820	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	248	N-T
821	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
842	G				A												
860	G													A	A	A	A
866	G																A
896	U													C	C	C	C
949	A													G			
953	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	291	D-G
965	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U		
973	A													G	G	G	G
997	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	307	K-R
998	G	A			A	A		A	A			A	A	A	A		
1004	U					A											
1007	G													A	A	A	A
1022	G	A	A	A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A		

A/Bangkok/1/79のHA遺伝子と比較し変異した塩基の位置だけを示した。

