

氏名(本籍)	中村和幸(長野県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第296号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 教授 田淵 清 (副査) 教授 清水 武彦 教授 小西 信一郎

論文内容の要旨

わが国におけるインフルエンザ流行は、おもに冬期に突発的に始まり、爆発的に拡大して行く。このような流行が毎年周期的に繰り返されているにもかかわらず、いまだにその流行実態についてさえも不明の点が多く残されている。

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つて、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行くなど疫学的な解析を積み重ね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、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。

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。

さらに、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、いわゆる前駆波現象が観察された。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。本論文の概要は以下のとおりである。

1. インフルエンザウイルス分離方法についての検討

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30mg/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29.5mg/mlのトリプトスリン酸ブロス液を10%添加した培養液、ESK 細胞には100mg/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200rpm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、WHO 標準法での吸光度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（松本市、須坂市）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、松本市は須坂市より約1～2週間程早期に認められた。

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、ワクチン接種を励ま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：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歳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 (H1N1) 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 (H3N2) 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、ウイルス RNA を直接鋳型としてダイデオキシ法により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個所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ていたが、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。

論文審査の結果の要旨

ヒト・ウマ・ブタ・トリなどのインフルエンザの病原体は *Orthomyxoviridae* 科・*Influenzavirus* 属のウイルスであって、このビリオンはエンベロープを有するマイナス・1本鎖RNA・分節型ゲノムからなる。この構造蛋白のM(マトリックス蛋白)・NP(核蛋白)は型特異的(A, B, C型)であり、HA(赤血球凝集素)・NA(ノイラミニダーゼ)は亜型特異的であって宿主域に参与する。B型並びにC型インフルエンザウイルスには亜型は認められないが、A型ウイルスには多数の亜型(H 1~13, N 1~9)が存在し、このHA・NAは種々の程度の変異を容易におこすことが知られている。それ故、わが国での本症の流行は周期的に毎年冬期に認められているものの、この流行実態は未だ十分に解明されるに至らず、防疫対策が不完全なままとなっている。

著者は、ヒト・インフルエンザの流行実態を正確に把握し、その流行と抗原変異との関連性を明らかにする目的で、ウイルスの即応的分離方法とその分離指標の確立を出発点とし、その応用により疫学的検索を重ねるとともに分離ウイルスの抗原変異並びにその進化方向の解析を試みた。その結果、分離ウイルスの遺伝的関連性等から次期流行ウイルスを予知することに成功した。本研究の概要は次のとおりである。

1. インフルエンザウイルス分離方法についての検討

MDCK(犬腎由来株化)細胞およびESK(豚腎由来株化)細胞は、新生仔牛血清・メチルセルロース添加のMEM Joklik 浮遊培養液を基礎培地とし、さらにMDCK用にはトリプトースリン酸ブロス添加、ESK用にはポリペプトン添加培養液でスピナーフラスコを用い、37°C・200 rpmの搅拌培養により良好な増殖成績を得た。この細胞浮遊液へのウイルス接種によるHA産生性は、細胞濃度がMDCKで 5.5×10^6 /ml、ESKは 6.0×10^6 /mlレベルで最良であり、発育鶏卵や単層培養細胞での成績と同等であった。

また、MDCK細胞は低温保護剤としてジメチルスルホオキシドを添加して-80°C・6ヶ月保存後にも95

80%以上の生存率を示し、この（凍結）保存細胞でのウイルス増殖性も単層培養細胞での成績と同等の結果が得られた。

2. インフルエンザウイルス分離指標についての検討

本ウイルスの増殖指標としてのHA活性とNA活性が検討された。ウイルス分離例の初代培養におけるHA活性はニワトリ赤血球よりモルモット赤血球で良好であった。特にA (H1N1) 型ウイルス分離例ではニワトリ赤血球に対するHA陰性（1：4以下）例が48.8%（79/162）に認められたのに対して、モルモット赤血球では全例陽性を示した。

また、HA陰性例にはNA活性の陽性（WHO標準法の吸光度0.05以上）例と陰性例が認められた。このNA陽性例は次代培養によりHA陽性となり、ウイルスの分離効率をあげることが可能となった。

3. インフルエンザ流行についての疫学的検討

長野県松本市と須坂市（1986年1月～1989年7月）並びにタイ国チェンマイ市（1986～1989年の毎8月）の医療定点におけるインフルエンザ様患者から、浮遊培養 MDCK 細胞によるウイルス分離を試みるとともに、血中抗体価の変動等について検討した。

ウイルス分離成績からは、医療定点における本症の流行ウイルスの種類、流行開始および終息の時期を正確に把握することができ、ほとんどの流行ウイルスを流行前に前駆波ウイルスとして捉えることができた。

インフルエンザ流行期の患者血中抗体価と感染・発症およびワクチン投与との関係については、そのウイルス分離率からインフルエンザ増幅集団は幼若年齢層のみならず、青年層および高齢者も感受性集団とみなす成績であった。本症感染者の急性期血中抗体価はワクチン接種の有無に関わらず流行株に対して1:128以上の抗体の保有者は認められなかったが、非感染者では抗体価が明らかに高水準であり、特にワクチン接種の非感染者では感染防御に十分な免疫状態であった。

4. インフルエンザウイルスの抗原変異および進化

分離ウイルスについて、ワクチン株およびその他の標準株の抗血清を用いた交差血球凝集抑制反応（HI）による抗原分析並びにHA遺伝子塩基配列の解析による分子進化について検討した。

1986年8月のタイ国チェンマイ市で分離されたA (H1N1) 型ウイルスはA/山形/120/86類似のウイルスで、わが国での1986～87年の前駆波ウイルスおよび1988～89年の主流行ウイルスのタイプであった。

1987年8月のタイ国チェンマイ市で分離されたウイルスにはA型ウイルスの他、B型ウイルスとしてB/長崎/3/87類似のウイルスも分離された。このB型ウイルスは1987～88年の長野県における流行ウイルスと同一タイプであった。

1988年8月タイ国チェンマイ市で分離されたA (H3N2) 型ウイルスはA/福岡/C29/85類似ウイルスとこれからやや変異したタイプの2種が認められた。前者はわが国で1987～88年の流行期に分離されたウイルスとほぼ同一タイプであり、後者のウイルスはわが国で1989～90年の流行ウイルスと同一タイプであった。

前駆波ウイルスとして捕捉されたA (H1N1) 型およびA (H3N2) 型ウイルスについて、ウイルスRNAを直接鋳型としたダイデオキシ法によりHA遺伝子の塩基配列を解析し、その進化系統樹から前駆波ウイルス

と次期流行ウイルスとの遺伝的関連性を明らかにすることができた。すなわち、1986～87年の流行期に分離されたA (H1N1) 型ウイルスは1986年春の前駆波ウイルスと同一の遺伝的起源に由来するものと推定された。1988年春に分離されたA (H1N1) 型ウイルス A/長野/1398/88) は前流行期のA (H1N1) 型ウイルスから2カ所変異を生じたものであり、その冬の流行ウイルスはA/長野/1398/88とは異なった系統樹側枝上に位置していたことからこの流行ウイルスとの直接的関連性が否定された。

また、1987年春に分離されたA (H3N2) 型ウイルス (A/長野/1046/87) はその冬の流行ウイルスおよびタイ国チェンマイ市で分離されたA/Chiang Mai/156/88とともに遺伝的近縁関係にあって同一起源によるものと推定されたが、1987～88年の流行期に東京・千葉で分離され、1988年夏に神奈川で分離されたウイルスはともにA/長野/1046/87とは異なった起源をもち、A/四川/2/87近縁のウイルスと推定された。

著者は本研究によって、インフルエンザウイルスの即応的分離方法並びにその高感度分離指標を検討・確立し、この応用にて分離したウイルスの抗原変異並びにその遺伝学的関連性の解析結果から、ウイルス病の防疫対策上最も重要な疫学的予知に成功した。

本研究は病原ウイルス学並びに予防医学上寄与するところ多大であり、博士(獣医学)の学位を授与するにふさわしい業績と評価する。