

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

[論文要旨]

中村和幸

1991

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細胞の扱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ヶ月後も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が認められた。

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、育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(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。