

インフルエンザの疫学並びに血清学的研究 — B型分離株のクローン解析並びに B型 代表株の抗血清存在下継代培養実験 —

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

平 松 宗 成

（昭和57年10月30日受稿）

Key words : Influenza virus B type,
Plaque cloning,
HA antigenicity,
Presence of antibody

緒 言

インフルエンザウイルスの患者材料からの分離やプラーク定量などに用いられて来た種々の初代および株化細胞がある。その中、GaushおよびSmith¹⁾はイヌ腎由来の株化細胞(MDCK)が幾つかのA型およびB型株のプラーク定量に用いることを示した。

1975年飛田ら^{2),3)}は本細胞はトリプシン加培養液を用いることにより、A型・各亜型各種およびB型・各株、全般により効率よくプラークを形成すること報告した。以来本細胞を用いての患者材料からのウイルス分離が試みられ、その分離率はこれまでの発育鶏卵培養法⁴⁾に匹敵した^{5)~7)}。

このようなMDCK細胞のインフルエンザウイルスに対する高い感受性は培養基に馴化していない患者材料や分離当初の株中の本ウイルスのプラーク・クローニングに応用出来る。従って自然界で現に流行中の本ウイルスの諸性状を直接クローン単位で調べることが可能である。

筆者は上述のMDCK細胞の特性に着目し、岡山県下での1973年から1977年間の分離当初のB型株より本細胞によるプラーク・クローニングを行い、諸性状の内HA抗原性についての検討を試みた。また1973年、1977年両年の代表

的な流行型を抗血清存在下に継代培養し、*in vitro*でのHA抗原の変異性についての検討も併せ行った。

実験材料並びに実験方法

1) ウイルス株

岡山県下での1973年から1977年間に於て、集団かぜ発生施設の患者から分離された9株のB型株をプラーク・クローニングに供した。1973年—74年の5株は発育鶏卵、1977年の4株はMDCK細胞によるそれぞれ培養初代の分離株である。抗血清存在下継代培養実験には以下の株を用いた。すなわち両年の代表的な流行型であり、且つその後のワクチン株に採用されたB/岐阜/2/73株およびB/神奈川/3/76株（以下それぞれ岐阜株、神奈川株と略す）を使用した。

2) プラーク・クローニング

使用細胞は国立公衆衛生院より分与されたイヌ腎由来の株化細胞(MDCK)である。細胞の調製およびプラーク法の手技は飛田²⁾の方法に準拠した。次で毛細管ピペットを用いて各検体につき30~50個のプラークよりクローニングし、1mlの0.2% BA加、PBS (+)に採取した。その0.1mlをPBS (+)で3回洗浄したMDCK単層チューブに接種し、34°C、30分間放置後1mlの維持液²⁾を加え、34°Cに静置した。細

胞変性（以下 CPE と略す）が最大になった時培養液を採取し、3,000rpm、5 分間の遠心上清を抗原分析に供した。

3) 抗血清存在下培養法

岐阜株および神奈川株を MDCK 細胞によるプラーク法で 2 度クローン純化後、チューブ法で 1 代増殖したウイルス（親ウイルス、OG）の一定量を MDCK 単層チューブに接種した。次で 34°C、30 分間放置後、2 倍階段希釈ホモ抗血清（ラット免疫血清を RDE で処理後ニワトリ赤血球で吸収したもの、以下の抗血清も同様の処理を行った。）を添加し、34°C に静置した。抗血清無添加の対照に比し 8～24 時間遅れて CPE が最大となるチューブより培養液を採取し、以後同様に 10 代まで継代培養を行った。また 5 代目および 10 代目より各 30 クローンを分離し、以下の実験に供した。

4) 抗原分析

抗原分析はマイクロ法による赤血球凝集抑制（以下 HI と略す）試験で行った。分離株より得たクローンウイルスの抗原分析には岐阜および神奈川マウス抗血清を、抗血清存在下継代培養 5 代目、10 代目およびこれらより得たクローンウイルスについては岐阜および神奈川ラット抗血清を用いた。

実 験 成 績

1) 分離株のクローン解析

(1) 1973 年分離株クローンの HA 抗原性

供試株の HA 抗原性は表 1 に示す如くで、岐阜株類似の 4 株（No. 1～No. 4）から得た各 50 クローンの HI 試験を行った（図 1）。No. 2, No. 3 由来のクローンはすべて岐阜株類似であった。しかしながら No. 1 および No. 4 由来のクローンは種々異なる HI 価を示し、岐阜株類似のクローンの他、両抗血清に同価を示すものや神奈川株類似のクローンが混在した。

(2) 1974 年分離株クローンの HA 抗原性

B/ホンコン/72 型⁸⁾の流行末期の分離株（表 1, No. 5）は神奈川株と同一の HA 抗原性を示す。これより得た 50 クローンは図 2 示す如く、両抗血清に対して非常に巾広い HI 価を示し、神奈川株類似のもの以外に数種類の神奈川変異クローンが混在した。

(3) クローンウイルスの HA 抗原性の安定性

No. 1, No. 4 および No. 5 由来のクローンは多彩な HA 抗原性を示した。更にこれらの抗原性が安定した性状か否かを調べるため、各々より抗原性の異なる 5～6 クローンを選び、チューブ法で 5 代継代培養後の HI 価を測定した。

表 1 供試株の HA 抗原性

Viruses	Mouse antisera to;		Sampling date
	B/Gifu/2/73	B/Kanagawa/3/76	
B/Gifu/2/73	256 ^{※1}	32	
B/Kanagawa/3/76	64	256	
No. 1	256	64	11/13/73
No. 2	256	64	11/15/73
No. 3	256	32	12/ 2/73
No. 4	256	64	12/14/73
No. 5	64	256	1/18/74
No. 6	32	128	1/11/77
No. 7	32	128	1/18/77
No. 8	32	128	3/15/77
No. 9	32	128	3/15/77

※1 HI 抗体価

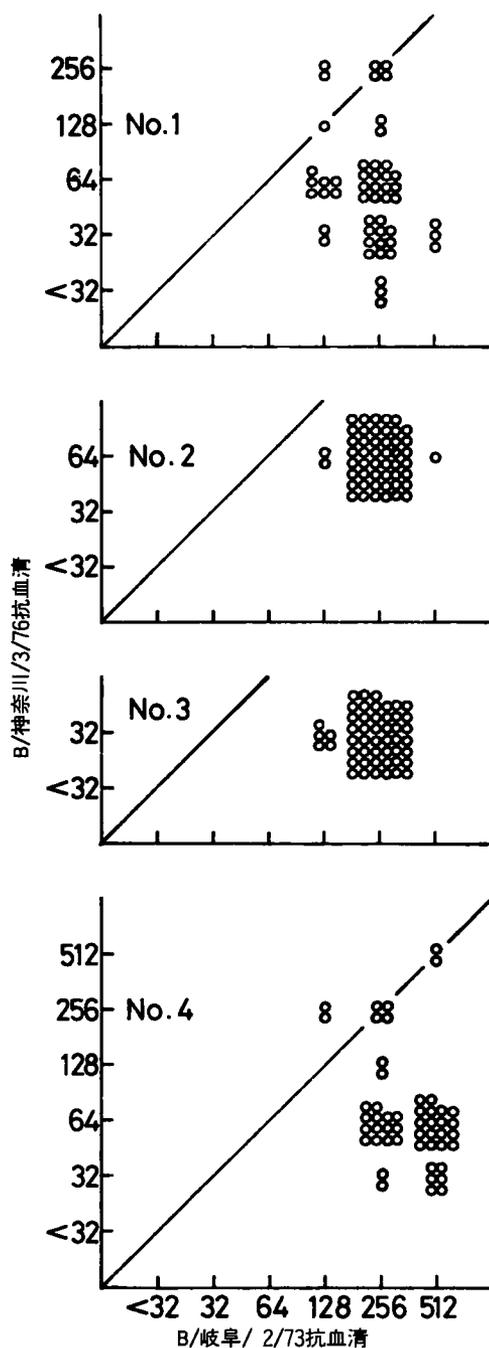


図1 1973年分離株クローンのHI試験

表2に示す如く、16クローンの1代目と5代目はすべて両抗血清に同価を示すことより、各クローンのHA抗原性は遺伝的に安定な性状と考えられた。

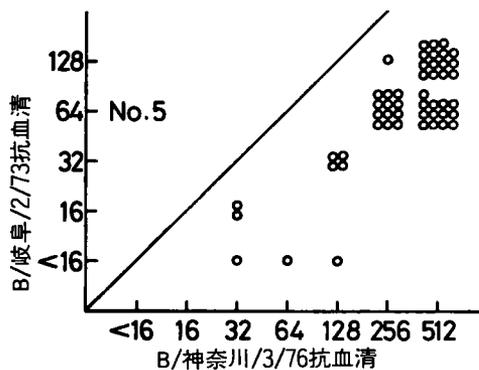


図2 1974年分離株クローンのHI試験

表2 No.1, No.4およびNo.5由来クローンの5継代後のHI試験

Clone No.	Mouse antisera to;			
	B/Gifu/2/2/73		B/Kanagawa/3/76	
	1*1	5	1	5
101	256*2	256	256	256
102	256	256	64	64
103	256	256	32	32
104	128	128	64	64
105	128	128	256	256
401	512	512	512	512
402	512	512	32	32
403	256	256	256	256
404	256	256	64	64
405	128	128	256	256
501	128	128	512	512
502	64	64	256	256
503	32	32	128	128
504	< 16	< 16	128	128
505	< 16	< 16	64	64
506	< 16	< 16	32	32

*1 継代数 *2 HI抗体価

(4) クローンウイルスの増殖能

No.5より得た神奈川株類似クローンの多くは大プラーク(直径1.5~2.5mm)、変異クローンはすべて小プラーク(直径1.0mm以下)由来で

表3 No.5由来クローンの継代歴によるプラークサイズおよびウイルス産生量

Clone No.	Plaque size		PFU/ml (10^7)		
	1*1	5	1	3	5
501	Large ^{**2}	Large	7.9	9.3	9.8
502	Large	Large	9.0	8.5	9.4
503	Large	Large	8.1	9.5	9.5
504	Small ^{**3}	Small	3.3	3.2	5.9
505	Small	Small	2.9	2.6	3.2
506	Small	Small	2.6	1.8	2.4

*1 継代数

*2 直径1.5~2.5mm

*3 直径1.0mm以下

あった。そこで両者の増殖能を検討するため、抗原性の安定性を調べた6クローンについて、継代培養によるプラークサイズとウイルス産生量(以下PFUと略す)を測定し、表3に示した。各クローンのプラークサイズは5代継代後も変化がなく、神奈川株類似クローンは大プラークを、変異クローンは小プラークを形成した。PFUはプラークサイズとよく相関し、また継代歴に関係なくほぼ一定の値を示した。従ってプラークサイズとPFUを指標とした神奈川株類似クローンと変異クローンの増殖能には明らかな差異が認められ、且つそれは遺伝的に安定な性状と考えられた。

(5) 1977年分離株クローンのHA抗原性

1977年の4株(表1, No.6~No.9)は神奈川株類似のHA抗原性を示す。この4株より得た各30クローンはすべて神奈川株類似で、変異クローンの混在は認められなかった。次でこの4株を神奈川抗血清で中和後、PFUが 10^{-4} 以下に減少するdishより各30クローンを分離し、HI試験に供した。図3に示す如く、No.7へNo.9由来のクローンはすべて神奈川株類似であった。しかしNo.6より得たクローン中に1例ではあるが大プラーク由来の岐阜変異クローンが混在した。

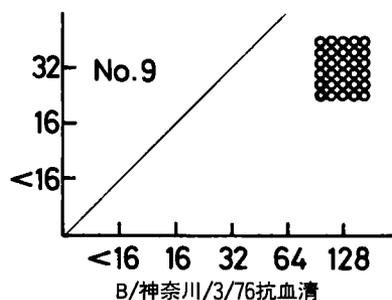
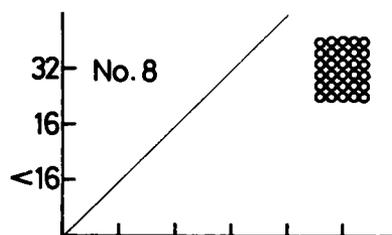
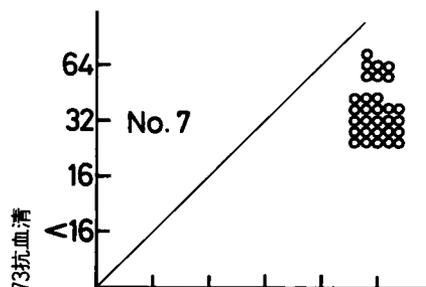
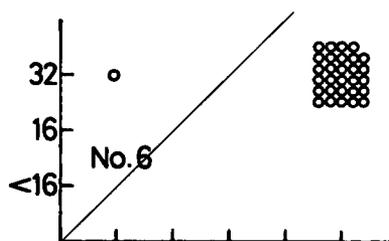


図3 1977年分離株クローンのHI試験

(6) 変異クローンの交叉HI試験

No.5, No.6より得た神奈川および岐阜変異クローンのより詳細なHA抗原性を調べるため、クローンNo.505, 506および601(岐阜変異クローン)のラット免疫血清を作成し、神奈川株、岐阜株との交叉HI試験を行った(表4)。505と506は神奈川, 505, 岐阜および601抗血清に対してはほぼ同価を示した。しかし506抗血清で

表4 変異クローンの交叉 HI 試験

Viruses	Rat antisera to;				
	B/Gifu/2/73	B/Kanagawa/3/76	505	506	601
B/Gifu/2/73	1024 ^{*1}	32	< 32	< 32	256
B/Kanagawa/3/76	32	1024	1024	< 32	64
505	< 32	64	1024	< 32	32
506	< 32	64	512	1024	64
601	64	< 32	256	32	1024

*1 HI 抗体価

表5 抗血清存在下継代培養5代目および10代目の HI 試験

Viruses	Rat antisera to;		
	B/Gifu/2/73	B/Kanagawa/3/76	
B/Gifu/2/73	OG ^{*1}	1024 ^{*2}	32
	5G	512	< 32
	10G	32	< 32
B/Kanagawa/3/76	OG	32	1024
	5G	< 32	1024
	10G	< 32	256

*1 抗血清存在下継代数 *2 HI 抗体価

表6 抗血清存在下継代培養5代目および10代目由来クローンの HI 試験

Viruses	HI titer of clones / HI titer of 00					
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
B/Gifu/2/73	5G ^{*1}	28 ^{*2}	2			
	10G				1	29
B/Kanagawa/3/76	5G	30				
	10G		28	2		

*1 抗血清存在下継代数 *2 クローン数

はホモが1024倍に対し、505は 32倍以下であった。従って両者の HA 抗原性には大きな差異が認められた。また神奈川株は 505抗血清ではホモと同価を示すのに対し、506抗血清では32倍以下であることより、505は抗原域の広い、506は狭いウイルスであることが示唆された。

一方601については、岐阜株との表裏のHI 価の比較から、岐阜株よりも抗原域が広がった。また岐阜株が505および506抗血清で抑制されないのに対し、601 は両抗血清での交叉が認められた。

表7 岐阜および神奈川変異クローンの5代継代後の HI 試験

Clones	Rat antisera to;			
	Gifu/2/73		Kanagawa/3/76	
	1 ^{*1}	5	1	5
Gifu-5G-2	512 ^{*2}	512	< 32	< 32
Gifu-5G-10	256	256	< 32	< 32
Gifu-10G-1	64	64	< 32	< 32
Gifu-10G-2	32	32	< 32	< 32
Kanagawa-10G-1	< 32	< 32	256	256
Kanagawa-10G-7	< 32	< 32	128	128

*1 継代数 *2 HI 抗体価

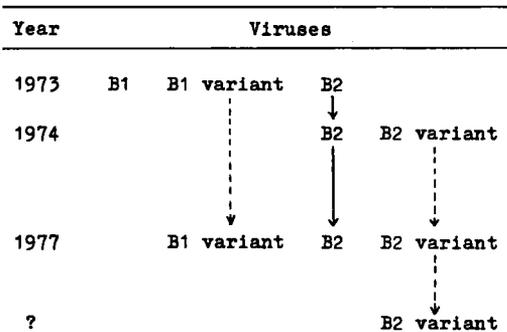


図4 B型ウイルスの年次変化模式図

2) 抗血清存在下継代培養成績

(1) 5代目および10代目の HA 抗原性

岐阜および神奈川クローンをホモ抗血清存在下に継代培養し、5代目と10代目についてHI 試験を行った(表5)。ホモ抗血清に対する親ウイルスとの比較では、岐阜クローンは5代目で1/2、10代目で1/32 を示した。また神奈川クローンは5代目で同価、10代目で1/4のHI 価を示

した。一方ヘテロ抗血清に対しては両者共に5代目以後交叉は認められなかった。

(2) 5代目および10代目より得たクローンウイルスのHA抗原性

5代目および10代目におけるクローン単位でのHA抗原性を検討するため、各30クローンを分離し、HI試験を行った(表6)。親ウイルスのHI価に比し、岐阜5G中には1/4、神奈川10G中には1/8低いクローンが存在した。一方これらのヘテロ抗血清に対する成績は略したが、いずれも32倍以下で、分離株中に混在したヘテロ型クローンは検出されなかった。

(3) クローンウイルスのHA抗原性の安定性

岐阜5Gおよび10G、神奈川10G中の変異クローンのHA抗原性が安定した性状か否かを調べるため、抗原性の異なる各2クローンを選んだ。そしてチューブ法で5代継代培養後のHI価を測定した。表7に示す如く、各クローンの1代目と5代目は両抗血清に同価を示した。すなわち分離株中のクローンと同様そのHA抗原性は遺伝的に安定な性状と考えられた。

以上の結果を総括し、模式図で示せば図4の如くである。

考 察

インフルエンザウイルスに対するMDCK細胞の発育鶏卵に匹敵する高い感受性^{2)~7)}に着目し、以下の実験を行った。すなわちts mutant⁹⁾、遺伝子欠損ウイルス¹⁰⁾、組み換えウイルス¹¹⁾の作出など、主に遺伝学的研究に利用されて来たブランク・クローニングの手法を分離初代株に応用した。そしてインフルエンザウイルスの諸性状の内、流行の度に常に問題となるHA抗原性について検討した。

1973年の岐阜型4分離株中2株由来のクローンウイルスは遺伝的に安定な種々異なるHA抗原性を有した。このことは同年の流行型が多彩であったことを示すと共に、人の咽喉頭部位で増殖したインフルエンザウイルスのHA抗原性は決して均一ではないことを示唆している。更にこの2株中に神奈川株類似クローンが混在し、1977年の流行型を1973年の分離株中に見出した。この事実は現在まで他に報告がなく、また

分離初代株のクローン解析により、将来の流行型の検出・予測が可能となるかもしれない。

1974年の分離株由来のクローンウイルスも同様に遺伝的に安定な種々異なるHA抗原性を示した。また神奈川株と同一ないし類似の抗原性を有するもの以外に数種類の変異クローンが混在した。神奈川株は1976年2月の分離株で、同年4月石川県で同一ウイルスの、4月から5月にかけて大阪および愛知で類似ウイルスの分離報告¹²⁾がある。筆者は神奈川株と同一のHA抗原性を有するウイルスをB/ホンコン/72型の流行末期に、且つ遺伝的に安定なクローンウイルスとして分離し得た。

岐阜株を基準とした場合、神奈川株類似クローンに比し神奈川変異クローンの変異度が大きく、後者が流行型となりやすい。一方ブランクサイズとPFUを指標とした増殖能は後者に比し前者が高く、流行型となり得るには増殖能も重要な要因と考えられた。

神奈川株と同変異クローンの交叉HI試験によれば、505抗血清は神奈川株をホモと同価で抑制するのに対し、506抗血清はホモのみを特異的に抑制した。インフルエンザウイルスの連続変異と抗原域に関し、後から出現したウイルスの抗原域は前者のそれより広いことより、抗原域の狭いウイルスは流行上minor strainとなり、抗原域の広いウイルスが流行型になりやすいという報告^{13),14)}がある。それに基づけば506はminor strainと考えられ、高い増殖能を持った505型のウイルスが出現すれば将来の流行型となるかもしれない。

1977年の分離株を抗血清で中和後得たクローン中に岐阜変異クローンが検出された。交叉HI試験より、このクローンは岐阜株より抗原域が広く、また神奈川変異クローンとの交叉も認められた。大山ら¹⁵⁾は1977年の分離株中に岐阜類似株が含まれていたことより、岐阜型と神奈川型は同一範中内のvariationであることを示唆した。1973年、1977年両年の分離株由来のクローン中にそれぞれ岐阜型と神奈川型が混在したことは大山らの成績を支持する。従って分離初代株のクローン解析は変異クローンの検出に基づく流行型の変遷やインフルエンザウイルスの生

態を把握する上で、極めて有用な手法と考えられる。

1973年、1977年両年の代表的な流行型である岐阜株および神奈川株のホモ抗血清存在下継代培養実験については以下の如くである。インフルエンザウイルスの抗血清存在下継代培養実験は抗原変異、特に連続変異現象の機序を解明するため、発育鶏卵を用いて行われて来た^{16)~19)}。その機序は未だ未解明であるが、point mutationを繰り返したウイルスが限界濃度の特異抗体存在下で選択されるために起こるものと想像されている¹⁹⁾。

岐阜クローンよりは親ウイルスに比し、5代目で1/4、10代目で1/32のHI価を示す変異ウイルスが作出された。しかしながら分離株のクローン解析で検出された神奈川型ウイルスの混在は認められなかった。神奈川クローンより作出された変異ウイルスは将来の流行型との関連で注目される。これらの成績の詳細な解析は野外での今後の流行を待つ必要があると考えられる。

結 論

MDCK細胞のインフルエンザウイルスに対する高い感受性に着目し、1973年から1977年間のB型分離株のクローン解析並びに1973年、1977年両年の代表的流行型株の抗血清存在下継代培養を行い、以下の結果を得た。

1. 1973年では岐阜株類似の4分離株中2株より、1977年の流行型である神奈川株類似のH

A抗原性を有するクローンウイルスを検出した。そのHA抗原性は5代継代後も変化がなく、遺伝的に安定な性状と考えられた。

2. 1974年ではB/ホンコン/72型流行末期の分離株中に、神奈川株と同一ないし類似のHA抗原性を有するクローンウイルスと神奈川変異クローンを検出した。後者に比し前者が高い増殖能を有したが、両者のHA抗原性は5代継代後も変化が認められなかった。

3. 1977年では神奈川株類似の4分離株中1株より、岐阜変異クローンを検出した。この変異クローンと神奈川変異クローン間には交叉が認められた。

4. 岐阜および神奈川クローンのホモ抗血清存在下継代培養により、それぞれから岐阜変異クローン、神奈川変異クローンが作出された。これらのクローンのHA抗原性は5代継代後も変化が認められなかった。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師緒方正名教授に心より謝意を表すると共に、終始御指導、御助言をいただいた築波大学飛田清毅博士、国立公衆衛生院杉浦昭博士に厚く感謝の意を表する。また本研究の機会を与えていただいた岡山県環境保健センター所長石田立夫博士に心からの感謝の意を表する。

なお本論文の要旨は下記の学会で発表した。

1978年 第26回日本ウイルス学会総会

1980年 第28回日本ウイルス学会総会

文 献

1. Gaush, C.R. and Smith, T.F.: Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Appl. Microbiol.* 16, 588—594, 1964.
2. Tobita, K.: Permanent Canine Kidney (MDCK) Cells for Isolation and Plaque Assay of Influenza B Viruses. *Med. Microbiol. Immunol.* 162, 23—27, 1975.
3. Tobita, K., Sugiura, A., Enomoto, C. and Furuyama, M.: Plaque Assay and Primary Isolation of Influenza A Viruses in an Established Line of Canine Kidney Cells (MDCK) in the Presence of Trypsin. *Med. Microbiol. Immunol.* 162, 9—14, 1975.
4. Burnet, F.M.: Influenza virus infection of the chick embryo by the amniotic route. 1. General character of the infection. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 18, 353—361, 1940.
5. 古山宗成, 緒方正名, 上羽 修, 石田立夫: MDCK細胞によるインフルエンザウイルスの分離—発育鶏卵との比較—。臨床とウイルス。4, 314—318, 1976.

6. 梶 哲夫, 尾西 一, 木村晋亮: 培養細胞によるインフルエンザウイルスの分離—発育鶏胎児との比較およびその問題点. *臨床とウイルス*, **5**, 333—338, 1977.
7. 芝田充男, 阿部昭也, 庭山清八郎: MDCK細胞によるインフルエンザウイルスの分離とブランク法による中和試験成績. *臨床とウイルス*, **5**, 339—342, 1977.
8. Schild, G.C., Pereira, M.S., Chakraverty, P., Coleman, M.T., Dowdle, W.R. and Chang, W.K.: Antigenic Variants of Influenza B Virus. *Br. Med. J.* **4**, 127—131, 1973.
9. Sugiura, A., Tobita, K. and Kilbourne, E.D.: Isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of influenza virus. *J. Virol.* **10**, 639—647, 1972.
10. Sugiura, A., Ueda, M., Tobita, K. and Enomoto, C.: Further isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of influenza virus. *Virology* **65**, 363—373, 1975.
11. Tobita, K. and Kilbourne, E.D.: Genetic Recombination for Antigenic Markers of Antigenically Different Strains of Influenza B Virus. *J. Virol.* **13**, 347—352, 1974.
12. 武内安恵: 今冬のインフルエンザの流行. *公衆衛生情報*, **6**, 4—6, 1976.
13. 福見秀雄: 最近のインフルエンザ流行株の抗原構造. *インフルエンザワクチン研究会第11回討論会記録*, 細菌製剤協会. pp. 87—97, 1973.
14. 福見秀雄: 最近のインフルエンザの流行株の抗原構造について. *インフルエンザワクチン研究会第13回討論会記録*, 細菌製剤協会. pp. 97—106, 1975.
15. 大山 忍, 西塚胞喜, 大泉昭子, 片桐 進, 日下部功夫, 高橋邦弘, 荒木 富, 本間守男: 1977年1月から3月にかけて山形県に流行したB型インフルエンザ. *医学のあゆみ*, **102**, 482—485, 1977.
16. Archetti, I. and Horsfall, F.L.: Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J. Exp. Med.* **92**, 441—462, 1950.
17. Isaacs, A. and Andrewes, C.H.: The spread of influenza. Evidence from 1950—1951. *Br. Med. J.* **11**, 921—927, 1951.
18. Hamre, D., Loosli, C.G. and Gerber, P.: Antigenic variants of influenza A virus (PR8 strain). 4. Serological characteristics of a second line of variants developed in mice given polyvalent vaccine. *J. Exp. Med.* **107**, 845—855, 1958.
19. Laver, W.G. and Webster, R.G.: Selection of Antigenic Mutants of Influenza Viruses. Isolation and Peptide Mapping of Their Hemagglutinating Proteins. *Virology* **34**, 193—202, 1968.

Epidemiological and serological studies on influenza**Part 1. Plaque cloning from influenza B isolates and cultivation
of B type reference strains in the presence of homologous
antibody****Muneshige HIRAMATSU**

Plaque cloning was conducted with MDCK cells on nine influenza B isolates from 1973 to 1977 in Okayama Prefecture, following hemagglutination inhibition test. Hemagglutinin (HA) antigenicity of clones isolated from two out of four B/Gifu/2/73 like isolates in 1973 varied greatly, including B/Kanagawa/3/76 like viruses, and the clones from B/Kanagawa/3/76 like isolate in 1974 also varied greatly, including B/Kanagawa/3/76 like and its variants. One clone from four B/Kanagawa/3/76 like isolates in 1977 indicated the HA antigenicity of B/Gifu/2/73 variant. After B/Gifu/2/73 and B/Kanagawa/3/76 strains were twice cloned by direct plaque to plaque on MDCK cells, these viruses were cultivated in the presence of homologous antibody. Tenth cultivated viruses and their clones indicated the HA antigenicity of each variant. Hemagglutinin antigenicity of both clones from the isolates and the cultivated viruses in the presence of antibody were stable after fifth cultivation in MDCK cells. From these results, it is suggested that the prevarent virus may be pre-isolated by plaque cloning from and cultivation in the presence of antibody of prevarent isolates.