

1992~1993年に分離したインフルエンザウイルスについて

小川 知子, 山中 隆也, 篠崎 邦子
海保 郁男, 時枝 正吉

Characteristic of Influenza Virus Isolated in Chiba Prefecture
During the Years 1992~1993.

Tomoko OGAWA, Takaya YAMANAKA, Kuniko SHINOZAKI
Ikuro KAIHO and Masayoshi TOKIEDA.

Summary

1. In an outbreak of Influenza in Chiba prefecture during the winter 1992~1993, two different types of virus were isolated: influenza A virus with H3N2 subtype at first and then B virus. The attack rate in this season was very high, but slightly lower than that of the years 1989~1990.
2. Isolated A H3N2 virus did not agglutinate chicken red blood cells(RBC), but agglutinated guinea pig RBC.
3. We compared the antigenicity of isolated strains with that of standard virus strains of A H3N2 and B using cross hemagglutination inhibition(HI) test. There were significant differences between the isolates and standard strains. This antigenic drift may be the reason of high attack rate in this season.
4. Using paired sera we found the significant rise of HI antibody titers against isolated A H3N2 virus in the patients.
5. We found two cases that were infected with both A H3N2 and B viruses at the same time. In one case, dual infection was confirmed by the rise of HI titer against both viruses in convalescent serum. In another case, although A H3N2 virus was isolated from the patient, only the rise of HI titer against B virus was noted.

I はじめに

インフルエンザは、毎年冬季に流行を繰り返す疾病である。ワクチンの開発されている他のウイルス感染症は、その接種により、患者数が減少しているのに対して、インフルエンザの感染者数は減少する傾向にない。この要因の一つとして、インフルエンザウイルス抗原の変異の大きさがあげられている¹⁾²⁾。

千葉県での1992~1993年のインフルエンザの流行は、A/H3型に始まり、A/H3型とB型との混合流行であった。届出患者数は4,662人で、その規模は、近年では1989~1990年の届出患者数19,451人の大流行に次ぐ大きなものであった³⁾。

このような流行をもたらしたインフルエンザウイルスの抗原性を明らかにするために、今シーズンに分離されたウイルスの中から、A/H3型1株(A/千葉/537/92)と、B型1株(B/千葉/237/93)をそれぞれの代表株とし、特性を検討した。

II 材料および方法

1. うがい液

集団発生の届出のうち、検査依頼のあった9集団(小学校9)74検体、および感染症サーベイランス患者定点より集められた136検体の計210検体を用いた。

2. 患者血清

集団発生で得られた28名のペア血清を用いた。急性期血清はうがい液採取時に、回復期血清は急性期血清採取後約2週間をめぐりに採取した。

3. ウイルス抗原

日本インフルエンザセンター(国立予防衛生研究所)より分与された、A/北京/352/89, A/貴州/54/89, A/滋賀/2/91, A/ブラジル/2/91, B/バンコク/163/90, B/パナマ/45/90, B/香港/22/89, B/愛知/5/88, (この内、1992~1993年のワクチン株は、A/北京/352/89, B/バンコク/163/90) 8抗原と、集団発生および感染症サーベイランス患者定点から分離したウイルスが、反応性にほとんど差がなかったため、A/H3N2型25株の中から、A/千葉/537/92(MDCK 2代継代)を、B型9株の中から、B/千葉/237/93(MDCK 2代継代)を代表株として選択し、これを加えた10株を抗原として用いた。

4. 抗血清

日本インフルエンザセンターより分与されたA/北京/352/89, A/貴州/54/89, A/滋賀/2/91, A/ブラジル/2/91, B/バンコク/163/90, B/パナマ/45/90, B/香港/22/89, B/愛知/5/88のフェレット感染抗血清を用いた。千葉県の分離株であるA/千葉/537/92株とB/千葉/237/93株の抗血清は、これら2株(HA価64~128倍)を抗原とし、3週令マウスの腹腔に0.5ml接種し3週間後に全採血したものをを用いた。

5. ウイルス分離と同定

ウイルス分離はMDCK細胞(イヌ腎細胞由来)を用いて行った。MDCK細胞は、5%FCS(ウシ胎児血清)添加イーグル

千葉県衛生研究所
(1993年11月20日受理)

MEMで約 8×10^6 個/ml の細胞浮遊液とし、24well のプレートに 1ml ずつ分注、34℃、5% CO₂ のふ卵機で培養した。翌日 PBS (-) 1ml で 2 回洗浄後、各well に 0.2ml のうがい液を接種、トリプシン 2 μg/ml 加イーグル MEM, FCS free を 1ml 加え、34℃、5% CO₂ のふ卵機で 5 日間培養し、細胞変性効果 (CPE) を観察した。CPE の認められた検体は、フェレット感染抗血清を用い、マイクロタイター法による赤血球凝集抑制試験 (HI 試験)⁴⁾ で同定した。

6. 赤血球凝集抑制試験 (HI 試験)

0.5% ニワトリ血球、0.7% モルモット血球を用い、マイクロタイター法により行った。血清中の非特異赤血球凝集抑制物質の除去は、RDE (武田薬品工業製) を用い、さらにニワトリ赤血球で吸収処理した。

7. SRCF 試験 (Single Radial Complement Fixation Test)

SRCF プレート「生研」(デンカ生研製) を用いて実施した。

III 成 績

1. 流行状況

集団発生があった 9 施設 74 検体より、13 株のウイルスが分離された。このうち、12 株が A/H3N2 型、1 株が B 型であった。施設別にみると、4 集団から A/H3N2 型、1 集団から A/H3N2 型と B 型が分離され、他の 4 集団からウイルスは分離されなかった。また、患者のペア血清を用いた HI 試験では、3 集団で A/H3N2 型、1 集団で B 型、さらに 1 集団で A/H3N2 型と B 型の両型に対し抗体の上昇が確認できた。ウイルス分離および血清反応の成績より、5 集団は A/H3N2 型の感染であり、2 集団は A/H3N2 型と B 型の混合感染であった (表 1)。

一方、感染症サーベイランス定点 (千葉市内) から集められた 136 検体より 34 株のウイルスが分離された。うち 25 株が A/H3N2 型で、9 株が B 型であった。

表 1 平成 4 年度インフルエンザ集団発生の検査成績

発生年月日	集団	HI 抗体価の上昇				* ウイルス分離	分離株
		A/山形/32/89 (H1N1)	A/北京/352/89 (H3N2)	A/ブラジル/02/91 (H3N2)	B/バンコク/163/90		
H.4.11.19	A	0/3	3/3	3/3	1/3	0/12	
H.4.12.17	B					4/10	A/H3
H.5.1.14	C	0/5	3/5		0/5	4/5	A/H3
H.5.1.21	D					0/8	
H.5.1.21	E	0/5	3/5	3/5	0/5	0/8	
H.5.1.22	F	0/7	6/7	6/7	0/7	2/6	A/H3
H.5.1.27	G					1/10	A/H3
H.5.1.28	H					0/6	
H.5.1.28	I	0/8	0/8	0/8	6/8	2/9	A/H3 (1株) B (1株)
計		0/28	15/28	12/23	7/28	13/74	

2. 分離ウイルスの赤血球凝集性

分離した A/H3N2 型および B 型について、赤血球凝集性を検討したところ、A/H3N2 型は全て 0.5% ニワトリ赤血球に凝集性を示さず、0.7% モルモット赤血球に凝集性を示した。B 型は 0.5% ニワトリ赤血球と 0.7% モルモット赤血球の両血球に対して凝集性を示した。

なお、日本インフルエンザセンターより分与された抗原・抗血清を用いて、抗体価の比較を行ったところ、0.5% ニワトリ赤血球と 0.7% モルモット赤血球の両者間ではほとんど差が見られなかった (表 2-1, 2-2)。よって、A/H3N2 型の代表株である A/千葉/537/92 と B 型の代表株である B/千葉/237/93 を含め、以後すべての反応は、0.7% モルモット赤血球を用いて行った。

3. HI 交差試験

A/H3N2 型では、千葉分離株 A/千葉/537/92 の抗血清 (ホモで 128 倍) に対して凝集した抗原は、A/ブラジル/2/91 だけであった。(表 2-1)。

B 型では、千葉分離株 B/千葉/237/93 の抗血清 (ホモで 512 倍) に対して、B/バンコク/163/90 に 16 倍、B/パナマ/45/90 に 64 倍、B/香港/22/89 に 16 倍、B/愛知/5/88 に 16 倍

以下の凝集を示した (表 2-2)。

4. 分離株を用いた患者血清の抗体価の変動

集団発生で A/H3N2 型の感染が考えられた 4 集団 20 名の急性期、回復期の血清を用いて、A/千葉/537/92 および A/貴州/54/89, A/北京/352/89, A/滋賀/2/91, A/ブラジル/2/91 に対する平均 HI 抗体価を比較した。この結果、分離株である A/千葉/537/92 に対する平均抗体価の上昇率が、3.9 と最も高かった (表 3)。

同様に、集団発生で B 型の感染が考えられた 1 集団 8 名の急性期、回復期の血清を用いて、B/千葉/237/93 および B/バンコク/163/90, B/パナマ/45/90, B/香港/22/89, B/愛知/5/88 に対する平均 HI 抗体価を比較した。平均抗体価の上昇率は、分離株である B/千葉/237/93, B/バンコク/163/90, B/パナマ/45/90 は、ほとんど同じであり、B/香港/22/89, B/愛知/5/88 とは大きく異なっていた (表 3)。

5. 重複感染が考えられた 2 例について

集団発生のうち、HI 試験で A/H3N2 型の感染が確認できた A 集団で、1 名が A/H3N2 型と B 型の両型に対して、抗体の上昇が認められた。この検体について SRCF テストを実施したところ、A/H3N2 型は陽性であったが、B 型は陰性であっ

表2-1 HI交差試験(A型:H3N2):0.5% ニワトリ血球使用

フェレット感染抗血清 ウイルス抗原	A/Guizhou/54/89	A/Beijing/352/89	A/shiga/2/91	A/Brazil/2/91	A/Chiba/537/92*
A/Guizhou/54/89	1024	<16	<16	64	<16
A/Beijing/352/89	64	256	256	128	<16
A/Shiga/2/91	128	256	1024	512	<16
A/Brazil/2/91	64	256	512	1024	64
A/Chiba/537/92	-	-	-	-	-

HI交差試験(A型:H3N2):0.7% モルモット血球使用

フェレット感染抗血清 ウイルス抗原	A/Guizhou/54/89	A/Beijing/352/89	A/shiga/2/91	A/Brazil/2/91	A/Chiba/537/92*
A/Guizhou/54/89	1024	<16	<16	32	<16
A/Beijing/352/89	128	1024	512	256	<16
A/Shiga/2/91	128	256	1024	512	<16
A/Brazil/2/91	64	128	512	1024	16
A/Chiba/537/92	128	<16	<16	32	128

※:マウス免疫抗血清(自家製)使用

表2-2 HI交差試験(B型):0.5% ニワトリ血球使用

フェレット感染抗血清 ウイルス抗原	B/Bangkok/163/90	B/Panama/45/90	B/Hongkong/22/89	B/Aichi/5/88	B/Chiba/237/93*
B/Bangkok/163/90	128	32	128	16	16
B/Panama/45/90	64	512	512	32	64
B/Hongkong/22/89	32	64	256	<16	32
B/Aichi/5/88	<16	<16	<16	64	<16
B/Chiba/237/93	32	128	128	<16	512

HI交差試験(B型):0.7% モルモット血球使用

フェレット感染抗血清 ウイルス抗原	B/Bangkok/163/90	B/Panama/45/90	B/Hongkong/22/89	B/Aichi/5/88	B/Chiba/237/93*
B/Bangkok/163/90	256	32	128	16	16
B/Panama/45/90	64	512	512	32	64
B/Hongkong/22/89	32	64	256	<16	16
B/Aichi/5/88	<16	<16	<16	64	<16
B/Chiba/237/93	32	128	128	<16	512

※:マウス免疫抗血清(自家製)使用

表3 平均HI抗体価(2^x) A型:H3N2

	急性期	回復期	差
A/Guizhou/54/89	7.3	10.0	2.7
A/Beijing/352/89	7.4	10.7	3.3
A/Shiga/2/91	6.6	9.7	3.1
A/Brazil/2/91	6.9	10.2	3.3
A/Chiba/537/92	6.2	10.1	3.9

平均HI抗体価(2^x) B型

	急性期	回復期	差
B/Bangkok/163/90	5.3	7.8	2.5
B/Panama/45/90	5.3	8.0	2.7
B/Hongkong/22/89	5.1	6.5	1.4
B/Aichi/5/88	3.8	4.1	0.3
B/Chiba/237/93	5.8	8.3	2.5

た。そこで、分離株も含め改めてB型についてHI試験を実施したところ、B/バンコク/163/90に急性期16倍以下、回復期32倍、B/パナマ/45/90に急性期16倍以下、回復期32倍、B/香港/22/89に急性期16倍以下、回復期16倍、B/愛知/5/88に急性期、回復期ともに16倍以下、B/千葉/237/93に急性期16倍以下、回復期64倍となり、分離株に対し回復期血清抗体価が有意な上昇を示した。このことから、B型の感染を確認した(表4)。

また、A/H3N2型とB型が分離されたI集団で、1名はA/H3N2型が分離されながら、HI試験では急性期、回復期血清でA/H3N2型に対する抗体上昇はなく、B型に対する抗体上昇のみが確認された。なお、この例のA/H3N2型の各株に対する急性期、回復期血清の抗体価は、急性期より、128~1024倍と高値であり、回復期でも変動はなかった(表4)。

表4 重複感染の2例

	赤血球凝集抑制(HI)試験		SRCF		備考
	急性期	回復期	急性期	回復期	
A/Guizhou/54/89	1 2 8	2 0 4 8	A型		分離(-)
A/Beijing/352/89	2 5 6	2 0 4 8	< 8	6 4	集団の流行は
A/Shiga/2/91	< 1 6	1 0 2 4			A/H 3型
A/Brazil/2/91	< 1 6	1 0 2 4			
A/Chiba/537/92	1 2 8	1 0 2 4			
B/Bangkok/163/90	< 1 6	3 2	B型		
B/Panama/45/90	< 1 6	3 2	< 8	< 8	
B/Hongkong/22/89	< 1 6	1 6			
B/Aichi/5/88	< 1 6	< 1 6			
B/Chiba/237/93	< 1 6	6 4			
A/Guizhou/54/89	5 1 2	5 1 2			分離A/H 3型
A/Beijing/352/89	1 0 2 4	1 0 2 4			集団ではB型も分離
A/Shiga/2/91	5 1 2	5 1 2			
A/Brazil/2/91	5 1 2	5 1 2			
A/Chiba/537/92	1 2 8	1 2 8			
B/Bangkok/163/90	3 2	1 0 2 4			
B/Panama/45/90	6 4	1 0 2 4			
B/Hongkong/22/89	3 2	1 0 2 4			
B/Aichi/5/88	< 1 6	< 1 6			
B/Chiba/237/93	1 2 8	≥ 2 0 4 8			

IV 考 察

最近、インフルエンザウイルスの患者からの分離方法は、発育ふ化鶏卵に変わってMDC K細胞が用いられる場合が多い。MDC K細胞で分離されたウイルスの中には、ニワトリ赤血球に対し、凝集性が弱い株が存在することがわかっている。1992～93年インフルエンザシーズンに分離されたA/H 3 N 2型の株は、ニワトリ赤血球に低凝集性であったとの報告⁵⁾⁶⁾がある。また前年の1991～92年インフルエンザシーズンに分離されたA/H 1 N 1型の株は、株によりニワトリ赤血球凝集性に差異があると報告⁷⁾⁸⁾されている。

1992～93年インフルエンザシーズンに千葉県で分離した株のうち、A/H 3 N 2型はすべて0.5%ニワトリ赤血球に凝集を示さなかった。また千葉分離株A/千葉/537/92の抗血清を用いたHI交差試験の結果では、A/ブラジル/2/91に対してのみ16倍を示し、他の株とは反応しなかった。よって、1992～1993年のA/H 3 N 2型の流行株は同型のワクチン株であるA/北京/352/89だけでなく、検査に用いた他の株とも異なっていた。また、B型も同様の試験の結果、千葉分離株B/千葉/237/93は、ワクチン株であるB/バンコク/163/90を含めた4株とは異なっていることが明らかになった。

患者の急性期および回復期血清を用いての各株に対する平均HI抗体価の比較で、A/H 3 N 2型では、A/千葉/537/92に差が最も大きかったこと、および他の株に対する抗体上昇が少ないことから、A/千葉/537/92が、近年流行した株とは抗原的に異なっていると考えられる。またこのことは、A/千葉/537/92に対する急性期の平均抗体価が、他の株より低かったことから示唆される。以上ことより、たとえワクチンの接種を行っていたとしても、今回のワクチン株では流行を十分に防御できな

かったのではないと思われる。B型については、ワクチン株であるB/バンコク/163/90と分離株であるB/千葉/237/93は、抗原的に差はあるが、B/バンコク/163/90に対しても同等の抗体上昇が見られることより(表3)、ワクチンによる防御は可能であったと推測される。

重複感染が疑われた2例のうち、1例は千葉分離株A/千葉/537/92、B/千葉/237/93を用いたHI試験で、両株に対し有意な抗体の上昇が認められ、重複感染が確認された。また他の1例は、A/H 3 N 2型に対し抗体の上昇は認められなかったが、A/H 3 N 2型のウイルスが分離され、かつB型に対する抗体の上昇が確認されたことから、重複感染があったものと考えられる。一般に、血清抗体による感染防御はHI抗体価で128～256倍といわれている⁹⁾。この例のA/H 3 N 2型の各株に対する抗体価は、急性期で128倍から1024倍と高値を示しており、このために感染がウイルスが分離された咽頭部分から先に進行せず、結果として抗体の上昇がなかったものと考えられる。

なお、正確な感染を知るためには、分離株を用いての血清反応が必要である。

V ま と め

1. 千葉県での1992～1993年のインフルエンザの流行はA/H 3 N 2型に始まり、A/H 3 N 2型とB型が混合するパターンであり、流行の規模は近年では1989～1990年の大流行に次ぐ大きなものであった。

2. 分離したA/H 3 N 2型の株は、0.5%ニワトリ赤血球に凝集性を示さなかった。

3. A/H 3 N 2型(A/千葉/537/92, A/貴州/54/89, A/北京/352/89, A/滋賀/2/91, A/ブラジル/2/91)

およびB型 (B/千葉/237/93, B/バンコク/163/90, B/パナマ/45/90, B/香港/22/89, B/愛知/5/88) について、フェット感染抗血清および千葉分離株に対して作製したマウス免疫抗血清とのHI交差試験を実施し、分離株の抗原性を比較したところ、両型とも他の株と異なっていた。

4. A/H3N2型について、患者急性期、回復期血清を用いて平均抗体価を比較したところ、分離株でより大きな差を示した。

5. A/H3N2型とB型の重複感染が考えられた2例で、1例は分離株を用いた血清反応で両型の感染が確認できた。また1例は、A/H3N2型ウイルスが分離されながら、抗体の上昇はB型のみで、A/H3N2型に抗体の変動はなかった。これは、A/H3N2型の急性期抗体価が高かったためと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、検体採取に御協力をいただいた各病院の諸先生方および、千葉県保健予防課、佐倉、市川、松戸、木更津、館山、野田、柏、習志野、千葉市保健所の関係各位に深謝します。

参考文献

1) 大谷 明：インフルエンザ流行の歴史と予測，公衆衛生

Vol.43, No.12, 848-851, 1979.

- 2) 中島捷久，中島節子：新型インフルエンザウイルス出現のメカニズム，臨床と研究，Vol.69, No.12, 3738-3743, 1992.
- 3) 千葉県衛生部保健予防課 平成4年度 事業概要，66.
- 4) 国立予防研究所学友会編：ウイルス実験学，総論，改訂二版，215-225，丸善，1973.
- 5) 持田 恭，糸川浩司，飯塚節子，板垣朝夫，五明田孝：鳥根県でみられた1992/93年のインフルエンザ，日本医事新報，No.3617, 52-55, 1993.
- 6) 大山 忍，安孫子千恵子，片桐 進，勝島矩子，中村喜代人：今冬季（1992/93）に山形で分離されたB型とA香港型インフルエンザウイルスの抗原性，第41回日本ウイルス学会総会講演抄録，68，1993.
- 7) 山岡政興，堀田 博，本間守男：A/ソ連型インフルエンザウイルス流行株の血球凝集性の変異，第40回日本ウイルス学会総会講演抄録，162，1992.
- 8) 森下高行，小林慎一，三宅恭司，石原佑弋，中島節子，中島捷久：1991/92シーズンに分離された赤血球凝集性の異なるA/ソ連型インフルエンザウイルスについて，第40回日本ウイルス学会総会講演抄録，162，1992.
- 9) 加地正郎：インフルエンザワクチンの予防効果，臨床と研究，Vol.64, No.1, 136-146, 1987.