

1979年、県下におけるインフルエンザの流行とウイルス分離について

山西 重機・山本 忠雄・岡崎 秀信

I 緒 言

昨冬、変異出現したインフルエンザA/USSR型の流行は、各地において流行、ウイルス分離の報告がつづいていたが、県下においては、例年とはことなっており、2月中旬頃より散発は認められたが、初夏の6月になって集団発生が確認され、流行は小規模で、時期的に大きなずれがみられた。

これは昨冬における23才以下の抗体未保有層のA/USSR型流行に際しての抗体獲得、また就学児童層におけるワクチン接種等の影響で流行が規制されたとみるべきであろうか。

そしてこの集団発生の患者検体のうがい液からのウイルス分離の際、10件について、発育鶏卵とともにMDCK細胞を用いてウイルス分離を試みたので、今冬の流行におけるインフルエンザウイルスの分離について、その概要を報告します。

II 検査材料および方法

インフルエンザ様疾患患者について、市内小児科医院よりうがい液を採取し、ウイルス分離には常法に従って発育鶏卵を用いた。

なお集団発生については、発育鶏卵とともにMDCK細胞を併用し、ウイルス分離、およびブラック法によりウイルスの定量を行った。

III 調査結果

1. インフルエンザの流行とウイルス分離について

本県におけるサーベランス事業の一環として、表1のようにインフルエンザ様疾患患者からのウイルス分離を、12月上旬よりはじめたが、例年と異なり、2月14日高松市内で1株のA/USSR型を分離、以降3月中旬までに15株を分離したが、流行は散発で、学校施設等における集団発生はみられなかった。その後6月に入り一小学校での集団発生があり、A/USSR型が分離された。

この間、3施設等のインフルエンザ様疾患の集団発生についてウイルス分離を試みたが、ウイルスは分離され

Table 1 About the isolation of virus from influenzae-like disease

Day		Total number of inspection	Virus Isolation
Dec	First	1	0/
	Middle	49	0/49
	Last	19	0/19
Jan	First	5	0/5
	Middle	34	0/34
	Last	45	0/45
Feb	First	23	0/23
	Middle	25	1/25
	Last	36	0/36
Mar	First	36	4/36
	Middle	33	10/33
	Last	1	0/1
Apr	First	2	0/2
	Middle	4	0/4
	Last	5	0/5
May	First	4	0/4
	Middle	1	0/1
	Last	2	0/2
Jun	First	10	0/10
	Middle	10	10/10
	Last	/	/

ず、血清学的にもインフルエンザは否定された。

2. 分離ウイルスの抗原分析について

抗原分析の結果は、表2のとおりで分離ウイルスは昨冬大流行をしたA/USSR型と同型であった。

A / 福島 / 103/78 とは、抗原的に離れており A / 熊本 / 103 / 78 と同じ抗原型であることが確認できた。

3. MDCK細胞によるウィルス分離について

MDCK細胞にトリプシンを添加することによって、インフルエンザウィルスがよく増殖し、ブラック形成の効率が高まるという報告がなされているが、今回の集団発生^{6, 7)}の10検体について発育鶏卵使用によるウィルス分離と比較してみた。発育鶏卵使用では、表3のとおりで、No. 6, 1 検体についてウィルス分離することが出来なかったが、MDCK細胞使用では、3日間培養で、全てCPEが+となり、HA価は表4のように短期間の培養で上昇し、1日間培養でも4検体について、HA価の上昇がみられた。

なお、細胞維持を容易にするため、トリプシン添加量の量的差異を検討した。すなわち、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ の3段階に別けて細胞維持液に添加し、差について検討したが、多くすればよいという結果にはならなかった。

4. MDCK細胞のブラック法によるウィルスの定量について

この成績については、表3のとおりで、ウィルス分離として用いるとわかりやすく、ウィルスの定量が可能な利点があるが、ブラックのクローニングによるウィルス同定の操作に時間を要する難点がある。

ブラックは写真のごとく、3日間培養後クリスタルバイオレットで染色したもので、検体中のウィルスが、分離と同時に定量出来るが、うがい液の検体については、原液のままでは、ウィルス量が多く、ブラックが密集して数え難いので、 $X10^2$ から $X10^3$ ぐらいの段階希釈が必要であった。

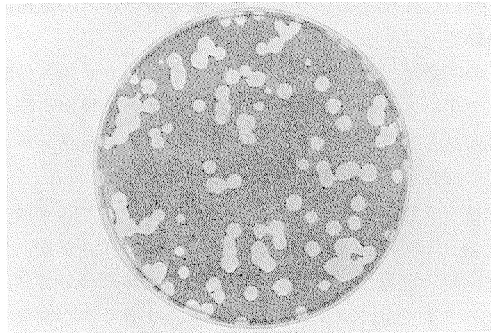
患者6について、発育鶏卵使用では分離することができなかったが、ブラック法では、2個のブラックが認められクローニングにより、インフルエンザウィルスであることが確認できた。

なお、検体接種量は $0.2\text{ml}/\text{plate}$ である。

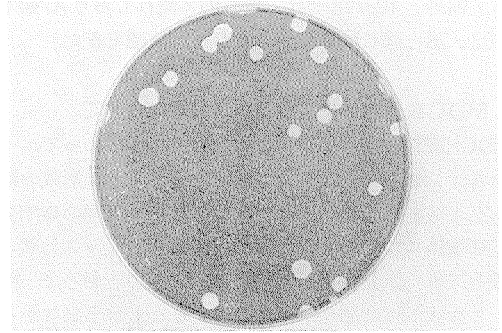
Table 2

Antigenic analysis (HI) of recent influenzae virus isolates

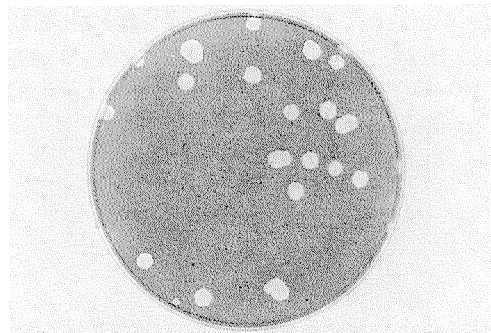
Antiserum / Antigen	A/FM/1/47	A/Oomathi/1/53	A/USSR/92/77	A/Kumamoto/103/78	A/Fukushima/103/78
A/Kagawa/ 1/79	1,024	64	1,024	2,048	32
A/Kagawa/ 2/79	2,048	128	2,048	2,048	64
A/Kagawa/ 3/79	512	64	1,024	2,048	64
A/Kagawa/ 4/79	512	64	1,024	2,048	32
A/Kagawa/ 5/79	512	32	1,024	2,048	32
A/Kagawa/ 6/79	512	64	1,024	2,048	32
A/Kagawa/ 7/79	1,024	64	1,024	2,048	64
A/Kagawa/ 8/79	512	32	1,024	2,048	32
A/Kagawa/ 9/79	512	64	1,024	2,048	32
A/Kagawa/10/79	512	64	1,024	2,048	32
A/Kagawa/11/79	1,024	64	1,024	2,048	32
A/Kagawa/12/79	512	32	1,024	2,048	32
A/Kagawa/14/79	1,024	64	1,024	2,048	32
A/Kagawa/15/79	2,048	128	4,096	4,096	128
A/F M /1/47	32,000	1,024	2,048	2,048	512
A/Kouguya/ 1/52	1,024	32	128	256	32
A/Oomathi/1/53	2,048	2,048	128	512	2,048
A/USSR/92/77	256	32	1,024	2,048	< 32
A/Kumamoto/103/78	256	32	1,024	2,048	< 32
A/Fukushima/103/78	2,048	2,048	128	512	2,048



No. 5
A/Kagawa/20/79 Dil, $\times 10$



No. 8
A/Kagawa/22/79 Dil, $\times 100$



No. 7
A/Kagawa/21/79 Dil, $\times 100$

Table 3
Isolation of influenzae virus for fertile eggs and in MDCK cells

No.	Isolated Virus	Progress of a case	Egg method	Cell culture of MDCK	Plaques method (used of MDCK)
1	A/Kagawa/16/79	2	+	+	130/plate
2	A/Kagawa/17/79	2	+	+	1,350
3	A/Kagawa/18/79	4	+	+	145
4	A/Kagawa/19/79	6	+	+	1,250
5	A/Kagawa/20/79	1	+	+	1,090
6	A/Kagawa/25/79	2	-	+	2
7	A/Kagawa/21/79	2	+	+	1,500
8	A/Kagawa/22/79	1	+	+	1,450
9	A/Kagawa/23/79	0	+	+	1,050
10	A/Kagawa/24/79	2	+	+	22

Inoculation. 0.2ml/platte

IV 考 察

MDCK細胞、発育鶏卵使用の併用によるウィルス分離では、飛田らがいうように、トリプシン添加MDCK細胞で、よく増殖し、うがい液中のウィルス量の問題もある

が、細胞使用では、10例中4例が1日の培養日数で、低いHA価ではあるが陽性となり、培養日数3日で10例ともHA価の上昇が認められ、高いもので512倍となった。また同時に細胞維持の面から、トリプシン添加量の減少を計るために量によるウィルス増殖の差を調べてみたが1ml中5 μ g, 10 μ g, 15 μ g,の添加で差は認められず、5

Table 4

About the HI test of influenza virus isolates in MDCK cells

Patient number	Day after inoculation	add of trypsin (5 μ g/ml)	add of trypsin (10 μ g/ml)	add of trypsin (15 μ g/ml)
1	1	< 16	< 16	< 16
	3	128	256	128
2	1	< 16	< 16	16
	3	256	256	256
3	1	< 16	< 16	< 16
	3	128	128	256
4	1	32	32	16
	3	128	128	128
5	1	16	32	32
	3	256	256	256
6	1	< 16	< 16	< 16
	3	< 16	128	128
7	1	< 16	< 16	< 16
	3	512	256	256
8	1	< 16	< 16	< 16
	3	128	256	64
9	1	32	32	< 16
	3	128	128	128
10	1	< 16	< 16	< 16
	3	256	128	256

μ g/mlでも、ウィルスが増殖し、また細胞維持が容易で1週間は脱落することなく維持することができた。

ブラック法によるウィルス分離では、うがい液中のウィルス量が少なくとも明瞭にブラックとして定量することができる。

このことから、MDCK細胞使用の利点として適当卵令の鶏卵を用意する場合より常時、ウィルス分離が出来る。

V 結 論

(1) 今冬におけるインフルエンザの流行は、昨冬と同型のA/USSR型で冬期間は散発で初夏になり集団発生の形態をとった。

(2) ウィルス分離では、発育鶏卵使用の場合より、MDCK細胞使用による方法が分離率が高かった。

(3) MDCK細胞でトリプシン添加量5 μ g/mlでウィルス増殖に支障なく細胞維持が容易であった。

(4) ブラック形成の場合、検体のうがい液は、段階希釈をして接種する必要があった。

VI 文 献

1. インフルエンザ様疾患発生報告, 厚生省保健情報課, 1979.
2. 山西重機: 1978年県下におけるソ連かぜの流行について, 香川県衛生研研所報, 6, 43-50, 1977.
3. 伝染病流行予測調査検査術式, 厚生省保健情報課, 53年5月.
4. 根路銘国昭: MDCK細胞を用いてのインフルエンザのブラック形成法及びブラック中和法の解説と手技, 細菌製剤協会, 昭和51年5月.
5. 根路銘国昭: MDCK細胞におけるインフルエンザウィルスの分離, 臨床病理, 特集35, 111-124, 1978.
6. 飛田清毅: MDCK細胞によるインフルエンザの分離, 臨床とウィルス, 1, 58-61, 1976.
7. 古山宗成: MDCK細胞によるインフルエンザの分離, 臨床とウィルス, 3, 110-114, 1976.