

インフルエンザウイルスA型の変異と集団かぜ検査 における血清学的検査の重要性について

佐藤 宏康 斎藤 博之 田中 恵子* 森田 盛大

わが国では平成4年頃からA型インフルエンザウイルスの変異が報告され、同時にウイルス分離率が低下傾向にあることが報告されている。秋田県においても同様の傾向が観察され、ウイルス分離のみによる集団かぜの病原診断は困難となり、それに伴って血清学的診断がますます重要になってきた。

キーワード：インフルエンザウイルスA型、ニワトリ赤血球、低凝集性変異株

I はじめに

集団かぜの発生は主としてインフルエンザウイルスに起因し、一度流行が始まると、短期間に多数の欠席者が発生するなど、学校教育現場において大きな問題となる。県内における集団かぜの検査は基本的には患者からウイルスを検出する方法と患者の血清中に産生される抗体を測定する方法が併用して行われている。しかし、平成5年度以降インフルエンザウイルスの分離率はそれ以前と比較して極端に低下した。本報ではウイルス変異と一致して観察されたウイルス分離率の低下とそれに伴う集団かぜ検査における血清学的診断検査の重要性について報告する。

II 材料及び方法

1 ウイルス分離

- (1) 分離材料：使用した咽頭拭い液59検体は平成8年1月から3月に集団かぜが発生した管轄保健所で採取後当所に搬送、接種時まで -80°C で保存した。
- (2) 分離方法：MDCK細胞を用いた組織培養法で行った。
- (3) 同定方法：日本インフルエンザセンターから分与された抗A/山形/32/89血清、抗A/北九州/159/93血清と抗A/秋田/1/94血清及び抗B/三重/1/93血清の合計4種類を用い、厚生省伝染病流行予測調査検査術式¹⁾に準じて行った。

2 血清学的診断

- (1) 被検血清：使用した56人の対血液は平成8年1月から3月に集団かぜが発生した管轄保健所で採血された。当所に搬送後血清として使用時まで -20°C で保存した。
- (2) 検査方法：厚生省伝染病流行予測調査検査術式¹⁾に準じ、0.5%モルモット赤血球を用いた赤血球凝集

抑制試験(HAI)で行った。

- (3) 使用抗原(診断液)：日本インフルエンザセンターから分与されたAソ連型1株：A/山形/32/89、A香港型2株：A/北九州/159/93とA/秋田/1/94及びB型1株：B/三重/1/93の合計4株を用いた。また、今シーズン県内で孵化鶏卵を用いて分離されたA香港型1株：A/秋田/54/96とAソ連型1株：A/秋田/14/96を診断抗原として使用した。

3 分離ウイルスの赤血球凝集能試験

- (1) 分離株の継代歴：いずれもMDCK細胞初代分離株を用いた。
- (2) 使用分離株：平成2年度分離のA香港型2株とAソ連型2株、平成3年度分離のAソ連型4株及び平成7年度分離のAソ連型3株とA香港型1株の合計12株を用いた。
- (3) 使用血球：ニワトリ、モルモット、ガチョウ赤血球の各0.5%浮遊液を使用した。

III 結果

1 ウイルス分離

平成7年度は集団かぜ患者として分離材料が採取された59人について実施されたが、わずか2名(3.4%)からAソ連型ウイルスがMDCK細胞で分離されたにすぎなかった。昭和62年度からの集団かぜ診断率の推移を表1に示した。最も高い分離率を示したのは平成4年の58.5%で、A香港型が主流であったが分離株69株中2株のB型が含まれていた。分離率が最低を示したのは平成7年度の3.4%であった。

2 血清学的診断

昭和61年度から平成7年度までの対血清による診断率を表1に示した。また、平成7年度の分離株抗原による病原診断率は表2に示した。すなわち、日本インフルエ

* 生活センター

表 1 過去10年間の集団かぜ診断率の推移

年度	対血清による診断率	ウイルス分離による診断率	流行した型
昭和61年	49／ 60 (81.7%)	—	Aソ連型
昭和62年	18／ 30 (60.0%)	5／ 31 (16.1%)	A香港型・B型
昭和63年	33／ 66 (50.0%)	7／ 72 (9.7%)	A香港型・Aソ連型
平成元年	62／ 96 (64.6%)	29／ 97 (29.9%)	B型・A香港型
平成2年	76／ 80 (95.0%)	43／ 80 (53.8%)	A香港型・Aソ連型
平成3年	41／ 66 (62.1%)	7／ 68 (10.3%)	Aソ連型
平成4年	102／111 (91.9%)	69／118 (58.5%)	A香港型・B型
平成5年	8／ 20 (40.0%)	1／ 20 (5.0%)	A香港型
平成6年	64／ 74 (86.5%)	4／ 77 (5.2%)	A香港型
平成7年	51／ 56 (91.1%)	2／ 59 (3.4%)	Aソ連型
平均	504／659 (76.5%)	167／622 (26.8%)	

表 2 平成7年度の血清学的病原診断率

型	センター由来抗原			県内分離抗原	
	Aソ連型	A香港型	B型	Aソ連型	A香港型
陽性人数	51	2	0	53	4
検査人数	56	56	56	56	56
診断率 (%)	91.1	3.4	0.0	94.6	7.1

ンザセンターから分与された4種類の抗原を使用した場合は56名中51名(91.1%)がAソ連型感染と診断された。また、A香港型にも2名の抗体上昇が確認された。

一方、県内の分離株2種類を抗原として診断した場合

は56名中53名(94.6%)がAソ連型感染、56名中4名(7.1%)がA香港型感染と診断された。同一人で二つの型に抗体上昇が認められたのは4名であった。

3 分離ウイルスの赤血球凝集能試験

分離ウイルスの赤血球凝集能比較試験で使用した平成2年度分離の4株(A香港型2株、Aソ連型2株)はニワトリ、モルモット、ガチョウ赤血球に凝集を示した。また、平成3年度分離株のAソ連型4株中2株はニワトリ赤血球を凝集しない株が存在していたことが明らかとなった。平成7年度分離の4株(Aソ連型3株、A香港型1株)はモルモットとガチョウ赤血球に凝集を認めたが、ニワトリ赤血球には凝集を認めなかった。この性状は表3に示したようにAソ連型、A香港型に共通した現象として認められた。

表 3 分離株の赤血球凝集能変異

分離ウイルス		希釈		
検出年度	型別	4→512	4→512	4→512
平成2年度	香港	+++++++-	+++++---	+++++++-
	香港	+++++++-	+++++---	+++++++-
	ソ連	+++++---	+++++---	+++++---
	ソ連	+++++---	+-----	+++++---
平成3年度	ソ連	+++++++-	+++++---	+++++++-
	ソ連	+++++++-	+++++---	+++++++-
	ソ連	+++++++-	-----	+++++++-
	ソ連	+++++++-	-----	+++++---
平成7年度	ソ連	+++++---	-----	+++++---
	ソ連	+++++---	-----	+++++---
	ソ連	+++++++-	-----	+++++---
	香港	+++++---	-----	+++++---
		モルモット	ニワトリ	ガチョウ
		赤血球の種類		

IV 考 察

秋田県の過去10年間に於ける集団かぜの平均病原診断率は表1に示したように、血清による診断率は76.5%と高く、対血清を用いた病原診断の重要性が確認された。ウイルス分離による診断率は26.8%で前者の約1/3であった。平成2年度、すなわち平成3年3月までは表3から明らかなように、県内にはニワトリ赤血球に対する低凝集性変異株は存在していなかったと推定された。全国的に変異株が出現するのは平成3年度すなわち、平成4年(1992年)の冬からである。この時点での流行ウイルスはAソ連型で、分離株の中にニワトリ赤血球に対する低凝集性変異株が存在することが山岡ら²⁾、森下ら³⁾により報告されている。本県においても平成3年度はニワトリ赤血球に対する低凝集性変異株が存在し、そのためウイルス分離は68検体中7株(10.3%)と低い分離率に終始したと考えられた。

一方、平成4年度の主流ウイルスはA香港型であり、一部にB型も流行した。A香港型は前年のAソ連型と同じくニワトリ赤血球に対する低凝集性変異株が存在したことが山岡ら⁴⁾、森下ら⁵⁾により報告されている。山岡らはMDCK細胞を用いて分離したA香港型ウイルスの約半数はニワトリ赤血球低凝集性であり、孵化鶏卵では分離され難いことを述べている。結果として示さなかったが、当所で平成4年度に検査した118検体から67株(56.8%)のA香港型ウイルスと2株のB型(1.7%)をMDCK細胞を用いて検出したが、孵化鶏卵での分離率はA香港型118検体中5株(4.2%)、B型は1株の検出であり、MDCK細胞の分離率に比較して低かった。

このように、Aソ連型、A香港型共に変異が進み、平成5年度以降の集団かぜ検体からのウイルス分離率は極端な低下を示したと考えられた。平成6年度は77検体からわずかA香港型4株(MDCK細胞3株、孵化鶏卵1株)のウイルス検出数であった⁶⁾。平成7年度はAソ連型が2株分離されたが3.4%と低い分離率であった。定点観測調査での分離株も含め検査した4株(表3)はいずれもニワトリ赤血球に対する低凝集性変異株であった。ニワトリ赤血球に対する低凝集性変異株の出現とウイルスが分離され難くなった現象とどのような関係にあるか明らかではないが、この傾向は今後も続くと思われることから、ウイルス分離による病原診断はますます困難となり、対血清を用いた血清学的診断を実施しなければ、集団かぜの病原診断は極めて非効率におちいらざるを得ない現状にある。

しかし、ウイルス分離検査は、①血清学的診断用ウイ

ルス液の作成、②分離ウイルスの型決めに必要な同定用免疫血清の作成、③ウイルスの遺伝学的解析、④ワクチン製造用検討対象株として予研への送付などの理由により継続していく必要がある。特に、分離株を診断液として使用した場合は診断率が上昇することからウイルス分離検査は欠くことができないと考えている。

MDCK細胞を用いて検出された初代分離株は同定に十分な凝集価が得られない場合が少なくない。このような場合PCR法を用いた同定法が有効と考えている。

V ま と め

- 1 集団かぜの病原診断率は血清学的検査平均76.5%、ウイルス分離検査平均26.8%で対血清を用いた血清学的診断が不可欠であると考えられた。
- 2 ニワトリ赤血球に対する低凝集性変異株の出現以来ウイルス分離率は低下傾向を示し、平成7年度集団かぜ検体からの分離率は3.4%で過去9年間の最低を示した。

稿を終えるにあたり、検体採取を担当された各保健所の皆様に感謝申し上げます。

VI 文 献

- 1) 厚生省保健医療局結核難病感染症課感染症対策室、伝染病流行予測調査検査術式、昭和61年5月
- 2) 山岡政興、他、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演説抄録、1992(神戸)、162。
- 3) 森下高行、他、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について、第40回日本ウイルス学会総会演説抄録、1992(神戸)、162。
- 4) 山岡政興、他、1992-93年流行期のA香港型インフルエンザウイルス分離株のニワトリ血球凝集性の変異、第41回日本ウイルス学会総会演説抄録、1993(札幌)、233。
- 5) 森下高行、他、1992/93シーズンに分離された赤血球凝集性の異なるA香港型インフルエンザについて、第41回日本ウイルス学会総会演説抄録、1993(札幌)、233。
- 6) 原田誠三郎、他、平成6年度の秋田県内におけるインフルエンザウイルスの流行状況について、秋田県衛生科学研究所報、1995; 39: 37-39。