

A香港型インフルエンザウイルスのキモトリプシン存在下での MDCK細胞による分離について

山岡政興* 押部智宏 稲元哲朗

Relative Efficacy of MDCK Cell Cultures with Chymotrypsin for Isolation of Recent AH3 Influenza Viruses

Masaoki YAMAOKA*, Tomohiro OSHIBE and Tetsuro INAMOTO

*Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

The isolation efficiency of A Hong Kong type influenza virus in MDCK cell cultures with chymotrypsin was examined from 1991/1992 to 1993/1994, and from 2003/2004 to 2005/2006 influenza season. The efficacy of virus isolation under chymotrypsin was better than that of trypsin for 6 influenza seasons examined. Moreover, it is easy to observe the cytopathic effects under the chymotrypsin existence.

I はじめに

インフルエンザウイルスは初期にはもっぱら発育鶏卵を用いて分離されていたが、飛田ら^{1, 2)}がイヌの腎細胞であるMDCK細胞の有用性を報告してから、インフルエンザウイルス分離の標準法として広く用いられてきた。われわれ³⁾は1980年代半ばから発育鶏卵に代えてMDCK細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離を日常検査として行ってきた。B型ウイルスは発育鶏卵での分離効率は高いこと、および、Aソ連型は、1977年に出現して4回目の流行期にニワトリ赤血球低凝集性に変異し、それに伴って発育鶏卵での分離効率が低下したことなどが細胞での分離を急がせた要因である。

A香港型ウイルスは、1992/1993の流行シーズンにそれまでのウイルスとは大きく抗原性を変異させると共に、

従来のニワトリ赤血球高凝集性株とは別に、Aソ連型にしか見られなかったニワトリ赤血球に対する低凝集性株が出現した。同時に、ふ化鶏卵による分離率はAソ連型で見られたと同様に急激に低下した⁴⁾。続く1993/1994年のA香港型流行株はすべて、ニワトリ赤血球に対して低凝集性を示し⁵⁾、以後2006/2007年の流行期においてもA香港型はニワトリ赤血球低凝集性株が流行を続けている。

ところで、MDCK細胞を用いてA型インフルエンザウイルスを分離する際、ウイルスのHA蛋白をHA1とHA2に開裂することによって非活性型のウイルスを活性化することが必要である。このとき細胞に影響しないようにトリプシンを低濃度で添加する^{1, 2)}。われわれはこのトリプシンに代えてキモトリプシンを用いてもインフルエンザウイルスは効率よく分離されること、現在流行しているA型およびB型を分離する際、それぞれ両プロテアーゼに対して異なる性状を示すことをみた。すなわち、同じ分離条件でAソ連型は、何れの流行期においても、両プロテアーゼ存在下においてほぼ同等の高い分離効率を示すのに対して、B型はプロテアーゼに対する感受性が

感染症部

*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所センター
感染症部 山岡政興

明確に異なる株が一定の割合で存在することがわかった。そこで今回、A香港型ウイルスのキモトリプシン存在下でのMDCK細胞による分離効率を6シーズンについてトリプシンの標準法と比較した。

II 材料および方法

1. インフルエンザウイルス分離材料

感染症発生動向調査で採取されたインフルエンザ様患者のswabを分離材料とした。A香港型は抗原性およびニワトリ赤血球に対する凝集性が変異した1992/93シーズンを中心にした3年間と、2003/2004からの最近の3年間、合計6年間のswabを分離材料とした。Aソ連型の分離材料は1990/1991, 1991/1992, 1995/1996年および1999年から2002年にかけての3回の流行株および2005/2006年のswabを対象にした。B型の分離材料はA香港型を対象とした6シーズンのうち4回のシーズンを対象とした。swabは、トランスワブのちにはバイロカルト(何れもアスカ純薬)を使用して採取した。採取したswabは、分離開始日が1週間程度ならば冷蔵庫で保存し、それ以上の期間保存する場合は冷凍保存した。swabはペニシリン、カナマイシン、ストレプトマイシンを添加したVIB (Difco) 溶液に浸漬後、vortexし、3,000rpm、5分遠心した上清を0.45 μ mのフィルターでろ過滅菌したものを接種材料とした。

2. インフルエンザウイルス分離法

ウイルス分離には6穴細胞培養プレート(コーニング社)を使用した。MDCK細胞継代3日目の単層細胞をPBSで1回洗浄し、ろ過滅菌したswabを1検体あたり2wellに150 μ lづつ接種し、33 $^{\circ}$ Cで1時間吸着させた後、そのまま維持液を2ml/wellづつ加え、33 $^{\circ}$ Cで培養した。このとき一方のwellの維持液は標準法に従って、トリプシン(Sigma, Type II-S)を3 μ g/ml、他方はキモトリプシン(Sigma, Type II)を100 μ g/ml濃度に調整した。swabを接種した細胞は1週間培養し、その間に細胞変性が観察され、迅速診断キットまたはHA反応が示された検体を分離陽性とした。HA反応にはモルモットおよびニワトリ赤血球を使用した。陰性の検体はさらにそれぞれの培養条件で2代まで継代した。2代目の接種材料は初代の分離陰性のwell内容物を遠心せずにそのまま150 μ lを使用した。接種後の培養は初代接種と同様33 $^{\circ}$ Cで行った。

III 結果および考察

1991/1992年のswabからMDCK細胞とトリプシンを用いる標準法の代わりにキモトリプシン存在下でA香港型の分離を試みた⁵⁾。このときトリプシン濃度は、細胞に影響の及ばない3 μ g/ml、キモトリプシンは20 μ g/mlの濃度を用いた。今回予備的な検討の中で、添加するキモトリプシンは濃度依存的に分離率を向上させ、100 μ g/mlの添加濃度が至適であることをみた。われわれはC型インフルエンザウイルスを細胞で分離する際、添加するトリプシン濃度が高いほどウイルス表面のHE糖タンパクの開裂活性化を促進しウイルス量が増大することを報告した⁶⁾。100 μ g/mlの濃度は培養液調整の限界に近いと思われるが、細胞が培養器表面から剥がれてもウイルスは増殖し、分離の妨げにはならないことを示唆している。

大きく抗原性を変異させると共にニワトリ赤血球に対する凝集性、ふ化鶏卵での分離率の低下を伴う変異ウイルスの出現した1992/1993年の検体を挟んだ3年間のswabについて、標準法とキモトリプシン存在下におけるMDCK細胞での2代目までの分離効率、および1992/1993と1993/1994の2年間については両者の間の統計学的な有意差をカイ2乗検定を行って調べた(Table 1)。

ニワトリ赤血球高凝集性であった1991/1992の40検体はキモトリプシンに対しても感受性が高く、トリプシンを添加した標準法と同じ37株(93%)が分離された。特に分離初代ですべてのswabからウイルスが分離され、HA価で見たウイルス産生量もほぼ同程度であった。1992/1993年の16検体はトリプシン存在下で初代から6株(37%)が分離され、継代することによって合計13株(81%)が分離された。これに対してキモトリプシン存在下では16株すべてが初代で分離され、キモトリプシンの方が分離効率は高かった。すべてのA香港型がニワト

Table 1. Efficacy of MDCK cell cultures with trypsin or chymotrypsin for Isolation of influenza AH3 viruses between 1991 and 1994

Year	No. of swabs	Passage history	No. of isolates (%)		Probability (p)
			Trypsin	Chymotrypsin	
1991/1992	40	M1	37(93)	37(93)	—*
		M2	0	0	—
		Total	37(93)	37(93)	—
1992/1993	16	M1	6(37)	16(100)	5.6x10 ⁻³
		M2	7(44)	0	—
		Total	13(81)	16(100)	6.9x10 ⁻²
1993/1994	36	M1	14(39)	30(83)	1.1x10 ⁻⁴
		M2	10(28)	4(11)	—
		Total	24(67)	34(94)	2.9x10 ⁻³

* : not done

リ赤血球低凝集性を示した1993/1994の36検体でのトリプシンによる標準法を用いた初代分離率は前年と同程度の39%で、2代継代後の全分離数は24株(67%)に止まった。これにしてキモトリプシン存在下では初代で30株(83%)が分離され、継代することによってさらに4株が分離され、ニワトリ赤血球低凝集性株が増えるに従ってトリプシン存在下での分離効率が低下する傾向がみられた。これに対してキモトリプシンは1991/1992年のニワトリ赤血球高凝集性株のときとほとんど変わらない分離効率を示した。

ところで、両プロテアーゼ存在下での分離効率に統計学的な有意差の有無について1992/1993からの2年間を調べた結果、Table 1のとおり初代分離においては何れの流行期においても有意水準0.01%以下であった。このことはトリプシンとキモトリプシンの分離効率には有意差が認められたことを示している。

2003/2004年から最近3年間のA香港型のトリプシンとキモトリプシン存在下におけるMDCK細胞での分離効率をTable 2に示した。この3年間はほぼ同じような分離性状を示した。すなわち、トリプシン存在下では初代で73~84%から分離され、継代することによってさらに83~91%が分離された。ニワトリ赤血球低凝集性株が出現した1992/1993および1993/1994年流行期の低い分離効率とは異なっていた。一方、キモトリプシン存在下では初代で87~94%が分離され、継代によって最近の3年間はすべてのスワブからウイルスが分離され、何れの流行期においてもキモトリプシンの方がトリプシン存在下より高い分離効率を示し、2003/2004年から3年間の2代継代におけるトータルの分離効率は、9~17%キモトリプシン存在下での分離効率の方が高かった。

両者の分離効率に有意水準0.01%以下で、2005/2006

Table 2. Relative efficacy of MDCK cell cultures with trypsin or chymotrypsin for Isolation of influenza AH3 viruses between 2003 and 2006

Year	No. of swabs	Passage history	No. of isolates (%)		Probability (p)
			Trypsin	Chymotrypsin	
2003/2004	68	M1	57(84)	59(87)	6.3×10^{-1}
		M2	5(7)	9(13)	—*
		Total	62(91)	68(100)	7.6×10^{-2}
2004/2005	34	M1	26(76)	32(94)	5.9×10^{-2}
		M2	4(12)	2(6)	—
		Total	30(88)	34(100)	1.3×10^{-1}
2005/2006	29	M1	21(73)	27(93)	1.3×10^{-7}
		M2	3(10)	2(7)	—
		Total	24(83)	29(100)	1.8×10^{-1}

* : not done

の初代分離以外に有意差は見られなかったが、3年間をトータルしたトリプシン116株に対してキモトリプシン131株の分離数との間の検定値(p)は 6.64×10^{-5} となり、有意水準0.01%以下であったことから両プロテアーゼ存在下での分離効率には有意な差が認められた。

抗原性を大きく変化させると共にニワトリ赤血球低凝集性株が出現した1992/1993年から2年間のトリプシン存在下での分離効率が低下したのに比べ、最近3年間のA香港型の分離効率が高かったのは、HA遺伝子の進化の結果であろうが詳細な機序は不明である。

キモトリプシン存在下での増殖ウイルスの抗原性は、感染研から配布された同定用のフェレット感染血清に対してトリプシン存在下での増殖ウイルスに比べ、1管程度低い場合があることが示された。そこで、トリプシンあるいはキモトリプシン存在下で増殖させたそれぞれのウイルスで作製したマウス免疫血清でお互いの抗原性を交差して比較したが、明確な差は認められなかった。免疫動物の種類あるいは免疫方法による差かも知れない。トリプシンとキモトリプシンのアミノ酸の開裂モチーフは異なる。しかしながら、抗原性に明確な差は見られなかったことから、いずれのプロテアーゼもHA蛋白の開裂部位はほぼ近似していることを示唆している。

Aソ連型は調べた複数の流行期においてもトリプシン、キモトリプシンいずれのプロテアーゼ存在下でもその分離率にほとんど影響を受けず、ウイルスは患者材料から高率に分離された。一方、B型は調べた限り、いずれか一方のプロテアーゼにしか感受性を示さない分離株が一定の割合で存在した。2004/2005の23検体では、両方のプロテアーゼで18株(78%)分離されたが、トリプシンでのみ分離されたのが2株、キモトリプシンでのみ分離されたのは3株であった。

Fig. 1にA香港型ウイルスのキモトリプシン存在下での細胞変性を示した。印象的なのは使用するキモトリプシン濃度が $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ と高いために未感染細胞がウイルス接種後培養3~4日で広い空間を等間隔に空けて小さな細胞塊として集積しだす(Fig. 1 d、矢印で示す細胞変性箇所の外側の細胞塊)。このときA香港型ウイルスが感染していると感染初期から、かなり広い領域で未感染細胞の細胞塊集落とは異なる一見正常な単層細胞域を形成しているのが見られる(Fig. 1 b)。早晩この一見正常な単層細胞域は打上げ花火の大輪の菊のようにその場で壊れていき、最終的にはバラバラな細胞の壊滅像を示す(Fig. 1 c)。Fig. 1のdは1wellに1箇所の細胞変性を見せた検体での培養4日目の像である。細胞変性はトリプシン存在下とは異なる特異的な変性像を示し観察は容易である。

謝 辞

検体採取に協力して下さいました疾病対策課、発生动向調査における検査定点である岡藤小児科、県立塚口病院および県立公立豊岡病院の関係者、ならびに県内の保健所関係者に深く感謝致します。

本研究の一部は、文部科学省「新興・再興感染症研究拠点形成プログラム」による支援を受けた。

文 献

- 1) 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)
- 2) Tobita, K.: Persistent canine kidney (MDCK) cells for isolation and plaque assay of influenza B viruses. *Med. Microbiol. Immunol.*, **162**, 23-27 (1975)
- 3) 山岡政興: MDCK細胞と発育鶏卵によるインフルエンザウイルス分離の比較. *兵庫衛研報*, **18**, 13-17 (1983)
- 4) 山岡政興, 岡藤輝夫, 垣内敏孝, 楠田均: A香港型およびB型が分離された1992-93年流行期の兵庫県におけるインフルエンザについて. *兵庫衛研報*, **28**, 7-12 (1993)
- 5) 山岡政興, 楠田均, 岡藤輝夫, 垣内敏孝: 1993-94年流行期の兵庫県におけるインフルエンザについて. *兵庫衛研報*, **29**, 13-19 (1994)
- 6) Yamaoka, M., Homma, M. and Hotta, H.: MDCK cell cultures supplemented with high concentrations of trypsin exhibit remarkable susceptibility to influenza C virus. *Archives of Virology*, **140**, 937-944 (1995)

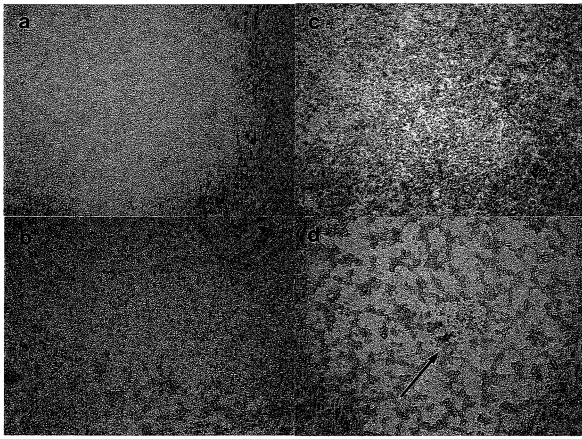


Figure 1. Time course of the cytopathic effects of MDCK cells infected with A Hong Kong type influenza virus. Uninfected cells, x40 (a), 4 days post infection, x40 (b and d), and 7 days post infection, x40 (c). The arrow indicates cytopathic effects.

IV ま と め

MDCK細胞におけるA香港型インフルエンザウイルスのキモトリプシン存在下での分離効率について、1992/1993年を中心にした3年間と2003/2004年からの3年間を対象に検討した。1991/1992年の株はトリプシンあるいはキモトリプシン存在下の何れでも初代で高率に分離されていたが、1992/1993年からの2年間はトリプシンにおける分離効率が明らかに低下した。最近3年間のトリプシンによる分離効率は高くなっているが、検討した6年間では何れもキモトリプシン存在下での分離効率がトリプシンを上回った。分離に用いた同じプロテアーゼ条件下でAソ連型はトリプシンおよびキモトリプシン何れの存在下でもほぼ同一の高い分離効率を示した。一方、B型はプロテアーゼに対する感受性の異なる株が一定の割合で存在した。また、細胞変性はトリプシン存在下に比べて観察しやすい。