

インフルエンザウィルスA／USSR／92／77 (H1N1)に対する単クローン抗体の作製と 疫学的解析における応用

Production of monoclonal antibodies to influenza virus A/USSR/92/77(H1N1) and their application to epidemiological study

吉屋 宏二 野呂 新一 桜田 教夫

Koji Furuya, Shin-ichi Noro and Norio Sakurada

緒 言

1975年にKöhlerとMilsteinによって、永続培養が不可能な抗体産生細胞を永続培養可能な骨髄腫細胞と融合させ抗体を產生しながら増殖を続けるB細胞ハイブリドーマ（雑種腫瘍系細胞）が作られた¹⁾。この技術の開発により、1個のB細胞または1個の細胞より細胞分裂によって生じた遺伝的に均一な細胞集団によって產生された抗体、すなわち単クローン抗体が大量作製されることができるようになり、医学、生物学の広い分野で利用されるようになった。

インフルエンザウィルス（以下インフと略す）に対する単クローン抗体に関しては、1978年にGerhardらにより、A/PR/8/34(H1N1)に対する抗体が作製されて以来²⁾多くの研究者がヘマグルチニン(HA)³⁾、ノイラミニダーゼ(NA)⁴⁾、リボ核タンパク(RNP)⁵⁾、マトリクスタンパク(M)⁶⁾等のウィルス抗原成分に対する単クローン抗体を作製し、それぞれの分子上の詳細なエピトープ（抗原決定基）の解析を行った。特に、表在抗原(HA, NA)の抗原性の大幅な変異(antigenic shift)や小変異(antigenic drift)の機序が単クローン抗体を用いて解明されつつある⁷⁾。

そこで我々は、北海道における過去6年間のインフの流行時に分離したA/H1N1型(H1型と略す)の小変異について解析するため、この型の代表的な株とされているA/USSR/92/77に対して作製された単クローン抗体の抗原結合特異性について記し、さらに凝集阻害(HI)活性を示す抗体を使って、1978年から1984年の間に北海道で分離されたH1型の株内小変異について考察する。

実験材料と方法

1. ウィルス株

本研究で使われたA/USSR/92/77(H1N1)、A/Tokyō/2/75(H3N2)、B/Kanagawa/3/76の3株と1978年から1984年の間に北海道で分離されたH1型の株の大部分は、ふ化鶏卵内の漿尿膜腔で分離継代した。一部は、Tobitaら(1975)の方法⁸⁾で、トリプシン存在下MDC K細胞で分離し継代保存した。A/PR/8/34(H1N1)、A/FM/1/47(H1N1)、A/Swine/Iowa/15/30(H1N1)、A/Singapore/1/57(H2N2)N₁、A/Aichi/2/68(H3N2)、A/Kumamoto/37/79(H1N1)、A/NJ/8/76(H1N1)、A/Niigata/102/81(H3N2)そしてB/Singapore/222/79の9株は国立予防衛生研究所内日本インフルエンザセンター製インフルエンザウィルス抗原分析用キットを用いた。

2. マウス骨髄腫細胞

骨髄腫細胞としてP₃N S₁/1-Ag4-I(NS-1)(大日本製薬株式会社ラボラトリープロダクト部)を用いた。

3. 免疫マウス

Laverらの方法⁹⁾に従って卵で増殖させたA/USSR/92/77を赤血球吸着法と蔗糖密度勾配法により精製した。次に、この精製ウィルスの1250血球凝集単位(HAU)を完全アジュバントと共に6週齢のBALB/c系雌マウスの腹腔に接種し、1ヶ月後、さらにアジュバントなしに200HAUを静脈から追加免疫し、3日後の脾細胞を用いた。一部のマウスを最終回の注射後7日目に採血し、血清を分離したのち免疫マウス血清として使用した。

4. 脾細胞の調製

脾細胞浮遊液は、長谷川の方法¹⁰⁾に準じて調製し、2~3×

10^8 個の脾細胞を得た。

5. 45%ポリエチレンギコール液

渡辺らの方法¹¹⁾に準じ分子量4,000のPEG (Sigma) を用いた。

6. HT培地とHAT培地

HT (ヒポキサンチン, チミジン) と HAT (ヒポキサンチン, アミノブテリン, チミジン) (Boehringer Mannheim) 培地は、15%牛胎児血清 (FBS) を加えて用いた。

7. 細胞融合

脾細胞 15×10^7 個と NS-1 3×10^7 個を混合し渡辺らの方法¹¹⁾ に従ってPEGと反応させた。融合後、HAT培地に脾細胞で $2 \sim 5 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように浮遊させその0.1 ml を96穴平底マイクロプレート (Falcon 3040) の各穴に分注し、37°Cの7%炭酸ガス培養器で培養した。融合後コロニーが肉眼的に認められるようになった穴について、それらの上清を取り、後述のenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法でスクリーニングした。

8. ハイブリドーマのクローニングおよび維持

間接蛍光抗体法 (IFA) でも強陽性を示すハイブリドーマは、渡辺らの方法¹¹⁾に準じて限界希釈法で2度クローニングを行い、増殖してきたコロニーを24穴平底プレート (Nunc 168357)、次いで10 ml のプラスチック培養びん (Falcon 3013) に移して大量培養を行い、一部を凍結保存、他の一部をあらかじめ、ブリストン (2, 6, 10, 14-tetramethyl pentadecane, Aldrich) 0.5 ml を腹腔内注射して処置しておいたBALB/c系マウスの腹腔内に移し 1×10^7 個のハイブリドーマを注射して約2週後に腹水を採取した。

9. 赤血球凝集抑制 (HI) 試験

HI試験は国立予防衛生研究所の方法¹²⁾に準じて行い、血清および腹水はあらかじめRDEで処理した。使用した赤血球浮遊液は0.5%ニワトリ血球であった。また一部のHI試験で抗原として使われた凝集素(HA)ロゼットは、Gregoriadesの方法¹³⁾に従って精製ウイルスを界面活性剤であるトリトンX-100で処理し、DEAE-セルロースクロマトグラフィーで分画後使用した。

10. ELISA法

ELISA法はVollerらのマイクロ法に準じて行った。¹⁴⁾スクリーニング用抗原は、MDCK細胞で増殖させたA/USSR/92/77を前述のLaverらの方法⁹⁾で精製し、1%トリトンX-100で分解後使用した。末処理正常ウイルス粒子抗原を使うELISAでは、緩衝液中にツィーン20を添加しなかった。また二次血清はペルオキシダーゼ標識羊抗マウス全IgMノグロブリン抗血清 (Cappel) を用いた。基質としてO-フェニレンジアミンが使われた。抗原およ

び二次血清の至適濃度は、共にBox titrationに基づき決定した。

11. ノイラミニダーゼ抑制 (NI) 試験

A/USSR/92/77のノイラミニダーゼ (NA) 活性をフィツインを基質にして測定し、常法通り行つた。¹²⁾

12. 間接蛍光抗体 (IFA) 法

ウイルス接種後、3~4+のCPEを認めた感染MDCK細胞をマルチテストスライド (Flow) 上に塗布し、冷アセトン処理後常法通り¹⁵⁾サンドイッチ法を実施した。二次血清として、FITC標識羊抗マウス全IgMノグロブリン抗体 (Cappel) を用いた。

実験成績

1. 抗体産生ハイブリドーマの作製

本研究では、2回の融合実験で896穴中152穴 (17%) にコロニーが認められ、ELISA法によりこれらのうち29.5%にあたる45穴が抗体陽性であった。抗体陽性のコロニーのうち、IFAでも強陽性を示す24のコロニーについて、さらに限界希釈法で2回クローニングを行い、最終的に合計10系統のハイブリドーマを確立した。

2. 単クローリング抗体のHI反応性

10系統のハイブリドーマ腹水と免疫マウス血清をRDE処理し、A/USSR/92/77ウイルス正常抗原とのHI試験を行った成績をTable 1に示す。7-5F3, 7-6

Table 1. HI titers of monoclonal antibodies to A/USSR/92/77(H1N1)

Monoclonal antibodies No.	Antigens	
	Intact virions	Isolated hemagglutinin
7-5F3	5,120*	N.T.
2-4B12	2,560	N.T.
7-6H7	640	N.T.
7-6G2	<40	640
7-2A3	<40	320
7-3B10	<40	80
2-1F4	<40	40
7-5D6	<40	40
7-1H10	<40	<40
7-2H12	<40	<40
Immune mouse serum**	2,560	N.T.

* The titer is expressed as the reciprocal of final dilution.

** N.T.=not tested.

*** Anti-A/USSR/92/77 immune mouse serum.

H7そして2-4B12の3系統がHI活性を示した。一方、正常粒子抗原に対してHI活性を示さなかった残り7系統のうち7-6G2, 7-2A3, 7-3B10, 7-5D6そして2-1F4の5系統がHAロゼットのHA活性を阻害した。

3. 単クローニング抗体のNA活性に対する影響

ウイルス表面のエンベロープから突出している抗原には、先に述べた赤血球を凝集するHAの他に、NAという酵素がある。Table 2に、A/USSR/92/77のNA活性に対する単クローニング抗体の10倍希釈液での影響をまとめた。NA活性を40%以上阻害した単クローニング抗体は、7-5F

Table 2. Effect of monoclonal antibodies to A/USSR/92/77(H1N1) on neuraminidase activity

Monoclonal antibodies*	Effect on neuraminidase activity of A/USSR/92/77
No.	
7-5F3	Decrease**
2-4B12	Decrease
7-6H7	Decrease
7-6G2	No effect
7-2A3	No effect
7-3B10	No effect
2-1F4	Enhance***
7-5D6	No effect
7-1H10	No effect
7-2H12	No effect

* The dilution used was 1:10 for all the antibodies.

** Decrease = 30 to 40% inhibition compared to control (anti-B/Kanagawa/3/76 hybridoma ascitic fluid).

*** Enhance = about 40% enhancement compared to control (anti-B/Kanagawa/3/76 hybridoma ascitic fluid).

3, 7-6H7そして2-4B12のいずれもHI活性を持ち合わせた抗体であった。

4. IFAによる抗HA単クローニング抗体の結合反応性

Table 3に示した8つの抗HA単クローニング抗体は、いずれもA/USSR/77-感染細胞の辺縁にのみ局限して強い特異蛍光を示した。またTable 1に示したHI試験の成績と比較して、IFA法による抗体検出は容易でしかも高い値を示した。

5. IFA法による細胞内抗原に対する単クローニング抗体の結合反応性

インフの抗原は、既に述べたHA、NAの表在抗原の他に粒子内部に存在する2つの抗原RNPとMを含む。表在抗原はもちろん、これら2つの内部抗原を、IFA法によりウイルス感染細胞内に検出することができる。¹⁶⁾¹⁷⁾ Table 4に示した7-1H10と7-2H12の2系統は、A/USSR/77-感染細胞の細胞質内に散在性に顆粒状の蛍光を発し、1H10で染色した細胞では核内にも蛍光を認めた。似た成績は、1984年のH1型分離株でも得られたが、H3型およびB型の感染細胞では、特異蛍光が認められなかった。Table 4は、また、加熱処理(100°C, 2分)後の細胞内抗原に対する単クローニング抗体の結合性を示す。7-1H10, 7-2H12は共にほとんど反応しなかった。

6. ELSA法による単クローニング抗体の結合反応性

Table 5に示したごとく、抗HA活性を示す8つの単クローニング抗体は、固相化されたA/USSR/77の正常粒子抗原に対して結合性を示した。しかし内部抗原に対する2種の抗体はまったく反応しなかった。また上述の8種の抗HA抗体は、1984年のH1型分離株とは結合しなかった。

7. H1型標準ウイルス株および1978年から1984年の間に北海道で分離されたH1型分離株とHI活性を示す単クローニング抗体の間の反応性について

7-1. 標準抗原株に対するHI反応性

Table 1に示したごとく、今回、3系統のA/USSR

Table 3. Immunofluorescence with anti-HA monoclonal antibodies of MDCK cells infected with various influenza type strains

Virus strains	Reciprocal FA titer* of monoclonal antibody							
	7-5F3	2-4B12	7-6H7	7-6G2	7-2A3	7-3B10	2-1F4	7-5D6
A/USSR/77(H1N1)	100,000	32,000	1,000	100,000	32,000	1,000	320	320
V-3475 (H1N1)**	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
A/Tokyo/75(H3N2)	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
B/Kanagawa/76	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100

* The FA titer of each monoclonal antibody was determined using serial 0.5 log₁₀-fold dilutions.

** This strain was isolated during the H1N1 type-epidemic of 1984 in Hokkaido.

Table 4. Immunofluorescence with anti-viral internal component monoclonal antibodies of MDCK cells infected with various influenza type strains

Infected cells with	Heat-treatment**	Reciprocal FA titer* of monoclonal antibody		
		7-2H12	7-1H10	Immune serum***
A/USSR/77(H1N1)	No	3.200	10,000	10,000****
"	Yes	<100	<100	N.T. ****
V-3475 (H1N1) *****	No	320	320	320
"	Yes	<100	<100	<100
A/Tokyo/75(H3N2)	No	<100	<100	1,000
"	Yes	<100	<100	320*****
B/Kanagawa/76	No	<100	<100	<100

*The FA titer of each monoclonal antibody was determined using serial 0.5 log₁₀-fold dilutions.

** Infected cells on slide glasses were treated in PBS for 2 min at 100°C.

*** Anti-A/USSR/92/77 immune mouse serum.

**** Strong fluorescence was found mainly at the cell margin of the infected cells.

***** N.T.=not tested.

***** This strain was isolated during the H1N1 type-epidemic of 1984 in Hokkaido.

***** The cytoplasmic fluorescence of most cells was lost, but several cells were stained.

Table 5. Reactivity of anti-A/USSR/92/77 monoclonal antibodies with the virions of different type strains with the aid of ELISA technique

Monoclonal antibodies No.	ELISA* with:		
	A/USSR/77 (H1N1)	A/Tokyo/75 (H3N2)	B/Kanagawa/76
7-5F3	+	-	-
2-4B12	+	-	-
7-6H7	+	-	-
7-6G2	+	-	-
7-2A3	+	-	-
7-3B10	+	-	-
2-1F4	+	-	-
7-5D6	+	-	-
7-2H12	-	-	-
7-1H10	-	-	-

*The ELISA was carried out using a 1:50 dilution of each monoclonal antibody and the developed color was read visually; -negative, +positive.

/92/77に対するH I活性を示す単クローナル抗体を得た。これらの単クローナル抗体は、力値に違いを認めたものの、A/FM/1/47, A/Kumamoto/37/79, そしてホモロガスであるA/USSR/77のHA活性をほぼ同じ程度に阻害した。しかしH1型であるA/PR/8/34, A/Swine/Iowa/15/30 そしてA/NJ/8/76とはまったく反応しなかった。これらの成績をTable 6 に示した。

Table 6. Reactivity of anti-A/USSR/92/77 monoclonal antibodies with representative A/H1N1 strains, A/H2N2 strain, A/H2N3 strains and B strains

Virus strains	HI titer of			Immune mouse serum*
	7-5F3	2-4B12	7-6H8	
A/PR/8/34(H1N1)	<40	<40	<40	<40
A/SW/Iowa/15/30(H1N1)	<40	<40	<40	<40
A/FM/1/47(H1N1)	5,120	2,560	640	1,280
A/NJ/8/76(H1N1)	<40	<40	<40	<40
A/USSR/92/77(H1N1)	5,120	2,560	640	2,560
A/Kumamoto/37/79(H1N1)	5,120	2,560	640	2,560
A/Singapore/1/57(H2N2)	<40	<40	<40	<40
A/Aichi/2/68(H3N2)	<40	<40	<40	<40
A/Tokyo/2/75(H3N2)	<40	<40	<40	<40
A/Niigata/3/76(H3N2)	<40	<40	<40	<40
B/Kanagawa/3/76	<40	<40	<40	<40
B/Singapore/222/79	<40	<40	<40	<40

Anti-A/USSR/92/77 immune mouse serum.

7-2. 北海道分離株に対するH I反応性

1978年から1984年の間に、北海道で分離されたH1型ウイルス20株と7-5F3および2-4B12の2系統の単クローナル抗体との間の反応性についてHI試験で調べた。その結果、1978年の12株、1979年の1株、1980年の3株、1981

年の1株は、これら2系統の单クローニング抗体によって程度の差は認められるにしても、いずれも凝集阻害作用を受けた。しかし1983年11月から1984年2月の間に分離された株、すなわち今季シーズン中に分離された3株はほとんど阻害されなかった。以上の成績をTable 7に示した。

Table 7. Reactivity of anti-A/USSR/92/77(H1N1) monoclonal antibodies with A/H1N1 strains isolated during the influenza epidemics of 1978 to 1984 in Hokkaido

Strain No.	Years isolated	HI titer of	
		7-5 F 3	2-4 B 12
G42	1978. 2	640	320
G49	1978. 2	2,560	1,280
G64	1978. 2	5,120	2,560
G71	1978. 2	5,120	2,560
G76	1978. 2	2,560	2,560
PH97	1978. 2	5,120	2,560
PH103	1978. 2	1,280	640
PH114	1978. 2	5,120	1,280
PH137	1978. 2	1,280	320
PH148	1978. 2	320	160
PH164	1978. 2	2,560	1,280
PH185	1978. 2	1,280	640
CV131	1979. 2	1,280	640
V42	1980. 2	5,120	2,560
V243	1980. 2	5,120	2,560
V741	1980. 3	2,560	1,280
V768	1981. 2	2,560	1,280
V3203	1983. 11	40	<40
V3287	1983. 12	<40	<40
V3475	1984. 2	<40	<40

考 察

1. 表在抗原HA上のエピトープに対する单クローニング抗体の結合性について

本実験で得た7-5 F 3, 2-4 B 12そして7-6 H 7のHI活性を示す3系統の单クローニング抗体は、 HAとNAに対する生物学的活性から (Table 1, Table 2), Gerhardら¹⁸⁾の言うL-AもしくはXのエピトープグループを認識する抗体ではないかと推察された。すなわち、 HA分子上のこれらの領域に対する抗体は、 HI活性が低く、 NA活性を減少せしめる効果をもつと言われている。一方他の5系統の抗HA单クローニング抗体は、正常ウイルス粒子に対す

るHI活性を完全に欠除していたが、界面活性剤で処理後得たHAロゼットの凝集を阻害した (Table 1)。これらの抗体はNI活性をもたず (Table 2)、しかもウイルス表在抗原に対して向かっていることがELISA法で証明されていることから (Table 5), Gerhardら¹⁸⁾の言うYエピトープに属する領域を認識している抗体であることが示唆される。喜田らのA/Seal/Mass/1/80 (H₇N₇) ヘマグルチニンを使った所見では、 HI陰性の抗体は、陽性の抗体より HA分子の疎水端に近い部分に結合することが示唆されている¹⁹⁾。

2. 内在抗原に対する单クローニング抗体の結合性について

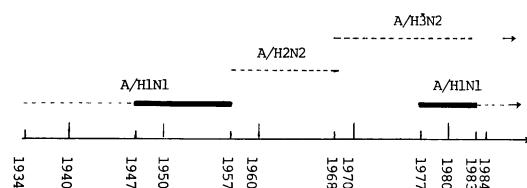
ウイルス粒子内部の抗原、 RNPとMは、共に型特異的抗原であることが知られている²⁰⁾。以前から行なわれているように、インフをA, B, Cの3型に分ける分類は、抗原的に恒常不变であると考えられていたこれらの内部抗原に対する動物抗血清を用いた補体結合反応に基づく (WHO, 1959)。しかしながら、单クローニング抗体を使った最近の研究によると、 RNPは少なくとも3つの互いにオーバラップしない抗原決定領域をもち、その1つが型特異であるらしく、他の2つの領域で抗原変異があることがわかった⁵⁾。またMに関しても、4つの抗原結合部位が知られており、亜型の中であるいは間で小変異が証明されている⁶⁾。Table 4に示したIFA法に基づく成績もまた、7-1 H10および7-2 H12が亜型特異的抗体である可能性を示唆した。すなわち、他の亜型A/Tokyo/2/75 (H₃N₂) - 感染細胞とはまったく反応しないことが判明した。また、加熱処理後の抗原とはほとんど反応しなかったことから、内部抗原に対するこれらの抗体が、共に、Mに対してよりもRNPに対して向かられた抗体と思われた。この場合、RNPとMに対する抗体を識別するうえで、RNP抗原が易熱性で、100°C 2分間の加熱で破壊されるのに対し、Mはさらに長時間の煮沸に耐えるという事実に基づく²¹⁾。

3. 1978年から1984年の期間内に北海道で分離されたH₁型ウイルス株と单クローニング抗体の間のHI反応性について

Table 1に示したごとく、 HI活性を示す3系統の单クローニング抗体は、 HIパターンから推察して多分同一のあるいは近接した抗原部位を認識しているものと思われた。標準株との反応性では、ホモロガスであるA/USSR/92/77 (H₁N₁) と似た反応性をA/FM/1/47 (H₁N₁) で認めたが、 A/PR/8/34 (H₁N₁) そしてブタインフルエンザA/Swine/Iowa/15/30 (H₁N₁) 由来と思われるA/NJ/8/76 (H₁N₁)²²⁾とはまったく反応しなかった。PR8とFM1は、自然界で顕著な“連続変異”をおこしたウイルス株であり²³⁾、フェレット抗血清によるHI試験でもこれら2株間の交差反応性は認められて

ない。FM 1類似の反応性は、1979年の標準株A/Kumamoto/37/79でも認められた。1977年に再登場した所謂Aソ連型は、1950年頃流行していたH₁ウイルスと抗原的に極めて類似していることが指摘されている^{24), 25), 26)}。また単クローナル抗体を使った研究でも、同様のことが証明されている²⁷⁾。一方、北海道で分離されたH₁株のうち、1978年から1981年にかけて分離されたすべての株に対し7-5 F 3と2-4 B 12の2つの系統は、反応における程度の差こそあれ、明らかなH I活性を示した。けれども、1983年から1984年にかけての流行期に分離されたH₁株に対してほとんどH I作用を及ぼさなかった。病原微生物検出情報(第49号、1984年3月発行)によると全国的に今季シーズン初期に分離されたH₁株はワクチン株であるA/Kumamoto/37/79とH I試験で同型であったが、その後今季ニュージーランドで分離されたA/Dunedin/6/83型株が優性になったことが報告されている。このように、フェリット抗血清による所見と異なり、7-5 F 3と2-4 B 12の2系統の単クローナル抗体で調べた限り、北海道では今季流行の当初より、既にこれら単クローナル抗体と反応する部位が変異していたことが推測される。Figure 1に我々が得た単クローナル抗体7-5 F 3および2-4 B 12と反応するエピトープの出現と消失についての模式化した図を示す。

Figure 1. Inheritance and disappearance of monoclonal antibody 7-5F3(or 2-4B12)-reactive epitope on the HA molecules of influenza virus A/H1N1 strains



*Solid lines indicate the inheritance of 7-5F3-reactive epitope on the HA molecules of A/H1N1 isolates from 1947-1957 and of the "Russian" strains which reappeared in 1977.

**No A/H1N1 viruses were isolated during the period 1956-1976; in 1956, the H2N2 strains emerged and replaced the H1N1 viruses, and in 1968, the H3N2 viruses appeared, and since 1977 the "Russian" strains have coexisted in the population with H3N2 viruses.

FM 1がPR 8から連続変異した際に獲得したと思われる抗原決定基の一部が、1977年に再登場したAソ連型ウイルスに引き継がれ、1983年まで保持され、そしてその同じ年に消失したことが推測される。今シーズンから明瞭に変異したH₁ウイルスが今後どのように流行していくのかは予

測できない。しかし少なくとも今シーズンの本疾患の発生が比較的小規模であったのは、Aソ連型は1977年から流行しており抗体保有率が高かったこと、また、ワクチン接種等により、Aソ連型に対し抗体価が高く、A/Dunedin/6/83類似株に対しても十分な抵抗力を獲得していたためと考えられている(病原微生物検出情報、第50号、1984年4月発行)。

要 約

我々はインフルエンザウイルスA/USSR/92/77(H₁N₁)に対する10系統の単クローナル抗体を作製した。これらの抗体は、H I活性、N I活性、ELISAおよび蛍光染色パターンより2つのクラスに分類された。すなわちウイルス表在抗原であるHAに対する抗体と内在抗原に対する抗体とに分れた。前者の抗原に対して8系統のクローナーが得られた。このうち3系統が正常ウイルスに対するH I活性を示したが、5系統はまったくH I活性を示さなかった。一方、内在抗原に対する2つの抗体は、RNPに対するものであることが示唆された。次に我々は、H I活性を示す3系統の単クローナル抗体を使って、代表的な(H₁)型の株との交差反応性をH I試験で調べた。その結果、A/FM/1/47(H₁N₁)とA/Kumamoto/37/79(H₁N₁)と似た反応を示すことが分った。一方、これらの単クローナル抗体は、北海道において1978年から1984年の間のH₁型の流行期に分離された株のうち、1983年から1984年の流行期を除く調べたすべての株に対しH I活性を示した。しかし1983年から1984年に分離した株、すなわち今季流行株に対するH I活性は、まったく無いかあるいはほとんどないことが判明した。1977年に再登場したAソ連型ウイルスのエピトープの一部は、1947年の分離株FM 1と同一であり、1983年に変異したことが単クローナル抗体を使って示唆された。

稿を終えるにあたり、本研究に協力をいたいた当研究所疫学部由布久美子専門員に深謝致します。

文 献

- 1) Köhler,G and Milstein,C : Nature, **256**, 495 (1975)
- 2) Gerhard,W,et al. : Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., **75**, 3 (1978)
- 3) Webster,R.G. and Laver,W.G. : Virology, **104**, 139 (1980)
- 4) Webster,R.G. et al. : Virology, **117**, 93 (1982)
- 5) Van Wyke,K.L. et al. : J.Virol., **35**, 24 (1980)

- 6) Van Wyke,K.L.et al.: J.Immunol., **49**, 248 (1984)
- 7) Webster,R.G.et al.: Genetics of Influenza Viruses, ed.Palese,P.and Kingsbury,D.W.,Springer-Verlag, Wien,New York.P.127 (1983)
- 8) Tobita,K.et al.: Med.Microbiol.Immunol.,**162**, 9 (1975)
- 9) Laver,W.G.: Fundamental Techniques in Virology ed.Habel,K.and Salzman,N.P.,Academic Press,New York,p.82 (1969)
- 10) 長谷川 均: 感染症学雑誌, **56**, 855 (1982)
- 11) 渡辺 武, 海津 務: 免疫実験操作法, X, 2963 (1980)
- 12) 国立予防衛生研究所学友会編: ウイルス実験学各論, 丸善, p. 287 (1982)
- 13) Gregoriades,A.: Virology, **49**, 333 (1972)
- 14) Voller,A.et al.: Bull. WHO **53**, 55 (1976)
- 15) Kawamura,A.Jr.: Fluorescene Antibody Techniques and their Application,University of Tokyo Press,Tokyo (1969)
- 16) Maeno,K.and Kilbourne,E.D.: J.Virol., **5**, 153 (1970)
- 17) Oxford,J.S.and Schild,G.C.: Immunological Studies with influenza matrix protein.In The Biology of Negative Strand RNA Viruses,Barry,R.D.and Mahy,B(eds.) Academic Press,New York (1975)
- 18) Gerhard,W.et al.: Monoclonal antibodies,ed.Kennett,H.et al.,Plenum Press,New York,London, p.317 (1980)
- 19) 喜田 宏他: 第30回日本ウイルス学会総会講演要旨集, シンポジウム演説抄録, No.4 (1982)
- 20) Schild,G.C.: J.gen.Virol., **15**, 99 (1972)
- 21) Oxford,J.S.and Schild,G.C.: Virology, **74**, 394 (1976)
- 22) Dowdle,W.R.: Report on influenza virus surveillance from the Virology Division,Center for Disease Control,Atlanta,U.S.A. 29 April (1976)
- 23) Virelizier,J.L.et al.: J.exp.Med., **150**, 1559 (1974)
- 24) Kung,H.C.et al.: Bull.W.H.O. **56**, 913 (1978)
- 25) Kendal,A.P.et al.: Virology, **89**, 632 (1978)
- 26) Zhdanov,V.M.et al.: Lancet, I, 294 (1978)
- 27) Webster,R.G.et al.: Virology **96**, 258 (1979)

英 文 要 約

Summary

Ten clones of hybridoma cells that formed antibodies against influenza virus A/USSR/92/77(H1N1) have been isolated.

First, the antibodies were divided into two classes on the basis of their hemagglutination inhibition(HI) activity, neuraminidase inhibition(NI) activity, ELISA and fluorescent staining patterns.

1. One class of antibody is directed against the hemagglutinin(HA). Of 8 antibodies belonging to this class, 3 showed HI activity, however the remaining 5 cases possessed no activity in HI tests.

2. Other class is directed against the viral internal antigen, perhaps ribonucleoprotein.

Second, the antigenic relationship among representative influenza virus A/H1N1 strains was analyzed.

The three monoclonal anti-HA antibodies to A/USSR/92/77(H1N1), which exhibited HI activity, cross-reacted with A/FM/1/47(H1N1) and A/Kumamoto/37/79(H1N1), but not with A/PR/8/34(H1N1), A/SW/Iowa/15/30(H1N1) and A/NJ/8/76(H1N1).

Using such cross-reacting anti-HA antibodies, two distinct reactivity patterns were observed among A/H1N1 viruses isolated during the epidemics of 1978 to 1984 in Hokkaido, Japan, i.e., they inhibited the hemagglutination activity of isolates in 1978 to 1981, but failed to inhibit that of isolates in 1983 and 1984.

Therefore, it seems valid to state that at least one of shared and cross-reacting epitopes, which is antigenically identical with that of FM1, on the HA molecules of A/H1N1 viruses from the influenza epidemics of 1977 to 1983 underwent an antigenic change in the year of 1983.