

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461563

研究課題名(和文) C型インフルエンザの隔年流行の要因と抗原変異が及ぼす臨床への影響

研究課題名(英文) Biennial epidemics and clinical features of influenza C virus infections.

研究代表者

松崎 葉子 (Matsuzaki, Yoko)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：00292417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：C型インフルエンザの流行を2014年と2016年に捉えることができたが、流行株の抗原変異は検出できなかった。地域住民の抗体保有調査では、流行の無かった奇数年(2015年と2017年)と流行のあった偶数年(2014年と2016年)とで抗体保有率に明確な違いは見られず、奇数年でも不顕性感染がある可能性が示唆された。小児科入院患者の調査では、ヒトメタニューモウイルスに比べて喘鳴の頻度は低いものの肺炎の頻度は同程度で、白血球数やCRPの上昇を認めた。細菌の二次感染や他ウイルスとの重複感染が病態の悪化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epidemics of influenza C virus infection occurred in Yamagata, in 2014 and 2016, but we could not detect antigenic changes of viruses during a study period. Annual investigation of seroprevalence revealed that the prevalence of the antibodies against influenza C virus in 2015 and 2017 were similar to those in 2014 and 2016, suggesting that influenza C virus had been circulating asymptotically in 2015 and 2017. Influenza C virus infections in a hospital setting had similar rate of pneumonia, significantly lower frequency of wheezing, and higher levels of WBC and C-reactive protein than human metapneumovirus (hMPV) infection, suggesting that bacterial coinfections make respiratory conditions more severe.

研究分野：小児感染症学

キーワード：C型インフルエンザウイルス 抗原変異 抗体保有率 小児肺炎

1. 研究開始当初の背景

(1) C型インフルエンザにはA型やB型にはない流行パターンがあり、隔年の流行(偶数年)が1996年から2013年現在まで山形県では続いている。そしてこの期間に、抗原性の異なる系統による流行株の置き換わり現象が3度起きている。1996年から2000年までは山形系統株、2002年から2004年までは神奈川系統株、2006年から2012年まではサンパウロ系統株が流行した。このような流行株の置き換わり現象はB型インフルエンザのビクトリア系統株と山形系統株の流行に似ている。C型インフルエンザの隔年流行や流行株の置き換わりが何故おきるのか、B型インフルエンザでいわれているように免疫圧による選択によるものであるのかは明らかにされていない。

(2) C型インフルエンザの抗原変異のメカニズムは明らかにされていない。中和抗体を産生させる唯一の蛋白であるヘムアグルチニン・エステラーゼ(HE)蛋白の抗原構造に関して、1992年に私達のグループが中和エピトープの同定を行って以降、進展していないのが現状である(Matsuzaki et al, Virology 180, 79-87, 1992)。1998年にはHE蛋白の結晶構造が発表され(Rosenthal et al, Nature, 1998)、中和エピトープを立体構造モデル上に表すことが可能になった。そこで、異なる系統株について多くのエスケープ変異株を採取して、C型インフルエンザHE蛋白の抗原構造を詳細に解析すること考えている。

(3) 私達がこれまでにC型インフルエンザ感染者170例の臨床像を解析した結果、患者の90%以上が6歳未満で学童は少なく、明らかにA型インフルエンザの年齢分布とは異なっていた。症状はA型インフルエンザに酷似し、約20%の症例が下気道炎と診断されていた。特に2歳未満児の入院率は30%を超えており、入院症例では肺炎が50%を占めることを報告した(Matsuzaki et al, J Infect Dis, 2006)。また、C型インフルエンザによる脳症例の報告も行った(Takayanagi et al, Pediatr Infect Dis J, 2009)。従来、「C型インフルエンザは鼻カゼ程度」といわれることが多かったが、これはA型B型インフルエンザの流行期に偶発的に分離されたC型インフルエンザ症例に基づくものであり、年間を通したサーベイランスを行えば症例が増えて、小児科領域とくに乳幼児でのC型インフルエンザウイルスの臨床的意義が明らかになるものと予想される。

2. 研究の目的

(1) C型インフルエンザの隔年流行と抗原性の異なる系統株による置き換わり現象が、B型インフルエンザでいわれているように免疫圧による選択によるものであるのかを探る為に、地域住民の継続した抗体保有調査を

実施し、集団免疫の低下とC型インフルエンザの流行との間に関連があるのかを明らかにする。

(2) C型インフルエンザウイルスの表面蛋白であるHE蛋白に対する単クローン抗体を作成し、エスケープ変異株を多数採取して、その変異部位をHE蛋白三次構造上に位置づける。異なる系統株に対する単クローン抗体を用いることにより、系統株独自の中和エピトープを明らかにし、分離株でみられる変異箇所と比較して変異のメカニズムを探る。

(3) C型インフルエンザは2歳未満児で肺炎を起こす頻度が高いが、他のウイルスと比較した報告は無い。サーベイランスで採取した検体を用いて、C型インフルエンザをはじめとする呼吸器ウイルスの検索をPCR法で行い、他の呼吸器ウイルスの検出例と比較することにより、このウイルスの臨床的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 山形県で2014年から2017年の間に分離されたC型インフルエンザウイルスを対象に、抗HE単クローン抗体を用いた赤血球凝集抑制(HI)試験を行い、各分離株の抗原性を明らかにした。さらに、感染症流行予測調査事業で集められた山形県住民の血清を用いて、山形系統株、神奈川系統株、サンパウロ系統株に対する抗体保有調査を実施した。

(2) C/Yamagata/15/2004(山形系統株)をマウスに免疫してHE蛋白に対する中和活性のある2種類の単クローン抗体を作成し、約50個の中和抵抗性エスケープ変異株を採取した。同様に、C/Ann Arbor/1/50株HEに対する既存の7種類の単クローン抗体を用いて、約200個のエスケープ変異株を採取した。これらの変異株の変異部位を同定し、HE蛋白立体構造モデル上への位置づけを行った。

(3) 一か所の病院小児科に呼吸器感染症で入院した患者の289検体から、PCR法でC型インフルエンザウイルスを検出し、陽性患者の臨床データの解析を他の呼吸器ウイルス(RSウイルスとヒトメタニューモウイルス)陽性患者と比較して行った。この研究は山形大学医学部倫理委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) C型インフルエンザ分離株の抗原性と抗体保有調査

2014年: 2014年に分離された21株について抗原解析を実施した結果、2006年から2012年までの流行の主流であったサンパウロ系統株が8株、2002年から2004年まで主流だった神奈川系統株が13株となり、流行の主流がサンパウロ系統から神奈川系統に変わ

る可能性が示唆された。

2015年：2株が分離されたのみで、奇数年のC型インフルエンザウイルスの活動は極めて低いことが示唆された。抗原解析の結果は2株とも神奈川系統株であり、流行する系統株の置き換わりが起きたことが示唆された。

2016年：32株の分離があり、隔年流行が実証された。抗原解析の結果、すべての株がサンパウロ系統株だった。これは、流行の主流がサンパウロ系統から神奈川系統に変わりつつあるという我々の予測に反するものだった。C型インフルエンザの抗原性の変化が起きにくいことを実証することになった。

抗体保有調査：

山形県住民のC型インフルエンザウイルスに対する抗体保有調査を毎年実施した結果、2014年から2017年の4年間は、サンパウロ系統株に対する抗体保有率が神奈川系統株に対する抗体保有率よりも高かった。この結果は、サンパウロ系統株が流行の主流株であり続けた上記結果と一致するものであった。流行の無い奇数年に抗体保有率の低下が認められた年もあったが、流行のあった偶数年との比較で明確な規則性を見いだすことはできなかった。このことから、奇数年でも不顕性感染がある可能性が示唆された。

(2) C型インフルエンザHE蛋白の抗原構造

C/Ann Arbor/1/50とC/Yamagata/15/2004のHEに対する計9種類の単クローン抗体を用いて約240個のエスケープ変異株を採取した。これら変異株の1アミノ酸変異は計17か所あり、HI試験の結果、4つの抗原領域(A-1、A-2、A-3、Y-1)がHE蛋白上にあることが明らかになった。さらに、変異株のアミノ酸変異箇所をHE蛋白の立体構造上に位置づけたところ、多くがレセプター結合活性やレセプター破壊活性部位の近傍にあることが明らかになった。この結果は、抗体の結合を逃れる変異が生物活性を低下させる可能性を示すものであり、HE蛋白の構造が安定である要因と考えられた。

(3) C型インフルエンザ感染小児の臨床的特徴

C型インフルエンザウイルスが検出された小児科入院患者29例の臨床データの解析を行った。他の呼吸器ウイルスが検出された重複感染例を除き、同時期に入院したRSウイルスとヒトメタニューモウイルスの感染小児と比較した。その結果、ヒトメタニューモウイルスの感染に比べて喘鳴の頻度は低かった(C型インフルエンザ13.3% vs. ヒトメタニューモ68.6%)が、肺炎の頻度は同程度(53.3% vs. 57.1%)だった。血液検査所見では、白血球数やCRPの上昇を認めた。細菌の二次感染や他ウイルスとの重複感染が病態の悪化に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Itagaki T, Aoki Y, Matoba Y, Tanaka S, Ikeda T, Mizuta K, Matsuzaki Y. Clinical characteristics of children infected with enterovirus D68 in an outpatient clinic and the association with bronchial asthma. *Infect Dis (Lond)*. 2018 Apr;50(4):303-312. doi: 10.1080/23744235.2017.1400176. 査読有.

Itagaki T, Aoki Y, Matoba Y, Tanaka S, Ikeda T, Matsuzaki Y, Mizuta K. Detection of Saffold viruses from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan, between 2008 and 2015. *J Med Virol*. 2018 Jan;90(1):34-40. doi: 10.1002/jmv.24928. 査読有.

Matsuzaki Y, Sugawara K, Furuse Y, Shimotai Y, Hongo S, Oshitani H, Mizuta K, Nishimura H. Genetic Lineage and Reassortment of Influenza C Viruses Circulating between 1947 and 2014. *J Virol*. 2016 Aug 26;90(18):8251-65. doi: 10.1128/JVI.00969-16. 査読有.

Furuse Y, Matsuzaki Y, Nishimura H, Oshitani H. Analyses of Evolutionary Characteristics of the Hemagglutinin-Esterase Gene of Influenza C Virus during a Period of 68 Years Reveals Evolutionary Patterns Different from Influenza A and B Viruses. *Viruses*. 2016 Nov 26;8(12). pii: E321. doi:10.3390/v8120321 査読有.

Shimizu Y, Abiko C, Ikeda T, Mizuta K, Matsuzaki Y: Influenza C virus and human metapneumovirus infections in hospitalized children with lower respiratory tract illness. *Pediatr Infect Dis J*. 2015 Nov;34(11):1273-5. doi: 10.1097/INF.0000000000000863. 査読有.

Tanaka S, Aoki Y, Matoba Y, Yahagi K, Mizuta K, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Matsuzaki Y. The dominant antigenic group of influenza C infections changed from C/Sao paulo/378/82-lineage to C/Kanagawa/1/76-lineage in Yamagata, Japan, in 2014. *Jpn J Infect Dis* 68(2):166-168, 2015. doi: 10.7883/yoken.JJID.2014.520. 査読有.

〔学会発表〕(計7件)

松寄葉子, 下平義隆, 本郷誠治, 水田克巳, 西村秀一: 2015-16シーズンのC型インフルエンザの流行. 第31回インフルエンザ研究者交流の会, 静岡; 2017年
高橋雅輝, 小原崇裕, 松寄葉子, 佐々木

裕, 吉野直人, 梶田弘子, 小野泰司, 村木 靖: 岩手県で検出された C 型インフルエンザウイルスの性状解析. 第 71 回日本細菌学会東北支部会, 仙台; 2017 年
佐藤光, 林日出喜, 下平義隆, 松寄葉子, 山谷睦雄, 本郷誠治, 川上和義, 西村秀一: C 型インフルエンザウイルス HE タンパクの開裂に関わる宿主プロテアーゼの解析. 第 71 回日本細菌学会東北支部会, 仙台; 2017 年
Sato K, Hayashi H, Shimotai Y, Matsuzaki Y, Yamaya M, Hongo S, Kawakami K, Nishimura H: Analysis of host serine proteases involved in cleavage of HE protein of the influenza C virus. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪; 2017 年
松寄葉子, 板垣勉: エンテロウイルス D68 感染症の 2 シーズン (2010 年と 2015 年) の臨床的検討. 第 48 回日本小児感染症学会, 岡山; 2016 年
松寄葉子, 菅原勘悦, 下平義隆, 本郷誠治, 水田克巳, 西村秀一: 2014 年の C 型インフルエンザウイルスの流行. 第 29 回インフルエンザ研究者交流の会, 東京; 2015 年
田中静佳, 的場洋平, 青木洋子, 矢作一枝, 水田克巳, 勝島史夫, 勝島由利子, 板垣勉, 松寄葉子: 2014 年山形県における C 型インフルエンザウイルスの分離状況. 第 41 回山形県公衆衛生学会, 山形; 2015 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松寄 葉子 (MATSUZAKI, Yoko)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号: 00292417