

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07783

研究課題名(和文) C型インフルエンザの隔年流行の宿主側要因と同ウイルス感染小児の重症化要因の解明

研究課題名(英文) Elucidation of factors that cause the biennial epidemic of influenza C virus and factors that make infected children more severe

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：C型インフルエンザでみられる隔年流行の要因をウイルス側の抗原変異と宿主側の免疫から探り、重症化との関連を検討した。2018年の分離株にみられた表面蛋白のアミノ酸置換K190Nは中和エпитープの中にあり、抗原変異によって流行が拡大した可能性が示唆された。抗体調査では、小児での流行前に成人の抗体価上昇を複数例で検出したことから、免疫を持つ成人の再感染が流行株の選択に働き、小児での流行に影響したことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C型インフルエンザの小児での流行に、ウイルスの抗原変異と成人の再感染が関係することを明らかにできた。この成果を他の呼吸器ウイルスの解析に応用することが期待できる。大きな流行になれば小児の重症化例も増える。中和エпитープの場所を同定したことと、本研究でその場所の変異による増殖への影響をみたことにより、今後のサーベイランスで得られる自然分離株の遺伝子変異を抗原変異と結び付けることが可能になり、流行拡大への影響を推測することが出来るようになった。

研究成果の概要(英文)：The cause of the biennial epidemic of influenza C virus was investigated from the antigenic variation on the virus side and the immunity on the host side. The amino acid substitution K190N of the surface protein found in the 2018 isolates was in the neutralizing epitope, suggesting that the epidemic may have spread due to antigen variation. The antibody survey against influenza C virus detected several cases of increased antibody titers in adults before the epidemic in children, indicating that reinfection in immunized adults helped select epidemic strains and affected the epidemic in children.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ 呼吸器感染症 抗原変異

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

C型インフルエンザは、発熱と鼻汁と咳嗽を主症状とする呼吸器感染症である。7-10歳までに80%以上の小児が抗体をもつ。患者は主に7歳未満の小児だが、成人での再感染があることがわかっている。小児での感染は上気道炎がほとんどだが、2歳未満の乳児では肺炎に進展して入院する率が高いことを報告した。このような重症例が増える要因の1つとして、流行の拡大とそれに起因するウイルスの抗原変異が考えられた。これまでの研究で、C型インフルエンザの表面蛋白上の抗原決定部位を明らかにできたが、自然界で発生するウイルスの変異が抗原性を変えるかどうか、重症化と関連するかどうか、まだ解明できていない。

1988年から山形県で始めたサーベイランスによって、C型インフルエンザは偶数年に大きな流行を起こすことが判明している。このような特異的な流行周期をとる感染症は少なく、その要因について探索を始めている。これまでの抗体保有調査では奇数年と偶数年で抗体保有率に明確な違いはみられなかった。このため、流行の捉えられない奇数年でも成人の再感染が水面下で起きていることが示唆される。成人の間でウイルスの伝播が続けば、A型インフルエンザのようにC型も再感染時の免疫によって抗原変異株の選択が起き、それが小児での流行につながると考えられる。しかし、これまでの内外の研究からは、この仮説を裏付けるような報告は無い。

### 2. 研究の目的

本研究では、C型インフルエンザウイルスに特異的な隔年流行の要因を、ウイルス側と宿主側双方から探り、重症化との関連をみることを目的とする。ウイルス側として、流行に伴う抗原変異をとらえ、抗原変異株の増殖能に変化があるかを調べる。宿主側として、流行閉期の成人の感染を調査し、小児での流行株の選択に關与しているかを調べる。

### 3. 研究の方法

(1) 山形県で研究期間中に分離できたC型インフルエンザウイルスについて、表面蛋白ヘムアグルチニン・エステラーゼ(HE)に対する抗体を用いた赤血球凝集抑制(HI)試験を行い、抗原変異をとらえる。

(2) 分離株の塩基配列を決定し、アミノ酸変異箇所の同定を行う。変異箇所をHE蛋白の立体構造上に位置付けて、中和エピトープの位置と比較する。

(3) 中和エピトープの決定に使用した、抗HE単クローン抗体に対するエスケープ変異株の増殖実験を行う。自然分離株の変異箇所と比較することにより、増殖能への影響を検討する。

(4) 感染症流行予測調査事業で集められる山形県住民の血清のうち同意の得られたものを用いて、C型インフルエンザウイルスの抗体保有調査を行う(前年度からの継続)。平成30年度(2018年)から平成33年度(2021年)まで毎年実施し、隔年流行と抗体保有率の関係を明らかにする。

(5) 職員検診で半年ごとに採取された血清のうち同意の得られたものを用いて、C型インフルエンザウイルスの抗体価を測定する。半年間で4倍以上の抗体価上昇がみられた場合に、その半年の間に感染したものととして、成人での感染率を算出する。

### 4. 研究成果

#### (1) 山形県でのC型インフルエンザの流行と抗原変異株の出現

山形県ではC型インフルエンザの流行が2018年と2020年にあり、隔年流行が裏付けられた。2018年は40株、2020年は11株の分離があり、ともに2016年から続くサンパウロ系統株が主流だったが、2020年には少数ながら神奈川系統株が5年ぶりに分離された。HI試験の結果、2018年のサンパウロ系統株は、単クローン抗体YA3との反応性の異なる2つのグループに分かれることが判明した。これは、新たな抗原変異株が生まれたことを示唆する知見だった(Matsuzaki et al., Infect Genet Evol, 2020)。

#### (2) 分離株のアミノ酸変異箇所の同定と流行拡大の可能性

分離株の塩基配列を決定してアミノ酸変異箇所を調べたところ、HE蛋白の190番目のアミノ酸がリシン(K)からアスパラギン(N)に置換した株が見つかり、この変異によりYA3との反応性が低下することが判明した。190番目は立体構造モデルでHE蛋白の中和エピトープの中にあることから、このK190N変異によって流行が拡大する可能性が示唆された。

### (3) エスケープ変異株の増殖実験と自然分離株の増殖能の推定

中和エピトープに変異をもつ12のエスケープ変異株の増殖実験を行った。その結果、レセプター結合領域に近接した中和エピトープ J14 に変異をもつ D269N 変異株で極端な増殖低下がみられた。流行拡大への関与が推測された190番目を含むHE蛋白頭頂部の190-loopの変異に関しては、S192L 変異株の増殖は低下しないものの E193K 変異株は増殖低下がみられた(図1 Matsuzaki et al., *Viruses*, 2021)。これまでのサーベイランスで、193番目に変異をもつウイルスは分離されていない。自然分離株にみられた K190N 変異は、増殖能を保ったまま抗原性を変えることが出来たため、流行株として選択されたものと考えられた。

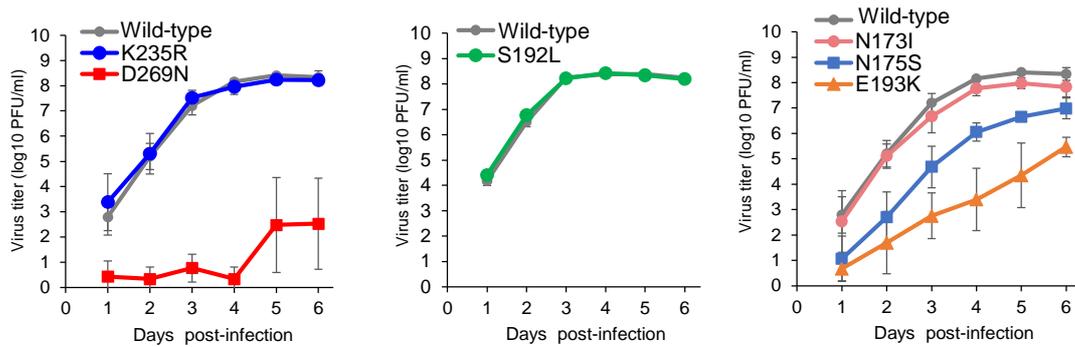


図1 エスケープ変異株の増殖曲線

### (4) 抗体保有調査の結果と流行株の関係

2018年に実施した抗体保有調査では、40歳代での神奈川系統株に対する抗体保有率の上昇がみられた。2018年の小児の流行株はサンパウロ系統であり神奈川系統の分離は無かった。2019年の調査では、20代以降の年齢層でサンパウロ系統株よりも神奈川系統株に対する抗体保有率が高い傾向がみられた。これは再感染する年齢層で神奈川系統株が選択されている可能性を示唆している。(1)で記したように2020年に神奈川系統株が5年ぶりに3株分離されており、前年までの成人の感染によって小児での流行株が選択された可能性を支持する結果だった。

### (5) 成人での感染と流行株選択の可能性

職員検診で半年ごとに採取された血清を用いてC型インフルエンザの抗体価を測定した。5年間のシリーズ血清で調べたところ、57人中10人で4倍以上の抗体価上昇がみられ、成人における5年間のC型インフルエンザ再感染率を17.5%と算出した。抗体上昇がみられた時期は、小児でC型インフルエンザの流行が確認された時期にほぼ一致し、成人での再感染が小児におけるC型インフルエンザの流行に影響するという予測を裏付けることができた(図2)。また、抗原性の異なるサンパウロ系統と神奈川系統の株に対する抗体価をそれぞれ測定したところ、小児での各系統の流行時期に先んじて成人での抗体上昇がみられており、成人での再感染が免疫による選択圧に関与し、抗原性の異なる流行株の置き換えりに影響することを示すことができた(Liao et al., *J Clin Virol*, 2020)。

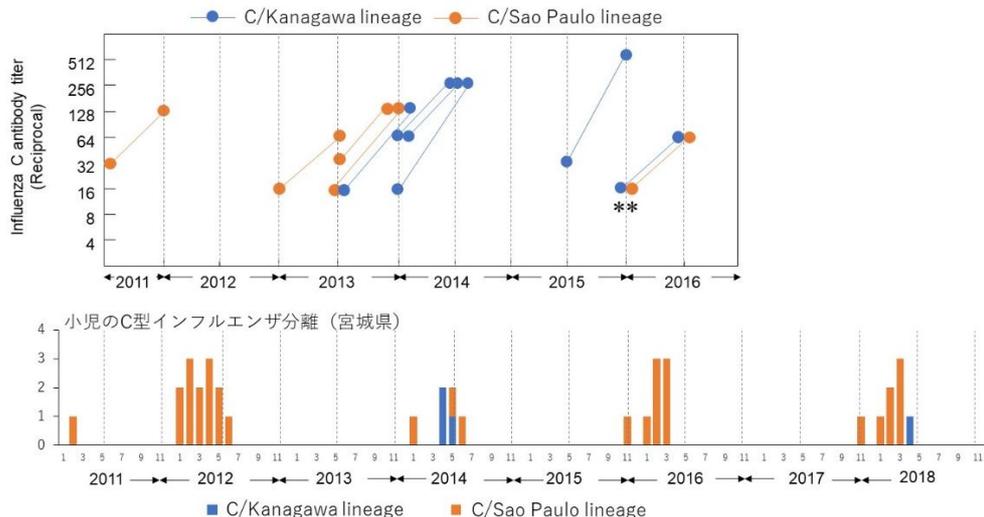


図2 成人でのC型インフルエンザウイルス抗体価上昇例(上)と小児のC型インフルエンザ分離数(下)

#### (6) 小児の重症化の要因について

本研究の成果として、サーベイランスでとらえた C 型インフルエンザウイルス表面蛋白の K190N 変異によって抗原性が変化し流行が拡大する可能性を示すことが出来た。また、少人数の解析ではあるが、K190N 変異の有る株と無い株に感染した患児の入院率に違いがあったため、病原性に関与する可能性も示唆された。しかし、新型コロナウイルス対策の影響により 2020 年は流行が早期に収束し、2022 年は全く分離できなかったため詳細な評価ができなかった。今後も継続的なサーベイランスが必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Matsuzaki Yoko, Sugawara Kanetsu, Shimotai Yoshitaka, Kadowaki Yoko, Hongo Seiji, Mizuta Katsumi, Nishimura Hidekazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Growth Kinetics of Influenza C Virus Antigenic Mutants That Escaped from Anti-Hemagglutinin Esterase Monoclonal Antibodies and Viral Antigenic Changes Found in Field Isolates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 401 ~ 401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13030401	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Ko, Hayashi Hideki, Shimotai Yoshitaka, Yamaya Mutsuo, Hongo Seiji, Kawakami Kazuyoshi, Matsuzaki Yoko, Nishimura Hidekazu	4. 巻 95
2. 論文標題 TMPRSS2 Activates Hemagglutinin-Esterase Glycoprotein of Influenza C Virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e0129621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01296-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Liao Feng, Nishimura Hidekazu, Ito Hiroko, Zhang Yunhui, Matsuzaki Yoko	4. 巻 133
2. 論文標題 Longitudinal course of influenza C virus antibody titers of healthy adults in Sendai, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Virology	6. 最初と最後の頁 104662 ~ 104662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcv.2020.104662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsuzaki Yoko, Shimotai Yoshitaka, Kadowaki Yoko, Sugawara Kanetsu, Hongo Seiji, Mizuta Katsumi, Nishimura Hidekazu	4. 巻 81
2. 論文標題 Antigenic changes among the predominantly circulating C/Sao Paulo lineage strains of influenza C virus in Yamagata, Japan, between 2015 and 2018	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 104269 ~ 104269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2020.104269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuzaki Yoko, Sugawara Kanetsu, Furuse Yuki, Shimotai Yoshitaka, Hongo Seiji, Mizuta Katsumi, Nishimura Hidekazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Neutralizing Epitopes and Residues Mediating the Potential Antigenic Drift of the Hemagglutinin-Esterase Protein of Influenza C Virus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 417 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v10080417	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松寄葉子, 下平義隆, 本郷誠治, 水田克巳, 高橋雅輝, 村木靖, 西村秀一
2. 発表標題 2017-2018シーズンに分離されたC型インフルエンザウイルスの系統樹解析と抗原解析.
3. 学会等名 第33回インフルエンザ研究者交流の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松寄葉子
2. 発表標題 エスケープ変異株と自然分離株にみるC型インフルエンザウイルスの抗原変異とその選択.
3. 学会等名 第34回インフルエンザ研究者交流の会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------