

資料

## 広島県におけるC型インフルエンザ

高尾 信一, 島津 幸枝, 福田 伸治, 豊田 安基江, 宮崎 佳都夫

### Clinical and Epidemiological Study of Influenza C in Hiroshima Prefecture

SHINICHI TAKAO, YUKIE SHIMAZU, SHINJI FUKUDA, AKIE TOYOTA and KAZUO MIYAZAKI

(Received Oct. 1, 2001)

1999年11月から2000年3月までの間に、広島県内において8名のC型インフルエンザの患者が確認された。患者はいずれも9ヶ月齢から3歳5ヶ月齢までの乳幼児で、主な臨床症状は38℃～40℃の発熱を伴う上気道炎あるいは下気道炎であった。また、これらの患者の発生については、疫学的解析から、いずれも散発事例と考えられた。

広島県内におけるC型インフルエンザウイルス(Inf.V)感染の実態を把握する目的で、0歳～86歳齢までの住民186名について、C型Inf.Vに対する抗体保有状況を調査した。年齢階層別にみた抗体保有率は、0歳～4歳の年齢層において50%未満であった以外、全ての年齢階層で高い抗体保有率を示した。

キーワード：C型インフルエンザ, Seroepidemiology, HI抗体価, 広島県

#### はじめに

C型インフルエンザウイルス(Inf.V)は、かぜ様疾患を引き起こす原因ウイルスの1つであると考えられている[1]。しかし、ヒトの間に広く浸淫して毎年のように大きな流行を繰り返すA型やB型Inf.Vに比べ、C型Inf.Vの臨床的・疫学的な実態は不明な点が多い。

広島県内においては、これまでC型Inf.Vの分離報告例は見当たらなかったが、今回我々は、1999年11月から2000年3月にかけて、合計8名の急性呼吸器感染症の患者からC型Inf.Vを分離したので、それら患者の臨床的・疫学的な知見を報告する。また、広島県内におけるC型インフルエンザの実態を把握する一端として、県内住民を対象としたC型Inf.Vに対する抗体保有状況を調査したので、その成績も併せて報告する。

#### 材料と方法

##### 1. Inf.Vの分離

###### (1) 対象

1999年11月から2000年3月までの間に、広島県内の医療機関(広島県感染症発生動向調査検査定点医院など)において、急性呼吸器感染症の症状を呈した患者667名

(うち638名は15歳以下の小児)から採取された咽頭拭い液および鼻汁、合計667検体についてInf.Vの分離を実施した。

###### (2) Inf.Vの分離方法

全ての検体についてMDCK細胞を用いてInf.Vの分離を試みた。また一部の検体については、発育鶏卵を用いた分離法も併用した。

MDCK細胞を用いた分離法の場合は、分離の正否は検体を接種したMDCK細胞における細胞変性効果(CPE)の出現を指標とし、MDCK細胞で3代の継代後においてもCPEが出現しないものを分離陰性と判定した。また、CPEの出現によりInf.Vの分離が疑われる場合には、培養上清についてニワトリ赤血球とモルモット赤血球の凝集能の有無を確認した。

発育鶏卵を用いた分離法では、検体を7日齢卵のしょう尿膜腔内および羊膜腔内に接種し、34℃、72時間ふ卵した後、しょう尿液と羊水とを別々に採取し、それらについてニワトリ赤血球およびモルモット赤血球に対する凝集能の有無を確認した。

###### (3) 分離Inf.Vの同定

分離ウイルス株の(亜)型の同定は、マイクロタイター

法による赤血球凝集抑制)HI)試験により行なった[2].

① A型およびB型Inf.V同定のためのHI試験

国立感染症研究所・WHOインフルエンザセンターより分与された1999/2000年シーズン用同定キット(抗血清は,それぞれ, A/北京/262/95(H1N1)株, A/シドニー/05/97(H3N2)株, B/山梨/166/98株およびB/山東/07/97株の感染フェレット血清)と, 0.6%モルモット赤血球を用いたHI試験により分離株の(亜)型を同定した.

② C型Inf.V同定のためのHI試験

C型Inf.Vについては, 山形大学医学部細菌学教室の中村喜代人博士より分与された, C/山形/8/89株ニワトリ免疫血清と, 0.5%ニワトリ赤血球を用いたHI試験により同定した.

2. 分離C型Inf.V株の電子顕微鏡観察

分離されたC型Inf.V株の一部について, 7日齢の発育鶏卵羊水中に接種し, 34℃で3日間ふ卵した後, 羊水を採取した. 羊水中のウイルス粒子を20,000rpm, 1.5時間超遠心で濃縮したものを, 2%リンタングステン酸でネガティブ染色した後, 電子顕微鏡でウイルス粒子の形態を観察した.

3. 血清HI抗体価の測定

(1) 対象

1997年に広島県内の0歳から84歳までの住民, 合計186名から採取した血清について, A型, B型およびC型Inf.Vに対するHI抗体価を測定した.

(2) Aソ連型, A香港型およびB型Inf.Vに対するHI抗体価の測定

① 被検血清処理

被検血清は, 定法[1]に従いRDEで処理し, 56℃で60分間加温した後, ニワトリ赤血球で非特異的凝集素を吸収・除去して供試した.

② HI試験

ウイルス抗原は, 国立感染症研究所・WHOインフルエンザセンターから分与された, A/北京/262/95(H1N1)株, A/シドニー/05/97(H3N2)株, B/ハルビン/7/97株をそれぞれ用いた. HI抗体価の測定は, マイクロタイター法で実施した. 血球は0.5%ニワトリ赤血球液を用い, 室温で60分静置後に判定した. HI抗体価10倍以上を示すものを抗体陽性と判定した.

(3) C型Inf.Vに対するHI抗体価の測定

① 被検血清処理

被検血清の処理は, Hommaら[3]が報告した方法に準じて血清をPBS(-)で10倍に希釈したものを,

56℃, 30分間加温した後に用いた(RDE処理と赤血球による非特異凝集素の吸収処理は行っていない).

② HI試験

ウイルス抗原は, 今回我々が分離したC型Inf.V株(C/Hiroshima/290/99)を用い, マイクロタイター法で実施した. 反応には0.5%ニワトリ赤血球を用い, 4℃で60分静置後にHI抗体価を判定した. HI抗体価10倍以上を示すものを抗体陽性と判定した.

結 果

1. 急性呼吸器感染症患者からのInf.V分離

今回対象とした, 急性呼吸器感染症の患者由来の667検体のうち, 246検体からInf.Vが分離された. それらの内訳は, A香港型Inf.Vが158検体から, Aソ連型Inf.Vが79検体から, B型Inf.Vが1検体から, また, C型Inf.Vが8検体からであった.

C型Inf.Vの分離された8検体については, 全例が発育鶏卵の羊膜腔内接種法で分離された. 一方, MDCK細胞を用いた分離法では, 8検体中5検体でC型Inf.Vの分離に成功したが, 残りの3検体については, MDCK細胞での再分離を試みたものの, 分離陰性であった. なお, C型Inf.V分離株のMDCK細胞における増殖については, ウイルス増殖に伴うCPEは出現したが, その程度はA型やB型Inf.Vと比較すると弱く, また, 培養上清中のHA価も, 3~5代の継代後においても8HA/25 $\mu$ l以上には上昇しなかった.

2. C型Inf.V粒子の形態学的観察

A型とB型Inf.Vについては, 形態学的に両者を区別することは不可能であるが, C型Inf.Vは表面のスパイク構造の配列に特徴があり, 容易に識別できると言われている[4, 5]. そこで, C型Inf.V分離株について, その形態学的特徴を, 電子顕微鏡により観察した.

観察されたウイルス粒子は直径100nm前後の球形ないし類球形状を呈し, 表面にはC型Inf.Vの特徴とされる[4, 5]スパイク様構造物が正六角形の格子状の模様を描きながら, 規則正しく配列している像が確認された(Fig.1).

3. C型Inf.Vが分離された患者の臨床的・疫学的特徴

C型Inf.Vが分離された8名の患者の概要をTable 1に示した. 患者はいずれも9ヶ月齢から3歳5ヶ月齢までの乳幼児で, 臨床症状は38℃~40℃の発熱を認め, 上気道炎あるいは下気道炎を呈していた. そのうち3名(患者No.2, 4, 7)では, 鼻漏の症状も認められた. また, 1名(患者No.1)には, 発疹と骨髄異形成症候群を疑う所見も認められた.

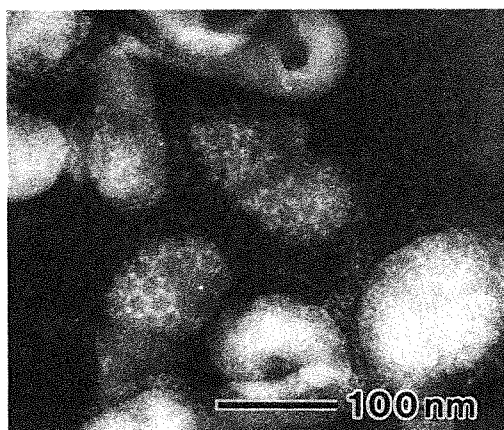


Figure 1. An electron micrograph of the Influenza C virus.

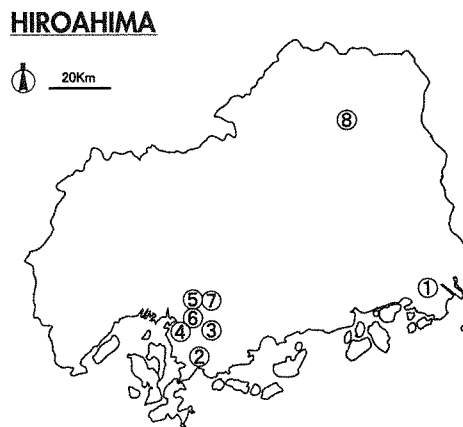


Figure 2. Geographical distribution of the patients with isolated influenza C virus in Hiroshima Prefecture. The numbers on the map show the place of the patients, and agree with the number of patients in the Table 1.

Table 1. Characterization of the patients with isolated influenza C virus from November 1999 to March 2000 in Hiroshima Prefecture.

No. of patient	Sex	Age	Specimen	Date was specimen collected	Clinical Symptoms	Strain of influenza C virus
1	M	1y 5m	throat swab	Dec. 2, 1999	fever, upper respiratory illness, rash	C/Hiroshima/290/99 (C/H/290/99)
2	M	9m	throat swab	Dec. 21, 1999	fever (39°C), bronchitis, rhinorrhea	C/H/252/2000
3	M	6y 11m	throat swab	Jan. 24, 2000	fever (40.0°C), bronchitis	C/H/248/2000
4	M	4y 0m	throat swab	Feb. 21, 2000	fever (40.0°C), upper respiratory illness, rhinorrhea	C//249/2000
5	M	1y 2m	throat swab	Feb. 23, 2000	fever (38.4°C), upper respiratory illness,	C/H/246/2000
6	M	3y 1m	throat swab	Feb. 28, 2000	fever (38°C), upper respiratory illness	C/H/247/2000
7	M	3y 5m	throat swab	Mar. 8, 2000	fever (40.3°C), bronchitis, rhinorrhea	C/H/251/2000
8	F	3y 2m	throat swab	Mar. 28, 2000	fever (39°C), bronchitis	C/H/250/2000

患者の発生に関しては、Fig. 2 に示した広島県内における患者発生の地理的分布、およびTable 1 に示した患者の発生時期から検討すると、患者相互に関連は認められなかったことから、地域的な流行によるものではなく、散発的な事例と考えられた。

#### 4. 広島県内住民のA、BおよびC型Inf.Vに対する抗体保有状況

広島県内の住民、0歳～86歳までの186名についてA、BおよびC型Inf.Vに対するHI抗体価を測定し、それらの抗体価をもとに5歳年齢層ごとの抗体保有率を算定した成績をFig. 3に、また、同じ被検血清について、A型およびB型Inf.Vについての抗体保有率を算定した成績をFig. 4に示した。

C型Inf.Vに対しては、今回対象とした住民の73.6% (134/186) が抗体価10倍以上のHI抗体を保有していた。また、それらの抗体保有率を年齢層別にみると、0歳～4歳では抗体保有率が50%未満であったが、それ以外の年齢層では、いずれも高い抗体保有率を示していた (Fig. 3)。これに対して、A型およびB型Inf.Vに対する年齢層別の抗体保有率のパターンは、明らかにC型Inf.Vのそれとは異なっていた。すなわち、A/シドニー/05/97 (H3N2) 株については14歳以下の年齢層においてのみ、あるいはB/ハルビン/7/97株に対しては5歳～24歳および30歳～39歳の年齢層においてのみ、50%を超える抗体保有が認められたに過ぎず、さらにA/北京/262/95 (H1N1) 株に対しては、全ての年齢層において抗体保有率が極めて低かった (Fig. 4)。

考 察

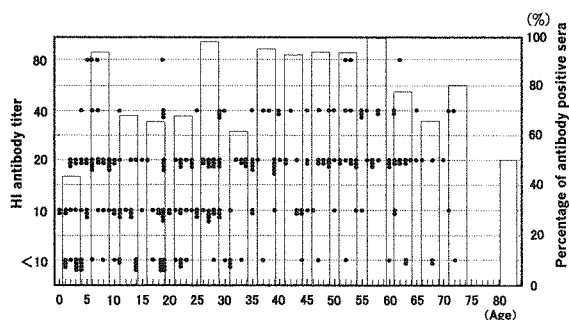


Figure 3. Age-related distribution of antibody and antibody-positive rate in age groups against influenza C virus. Hemagglutination-inhibition (HI) titers of 186 sera collected from residents of Hiroshima Prefecture in 1997 were determined by the microplate technique as described Homma [3]. The antigen for HI test was used the isolate of influenza C virus (C/Hiroshima/290/99). HI titers were expressed as the reciprocal of highest serum dilution that inhibited hemagglutination, and were plotted against age. The percentages of antibody-positive sera (HI titer of 1:10 or more) were determined every 5 years of age, and were showed by bar.

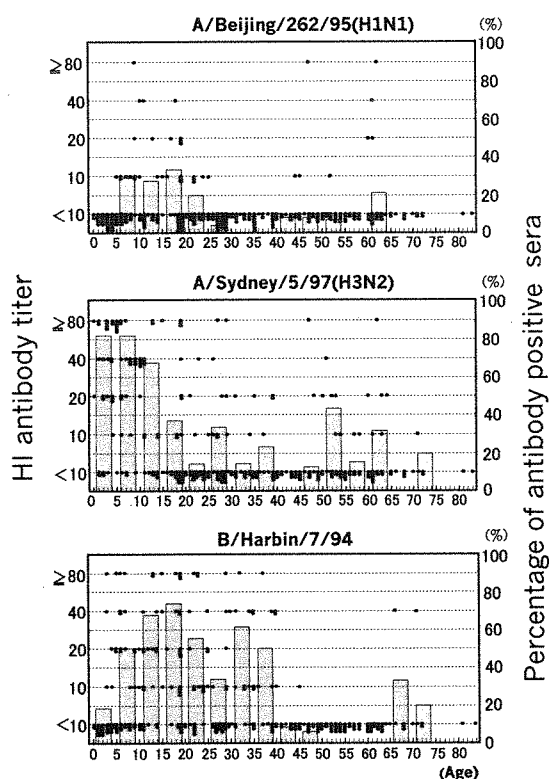


Figure 4. Age-related distribution of antibody and antibody-positive rate in age groups against influenza A and B viruses. HI titers of the same sera described in the legend of Fig.3 were determined by the standard microplate technique for influenza A and B virus [2]. The antigens for HI tests were used the standard strains in 1997/1998-influenza season, Japan; A/Beijing/262/95 (H1N1), A/Sydney/5/97 (H3N2), and B/Harbin/7/94. The representation of the HI titers and prevalence of antibody were the same as those of Fig.3.

C型Inf.Vは、1947年にアメリカのTaylorによる鼻カゼ様症状を呈した患者からの分離報告[6]により、その存在が明らかとなった。それ以後、C型インフルエンザに関しては、いくつかの臨床的、あるいは疫学的な研究成果が報告されている[7-11]ものの、その実態は依然として不明な点が多い。Katagiriら[1]は、山形県内の乳児院を対象として実施した2年間の継続調査結果から、C型インフルエンザの臨床症状を、38℃から40℃の発熱と2週間以上続く鼻汁過多で特徴づけられると報告している。また、中村[10]は、ヒトのC型Inf.Vの感染は、その経過中に終始重症感がないのが特徴であると説明している。今回、我々が報告した8名のC型インフルエンザ患者においては、そのうちの3名には、Katagiriらが指摘したような鼻汁過多の症状が認められたものの、他の5名には、そうした症状は認められなかった。また、8名中4名(患者No.1, 4, 5, 6)の症状は上気道炎であったが、残りの4名は気管支炎などの下気道炎であった。しかし、これらの症状は、A型やB型インフルエンザにおいても同様に見られるものであり、少なくとも冬期においては、臨床症状だけでは、C型インフルエンザと他のインフルエンザを区別することは困難であると思われる。なお、1名の患者(No.1)については、呼吸器感染症の症状以外に、骨髄異形成症候群と診断される症状が認められたが、それがC型Inf.Vの感染と関係があるか否かについては不明である。

C型インフルエンザに関する臨床的、疫学的知見が乏しい最大の理由は、C型インフルエンザと診断された症例、言い換えればC型Inf.Vの分離報告例が極めて少ないことにあると思われる。我が国では、各地方衛生研究所等(各地研等)を中心にInf.Vのサーベイランス体制が整備されており、各地研等で分離されたInf.Vについては、そのほとんどの分離事例が国立感染症研究所(旧国立予防衛生研究所)に報告されている。それらの報告を基に集計した結果をみると[12]、1991年から1996年までの間に、A香港型Inf.Vは12,822例、Aソ連型Inf.Vは5,699例、B型Inf.Vは5,232例の分離が報告されている。これに対して、同時期のC型Inf.Vは、わずかに18例の報告があったに過ぎない。このことは、ヒトにおけるC型Inf.Vの感染が、極めて希なケースである可能性と、C型Inf.Vの分離・同定が、他のInf.Vに比べて技術的に難しいことを反映している可能性が考えられる。前者の可能性については、詳細を後述するが、住民の抗体保有状況から考察すると否定的である。C型Inf.Vの分離・同定に関して、今回我々は8名の患者からウイルスを分離したが、それらは、いずれも発育鶏卵の羊膜腔内接種による分離成功例である。これに対して、MDCK細胞を用いた分離法では、

8検体中3検体からはC型Inf.Vを分離できなかった。さらにMDCK細胞でC型Inf.Vが分離できた場合でも、分離株のMDCK細胞におけるCPEの程度は弱く、培養上清中のHA価も低かった。このことは、C型Inf.VのMDCK細胞での増殖能が、他のInf.Vに比較して弱いことを示唆している。このように、C型Inf.Vの分離には発育鶏卵による分離法の方が、MDCK細胞を用いたそれと比べて優れていると思われるが、近年では各地研等においてInf.Vの分離目的で発育鶏卵を使用する機会が少なくなっており、このことがC型Inf.Vの分離報告例が少ない理由の1つであると推察される。加えて、分離株の同定に使用する抗血清が市販されていないことも、C型Inf.Vと同定される株が少ない理由の1つかもしれない。

今回我々は、広島県内住民のC型Inf.Vに対する抗体保有状況を調査した。その結果、0歳～4歳の年齢層を除いて、全ての年齢層が高率に抗体を保有していた。C型Inf.Vの年齢層別にみた抗体保有率については、過去に国内・外で実施された調査においても、今回の我々と同様の結果が報告されている[3, 9, 10, 13]。例えばHommaらが1976年に山形県下で実施した調査では、生後2ヵ月齢未満の乳児は全て抗体を保有していたが、生後6ヶ月までに一旦消失する。そして1歳以後は再び抗体保有率が急激に増加し、7歳～10歳で80～90%に達し、それ以降の年齢層においても高率に抗体保有が維持されていたことが明らかにされている[3]。これらの結果や今回の我々の結果から推察すると、C型Inf.Vの感染は、生後に母親から受動した免疫が消失するころから始まり、小児期までに、ほとんどの児が初感染を受け、その後も再感染を繰り返す事で、成人以降も抗体が維持されているものと考えられる[3, 5, 9, 10]。

## 文 献

- [1] Katagiri, S., Ohizumi, A. and Homma, M. (1983): An outbreak of type C influenza in a children's home. *J. Infect. Dis.*, 148, 51-56.
- [2] 国立感染症研究所(2000): インフルエンザウイルスおよびパラインフルエンザウイルスに対するHI抗体価表示方法の改定について, *臨床とウイルス*, 28(1), 47-49.
- [3] Homma, M., Ohyama, S. and Katagiri, S. (1982): Age distribution of the antibody to the type C influenza virus. *Microbiol. Immunol.*, 26, 639-642.
- [4] Wiley, D.C. and Skehel, J.J. (1991): *Viral members*. p.63-85. In Fields, B.N. and Knipe, D.M. (eds), *Fundamental Virology*, second edition, Raven Press, New York.
- [5] 松寄葉子, 中村喜代人 (1997): A型, B型, C型インフルエンザウイルスのウイルス学的, 疫学的ならびに臨床的特徴, *日本臨床*, 55(10), 2512-2520.
- [6] Taylor, R.M. (1949): Studies on survival of influenza virus between epidemics and antigenic variants of the virus. *Am. J. Public Health*, 39, 171-178.
- [7] Dykes, A.c., Cherry, J.D. and Nolan, C.E. (1980): A clinical, epidemiologic, serologic, virologic study of influenza C virus infection. *Arch. Intern. Med.*, 140, 1295-1298.
- [8] Moriuchi, H., Katsushima, N., Nishimura, H., Nakamura, K. and Numasaki, Y. (1991): Community-acquired influenza C virus infection in children. *J. Pediatr.*, 118, 235-238.
- [9] 本間守男 (1994): C型インフルエンザの臨床と疫学, *臨床とウイルス*, 22(5), 399-405.
- [10] 中村喜代人 (1991): 特集インフルエンザのすべてウイルス学的立場から 3) C型, *化学療法の領域*, 7(10), 50-59.
- [11] 勝島矩子 (2000): C型インフルエンザ, *小児科診療*, 63(12), 2057-2060.
- [12] Editorial Committee of Infectious Agents Surveillance Report (1997): Isolation/detection of virus from human sources, by year, Japan, 1991-1996. *Jpn. J. Med. Sci. Bio.*, 50 (suppl.), S111-112.
- [13] Nishimura, H., Sugawara, K., Kitame, F., Nakamura, K. and Sasaki, H. (1987): Prevalence of the antibody to Influenza C virus in a Northern Luzon Highland Village, Philippines. *Microbiol. Immunol.*, 31(11), 1137-1143.

