

# 1997/98 シーズンに山梨県で分離された インフルエンザウイルスについて

小澤 茂 山上隆也 井上利男<sup>1)</sup> 横山 宏<sup>1, 2)</sup>  
小松史俊<sup>3)</sup> 若尾 朗<sup>4)</sup> 田中 均<sup>5, 6)</sup> 荻原 篤<sup>5)</sup>  
佐藤俊彦<sup>5)</sup> 栗屋敬之<sup>5)</sup>

## Studies on Influenza Epidemics of 1997/98 Season in Yamanashi Prefecture

Shigeru OZAWA, Takaya YAMAGAMI, Toshio INOUE, Hiroshi YOKOYAMA,  
Fumitoshi KOMATSU, Hogara WAKAO, Hitoshi TANAKA, Atsushi OGIHARA,  
Toshihiko SATOH and Yoshiyuki KURIYA

インフルエンザはインフルエンザウイルスにより引き起こされる急性呼吸器疾患で、毎年、冬期に流行し、多数の人が罹患する。最近特に、インフルエンザの合併症と考えられる小児の脳炎、脳症などの重症例の報告の増加<sup>1, 2)</sup>や老人福祉施設でのインフルエンザの集団発生とそれに伴う死亡例の多発<sup>3)</sup>など、インフルエンザは、社会的にも影響が大きい、最も注視されている感染症の1つでもある。日本では過去約20年間は、A(H1N1)ソ連型、A(H3N2)香港型、B型の3種類のインフルエンザウイルスが抗原連続変異(drift)を起こしながら単独あるいは混在して毎年繰り返し流行している。

1997/98年シーズンの山梨県におけるインフルエンザの流行は、A(H3N2)型が主流であったが、2月～3月にB型が散発的に分離された。この流行の中で分離されたA(H3N2)型やB型ウイルスは、1997/98シーズンのワクチン株とは抗原性が少し異なるものであった。特に、B型ウイルスの1株(B/山梨/166/98)は、ワクチン株に比べ抗原変異が進んだ変異株であることから、1998/99シーズンの国際標準株、1999/2000シーズンの米国およびヨーロッパのワクチン製造株に選定された。

本報では、B/山梨/166/98が分離された1997/98シーズンのインフルエンザの流行状況とこの株の分離の経緯、さらにこのシーズンに分離されたA(H3N2)型、およびB型ウイルスの抗原性などについて報告する。

## 材料と方法

### 1. ウイルス分離対象と材料

県内の医療機関に呼吸器疾患で受診した患者117名、

\* 1 : 井上内科・小児科医院

\* 2 : 都留市立老人保健施設「つる」

\* 3 : 小松小児科医院

\* 4 : 若尾小児科医院

\* 5 : 県立中央病院

\* 6 : 吉田保健所

および集団発生があった4施設の患者41名の咽頭ぬぐい液をインフルエンザウイルスの分離材料とした。また、脳症、髄膜炎を呈した別の患者5名の咽頭ぬぐい液からもウイルス分離を試みた。

### 2. 被検血清

1998年1月から2月にかけて集団発生があった上記4施設の31名から採取した対血清を用いた。

### 3. ウイルス分離と同定

患者の検体をMDCK細胞に接種し、34℃で7日間培養した。なお維持培地としては、最終濃度5μ/mlのアセチルトリプシン添加したイーグルMEM培地を使用した。培養の間、細胞変性効果(CPE)を観察したが、最終的には0.5%モルモット血球を使用し、培養液の赤血球凝集(HA)反応を行って判定した。HA反応陽性のもは、日本インフルエンザセンターから配布された4種類の抗血清、すなわち、1997/98シーズンのインフルエンザのワクチン株であるA/北京/262/95(H1N1)、A/武漢/359/95(H3N2)、B/三重/1/93、B/広東/05/94に対する抗血清を用いた赤血球凝集抑制(HI)反応を行い、型別同定を行った。

### 4. 血清抗体価の測定

血清はデンカ生研製のRDEで4倍に希釈し、37℃18時間放置後、56℃30分で非働化し、50%モルモット血球で血清中の血球に対するインヒビターを除去したものを被検血清とした。HI反応は0.5%モルモットの血球を使用したマイクロプレート法<sup>3)</sup>で行った。使用した抗原は、上記に示した4種類のワクチン株と分離株A/山梨/27/98(H3N2)、A/山梨/46/98(H3N2)であった。



## 結 果

### 1. インフルエンザ様疾患患者の発生状況

1998年の山梨県感染症サーベイランス事業におけるインフルエンザ様疾患の一定医療機関当たりの患者報告数（定点率）の推移を図1に示した。

1997/98シーズンは1月の第3週から患者が増加し、第6週に定点率65.7でピークに達し、以後、減少し、第12週で流行が終息した。このシーズンは例年に比べ流行が遅く始まったわりには、ピーク時の定点当たりの患者数が例年より多く、短い期間に爆発的に流行がみられたのが特徴であった。1997年第48週から1998年第13週までの患者報告数は8,185人（定点率215.3）で、中規模の流行であった。

### 2. インフルエンザウイルス分離状況

山梨県内の医療機関と集団かぜ発生施設の呼吸器疾患患者から採取した検体についてウイルス分離を行った結果を週単位で図2に示した。

1997/98シーズンの最初のインフルエンザウイルスは、1998年第2週の1月17日に甲府市内の医療機関の患者

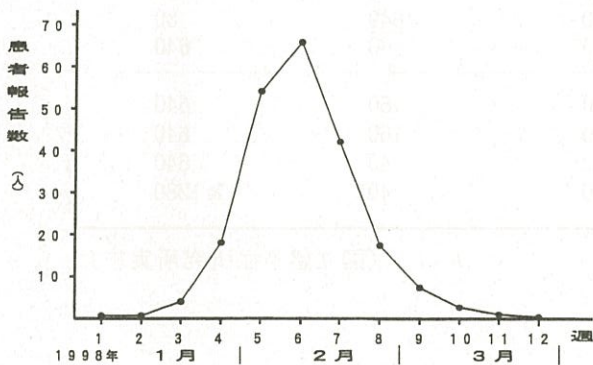


図1 インフルエンザ様疾患の一定医療機関当たりの週別患者報告数の推移

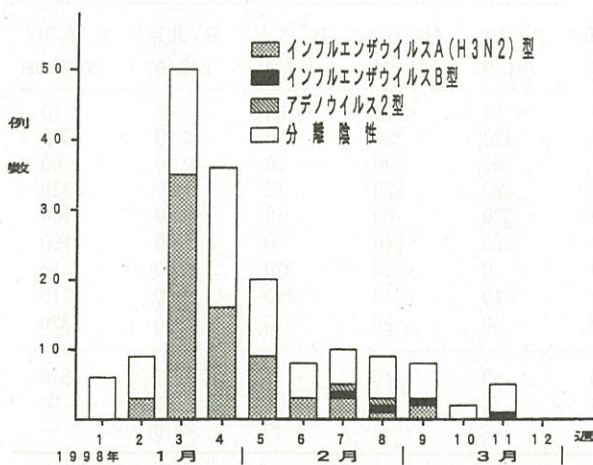


図2 山梨県の週別インフルエンザウイルス分離株数

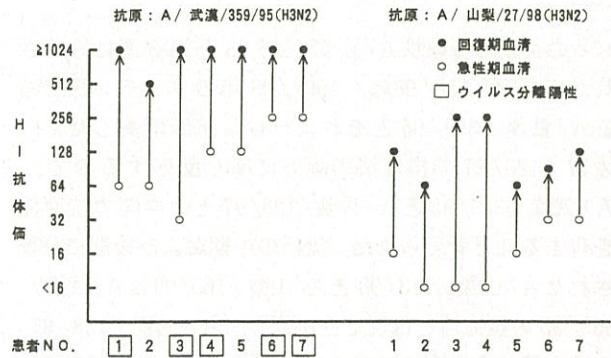


図3 集団かぜ発生施設における血清学的検査結果

から分離されたA (H3N2)型であった。その後、A (H3N2)型ウイルスの分離は、第3週に35株でピークになり、以後、減少しながら3月初旬の第9週まで続いた。この間、A (H3N2)型ウイルスが分離されたのは、163検体のうち72検体で、分離率は44.2%であった。

集団かぜの発生時の病因検索は、1998年の第3週から第5週にかけて発生した県境にある4保健所管内の初発の学校について実施した。4施設ともA (H3N2)型ウイルスが分離され、血清学的検査でも対血清が得られた31名中27名がA (H3N2)型ウイルスに感染したことが認められた。図3にはその内の1施設の血清学的検査例を示した。被検者7名中5名からA (H3N2)型ウイルスが分離され、全員の対血清間でA (H3N2)型に対する抗体の有意な上昇が認められた。被検者7名の急性期血清のHI抗体価をみると、ワクチン株A/武漢/359/95 (H3N2)に対しては全員が比較的高い抗体価を保有していたが、1998年の分離株A/山梨/27/98 (H3N2)に対する抗体は保有してないか、または保有していても低い抗体価であった。このことはA/山梨/27/98 (H3N2)の抗原性がワクチン株A/武漢/359/95 (H3N2)とずれていることを示唆していた。

以上のように、1997/98シーズンはA (H3N2)型ウイルスが主流行であったが、これに混じって、インフルエンザB型ウイルスが2月21日に1株 (B/山梨/166/98)、さらに3月3日から16日の間に3株、散発的に分離された。

### 3. 分離ウイルスの抗原性

山梨で分離されたウイルスがその年のワクチン株と類似しているかを調べるために、第2週、3週、5週、7週の検体から分離されたA (H3N2)型4株、第7週に分離されたB/山梨/166/98について国立感染症研究所に依頼して、抗原分析を実施した。

表1には県内で分離されたA (H3N2)型ウイルス4株に対するA (H3N2)型の標準株感染フェレット抗血清がどの程度のHI抗体価を持っているのかを示した。本シー



ズンの最初の分離株A/山梨/27/98と第3週に分離されたA/山梨/56/98は、1997/98年のワクチン株であるA/武漢/359/95とそれより少し抗原変異したA/佐賀/128/97の抗血清の両方に高く反応するので、A/武漢/359/95とA/佐賀/128/97との中間の抗原性を有する株と考えられた。流行の中期および後期に分離されたA/山梨/113/98とA/山梨/165/98はA/武漢/359/95の抗血清とは反応性が低く、A/佐賀/128/97の抗血清のみに高く反応するので、A/佐賀/128/97類似株であった。

一方、B/山梨/166/98について抗原分析の結果を表2に示した。MDCK細胞で分離されたB/山梨/166/98は、ワクチン株であるB/三重/1/93のホモ抗体価の1/8に反応が低下した株であり、山梨より少し早く分離されたB/長野/2038/98とほぼ同一の抗原性を示した。なお、B/山梨/166/98は、ワクチン株であるB/広東/

05/94の抗血清には全く反応しなかった。

その他のB型分離株は、著者らが行った分析では、表3に示すようにB/三重/1/93のホモ抗体価の1/8～1/4に低下した株であった。

#### 4. B/山梨/166/98が分離された患者の臨床像

B/山梨/166/98が分離された患者は、甲府市在住の4歳児で、2月20日に急な発熱で発症し、最高体温は39.5℃で、咽頭発赤、咽頭痛、顎下リンパ腺腫脹がみられた。5～6回の嘔吐があったが、下痢、結膜充血は見られなかった。21日には熱性けいれんが認められた。

#### 5. 発育鶏卵培養法によるB/山梨/166/98の分離

MDCK細胞で分離されたB/山梨/166/98がワクチン株であるB/三重/1/93から8倍程度ずれた抗原性を示したので、-70℃で凍結保存していたB/山梨/166/

表1 1997/98シーズンに分離されたインフルエンザA(H3N2)型ウイルスの抗原分析

ウイルス抗原	フェレット感染抗血清 (HI抗体価)			
	A/秋田/1/94	A/武漢/359/95	A/S. Africa/1147/96	A/佐賀/128/97
A/秋田/1/94	320	80	<10	<10
A/武漢/359/95	80	320	80	20
A/S. Africa/1147/96	160	320	640	80
A/佐賀/128/97	<10	40	160	640
A/山梨/27/98	10	80	160	640
A/山梨/56/98	20	160	160	640
A/山梨/113/98	<10	<10	40	640
A/山梨/165/98	10±	10	40	≥1280

(国立感染症研究所実施)

表2 1997/98シーズンに分離されたインフルエンザB型ウイルスの抗原分析

抗原	フェレット感染抗血清 (HI抗体価)								
	B/愛知/5/88	B/山形/16/88	B/Panama/45/90	B/三重/1/93	B/北京/184/93	B/Harbin/07/94	B/広東/05/94	B/北京/243/97	B/長野/2038/98
B/愛知/5/88	40	<10	<10	<10	<10	<10	80	80	<10
B/山形/16/88	<10	1280	160	80	320	320	20	<10	320
B/Panama/45/90	<10	320	160	40	160	320	20	<10	160
B/三重/1/93	<10	160	80	160	320	320	10	20	320
B/北京/184/93	<10	320	40	40	320	80	10	<10	160
B/Harbin/07/94	<10	640	40	80	320	640	10	<10	160
B/広東/05/94	20	<10	<10	<10	10	<10	320	160	<10
B/北京/243/97	20	<10	<10	<10	<10	<10	160	160	<10
B/長野/2038/98	<10	40	10	20	40	20	<10	<10	320
B/山梨/166/98 (MDCK2)	<10	40	20	20	80	40	<10	<10	320
B/山梨/166/98 (Egg2)	<10	10	10	10	40	20	<10	<10	80
B/山梨/166/98 (Egg4)	<10	40	20	20	80	-	<10	<10	-

(国立感染症研究所実施)



表3 インフルエンザウイルスB型分離株とワクチン株感染抗血清との間の交差 HI 試験

抗原	フェレット感染抗血清 (HI 抗体価)	
	B/三重/1/93	B/広東/05/94
B/三重/1/93	320	10
B/広東/05/94	<10	320
B/山梨/166/98	20	<10
B/山梨/190/98	80	10
B/山梨/231/98	40	<10
B/山梨/232/98	40	<10

98 (MDCK) が分離された咽頭ぬぐい液の検体を再び解凍し、8個の発育鶏卵のそれぞれの漿尿膜腔内に0.2ml, 羊膜腔内に0.1ml接種して、再分離を試みた(図4)。34℃で5日間培養後、各々の鶏卵から漿尿液と羊水を採取して、それを合し、その1部を取り等量の0.5%モルモット血球を添加して、HA反応を行った。8個のうち3個の発育鶏卵がウイルス分離陽性で、HA価は各々1:16, 1:64, 1:256であった。HA価1:256を示した漿尿液および羊水を生理食塩水で50倍と100倍に希釈し、それぞれ4個の発育鶏卵に接種し、2代目の継代培養を行った。その結果、HA価1:32を示した発育鶏卵は1個で、他の発育鶏卵の漿尿液および羊水のHA価は1:64を示した。さらに、HA価1:64を示した漿尿液および羊水を生理食塩水で30倍に希釈して3代目の継代培養を行ったがHA価の増強はみられなかった。

発育鶏卵で1代と3代継代培養したB/山梨/166/98 (Egg) を国立感染症研究所に送付して、抗原分析を依頼した。そこでさらにもう1代継代培養し、抗原分析した結果、表2に示すように、B/山梨/166/98 (Egg) もワクチン株であるB/三重/1/93のホモ抗体価の1/16~1/8に低下した株であり、MDCK細胞で分離されたB/山梨/166/98 (MDCK) と抗原性はほぼ変わらなかった。

## 考 察

1997/98シーズンの山梨県内のインフルエンザの流行は、例年より遅い1998年1月中旬から始まり、2月中旬がピークで3月中旬頃まで続いた。この間、分離されたインフルエンザウイルスの95%がA(H3N2)型ウイルスであった。全国のインフルエンザウイルス分離報告数をみると、A(H3N2)型が全分離株の98%を占め<sup>2)</sup>、全国と山梨県との分離状況は一致していた。

A(H3N2)型分離株の抗原性をみると、流行初期には、前年の流行株で、ワクチン株でもあるA/武漢/359/95とA/佐賀/128/97の中間の抗原性を有する株であったが、流行が進むにつれ、A/佐賀/128/97類似株に変わっ

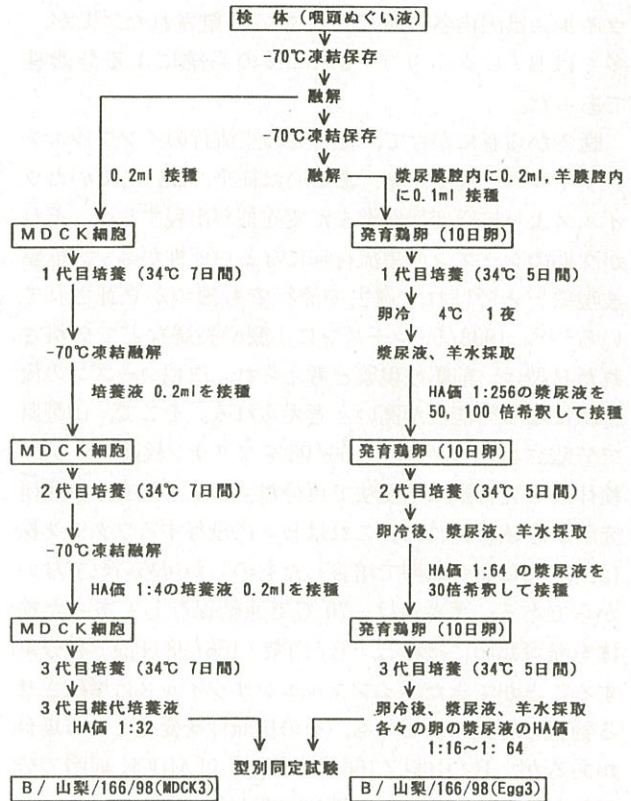


図4 インフルエンザウイルスB/山梨/166/98の分離

ていった。A/佐賀/128/97は、1997年に分離され<sup>4)</sup>、A/武漢/359/95より8倍程度変異した株で、その後、世界の各地で流行したA/シドニー/5/97と同じ抗原性を有するウイルスである<sup>5)</sup>。

A(H3N2)型ウイルスの主流行に混じって、2月中旬から3月中旬にかけて散発的にB型が4株分離された。

B型ウイルスは、1988年以来、B/ビクトリア/2/87様とB/山形/16/88様の変異株の系統に大きく分かれて進化してきた<sup>6)</sup>。日本ではB/山形/16/88様の変異株の系統が毎年、流行を起こし、最近の主流行株はB/三重/1/93である。ところが、1997年の春に、関西地域からB/ビクトリア/2/87様の系統のB/広東/05/94類似株が流行し始め<sup>7)</sup>、それ以来、日本では互いに免疫的交差のないこの2つの系統のB型が流行している<sup>1, 2)</sup>。1997/98シーズンに山梨県内で分離されたB型は4株ともB/山形/16/88様系統に属し、その代表株のB/山梨/166/98はワクチン株B/三重/1/93から8倍程度変異した株で、B/北京/184/93の変異株であると考えられた。また、この分離株は1997/98シーズンの国内最初のB型分離株<sup>8)</sup>になったB/長野/2038/98と同じ抗原性を有していた。

1998年4月21日までの国内のB型ウイルスの分離株数は55株で、全インフルエンザウイルス分離株の1%と少なく、この内、B/山形/16/88様の系統に属するものは15株(17%)にすぎなかった<sup>2)</sup>。その後、B型



ウイルスは国内各地域で7月まで分離された<sup>9-11)</sup>が、多くはB/ビクトリア/2/87様の系統による分離株であった。

晩冬から春にかけて、その冬の主流のインフルエンザウイルスと異なる型、あるいは従来、流行していたウイルスより抗原変異が進んだ変異型が出現すると、それが次期のシーズンの主流株になる可能性が高く、前駆波現象<sup>12)</sup>と呼ばれ、過去の流行でも幾つか立証されている<sup>13,14)</sup>。1998/99シーズンに山梨や長野などで分離されたB型は、前駆波現象と考えられ、次期シーズンの流行株になる可能性が高いと考えられる。そこで、山梨県で分離されたB/山梨/166/98をワクチン候補株として、検体から発育鶏卵培養法で再分離するよう国立感染症研究所から依頼された。これはヒトに投与するワクチン株は国際的に発育鶏卵で培養したものしか認められてないからである。著者らは-70℃で凍結保存してあった検体を発育鶏卵に接種し、B/山梨/166/98 (Egg) を分離することができた。インフルエンザウイルスは増殖させる細胞の種類によっても、その抗原性を変化させる場合があるが、B/山梨/166/98 (Egg) はMDCK細胞で分離したウイルス株と抗原性には変わりがなかった。しかし、3代継代培養を繰り返してもHA価の上昇は認められなく、十分に馴化することはできなかった。

厚生省および国立感染症研究所では長野県で分離したウイルスが発育鶏卵で分離できなかったことから、B/山梨/166/98 (Egg) と滋賀県の発育鶏卵分離株B/滋賀/T30/98 (Egg)<sup>15)</sup>とを次期のB型ワクチン製造候補株として検討したが、両株とも増殖性に難があり、やむおえず次期ワクチン株としては1997/98シーズンに引き続きB/三重/1/93を使うことを決定した。

B/山梨/166/98 (Egg) は日本のワクチン製造株にはならなかったが、その後、日本と米国との間の国際標準株として使用されている。そして、1999年5月に米国とヨーロッパでは、最近のB型分離株が今までワクチン株と抗原的に異なってきたことを理由に、この株に替って、B/山梨/166/98 (Egg) を1999/2000年シーズンの米国およびヨーロッパのインフルエンザワクチン製造株に選定した。日本の分離株が世界のワクチン株に選ばれたことは初めてのことである。この背景には、インフルエンザに関するWHOの4つの指定研究協力センターの1つである国立感染症研究所がWHOのグローバルサーベイランスに大いに貢献していること<sup>16)</sup>や医療機関、保健所、行政機関、地方の衛生研究所、国立感染症研究

所が連帯して実施している日本の感染症サーベイランス体制が世界的に高く評価されていることもあると考えられる。

新型インフルエンザウイルスの出現が危惧されている時期に、引き続きインフルエンザのサーベイランスを一層強化することが重要であると考えられる。

謝 辞：稿を終わるにあたり、検体採取に御協力を賜った県内医療機関の諸先生、山梨県福祉保健部健康増進課および各保健所地域保健課の方々に深謝いたします。抗原分析をして頂き、ご指導を賜りました国立感染症研究所の呼吸器系ウイルス研究室の諸先生方に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報月報，18，299～300 (1997)
- 2) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報月報，19，272～275 (1998)
- 3) 日本公衆衛生協会：微生物検査必携 ウイルス，リケッチア検査，183～192 (1978)
- 4) 船津丸貞幸ら：佐賀衛研所報，23，69～75 (1997)
- 5) WHO：Weekly Epidemiological Record No.9，27 Feb.，56～58 (1998)
- 6) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報月報，18，235～236 (1997)
- 7) 前田章子ら：病原微生物検出情報月報 (国立感染症研究所編)，18，104～105 (1997)
- 8) 塚越美恵子ら：病原微生物検出情報月報 (国立感染症研究所編)，19，58 (1998)
- 9) 中井定子ら：病原微生物検出情報月報 (国立感染症研究所編)，19，130 (1998)
- 10) 島田慎一ら：病原微生物検出情報月報 (国立感染症研究所編)，19，158 (1998)
- 11) 佐原啓二ら：病原微生物検出情報月報 (国立感染症研究所編)，19，179 (1998)
- 12) Glezen, W. P. et al. : Am. J. Epidemiol. 116, 589～598 (1982)
- 13) 西川文雄ら：臨床とウイルス，15，361～368 (1987)
- 14) 中村和幸：長野衛公研報告，18，1～16 (1995)
- 15) 大内好美ら：滋賀衛環セ所報，33，60～67 (1998)
- 16) 森田公一：モダンフィジシャン，18，1299～1301 (1998)