

かけて陽性となり、かつその反応のピークが出現した。これらの成績はこれまでのインフルエンザにおける報告と一致しているが、著者らが以前に行った水痘における成績と比較して^{28, 29)}、特に潜伏期の違いを考慮すると、インフルエンザにおける細胞性免疫の成立は明らかに早い。これはインフルエンザウイルスの体内での増殖が水痘のそれに比してはるかに早くかつ大規模であり、ウイルス抗原の免疫系への提示がそれと基を一にしていることが考えられる。また viremia を経過して約 2 週間かかって発症する水痘と、気管上皮で急速に増殖して 2, 3 日で発症する原則的には局所感染症としてのインフルエンザにおける免疫系との相互作用を含む発症病理の違いを反映している可能性もある。CD4+ T-cell の役割はあまり良く分かっていないとの記載もあるが³⁰⁾、CD8+ T-cell を欠いた mice で viral clearance に貢献しているという成績もあるので今後の検討が求められている³¹⁾。乳幼児における動態についても早急な研究の進展が望まれる。

今回の予備的研究では NK 細胞活性測定法の検討も行ったが、全血法 4 時間 incubation による NK 細胞活性測定では活性が低く十分な window 幅がとれなかった。これは well あたりの whole blood 中の NK 細胞の数が分離した単核球浮遊液の NK 細胞に比して少ないためと考えられる。incubation 時間を延長することおよび well 当たりの target cell 数を増やすことによって比較的少数の NK 細胞が target cell に contact する機会が増え standard assay で得られた % lysis に近い値が得られたものと思われた。NK 細胞活性は個人差が大きく、また生体の置かれた様々な条件下で dynamic に変動するため、ある時点での活性の絶対値を同一年齢集団等の平均値と比較することは妥当ではない。症例毎の経時的観察を含めた詳細な検討が必要である。そのような目的に対して whole blood natural killer cell assay 18 時間 incubation 法は十分な window 幅を持ち、頻回の monitoring に適した方法であることから乳幼児を対象とした際の検索方法として期待される。なお Bromelow らは depletion experiment によってこの assay 系の主たる effector cell は CD56+ の NK 細胞であることを確認している²⁴⁾。

NK 細胞が種々のウイルス感染症においてその感染抵抗に重要な役割を果たしていることは良く知られた事実である³²⁾。自然感染インフルエンザでは NK 細胞の活性が dynamic に変動することが知られて

いる。インフルエンザワクチン接種によって¹⁹⁾、あるいは in vitro でインフルエンザウイルスの刺激によって NK 細胞の活性が増強されると言う成績がある一方¹⁸⁾、高齢者ではその様な活性の増加が見られないと言う報告が見られる²⁰⁾。Innate immunity のみでインフルエンザに対する感染抵抗をになうのはやや不十分というデータがあるが³⁰⁾、一方インフルエンザ特異的 CTL 獲得の過程に NK 細胞が重要な役割を担うという成績も報告されており³³⁾、今後の検討が必要である。乳幼児についてこれらの検討はなされていない。さらに最近になって cytokine を中心とした non-lytic な mechanism で細胞内でのウイルスの増殖を押さえるという“viral purging”と呼ばれる機序が注目されており^{34, 35)}、NK 細胞の役割の再検討も必要である。なお、NK 細胞活性の測定系に赤血球が存在すると活性の増強が見られるという成績から³⁶⁾、単核球に分離された assay 系では真の NK 活性を表していないのではないかという懸念が提起されており全血培養法との関係で興味が持たれる。

全血培養による検査法を用いれば、これまで検討してきた LPT と NK 細胞活性の検索は末梢血 1ml あまりで可能である。

今回検討出来なかった免疫学的パラメーターの中で最も重要と思われるのは、HLA class I restricted cytotoxic T-lymphocyte 活性である。Gajewski は CD8+ T-cell 活性の検索方法についていくつかの方法の長所、短所について検討している³⁷⁾。抗原特異的 LPT, MHC class I restricted CTL assay, cytokine 産生検出法は機能を見る検査系に分類されるが、感度が低い。Limiting dilution analysis (LDA) は機能のみでなく定量性があり CD8+ 細胞の頻度が検出されるが、非常に煩雑であり、また長期間の培養が必要である。Peptide-MHC multimers を flow cytometry で検出する方法は感度が高いが特殊な reagent が必要である。抗原特異的な cytokine release を ELISPOT assay で検出する方法は感度が高いが assay 系が複雑である。Gajewski は触れていないが、このほかに McElhaney らによって開発された、抗原特異的な刺激によって CTL 細胞内で合成された Granzyme B の活性を測定する系がある²⁷⁾。インフルエンザについての研究で用いられてきたのは ⁵¹Cr release assay によって MHC class I restricted CTL を検出する方法であるが、非常に多量の検体(分離単核球)を必要とし、

今回対象となるような頻回の monitoring には適していない。Di Fabio らはインフルエンザウイルス特異的に IFN- γ を分泌する CD8+ T cell を ELISPOT assay で検出し³⁸⁾, それは今日では MHC class I restricted CTL であるとされている³⁹⁾. この方法の感度限界, 1/100000 は ⁵¹Cr releases assay での検出感度が 1/4000 とされていることを考えると遙かに優れている⁴⁰⁾. Granzyme B assay の感度については明らかでないが, 必要な単核球数が ⁵¹Cr releases assay に比して少なく済むという利点があるため検討の余地がある。著者らの研究室ではこの 2 つの方法の小児を対象とした assay 系としての可能性について検討する予定である。

Clerici は乳児の helper T cell 系の発達について LPT と IL-2 産生を parameter として検討し⁴¹⁾, 乳児においては T helper, antigen presenting の機能に欠陥があると言う成績を報告した。最近になって, Mbawuike らは ⁵¹Cr release assay により乳児の自然感染インフルエンザ症例及びワクチン接種症例における MHC class I restricted CTL の sequential な generation について報告した²³⁾. これは乳児における唯一の CTL に関する報告である。しかしながら, 検体採取上の制約から詳細な kinetic study がなされておらず, attenuated cold-recombinant vaccine でも CTL が誘導されなかったという成績はその assay 系の感度と相まってさらなる検討を要する課題と思われる。乳児におけるワクチン接種は依然として vaccinology の frontier であることが想起される。著者らが企図する研究によってこの領域の理解を幾ばくかでも前進させることが出来ることを期待したい。

E. 謝辞

抗原ウイルスの分与および血清抗体価を測定していただいた大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課長奥野良信博士に深謝する。

(文 献)

1. Fox JP, Cooney MK, Hall CE, Foy HM. Influenzavirus infections in Seattle families, 1975-1979. II. Pattern of infection in invaded households and relation of age and prior antibody to occurrence of infection and related illness. *Am J Epidemiol* 1982;116(2):228-42.
2. Puck JM, Glezen WP, Frank AL, Six HR. Protection of infants from infection with influenza A virus by transplacentally acquired antibody. *J Infect Dis* 1980;142(6):844-9.
3. Renegar KB, Small PA, Jr. Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. *J Immunol* 1991;146(6):1972-8.
4. Renegar KB, Small PA, Jr. Immunoglobulin A mediation of murine nasal anti-influenza virus immunity. *J Virol* 1991;65(4):2146-8.
5. Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME, Fletcher D, Nedrud JG. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(15):6901-5.
6. Dolin R, Murphy BR, Caplan EA. Lymphocyte blastogenic responses to influenza virus antigens after influenza infection and vaccination in humans. *Infect Immun* 1978;19(3):867-74.
7. Dolin R, Richman DD, Murphy BR, Fauci AS. Cell-mediated immune responses in humans after induced infection with influenza A virus. *J Infect Dis* 1977;135(5):714-9.
8. Ennis FA, Rook AH, Qi YH, et al. HLA restricted virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to live and inactivated influenza vaccines. *Lancet* 1981;2(8252):887-91.
9. Ennis A. Some newly recognized aspects of resistance against and recovery from influenza. *Arch Virol* 1982;73(3-4):207-17.
10. MacCallum FO. Hypogammaglobulinaemia in the United Kingdom. VII. The role of humoral antibodies in protection against and recovery from bacterial and virus infections in hypogammaglobulinaemia. *Spec Rep Ser Med Res Council (G B)* 1971;310:72-85.
11. Graham MB, Braciale TJ. Resistance to and recovery from lethal influenza virus infection in B lymphocyte-deficient mice. *J Exp Med* 1997;186(12):2063-8.
12. McMichael A. Cytotoxic T lymphocytes specific for influenza virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;189:75-91.

13. McElhaney JE, Beattie BL, Devine R, Grynock R, Toth EL, Bleackley RC. Age-related decline in interleukin 2 production in response to influenza vaccine. *J Am Geriatr Soc* 1990;38(6):652-8.
14. McElhaney JE, Pinkoski MJ, Au D, Lechelt KE, Bleackley RC, Meneilly GS. Helper and cytotoxic T lymphocyte responses to influenza vaccination in healthy compared to diabetic elderly. *Vaccine* 1996;14(6):539-44.
15. McElhaney JE, Gravenstein S, Krause P, Hooton JW, Upshaw CM, Drinka P. Assessment of markers of the cell-mediated immune response after influenza virus infection in frail older adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5(6):840-4.
16. McElhaney JE, Upshaw CM, Hooton JW, Lechelt KE, Meneilly GS. Responses to influenza vaccination in different T-cell subsets: a comparison of healthy young and older adults. *Vaccine* 1998;16(18):1742-7.
17. McElhaney JE, Gravenstein S, Upshaw CM, Hooton JW, Krause P, Drinka P. Immune response to influenza vaccination in institutionalized elderly: effect on different T-cell subsets. *Vaccine* 1998;16(4):403-9.
18. Rees RC, Dalton BJ, Young JF, Hanna N, Poste G. Augmentation of human natural killer cell activity by influenza virus. *J Biol Response Mod* 1987;6(1):69-87.
19. Schapiro JM, Segev Y, Rannon L, Alkan M, Rager-Zisman B. Natural killer (NK) cell response after vaccination of volunteers with killed influenza vaccine. *J Med Virol* 1990;30(3):196-200.
20. Kutza J, Gross P, Kaye D, Murasko DM. Natural killer cell cytotoxicity in elderly humans after influenza immunization. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3(1):105-8.
21. Skoner DP, Whiteside TL, Wilson JW, Doyle WJ, Herberman RB, Fireman P. Effect of influenza A virus infection on natural and adaptive cellular immunity. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;79(3):294-302.
22. Mbawuike IN, Piedra PA, Cate TR, Couch RB. Cytotoxic T lymphocyte responses of infants after natural infection or immunization with live cold-recombinant or inactivated influenza A virus vaccine. *J Med Virol* 1996;50(2):105-11.
23. Bromelow KV, Galea-Lauri J, O'Brien ME, Souberbielle BE. A highly sensitive whole blood natural killer cell assay. *J Immunol Methods* 1998;217(1-2):177-84.
24. Neuraminidase inhibitors for treatment of influenza A and B infections [published erratum appears in *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999 Dec 17;48(49):1139]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;48(RR-14):1-9.
25. Ennis FA, Cruz J, Jameson J, Klein M, Burt D, Thipphawong J. Augmentation of human influenza A virus-specific cytotoxic T lymphocyte memory by influenza vaccine and adjuvanted carriers (ISCOMS). *Virology* 1999;259(2):256-61.
26. 木村三生夫, 鈴木功, 可愛喜章, 他. 高齢者におけるインフルエンザワクチン接種の効果に関する研究. *臨床とウイルス* 1999;27:138-53.
27. McElhaney JE, Pinkoski MJ, Upshaw CM, Bleackley RC. The cell-mediated cytotoxic response to influenza vaccination using an assay for granzyme B activity. *J Immunol Methods* 1996;190(1):11-20.
28. Kumagai T, Chiba Y, Fujiwara M, et al. Humoral and cellular immune response to varicella-zoster virus in children inoculated with live attenuated varicella vaccine. *Biken J* 1980;23(3):135-41.
29. Kumagai T, Chiba Y, Wataya Y, Hanazono H, Chiba S, Nakao T. Development and characteristics of the cellular immune response to infection with varicella-zoster virus. *J Infect Dis* 1980;141(1):7-13.
30. Murphy BR, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Fiels, B.N. ed. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996.
31. Bender BS, Bell WE, Taylor S, Small PA, Jr. Class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocytes are not

- necessary for heterotypic immunity to influenza. *J Infect Dis* 1994;170(5):1195-200.
32. Welsh RM. Regulation of virus infections by natural killer cells. A review. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1986;5(4):169-99.
33. Kos FJ, Engleman EG. Role of natural killer cells in the generation of influenza virus-specific cytotoxic T cells. *Cell Immunol* 1996;173(1):1-6.
34. Guidotti LG, Chisari FV. Cytokine-induced viral purging--role in viral pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 1999;2(4):388-91.
35. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999;284(5415):825-9.
36. Shau H, Golub SH. Modulation of natural killer-mediated lysis by red blood cells. *Cell Immunol* 1988;116(1):60-72.
37. Gajewski TF. Monitoring Specific T-Cell Responses to Melanoma Vaccines: ELISPOT, Tetramers, and Beyond. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7(2):141-4.
38. Di Fabio S, Mbawuike IN, Kiyono H, Fujihashi K, Couch RB, McGhee JR. Quantitation of human influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation of cytotoxicity and increased numbers of IFN-gamma producing CD8+ T cells. *Int Immunol* 1994;6(1):11-9.
39. Huang XL, Fan Z, Kalinyak C, Mellors JW, Rinaldo CR, Jr. CD8(+) T-Cell Gamma Interferon Production Specific for Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) in HIV-1-Infected Subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7(2):279-87.
40. Asai T, Storkus WJ, Whiteside TL. Evaluation of the Modified ELISPOT Assay for Gamma Interferon Production in Cancer Patients Receiving Antitumor Vaccines. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7(2):145-54.
41. Clerici M, DePalma L, Roilides E, Baker R, Shearer GM. Analysis of T helper and antigen-presenting cell functions in cord blood and peripheral blood leukocytes from healthy children of different ages. *J Clin Invest* 1993;91(6):2829-36.