

2 年目研究課題

平成 23 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題：新型インフルエンザH1N1のウイルスの病原性等の解析に関する研究
(22180201)

課題番号：H22-新興-一般-001

予定期間：H22 年度から H24 年度まで

研究代表者：信澤枝里

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：インフルエンザウイルス研究センター

職名：室長

年次別研究費(交付決定額)：1 年目 25,000,000 円 2 年目 22,000,000 円

I. 研究の意義

- (1) 新型インフルエンザウイルス 2009H1N1pdm(新型ウイルス)の感染病態は、従来の季節性とは異なるが、特に重症例における病態は、季節性のインフルエンザウイルスと異なる点が多く、その病原性を動物実験により調べる必要がある。
- (2) 新型ウイルスの受容体親和性と重症化との関連に関する詳細な情報は明らかにされていない。
- (3) 新型ウイルス HA(新型 HA)の抗原領域構造の詳細、ヒトの免疫応答、受容体結合特異性に関する情報は少ないが、今後のウイルスの変異に迅速に対応するためには、必須の情報である。現状と必要性に関しては、(4)～(9)に記す。
- (4) 新型 HA の抗原領域に関する詳細な情報を得ることにより、抗原変異に関わる重要なアミノ酸残基を特定できる。
- (5) 新型ウイルスに対するヒト液性免疫応答の詳細は把握できていない。
- (6) 新型ウイルスワクチンに対する低/無応答者の抗体応答に関する詳細な情報はない。
- (7) 新型ウイルス HA とヒト中和抗体との多様な認識パターンの構造研究は、未だなされていない。
- (8) 新型ウイルス HA が抗体や受容体と結合する際に重要な役割を果たす残基に関する情報が少ない。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 基礎疾患を持つモデル動物での新型ウイルス感染時の病態の変化をみる。その結果、新型ウイルス感染による重症化の機序が明らかとなる。
- (2) ヒトの気管～肺組織における受容体構造の詳細を明らかにし、その構造に対する新型ウイルスの親和性と重症化との関連を検討する。
- (3) 新型ウイルス HA の抗原領域地図を完成させる。旧季節性インフルエンザウイルス H1N1 との比較により、抗原変異に関わる重要アミノ酸残基の特定が可能になる。
- (4) 新型ウイルス感染、ワクチン接種により産生される抗体が結合する HA 上の抗原領域の詳細を明らかにし、今後のワクチン開発に役立てる。
- (5) ワクチン接種により誘導されるヒト液性免疫応答の詳細を把握し、より効率的なワクチン接種法の開発に役立てる。

- (6) ワクチン接種後の低/無抗体応答者の割合の把握、その免疫応答の詳細の検討をおこなう。
- (7) 新型ウイルス HA 複合体(HA-中和抗体, HA-受容体)における分子間相互作用の詳細を、構造解析及び計算機実験により明らかにし、ウイルスの変異機構を解明する。

III. 2 年間の研究成果

・研究代表者(信澤枝里)

- (1) ヒトの感染組織における受容体構造の解析を行なった。
- (2) 新型ウイルス HA の推定 5 つの抗原領域をそれぞれ単独に発現するキメラ HA を構築し、新型ウイルスワクチン接種者及びウイルス感染者血清が結合する抗原領域を同定した。
- (3) 調べた新型ウイルスワクチン接種者血清の約 60% が特定の 1 抗原領域に対する結合能を示し、今後ウイルスの抗原変異との関連を検討する必要がある。

・研究分担者(長谷川秀樹)

- (1) 新型ウイルス感染による喘息発作悪化モデルマウスを作製した。
- (2) モデルマウスを用いて、新型インフルエンザウイルス感染後の病態を病理学的に解析したところ A/PR8(H1N1)感染と比較し、新型ウイルス A/Narita (H1N1) pdm 感染で有意にアレルギー病態の悪化が見られた。これはヒトにおける病態と一致した現象であり、増悪の原因の解明の手がかりとなる。

・研究分担者(高橋宜聖)

- (1) マウス単クローン抗体を作製し、in vitro 中和活性を解析した
- (2) 新型ウイルスに結合するヒト記憶 B 細胞と抗体産生細胞の分離技術を開発した
- (3) ワクチン接種者の末梢血細胞から、ヒト単クローン抗体を作製した。

・研究分担者(西村秀一)

- (1) ワクチン接種後、低/無 HI 抗体価を示す健康成人の存在を確認した。
- (2) 低/無 HI 抗体価を示す健康成人に、中和抗体価を示す集団が、確認された。

・研究分担者(田中成典)

- (1) HA とヒト型、トリ型レセプターとの複合体構造で、190, 225, 226 番目のアミノ酸残基の重要性を計算機実験により定量化した。
- (2) 新型ウイルス HA とレセプターとの相互作用における 145 番目のリジンの重要性を、計算機実験により明らかにした。
- (3) 抗原-抗体複合体で結合特異性に関する計算値と実験値との整合性を確認し、アミノ酸残基間の結合の生成・消失に関する情報を得た。

・研究分担者(松寄葉子)

- (1) 新型ウイルス(A/Narita/1/2009 株)に対する 17 種類の単クローン抗体を用いて、エスケープ変異株 680 株を分離した。このうち 340 株のアミノ酸変異か所を同定した。
- (2) 同一親株由来の 35 株のエスケープ変異株を用いた抗原領域地図を作製し、Sa、Sb、Ca2 領域の 3 つの抗原領域を持つことを明らかにした。
- (3) エスケープ変異株の解析から Sa と Sb 両領域に属するアミノ酸残基の存在が明らかとなり、新型ウイルスでは Sa と Sb 領域がオーバーラップしていることを明らかにした。

・研究分担者(安武義晃)

新型ウイルス HA-単クローン抗体複合体結晶化のためのモデル実験として、A/Aichi/2/68 由来の HA および mAb β 121d Fab フラグメントの複合体を用いて結晶化実験を行った。結晶は 3 種類の

形状で得られ、そのうち一種類に関して、2.8 Å 分解能までの回折データ収集に成功した。

IV. 平成 24 年度の課題

- (1) アレルギーマウスにおける新型ウイルス感染による病態増悪モデルができたので、その原因を解明する為に関与するサイトカインの検索とA/PR8/H1N1とA/Narita/H1N1pdmのキメラウイルスを用い増悪因子の同定を試みる。感染がアレルギー病態を悪化しているのかを調べる。
- (2) アレルギーモデルにおける新型ウイルス感染の増が、アレルギーが感染病態を悪化させているのか、感染がアレルギー病態を悪化しているのかを調べる。
- (3) 抗原領域地図を完成させる。
- (4) 各単クローン抗体と過去の季節性ウイルスH1HAとの反応性を調べ、新型ウイルスHAと季節性ウイルスHAとのエピトープ構造の類似性を検討
- (5) 対象者を増やし、新型ウイルス感染者、新型ウイルスワクチン接種者の血清が認識する抗原領域の特定及びエスケープ変異株との反応性から、エピトープ構成アミノ酸の同定を行なう。
- (6) 多くのワクチン接種者からヒトモノクローナル抗体を作製する。
- (7) インフルエンザ罹患者からヒトモノクローナル抗体を作製する。
- (8) ワクチン接種に対する低/無応答者の他のワクチン接種や自然感染に対する免疫応答を調べ、新型ウイルスワクチンへの反応との相違を明らかにする。
- (9) 新型ウイルスHAと抗体との結合構造解析を計算機実験により行ない、エスケープ変異株のアミノ酸変異が、結合構造に及ぼす影響を明らかにする。
- (10) 計算機実験によりレセプターとの結合に重要なHA上のアミノ酸残基の特定を行なう。
- (11) H1N1由来HAおよびヒト単クローン抗体の安定な複合体を用いて、結晶化および立体構造解析を行い、結合に重要なアミノ酸残基の特定を行う。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 重症化予防策への貢献
- (2) 新型ウイルス抗原変異部位の予測に必要な情報を提供し、ワクチン株選択、開発に資する。
- (3) ワクチン接種により抗体価が上昇しない対象者への免疫賦与の施策に貢献する。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究分担者 高橋宜聖

高橋宜聖 小野寺大志 小林和夫 ウイルス感染局所における記憶 B 細胞応答 実験医学増刊 2011 年

研究分担者 田中成典

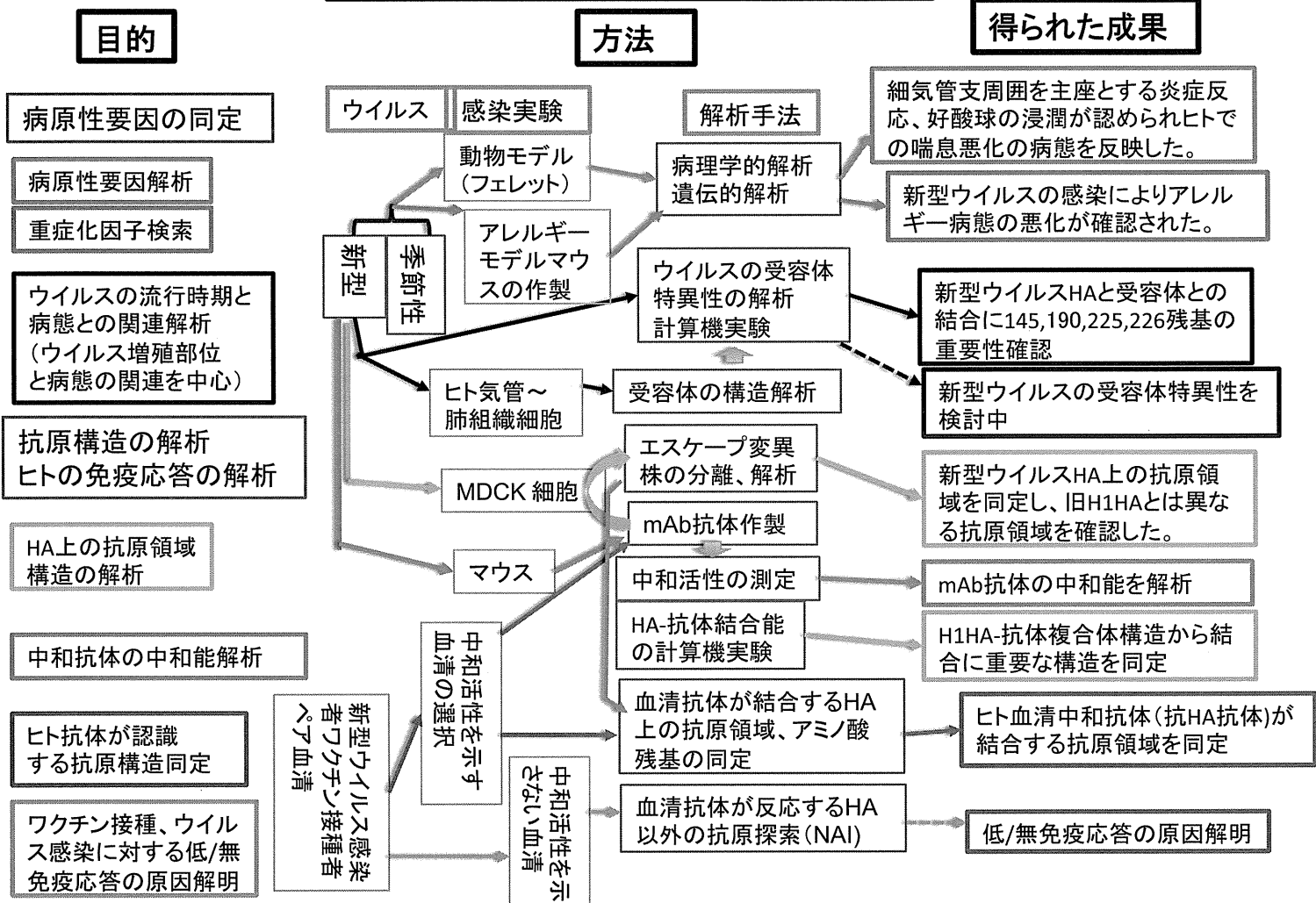
K. Fukuzawa, K. Omagari, K. Nakajima, E. Nobusawa, and S. Tanaka, "Sialic Acid Recognition of the Pandemic Influenza 2009 H1N1 Virus: Binding Mechanism Between Human Receptor and Influenza Hemagglutinin", Protein Peptide Lett. 18 (2011) pp. 530-539.

VII. III(2年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

進行中の課題は、破線の矢印で示した。

成果概要ポンチ図 (平成22~23年度)



●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・ 過去に所属した研究機関の履歴

1983年～1989年：東京大学医科学研究所・ウイルス学
 1989年～1990年：東京都臨床医学総合研究所・微生物学
 1990年～1991年：国立公衆衛生院・微生物学
 1991年～2009年：名古屋市立大学大学院・医学研究科・ウイルス学
 1992年～1993年：St. Jude Children's Research Hospital Dept. of Virology

・ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

中島捷久 (当時、東京大学医科学研究所、名古屋市立大学大学院)
 中島節子 (当時、国立公衆衛生院)
 鈴木康夫 (当時、静岡県立大学)
 大西俊一 (当時、京都大学)
 野本明男 (当時、東京都臨床医学総合研究所)
 河岡義裕 (当時、St. Jude Children's Research Hospital)
 森下高行 (当時、愛知県衛生研究所)
 佐藤克彦 (当時、愛知県衛生研究所)
 田代真人 (国立感染症研究所)
 長谷川秀樹 (国立感染症研究所)
 高橋宜聖 (国立感染症研究所)
 高下恵美 (国立感染症研究所)
 中内美名 (国立感染症研究所)
 西村秀一 (独立行政法人国立病院機構仙台医療センター)
 田中成典 (神戸大学)
 松寄葉子 (山形大学)
 安武義晃 (独立行政法人産業技術総合研究所)

・ 主な研究課題

インフルエンザウイルスの遺伝子進化系統解析
 インフルエンザウイルスHAの亜型系統解析
 インフルエンザウイルスのHAのエピトープ解析
 インフルエンザウイルスの受容体結合能の解析
 インフルエンザウイルスの宿主特異性の解析
 インフルエンザウイルスHAの膜融合能の解析
 インフルエンザウイルスの分子疫学
 インフルエンザウイルスの抗原変異解析
 インフルエンザウイルスの変異率の解析
 インフルエンザウイルスワクチン株開発

・ これまでの研究実績

1. Nobusawa E, Omagari K, Nakajima S, Nakajima K. Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A. *Microbiol Immunol in press*.
2. K. Fukuzawa, K. Omagari, K. Nakajima, E. Nobusawa, and S. Tanaka, "Sialic Acid Recognition of the Pandemic Influenza 2009 H1N1 Virus: Binding Mechanism Between Human Receptor and Influenza Hemagglutinin", *Protein Peptide Lett.* 18 (2011) pp. 530 -539.

3. A. Yoshioka, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, E. Nobusawa, K. Nakajima and S. Tanaka, "Prediction of Probable Mutations in Influenza Virus Hemagglutinin Protein Based on Large-Scale Ab Initio Fragment Molecular Orbital Calculations", *J. Mol. Graph. Model.* 30 (2011) pp. 110-119.
4. A. Yoshioka, K. Takematsu, I. Kurisaki, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, T. Nakano, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka, "Antigen-Antibody Interactions of Influenza Virus Hemagglutinin Revealed by the Fragment Molecular Orbital Calculation", *Theor. Chem. Acc.* 130 (2011) pp. 1197-1202.
5. Yano T, Nobusawa E, Nagy A, Nakajima S, Nakajima K. Effects of single-point amino acid substitutions on the structure and function neuraminidase proteins in influenza A virus. *Microbiol Immunol.* 2008 Apr;52(4):216-23.
6. Isaka M, Zhao Y, Nobusawa E, Nakajima S, Nakajima K, Yasuda Y, Matsui H, Hasegawa T, Maeyama J, Morokuma K, Ohkuma K, Tochikubo K. Protective effect of nasal immunization of influenza virus hemagglutinin with recombinant cholera toxin B subunit as a mucosal adjuvant in mice. *Microbiol Immunol.* 2008 Feb;52(2):55-63.
7. Nakajima S, Nakajima K, Nobusawa E, Zhao J, Tanaka S, Fukuzawa K. Comparison of epitope structures of H3HAs through protein modeling of influenza A virus hemagglutinin: mechanism for selection of antigenic variants in the presence of a monoclonal antibody. *Microbiol Immunol.* 2007;51(12):1179-87.
8. Ujike M, Nakajima K, Nobusawa E. A point mutation at the C terminus of the cytoplasmic domain of influenza B virus haemagglutinin inhibits syncytium formation. *J Gen Virol.* 2006 Jun;87(Pt 6):1669-76.
9. Nakajima K, Nobusawa E, Nakajima S. [Accumulation of amino acid substitutions promotes irreversible structural changes in the hemagglutinin of human influenza AH3 virus during evolution]. *Uirusu.* 2006 Jun;56(1):91-8. Review. Japanese.
10. Nobusawa E, Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol.* 2006 Apr;80(7):3675-8. PubMed PMID: 16537638
11. Nakajima K, Nobusawa E, Nagy A, Nakajima S. Accumulation of amino acid substitutions promotes irreversible structural changes in the hemagglutinin of human influenza AH3 virus during evolution. *J Virol.* 2005 May;79(10):6472-7.
12. Ujike M, Nakajima K, Nobusawa E. Influence of additional acylation site(s) of influenza B virus hemagglutinin on syncytium formation. *Microbiol Immunol.* 2005;49(4):355-9.
13. Ujike M, Nakajima K, Nobusawa E. Influence of acylation sites of influenza B virus hemagglutinin on fusion pore formation and dilation. *J Virol.* 2004 Nov;78(21):11536-43.
14. Sato K, Morishita T, Nobusawa E, Tonegawa K, Sakae K, Nakajima S, Nakajima K. Amino-acid change on the antigenic region B1 of H3 haemagglutinin may be a trigger for the emergence of drift strain of influenza A virus. *Epidemiol Infect.* 2004 Jun;132(3):399-406.

15. Nakajima K, Nobusawa E, Tonegawa K, Nakajima S. Restriction of amino acid change in influenza A virus H3HA: comparison of amino acid changes observed in nature and in vitro. *J Virol.* 2003 Sep;77(18):10088-98.
16. Tonegawa K, Nobusawa E, Nakajima K, Kato T, Kutsuna T, Kuroda K, Shibata T, Harada Y, Nakamura A, Itoh M. Analysis of epitope recognition of antibodies induced by DNA immunization against hemagglutinin protein of influenza A virus. *Vaccine.* 2003 Jul 4;21(23):3118-25.
17. Luo C, Nobusawa E, Nakajima K. Analysis of the desialidation process of the haemagglutinin protein of influenza B virus: the host-dependent desialidation step. *J Gen Virol.* 2002 Jul;83(Pt 7):1729-34.
18. Nobusawa E, Ishihara H, Morishita T, Sato K, Nakajima K. Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2): a single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides. *Virology.* 2000 Dec 20;278(2):587-96.
19. Sato K, Morishita T, Nobusawa E, Suzuki Y, Miyazaki Y, Fukui Y, Suzuki S, Nakajima K. Surveillance of influenza viruses isolated from travellers at Nagoya International Airport. *Epidemiol Infect.* 2000 Jun;124(3):507-14.
20. Luo C, Nobusawa E, Nakajima K. An analysis of the role of neuraminidase in the receptor-binding activity of influenza B virus: the inhibitory effect of Zanamivir on haemadsorption. *J Gen Virol.* 1999 Nov;80 (Pt 11):2969-76.
21. Luo C, Morishita T, Satou K, Tateno Y, Nakajima K, Nobusawa E. Evolutionary pattern of influenza B viruses based on the HA and NS genes during 1940 to 1999: origin of the NS genes after 1997. *Arch Virol.* 1999;144(10):1881-91.
22. Blaney JE Jr, Nobusawa E, Brehm MA, Bonneau RH, Mylin LM, Fu TM, Kawaoka Y, Tevethia SS. Immunization with a single major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte recognition epitope of herpes simplex virus type 2 confers protective immunity. *J Virol.* 1998 Dec;72(12):9567-74.
23. Tong N, Nobusawa E, Morishita M, Nakajima S, Nakajima K. M protein correlates with the receptor-binding specificity of haemagglutinin protein of reassortant influenza A (H1N1) virus. *J Gen Virol.* 1998 Oct;79 (Pt 10):2425-34.
24. Morishita T, Nobusawa E, Luo S, Sato K, Nakajima S, Nakajima K. Analysis of the host-specific haemagglutination of influenza A(H1N1) viruses isolated in the 1995/6 season. *Epidemiol Infect.* 1997 Dec;119(3):327-34.
25. Takahashi M, Yamada T, Nakanishi K, Fujita K, Nakajima K, Nobusawa E, Yamamoto T, Kato T, Okada H. Influenza A virus infection of primary cultured cells from rat fetal brain. *Parkinsonism Relat Disord.* 1997 Apr;3(2):97-102.
26. Morishita T, Nobusawa E, Nakajima K, Nakajima S. Studies on the molecular

- basis for loss of the ability of recent influenza A (H1N1) virus strains to agglutinate chicken erythrocytes. *J Gen Virol.* 1996 Oct;77 (Pt 10):2499 -506.
27. Nobusawa E, Hishida R, Murata M, Kawasaki K, Ohnishi S, Nakajima K. The role of acidic residues in the "fusion segment" of influenza A virus hemagglutinin in low-pH-dependent membrane fusion. *Arch Virol.* 1995;140(5):865 -75.
28. Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, Suzuki Y, Tateno Y, Nakajima K. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology.* 1991 Jun;182(2):475 -85.
29. Nakajima K, Nobusawa E, Ogawa T, Nakajima S. Evolution of the NS genes of the influenza A viruses. I. The genetic relatedness of the NS genes of animal influenza viruses. *Virus Genes.* 1990 Jun;4(1):5 -13.
30. Nobusawa E, Nakajima K. Amino acid substitution at position 226 of the hemagglutinin molecule of influenza (H1N1) virus affects receptor binding activity but not fusion activity. *Virology.* 1988 Nov;167(1):8 -14.
31. Nakajima K, Nobusawa E, Nakajima S. Evolution of the NS genes of the influenza A viruses. II. Characteristics of the amino acid changes in the NS1 proteins of the influenza A viruses. *Virus Genes.* 1990 Jun;4(1):15 -26.
32. Nobusawa E, Nakajima K, Nakajima S. Determination of the epitope 264 on the hemagglutinin molecule of influenza H1N1 virus by site-specific mutagenesis. *Virology.* 1987 Jul;159(1):10-9.
33. Nakajima K, Nobusawa E, Ogawa T, Nakajima S. Genetic divergence of the NS genes of avian influenza viruses. *Virology.* 1987 Jun;158(2):465-8.
34. Suzuki Y, Nagao Y, Kato H, Matsumoto M, Nerome K, Nakajima K, Nobusawa E. Human influenza A virus hemagglutinin distinguishes sialyloligosaccharides in membrane-associated gangliosides as its receptor which mediates the adsorption and fusion processes of virus infection. Specificity for oligosaccharides and sialic acids and the sequence to which sialic acid is attached. *J Biol Chem.* 1986 Dec 25;261(36):17057-61. PubMed PMID: 3782153.

厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

「新型インフルエンザH1N1のウイルスの病原性等の解析に関する研究」

研究代表者
信澤枝里 (国立感染症研究所)

研究班の目的

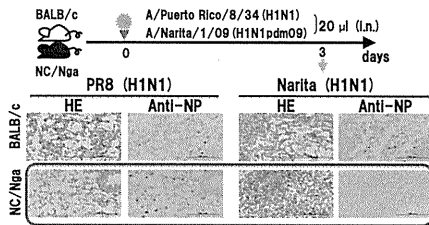
新型インフルエンザウイルスA(H1N1)pdm09(新型ウイルス)の病原性、抗原性、免疫原性等を解析し、国民の健康被害を最小限に留めるために必要な情報を提供する。

略語:
新型インフルエンザウイルスA(H1N1)pdm09 → 新型ウイルス
A(H1N1)pdm09 HA → 新型HA
抗A(H1N1)pdm09 ワクチン → 新型ワクチン

気管支喘息モデル動物における新型インフルエンザウイルス感染の病態解析

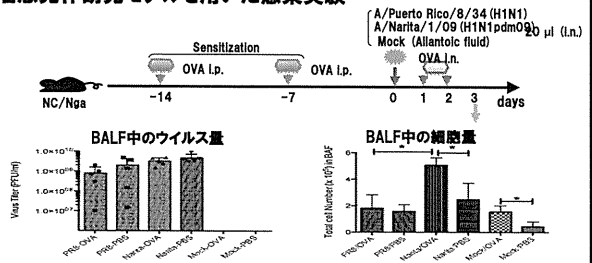
長谷川秀樹 (国立感染症研究所)

新型ウイルス感染と喘息発作との関係を明らかにする病態モデルを作製し、病態形成の機序を病理学のおよび免疫学的に解析する



NC/Ngaマウスでは、PR8株感染に比べNarita株感染に対する炎症反応が強かった。このような現象はBALB/cマウスでは見られなかった。

喘息発作誘発モデルを用いた感染実験



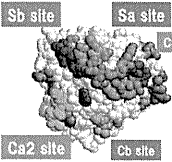
NC/Ngaマウスを用いた喘息発作誘発モデルではNarita株感染個体に喘息を誘発するとBALF中の細胞数が増加し、肺胞、細気管支への好酸球を主体とした炎症細胞浸潤が悪化した。Narita株感染では、喘息発作誘発により肺組織中のサイトカイン発現レベルが変化したが、PR8株感染では、明らかな変化は認められなかった。

今後、喘息発作悪化モデルにおける、病態悪化の機序を明らかにするため病理学的、免疫学的解析を進める。

新型HAの抗原構造の解析

松崎薫子 (山形大学)

新型HA上の抗原領域 (HAを上から見た図)
淡:旧H1HAと一致
濃:旧H1HAと不一致



HA分子上の抗原地図の作成

新型ウイルス (A/Narita/01/2009) に対して、中和能を持つモノクローナル抗体 (mAb) を用いて、700株のエスケープ変異株を分離し解析した。

- (1) 本研究で得たエスケープ変異株のアミノ酸置換 36種類 → Sa: 20変異/10部位, Sb: 5変異/5部位
Ca: 11変異/26部位 (Sa, Ca2には、旧H1HAの抗原領域には含まれない残基が存在)
- (2) mAbと変異株の反応性から、SaとSb領域は1つの抗原領域を形成している可能性が示唆された。

(3) エスケープ変異株の変異の80%は、旧H1HA上の当該部位での変異と異なる → 抗体の結合を阻止する変異も旧H1HAと新型HAでは異なる可能性がある

今後、エピトープマッピングを終了させるとともに感染者血清のエスケープ変異株に対する反応性を明らかにする。

ヒト血清抗体が認識するHA上の抗原構造の解析

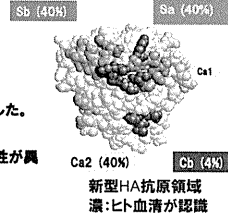
信澤枝里 (国立感染症研究所)

ヒト血清中の中和抗体は新型HA抗原領域のどこを認識するのか?

対象: 新型インフルエンザワクチン接種者へ血清 (150名, 20歳代~50歳代)
HI: pre ≤ 10, 80~160 ≤ post

方法:
・キメラHAとの結合能 (HA単独発現系) 測定
・mAbエスケープ変異株 (EM) に対するHI価測定

- 結果:
- ・血清の40%が、Sa, Sb, Caのいずれかが重複して認識した。
 - ・半数の血清の反応性が低下するEMが存在した。
 - ・同一部位でも変異アミノ酸の種類により、血清の反応性が異なる。



今後: 解析を続け、ワクチン接種者と罹患者との抗体産生の違いを検討、抗体が認識するアミノ酸残基に特徴があるのかを明らかにする。

新型インフルエンザH1N1ウイルスが惹起する液性免疫応答の特性の解明

高橋宣重 (国立感染症研究所)

- 1) 新型ウイルスでの初回感染後に作られる抗体は、どのB細胞から産生されるのか? (過去に感染されたB細胞由来か、ナイーブB細胞由来か?)
- 2) 抗体の抗原エピトープ構造の特徴は?
- 3) ワクチン接種者と罹患患者で、その特徴に違いは認められるか?

方法: ワクチン接種前後、罹患後の末梢血細胞から、HA結合性記憶B細胞を抽出 (A)
各細胞の抗体遺伝子クローニング
発現ベクターを用いたモノクローナル抗体作製系の確立 (HA結合性確認) (B)

(A) ワクチン接種前 ワクチン接種後 1ヶ月 ウイルス罹患後 1ヶ月

(B)

今後、確立した系を用いて、ワクチン接種者及び罹患患者の抗体産生細胞由来のモノクローナル抗体を作製しエピトープの同定を行う。

新型ウイルスでの初回感染後に作られる抗体は、どのB細胞から産生されるのか?

J. Exp. Med., 209, 181-193, 2010

ワクチン接種者由来のモノクローナル抗体には体細胞突然変異が蓄積されていた
→以前何らかの抗原で感染されたB細胞(記憶B細胞)から産生されている可能性が高い。
(右図は、最近報告された新型ウイルス感染者から分離されたモノクローナル抗体の変異数)

今後、B細胞の由来を明らかにすることが必要

新型インフルエンザワクチン接種者、ウイルス感染者の免疫応答

西村秀一 (国立病院機構仙台医療センター)

2009年~2011年 被ワクチン接種者(419名)の抗体価上昇率の検討

ワクチン接種(2回): 2009.10., 2010.10. 血清採取: pre 2009.10. post 2011.6.

年代別平均抗体価と抗体保有率

年代別感染平均抗体価と抗体陽転率

20~40代: 抗体保有率 抗体陽転率→70~80%
50代: 抗体保有率 抗体陽転率→50%

ワクチン接種後、低/無 HI 抗体価を示す集団: 健康成人の2~3割, 50代 半数(年齢差あり)

ウイルス感染に対する免疫応答の低い症例

対象: 2010年1月~2011年6月 新型ウイルス感染確定症例86件中
→ 6件 感染後回復期 HI価 ≤ 10 中和抗体価 10¹~160

患者 (年齢)	急性期		回復期	
	HI	NT	HI	NT
A (27)	<10	<10	<10	40
B (29)	<10	<10	10	160
C (53)	<10	<10	10	20
D (27)	<10	<10	10	20
E (13)	<10	<10	10	40
F (26)	<10	<10	10	10
G (4)	<10	<10	80	320

感染後HI価が低い症例→中和試験で一部抗体価上昇、半数は低応答

○ワクチン接種、ウイルス感染後のHI試験で低/無応答性症例: 免疫応答の仕組みの解明が必要(数年間の免疫応答の変化、中和抗体価測定、mAb解析等)

新型ウイルスHA複合体を形成するアミノ酸間の相互作用の定量 (フラグメント分子軌道法 (FMO) 計算による) 田中成典 (神戸大学)

HA-レセプター複合体

> HAとα2-6糖鎖との結合エネルギー (FMO-MP2/6-31G*)

	1930-swine	2009/H1N1pdm	1934-human
DE	-234.4*	-284.2*	-154.7*
IFIE	-263.1	-328.7	-204.8

2009/H1N1pdmの結合が最も強い

レセプターとHA各残基のIFIE

residue	1930-swine	2009/H1N1pdm	IFIE	DIFF
[Ser145	-2.08	Lys145	-99.46	97.4]
Thr214	0.16	Lys214	-12.77	12.9
Glu305	6.20	Lys305	-6.39	12.6
Asp210	10.59	Ser210	0.05	10.5
Lys405	-9.66	Glu405	9.14	-18.8
Gly225	4.94	Asp225	26.76	-21.8
Ala227	-1.97	Glu227	20.48	-22.4

今後の変異が、HA-レセプター結合に及ぼす影響を推定できる。

H1HA-抗体複合体

抗原変異予測の可能性

構造: 1918H1HA vs Fab2D1
方法: FMO法による量子化学計算から相互作用エネルギーを算出

結果:

抗原-抗体間11Å以内のHAの残基数	39
保存アミノ酸 (conserved residue)	16/39 41%
エピトープで変異経路あり (変異許容残基)	17/28 60%

図: FMO-IFIE解析結果
抗体に対して、赤の部位は引力のアミノ酸、青の部位は斥力のアミノ酸

新型HA-抗体の結晶構造が解け次第、同様の変異予測が可能になる

HA-抗体複合体の構造解析 安部龍典(産業総合研究所)

目的: ヒト単一抗体と新型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン複合体の結晶構造解析を行い、HA抗体間の相互作用の詳細を原子レベルで明らかにする。

実験の流れ

新型インフルエンザHAの生産、膜貫通領域の除去(結晶化のために必要)、精製

モノクローナル抗体の生産、プロテアーゼ切断によるFabフラグメントの作成、精製

複合体形成

結晶化

結晶回折実験

構造解析計算 → 複合体座標の取得 → 動力学シミュレーションでの利用
HA抗体間の相互作用情報の取得

平成 23 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：新型インフルエンザ H1N1 の病態把握と重症化の要因の解明に関する研究

課題番号：H22-新興-一般-002

予定期間：H22 年度から H24 年度まで

研究代表者：小林信之

所属研究機関：国立国際医療研究センター病院

所属部局：呼吸器内科

職名：医長

年次別研究費(交付決定額)：1 年目 20,800,000 円 2 年目 15,488,000 円

I. 研究の意義

- (1) 新型インフルエンザ肺炎の重症化因子については明らかにされていない。
- (2) 新型インフルエンザ肺炎におけるステロイド使用の是非については明確にされていない。
- (3) インフルエンザの遺伝子解析、薬剤耐性、重症化率についての正確な情報が把握されていない。
- (4) 2009-2010 年シーズン以降のインフルエンザウイルス流行状況を把握する必要がある。
- (5) 新たに使用可能となった薬剤を含めた 4 種類の薬剤の有効性に関する検討は不十分でない。
- (6) 新型インフルエンザ心筋炎の発症率、病態、危険因子、治療法は確立されていない。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 新型インフルエンザ、インフルエンザ(H1N1)2009 の臨床的、疫学的な特徴を明らかにする。
- (2) 新型インフルエンザ肺炎の重症化要因を解明する。
- (3) 新型インフルエンザ肺炎におけるステロイド投与の有用性について検討する。
- (4) 市中株での薬剤耐性インフルエンザ頻度をモニターし、耐性株が大流行する兆候を検証する。
- (5) 各(亜)型における NA 阻害薬の有効性を把握し、NA 阻害薬の使い分けの指針作成を目指す。
- (6) 新型インフルエンザ心筋炎の病態、合併率、重症度、致死率を明らかにし、治療法を確立する。

III. 2 年間の研究成果

- 研究代表者(小林信之)、研究分担者(工藤宏一郎)
 - (1) 国立国際医療研究センターに入院した新型インフルエンザ肺炎の 52%は喘鳴を伴っていた。
 - (2) 全身性ステロイドは 79%に投与されたが、解熱時間および入院期間の点では悪影響を及ぼさず。
- 研究分担者(工藤宏一郎)
 - (1) メキシコ国立呼吸器疾患センターに入院したインフルエンザ A(H1N1)pdm09 感染例の死亡リスクファクターは、入院後 Cr、挿管日数、P/F 比 (PaO_2/FiO_2) であった。
 - (2) 重症化因子は、外来例では SpO₂、入院例では P/F 比、Cr であり、診療ステージにより異なる。
- 研究分担者(齋藤玲子)
 - (1) 2010-2011 シーズンの初診時 A/H1N1pdm09 414 件のうち、NA 蛋白 274 位変異は 2 件(0.5%)検出。
 - (2) オセルタミビル投与後の検体では、5 例中 2 例(40%)で耐性変異が検出。

・研究分担者（河合直樹） 研究分担者（池松秀之）

- (1) 21年度に出現したH1N1 2009では、オセルタミビルの有効性は19年度以前と同様に高かった。
- (2) 22年度では、いずれのNA阻害薬も有効性はH1N1 2009で最も高く、次いでH3N2、Bの順、という傾向。ラニナミビル投与後のウイルス残存率は低く、1回投与でも有効性が高い。

・研究分担者（池松秀之）

- (1) 22年度はA(H1N1)pdm09、H3N2、Bの混合流行で、頻度はA(H1N1)pdm09、H3N2、Bの順。
- (2) A(H1N1)pdm09は、21年度では10-19歳が著しく多く、22年度では成人に多かった。
- (3) オセルタミビルおよびペラミビルに対する IC_{50} 値が著しく高いウイルスが2例より分離。

・研究分担者（浮村 聡）

- (1) 2009-2010シーズンでは新型インフルエンザによる心筋炎は全国で22例(死亡4例)報告され、そのうち12例が体外補助循環を必要とした(9例が救命され、3例が死亡)。
- (2) 2010-2011シーズンでは心筋炎の報告はなく、第2シーズンでは激減した。

IV. 平成24年度の課題

- (1) インフルエンザA(H1N1)pdm09感染時の患者行動、知識を調査し、重症化を導く要因を解明。
- (2) インフルエンザ肺炎の重症化因子をスコアリングし、診断・治療に関するアルゴリズムを作成。
- (3) インフルエンザ肺炎重症例の治療・予後に関する実態調査の実施。
- (4) 薬剤耐性インフルエンザ頻度をモニターし、薬剤投与後の耐性株出現頻度を重点的に調査。
- (5) (亜)型別のNA阻害薬の有効性、年齢による有効性の差異について多数例での検証を行う。
- (6) 心筋炎におけるノイラミニダーゼ阻害薬の有用性について動物実験を含めて検討。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) インフルエンザA(H1N1)pdm09感染の診断・治療アルゴリズムを作成することにより、将来インフルエンザパンデミックが発生した場合の重症化に至る患者の減少に寄与する。
- (2) インフルエンザ肺炎および心筋炎の診断・治療マニュアルの作成。
- (3) 薬剤耐性モニタリングにより、臨床医に対して薬剤の処方ガイドラインをリアルタイムに示す。
- (4) 実地医家向けのインフルエンザ診療指針としてインフルエンザ診療マニュアルを作成発行。
- (5) インフルエンザ重症化因子の解明、効果的な治療法の開発・確立により医療費を節減。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

・研究代表者(小林信之)、研究分担者(工藤宏一郎)

- (1) Kudo K, Takasaki J, Uryu H, Yamada R, Manabe T, Jodai T, Kuroda E, Kobayashi N, Matsushita T. Systemic corticosteroids and early administration of antiviral agents for pneumonia with acute wheezing due to influenza A(H1N1)pdm09 in Japan. (submitted)

・研究分担者(工藤宏一郎)、研究協力者(高崎 仁、間辺利江)

- (1) Kudo K, Iglesias A L H, Mabriquez M E V, Manabe T, Takasaki J, Bautista E, Padill JR P. Risk factors for hospital mortality among influenza A(H1N1)pdm09 patients with severe pneumonia and assisted mechanical ventilation in Mexico. (submitted)

- (2) 工藤宏一郎. グローバルでリージョナルな感染症—何をすべきか, 何が出来るか—インフルエンザパンデミックから考える. 日本職業・災害医学会会誌 59:115-119, 2011.
- (3) 間辺利江, 工藤宏一郎. 新型インフルエンザの重症化についての社会的インパクト. Progress in Medicine 30:2303-08, 2010.

・研究分担者(斎藤玲子)

- (1) Suzuki Y, Saito R, Sato I, Zaraket H, Nishikawa M, Tamura T, Dapat C, Caperig-Dapat I, Baranovich T, Suzuki T, Suzuki H. Identification of oseltamivir resistance among pandemic and seasonal influenza A (H1N1) viruses by an His275Tyr genotyping assay using the cycling probe method. J Clin Microbiol 49(1):125-30, 2011.
- (2) 斎藤玲子, 鈴木康司, 田村 務, 鈴木 宏. 新型インフルエンザ(パンデミック H1N1 2009)の教訓と今後の対策. 新型インフルエンザに対する抗インフルエンザ剤と耐性. Progress in Medicine 30:2315-2319, 2010.

・研究分担者(河合直樹)、研究分担者(池松秀之)

- (1) Kawai N, Ikematsu H, Tanaka O, Matsuura S, Maeda T, Yamauchi S, Hirotsu N, Nishimura M, Iwaki N, Kashiwagi S. Comparison of the clinical symptoms and the effectiveness of neuraminidase inhibitors for patients with pandemic influenza H1N1 2009 or seasonal H1N1 influenza in the 2007-2008 and 2008-2009 seasons. J Infect Chemother 17(3):375-81, 2011.
- (2) 河合直樹, 岩城紀男, 池松秀之, 柏木征三郎. 近年のH1N1型の症状経過とウイルス学的検討. H1N1pdmを中心として. インフルエンザ 12:157-163, 2011.
- (3) 河合直樹, 廣津伸夫, 池松秀之. インフルエンザ診療マニュアル 2011-2012年シーズン版. インフルエンザ研究班編集(柏木征三郎、岩城紀男監修). 日本臨床内科医会会誌 26(2), 臨時付録, 2011.

・研究分担者(池松秀之)、研究分担者(河合直樹)

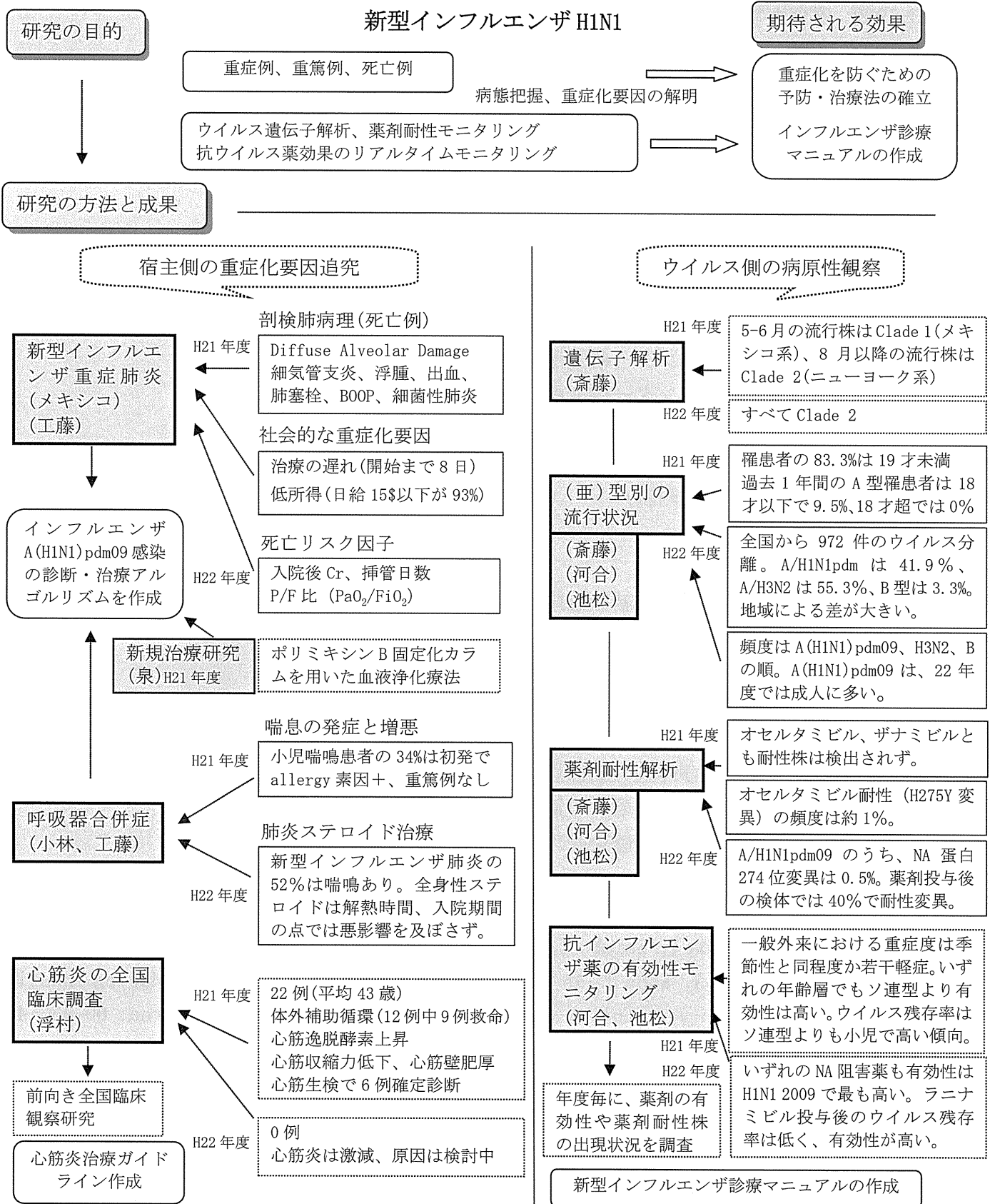
- (1) 河合直樹, 池松秀之, 柏木征三郎. 2010-2011年インフルエンザ流行状況と治療の有効性. Clinic Magazine 506:9-13, 2011.
- (2) 河合直樹, 廣津伸夫, 池松秀之, 柏木征三郎, 岩城紀男監修. インフルエンザ診療マニュアル(2010-2011年版). 一般社団法人日本臨床内科医会・インフルエンザ研究班編, 2010.

・研究分担者(浮村 聡)、研究協力者(和泉 徹、猪俣孝之、河上千尋)

- (1) Kawakami C, Murata T, Nitta M, Higashiyama T, Takahashi N, Ukimura A, Tamai H. Clinical predictors of pneumonia in pediatric influenza virus infection in H1N1pdm pandemic period. Bulletin of the Osaka Medical College 57(1):9-16, 2011.
- (2) Takeuchi I, Imaki R, Inomata T, Soma K, Izumi T. MRI is useful for diagnosis of H1N1 fulminant myocarditis. Circ J 74(12):2758-9, 2010.
- (3) Ukimura A, Izumi T, Matsumori A. A national survey on myocarditis associated with the 2009 influenza A (H1N1) pandemic in Japan. Clinical Research Committee on Myocarditis Associated with 2009 Influenza A (H1N1) Pandemic in Japan organized by Japanese Circulation Society. Circ J 74(10):2193-9, 2010.

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

新型インフルエンザ H1N1 の病態把握、重症化の要因の解明に関する研究



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

- 1983-1984 国立相模原病院リウマチ科
- 1985-1989 東京大学医学部物療内科
- 1989-1993 米国 NIH、NHLBI、Pulmonary Branch
- 1994-2010 国立国際医療センター呼吸器科
- 2010- 国立国際医療研究センター病院呼吸器内科（改称）

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- 宮本昭正（東京大学医学部物療内科）
- 吉澤久嘉（国立相模原病院リウマチ科）
- Ronald G Crystal（米国 NIH、NHLBI、Pulmonary Branch）
- 工藤宏一郎（国立国際医療センター呼吸器科）
- 慶長直人（国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部）
- 切替照雄（国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部）
- 溝上哲也（国立国際医療センター研究所 国際保健医療研究部）
- 岡田全司（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター）
- 大田 健（帝京大学医学部内科）

・主な研究課題

- ベトナムの医療従事者における結核感染リスクに関する研究
- 成人喘息の寛解を目指した治療薬の減量・中止に関する研究（研究代表者）
- 気道上皮の傷害と修復に関わる遺伝子変異解析研究
- 気管支喘息の発症や喘息症状の増悪に及ぼすウイルス感染の影響と治療の効果に関する研究
- アレルギー疾患の発症および悪化に影響する因子の解析
- 外国人結核の臨床像および外国人結核患者由来株の分子疫学解析
- 合併症・基礎疾患のある結核に対する適切な治療法に関する研究
- 医療従事者の費用効果的な結核感染管理に関する研究

・これまでの研究実績

1. Kudo K, Arioka H, Takeda Y, Shimbo T, Handa S, Kawana A, Kamimura M, Yamauchi Y, Nagase H, Kobayashi N, Manabe T, Kabe J. An early intensive intervention for inducing inactive asthma in adults. A one-year follow-up observation study. Allergol Internat 60:433-41, 2011.
2. Hang NT, Luu TL, Kobayashi N, Shimbo T, Sakurada S, Pham HT, Le TH, Do BT, Hijikata M, Matsushita I, Nguyen VH, Higuchi K, Harada N, Keicho N. Analysis of factors lowering sensitivity of interferon- γ release assay for tuberculosis. PLoS One. 2011; 6(8):e23806. Epub 2011 Aug 19.

3. Tanaka T, Sakurada S, Kano K, Takahashi E, Yasuda K, Hirano H, Kaburagi Y, Kobayashi N, Hang NT, Lien LT, Matsushita I, Hijikata M, Uchida T, Keicho N. Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant. *BMC Infect Dis* 11:71, 2011.
4. Miyoshi-Akiyama T, Matsumura K, Kobayashi N, Maeda S, Kirikae T. Genome sequence of clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* NCGM2209. *J Bacteriol* 193(23):6792, 2011.
5. Kudo K, Takasaki J, Uryu H, Yamada R, Manabe T, Jodai T, Kuroda E, Kobayashi N, Matsushita T. *Systemic corticosteroids and early administration of antiviral agents for pneumonia with acute wheezing due to influenza A(H1N1)pdm09 in Japan. (submitted)*
6. Goto Y, Hojo M, Takeda Y, Kobayashi N, Kudo K. Gefitinib-induced interstitial lung disease-addition of intravenous cyclophosphamide to corticosteroids is a valuable treatment option: A case report. *Med Oncol* 27(3):753-755, 2010.
7. Lien LT, Hang NT, Kobayashi N, Yanai H, Toyota E, Sakurada S, HuuThuong P, Cuong VC, Nanri A, Mizoue T, Matsushita I, Harada N, Higuchi K, Tuan le A, Keicho N. Prevalence and risk factors for tuberculosis infection among hospital workers in Hanoi, Viet Nam. *PLoS One* 4(8):e6798, 2009.
8. Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection. *J Infect Dis* 199(11):1707-15, 2009.
9. Suzuki M, Hirano S, Ito H, Matsubara D, Kubota K, Takeda Y, Sugiyama H, Kobayashi N, Kudo K. Pulmonary lymphoma developed during long-term methotrexate therapy for psoriasis. *Respirology* 12(5):774-6, 2007.
10. Mai HN, Hijikata M, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kimura K, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Nagai H, Kurashima A, Kajiki A, Oketani N, Hayakawa H, Tanaka G, Shojima J, Matsushita I, Sakurada S, Tokunaga K, Keicho N. Pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection associated with the IVS8-T5 allele of the CFTR gene. *Int J Tuberc Lung Dis* 11(7):808-13, 2007.
11. Tanaka G, Shojima J, Matsushita I, Nagai H, Kurashima A, Nakata K, Toyota E, Kobayashi N, Kudo K, Keicho N. Pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection: association with NRAMP1 polymorphisms. *Eur Respir J* 30(1):90-6, 2007.

平成23年度厚生労働科学研究費補助金
 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

新型インフルエンザH1N1の病態把握と重症化の要因の解明に関する研究

研究代表者 小林信之(国立国際医療研究センター呼吸器内科 研究統括)

肺炎重症例、死亡例の病態把握と重症化要因の解明 工藤宏一郎(国立国際医療研究センター)

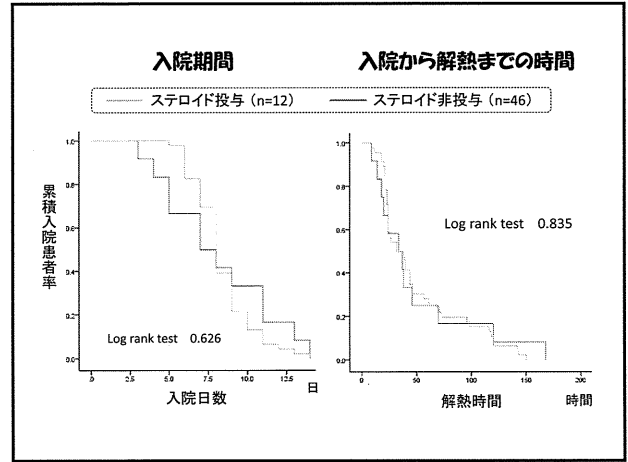
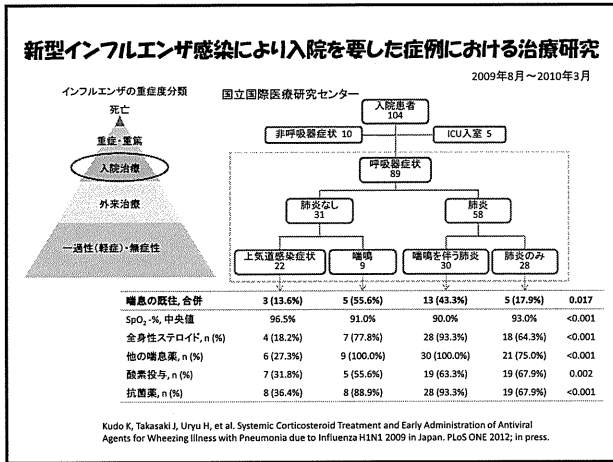
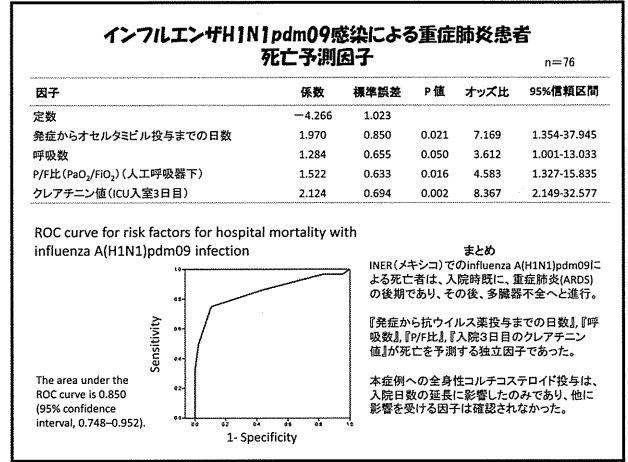
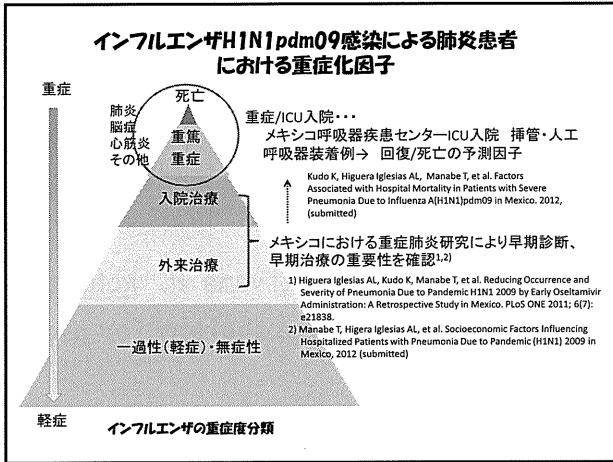
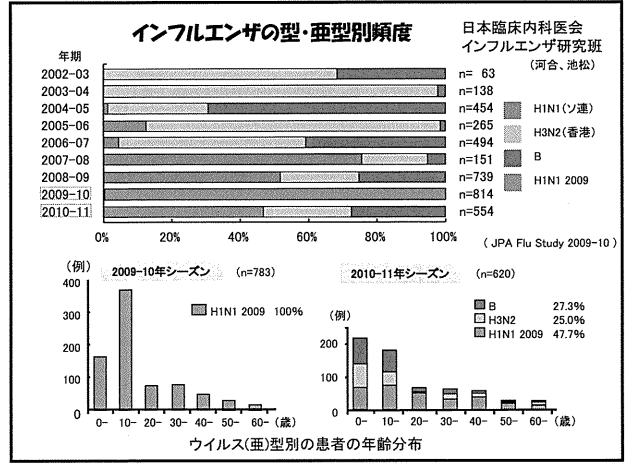
入院を要した肺炎に対する治療研究 小林信之(国立国際医療研究センター)

心筋炎の全国実態調査 浮村 聡(大阪医科大学)

ウイルス遺伝子解析 薬剤耐性モニタリング 齋藤玲子(新潟大学)

抗ウイルス薬効果のリアルタイムモニタリング 河合直樹(日本臨床内科医会) 池松秀之(九州大学)

重症化を防ぐための予防・治療法の確立
 インフルエンザ診療マニュアルの作成



インフルエンザ入院患者に全身性ステロイド投与を行った要因

n=89

変数	係数	標準誤差	P値	オッズ比	95% 信頼区間
切片	20.444	8.927			
喘鳴	2.401	0.841	0.004	11.03	2.12-57.33
肺炎	1.298	0.618	0.036	3.66	1.09-12.30
SpO ₂	-0.229	0.094	0.015	0.80	0.66-0.96

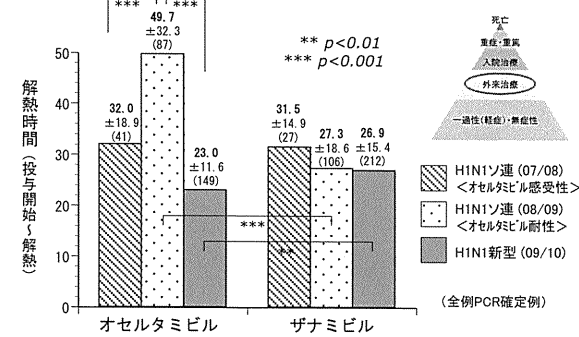
(ロジスティック回帰分析)

まとめ

- ❖ インフルエンザA(H1N1)pdm09感染の入院患者は、喘鳴を呈する者と喘息既往を持つ者が多かった。
- ❖ インフルエンザA(H1N1)pdm09の入院例について、『喘鳴あり』、『SpO₂低下』、『肺炎あり』が全身性ステロイド投与に関連する因子として認められた。
- ❖ 喘鳴を伴う肺炎患者において、全身性ステロイドの早期投与は抗ウイルス薬の併用下において、肺炎治療に対するネガティブな効果は認められなかった。
- ❖ 本投与方法が肺炎の重症化防止に役立った可能性が示唆された。

H1N1症例における抗インフルエンザ薬投与から解熱までの時間

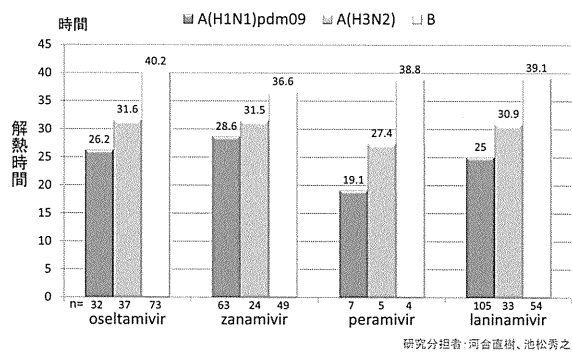
(平均±標準偏差)



(Kawai N, et al. J Infect Chemother. 2010 Dec 1.)

各(亜)型における抗インフルエンザ薬投与開始後の平均解熱時間

(2010-2011年シーズン)



研究分担者: 河合直樹、池松秀之

解熱時間、発熱時間に及ぼす影響因子

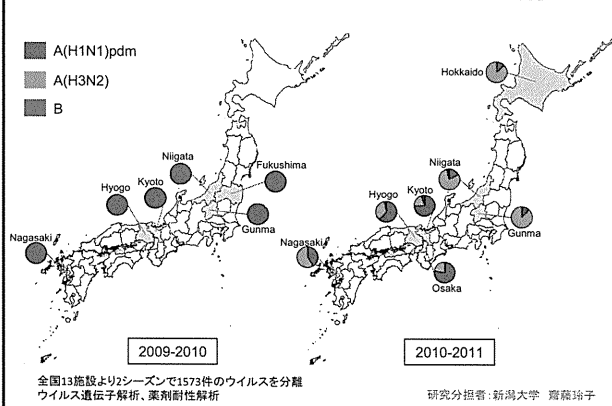
	パラメーター	t値	p値	95%信頼区間
解熱時間	亜型 (PCR)	3.49	<0.001	1.88-6.77
	最高体温	3.63	<0.001	2.54-8.56
	ワクチン接種回数	1.902	0.058	-0.09-5.51
	発症~投薬開始	-0.517	0.605	-0.21-0.12
発熱時間	抗ウイルス薬の種類	-0.494	0.622	-2.76-1.65
	発症~投薬開始	11.231	<0.001	0.789-1.124
	最高体温	3.601	<0.001	2.503-8.524
	亜型 (PCR)	3.491	<0.001	1.895-6.784
	ワクチン接種回数	1.881	0.061	-0.122-5.479
	抗ウイルス薬の種類	-0.486	0.627	-2.755-1.663

(重回帰分析)

まとめ

- ❖ 2010-2011年シーズンでは、H3N2、BよりもH1N1pdm09の方が症状が強い傾向にあった。
- ❖ NA阻害薬の有効性はいずれの薬剤も高く、その有効性には薬剤の種類よりも亜型の種類や最高体温が有意に影響した。
- ❖ H1N1pdm09では、他の亜型に比べてNA阻害薬の有効性が高い傾向にあった。

2009-2010, 2010-2011年シーズン 日本各地流行型



2010-2011年に初診時に採取されたインフルエンザ各(亜)型におけるNA阻害試験 (IC50)

