

201225001A

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

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 信澤枝里

平成 25(2013)年 3 月

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

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 信澤枝里

平成 25(2013)年 3 月

目 次

平成 24 年度

I 総括研究報告書

- 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 P. 1
研究代表者：信澤枝里

II 分担研究報告書

1. 病原性及び重症化要因の解析—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— P. 14
研究分担者：長谷川秀樹
研究協力者：川口 晶、鈴木忠樹、佐藤由子
 2. ヒト抗体による新型ウイルス HA 上の抗原領域の認識機構の解析 P. 20
研究分担者：信澤枝里
研究協力者：中内美名、高橋宜聖、西村秀一、松寄葉子、菅原勘悦、廣津伸夫、萩原温久
 3. 新型インフルエンザ H1N1 の HA 分子の抗原構造の解析 P. 24
研究分担者：松寄葉子
研究協力者：菅原勘悦
 4. 新型インフルエンザウイルスを認識するモノクローナル抗体の作製 P. 29
研究分担者：高橋宜聖
研究協力者：阿戸 学、小林和夫、信澤枝里、西村秀一、萩原温久、築地 信
 5. 新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の解析 P. 33
研究分担者：西村秀一
 6. インフルエンザウイルス表面タンパク質の分子認識の計算機シミュレーションによる研究 P. 37
研究分担者：田中成典
研究協力者：福澤 薫、尾曲克己、中島捷久、牛尾律子
 7. HA 抗体複合体構造解析に向けた研究 P. 40
研究分担者：安武義晃
研究協力者：鈴木忠樹、川口 晶
- ### III 研究成果の刊行に関する一覧表 P. 47

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）

平成24年度総括研究報告書

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 室長）

研究要旨 新型インフルエンザウイルス A/H1N1pdm09 (新型ウイルス)の病原性および抗原性に関し、網羅的解析を行った。

新型ウイルス感染による重症化例はアレルギー疾患に関連する症例が多い。しかし、その病態形成の機序については全く研究が進んでいない。そこで、新型ウイルスの病原性及び重症化要因の解析に関する基礎研究の一環としてアレルギー素因を有する近交系マウス NC/Nga を用いて、新型ウイルス感染による喘息悪化の病態モデルの作製を試みた。その結果、OVA-Alum で感作した NC/Nga マウス（気管支喘息モデル）は、新型ウイルス感染後、喘息発作を誘発すると気管支肺胞洗浄液中には、好酸球、炎症性サイトカイン、喘息に関係するケモカインの著名な上昇が確認された。これらの結果は、気管支喘息発作と新型ウイルス感染が相乗的に働き病態を悪化させることを示唆しており、この病態モデルは、気管支喘息に関連する H1N1pdm09 重症化例の感染病態を反映する動物モデルになる。

新型ウイルスは従来の季節性インフルエンザウイルス H1N1（季節性ウイルス）とは抗原性が異なり、各ウイルスに対する抗体は交叉反応性を示さないが、新型ウイルスヘマグルチニン（新型 HA）に対する抗体のエピトープ構造の詳細は明らかにされていない。本研究では HA の抗原構造の詳細解析、ヒトの新型 HA に対する免疫応答やその抗体のエピトープ構造を明らかにするため下記の研究を行った。(1) 新型ウイルス A/Narita/01/2009 に対するマウス単クローン抗体(mAb)エスケープ変異株を分離、解析し、新型 HA 抗原構造の特徴としては Sa と Sb 領域が重なり合うこと、旧 H1HA で欠失した残基が新たな抗原領域を形成することを明らかにした。(2) 新型ウイルスワクチン接種者が産生する血清中和抗体の大半が Ca2, Sa+Sb 領域を認識し、かつ 5 割は複数の領域を認識すること、特定残基の変異で 5 割の血清が反応性を失うことを明らかにした。(3) 新型ウイルスが惹起するヒトの液性免疫応答のエピトープ構造を解析するため、ワクチン接種者の末梢血プラズマ細胞から 7 種類の HA 特異的な単クローナル抗体を作製した。得られた抗体中には高頻度で交叉結合を示す抗体が同定され、新型 HA のユニークなエピトープ構造が示された。(4)2009 年～2010 年にか

けて、*新型ウイルス*ワクチン接種を受け、無／低免疫応答群はその7割は季節性インフルエンザ H3 ワクチンに対しても低い免疫応答を示した。さらに、インフルエンザワクチン以外の B 型肝炎ワクチンに対する反応性も同様に低いことが明らかになった。

ウイルス感染、抗原抗体反応の全てが原子間相互作用に基づいている。そこで、ウイルスが変異した際、その影響を原子間相互作用からの解析から評価する計として、計算機実験と結晶構造解析の系の構築を試みた。(1)古典力学的な分子動力学法に基づき高速高精度の計算機シミュレーションを行い、レセプター結合領域内のアミノ酸変異が HA とレセプターとの結合に及ぼす影響を推定し、その結果は実験科学による結果と一致した。(2) *新型ウイルス* HA-mAb 複合体の X 線結晶解析を行うことを目的として、HA のエクトドメインのウイルス粒子からの切り出し、回収、結晶化と mAb の単独結晶化を試みた。

研究分担者

信澤枝里 国立感染症研究所 室長
長谷川秀樹 国立感染症研究所 部長
高橋宜聖 国立感染症研究所 室長
西村秀一 国立病院機構仙台医療センター 室長
田中成典 神戸大学 教授
松崎葉子 山形大学 准教授
安武義晃 独立行政法人 産業技術総合研究所 研究員

A. 研究目的

新型ウイルス感染では、喘息を既往歴として有する者が重症化する傾向が指摘されている。特に小児喘息は喘息重症度にかかわらずインフルエンザ重症化のリスクが高いことが最近の疫学調査により明らかにされた。しかし、その病態形成の機序に関しては、全く明らかにされていない。そこで、本研究では、気管支喘息モデル動物を用いて新型インフルエンザ感染実験を行い、喘息患者で起こるインフルエンザ重症化の病態形成の機序を解明することを目指した。

新型ウイルスの主要抗原 HA は旧 H1HA とは抗原性が異なるが、その詳細な抗原構造は明らかにされていない。また、新型ウイルスワクチン接種／罹患に対する免疫応答は、旧 H1 ウイルスに対する応答とは異なり、交叉反応性を示すことが示唆されている。

しかし、一方では、ワクチン接種、ウイルス感染によっても HI 価の上昇が観察されない集団の存在が明らかになってきた。今後の抗原変異に対応するためにも、新型ウイルスの抗原構造とそれに対するヒトの免疫応答機構を正しく理解する事は重要である。そのため、マウス単クローナル抗体 (mAb) エスケープ変異株を用いた新型ウイルス HA の抗原領域地図の作成、新型ウイルスワクチン接種及び罹患に対するヒトの免疫応答や産生される抗体のエピトープ構造の詳細解析を試みた。さらに HA 複合体における原子間相互作用から HA に生じた変異の影響を推定し、抗原変異予測に資する情報を提供する系として、計算機実験系、X 線結晶構造解析系の確立を試みた。

B. 研究方法

○病原性の解析

・気管支喘息モデルマウス NC/Nga に卵白アルブミン(OVA)を2回投与し、アレルギーを惹起した後、新型ウイルス A/ Narita/1/2009 感染→喘息誘発モデルと喘息誘発→ウイルス感染モデルを作製し、肺洗浄液中のウイルス量、ケモカイン量等を測定した。

○抗原性の解析

●抗原構造の解析：

新型ウイルス A/Narita/1/2009HA に対す

る 16 種類のマウス mAb を用いて、新たに 320 株のエスケープ変異株を分離、解析後、各 mAb に対する反応性を血球凝集抑制試験 (HI 試験) により検討した。

●ヒト抗体による **新型ウイルス抗原構造認識機構の解析**：

・**新型ウイルスワクチン接種後のヒト血清**を用いて、Narita 株-WSN 株 HA 間で作製したキメラ HA に対する結合能、エスケープ変異株に対する HI 試験を行った。

・**新型インフルエンザワクチン接種者**から抹消血プラズマ細胞を同定、分離し、**新型ウイルスに結合する細胞**から抗体遺伝子をクローニングし、mAb の発現を行った。

●**新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の解析**：

新型ウイルスワクチン接種者及び感染者のペア血清を用いて中和抗体価、CF 抗体価の測定および**新型ウイルスワクチン以外のワクチン**に対する HI 抗体価の測定を行った。

○**新型 HA タンパク複合体の構造解析**：

・**分子動力学法**に基づく高速高精度の計算機シミュレーションを行い、HA-レセプター間の相互作用や熱力学的安定性に関する解析を行った。

・**新型ウイルス HA および HA-抗体複合体**の結晶構造解析を行うため、**新型**

ウイルス HA の調整、結晶化条件の検討および新たな手法として高速原子間力顕微鏡 (AFM) を利用した抗原抗体相互作用の観察を行った。

(倫理面への配慮)

動物を用いた感染実験は、国立感染症研究所の実験動物委員会の承認のもとに実施した。ヒト由来試料を用いた実験は、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) 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

Narita 株感染→喘息誘発モデルと喘息誘発→Narita 株感染モデルを作製し、病理学的、免疫学的解析を行った。その結果感染→喘息誘発モデルでは、コントロール群に比べ肺洗浄液中のウイルス量に差は無いものの、炎症性サイトカイン、喘息発作関連ケモカインの上昇が見られた。

(2) **新型ウイルス HA 分子上の抗原構造の解析**

中和活性をもつ 16 種類の単クローン抗体に対するエスケープ変異株を新たに 320 株分離、解析し、**新型 HA の特徴**として抗原領域 Sa, Sb が 3 残基で重なること、近年の旧 H1HA では欠失した残基が新たな抗原領域を形成することを明らかにした。

(3)ヒトの血清抗体が認識する新型ウイルス抗原上の抗原構造の解析

新型ウイルスワクチン接種者の接種後血清の約7割が Sa, +Sb, Ca2 領域を認識し、かつ5割の血清は複数の抗原領域を認識した。またエスケープ変異株を用いた HI 試験の結果、血清は、その反応性から5つのグループに分類された。また、流行株にも生じている158位の変異で約4割の血清で反応性が低下し、新たな抗原領域形成残基147位の変異で約5割の血清で反応性が低下した。

(4)新型ウイルスを認識するヒト単クローン抗体の作製

ワクチン接種後の末梢血プラズマ細胞から抗体遺伝子をクローニングし、抗体蛋白質を発現する系を確立し、新たに7種の新型ウイルス結合性ヒト mAb を作製した。このうち、4種類は複数のウイルス株に交叉結合性を示した。

(5)新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の血清疫学的解析

新型インフルエンザワクチン接種者で、低/無反応者を対象に、新型ウイルスワクチン以外のワクチンに対する反応性を検討した。その結果、季節性インフルエンザワクチン H3N2 株、および B 型肝炎ワクチンに対しても、調べた血清の7~5割で、免疫応答が低い傾向が見られた。

(6) 新型 HA タンパクの構造解析：

◎ HA とレセプターとの相互作用を分子動力学シミュレーションとエネルギー解析により調べた結果、Q226R 変異の挿入により、トリ型レセプターとの引力が野生株 A/California/4/2009 株 HA に比し、増加することを確認した。

◎HA-抗体複合体の構造解析

複合体作製のため可溶化 HA の回収条件を確立したが、結晶化に必要な量の確保には至らなかった。また、抗体単独での結晶化は成功したが、結晶が微細で構造解析に用いる得る質の回折データの取得には至らなかった。一方、高速原子間力顕微鏡を用いて HA-mAb 複合体形成の観察に成功した。

D. 考察

(1)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

Nc/Nga マウスを用いた実験結果から、新型ウイルス感染と喘息発作誘導という二つの事象が起きる時間的差が、症状の増悪の有無を左右し、感染→喘息発作誘導が重症化を引き起こすことが明らかとなった。また、この重症化には種々のケモカインが関与していることも示唆した。本モデルは、インフルエンザウイルス感染と喘

息発作の関連を解析する新たな動物モデルとなる。

(2) 新型ウイルス HA 分子上の抗原構造の解析

16 種類の mAb を用いて多数のエスケープ変異株を分離、解析したことで、従来明らかにされていなかった詳細なエピトープ構造を明らかにできた。Sa, Sb 領域の重なり、同じ部位における異なるアミノ酸変異の影響、新たな抗原領域の同定は、適当な mAb とエスケープ変異株の組み合わせがなければ同定できず、今回、提示した抗原領域地図は今後の新型ウイルスの抗原変異の解析に大きく寄与すると考える。

(3) ヒトの血清抗体が認識する新型ウイルス抗原上の抗原構造の解析

インフルエンザウイルスの抗原変異はヒト血清による変異株の選択によるが、本研究の結果、同じ 1 価の新型ワクチン接種を受けたにも拘らず、また、新型ワクチンに対しては被接種者は全てナীবであるはずにも拘らず、各人で惹起されたヒト血清抗体の認識するエピトープ構造は著しく異なることが判明した。また、新型ウイルス流行株に生じた 158 位の変異は、ワクチン接種者の血清抗体により選択された可能性を示唆した。さらに、147 位の変異に対し、調べた半数の血清で反応性が落ちており、この

変異を持つ株が流行すれば、流行の規模が大きくなる可能性が示唆された。

(4) 新型ウイルスを認識するヒト単クローン抗体の作製

近年、単一のヒト B 細胞から、抗体 V_H/V_L 遺伝子をクローニングし、モノクローナル抗体タンパクを作製する技術が開発され、インフルエンザワクチンが惹起するヒト抗体の特性が明らかにされつつある。本研究でも新型ウイルスワクチン接種後に惹起されたヒト mAb の迅速作製システムの構築に成功し、作製した mAb 中に交叉結合性を示す抗体を同定した。今後構築した mAb 作製系を用いてワクチン接種、罹患により惹起されるヒト抗体のエピトープ構造の詳細解析を行う。

(5) 新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の血清疫学的解析

新型ウイルスワクチン接種後あるいは罹患後に、低/無 HI 抗体価を示す集団で、季節性インフルエンザワクチン(H3N2)、B 型肝炎ワクチンに対する抗体価を調べ、低い免疫応答が新型ウイルス特異的な現象であるのかを検証した。本研究の結果からは、少なくとも対象の 5 割は、他のワクチンに対する免疫応答も低く、このような集団に対する対応策の検討が必要と考えられた。

(6) 新型 HA タンパクの構造解析：

◎HA タンパク質の分子認識の計算機シミュレーションによる研究

HA のレセプター結合領域のアミノ酸変異がレセプターとの結合に及ぼす影響を推定するため、動力学シミュレーション法とエネルギー解析系を用いた。226 位の変異で、HA と鳥型レセプターとの引力が増加することを示し、同様の傾向は FMO 計算に基づく相互作用解析でも確認している。今後この系の汎用により、HA 上の変異の影響を評価することが可能になる。

◎HA-抗体複合体の構造解析

新型ウイルス HA のウイルス粒子からの切り離しが非常に困難で、結晶化に必要な量の回収には至らなかった。本研究ではウイルス粒子上の HA の構造を重視し、バキュロウイルスを用いた組換え HA の大量生産は試みなかったが、今後、結晶学的研究を行うには組換え HA の使用も視野に入れる必要があると考える。一方、少量のサンプルで観察可能な高速原子間力顕微鏡実験を行い、抗原抗体複合体の画像を捉えることに成功した。今後、この手法と結晶構造解析法との組み合わせにより、詳細な HA 複合体構造の解析に寄与できると考える。

E. 結論

◎アレルギー素因を有する NC/Nga マウスを用いて新型インフルエンザウ

イルス感染による喘息発作悪化の病態モデルを構築、解析し、病態形成機序を明らかにした。

◎新型ウイルス HA の抗原領域地図を作成し、新型 HA 特異的抗原構造の詳細を明らかにした。

◎新型ウイルスワクチン接種者の血清抗体が認識する新型 HA 抗原領域の詳細構造を明らかにした。

◎プラズマ細胞の抗体遺伝子からモノクローナル抗体を作製することに成功し、その中に、いくつかの交叉結合性を示す抗体を同定した。

◎新型ウイルスワクチン接種および感染に対し、低/無 HI 抗体価を示す集団の多くが、季節性インフルエンザワクチン、B 型肝炎ワクチンに対しても低反応性を示すことが明らかになった。

◎分子動力学 (MD) 法とフラグメント分子軌道 (FMO) 法を用いた高精度計算機シミュレーションを行うことで、HA 複合体内の分子間相互作用の定量的解析が可能であることを示した。

◎目的とするデータの取得にはいたらなかったものの、今後、結晶構造解析法と高速原子間力顕微鏡実験の組み合わせにより、抗原-抗体相互作用の詳細な解析が可能であることを示した。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, and Nobusawa E. Composition of hemagglutinin and neuraminidase affects the antigen yield of influenza A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses. JJID. 66(2013) pp.65-68.
2. Uchida Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kawaguchi A, Nobusawa E, Tanikawa T, Hikono H, Takemae N, Mase M, Kanehira K, Hayashi T, Tagawa Y, Tashiro M, Saito T. Genetics and infectivity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and wild birds in Japan during 2010-11. Virus Res. 170(2012) pp.109-117.
3. Eri Nobusawa, K. Omagari, S. Nakajima, K. Nakajima. Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A. Microbiology and Immunology. 56 (2012) pp. 99-106
4. Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. Mod Pathol. 2012 Nov 23. doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]
5. Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. Blood. 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
6. van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. Vaccine. 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.

7. Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. ACS Chem Biol. 2012 Jan 13.
8. Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. J Med Virol. 2012 Feb;84(2):336-44.
9. Yanagibashi, T., A. Hosono, A. Oyama, M. Tsuda, A. Suzuki, S. Hachimura, Y. Takahashi, Y. Morose, K. Itoh, K. Hirayama, K. Takahashi, and S. Kaminogawa. 2012. IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: *Bacteroides acidifaciens* promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA⁺ B cells. Immunobiology Aug 8, Epub ahead of print
10. Kaji, T., A. Ishige, M. Hikida, J. Taka, A. Hijikata, M. Kubo, T. Nagashima, Y. Takahashi, T. Kurosaki, M. Okada, O. Ohara, K. Rajewsky, and T. Takemori. 2012. Distinct cellular pathways select germ-line encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. J. Exp. Med., 209: 2079-2097.
11. Onodera, T., Y. Takahashi, Y. Yokoi, M. Ato, Y. Kodama, S. Hachimura, T. Kurosaki, and K. Kobayashi. 2012. Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109: 2485-2490
12. Ohnishi, K., Y. Takahashi, N. Kono, N. Nakajima, F. Mizukoshi, S. Misawa, T. Yamamoto, Y. Mitsuki, S. Fu, N. Hirayama, M. Ohshima, M. Ato, T. Kageyama, T. Odagiri, M.

- Tashiro, K. Kobayashi, S. Itamura, Y. Tsunetsugu-Yokota. 2012. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65: 19-27.
13. Yuki, N., Y. Takahashi, T. Ihara, S. Ito, T. Nakajima, K. Funakoshi, K. Furukawa, K. Kobayashi, and M. Odaka. 2012. Lack of antibody response to Guillain-Barre syndrome-related gangliosides in mice and men after novel influenza vaccination. *J. Neurol. Neurosurg. & Psychiatry* 83: 116-117.
14. 小野寺大志 小林和夫 高橋宜聖 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) B細胞内因性 TLR シグナルによる B細胞応答の制御機構、58、275-282、2012
15. Matsuzaki Y, Ikeda T, Abiko C, Aoki Y, Mizuta K, Shimotai Y, Sugawara K, Hongo S: Detection and quantification of influenza C virus in pediatric respiratory specimens by real-time PCR and comparison with infectious viral counts. *J Clin Virol.* 54(2): 130-134, 2012.
16. Takashita E, Muraki Y, Sugawara K, Asao H, Nishimura H, Suzuki K, Tsuji T, Hongo S, Ohara Y, Kawaoka Y, Ozawa M, Matsuzaki Y. Intrinsic temperature sensitivity of influenza C virus hemagglutinin-esterase-fusion protein. *J Virol.* 86(23):13108-11, 2012.
17. T. Nakano, Y. Mochizuki, K. Yamashita, C. Watanabe, K. Fukuzawa, K. Segawa, Y. Okiyama, T. Tsukamoto, and S. Tanaka, "Development of the Four-Body Corrected Fragment Molecular Orbital (FMO4) Method", *Chem. Phys. Lett.* 523 (2012) pp. 128-133.
18. S. Tanaka, C. Watanabe, and Y. Okiyama, "Statistical Correction to Effective Interactions in the Fragment Molecular Orbital Method", *Chem. Phys. Lett.* 556 (2013) pp. 272-277.
- 2.学会発表
1. 信澤枝里、中内美名、松壽葉子、菅原勘悦、有田知子、廣津伸夫、田代真人、西村秀一： A/H1N1pdm09 ワクチン被接種

- 者血清抗体が認識するHA上の抗原領域の解析。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
2. 松寄葉子、菅原勘悦、下平義隆、本郷誠治、信澤枝里: パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm09 の HA 分子の抗原構造の解析。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
 3. 嶋崎典子、白倉雅之、信澤枝里、矢野茂生、板村繁之、田代真人: インフルエンザワクチン製造株のアミノ酸変異による抗原蛋白経時安定性への影響。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
 4. 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹: 喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
 5. 有田知子、白倉雅之、信澤枝里、田代真人: H5N1 インフルエンザワクチン種株候補の抗原収量の検討。第16回日本ワクチン学会学術集会、横浜、2012年11月
 6. 長谷川秀樹: 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン。第60回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012年11月
 7. 山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋仁、許斐奈美、相内章、長谷川秀樹、田代真人: 細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響。第60回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012年11月
 8. 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹: 喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析。第60回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012年11月
 9. 池田千将、伊藤良、相内章、鈴木忠樹、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹: 基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果。第60回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012年11月
 10. 泉地恭輔、相内章、鈴木忠樹、浅沼秀樹、長谷川秀樹: 経鼻投与型インフルエンザワクチンによるマウス母子免疫の解析。第60回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012年11月
 11. 鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹: インフルエン

- ザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型 IgA 抗体の性状解析。第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
12. 相内章、池田千将、伊藤良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代眞人、浅沼秀樹、長谷川秀樹：感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響。第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
 13. Elly van Riet, Aina A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H: Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
 14. Hasegawa H, Aina A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T: Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
 15. 浅沼秀樹、相内章、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代眞人：野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討。第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
 16. 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、長谷川秀樹、相内章、藤本陽、千葉丈：インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究～長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御効果の検討～第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
 17. Takahashi, Y., T. Onodera, M. Tsuiji, and K. Kobayashi. 2012. Increased affinity maturation in lung memory B cells following influenza virus infection. 第 41 回日本免疫学会（神戸、12月）
 18. Onodera, T., T. Kurosaki, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2012. B-cell intrinsic Toll-like receptor signaling accelerates memory B cell response to booster influenza vaccination. 第 41 回日本免疫学会（神戸、12月）

19. Sato, K., Y. Takahashi, M.. Ato, and H. Asanuma. 2012. Split-virion influenza vaccines induce high levels of virus-specific antibodies upon responses to a booster immunization. 第41回日本免疫学会（神戸、12月）
20. 伊藤洋子ほか，不活化ワクチンに対する抗体反応無/低反応群の解析，第66回日本細菌学会東北支部総会，2012年8月24日，仙台市
21. S. Tanaka: “Multi-Scale Simulations for Biomolecular Functions”(2nd AICS International Symposium – Computer and Computational Sciences for Exascale Computing –, March 1, 2012, RIKEN Advanced Institute for Computational Science, Kobe, Japan).
22. 田中成典：「FMO 計算の今後」第4回「イノベーション基盤シミュレーションソフトウェアの研究開発」シンポジウム、2012年7月5日、東京大学生産技術研究所、東京
23. 田中成典：
「フラグメント分子軌道 (FMO) 算の現状と今後」（日本機械学会第25回計算力学講演会、2012年10月6日、甲南大学、神戸）
- H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)**
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

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)

平成 24 年度分担研究報告書

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

病原性及び重症化要因の解析

—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—

研究分担者:長谷川 秀樹(国立感染症研究所 感染病理部 部長)

研究協力者:川口 晶 (国立感染症研究所 感染病理部 任期付研究員)

鈴木 忠樹 (国立感染症研究所 感染病理部 研究員)

佐藤 由子 (国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官)

研究要旨: 新型インフルエンザ H1N1pdm09 重症化例の感染病態ではアレルギー疾患に関連する例が多いが、その病態形成の機序については全く研究が進んでいない。そこで、本研究では H1N1pdm09 のウイルスの病原性及び重症化要因の解析に関する基礎研究の一環として、アレルギー素因を有する近交系マウスを用いて新型インフルエンザウイルス感染により喘息発作が悪化するという病態モデルの作製を試みた。OVA-Alum 腹腔内接種により感作した NC/Nga マウス(気管支喘息モデル)に H1N1pdm09 ウイルスを感染させ、感染後に OVA を気道内に負荷することで喘息発作を誘発し、その病態を免疫学的に検討した。感染後に喘息発作を誘発すると BALF 中には好酸球が多く見られ、炎症性サイトカインや喘息に関係するケモカインの著明な上昇を認めた。これらの結果は、気管支喘息発作と H1N1pdm09 感染が相乗的に働いて病態を悪化させることを示唆しており、この病態モデルは、気管支喘息に関連する H1N1pdm09 重症化例の感染病態を反映していると考えられ、インフルエンザウイルス感染が喘息発作に及ぼす影響を解析する新しい動物モデルになることが考えられた

A. 研究目的

2009 年より流行が始まった新型インフルエンザ(H1N1pdm09)では、喘息を既往歴として有する者が重症化する傾向があることが指摘されている。特に小児喘息は喘息重症度にかかわらずインフルエンザ重症化のリスクが高いことが最近の疫学調査により明らかになってきた。しかしながら、喘息患者でのインフルエンザ重症化

の病因・病態については全く分かっていない。本研究は気管支喘息モデル動物を用いて新型インフルエンザ感染実験を行い、喘息患者で起こるインフルエンザ重症化の病態を解明することを目指した。

一般的に喘息と呼吸器ウイルス感染症の関係性については、(1)気管支喘息の発症因子としての呼吸器ウイルス感染症、(2)喘息発作誘発因子としての呼吸器ウイルス感染症、(3)呼吸器ウイルス感

染症により惹起される病態の悪化と喘息、という主に三つの観点から研究が進んでいる。昨年度までに行った喘息発作モデルを用いた H1N1pdm09 株感染実験の病理学的解析により気管支喘息発作と H1N1pdm09 感染が相乗的に働き病態を悪化させることが示された。そこで本年度は、この動物モデルに加えて喘息発作誘発後にウイルス感染を行うモデルも作製し、それらの病態について免疫学的に解析を進めた。

B. 研究方法

1) 気管支喘息モデルの構築と感染実験

6~8 週齢の NC/Nga マウスまたは BALB/c マウスに卵白アルブミン (OVA) 100 μ g + alum 2mg / 200 μ l PBS を1週間間隔で2回腹腔内投与した。

感染後喘息誘発モデルにおいては、OVA 最終投与から1週間後に Influenza A virus (A/Narita/1/2009(H1N1pdm09))を一匹あたり 4×10^4 PFU/20 μ l (Narita 株)でケタラール/キシラジン麻酔下で経鼻接種した。接種ウイルス量は、40 LD₅₀に相当する。Narita 株は BALB/c マウスの肺内にて15代継代しマウスに馴化させた株を用いた。対照群には、ウイルスを接種していない有精卵 (10 日卵)の漿尿液を接種ウイルス液と同程度に希釈したものを用いた。続いて気管支喘息発作を誘発するためにウイルス接種1日後と2日後に OVA 100 μ g / 20 μ l PBS を経鼻投与した。対照群には PBS のみを投与した。最後の OVA 経鼻投与から24時間後にこれらの動物を過麻酔殺し、肺洗浄液(BALF)の採取と心臓採血を行った。その後、肺を採取し、採取した組織材料は一部を-80°Cに保管した。

喘息誘発後感染モデルにおいては、OVA 最

終投与から1週間後に2日連続で OVA 100 μ g / 20 μ l PBS をケタラール/キシラジン麻酔下で経鼻接種した。最終の OVA 経鼻投与24時間後に Influenza A virus (A/Narita/1/2009(H1N1pdm09))を一匹あたり 4×10^4 PFU/20 μ l (Narita 株)でケタラール/キシラジン麻酔下で経鼻接種した。ウイルス感染3日後にこれらの動物を過麻酔殺し、肺洗浄液(BALF)の採取と心臓採血を行った。その後、肺を採取し、採取した組織材料は一部を-80°Cに保管した。これらの動物実験は国立感染症研究所の実験動物委員会の承認のもとに実施した。

2) 肺洗浄液(BALF)細胞数計測

BALF 中の総細胞数を Vetscan を用いて計測した。各細胞種は BALF を CytoSpin 4 Cyto centrifuge (Thermo)を用いてガラス上に密着させギムザ染色およびヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施し、正立顕微鏡 BX43(オリンパス)を用いて計測した。

3) ケモカインの定量

BALF 中のケモカインは Mouse Cytokine 20-Plex Antibody Bead Kit (Invitrogen)を用いてプロトコールに従いサンプル処理を行い、LUMINEX システムにて計測を行った。

4) ウイルスの定量

MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法により、鼻腔洗浄液中のウイルス価を算出した。MDCK 細胞に希釈した鼻腔洗浄液を200 μ l 添加し、37°Cの培養器内で1時間の吸着操作を行った。その後、細胞を洗浄しアガロース添加培地を重層して37°Cで40時間培養した。アガロース培地を剥離したのちに、クリスタルバイオレット染色液で染色し、プラーク数を数え、ウイルス価の算出を行った。

C. 研究結果

1) BALF 中炎症細胞の計測

感染後喘息誘発モデルにおいては、Mock 感染 OVA 負荷動物、ウイルス感染 PBS 負荷動物はいずれも接種 3 日目に、明らかな立毛、元気消失は見られなかったのに対し、Narita 株感染 OVA 負荷動物においては、明らかな立毛と元気消失を認めた。この時に採取した BALF 中に認められた炎症細胞を種類毎に計測した所、Narita 株感染 OVA 負荷動物において、有意に好中球と好酸球の増加を認めた(図1)。

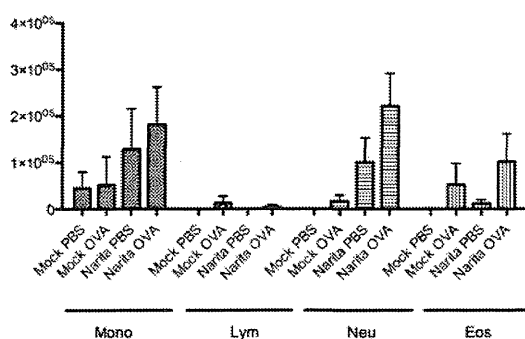


図1 感染後喘息誘発モデルの BALF 中細胞数

2) BALF 中のケモカインの計測

感染 3 日目に採取した BALF 中のケモカインを定量した所、感染後喘息誘発モデルにおいては、NC/Nga マウス、BALB/c マウスのいずれの系統においても MIG/CXCL9、IP-10/CXCL10、Eotaxin/CCL11、MCP-1/CCL2、RANTES は感染 OVA 負荷群で最も高い傾向が見られた(図2)。一方、喘息誘発後感染モデルにおいては、いずれのケモカインも OVA 負荷群において有意に低かった(図3)。

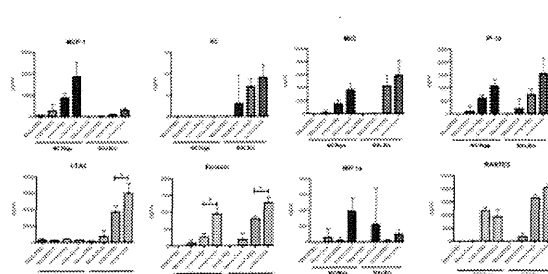


図2 感染後喘息誘発モデルの BALF 中ケモカイン

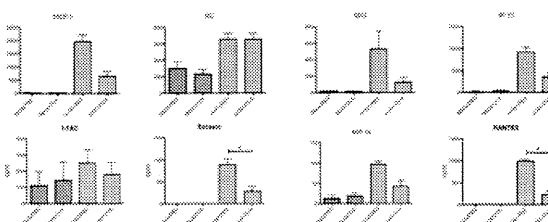


図3 喘息誘発後感染モデルの BALF 中ケモカイン

3) BALF 中のウイルスタイトルの計測

次に BALF 中のウイルス量をプラークアッセイにより定量した所、感染後喘息誘発モデルにおいては、OVA 負荷群と PBS 負荷群で明らかな差は認められなかった(図4)。しかしながら、喘息誘発後感染モデルにおいては、OVA 負荷群において有意にウイルスタイトルの減少が見られた(図5)。

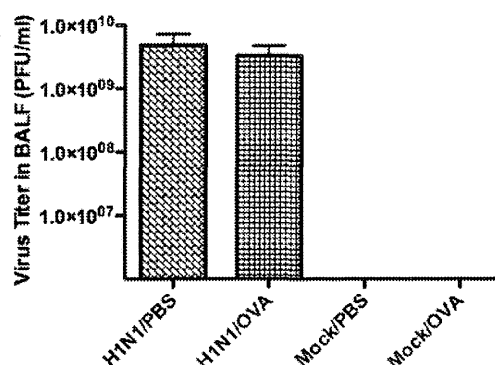


図4 感染後喘息誘発モデルの BALF 中ウイルス量

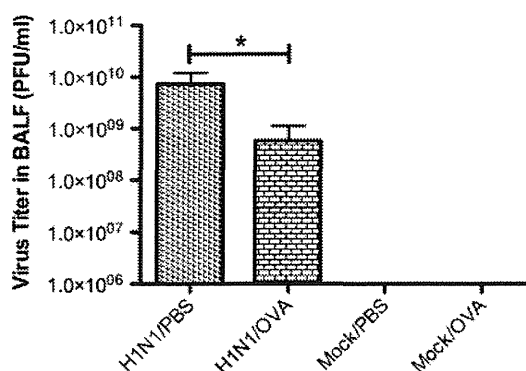


図5 喘息誘発後感染モデルのBALF中ウイルス量

D. 考察

ヒトアトピー性皮膚炎のモデルである NC/Nga マウスを用いた OVA 感作気管支喘息モデルでは BALB/c マウスに比べ血中 IgE の上昇、肺組織への好酸球浸潤、気管上皮での粘液産生の亢進といった気管支喘息に特有の症状を強く引き起こすことが知られることから、気管支喘息の良い疾患モデルとされている。本研究ではこの気管支喘息モデルを用いて H1N1pdm09 感染が喘息発作を悪化させるかどうか、検討を行った。本年度は、この喘息発作悪化モデルにおいて免疫学的に解析を進めたところ、ウイルス感染後、喘息発作を誘導した場合には、感染 3 日後の BALF 中で好中球数、好酸球数が有意に上昇し、MIG/CXCL9、IP-10/CXCL10、Eotaxin/CCL11、MCP-1/CCL2 などのケモカインの産生量が高くなっており、病態が悪化していると考えられた。しかし、BALF 中のウイルス量には差が認められなかった。一方、喘息発作を誘導後にインフルエンザウイルスを感染させると、感染 3 日後の BALF 中のウイルス量は喘息発作を誘導した場合に有意に減少していた。ケモカインの産生も、

喘息発作を誘導した場合に減少し、感染後に喘息発作を誘導した場合は逆に病態が改善していた。以上の結果から、新型インフルエンザウイルス感染後に喘息発作が起きた場合に症状の増悪が認められ、病態の悪化には種々のケモカインが関与していることが示唆された。過去に喘息モデル動物にインフルエンザウイルスを感染させる研究は行われているが、インフルエンザウイルス感染による喘息発作悪化モデルの報告はされていない。本モデルはインフルエンザウイルス感染が喘息発作に及ぼす影響を解析する新しい動物モデルになることが考えられた。

E. 結論

アレルギー素因を有する NC/Nga マウスを用いて新型インフルエンザウイルス感染による喘息発作悪化の病態モデルを構築し、免疫学的に解析した。本モデルはインフルエンザウイルス感染が喘息発作に及ぼす影響を解析する新しい動物モデルになることが考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol.* 2012 Nov 23. doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]