

- Tamura, Masato Tashiro,
Hideki Hasegawa,
INFLUENZA SPECIFIC IGA
PRODUCING SERUM
MEMORY B CELLS
CORRELATE TO
PROTECTIVE ANTIBODIES
IN THE SERUM AS WELL AS
LOCAL IGA RESPONSES, XV
International Congress of
Virology, Sep 2011 Sapporo
28. Ryo Ito, Akira Ainai, Hideki
Asanuma, Tadaki Suzuki, Joe
Chiba, Shin-Ichi Tamura,
Masato Tashiro, Tetsutaro Sata,
Hideki Hasegawa ANALYSIS
OF THE IMMUNE
RESPONSES AFTER
INTRANASAL BOOSTER
INFLUENZA VACCINE WITH
HETEROLOGOUS VIRUS
PRIMING XV International
Congress of Virology, Sep 2011
Sapporo
29. Hideki Hasegawa, Akira Ainai,
Elly van Riet, Tadaki Suzuki,
Ryo Ito, Takeshi Tanimoto,
Takato Odagiri, Masato Tashiro,
Tetsutaro Sata, Takeshi Kurata,
Shin-Ichi Tamura,
INTRANASAL
ADMINISTRATION OF AN
INACTIVATED
- WHOLE-VIRION INFLUENZA
VACCINE EFFECTIVELY
INDUCES THE
NEUTRALIZING
ANTIBODIES BOTH IN THE
SERUM AND THE NASAL
WASH IN HUMAN XV
International Congress of
Virology, Sep 2011 Sapporo
30. Hideki Asanuma, Mina
Nakauchi, Kayoko Sato, Eri
Nobusawa, Akira Ainai, Norio
Yamamoto, Nami Konomi,
Hideki Hasegawa, Masato
Tashiro COMPARISON OF
INFLUENZA A/H1N1 PDM09
VACCINE PRODUCTIONS IN
EGGS VERSUS CELL
CULTURES AND THE
PROTECTIVE IMMUNE
RESPONSES INDUCE IN
MICE XV International
Congress of Virology, Sep 2011
Sapporo
31. Tadaki Suzuki, Akira Ainai,
Noriyo Nagata, Tetsutaro Sata,
Hideki Hasegawa ROLE OF
THE N-TERMINAL REGION
OF THE PA SUBUNIT IN
NUCLEAR IMPORT AND
ASSEMBLY OF INFLUENZA A
VIRUS RNA POLYMERASE
XV International Congress of

- Virology, Sep 2011 Sapporo
32. Tatsuya Yamazaki, Yasutomo Teshima, Daisuke Ninomiya, Maria Nagashima, Yuka Arai, Akira Fujimoto, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Joe Chiba
 PASSIVE IMMUNOTHERAPY AGAINST INFLUENZA VIRUS INFECTION USING THE EXPRESSION OF NEUTRALIZING ANTI-HEMAGGLUTININ MONOCLONAL ANTIBODIES FROM PLASMIDS BY HYDRODYNAMICS-BASED PROCEDURE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
33. 長谷川秀樹:感染防御に効くインフルエンザワクチンを目指して 第15回日本ワクチン学会学術集会(東京)2011年12月
34. 相内章、浅沼秀樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹:2009/10季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与によるA/H1N1pdm09ウイルスの感染防御。第15回日本ワクチン学会学術集会(東京)2011年12月
35. 長谷川秀樹、永田典代、岩田奈緒子、辻隆裕、佐多徹太郎:新型インフルエンザウイルス A/(H1N1)pdm
- のフェレットにおける病原性の検討。第99回日本病理学会総会(東京)2010年4月
36. 中島典子、羽田悟、飛梅実、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、岩田奈緒子、辻隆裕、渡辺正秀、佐多徹太郎:本邦初の新型インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm)肺炎の剖検例。第99回日本病理学会総会(東京)2010年4月
37. 瀧山晃弘、王磊、谷野美智枝、木村太一、西原広史、川岸直樹、國枝保幸、片野晴隆、長谷川秀樹、高木知敬、佐多徹太郎、田中伸哉:新型インフルエンザ(A/H1N1pdm)肺炎によるびまん性肺胞障害により急死した1剖検例。第99回日本病理学会総会(東京)2010年4月
38. 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎:経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンによるブースター効果と高病原性H5N1ウイルスの感染防御の検討。第58回日本ウイルス学会学術集会(徳島)2010年11月
39. 相内章、伊藤良、浅沼秀樹、鈴木忠樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、佐多徹太郎、田代真人、

- 長谷川秀樹:2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm ウイルスの感染阻害効果の検討。第 58 回日本ウイルス学会学術集会(徳島)2010 年 11 月
40. 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、相内章、長谷川秀樹、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遺伝子治療による感染と重症化の阻止。第 58 回日本ウイルス学会学術集会(徳島)2010 年 11 月
41. 伊藤良、相内章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、千葉丈、田村慎一、田代真人、佐多徹太郎、長谷川秀樹:経鼻インフルエンザワクチンにおける抗原性の異なる株による追加免疫時の免疫応答の解析。第 58 回日本ウイルス学会学術集会(徳島)2010 年 11 月
42. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、佐多徹太郎:日本の 2009 年 H1N1 新型インフルエンザウイルス感染症剖検例の病理。第 58 回日本ウイルス学会学術集会(徳島)2010 年 11 月
43. 浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、許斐奈美、山本典生、中内美奈、網康至、長谷川秀樹、相内章、高下恵美、小淵正次、徐紅、岸田典子、小田切孝人、田代真人:新型インフルエンザウイルス(H1N1pdm)の増殖性に関する検討。第 58 回日本ウイルス学会学術集会(徳島)2010 年 11 月
44. 相内章、田村慎一、鈴木忠樹、伊藤良、浅沼秀樹、谷本武史、五味康行、奥野良信、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅、長谷川秀樹:インフルエンザワクチン経鼻接種による成人での血清および鼻腔洗浄液中のウイルス特異的中和抗体の評価。第 14 回日本ワクチン学会学術集会(東京)2010 年 12 月
45. 谷本武史、高野大輔、森本孝一、五味康行、長谷川秀樹、田村慎一、宮崎隆、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信:経鼻インフルエンザワクチンによる免疫獲得効果検討。第 14 回日本ワクチン学会学術集会(東京)2010 年 12 月
46. 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎:第 14 回日本ワクチン学会学術集会(東京)2010 年 12 月
47. 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)
48. 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)
49. 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)
50. Takahashi, Y. 2011. Protective memory B cell responses to influenza virus infection. 第40回日本免疫学会(千葉、11月)
51. Onodera, T., R. Aizawa, A. Hosono, S. Kaminogawa, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2011. Role of Toll-like receptor signaling for the development and reactivation of virus-specific memory B cells. 第40回日本免疫学会(千葉、11月)
52. Yokoi, Y., T. Onodera, S. Hachimura, M. Ato, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2011. Localization and reactivation of virus-specific memory B cells at the site of virus infection. 第40回日本免疫学会(千葉、11月)
53. 高橋宜聖 2010. Protective memory B cells against influenza virus infection in the lungs. 千葉大G-COEシンポジウム.(東京、12月)
54. 小野寺大志、相澤竜太郎、細野朗、上野川修一、小林和夫、高橋宜聖 2010. T cell-independent activation of virus-specific memory B cells requires Toll-like receptor (TLR) signaling. 第14回国際免疫学会(神戸、8月)
55. 疋田正喜、加地友弘、高橋宜聖、Klaus Rajewsky、竹森利忠 2010. IgG1 memory B cell compartment undergoes qualitative alteration after its initial generation early in the immune response. 第14回国際免疫学会(神戸、8月)
56. 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
57. 松寄葉子、池田辰也、青木洋子、菅原勘悦、下平義隆、本郷誠治、

- 安孫子千恵子, 水田克巳:リアルタイム PCR 法を用いた C 型インフルエンザウイルス検出の試み. 第 65 回日本細菌学会東北支部総会, 山形;2011 年 8 月
58. 下平義隆, 村木 靖, 菅原勘悦, 松寄葉子, 本郷誠治:C 型インフルエンザウイルス CM2 タンパク質の細胞質領域の解析. 第 65 回日本細菌学会東北支部総会, 山形; 2011 年 8 月
59. Furukawa T, Muraki Y, Sugawara K, Matsuzaki Y, Takashita E, Shimotai Y, Hongo S: The Role of the CM2 Protein in the Influenza C Virus Replication. Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong; September 2010
60. Muraki Y, Okuwa T, Furukawa T, Matsuzaki Y, Sugawara K, Himeda T, Hongo S, Ohara Y: Role of Palmitoylation of CM2 in the Influenza C Virus Replication. Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong; September 2010
61. Hongo S, Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Shimotai Y, Sugawara K: Influenza C virus NS1 protein up-regulates viral mRNA splicing. Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong; September 2010
62. Takashita E, Sugawara K, Matsuzaki Y, Hongo S, Goto H, Kawaoka Y, Nobusawa E: Compatibility between hemagglutinin and neuraminidase affects the growth of H3N2 influenza A viruses. 14th International Negative Strand Virus Meeting, Bruges; June 2010
63. 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).
64. 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
65. 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)

- | | |
|--|---|
| <p>66. 吉岡彬生、栗崎以久男、渡邊博文、田中成典:「分子動力学シミュレーションによるインフルエンザウイルス NS1 タンパク質と dsRNA の結合解析」(日本コンピュータ化学会 2010 春季年会、2010 年 5 月 21 日、東京)</p> <p>67. 田中成典:「スーパーコンピュータでインフルエンザウイルスの変異の仕組みを探る」(地球シミュレータ産業利用シンポジウム 2010、2010 年 10 月 8 日、東京)</p> <p>68. 田中成典:「フラグメント分子軌道法を用いた薬剤耐性メカニズムの解析」(平成 22 年度地球シミュレータ利用報告会、2011 年 2 月 4 日、横浜)</p> <p>69. Akio Yoshioka and Shigenori Tanaka:「Comparison of Antigen-Antibody Binding by the Fragment Molecular Orbital Calculations for Swine-Origin Influenza Hemagglutinin Proteins」(日本生物物理学会第 49 回年会、2011 年 9 月 18 日、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス)</p> <p>70. 田中成典:「蛋白質の電子状態計算と医療・創薬・環境科学への応用」(第4回バイオナノシステムズ研究会、2011 年 8 月 5 日、臨床情報研究センター、神戸)</p> | <p>H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)</p> <p>1. 特許取得
なし</p> <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|--|---|

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 22-24 年度分担者研究報告書

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: 呼吸器ウイルス感染症は気管支喘息の重大な発作誘発因子になると考えられており、インフルエンザウイルス感染と喘息発作悪化との関係性が指摘されている。特に新型インフルエンザウイルスの重症例の感染病態ではアレルギー疾患に関連する例が多く、気管支喘息は重症化の重要なリスクとして認識されている。しかしながら、新型インフルエンザウイルス感染時の喘息発作の病態とその形成機序については全く研究が進んでいない。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ウイルス感染実験を行い、その病態を免疫学的・病理学的に解析する事により、喘息発作と新型インフルエンザウイルス感染との関係性を明らかにすることを目的とした。3年間の研究によりインフルエンザウイルス感染後に喘息発作を誘導し病態悪化を来す動物モデルを作製することに成功した。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。

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。このような研究には目的に合わせて適切な動物を選択する必要があるが、本研究では気管支喘息モデル動物として、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。このマウスを用いた 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から、気管支喘息の良い疾患モデルとして知られている。このマウスを用いて、初年度は、マウスに馴化させた新型インフルエンザウイルス Narita 株をこのマウスに感染させる実験を行い、更にモデル抗原を用いた気管支喘息マウスモデルの構築を行った。計画 2、3 年目では、喘息発作と感染との関係性を明らかにするために、ウイルス感染と喘息発作を組み合わせた動物モデルを作製し、病理学的および免疫学的に解析した。

B. 研究方法

1) 感染実験

8 週齢の BALB/c マウスおよび NC/Nga マウスにマウス馴化株である Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34(H1N1))、新型インフルエンザウイルスである Influenza A virus (A/Narita/1/2009(H1N1)) を一匹あたり 1×10^3 PFU/20 μ l (PR8 株では 40 LD₅₀、Narita 株では 0.025 LD₅₀ に相当する) もしくは 1×10^2 PFU/20 μ l (PR8 株では 4 LD₅₀、Narita 株では 0.0025 LD₅₀ に相当する) ケタラール/キシラジン麻酔下で経鼻接種した。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。接種 3 日目 (1×10^3 PFU 感染群)、7 日目 (1×10^2 PFU 感染群) にこれらの動物 (一群 3 匹) を過麻酔殺、心臓採血した。その後、臓器を採取し、これら採取した組織材料は 10% ホルマリン緩衝液に浸漬固定した。この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。

2) 気管支喘息モデルの構築

6 週齢の 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 3 回腹腔内投与し、さらに 1 週間後に OVA 100 μ g / 50 μ l PBS を 3 日間連続経鼻投与した。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 (一群 2 匹) を過麻酔殺、心臓採血した。その後、臓器を採取し、これら採取した組織材料は 10% ホルマリン緩衝液に浸漬固定した。こ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。

3) 気管支喘息発作モデルでの感染実験

6~8 週齢の BALB/c マウスおよび NC/Nga 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。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℃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 100µg / 20µl PBSをケタラル／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 µl (Narita株)でケタラル／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℃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。

4) 病理学および免疫組織学的検索

10%ホルマリン緩衝液固定のインフルエンザウイルス感染マウス組織材料(脳、鼻腔、気道、肺)は、常法どおりパラフィン包埋切片を作製した。脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施した。また、ウイルス抗原を検出するために、一次抗体として抗インフルエンザウイルス NPタンパクポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を実施した。脱パラフィンした切片を抗原賦活化剤(pH9.0)(ニチレイ)中で121℃20分オートクレーブ処理によって抗原賦活化した。その後、過酸化水素水・メタノールによる内因性ペルオキシダーゼの阻止を室温30分で処理し、1次抗体(4000倍希釈)を加え4℃で一晩インキュベートした。その後、ENVISION+(DAKO)を用いてプロトコール通り免疫染色を实

施した。

5) 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。

6) 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。

7) 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 µl 添加し、37℃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℃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) インフルエンザウイルス感染実験

動物は接種 3 日目もしくは 7 日目では、明らかな立毛、元気消失は見られなかった。解剖時、接種 7 日目の BALB/c マウスでは PR8 株感染、Narita 株感染個体ともに肺の一部に赤褐色調を呈する病変が肉眼的に観察できたが、NC/Nga マウスではいずれの株の感染個体においてもはっきりとした肉眼的な病変は認められなかった。接種 3 日目の病理学

的検索の結果、BALB/c マウスにおいては PR8 株感染と Narita 株感染いずれの個体においても気道粘膜上皮と肺胞上皮にウイルス抗原が陽性となり、末梢肺においては、リンパ球やマクロファージを主体とした軽度の炎症細胞浸潤を認めた(図1)。NC/Nga マウスにおいては、PR8 株感染により BALB/c マウスと同様に気道上皮と肺胞上皮でウイルス抗原が陽性となったが、炎症細胞浸潤はほとんど認められなかった。一方、Narita 株感染においては、ウイルス抗原は気道上皮に認められず肺胞上皮でのみ陽性であり、ウイルス抗原陽性の肺胞上皮周囲にはリンパ球を主体とした高度の炎症細胞浸潤が認められた。接種 7 日目の病理学的検索の結果、BALB/c マウスにおいては、PR8 株感染、Narita 株感染ともに肺胞上皮にウイルス抗原が陽性となり、その周囲にリンパ球、好中球などの炎症細胞浸潤が認められた。また、軽度の好酸球浸潤も認められた。一方、NC/Nga マウスにおいては PR8 株感染ではウイルス抗原も炎症反応も認められなかったが、Narita 株感染では、肺胞上皮にウイルス抗原が陽性となり周囲にリンパ球を主体とした炎症細胞浸潤が認められ、好酸球の浸潤も散見された(図2)。全体な傾向として Narita 株は PR8 株に比べ抗原陽性細胞が乏しく炎症性反応が強かった。さらにこの傾向は、NC/Nga マウスでより顕著であった。

2) 気管支喘息モデルの構築

喘息患者でのインフルエンザ重症化のモデルとしてはアレルギー素因のある動物への感染実験だけでなく、実際に気管支喘息を惹起した後のインフルエンザウイルス感染の影響も検討する必要がある。初年度はこの実験を行うために

まず気管支喘息モデルの構築を試みた。その結果、OVA 投与個体では、気管支周囲に著明な好酸球浸潤を伴う高度の炎症細胞浸潤が認められた。この好酸球浸潤は前述のインフルエンザウイルス感染実験で見られた好酸球浸潤に比べ非常に高度であった。

3) 気管支喘息モデルでの感染実験

①病理組織解析

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。解剖時、これらの Narita 株感染個体においては肺の一部に赤褐色調を呈する病変が肉眼的に観察できた。組織学的には、PBS 負荷動物において、PR8 株感染、Narita 株感染いずれの群においても細気管支や肺胞領域にマクロファージや好中球、リンパ球等の炎症細胞浸潤を認めた。一方で OVA 負荷動物においては、Mock 感染群においても細気管支周囲や血管周囲に好酸球を含む炎症細胞浸潤を認め、Narita 株感染では、それらの炎症の程度が明らかに悪化していた。しかしながら PR8 株感染では、PBS 負荷動物に比べ炎症の程度が弱いか同程度であった(図1)。

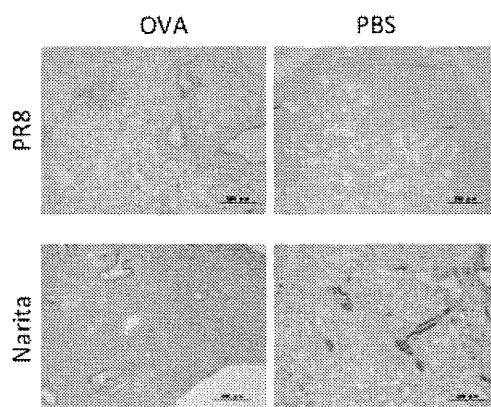


図1 肺組織の病理組織

②BALF 中細胞数の計測

感染 3 日目に採取した BALF 中に存在する細胞数を計測した所、Mock 感染群では OVA 負荷によって BALF 中の細胞数が増加していた。PR8 株感染群では、OVA 負荷と PBS 負荷では明らかな細胞数の変化は認められなかった。一方、Narita 株感染群においては、OVA 負荷によって著明に BALF 中の細胞数が増加しており、PBS 負荷群の 2 倍、Mock 感染 OVA 負荷群の 3 倍の細胞を認めた(図 2)。続いて、Narita 株感染群において BALF 中に見られた炎症細胞の種類を詳細に解析すると、Narita 株感染 OVA 負荷動物において、非感染群および感染のみの群に比べ好中球と好酸球の有意な増加を認めた(図 3)。

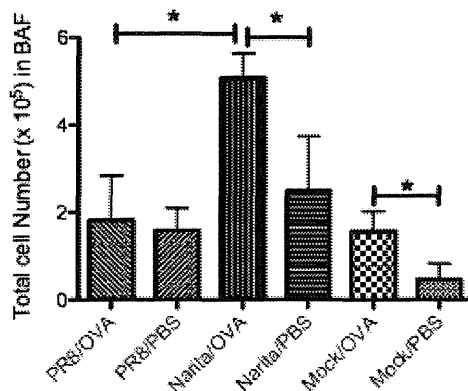


図 2 BALF 中の細胞数

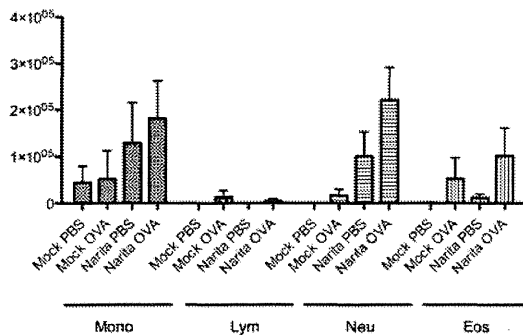


図 3 感染後喘息誘発モデルの BALF 中細胞数

③BALF 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 4)。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 負荷群において優位に低かった(図 5)。

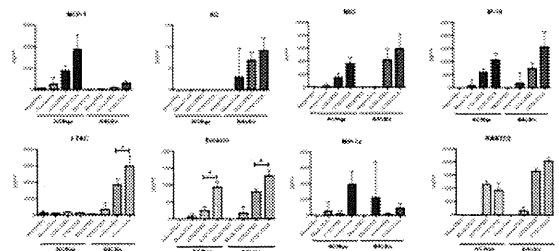


図 4 感染後喘息誘発モデルの BALF 中ケモカイン

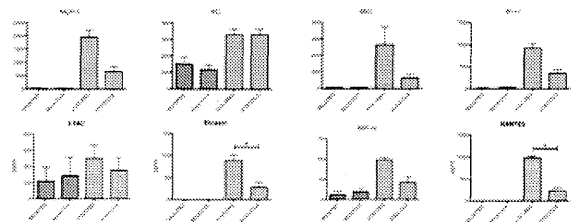


図 5 喘息誘発後感染モデルの BALF 中ケモカイン

④BALF 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ッ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 6)。しかしながら、喘息誘発後感染モデルにおいては、OVA 負荷群において優位にウイルスタイトルの減少が見られた(図 7)。

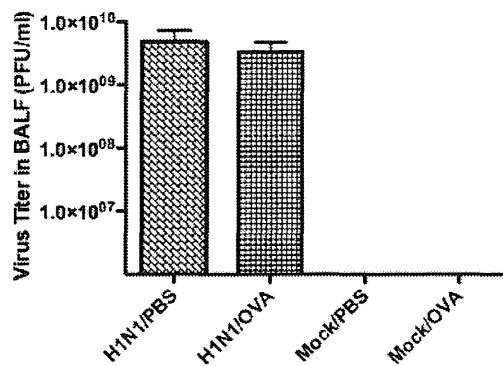


図 6 感染後喘息誘発モデルの BALF 中ウイルス量

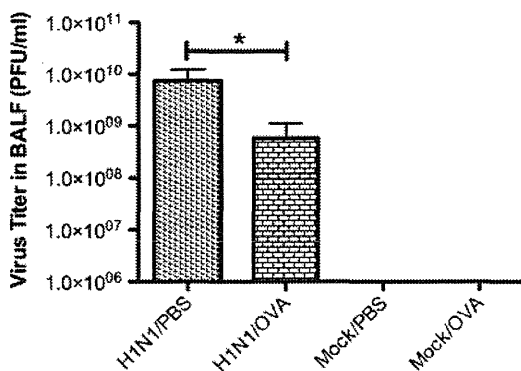


図 7 喘息誘発後感染モデルの BALF 中ウイルス量

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。まず、NC/Nga マウスと BALB/c マウスにマウスに、マウスへ馴化させた H1N1 亜型インフルエンザウイルスである PR8 株と Narita 株を感染させたところ、NC/Nga

マウスを用いた実験では Narita 株はウイルス抗原陽性細胞の数が少なく炎症反応が強い傾向があった。一方、BALB/c マウスを用いた実験ではこの傾向は不明瞭であった。接種後、7日目においては、BALB/c マウスではいずれの株でも、NC/Nga マウスでは Narita 株で、軽度ではあるがアレルギーの重要な指標である好酸球浸潤が認められた。しかしながら、一般的に気管支喘息モデルとして用いられている OVA-Alum の系で認められるような高度の好酸球浸潤は、いずれの感染実験においても認められず、アレルギー素因を有するマウスにおいても新型インフルエンザウイルス感染のみでは気管支喘息は惹起されないと考えられた。

そこで、次にモデル抗原を用いた気管支喘息モデルにおいて H1N1pdm09 感染が喘息発作を悪化させるかどうか、検討を行ったところ、ウイルス感染後、喘息発作を誘導した場合には、病理組織学的検査では、Narita 株感染では OVA 負荷により著明に炎症が悪化していた。また、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。しかしながら、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と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、病理学的および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]
- 2) 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, Aina 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]
- 3) van Riet E, Aina 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Suzuki T, Aina A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Nov 4;414(4):719-26. Epub 2011 Oct 6.
- 7) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol.* 2012 Jan;25(1):1-13. Epub 2011 Aug 26.

- 8) Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, Arai Y, Teshima Y, Fujimoto A, Ainai A, Hasegawa H, Chiba J. Passive Immune-Prophylaxis against Influenza Virus Infection by the Expression of Neutralizing Anti-Hemagglutinin Monoclonal Antibodies from Plasmids. *Jpn J Infect Dis.* 2011 Jan;64(1):40-9.
- 9) Ainai A, Tashiro M, Hasegawa H. Cross-protective immunity against influenza virus infections induced by intranasal vaccination together with a TLR3-mucosal adjuvant. *Hum Vaccin.* 2011 Jan 1;7. [Epub ahead of print]
- 10) Ichinohe T, Ainai A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzaki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer D, Carter W, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, and Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J Med Virol* 2010 Oct;82(10):1754-61.
- 11) Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One.* 2010 Apr 23;5(4):e10256.
2. 学会発表
- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 相内章、池田千将、伊藤良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代真人、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
- 8) Elly van Riet, Ainai 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
- 9) 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
- 10) 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、田代真人: 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
- 11) 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、千葉文: 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
- 12) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、熊坂利夫、羽田悟、田中伸哉、笠井孝彦、鄭子文、飯塚利彦、仲里巖、樋野陽子、濱松晶彦、堀尚、田中智之、長谷川章雄、尾矢剛志、佐多徹太郎: 2009H1N1 パンデミックインフルエンザウイルス感染症 20 剖検例の臨床病理学的解析 第 100 回日本病理学会総会(横浜)2011 年 4 月
- 13) Akira Aina, Ryo Ito, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Shin-Ichi Tamura, Tetsutaro Sata, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa INTRANASAL ADMINISTRATION OF 2009/10 ANNUAL INFLUENZA VACCINE INDUCE THE CROSS-PROTECTION AGAINST 2009 PANDEMIC INFLUENZA VIRUS INFECTION, XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 14) Elly van Riet, Akira Aina, Ryo Ito, Tadaki Suzuki, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa, INFLUENZA SPECIFIC IGA PRODUCING SERUM MEMORY B CELLS CORRELATE TO PROTECTIVE ANTIBODIES IN THE SERUM AS WELL AS LOCAL IGA RESPONSES, XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 15) Ryo Ito, Akira Aina, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Joe Chiba, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa ANALYSIS OF THE IMMUNE RESPONSES AFTER INTRANASAL BOOSTER INFLUENZA VACCINE WITH HETEROLOGOUS VIRUS PRIMING XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 16) Hideki Hasegawa, Akira Aina, Elly van Riet, Tadaki Suzuki, Ryo Ito, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Takeshi Kurata, Shin-Ichi Tamura, INTRANASAL ADMINISTRATION OF AN INACTIVATED WHOLE-VIRION INFLUENZA VACCINE EFFECTIVELY INDUCES THE NEUTRALIZING ANTIBODIES BOTH IN THE SERUM AND THE NASAL WASH IN HUMAN XV International

- Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 17) Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kayoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro COMPARISON OF INFLUENZA A/H1N1 PDM09 VACCINE PRODUCTIONS IN EGGS VERSUS CELL CULTURES AND THE PROTECTIVE IMMUNE RESPONSES INDUCE IN MICE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 18) Tadaki Suzuki, Akira Ainai, Noriyo Nagata, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa ROLE OF THE N-TERMINAL REGION OF THE PA SUBUNIT IN NUCLEAR IMPORT AND ASSEMBLY OF INFLUENZA A VIRUS RNA POLYMERASE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 19) Tatsuya Yamazaki, Yasutomo Teshima, Daisuke Ninomiya, Maria Nagashima, Yuka Arai, Akira Fujimoto, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Joe Chiba PASSIVE IMMUNOTHERAPY AGAINST INFLUENZA VIRUS INFECTION USING THE EXPRESSION OF NEUTRALIZING ANTI-HEMAGGLUTININ MONOCLONAL ANTIBODIES FROM PLASMIDS BY HYDRODYNAMICS-BASED PROCEDURE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 20) 長谷川秀樹: 感染防御に効くインフルエンザワクチンを目指して 第 15 回日本ワクチン学会学術集会(東京)2011 年 12 月
- 21) 相内章、浅沼秀樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹: 2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm ウイルスの感染防御。第 15 回日本ワクチン学会学術集会(東京)2011 年 12 月
- 22) 長谷川秀樹、永田典代、岩田奈緒子、辻隆裕、佐多徹太郎: 新型インフルエンザウイルス A/(H1N1)pdm のフェレットにおける病原性の検討。第 99 回日本病理学会総会(東京)2010 年 4 月
- 23) 中島典子、羽田悟、飛梅実、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、岩田奈緒子、辻隆裕、渡辺正秀、佐多徹太郎: 本邦初の新型インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm)肺炎の剖検例。第 99 回日本病理学会総会(東京)2010 年 4 月
- 24) 瀧山晃弘、王磊、谷野美智枝、木村太一、西原広史、川岸直樹、國枝保幸、片野晴隆、長谷川秀樹、高木知敬、佐多徹太郎、田中伸哉: 新型インフルエンザ(A/H1N1pdm)肺炎によるびまん性肺胞障害により急死した 1 剖検例。第 99 回日本病理学会総会(東京)2010 年 4 月
- 25) 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎: 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンによるブースター効果と高病原性 H5N1 ウイルスの感染防御の検討。第 58 回日本ウイルス学会学術集会(徳島)2010 年 11 月
- 26) 相内章、伊藤良、浅沼秀樹、鈴木忠樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、佐多徹太郎、田代真人、長谷川秀樹: 2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm ウイルスの感染阻害効果の検討。第 58 回日本ウイルス学会学術集会(徳島)2010 年 11 月
- 27) 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、相内章、長谷川秀樹、藤本陽、千葉

- 文: インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた遺伝子治療による感染と重症化の阻止。第 58 回日本ウイルス学会学術集会(徳島)2010 年 11 月
- 28) 伊藤良、相内章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、千葉文、田村慎一、田代真人、佐多徹太郎、長谷川秀樹: 経鼻インフルエンザワクチンにおける抗原性の異なる株による追加免疫時の免疫応答の解析。第 58 回日本ウイルス学会学術集会(徳島)2010 年 11 月
- 29) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、佐多徹太郎: 日本の 2009 年 H1N1 新型インフルエンザウイルス感染症剖検例の病理。第 58 回日本ウイルス学会学術集会(徳島)2010 年 11 月
- 30) 浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、許斐奈美、山本典生、中内美奈、網康至、長谷川秀樹、相内章、高下恵美、小淵正次、徐紅、岸田典子、小田切孝人、田代真人: 新型インフルエンザウイルス(H1N1pdm)の増殖性に関する検討。第 58 回日本ウイルス学会学術集会(徳島)2010 年 11 月
- 31) 相内章、田村慎一、鈴木忠樹、伊藤良、浅沼秀樹、谷本武史、五味康行、奥野良信、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅、長谷川秀樹: インフルエンザワクチン経鼻接種による成人での血清および鼻腔洗浄液中のウイルス特異的中和抗体の評価。第 14 回日本ワクチン学会学術集会(東京)2010 年 12 月
- 32) 谷本武史、高野大輔、森本孝一、五味康行、長谷川秀樹、田村慎一、宮崎隆、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信: 経鼻インフルエンザワクチンによる免疫獲得効果検討。第 14 回日本ワクチン学会学術集会(東京)2010 年 12 月
- 33) 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎: 第 14 回日本ワクチン学会学術集会(東京)2010 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願)
2. 実用新案登録
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 22-24 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

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

研究分担者：信澤枝里（国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター・室長）

研究協力者：中内美名（国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官）

高橋宜聖（国立感染症研究所免疫部・室長）

西村秀一（国立病院機構仙台医療センター・室長）

松崎葉子（山形大学医学部・准教授）

菅原勘悦（山形大学医学部・技官）

廣津伸夫（廣津医院・院長）

萩原温久（萩原医院・副院長）

研究要旨 2009 年 4 月にブタウイルスを起源とする A/H1N1pdm09（新型ウイルス）によるパンデミックが発生した。新型ウイルスは、従来の季節性 A/H1N1 インフルエンザウイルス（季節性ウイルス）とは抗原性が異なるが、ヒトの血清抗体が認識する、新型ウイルス主要抗原 HA（新型 HA）上の抗原領域は、明らかにされていない。本研究では、新型ウイルスに対する 1 価のワクチン接種を受けた約 150 名を対象とし、新型 HA 特異的に結合する抗体のエピトープ構造を明らかにすることを試みた。ワクチン接種後に新型 HA 特異的に結合する 40 名分の血清を選択し、キメラ HA に対する結合能及びモノクローナル抗体エスケープ変異株に対する血球凝集阻止能 (HI 価) を測定し、ヒト血清の新型 HA 上のエピトープ構造の詳細解析を行った。その結果、調べた血清の約 70% が Ca2 あるいは Sa+Sb 領域に結合し、また約 50% の血清は複数の抗原領域に結合することが判明した。さらに、147 位、158 位、159 位の変異の影響を受ける血清が約 50% 同定され、中でも 147 位は、新型 HA 特異的なエピトープ構造の構成残基で、変異が起きれば流行規模に及ぼす影響が大きいことが示唆された。

A. 研究目的

2009 年 4 月以降、ブタウイルスに由来すると考えられる A/H1N1pdm09 インフルエン

ザウイルス（新型ウイルス）が世界規模の大流行を引き起こした。新型ウイルスは、2009 年以前の旧 H1N1 季節性インフルエンザウ

ウイルスとは抗原性が異なるため、抗体は交叉反応性を示さない。今後、新型コロナウイルスの持続的流行によりウイルスの抗原性が変化し、犠牲者が増加することが懸念される。インフルエンザウイルスの抗原変異株は、ヒト血清中の中和抗体により抗原変異株が選択され出現すると考えられる。本研究では、ヒト中和抗体が認識する HA 上の抗原領域を特定し、今後、新型コロナウイルスで生じる抗原変異あるいは、流行規模を推定し、抗原変異に対する迅速な対応を可能にすることを目的とした。そのため、新型 HA の抗原領域を有するキメラ HA に対する血清抗体の結合能の測定と、新型コロナウイルス HA に対するマウスモノクローナル抗体エスケープ変異株を用いた血球凝集阻止試験 (HI 試験) を行い、ヒト血清抗体のエピトープ構造を詳細に解析した。

B. 研究方法

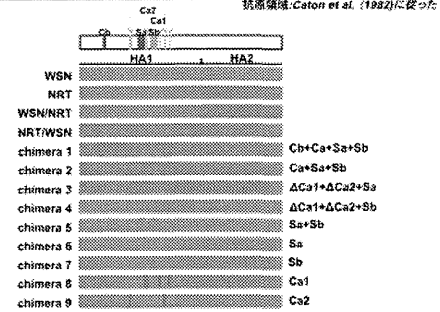
1. ヒト血清

2009/2010 シーズン新型コロナウイルスワクチン (1 価のワクチン) 接種後、新型コロナウイルスに対する HI 価が上昇した 150 名分のペア血清を対象とした。エピトープ構造の解析には、下記キメラ HA との結合実験で、新型 HA の HA1 領域に、ワクチン接種後のみに特異的に結合する 40 血清を選択して解析した。

2. キメラ HA の構築

WSN 株と A/Narita/1/2009 (NRT) 株 (新型コロナウイルス) の HA の間で、キメラ HA を作製した。作製したキメラ HA は、NRT/WSN (HA1:NRT、HA2:WSN)、WSN/NRT (HA1:WSN、HA2:NRT)、のほか、5 つの抗原領域のうち、複数の領域あるいは一領域のみが NRT 由来の配列を有する下記の 9 種の NRT/WSN キメラ HA である。

NRT/WSN 間のキメラ HA



3. HA 蛋白質の単独発現

発現ベクター pME18S にクローニングした各キメラ HA cDNA を COS 1 細胞にトランスフェクションし、48 時間後にエタノール・アセトン (1:1) により固定した。

4. ヒト血清を用いた蛍光免疫染色

各ヒト血清の NRT HA、WSN HA および各キメラ HA に対する結合能を間接蛍光免疫染色法により測定した。ヒト血清 (100 分の 1 希釈) は各キメラ HA 発現固定化細胞と 37°C、1 時間反応後、FITC 標識抗ヒト抗体とさらに反応し、蛍光顕微鏡下で観察した。

5. HI 試験

A/Narita/1/2009 株に対するモノクローナル抗体エスケープ変異株のうち Sa, Sb, Ca2 領域それぞれに 1 アミノ酸変異を有する 19 株および国内の流行株 (山形衛研、水田克巳先生より分与戴いた) を用いてヒト血清との HI 試験を行った。

(倫理面への配慮)

全ての実験は国立感染症研究所村山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程に従い実施した。ヒト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。

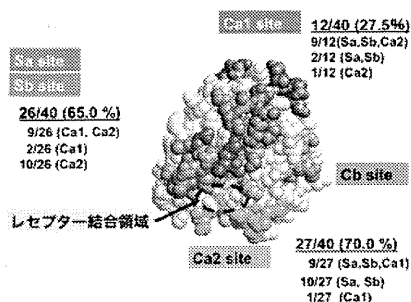
C. 研究結果

(1) キメラ HA との結合実験

ワクチン接種前後のペア血清を用いて、

NRT/WSN および WSN/NRT に対する結合能を調べた結果、接種後のみ NRT/WSN に特異的に結合するグループ 1、接種後のみ NRT/WSN および WSN/NRT の両方に結合するグループ 2、接種前後いずれも、NRT/WSN、WSN/NRT に結合するグループ 3、結合能が弱く判定不能のグループ 4 に分かれた。ワクチン接種により誘導された抗体が、特異的に結合する NRT 株の HA1 領域を同定するためグループ 1 の 40 名の血清を用いて、血清が結合する抗原領域の詳細を調べた。その結果、約 7 割の血清が、Sa+Sb 領域あるいは Ca2 領域に結合し、約 3 割が Ca1 領域を認識した。また、このうち複数の抗原領域に結合する血清が約 5 割同定された。

NRT HA抗原領域へのpost血清の結合分布



(2) エスケープ変異株及び流行株に対する HI 試験

エスケープ変異株のうち、1 アミノ酸変異が Sa 領域 (5 株)、Sa と Sb 領域が重なっている Sa+Sb 領域 (3 株)、Sb 領域 (3 株)、Ca2 領域 (7 株)、147 位にそれぞれ同定された計 19 株を用いて、(1) で結合領域を同定した 40 血清それぞれと HI 試験を行い、各血清抗体の結合部位の推定を行った。その結果、変異の影響を全く受けないグループと影響を受けるグループに分かれ、さらに後者は、(i) Sa, Sb, Ca2 領域全ての変異の影響を受ける、(ii) 特定の抗原領域の変異の影響を受ける、(iii) 147 位の変異の影響を受ける 3 グループに分かれた。

次に 2010 年、2011 年に分離された野外分離株に対して各血清で HI 試験を行った

結果、エスケープ変異株に対する各血清の反応性を反映する結果だった。すなわち、分離株に生じている変異がエスケープ変異株と同じ部位の場合、反応性が低下した血清は、エスケープ変異株の場合と一致した。2010 年に分離され、202 位に変異がある山形株との反応性は、202 位に 1 アミノ酸変異があるエスケープ変異株との反応性が低下したほとんどの血清で、低下していた。2011 年に分離され 158 位に変異がある山形株との反応性でも、同様の結果が得られた。エスケープ変異株で生じたアミノ酸変異のうち、調べた血清との反応性に及ぼす影響の大きさを調べた。血清の HI 価を親株である NRT に比較して 8 倍以上低下させる変異のうち、約 5 割の血清に影響を及ぼしたのは、147, 158, 159 位の変異であった。

D. 考察

当初、作製したキメラ HA では、生物学的活性が維持されていたため、WSN では欠失し、新型 HA では挿入されている 147 位のアミノ酸を考慮しなかった。しかし、キメラ HA の WSN 株配列部位に 147 位を導入したことで、一部の血清で結合実験結果と、HI 試験結果の矛盾点が解消した。このことは、新型 HA の 147 位のアミノ酸が抗原構造維持に果たす役割が大きいこと示す。

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が原因であると考えられているが、本研究の結果、pdm ウイルス流行株に生じた変異が、前のシーズンのワクチン接種者の血清抗体により中和されず、選択されて生じた可能性を示したことになる。

近年の旧 H1HA では欠失し、新型 HA で再度挿入された 147 位が、Sa, Sb 領域の残基とともに新型 HA 特異的なエピトープを形成していることをマウスモノクローナル抗体エスケープ変異株の解析から分担者の松