

図4 “インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼサイクル”によって誘発される血管内皮細胞機能障害と多臓器不全の発症機序  
 インフルエンザ感染の重症化は，“インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼサイクル”がひき起こす血管内皮細胞の膜透過性の亢進状態である。

protease-9(MMP-9)の発現誘導をひき起こす<sup>7)8)</sup>。特に蛋白質分解酵素の遺伝子を持たないインフルエンザウイルスにとって、trypsinは感染と増殖に不可欠な宿主因子で、ウイルス膜蛋白質のヘマグルチニンを分解して細胞膜融合活性を導き出して感染を促進する<sup>10)11)</sup>。このようにして、一端ウイルスが感染すると、感染部位から放出されるサイトカインによって、血管内皮細胞を含む各種全身の臓器でtrypsinとMMP-9が誘導されることになり、これによって血管内皮細胞の異常な透過性亢進や、臓器内へのウイルス侵入が進むことになる<sup>7)</sup>。MMP-9の増加は、血管基底膜のタイプIVコラーゲンと細胞外マトリックスの分解を誘導し、血管膜透過性亢進に深く関与している。このようにインフルエンザウイルス感染が、サイトカイン誘導を介して全身の血管内皮細胞の機能障害と深く結びついていることが明らかになってきた。とりわけ基礎疾患として内皮細胞の機能障害を持つ人、たとえば糖尿病患者や人工透析患者や、体質としてエネルギー代謝系酵素に弱点を持つ人が重症化しや

すい人といえる。図4は、「インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼサイクル」と血管内皮細胞機能障害との関係を図示している<sup>7)9)</sup>。インフルエンザ感染後、trypsinは肺、脳、心臓で誘導が著しく<sup>7)8)12)</sup>、血管内皮細胞でも増加してタイトジャンクションの崩壊と血管膜透過性の異常亢進をひき起こす。タイトジャンクションの崩壊は、ウイルスが臓器内に侵入するきっかけを作ることになる。血管内皮細胞機能障害は、末梢循環不全だけでなく、血液凝固・補体系の活性化、好中球、マクロファージの活性化、リンパ球の活性化と不活性化を誘導し、急速に多臓器不全を進展させる。

インフルエンザ感染時に血管内皮細胞の障害を受けやすい人が明らかになってきた。その典型例がインフルエンザ脳症である。インフルエンザ脳症は、脳浮腫と脳圧亢進を主症状とする脳の血管内皮細胞の透過性亢進状態で、その原因は脳の血管内皮細胞のエネルギー代謝不全と推定されている。すなわち、感染による血管内皮細胞のエネルギー代謝異常で、代謝病として

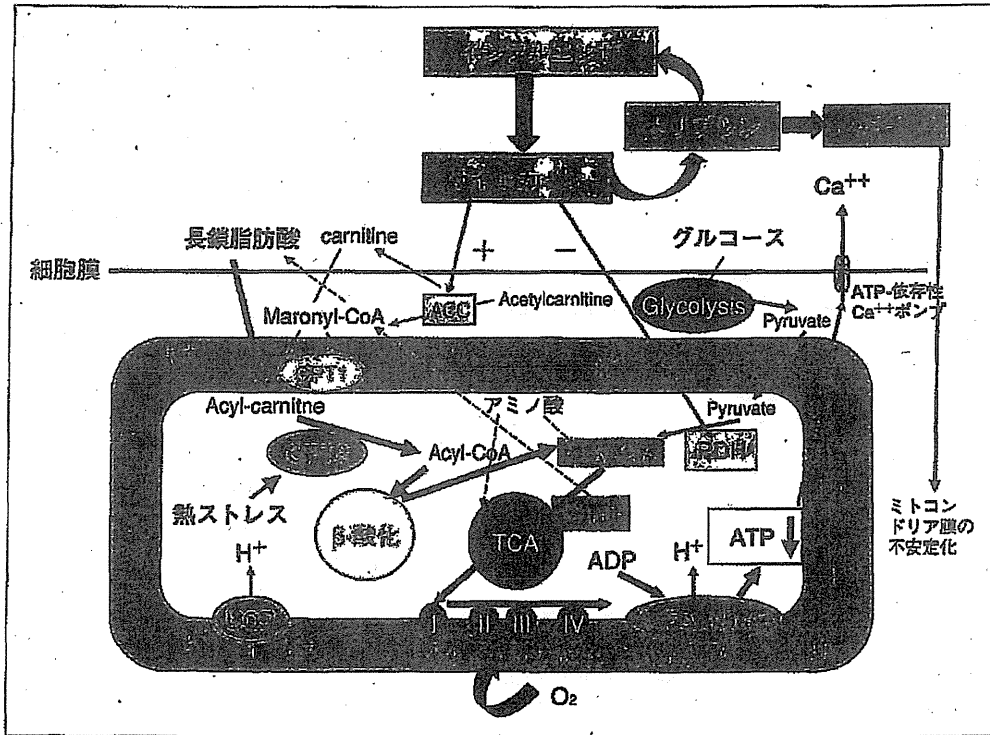


図5 インフルエンザ感染がミトコンドリアのATP産生に及ぼす影響とそのターゲット分子“インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼサイクル”で誘導されるトリプシンは、そのレセプターである細胞膜上のprotease activated receptor (PAR)-1,-2を介してミトコンドリア膜の不安定化を誘発し、サイトカインは関連する転写因子を介してpyruvate dehydrogenase (PDH)活性の低下と、acetyl-CoA carboxylaseの増加による代謝変動を、さらにサイトカインレセプターを介してミトコンドリア膜の不安定化を誘導する。インフルエンザ感染に伴う高熱は、熱不安定性遺伝子多型CPT IIを持つ小児の後天性の酵素欠損症状態を誘導する。これらの変動は、ミトコンドリアでのATP産生を急速に低下させ、ATP依存性の酵素群の活性異常と細胞の機能異常を誘発する。

の表現型を示す<sup>13)14)</sup>。脳の血管内皮細胞は、心筋細胞や脳の神経細胞と同様にATP消費の高い細胞で、全身の血管内皮細胞のなかでも特にミトコンドリアが多く、ATPを必要としている。さらに血管内皮細胞は、エネルギー源の約70%を脂肪に依存しており<sup>15)</sup>、エネルギー源を糖とケトンに100%依存する神経細胞とは対照的な細胞である。インフルエンザ脳症と診断され重症化した患児の多くは、長鎖脂肪酸代謝酵素のcarnitine palmitoyltransferase II (CPT II)に熱不安定性遺伝子多型がみられ、脂肪酸代謝障害と脳症との関係が解明されてきた<sup>13)14)</sup>。わが国のインフルエンザ脳症死亡患児、脳症後のハンディキャップ患児のなかで高率にみられる遺伝子多型が、CPT IIの熱不安定性遺伝子多型である。

### 長鎖脂肪酸代謝酵素CPT IIの遺伝子多型とミトコンドリア機能不全、細胞内ATPの低下

1日に必要とされるヒトのATP量は体重に匹敵する量で、呼吸によって取り込んだ酸素の約95~96%がATP産生に利用され、ATPは生命活動を支える基本分子である。インフルエンザ感染で誘導される各種サイトカインによって、pyruvate dehydrogenase (PDH)活性が低下してグルコースの代謝経路が細くなると、これに対応して細胞は脂肪酸からのエネルギーを産生する比率を大きくして、エネルギー危機を回避しようとする。インフルエンザ感染とミトコンドリアのエネルギー産生系との関係を図5に示す。糖代謝から脂質代謝へシフトする際に、長鎖脂肪酸代謝酵素のCPT IIに熱不安定性遺伝子多型を持つ患児

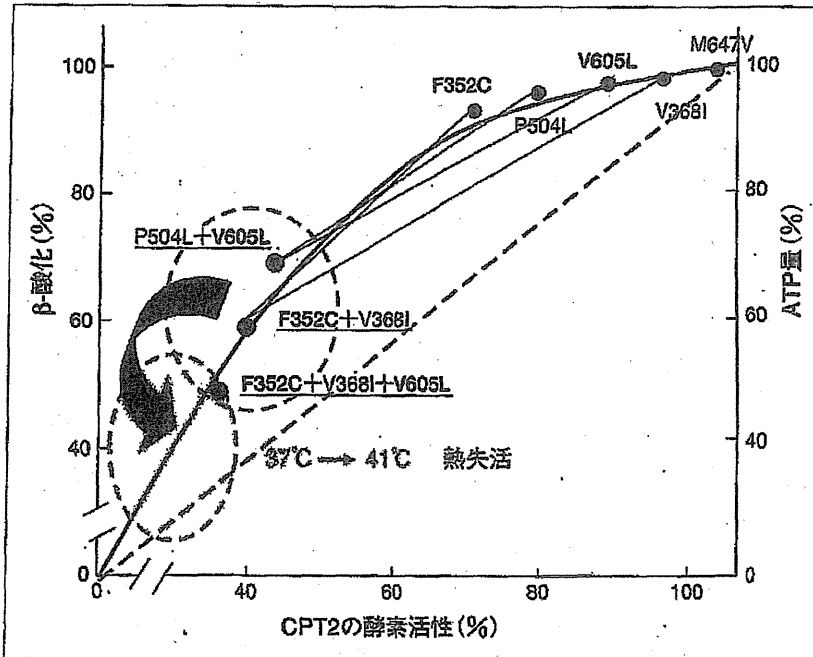


図6 インフルエンザ脳症患者のCPT II遺伝子多型と、高熱持続で誘発される後天性CPT IIの熱失活による細胞内ATPレベルの低下  
熱不安定性遺伝子多型CPT IIを持つ患者は、インフルエンザ感染で数時間の高熱をきっかけとして酵素の熱失活による後天性CPT II酵素欠損状態に陥り、急速なβ酸化レベルの低下、ATPレベルの低下をひき起こしてエネルギー危機状態になる。

では、変動に対応できずにエネルギー危機となり、ミトコンドリアの多い脳の血管内皮細胞から影響が出始める。インフルエンザ脳症患児で見られるCPT IIの遺伝子多型の中で、F352Cは東アジア人種に頻度の高い多型で日本のインフルエンザ脳症患者でよくみられる<sup>13)14)</sup>。この遺伝子多型は活性中心近傍に位置して、以下の特徴を示す。①基質のカルニチンとの親和性が低下して、酵素活性が低下(約40~50%程度)するが、日常生活で異常は観察されないことが多い。②体温が37℃から40~41℃へ上昇して数時間すると酵素の熱失活が急速に起きる。③熱不安定性遺伝子多型酵素の細胞内寿命(半減期)は、正常値の1/3に短縮されて、6時間となっている<sup>14)</sup>。このような多型を持つ酵素は細胞内で速やかに分解を受け、細胞は新しい酵素を活発に作って補充し続けている状態にある。以上の特徴から図6に示すように、高熱が持続すると酵素の熱失活で細胞内のATP量、β酸化レベルは50%以下となり、急速なエネルギー危機に陥り血液・脳関門が開くと推定している。脂肪を多く含むミ

ルクを主食とする乳幼児期は、脂肪酸代謝が優位と考えられるが、この時期に上記のCPT II遺伝子多型を持つ患児がインフルエンザに感染するとエネルギー危機になりやすい。インフルエンザウイルス以外にもHHV-6、アデノウイルス、コクサキウイルス、ロタウイルス等の感染で、脳症と多臓器不全を起こすことがあるが、これらの患者のなかにCPT IIの熱不安定性遺伝子多型を持った患者が多数みられる。

熱に弱いCPT II遺伝子多型を持った患児でも、CPT IIの発現を増強して細胞内ATPレベルを増加させることで、エネルギー危機を回避できる可能性が見出された<sup>16)17)</sup>。高脂血症の治療薬のなかで脂質代謝酵素の発現を増加させて代謝を活性化する薬剤のbezafibrateに注目している。この薬剤はCPT IIの転写を上昇させて酵素量を増加させる効果を示すが、さらにCPT II安定化剤のカルニチンを加えると脂肪酸代謝が回復することを見出した<sup>16)</sup>。この薬剤を重症患者のCI-FI型CPT IIを持つ培養線維芽細胞に投与すると、図7に示すように高熱下でもミトコンドリア機能を改

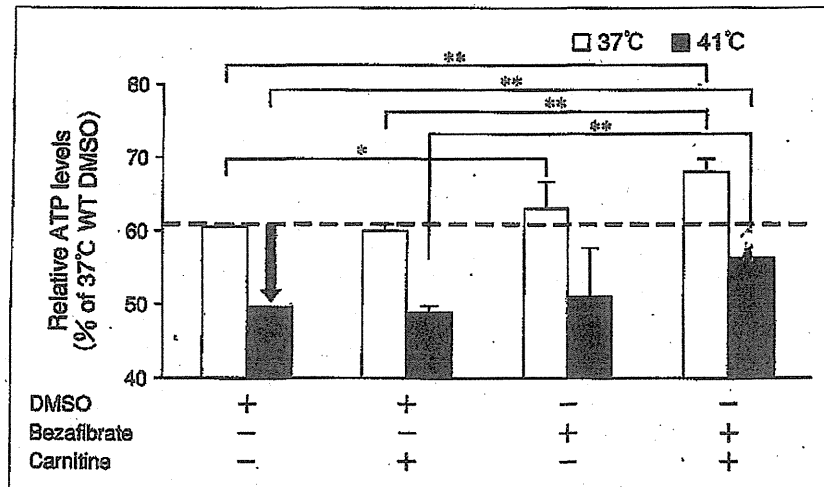


図7 インフルエンザ脳症患者の線維芽細胞培養系へのbezafibrate, carnitineの添加による細胞内ATPレベルの回復

インフルエンザ脳症重症患者(CI-FI型: F352C hetero+V368I homo)の線維芽細胞培養系へbezafibrate (400  $\mu$ M), L-carnitine (50  $\mu$ M)を添加して24時間後の細胞内のATPレベルを示す。白抜きのパールは37°C, 黒のパールは41°Cの条件下で培養した細胞を示す。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (コントロールとして投与したDMSOに比して有意差を示した検体)。

善しATP産生を増加させた。すなわち遺伝子治療によることなく、酵素量を増加させることで、エネルギー危機を回避する可能性が示唆されたことになる。さらに、脂質代謝以外に糖代謝のPDHの活性低下を防ぐ薬剤も最近解析が進み注目されている。

### おわりに

インフルエンザ感染の重症化は、血管内皮細胞膜の透過性の亢進と代謝の破綻を伴うが、重症化を血管内皮細胞と糖と脂質の代謝障害に原因を求めることで、治療のターゲット分子(酵素)が明らかになってきた。早期の抗インフルエンザ薬の使用と、重症化の治療薬を併用することで、ハイリスク患者においても有効なインフルエンザの治療がみえつつある。

### 文 献

- 1) 木戸 博, 高橋悦久, 水野 大, ほか. マクロライド薬によるインフルエンザ感染時の粘膜免疫増強作用. 臨床と微生物 2012; 39: 331.
- 2) Fujimoto C, Takeda N, Matsunaga A, et al. Induction and maintenance of anti-influenza antigen-specific nasal secretory IgA levels and serum IgG lev-

els after influenza infection in adults. *Influenza Other Respi Viruses* 2012; 6: 396.

- 3) Shinahara W, Takahashi E, Sawabuchi T, et al. Immunomodulator clarithromycin enhances mucosal and systemic immune responses and reduces re-infection rate in pediatric patients with influenza treated with antiviral neuraminidase inhibitors: a retrospective analysis. *PLoS One* 2013; 8: e70060.
- 4) Takahashi E, Kataoka K, Fujii K, et al. Attenuation of inducible respiratory immune responses by oseltamivir treatment in mice infected with influenza A virus. *Microbes Infect* 2010; 12: 778.
- 5) Sawabuchi T, Suzuki S, Iwase K, et al. Boost of mucosal secretory immunoglobulin A response by clarithromycin in pediatric influenza. *Respirology* 2009; 14: 1173.
- 6) Takahashi E, Kataoka K, Indalao IL, et al. Oral clarithromycin enhances airway immunoglobulin A (IgA) immunity through induction of IgA class switching recombination and B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family molecule on mucosal dendritic cells in mice infected with influenza A virus. *J Virol* 2012; 86: 10924.
- 7) Wang S, Le TQ, Kurihara N, et al. Influenza virus-

- cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J Infect Dis* 2010 ; 202 : 991.
- 8) Pan H, Yamada H, Chida J, et al. Upregulation of ectopic trypsins in the myocardium by influenza A virus infection triggers acute myocarditis. *Cardiovasc Res* 2011 ; 89 : 595.
- 9) Kido H, Okumura Y, Takahashi E, et al. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim Biophys Acta* 2011 ; 1824 : 186.
- 10) Klenk HD, Rott R. The molecular of influenza virus pathogenicity. *Adv Virus Res* 1988 ; 34 : 247.
- 11) Kido H, Okumura Y, Takahashi E, et al. Proteases essential for human influenza virus entry into cells and their inhibitors as potential therapeutic agents. *Curr Pharm Des* 2007 ; 13 : 405.
- 12) Le TQ, Kawachi M, Yamada H, et al. Identification of trypsin I as a candidate for influenza A virus and Sendai virus envelope glycoprotein processing protease in rat brain. *Biol Chem* 2006 ; 387 : 467.
- 13) Chen Y, Mizuguchi H, Yao D, et al. Thermolabile phenotype of carnitine palmitoyltransferase II variations as a predisposing factor for influenza-associated encephalopathy. *FEBS Lett* 2005 ; 579 : 2040.
- 14) Yao D, Mizuguchi H, Yamaguchi M, et al. Thermal instability of compound variants of carnitine palmytoyltransferase II and impaired mitochondrial fuel utilization in influenza-associated encephalopathy. *Hum Mut* 2008 ; 29 : 718.
- 15) Dagher Z, Ruderman N, Tornheim K, et al. Acute regulation of fatty acid oxidation and AMP-activated protein kinase in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res* 2001 ; 88 : 1276.
- 16) Yao M, Yao D, Yamaguchi M, et al. Bezafibrate upregulates carnitine palmitoyltransferase II expression and promotes mitochondrial energy crisis dissipation in fibroblasts of patients with influenza-associated encephalopathy. *Mol Genet Metab* 2011 ; 204 : 265.
- 17) 木戸 博. CPT2欠損症. 先天性代謝異常ハンドブック. 3章 脂質代謝異常. 東京 : 中山書店 ; 2013. pp. 126-7.

\* \* \*



## インフルエンザにおける マクロライドの有効性の機序 2 : インフルエンザにおける粘膜免疫増強作用と 再感染抑制機序\*

木 戸 博\*\*

Key Words : mucosal immunity, anti-viral neuraminidase inhibitor, secretory IgA (sIgA), mucosal adjuvant, BAFF (B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family)

### はじめに

近年インフルエンザ感染は、新型インフルエンザの出現や高病原性鳥インフルエンザのヒト型への変異リスクから、パンデミック対策としてより効果的な予防法と治療法の開発が望まれている。予防法で最も重要になるのがインフルエンザウイルスの侵入門戸でウイルスの体内侵入を防ぐ感染防御抗体の分泌型IgA (secretory IgA ; sIgA) であるが、現行の皮下注射ワクチンにはsIgAの誘導効果はない。このような状況の中で、インフルエンザ感染時の獲得免疫、なかでも分泌型sIgA産生を増強するマクロライド系抗菌剤のクラリスロマイシン (CAM) が注目されている。わが国ではインフルエンザ感染と診断された場合、抗ウイルス剤を処方することが多いが、抗ウイルス剤はウイルス増殖サイクルを抑制して症状を改善するが、同時にウイルス抗原量の減少による獲得免疫の不全をもたらす。抗ウイルス剤のこの避けがたい欠点を補う物質として、粘膜免疫増強効果を示すCAMが注目されている。本稿では、気道感染における粘膜免疫の重要性、粘膜免疫を増強するCAMの効果とその作用機序について、最近の知見を紹介する。

### 気道のウイルス感染感受性を決定している 粘膜免疫

病原体の侵入門戸で感染防御の主体を担う気道粘膜の分泌型sIgA抗体は、交叉免疫性が強く主要な初感染防御機能を担っている<sup>1)</sup>。図1に、ヒト鼻汁中の抗インフルエンザ特異sIgA抗体価とインフルエンザの感染感受性との関係を示す<sup>2)</sup>。2005/2006年と2006/2007年のインフルエンザワクチン接種時に鼻汁を採取して、抗インフルエンザ特異的sIgA抗体価を測定した結果である。翌年の5月にインフルエンザ感染の有無を調査した結果と合わせて表示した。なお、感染者の判定は、迅速診断キットで陽性と判定されたヒトをエントリーしており、擬陽性者は非感染グループとして扱った。縦軸は鼻汁の全IgA中に占めるインフルエンザ特異的sIgA抗体量を表示している。インフルエンザに感染したヒトは、例外なく鼻汁中の抗インフルエンザsIgA抗体価が低く、非感染者は抗体価が高く、鼻汁の抗インフルエンザ特異抗体価レベルが感染感受性を決定しているといっても過言ではない。なお、感染リスクの基準値は、インフルエンザの亜型によって異なり、H1N1亜型の方がH3N2亜型に比

\* Mechanisms of macrolide effects on influenza virus infection 2 : Enhancement of mucosal immunity and suppression of re-infection.

\*\* Hiroshi KIDO, M.D.: 徳島大学疾患酵素学研究センター〔〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町3-18-15〕; Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Tokushima 770-8503, JAPAN

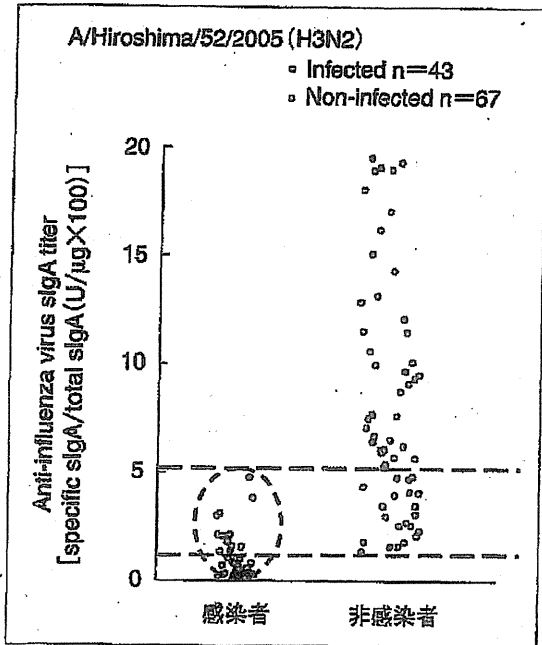


図1 インフルエンザ感染前の鼻汁中の抗インフルエンザ抗体価と感染感受性

2005/2006年, 2006/2007年のインフルエンザシーズンの10月にボランティアから鼻汁を採取し, インフルエンザ特異的sIgA抗体価を測定した。翌年5月に, インフルエンザに感染したかを調査して相互の関係を調査した結果を示す。縦軸は, 鼻汁中の全sIgA中に占める抗インフルエンザ特異sIgA量を示す。

べて基準値が低い傾向にある。また, インフルエンザ感染者を対象としたRetrospective Study<sup>3)</sup>では, 感染者であってもその約70%がインフルエンザシーズン前にワクチンを接種しており, 62.5%が皮下注射ワクチンの目標値であるhemagglutinin inhibition (HI) 価 $\geq 40$ を示していた。しかし, 感染者の鼻汁中のsIgA抗体価は例外なく低値を示し, 血中のHI価が $\geq 40$ であっても感染することを示している。これらのことから, 血中のHI価やIgG抗体価よりは気道粘膜のsIgA抗体価がインフルエンザの感染感受性を決めていることがわかる。

### 粘膜免疫を賦活化する マクロライド系抗菌薬

マクロライド系抗菌剤の中に, 気道分泌液中の抗インフルエンザウイルス特異sIgA抗体と血中の抗インフルエンザウイルス特異IgG抗体の増加, 気道分泌液中のIL-12の増加を示す薬剤とし

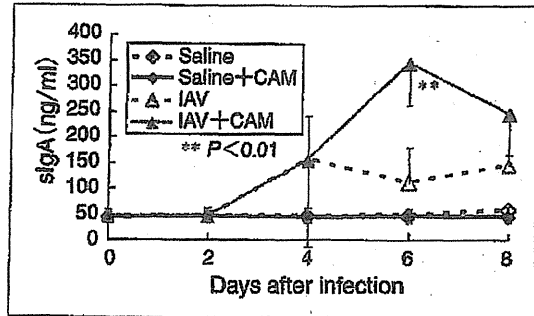


図2 気管支肺胞洗浄液のCAMによるsIgA抗体産生量の増幅効果

C57BL/6雌マウスにインフルエンザAウイルス( $6.6 \times 10^8$  PFU)を経鼻感染させた後, 気管支肺胞洗浄液中に検出されるsIgA抗体量を経時的に測定した。各群のマウスは15匹からなる。(◇)Saline: 生理食塩水を20  $\mu$ l 経鼻投与した群, (◆)Saline+CAM: 生理食塩水20  $\mu$ lの経鼻投与と, CAM(10mg/kg/日)を経口投与した群, ( $\Delta$ )IAV: 生理食塩水(20  $\mu$ l)にインフルエンザウイルス(IAV)を加え経鼻感染させた群, ( $\blacktriangle$ )IAV+CAM: インフルエンザウイルス(IAV)を経鼻感染させると同時に, CAM(10 mg/kg/日)を経口投与した群。気管支肺胞洗浄液中のsIgA抗体量は酵素抗体法で定量した。

てクラリスロマイシン(CAM)が2004年に報告された<sup>4)</sup>。図2にインフルエンザウイルス, A/Aich/2/68(H3N2)をマウスに経鼻感染させ, CAMの有りなしで気管支肺胞洗浄液(BALF)中の分泌型sIgAを測定した結果を示す<sup>4)5)</sup>。感染4日目以後にBALF中の分泌型sIgAの誘導がみられるが, CAMはこの分泌型sIgA誘導を, 4日目以後6日目をピークに有意に増強した。インフルエンザ非感染群では, CAMによる分泌型sIgAの誘導効果がみられないことから, ウイルス抗原感作によって刺激された免疫系がCAMによってさらに増強されたと考えることができる。なお, 図には示していないが, BALF中に誘導されるIgGもCAMの投与によって6日目以後有意に増加し, これら分泌型sIgAとIgGの分泌量の増加に逆相関して, BALF中のウイルス量は減少していることが判明した。なお分泌型sIgAは, 血液中のIgGに比べて交差免疫性が高く, インフルエンザウイルスの亜型が変わってもウイルス増殖抑制作用を示し, 感染感受性を決める重要な生体防御物質である。

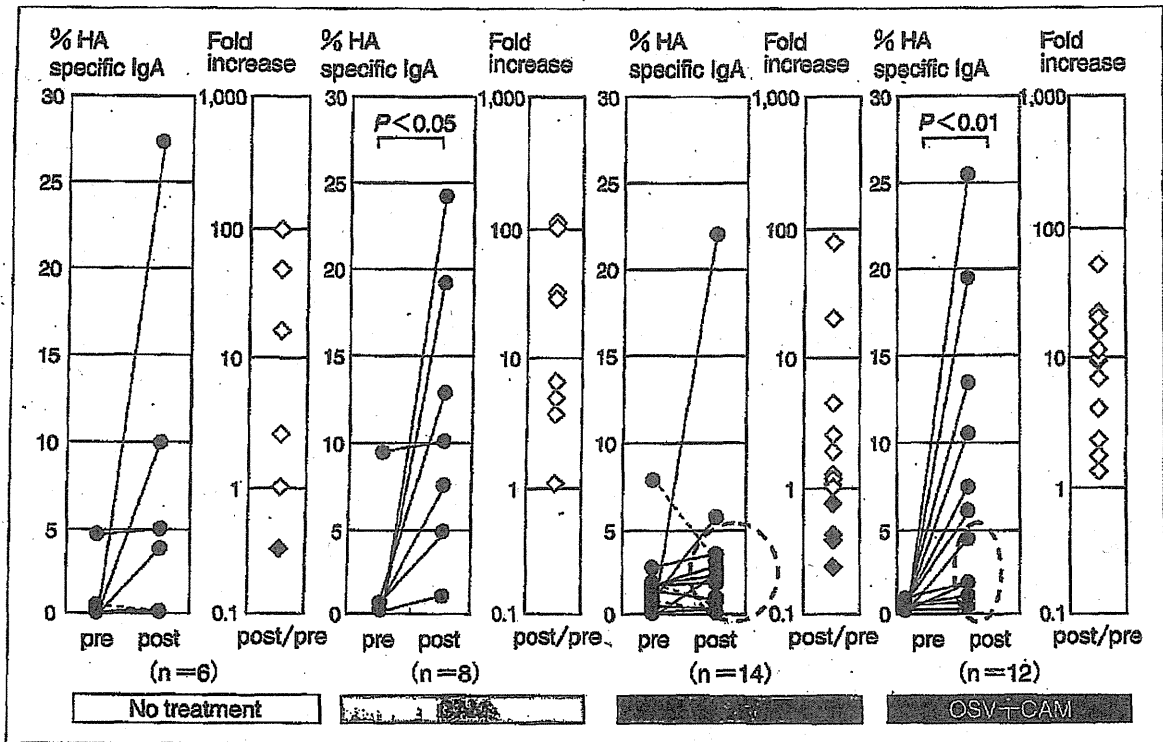


図3 抗インフルエンザ薬治療期間における患児鼻汁中の抗インフルエンザ抗体の推移  
 無投薬群 (no treatment) (n=6), CAM投与群 (n=8), タミフル(OSV)投与群 (n=14), タミフル(OSV)+CAMの併用投与群 (n=12)の来院時(Pre)と投薬5日目(Post)の鼻汁中の抗 influenza A/Hiroshima (H3N2) 特異sIgA抗体量の推移を示す。縦軸は、全sIgAに占める抗インフルエンザ特異sIgA抗体の割合(%)を示す。各群でPreとPostを比較して、全sIgAに占める抗インフルエンザ特異sIgA抗体の割合(%)が何倍増加したかを、右のカラムに示した。(●—●), (◇)は、抗体価が増加したか変わらなかった個体を示す。(●---●), (◇)は、抗体価が減少した個体を示す。PreとPost間の有意差検定はWilcoxon signed-rank testを用いた。

### 抗インフルエンザ薬によって低下した獲得免疫を回復させるCAMの粘膜免疫増強効果

粘膜免疫を増強するCAMの上記の新作用の発見<sup>4)5)</sup>を基盤に、CAMの効果がタミフル(OSV)、リレンザ(ZNV)などの抗インフルエンザ薬(シアリダーゼ阻害剤)によって低下した獲得免疫を補う効果的な薬剤として、より明確な薬効が明らかにされた<sup>6)7)</sup>。OSV, ZNVなどの抗インフルエンザ薬(シアリダーゼ阻害剤)は、ウイルスの増殖サイクルを抑制して症状を改善するが、同時に体内ウイルス抗原量を減少させるため、獲得免疫誘導が不十分になる<sup>8)9)</sup>。特にその影響は、インフルエンザ抗原メモリーの少ない小児、乳幼児で強く、IgG, sIgA抗体の産生量の低下が観察されるが、免疫系の活性化に比較的多くの抗原を必要とする粘膜sIgA抗体誘導でその影響は

大きい。獲得免疫の低下は、次年度の再感染リスクの増大として表れる。

患者と家族の同意の基に、2005/2006年と2006/2007年のインフルエンザシーズンにインフルエンザに罹患した患児(5.7±3.2歳)を対象に、抗インフルエンザ薬のOSV投与群と非投与群について、CAMの併用群と非併用群で鼻汁中の抗インフルエンザ特異的sIgA抗体量と臨床症状が比較検討された<sup>6)</sup>。鼻汁の採取は、来院時と投薬5日後に行った。図3では、鼻汁の全分泌型IgA中に占める抗インフルエンザ特異sIgA抗体の割合(%)を示し、各群間の個々人のデータの推移を比較している。インフルエンザ罹患時の、鼻汁の抗インフルエンザ特異sIgA抗体価は、数人の例外を除いて5%以下で、図1の結果を支持した。感染後は抗インフルエンザ特異的sIgAが患児の鼻粘膜で誘導され、全IgA中に占める抗インフルエンザsIgA抗体量は5%を超え、高い患児では25%



表1 インフルエンザ罹患患者への投薬の違いによる鼻汁中の抗インフルエンザウイルス特異sIgA抗体誘導

Treatment	n	S-IgA concentration				Percentage of patients with $\geq 1$ -fold and $\geq 4$ -fold increases in anti-IAV-specific S-IgA concentration during treatment			
		Anti-IAV-specific S-IgA (U/mg protein)				H1N1		H3N2	
		H1N1		H3N2					
		Before	After	Before	After	$\geq 1$ -fold (After/before)	$\geq 4$ -fold (After/before)	$\geq 1$ -fold (After/before)	$\geq 4$ -fold (After/before)
No treatment	65	2.3(0.5~5.7)	3.1(1.2~7.8)*	2.2(0.6~3.8)	3.1(1.0~6.7) <sup>¶</sup>	61.5	26.2	69.2	15.4
OSV	70	1.3(0.6~5.9)	1.2(0.4~5.0)	1.0(0.4~2.8)	1.1(0.5~3.1)	42.9 <sup>§</sup>	18.6	42.9 <sup>‡</sup>	14.3
OSV+CAM	20	0.9(0.3~1.4)	1.9(0.3~12.3)*	0.7(0.2~1.7)	1.5(0.3~7.6) <sup>¶</sup>	65.0 <sup>#</sup>	30.0	70.0 <sup>†</sup>	20.0
ZNV	27	3.8(1.7~12.3)	4.5(0.5~15.8)	2.0(1.4~3.8)	2.6(0.5~7.8)	37.0 <sup>§</sup>	18.5	48.1 <sup>§</sup>	11.1
ZNV+CAM	10	2.0(1.6~7.1)	6.3(2.2~19.5)	1.7(1.2~2.4)	4.3(1.8~11.6)	50.0	30.0	60.0	30.0

2008/2009シーズンのインフルエンザ罹患小児に、非投薬(no treatment)、OSV投薬、OSV+CAM投薬、ZNV投薬、ZNV+CAM投薬が行われた。投薬前と5日間の投薬後の鼻汁中の抗インフルエンザウイルス特異sIgA抗体価をmedian(interquartile range)で示した。

\* $P < 0.05$ , <sup>¶</sup> $P < 0.01$ (初診時と比べて5日後の値が有意に増加)。<sup>§</sup> $P < 0.05$ , <sup>‡</sup> $P < 0.01$ (no treatmentに比較して有意差を認めた)。<sup>#</sup> $P < 0.06$  to  $0.09$ , <sup>†</sup> $P < 0.05$ (OSVに比較して有意差を認めた)。

表2 インフルエンザ罹患患者への投薬の違いによる血中の抗インフルエンザウイルス特異IgG抗体誘導

Treatment	n	IgG concentration				Percentage of patients with $\geq 1$ -fold and $\geq 4$ -fold increases in anti-IAV-specific IgG concentration during treatment			
		Anti-IAV-specific IgG (U/ml)				H1N1		H3N2	
		H1N1		H3N2					
		Before	After	Before	After	$\geq 1$ -fold (After/before)	$\geq 4$ -fold (After/before)	$\geq 1$ -fold (After/before)	$\geq 4$ -fold (After/before)
No treatment	49	0.5(0.2~0.9)	0.8(0.4~1.5) <sup>¶</sup>	0.4(0.2~0.7)	0.8(0.3~1.4) <sup>¶</sup>	73.5	30.6	73.5	34.7
OSV	52	0.2(0.03~0.7)	0.5(0.06~1.0)	0.2(0.04~0.5)	0.4(0.06~1.1) <sup>¶</sup>	63.5	21.2	75.0	32.7
OSV+CAM	14	0.5(0.3~0.6)	0.9(0.5~1.4) <sup>¶</sup>	0.5(0.2~0.5)	0.6(0.4~1.2)*	78.6	21.4	85.7	14.3
ZNV	22	0.6(0.3~1.1)	0.6(0.4~1.1)	0.3(0.2~0.5)	0.5(0.4~0.9) <sup>¶</sup>	40.9 <sup>‡</sup>	13.6	68.2	18.2
ZNV+CAM	8	0.3(0.2~0.6)	0.9(0.2~1.8)*	0.4(0.2~0.7)	1.4(0.4~2.6)*	100.0 <sup>†</sup>	25.0	100.0 <sup>#</sup>	50.0

2008/2009シーズンのインフルエンザ罹患小児に、非投薬(no treatment)、OSV投薬、OSV+CAM投薬、ZNV投薬、ZNV+CAM投薬が行われた。投薬前と5日間の投薬後の血中の抗インフルエンザウイルス特異IgG抗体価をmedian(interquartile range)で示した。

\* $P < 0.05$ , <sup>¶</sup> $P < 0.01$ (初診時と比べて5日後の値が有意に増加)。<sup>‡</sup> $P < 0.01$ (no treatmentに比較して有意差を認めた)。<sup>#</sup> $P < 0.06$  to  $0.09$ , <sup>†</sup> $P < 0.01$ (ZNVに比較して有意差を認めた)。

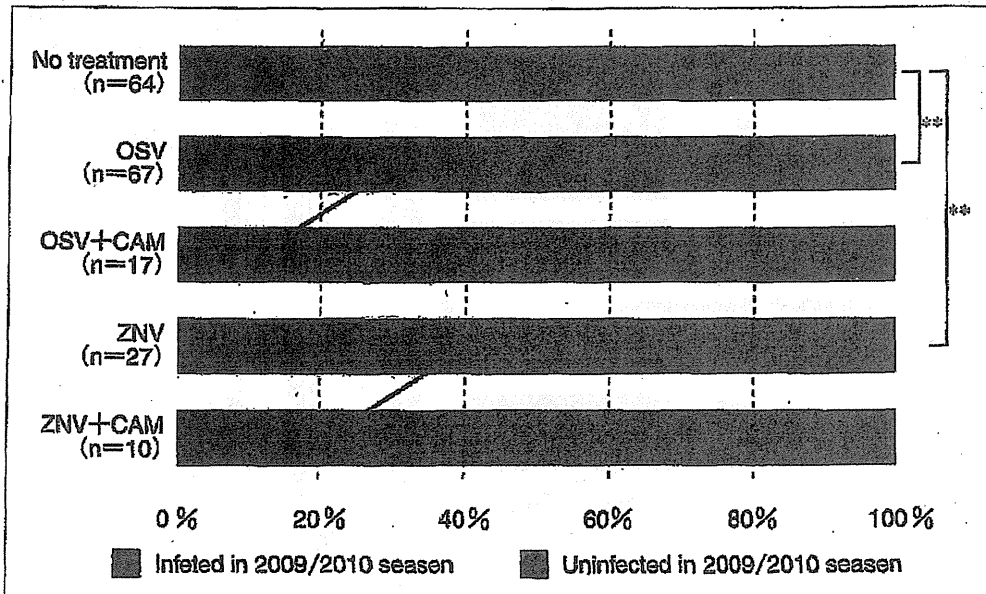


図4 インフルエンザに罹患した患者の翌シーズンにおけるインフルエンザ再罹患状況  
2008/2009シーズンのインフルエンザ罹患小児に、非投薬(no treatment)、OSV投薬、OSV+CAM  
投薬、ZNV投薬、ZNV+CAM投薬が行われた。これらの患児の翌2009~2010シーズンにおける  
インフルエンザの罹患率を調査した。\* $P<0.01$ (no treatmentに比較して有意差を認めた)  
(文献<sup>7)</sup>より引用改変)

にまで増加した。OSV服用でウイルス増殖の抑制された患児では、特異sIgAの増加がほとんど認められず、初感染時の5%に留まる患者(○)が全体の86%を示した。一方、OSVとCAMの併用群では、感染5日目で約50%の患者で特異sIgA抗体価は5%を超え、抗体価の有意な( $P<0.01$ )増加が確認された。このことはCAMの粘膜免疫増強作用により、わずかな量のウイルス抗原でも抗インフルエンザ特異sIgAの産生を促進していることを示している。無投薬の場合、多くの患者で抗インフルエンザ特異sIgA抗体価は増加しており、自然感染における獲得免疫を確認できる。CAM単独投与群では、無投薬群や、OSVとCAMの併用投与群との間に有意差は認められなかった。

上記の結果において、各群の患者数が限られていたことから、さらに患者数を増加した再試験が行われた。再試験では、鼻汁中のsIgA抗体価以外に血中IgG抗体価へのCAMの影響調査、経口剤のOSV以外に吸入剤のZNVについての調査、次年度の再感染率の調査が行われた。表1に鼻汁中の抗インフルエンザウイルス特異的sIgAの結果を示す。抗ウイルス薬の服用のない群(no treatment)では、感染5日後に鼻汁の抗インフ

ルエンザIgA抗体は有意に増加したが、OSV、ZNV服用者では有意な抗体価の増加はみられなかった<sup>7)</sup>。感染5日後の抗体価が $\geq 1$ 倍以上増加している人数(%)で表すと、no treatment群では60~70%の増加がみられたが、OSVでは42.9%、ZNVでは37~48%と有意に低下していた。一方、抗体価が $\geq 1$ 倍以上増加している人数は、OSV+CAM投与群で65~70%と有意に増加し、ZNV+CAMで50~60%と増大がみられた。これらの変化は、翌年の再感染率を示している図4の結果に良く反映されている。さらに、抗インフルエンザウイルス特異IgG抗体価の変動結果を表2に示す<sup>7)</sup>。No treatment群では、血中の抗ウイルス特異IgG抗体価は感染5日後に有意な増加が観察され、H1N1抗体ではOSV、ZNV投薬群で有意な増加はみられず、H3N2抗体では有意な増加が認められた。抗体価が $\geq 1$ 倍以上増加している人数解析では、抗H1N1抗体価においてno treatmentの73.5%に比べてZNV投薬群で40.9%と有意に低く、ZNV+CAM群で100%と有意な増加を示した。抗H3N2抗体価においても同様な傾向が認められたがこの場合、有意差のつかないケースが認められた。以上の結果は、抗ウイルス剤の獲

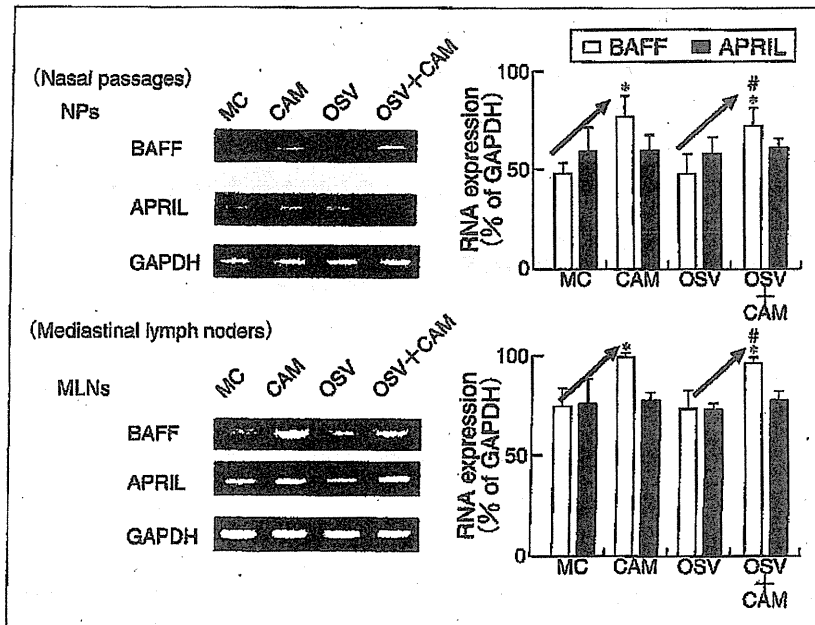


図5 鼻腔粘膜リンパ節, 胸縦隔リンパ節におけるBAFFとAPRILの発現  
 インフルエンザウイルス感染後6日目の鼻腔粘膜リンパ節, 胸縦隔リンパ節を採取して, CD11c<sup>+</sup>の樹状細胞をマイクロビーズ法で集め, 抗体産生クラススイッチ遺伝子組み換えのキーエンザイムAIDの上流に位置する樹状細胞の分泌因子, BAFFとAPRILの発現を検討した. BAFF; B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family, APRIL; proliferation-inducing ligand, GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. \* P<0.05(コントロール溶媒のMC: 0.5% methylcelluloseに比較して有意差を認めた), # P<0.05(OSV投与群に比較して有意差を認めた)

得免疫抑制効果は, OSV以外にZNVでも認められること, さらに鼻汁のsIgAと血液のIgGの両方で獲得免疫の抑制効果が認められ, この抑制効果はOSV+CAM, ZNV+CAMで回復する傾向が確認された。

なお, 粘膜アジュバント効果をヒトで評価する場合, 抗体価が $\geq 4$ 倍以上増加したヒトの占める割合(%)で評価することが多いが, 表1, 2に示すように $\geq 4$ 倍以上増加した人数は, sIgAの調査とIgGの調査で, とともに各群間の有意差はみられなかった。このことは, CAMはマイルドな粘膜免疫増強物質として作用し, 経鼻接種ワクチンのアジュバントとして使用できるほど強力なアジュバントではないことを示している。むしろCAMはアジュバント病のリスクのないマイルドで安全な粘膜免疫増強剤として位置づけることができる。

OSV, ZNVの獲得免疫抑制効果は, 次年度のインフルエンザ再感染率に有意差をもって表れ

た。図4に示すようにno treatment群の再感染率がわずかに8.6%であるのに比べて, OSVでは37.3%, ZNVでは45%と高く, 有意差は付かなかったもののOSV+CAM, ZNV+CAMでそれぞれ17.6%と22.2%にまで回復した。

### CAMの粘膜免疫増強作用機序

抗ウイルス剤である限り避けることのできないウイルス抗原量の低下とそれに伴う獲得免疫の低下を, CAMが補って粘膜免疫レベルを回復させることが明らかになったが, その作用機所の解析が進んでいる。CAMの粘膜免疫増強作用はマウスにおいても良く再現され, OSVによって低下したsIgA抗体価のレベルを薬剤無投与レベルにまで回復させた<sup>9)</sup>。CAMは服用後, 気道に高濃度分布するため, マウスの鼻腔リンパ球と胸縦隔リンパ球を採取して, 抗体産生関連遺伝子の解析を実施した。特に今回の解析では, 粘膜の局所免疫系においてインフルエンザウイル

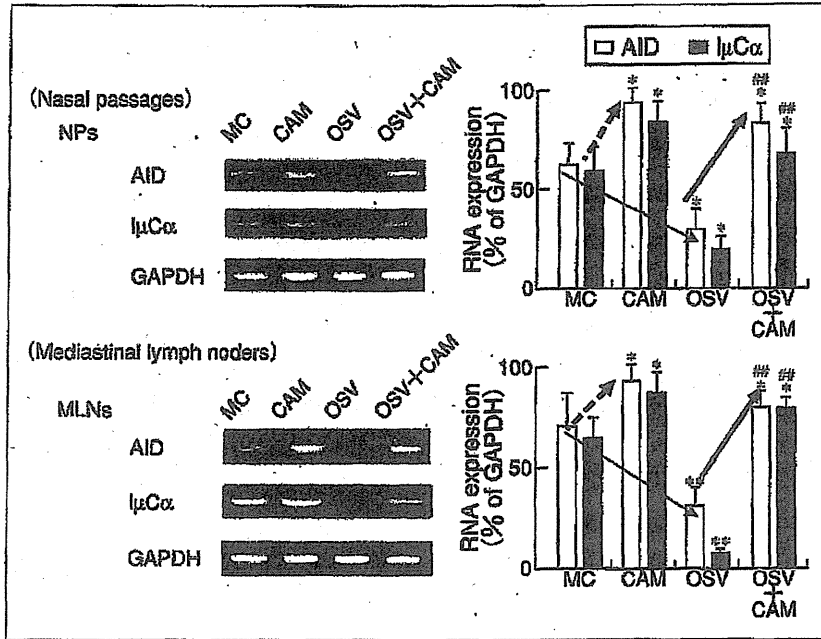


図6 鼻腔粘膜リンパ節, 胸縦隔リンパ節におけるAIDとIμCαの発現  
 インフルエンザウイルス感染後6日目の鼻腔粘膜リンパ節, 胸縦隔リンパ節を採取して, 抗体産生クラススイッチ遺伝子組み換えのキーエンザイムAIDと, 組み替え体IμCαの発現をRT-PCRで検討した。OSV; タミフル, CAM; クラリスロマイシン, GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, RT-PCR; reverse transcription polymerase chain reaction, \* P<0.05 (MC投与群と比較して有意差を認めた), \*\* P<0.01 (MC投与群と比較して有意差を認めた), # P<0.01 (OSV投与群と比較して有意差を認めた)

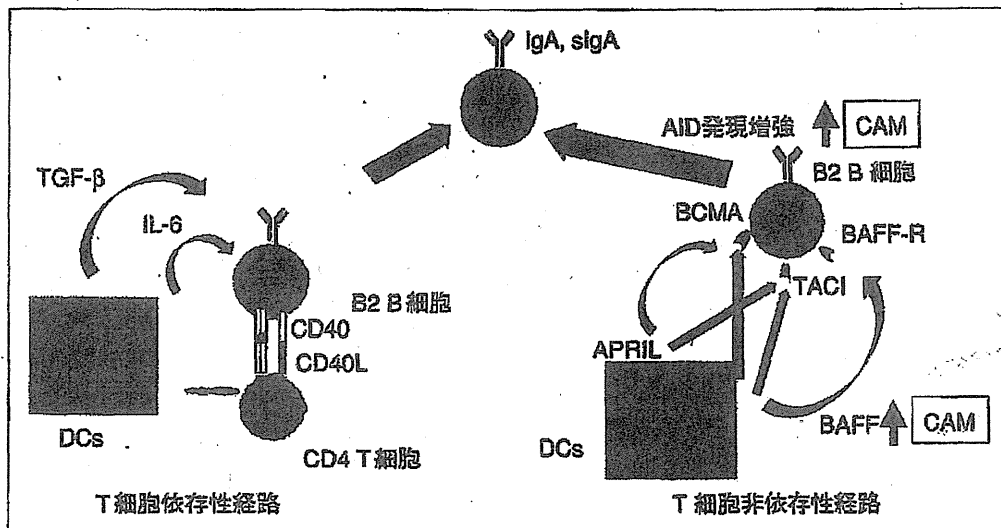


図7 粘膜におけるB細胞からのIgA抗体の産生機序とCAMの作用点  
 粘膜の抗体産生系におけるT細胞依存性経路とT細胞非依存性経路を示す。今回の実験では, T細胞非依存性経路におけるCAMの効果を検証した結果, BAFFの発現増加によってB細胞でのAIDの発現が著明に増加してIgA抗体の産生増加が引き起こされたことが判明した。抗原提示樹状細胞; DC, B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family; BAFF, the proliferation-inducing ligand: APRIL, BAFF receptor; BAFF-R, transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor; TACI), B-cell maturation antigen; BCMA, activation-induced cytidine deaminase; AIDを示す。

ス抗原を取り込んだ抗原提示樹状細胞(DC)から、粘膜局所のB細胞へのシグナル伝達(T細胞非依存性IgAクラススイッチ経路)に焦点を絞った解析を実施した。その結果、図5に示すように、気道粘膜のDCが認識した抗原情報をB細胞に伝えるB-cell activating factor of the TNF family (BAFF)の増加が観察された<sup>9)</sup>。DCから分泌されるproliferation-inducing ligand (APRIL)には変化がなく、図には示していないがこれらの因子をB細胞で認識するtransmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor (TACI), B-cell maturation antigen (BCMA), BAFF-receptor (BAFF-R)への影響は認められなかった。BAFFの発現増強を受けたB細胞では、図6に示すように、IgAクラススイッチに必要なactivation induced cytidine deaminase (AID)の発現量の著明な増加を招き、クラススイッチに伴う $I\mu C\alpha$ の増加が確認された。以上の結果を図7にまとめる。CAMはT細胞非依存性抗体産生経路の中でBAFFの発現を増加させ、B細胞のIgAクラススイッチに必要なAIDの発現量を増強していた。上記のCAMの作用は、免疫メモリーの弱い小児のインフルエンザ感染で著明で、CAMが免疫メモリーの増強を介して図4に示した再感染率の低下に貢献していることが考えられる。

### おわりに

新型インフルエンザ対策として、世界各国は抗ウイルス薬の備蓄を行っているが、抗ウイルス薬はウイルス抗原の低下を招き、獲得免疫能の低下をさけることはできない。この傾向は粘膜免疫誘導で特に著しい。このような抗ウイルス剤の宿命ともいえる弱点を、CAMが補うことが明らかになった。CAMは抗体産生系においてBAFFの発現量の増加を導いて、シグナルの下流に位置するAIDの発現量を著明に増加させて抗体産生を増加させていた。マクロライドは抗菌作用以外に抗炎症作用などさまざまな作用が報告されてきたが、作用標的分子が同定された例は少ない。CAMの作用標的分子として、免疫増強アジュバント作用関連分子のBAFFが明確になったことから、今後さらにCAMの幅広い医療応用に発展すると期待される。

### 文 献

- 1) Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 2005 ; 11 : 45.
- 2) 木戸 博, 水野 大, 木本貴士. 粘膜免疫機能とインフルエンザ感染. *小児内科* 2010 ; 42 : 1541.
- 3) Fujimoto C, Takeda N, Matsunaga A, et al. Induction and maintenance of anti-influenza antigen-specific nasal secretory IgA levels and serum IgG levels after influenza infection in adults. *Influenza Other Respi Viruses* 2012 ; 6 : 396.
- 4) Ide K, Mizuno D, Ichinomiya T, et al. Oral administration of clarithromycin (CAM), a macrolide antibiotic, stimulates mucosal immunoresponses and elevates IgA levels in the airway of mice after infection with influenza A virus. *World Conf. on Magic Bullets* 2004. p. A-64.
- 5) Kido H, Okumura Y, Yamada H, et al. Proteases essential for human influenza virus entry into cells and their inhibitors as potential therapeutic agents. *Curr Pharma Des* 2007 ; 13 : 405.
- 6) Sawabuchi T, Suzuki S, Iwase K, et al. Boost of mucosal secretory immunoglobulin A response by Clarithromycin in pediatric influenza. *Respirology* 2009 ; 14 : 1173.
- 7) Shinahara W, Takahashi E, Sawabuchi T, et al. Immunomodulator clarithromycin enhances mucosal and systemic immune responses and reduces re-infection rate in pediatric patients with influenza treated with antiviral neuraminidase inhibitors : A retrospective analysis. *PLoS One*. In press 2013 .
- 8) Takahashi E, Kataoka K, Fujii K, et al. Attenuation of inducible respiratory immune responses by oseltamivir treatment in mice infected with influenza A virus. *Microbes Infect* 2010 ; 12 : 778.
- 9) Takahashi E, Kataoka K, Indalao IL, et al. Oral clarithromycin enhances airway immunoglobulin A (IgA) immunity through induction of IgA class switching recombination and B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family molecule on mucosal dendritic cells in mice infected with influenza A virus. *J Virol* 2012 ; 86 : 10924.

ウイルス性かぜ症候群での抗菌薬の使用法—②

# ウイルス性気道感染症における 粘膜免疫の重要性

## —インフルエンザ感染における粘膜免疫増強抗菌薬の併用効果

木戸 博\*・高橋悦久・塚 聡子

徳島大学 疾患薬素学研究センター \*特任教授

### Summary

ウイルス性気道感染症の感染感受性を決めている因子が気道粘膜の分泌型 IgA と細胞性免疫であるが、これらを誘導する安全で有効な粘膜ワクチンはいまだ実用化されていない。このような状況下において、気道の粘膜免疫を活性化して分泌型 IgA 抗体産生量を増加させ、抗インフルエンザ薬の副反応を補うマクロライド系抗菌薬が明らかになり、その作用機序が明らかになった。

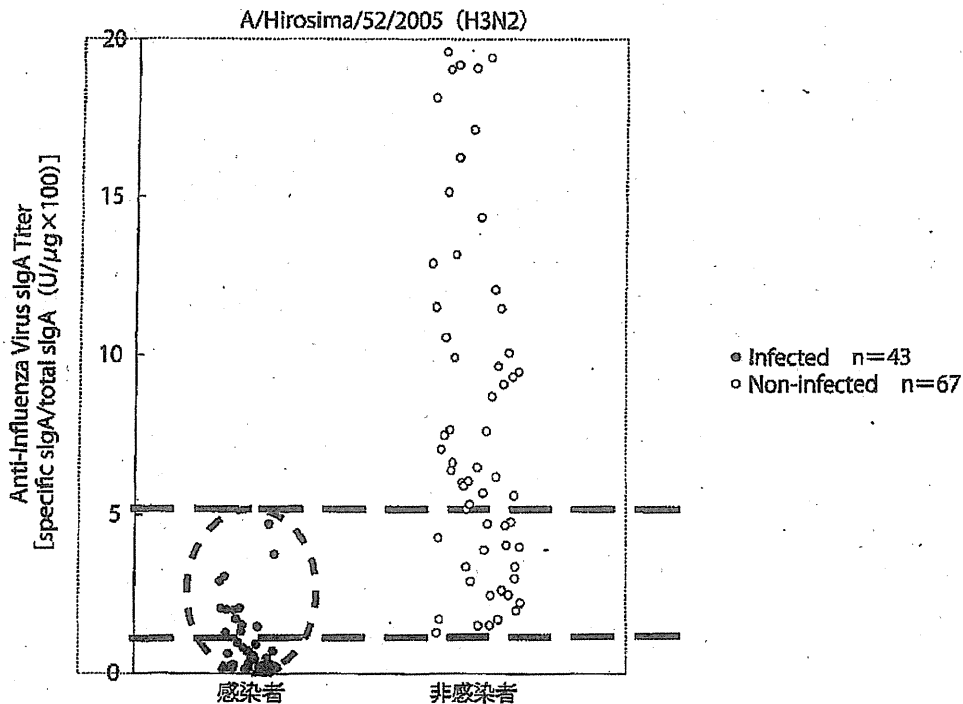
### Key words

粘膜免疫, sIgA, CAM, インフルエンザ感染

### はじめに

2009H1N1 パンデミックインフルエンザの出現や、H7N9 高病原性鳥インフルエンザの中国での発症報告があるように、世界はより効果的なインフルエンザ感染予防法と治療法の開発を強く望んでいる。感染予防の因子としてウイルスを侵入門戸で防ぐ分泌型 IgA (secretory IgA : sIgA) の誘導が重要であるが、現行の皮下注射ワクチンには sIgA の誘導効果はなく、生ワクチン以外の安全で有効な経鼻接種インフルエンザワクチン開発が待たれている。このような状況の中で、インフルエンザ感染時の獲得免疫、中でも感染予防

に關与する sIgA 産生を増強するマクロライド系抗菌薬が注目されている。我が国ではインフルエンザ感染と診断された場合、抗ウイルス薬を処方することが多いが、抗ウイルス薬はウイルス増殖サイクルを抑制して症状を改善するが、同時にウイルス抗原量の減少による不十分な獲得免疫をもたらす。本稿では、気道感染における粘膜免疫の重要性と粘膜免疫を増強するマクロライド系抗菌薬の効果とその作用機序について、最近の知見を紹介する。



**図1 インフルエンザ感染前の鼻汁中の抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価と感染感受性**  
 2005/2006年, 2006/2007年のインフルエンザシーズンの10月にボランティアから鼻汁を採取し, 抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価を測定した。翌年5月に, インフルエンザに感染したかを調査して相互の関係を調査した結果を示す。縦軸は, 鼻汁中の全 sIgA 中に占める抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価を示す。  
 (文献2より)

### ① 気道のウイルス感染感受性を決定している粘膜免疫

病原体の侵入門戸で感染防御の主体を担う気道粘膜の sIgA 抗体は, 交叉免疫性が強く主要な初感染防御機能を担っている<sup>1)</sup>。図1に, ヒト鼻汁中の抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価とインフルエンザの感染感受性との関係を示す<sup>2)</sup>。2005/2006年と2006/2007年のインフルエンザワクチン接種時に鼻汁を採取して, 抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価を測定した結果である。翌年の5月にインフルエンザ感染の有無を調査した結果と合わせて表示した。なお, 迅速診断キットで陽性と判定された人を感染者としてエントリーしており, 擬陽性者と未実施者は非感染者と

して扱った。縦軸は鼻汁の全 IgA 中に占める抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価量を表示している。インフルエンザに感染したヒトは, 例外なく鼻汁中の抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価が低く, 非感染者は抗体価が高く, 鼻汁の抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価レベルが感染感受性を決定していると言っても過言ではない。なお感染リスクを示す基準値は, インフルエンザの亜型によって異なり, H1N1 亜型の方が H3N2 亜型に比べて基準値が高い傾向にある。以上の結果は, インフルエンザ感染者を対象とした retrospective study<sup>3)</sup>で, 感染者であっても約70%がインフルエンザシーズン前にワクチンを接種しており, 鼻汁中の抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価は例外なく低値を示していたことから確認

された。

## ② 粘膜免疫賦活化作用を示す マクロライド系抗菌薬

マクロライド系抗菌薬の中で、鼻汁中の抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価と血中の抗インフルエンザ特異 IgG 抗体価の増加を示す薬剤としてクラリスロマイシン (CAM; クラリス®, クラリシッド®) を 2004 年に報告した<sup>4)</sup>。上記の CAM の免疫賦活化作用を見出したことから<sup>4,5)</sup>、オセルタミビル (OSV; タミフル®), ザナミビル (ZNV; リレンザ®) 等の抗インフルエンザ薬との併用効果が検討された<sup>6,7)</sup>。OSV, ZNV は、ウイルスの増殖サイクルを効果的に抑制して症状を改善するが、体内ウイルス抗原量を減少させるため、獲得免疫誘導が不十分になり<sup>6,8)</sup>、特にその影響は、抗原メモリーの少ない小児、乳幼児で強い。

2005/2006 年, 2006/2007 年のインフルエンザシーズンに実施した OSV と CAM の併用効果の調査<sup>6)</sup>の結果において、OSV 投与例では鼻汁中の sIgA 抗体価は投与 5 日目でもわずかに 1.2 倍しか増加しないが、CAM の併用で 9.8 倍に増加することが確かめられた。さらに患者数を増加させて、鼻汁中の sIgA 抗体価以外に血中 IgG 抗体価への CAM の影響調査、さらに経口薬の OSV 以外に吸入薬の ZNV についての調査が 2008/2009 年シーズンに、そして翌年度の再感染率調査が行われた。表 1 に鼻汁中の抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価誘導の結果を示す。抗ウイルス薬の服用のない群 (no treatment) では、感染 5 日後に鼻汁の抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価は有意に増加したが、OSV,

ZNV 服用者では有意な抗体価の増加は見られなかった<sup>7)</sup>。感染 5 日後の抗体価が  $\geq 1$  倍以上増加している人数 (%) では、no treatment 群が 61.5~69.2% を示したのに対して、OSV では 42.9%, ZNV では 37.0~48.1% と有意に低値を示し、獲得免疫の不全状態を示した。一方、抗体価が  $\geq 1$  倍以上増加している人数は、OSV+CAM 投与群で 65.0~70.0% と有意に増加し、ZNV+CAM で 50.0~60.0% と増大が見られた。これらの変化は、翌年の再感染率を示している図 2 の結果に良く反映されている。さらに抗インフルエンザ特異 IgG 抗体価の変動結果を表 2 に示す<sup>7)</sup>。No treatment 群では、血中の抗インフルエンザ特異 IgG 抗体価は感染 5 日後に有意な増加が観察された。一方、OSV, ZNV 投薬群では、H1N1 抗体で有意な増加は見られず、H3N2 抗体では有意な増加が認められ、鼻汁の sIgA 抗体誘導への影響よりもマイルドであることが判明した。抗体価が  $\geq 1$  倍以上増加している人数 (%) 解析では、抗 H1N1 抗体価において no treatment の 73.5% に比べて ZNV 投薬群で 40.9% と有意に低く、ZNV+CAM 群で 100% と有意な増加を示した。抗 H3N2 抗体価においても同様な傾向が認められた。以上の結果は、抗ウイルス薬の使用によって鼻汁の sIgA と血液の IgG の両方で獲得免疫が不十分になる事が OSV と ZNV で認められ、この獲得免疫不全は、CAM の併用で回復する事が確認された。

なお、粘膜アジュバント効果をヒトで評価する場合、抗体価が  $\geq 4$  倍以上増加した割合 (%) で評価することが多いが、表 1, 2 に示すように  $\geq 4$  倍以上増加した人数は、sIgA と IgG の両方で各群間の有意差は見られなかった。このことは、CAM はマイルドな粘膜免疫増強



表1 インフルエンザ罹患患者への投薬の違いによる鼻汁中の抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価誘導

Treatment	n	sIgA concentration				Percentage of patients with $\geq 1$ -fold and $\geq 4$ -fold increases in anti-IAV-specific sIgA concentration during treatment			
		Anti-IAV-specific sIgA (U/mg protein)							
		H1N1		H3N2		H1N1		H3N2	
		Before	After	Before	After	$\geq 1$ -fold (After/before)	$\geq 4$ -fold (After/before)	$\geq 1$ -fold (After/before)	$\geq 4$ -fold (After/before)
No treatment	65	2.3 (0.5-5.7)	3.1 (1.2-7.8)*	2.2 (0.6-3.8)	3.1 (1.0-6.7) <sup>†</sup>	61.5	26.2	69.2	15.4
OSV	70	1.3 (0.6-5.9)	1.2 (0.4-5.0)	1.0 (0.4-2.8)	1.1 (0.5-3.1)	42.9 <sup>§</sup>	18.6	42.9 <sup>‡</sup>	14.3
OSV+CAM	20	0.9 (0.3-1.4)	1.9 (0.3-12.3)*	0.7 (0.2-1.7)	1.5 (0.3-7.6) <sup>†</sup>	65.0 <sup>§</sup>	30.0	70.0 <sup>‡</sup>	20.0
ZNV	27	3.8 (1.7-12.3)	4.5 (0.5-15.8)	2.0 (1.4-3.8)	2.6 (0.5-7.8)	37.0 <sup>§</sup>	18.5	48.1 <sup>§</sup>	11.1
ZNV+CAM	10	2.0 (1.6-7.1)	6.3 (2.2-19.5)	1.7 (1.2-2.4)	4.3 (1.8-11.6)	50.0	30.0	60.0	30.0

2008/2009年シーズンのインフルエンザ罹患小児に、非投薬 (no treatment), OSV 投薬, OSV+CAM 投薬, ZNV 投薬, ZNV+CAM 投薬が行われた。投薬前と5日間の投薬後の鼻汁中の抗インフルエンザ特異 sIgA 抗体価を median (interquartile range) で示した。

\*P<0.05, <sup>†</sup>P<0.01 (初診時と比べて5日後の値が有意に増加)

<sup>§</sup>P<0.05, <sup>‡</sup>P<0.01 (no treatment に比較して有意差を認めた)

<sup>§</sup>P<0.06 to 0.09, <sup>†</sup>P<0.05 (OSV に比較して有意差を認めた)

(文献7より)

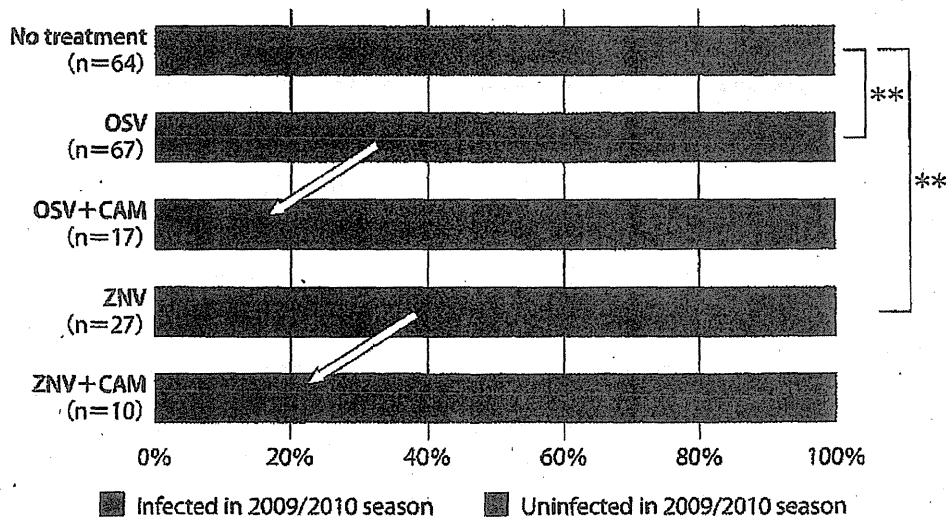


図2 インフルエンザに罹患した患者の翌シーズンにおけるインフルエンザ再罹患状況

2008/2009年シーズンのインフルエンザ罹患小児に、非投薬 (no treatment), OSV 投薬, OSV+CAM 投薬, ZNV 投薬, ZNV+CAM 投薬が行われた。これらの患児の翌2009/2010年シーズンにおけるインフルエンザの罹患率を調査した。

(文献7より)

表2 インフルエンザ罹患者への投薬の違いによる血中の抗インフルエンザ特異 IgG 抗体価誘導

Treatment	n	IgG concentration				Percentage of patients with $\geq 1$ -fold and $\geq 4$ -fold increases in anti-IAV-specific IgG concentration during treatment			
		Anti-IAV-specific IgG (U/ml)							
		H1N1		H3N2		H1N1		H3N2	
		Before	After	Before	After	$\geq 1$ -fold (After/before)	$\geq 4$ -fold (After/before)	$\geq 1$ -fold (After/before)	$\geq 4$ -fold (After/before)
No treatment	49	0.5 (0.2-0.9)	0.8 (0.4-1.5) <sup>‡</sup>	0.4 (0.2-0.7)	0.8 (0.3-1.4) <sup>‡</sup>	73.5	30.6	73.5	34.7
OSV	52	0.2 (0.03-0.7)	0.5 (0.06-1.0)	0.2 (0.04-0.5)	0.4 (0.06-1.1) <sup>‡</sup>	63.5	21.2	75.0	32.7
OSV+CAM	14	0.5 (0.3-0.6)	0.9 (0.5-1.4) <sup>‡</sup>	0.5 (0.2-0.5)	0.6 (0.4-1.2) <sup>*</sup>	78.6	21.4	85.7	14.3
ZNV	22	0.6 (0.3-1.1)	0.6 (0.4-1.1)	0.3 (0.2-0.5)	0.5 (0.4-0.9) <sup>‡</sup>	40.9 <sup>*</sup>	13.6	68.2	18.2
ZNV+CAM	8	0.3 (0.2-0.6)	0.9 (0.2-1.8) <sup>*</sup>	0.4 (0.2-0.7)	1.4 (0.4-2.6) <sup>*</sup>	100.0 <sup>†</sup>	25.0	100.0 <sup>‡</sup>	50.0

2008/2009年シーズンのインフルエンザ罹患小児に、非投薬 (no treatment), OSV投薬, OSV+CAM投薬, ZNV投薬, ZNV+CAM投薬が行われた。投薬前と5日間の投薬後の血中の抗インフルエンザ特異 IgG 抗体価を median (interquartile range) で示した。

<sup>\*</sup>P<0.05, <sup>‡</sup>P<0.01 (初診時と比べて5日後の値が有意に増加)

<sup>\*</sup>P<0.01 (no treatment に比較して有意差を認めた)

<sup>†</sup>P<0.06 to 0.09, <sup>‡</sup>P<0.01 (ZNV に比較して有意差を認めた)

(文献7より)

物質として作用していることを示している。OSV, ZNV の獲得免疫抑制効果は、次年度のインフルエンザ再感染率に有意差をもって表れた。図2に示すように no treatment 群の再感染率がわずかに 8.6%であるのに比して、OSV では 37.3%, ZNV では 45%と高く、有意差は付かなかったものの OSV+CAM, ZNV+CAM でそれぞれ 17.6%と 22.2%にまで回復した。

### 3 CAM の粘膜免疫増強作用機序

抗ウイルス剤である限り避けることのできないウイルス抗原量の低下とそれに伴う獲得免疫の低下を、CAM が補って免疫レベルを

回復させることが明らかになったが、その作用機序の解析が行われた。CAM の粘膜免疫増強作用はマウスにおいても良く再現され、OSV によって低下した sIgA 抗体価のレベルを薬剤無投与レベルにまで回復させた<sup>9)</sup>。CAM は服用後、気道に高濃度分布するため、マウスの鼻腔リンパ球と胸縦隔リンパ球を採取して、抗体産生関連遺伝子の解析を実施した。特に今回の解析では、粘膜の局所免疫系においてインフルエンザウイルス抗原を取り込んだ抗原提示樹状細胞 (DC) から、粘膜局所の B 細胞へのシグナル伝達 (T 細胞非依存性 IgA クラススイッチ経路) に焦点を絞った解析を実施した。その結果、図3に示すように、気道粘膜の DC が認識した抗原情報を B

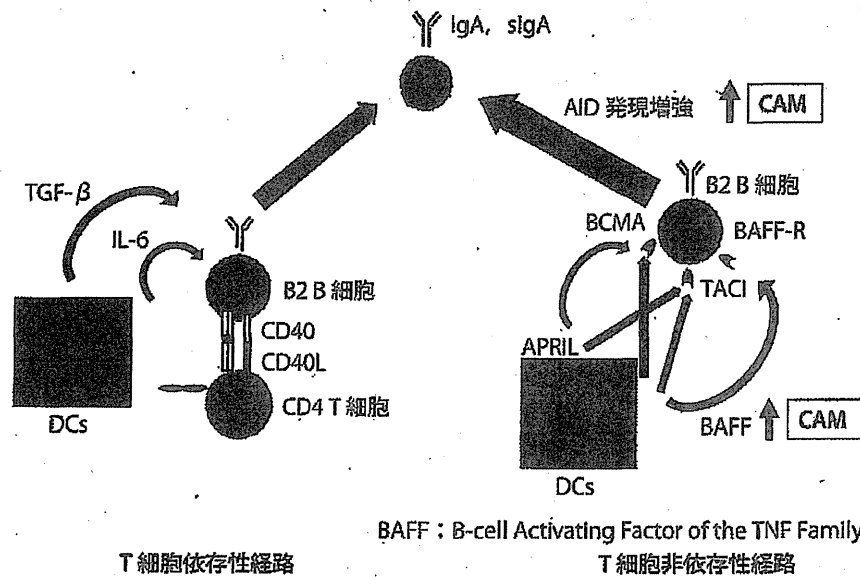


図3 粘膜におけるB細胞からのIgA抗体の産生機序とCAMの作用点

粘膜の抗体産生系におけるT細胞依存性経路とT細胞非依存性経路を示す。抗原提示樹状細胞(DC)、B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family(BAFF)、proliferation-inducing ligand(APRIL)、BAFF-receptor(BAFF-R)、transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor(TACI)、B-cell maturation antigen(BCMA)、activation-induced cytidine deaminase(AID)を示す。今回の実験では、T細胞非依存性経路におけるCAMの効果を検証した結果、BAFFの発現増加によってB細胞でのAIDの発現が著明に増加して、IgA抗体の産生増加が引き起こされたことが判明した。

(文献9より)

細胞に伝える B-cell activating factor of the TNF family (BAFF) の CAM による増加が観察された<sup>9)</sup>。DC から分泌される proliferation-inducing ligand (APRIL) には変化がなく、図には示していないがこれらの因子を B 細胞で認識する transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor (TACI)、B-cell maturation antigen (BCMA)、BAFF-receptor (BAFF-R) への影響は認められなかった。BAFF の発現増加を受けた B 細胞では、図に示すように、IgA クラススイッチに必要な activation-induced cytidine deaminase (AID) の発現量の著明な増加を招き、クラススイッチに伴う  $I\mu C\alpha$  の増加が確認された。以上から、CAM は T 細胞非依存性抗体産生経路の中で BAFF の発現を

増加させ、B細胞のIgAクラススイッチに必要なAIDの発現量を増強してIgA産生を増加させていることが判明した。

#### おわりに

インフルエンザの治療薬としての抗ウイルス薬は、ウイルス抗原の低下を招き獲得免疫の低下を引き起こす。このような抗ウイルス薬の宿命とも言える弱点を、CAMが補うことが明らかになった。CAMは抗体産生系においてBAFFの発現量の増加を導いて、シグナルの下流に位置するAIDの発現量を著明に増加させて抗体産生を増加した。マクロライド系抗菌薬は抗菌作用以外に抗炎症作用等の様々な作用が報告されてきたが、作用標的

分子が同定された例は少ない。CAMの作用標的分子として、免疫増強アジュバント作用関連分子のBAFFが明確になったことから、

今後さらにCAMの幅広い医療応用に発展すると期待される。

#### 文献

- 1) Holmgren J, Czerkinsky C : Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11 (Suppl) : S45-53, 2005
- 2) 木戸 博, 水野 大, 木本貴士 : 粘膜免疫機能とインフルエンザ感染. *小児内科* 42 : 1541-1545, 2010
- 3) Fujimoto C, Takeda N, Matsunaga A et al : Induction and maintenance of anti-influenza antigen-specific nasal secretory IgA levels and serum IgG levels after influenza infection in adults. *Influenza Other Respi Viruses* 6 : 396-403, 2012
- 4) Ide K, Mizuno D, Ichinomiya T et al : Oral administration of clarithromycin (CAM), a macrolide antibiotic, stimulates mucosal immunoresponses and elevates IgA levels in the airway of mice after infection with influenza A virus. *World Conf. on Magic Bullets*, pA-64, 2004
- 5) Kido H, Okumura Y, Yamada H et al : Proteases essential for human influenza virus entry into cells and their inhibitors as potential therapeutic agents. *Curr Pharm Des* 13 : 405-414, 2007
- 6) Sawabuchi T, Suzuki S, Iwase K et al : Boost of mucosal secretory immunoglobulin A response by clarithromycin in pediatric influenza. *Respirology* 14 : 1173-1179, 2009
- 7) Shinahara W, Takahashi E, Sawabuchi T et al : Immunomodulator clarithromycin enhances mucosal and systemic immune responses and reduces re-infection rate in pediatric patients with influenza treated with antiviral neuraminidase inhibitors : A retrospective analysis. *PLoS One* 8 : e70060, 2013
- 8) Takahashi E, Kataoka K, Fujii K et al : Attenuation of inducible respiratory immune responses by oseltamivir treatment in mice infected with influenza A virus. *Microbes Infect* 12 : 778-783, 2010
- 9) Takahashi E, Kataoka K, Indalao IL et al : Oral clarithromycin enhances airway immunoglobulin A (IgA) immunity through induction of IgA class switching recombination and B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family molecule on mucosal dendritic cells in mice infected with influenza A virus. *J Virol* 86 : 10924-10934, 2012