

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24590786

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスの不顕性感染メカニズムの解明

研究課題名(英文) Clarification of the mechanism of asymptomatic infection with influenza virus

研究代表者

岩附 研子 (IWATSUKI-HORIMOTO, KIYOKO)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：20376619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスに対する免疫記憶機構を解明するため、同一集団を対象とし、継続的にpdmH1N1亜型のウイルスに対する抗体価の変動を調べたところ、常に高い抗体価を保持しているヒトとワクチンを複数回接種しても全く抗体価が上がらないヒトが認められた。そこで、ワクチン接種前後の抗体価を比較したところ、ワクチン接種は影響していないことが分かった。さらに、様々なH3N2亜型のウイルスに対する抗体価を解析したところ、年代別に抗体価に差が認められ、最初に感染したと思われる株に対する抗体価を維持しており、ワクチンの刺激により抗体価を維持しているのではなく、別の要因が関係していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of immunological memory against influenza virus infection, we investigated the change in antibody titers against pdmH1N1 viruses in the cohort regularly. We found that while some individuals always retained high antibody titers, some had no antibody against pdmH1N1 viruses even though they had received the vaccine several times. Therefore, we compared antibody titers before and after vaccination, and found that titer levels were not affected. Furthermore, analysis of the antibody titers against various H3N2 virus strains revealed a difference in the titer levels by age groups; interestingly, the titer level was sustained against the strain that had apparently caused the initial infection. Our findings suggest that vaccine stimulation does not maintain the antibody titer level, and instead other factors are involved.

研究分野：医歯薬学

キーワード：インフルエンザ 中和抗体価 不顕性感染

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは、毎年のように冬になると猛威をふるう。高齢者では致死率も高く、また乳幼児ではインフルエンザ脳症を起こすこともあり、公衆衛生上非常に重要な疾患である。2009年には、新型インフルエンザによるパンデミックが発生し、瞬く間に世界各地に広がった。幸い、日本ではそれほど多くの死亡者は出なかったが、パンデミック発生により、社会に混乱が起こったことは記憶に新しい。

これまでに、我々は1918年以降に生まれた日本人はパンデミックウイルスに対する中和抗体をほとんど持っていないことを明らかにした (Itoh et al., Nature 460:1021-1025, 2009)。そのため、1918年以降に生まれた90歳以下の人たちは、かなりの確率で罹患・発症すると思われた。ところが、実際の流行の中心は小児であり、成人の発症率は低かった。そこで、我々はパンデミック発生中の2009年11月から2010年3月にかけて、健康なボランティア(6歳から65歳)から採血を行い、パンデミックインフルエンザの発症と中和抗体価の関係を解析した。その結果、中和抗体価を保有しておらず、かつ罹患もしていない成人が多数存在することが分かった。さらに、成人では不顕性感染が多いことも明らかにした (Iwatsuki-Horimoto et al., CVI 18:860-86, 2011)。

## 2. 研究の目的

インフルエンザは、毎年流行を繰り返していること、また多くの成人は、インフルエンザ感染やワクチン接種を複数回経験しているため、ほぼすべての成人が季節性のインフルエンザに対する免疫記憶を持ち合わせていると考えられる。そのため、季節性のインフルエンザに対する中和抗体価を解析しても、ワクチン接種によるものか、採血時の2週間前に感染したのか、1年前に感染したのかを判断することは困難であった。しかし、2009年のパンデミックウイルスは、これまでにない「新型」であったため、90歳以下の人たちは反応する抗体を持っておらず、その中和抗体価を測定することにより、感染の有無をダイレクトに知ることが可能となった。さらに、パンデミックインフルエンザワクチンの臨床試験の成績より、健康な成人では、1回のワクチン接種で十分な抗体が得られることが明らかとなった。つまり、過去の別のウイルスによる感染や、季節性インフルエンザのワクチン接種により獲得された免疫機構が、パンデミックインフルエンザのワクチンにブースター効果を与える基礎免疫として働きうるということを示している。これは、当初予想していなかった現象である。しかし、どのような免疫記憶がその効果を発揮しているのかは不明である。また、成人での低い発症率や、不顕性感染が多かったこと、感染

しても軽い症状ですんだ人が多かったことなども、何らかの免疫記憶が存在していたことを示唆している。本研究では、成人の間に存在していると思われる免疫機構を明らかにすることにより、不顕性感染及び感染防御のメカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 2009年9月、2010年3月、2011年11月、2014年4月、2015年4月に同一集団を対象としてボランティアから採血した血液を用いて、pdmH1N1亜型のインフルエンザウイルスに対する抗体価を調べた。

(2) ワクチン接種による抗体変動を調べるため、インフルエンザワクチンを接種する方を対象にボランティアを募集し、ワクチン接種前と接種1ヵ月後に採血をさせていただき、ワクチン株4株(pdmH1N1亜型、H3N2亜型、B型ビクトリア系統、B型山形系統)に対する抗体価を調べた。

(3) 本研究期間中の2013年春に、中国でH7N9亜型のインフルエンザウイルスがヒトに感染したことから、本ウイルスが日本に入ってきた場合の被害の程度を予測するため、東京大学医科学研究所の血清バンク(医科研血清バンク)から、2012年に採取した20歳から63歳のボランティア200人分の血清の分与を受け、日本人が本ウイルスに対する抗体をどの程度保有しているのかを解析した。

## 4. 研究成果

(1) 2009年9月、2010年3月、2011年11月、2014年4月、2015年4月に、同一集団から採取した血液を用いて、pdmH1N1亜型のインフルエンザウイルスに対する抗体価を調べた結果、インフルエンザ発症の有無や、ワクチン接種の有無に関係なく、常に高い抗体価を保持しているグループと、ワクチンを複数回接種しているにもかかわらず、全く抗体価が上がらないグループが存在することが明らかとなった。pdmH1N1に対する抗体価が上がらない原因の一つとして、2009年のパンデミック発生前に流行していた季節性H1N1ウイルスに対する抗体が影響している可能性が考えられたため、2009年に分離された季節性H1N1ウイルス、A/Kawasaki/UTK-4/09に対する抗体価を調べたところ、pdmH1N1ウイルスに対する抗体価で分けられたグループとは全く相関がみられなかった。これらの結果から、pdmH1N1ウイルスに対する抗体価の上昇の有無には、季節性H1N1ウイルスに対する抗体価の上昇は影響していないことが明らかとなった。

(2) 次に、高い抗体価の維持とワクチン接種の関係を調べるため、ワクチン接種ボランティアからワクチン接種ボランティアのワクチン接種前と接種1ヵ月後のワクチン株4

株に対する抗体価を解析した。その結果、いずれの亜型でもワクチン接種による抗体価の変動はあまり認められず、抗体価の高い人はワクチン接種前から高い抗体価を維持していることが明らかとなった。そこで、ワクチン接種ボランティアの血液を用いて、1968年、1979年、1992年、2002年、2012年、2014年の各年に分離された H3N2 亜型のウイルスに対する抗体価を解析したところ、年代別に抗体価に差が認められ、一番最初に感染したと思われるウイルス株に対する抗体価が高く、抗原原罪が影響していると考えられた。また、いずれの株に対しても、ワクチン接種による抗体価の変動はほとんど認められなかった。したがって、ワクチンの刺激により抗体価を維持しているのではなく、別の要因が関係していることが明らかとなった。

(3) 2013年春、中国で H7N9 亜型のインフルエンザウイルスがヒトに感染したことから、本ウイルスが日本に入ってきた場合の被害の程度を予測するため、日本人が本ウイルスに対する抗体をどの程度保有しているのかを解析した。医科研血清バンクから、2012年に採血した 20 歳から 63 歳のボランティア 200 人分の血清の分与を受け、中国の患者から分離した H7N9 ウイルス (A/Anhui/1/2013 (H7N9)) に対する中和抗体価を測定した。その結果、200 人全員の抗体価は 4 以下で、H7N9 ウイルスと反応する抗体を全く持っていないことが明らかとなった。2009 年の H1N1 亜型のウイルスによるパンデミック発生時は、1918 年以前に生まれたヒトがパンデミックウイルスに対する抗体を持っていた。また、1918 年以降に生まれた成人も、不顕性感染が多く認められた。しかし、今回の H7N9 亜型はこれまでヒトの間で流行したことの無い亜型であり、誰も抗体を持っていないことが明らかになったため、本ウイルスが日本に入ってきた場合、重症化する危険性があることが分かった。本研究で得られた結果は、中国で発生した H7N9 ウイルスの性状を解析した論文の成果の一部として公表された (Nature 26:551-555, 2013)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

Nidom CA, Yamada S, Nidom RV, Rahmawati K, Alamudi MY, Kholik, Indrasari S, Hayati RS, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Genetic characterization of H5N1 influenza viruses isolated from chickens in Indonesia in 2010. *Virus Genes*. 44:459-465, 2012.

Kikuchi T, Iwatsuki-Horimoto K, Adachi E, Koga M, Nakamura H, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Miura T, Fujii T, Kawaoka Y, Iwamoto A. Improved neutralizing antibody response in the second

season after a single dose of pandemic (H1N1) 2009 influenza vaccine in HIV-1-positive adults. *Vaccine*, 30:3819-3823, 2012.

Katsura H, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Watanabe S, Sakabe S, Hatta Y, Murakami S, Shimojima M, Horimoto T, Kawaoka Y. A replication-incompetent virus possessing an uncleavable hemagglutinin as an influenza vaccine. *Vaccine*, 30:6027-6033, 2012.

Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Le MQ, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Differences in cytokine production in human macrophages and in virulence in mice are attributable to the acidic polymerase protein of highly pathogenic influenza A virus subtype H5N1. *The Journal of Infectious Diseases*, 207:262-271, 2013 Jan.

Van Kerkhove MD, Hirve S, Koukonari A, Mounts AW; H1N1pdm serology working group (Iwatsuki-Horimoto K in 56 collaborators). Estimating age-specific cumulative incidence for the 2009 influenza pandemic: a meta-analysis of A(H1N1)pdm09 serological studies from 19 countries. *Influenza Other Respir Viruses*. 7:872-886, 2013 Jan. doi: 10.1111/irv.12074.

Uraki R, Kiso M, Shinya K, Goto H, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Takahashi K, Daniels R, Hungnes O, Watanabe T, Kawaoka Y. Virulence determinants of pandemic A(H1N1)2009 virus in a mouse model. *Journal of Virology* 87:2226-2233, 2013 Feb. doi: 10.1128/JVI.01565-12.

Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shiraikura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 26:551-555, 2013. doi: 10.1038/nature12392.

Kobayashi H, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Uraki R, Ichiko R, Takimoto T, Kawaoka Y. A replication-incompetent influenza virus bearing the HN glycoprotein of human parainfluenza virus as a bivalent vaccine. *Vaccine* 31:6239-6246, 2013. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.10.029.

Uraki R, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Takashita E, Ozawa M, Kawaoka Y. A novel bivalent vaccine based on a PB2-knockout influenza virus protects mice from pandemic H1N1 and highly pathogenic H5N1 virus challenges. *J Virol* 87:7874-7881, 2013. doi: 10.1128/JVI.00076-13.

Horimoto T, Gen F, Murakami S, Iwatsuki-Horimoto K, Kato K, Akashi H, Hisasue M, Sakaguchi M, Kawaoka Y, Maeda K. Serological evidence of infection of dogs with human influenza virus in Japan. *Veterinary Record* 174:96, 2014. doi:10.1136/vr.101929

Uraki R, Das SC, Hatta M, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Ozawa M, Coban C, Ishii KJ, Kawaoka Y. Hemozoin as a novel adjuvant for inactivated whole virion influenza vaccine. *Vaccine* 32:5295-300, 2014.

Katsura H, Piao Z, Iwatsuki-Horimoto K, Akeda Y, Watanabe S, Horimoto T, Oishi K, Kawaoka Y. A bivalent vaccine based on a replication-incompetent influenza virus protects against *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus infection. *J Virol* 88:13410-13417, 2014.

Horimoto T, Gen F, Murakami S, Iwatsuki-Horimoto K, Kato K, Hisasue M, Sakaguchi M, Nidom CA, Kawaoka Y. Cats as a potential source of emerging influenza virus infections. *Virol Sin* 30:221-223, 2015.

Okazaki T, Higuchi M, Takeda K, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Miyagishi M, Yanai H, Kato A, Yoneyama M, Fujita T, Taniguchi T, Kawaoka Y, Ichijo H, Gotoh Y. The ASK family kinases differentially mediate induction of type I interferon and apoptosis during the antiviral response. *Sci Signal* 8:ra78, 2015.

Uraki R, Piao Z, Akeda Y, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Ozawa M, Oishi K, Kawaoka Y. A Bivalent Vaccine Based on a PB2-Knockout Influenza Virus Protects Mice From Secondary Pneumococcal Pneumonia. *J Infect Dis* 212:1939-1948, 2015. doi: 10.1093/infdis/jiv341.

Li C, Hatta M, Burke DF, Ping J, Zhang Y, Ozawa M, Taft AS, Das SC, Hanson AP, Song J, Imai M, Wilker PR, Watanabe T, Watanabe S, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Russell CA, James SL, Skepner E, Maher EA, Neumann G, Klimov AI, Kelso A, McCauley J, Wang D, Shu Y, Odagiri T, Tashiro M, Xu X, Wentworth DE, Katz JM, Cox NJ, Smith DJ, Kawaoka Y. Selection of antigenically advanced variants of seasonal influenza viruses. *Nat Microbiol* 23:16058, 2016. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.58.

Arafa A-S, Yamada S, Imai M, Watanabe T, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Imamura T, Nakajima N, Takahashi K, Zhao D, Oishi K, Yasuhara A, Macken C, Zhong G, Hanson A, Fan S, Ping J, Hatta M, Lopes T, Suzuki Y, El-Husseiny M, Selim A, Hagag N, Soliman M, Neumann G, Hasegawa H, Kawaoka Y. Risk assessment of recent Egyptian H5N1 influenza viruses. *Sci Rep* 6:38388, 2016. doi: 10.1038/srep38388.

Iwatsuki-Horimoto K, Nakajima N, Shibata M, Takahashi K, Sato Y, Kiso M, Yamayoshi S, Ito M, Enya S, Otake M, Kangawa A, Lopes T, Ito H, Hasegawa H, Kawaoka Y. Microminipigs as

an animal model for influenza A virus infection. *J Virol* 91:e01716-16, 2017. doi: 10.1128/JVI.01716-16

〔学会発表〕(計 11 件)

Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Tamura D, Kiso M, Kawakami E, Hatakeyama S, Ebihara Y, Koibuchi T, Fujii T, Takahashi K, Shimojima M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Sakabe S, Iwasa A, Takahashi K, Ishii T, Gorai T, Tsuji K, Iwamoto A & Kawaoka Y. Seroprevalence of pandemic 2009 (H1N1) influenza A virus among schoolchildren and their parents in Tokyo, Japan. Workshop of Tropical Infectious Diseases, Surabaya, 2012, May.

Iwatsuki-Horimoto K, Nidom CA, Qurnianingsih E, Koesoemoprodjo W, Nidom RV, Setyarini T, Sudarsono RRE, Alamudi MY, Rahmawati K, Hidayat B, Yamada S, Kiso M, Kawaoka Y. Sero-prevalence of influenza viruses in Indonesia. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013. Tokyo, 2013 Jan.

Yamada S, Nidom CA, Nidom RV, Rahmawati K, Alamudi MY, Kholik, Iswahyudi, Sudarsono RPE, Indrasari S, Hayati RS, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Genetic characterization of H5N1 influenza viruses isolated in Indonesia from 2010-2012. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013. Tokyo, 2013 Jan.

Kobayashi H, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Uraki R, Ichiko Y, Takimoto T, Kawaoka Y. A replication-incompetent influenza virus bearing the HN glycoprotein of human parainfluenza virus as a bivalent vaccine. XV International Conference on Negative Strand Viruses. Granada, 2013 June.

Iwatsuki-Horimoto K. Sero-prevalence of influenza virus in Indonesia. Pelaksanaan Seminar Proteomik Vaksin Flu Burung (Seminar of Bird Flu Vaccine and Proteomics). Surabaya, 2013 Nov.

岩附研子、中島典子、柴田昌利、高橋健太、佐藤由子、木曾真紀、山吉誠也、伊藤睦美、塩谷聡子、大竹正剛、寒川彰久、伊東祐孝、長谷川秀樹、河岡義裕「マイクロミニピッグのインフルエンザ感染モデル動物としての有用性」第 158 回日本獣医学会学術集会、十和田、2015 年 9 月

岩附研子、朴貞玉、明田幸宏、小澤真、Sylvia Victor、桂廣亮、浦木隆太、小林博文、大石和徳、河岡義裕「A replication-incompetent PB2-knockout influenza A virus as a platform for a bivalent vaccine」第 89 回日本細菌学会総会、大阪、2016 年 3 月

渡辺登喜子、岩附研子、木曾真紀、伊藤睦美、河岡義裕「サルモデルにおけるインフ

ルエンザウイルスのエアロゾル感染系の確立」第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月

岩附研子、中島典子、長谷川秀樹、河岡義裕「近年のヒト分離 H3N2 インフルエンザウイルスに対するハムスターの感受性」第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月

木曾真紀、山吉誠也、岩附研子、浦木隆太、伊藤睦美、川上英良、富田有里子、福山聡、渡辺登喜子、伊藤靖、小笠原一誠、河岡義裕「薬剤耐性 H7N9 インフルエンザウイルスの性状解析」第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月

Iwatsuki-Horimoto K. Development of a novel influenza rapid diagnostic kit specific for the H7 subtype. The Sixth China-Japan Bilateral Symposium on All Influenza Viruses. 2017, March

〔図書〕(計 1 件)

岩附研子「不顕性感染者発生は？」: インフルエンザの最新知識 Q&A2012 ~ パンデミック H1N12009 の終焉を迎えて ~ 鈴木宏、渡辺彰、編、p88-90, 医薬ジャーナル社、2012 年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

岩附 研子 ( IWATSUKI-HORIMOTO KIYOKO )  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号 : 20376619