

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870758

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスの簡便な細胞性免疫評価法の確立

研究課題名(英文) Development of a convenient assay for cell-mediated immunity to the influenza virus.

研究代表者

大谷 成人(Otani, Naruhito)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10561772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザワクチンの効果を免疫学的な評価を抗体価で行うことは出来ないと考えられている。今回我々は新しい細胞性免疫の測定法を用い、成人23名に対し、ワクチン接種前後においてワクチン抗原に反応して産生されるIFN- γ の値の変化をみた。本研究期間にインフルエンザ(H3N2)を発症したsubjectが4名あり、これらの4名はワクチン接種によりIFN- γ の産生が増加しなかった。これらの結果より、インフルエンザワクチン接種前後において、ワクチン抗原に反応して産生されるIFN- γ の値の変化を測定することにより、インフルエンザワクチンの有効性を評価できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is considered that immunological evaluation of the effect of influenza vaccines cannot be performed based on the antibody titer. In this study, using a new cell-mediated immunity measurement method, we investigated changes in the level of IFN- γ produced after vaccination in response to the vaccine antigen in 23 adults. Four subjects were infected with influenza A(H3N2) during the study period, and vaccination did not increase IFN- γ in these 4 subjects. It was suggested that the efficacy of influenza vaccines can be evaluated by measuring changes in the level of IFN- γ produced in response to influenza vaccine.

研究分野：感染症疫学

キーワード：インフルエンザ ワクチン 細胞性免疫 抗体

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染やワクチンの評価に関しては、通常は液性免疫、つまり抗体による評価が行われている。一般的に細胞内に寄生する結核菌やいくつかのウイルスでは液性免疫では評価できないものがあり、それらは細胞性免疫による評価が重要と考えられているが、臨床現場で実際に活用されているのは現在のところ結核菌についてのクオンティフェロンや T-spot、水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) に用いられている皮内テストなどしかない。インフルエンザワクチンは、不活化ワクチンであるが液性免疫だけでなく細胞性免疫も獲得していると考えられるが、ワクチンの免疫学的評価は抗体のみで評価されている。しかし、インフルエンザウイルスに対する感染防御に必要な免疫を有しているかどうかを抗体価だけで評価することは出来ない。近年、インフルエンザに対する免疫学的評価としては細胞性免疫と液性免疫の両方を評価することが良いとの報告があり、細胞性免疫を簡便に評価する方法を確立する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルスに対する細胞性免疫の測定方法を開発し、インフルエンザワクチンの接種に伴う免疫学的効果、インフルエンザ患者における免疫の推移と病態との関連を調べ、インフルエンザに対する免疫学的評価方法の確立を目的とする。研究代表者らは、VZV に対する細胞性免疫を測定する方法を開発し (Otani N, et al. J Immunol Methods, 2009)、感染の有無や発症時の診断に有効に用いることが可能であることを証明した (Otani N, et al. J Immunol Methods, 2012)。

本研究において我々が開発する方法は、特殊な設備を必要とせず、簡便に細胞性免疫測定することが出来、現在用いられている抗体価以外の方法で、インフルエンザの免疫学的評価を行うことが期待される。

3. 研究の方法

(a) Interferon- release assay による細胞性免疫の測定方法の確立

これまでウイルスの細胞性免疫を測定する場合、採血した検体を単核球に分離し、細胞数を調整し抗原を反応させる方法が行われてきた。我々が varicella zoster virus (VZV) を用いて開発した Interferon-release assay (IRA) は、全血とウイルス抗原を直接反応させることにより、特異的 T 細胞から産生される IFN- を測定する方法を用いている。この方法は、細胞の分離などを行う必要がなく一般の医療施設でも施行

可能であると考えられる。今回、この IRA を用いてインフルエンザウイルスの細胞性免疫の測定方法を確立した。

【測定方法】

- (1) 測定系の確立のため、本研究への協力に同意していただいたインフルエンザワクチン接種予定の基礎疾患のない本学職員より約 3~5ml 採血。
- (2) 96 well マイクロプレートで 1well あたり、全血 100 μ l とインフルエンザ抗原 100 μ l (10 μ gHA/ml) を混合、培養。
- (3) 全血とインフルエンザ抗原を反応させた場合、最も多く特異的 T 細胞から IFN- が産生される抗原量や培養時間の設定。
- (4) 上清 100 μ l を採取し、ELISA 法にて IFN- 量を測定。

全血(100 μ l) + インフルエンザ抗原(100 μ l)

96 well マイクロプレートにて培養
上澄み採取
IFN- (ELISA) 測定

但し、通常のインフルエンザワクチンには、インフルエンザ抗原は、A (H1N1)、A (H3N2)、B の 3 種類抗原が含まれているため、別々に反応させ、それぞれの細胞性免疫の系を確立した。

(b) インフルエンザワクチン接種前後のインフルエンザウイルスに対する細胞性免疫の推移の検討

本研究では、インフルエンザワクチン接種予定の人に対して、研究目的を十分説明し、同意を得た 23 名からワクチン接種前、接種 2 週後、8 週後に採血を行った。細胞性免疫は (a) にて確立した方法を用いた。

(c) ワクチン接種による抗体価の評価

ワクチン接種前後に行った採血から得た血清より赤血球凝集抑制試験 (hemagglutination inhibition test : HI 法) にて抗体を測定した。

(d) インフルエンザ感染の診断

HI 抗体もしくはクリニック受診時に施行された迅速診断キットにより診断した。

4. 研究成果

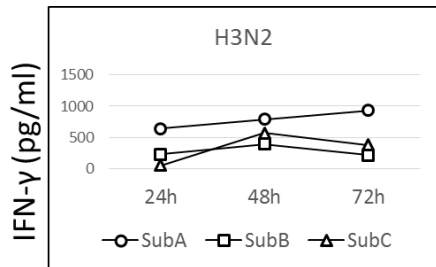
(a) Interferon- release assay (IRA) による細胞性免疫の測定方法の確立

我々は培養時間を決定するために、インフルエンザ抗原と全血を反応させ 2 4 時間、4

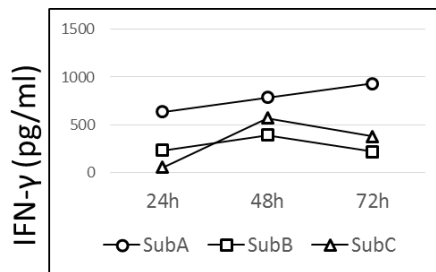
8時間、72時間で産生されるIFN- γ の産生量を見た。

図1に示したよう48時間後まではIFN- γ の産生量は増加するが、72時間経過するとIFN- γ の産生量の低下が観察された。これらの結果から、培養時間は48時間とした。

H1N1



H3N2



B

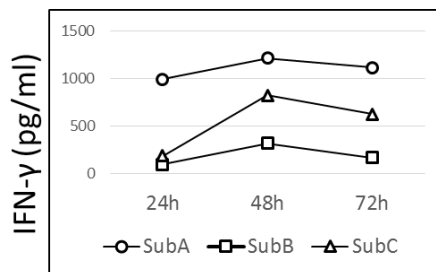


図1 .培養時間におけるIFN- γ 産生量の違い

(b) インフルエンザワクチン接種前後のインフルエンザウイルスに対する細胞性免疫の推移の検討

今回の研究に登録した23人のうち4人がH3N2型のインフルエンザに感染した。この4人は、IIV3を接種することによりH3N2抗原に対するIFN- γ の産生量がワクチンの接種前後で1.5倍未満であったため、1.5倍以上の上昇した場合を陽性とした。我々が開発したIRAは細胞数の調整を行わずに、全血で抗原を反応させている。そのため、ワクチン接種前の値を基準値として、ワクチン接種2週間後、8週間後においてIFNの産生量が上昇するかどうかを見た。

ワクチン接種2週後にIFN- γ 産生量が有意(≥ 1.5 倍)に上昇した割合

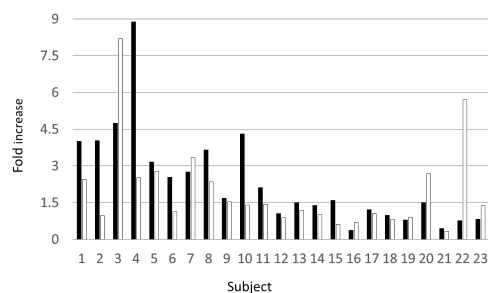
H1N1: 65% (15/23), H3N2: 57% (13/23), B: 57% (13/23) (図.2)。

ワクチン接種8週後にIFN- γ 産生量が有意(≥ 1.5 倍)に上昇した割合

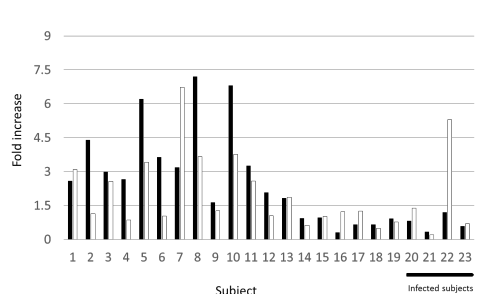
H1N1: 39% (9/23), H3N2: 39% (9/23), B: 26% (6/23) (図.2)。

この結果、IFN- γ の産生量の増加率は、ワクチン接種2週間の方が、高かった。

H1N1



H3N2



B

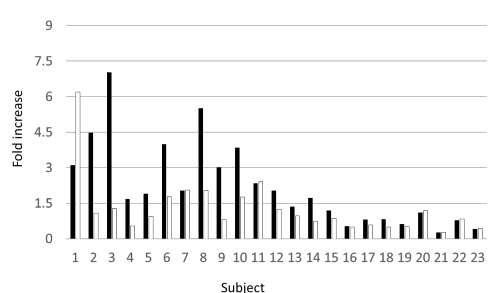


図2 .ワクチン接種前を基準とした場合における、接種2週間後、接種8週間後におけるIFN- γ 産生量の変化

インフルエンザウイルスの細胞性免疫を評価する方法に関する論文もいくつか認め、GranzymeBの産生量の変化を測定するものやElispot法を用いたものなどがある。今後、これらとの比較検討が必要と考えられる。

(c) ワクチン接種による抗体価の変化

(1)液性免疫 (HI 法) ≥40 倍の割合

ワクチン接種前は H1N1: 35%(8/23), H3N2: 100%(23/23), B: 39%(9/23)、2 週間後 H1N1: 48%(12/23), H3N2: 100%(23/23), B: 57%(13/23)、8 週後 H1N1: 52%(12/23)、H3N2:100%(23/23), B: 39%(9/23)であった。

(2)GMT 値 (GMT 比)

ワクチン接種前は H1N1 : 19.4, H3N2:66.8, B:23.2, 2 週間後 H1N1:29.6 (1.5), H3N2:137.6 (2.1), B:35.5 (1.5), 8 週後 H1N1:41.1 (2.1), H3N2:191.7 (2.9), B:29.6 (1.3)であった。

EMA の guidance ではインフルエンザワクチンの免疫原性の評価基準が HI titer が 40 以上となっているが、HI 抗体価でインフルエンザに感染するかどうかを評価することは出来ない。今回の研究においても、インフルエンザに感染した 4 名は、H3N2 に対する HI titer は 40 倍以上であった。また、A(H1N1) \ A(H3N2) ではワクチン接種 2 週間後、8 週間後と経過するにしたがって、GMT 値は上昇したが、B では 2 週間後の GMT は上昇したが、8 週間後では低下を認めた。

(d) インフルエンザの診断

今回の研究期間中にインフルエンザ H3N2 に感染した人が 4 名 (subject: 20, 21, 22, 23) いた。Subject 22 はワクチン接種後約 1 か月、Subject: 21, 22, 23 は、ワクチン接種後約 3 か月後に、発熱など認め、近所のクリニックを受診し、迅速診断キットでインフルエンザ A 陽性と診断された。また、Subject 20 はワクチン接種後約 4 か月の時に、発熱を認めたが、病院受診しなかった。しかし、Subject 20 は、H3N2 抗体価の 4 倍以上の上昇 (40 640) を認めており、インフルエンザによる発熱であったと考えられた。

インフルエンザに感染した 4 名における細胞性免疫は、ワクチン接種により H3N2 抗原に対する IFN- γ 産生の増加を認めなかった。この結果より、ワクチン抗原に対して IFN- γ の産生が増加の有無を見ることにより、ワクチンによる免疫原性を評価出来る可能性が示唆された。

IRA の反応において 1 回のワクチンの接種で有意に上昇しない場合、ワクチンを 2 回接種することにより、陽性反応を示す可能性が考えられる。もし、2 回接種で反応を認めるなら、ワクチン接種を 1 回接種と 2 回接種の指標に用いられる可能性がある。

今後、ワクチン接種による免疫学的評価を IRA で行うにあたって、インフルエンザ感染

者の免疫学的反応との比較検討やワクチンの 1 回接種で不十分な反応を示す症例での 2 回接種での検討が必要であると考えられる。

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 3 件)

Otani N, Shima M, Ueda T, Kaoru I, Nakajima K, Takesue Y, Okuno T. Evaluation of influenza vaccine-immunogenicity in cell-mediated immunity. Cell Immunol. 2016; 310:165-169. (査読有) DOI:10.1016/j.cellimm.2016.09.005.

Otani N, Tanaka M, Maeda K, Gomi Y, Nakajima K, Tanimura S, Takesue Y, Shima M, Okuno T. Varicella zoster virus antibody detection: a comparison of four commonly used techniques. J Infect Chemother. 2016; 22:225-8.(査読有) doi: 10.1016/j.jiac.2015.12.018.

Otani N, Shima M, Nakajima K, Takesue Y, Okuno T. Development of a simplified and convenient assay for cell-mediated immunity to the mumps virus. J Immunol Methods. 2014; 411:50-4. (査読有) doi: 10.1016/j.jim.2014.06.006.

[学会発表](計 4 件)

大谷成人、島正之、余田佳子、奥田浩人、植田貴史、一木薫、中嶋一彦、竹末芳生、奥野壽臣: 2014/2015 シーズンにおけるインフルエンザワクチンの免疫学的評価。第 87 回日本衛生学会学術集会、2017.3.26-28. フェニックス・シーガイア・リゾート (宮崎県、宮崎市)

大谷成人、島正之、余田佳子、奥田浩人、前田一洋、田中美幸、五味康行、中嶋一彦、竹末芳生、奥野壽臣: 水痘・帯状疱疹ウイルスの抗体検査: EIA 法、gpELISA 法、FAMA 法、IAHA 法の比較。第 86 回日本衛生学会学術集会、2016.5.11-13. 旭川市民文化会館 (北海道、旭川市)

大谷成人、島正之、中嶋一彦、竹末芳生、奥野壽臣: 水痘・帯状疱疹ウイルスの抗体検査法の比較。第 89 回日本感染症学会総会・学術講演会、2015.4.16-17. 国立京都国際会館 (京都府、京都市)

大谷成人、島正之、中嶋一彦、竹末芳生、奥野壽臣: ムンプスウイルスに対する細胞性

免疫測定法の確立。第 88 回日本感染症学会
総会・学術講演会、2014.6.18-20. ヒルトン
福岡シーホーク（福岡県、福岡市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 成人 (Naruhito Otani)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10561772