

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10458

研究課題名（和文）インフルエンザワクチンの細胞性免疫への影響の解明

研究課題名（英文）Effects of influenza vaccines on cell-mediated immunity.

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：IFN gamma は、細胞性免疫の重要な因子と考えられている。しかし、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）に重要な役割を果たすGranzyme Bとの関連については、ほとんど知られていない。本研究では、2017/18年に不活化インフルエンザワクチン接種前後の健康成人32名の血液を採取し、細胞性免疫（IFN gamma とGranzyme B）と液性免疫（赤血球凝集抑制試験）を測定した。IFN gamma とGranzyme Bの値は、ワクチン接種前後で有意に相関していた。さらに、ワクチン接種後のfold increaseも有意に相関していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザの免疫にはCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞の両方が重要と考えられ、CD8陽性T細胞のうちCD8陽性cytotoxic T lymphocytes (CTLs)の活性化に重要な蛋白質の1つがgranzyme Bであることが知られており、ワクチン接種とGranzyme Bの関係についての研究もおこなわれている。しかし、IFN gammaとGranzyme Bの関連性を見た研究はあまりない。そのため、本研究において不活化インフルエンザワクチンの細胞性免疫への影響を評価するためワクチン接種前後のIFN gammaとgranzyme bを測定しこれらの関連性をみることは重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：IFN gamma is considered a key moderator of cell-mediated immunity. However, little is known about its association with granzyme B, which plays an important role in the effector function of cytotoxic T lymphocytes (CTLs). In the present study, we collected blood samples from 32 healthy adults before and after vaccination with inactivated influenza vaccine in 2017/18 to measure the levels of IFN gamma and granzyme B, which play a role in cell-mediated immunity, and hemagglutination inhibition (HAI) antibody, which plays a role in humoral immunity. The levels of IFN gamma and granzyme B were significantly correlated both before and after vaccination. Furthermore, the post-vaccine fold increases in Interferon gamma and granzyme B levels were significantly correlated.

研究分野：感染症の疫学

キーワード：インフルエンザワクチン 細胞性免疫 抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザの感染防御能として細胞性免疫も重要な役割を果たしており、液性免疫のみの評価では十分でないと考えられている。細胞性免疫において重要な構成要素である $TH_1$ 細胞により産生される最も重要なサイトカインは $IFN-\gamma$ である。そのため、これまで我々はインフルエンザワクチン接種による細胞性免疫の影響を $IFN-\gamma$ により評価してきた。インフルエンザの免疫には $CD4$ 陽性T細胞と $CD8$ 陽性T細胞の両方が重要と考えられ、 $IFN-\gamma$ は $CD8+T$ 細胞の誘導を助けるとされとされている。 $CD8$ 陽性T細胞のうち $CD8+cytotoxic T lymphocytes$  (CTLs)は、ウイルスのクリアランスと感染からの回復と関連しているとされ、CTLsの活性化に重要なたんぱく質の一つがgranzyme Bであることが知られており、ワクチン接種とグランザイムBの関係についての研究も行われている。

## 2. 研究の目的

$IFN-\gamma$ とグランザイムBの関連性を見た研究はあまりない。本研究の目的は、不活化インフルエンザワクチンの細胞性免疫への影響を評価するためワクチン接種前後の $IFN-\gamma$ とgranzyme bを測定し関連性をみることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象者とワクチン

32人のhealthy adults (age 33-59 years、男14人、女18人)を今回の研究で登録し、2017年9月から12月までの期間に、インフルエンザワクチンの接種を行った。インフルエンザワクチンは、Inactivated quadrivalent influenza vaccine :IIV4 (BIKEN, OSAKA, JAPAN, LOT HA173B)を用い、1回0.5mlを皮下注射した。採血は、インフルエンザワクチン接種前、インフルエンザワクチン接種後2週間と5か月の3回行い、細胞性免疫( $IFN-\gamma$ 、granzyme B)と液性免疫(Hemagglutination Inhibition (HAI) Test)の測定を行った。この研究は兵庫医科大学の倫理審査委員会の承認を得ている。

### (2) 抗原

抗原は2017/2018 seasonに用いられたIIV4に含まれている4種類のワクチン抗原(A/H1N1, A/H3N2, B/Victori系, B/Yamagata系)を用いた。これらのワクチン抗原は、BIKENから提供された。

### (3) 細胞性免疫の測定 ( $IFN-\gamma$ 、Granzyme b)

$IFN-\gamma$ の測定は先行研究(Otani et al., 2016)で行った方法を用い測定した。Granzyme bの測定は、 $IFN-\gamma$ の方法を応用し抗原量や培養時間など調整し測定した。

### (4) 液性免疫 (HAI) の測定

HAI抗体はワクチン株を用いて測定した。各検体をreceptor-destroying enzymeで処理した後、1:10に希釈し、血清中のHAI抗体量をan influenza virus HAI test (Denka Seiken Co., Tokyo, Japan)を用いて測定した。hemagglutinationを完全に阻止した検体の最終希釈倍数をHAI抗体価とした。HAI抗体価が1:10以上を陽性と判定し、1:10未満を陰性と判定した。HAI抗体価の測定は、commercially laboratory (SRL, Inc. Tokyo)にて行った。

## 4. 研究成果

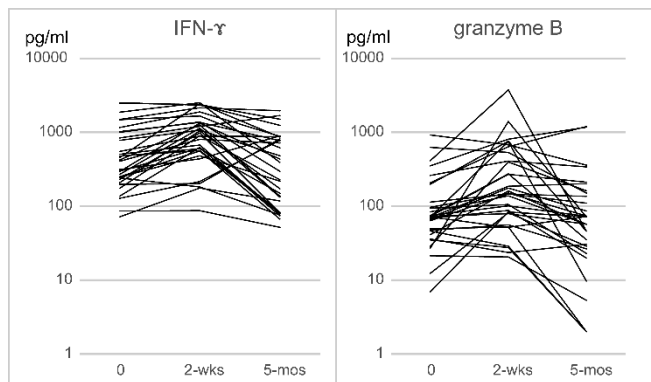
### (1) インフルエンザワクチン接種後の細胞性免疫 ( $IFN-\gamma$ 、グランザイムB) の変化

ワクチン接種前、接種後2週、接種後5か月の $IFN-\gamma$ 、Granzyme Bの変化を4種の抗原{A(H1N1), A(H3N2), B(Yamagata lineage), B(Victoria lineage)}それぞれについてFigure.1(a,b,c,d)に示した。半数以上のSubjectにおいてワクチン接種後2wに $IFN-\gamma$ とグランザイムbが上昇し、接種後5か月には低下を認めているのが分かる。次に、Table 1にてGMTやfold increaseを用い定量的に評価した。 $IFN-\gamma$ 、Granzyme Bともにワクチン接種2週後のGMTは上昇を認めているが、5か月後には低下していた。

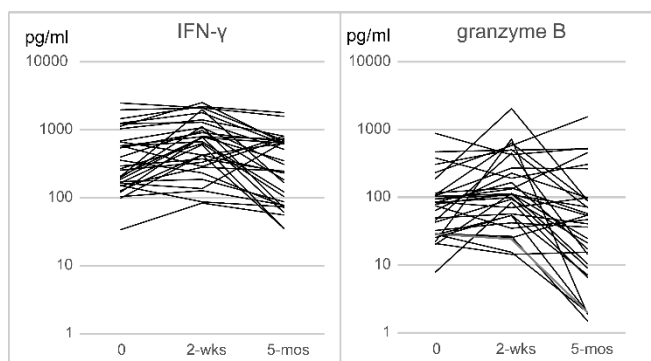
次に、Fold increaseで検討した場合、ワクチン接種2-3週間では $IFN-\gamma$ 、グランザイムbともに50%前後が1.5倍以上の上昇を認めた。しかし、ワクチン接種5か月後に上昇を認めたsubjectは半数以下に減少した。

ワクチン抗原と全血を反応させ24時間後の上澄みを採集し、グランザイムb (day 1)の測定もおこなったが、ワクチン接種前の値が検出感度であったsubjectがそれぞれ、H1N1: 4/32, H3N2: 8/32, Yamagata lineage: 5/32, Victoria lineage: 5/32 認めた (data not shown)。そのため、

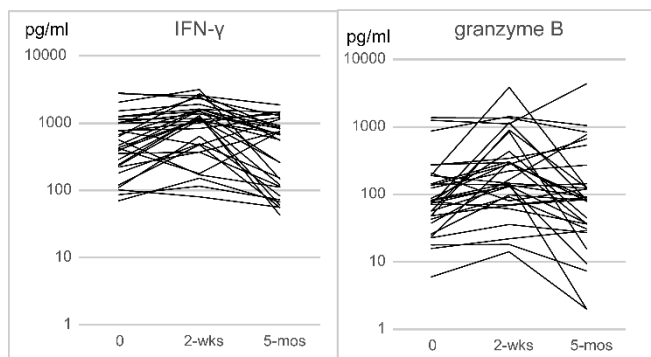
全血と抗原を反応させる方法でグランザイム b の産生を評価するには 24 時間の培養では不十分であると考えられた。



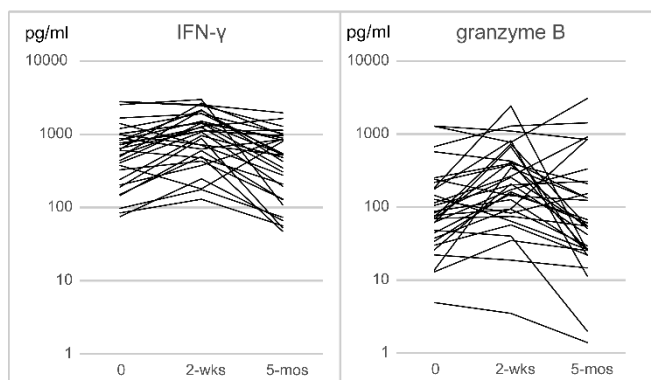
(a) A(H1N1)



(b) A(H3N2)



(c) B(Yamagata lineage)



(d) B(Victoria lineage)

**Figure 1.** Cell-mediated immunity (IFN- $\gamma$  and granzyme B levels) to the four vaccine antigens: (a) A(H1N1); (b) A(H3N2); (c) B(Yamagata lineage); and (d) B(Victoria lineage). IFN- $\gamma$  and granzyme B levels were measured at pre-vaccination (0), two weeks post-vaccination (2-wks), and five months post-vaccination (5-mos).

## (2) IFN- とグランザイム B の関係

インフルエンザワクチンの抗原 4 種類について、IFN- (day2)とグランザイム b ( day2) の関係について、ワクチン接種前の値、ワクチン接種後の値についてそれぞれスピアマンの相関係数を用いて計算を行った (Table2)。4 種類すべて抗原においてワクチン接種前後に相関を認めた。ワクチン接種前からワクチン接種後への Fold increase についても同様に計算を行いいずれも相関を認めた。これらの結果は IFN- とグランザイム B はインフルエンザワクチン接種により同じように反応することを示す。

## (3) インフルエンザワクチン接種後の抗体の変化

EMA のガイダンスでは、18 - 60 歳未満におけるワクチン評価の criteria は、ワクチン接種前後の HI 抗体価で評価し、次の 3 項目のうち、最低 1 項目以上は基準を満たすことが必要と定められている。接種後 HAI 抗体価 40 倍以上の者の割合 :70%以上 HAI 抗体価が接種前に < 10 倍かつ接種後 40 倍以上」または「HAI 抗体価の変化率が 4 倍以上」の者の割合:40%以上 GMT ratio>2.5 下記に ② それぞれについて評価した。

### HAI 抗体価が 40 以上の割合

インフルエンザワクチン接種後に HAI 抗体価が 40 以上の割合が 70%以上となったのは、A(H3N2)のみであった。ただし、ワクチン接種前に 68.8% (22/32) とほぼ 70%であった。また、5-6 か月後には A(H3N2)はワクチン接種前の割合に戻った。

### ② 抗体価が接種前に <10 かつ接種後>40」または「抗体価の変化率が 4 倍以上」の割合

ワクチン接種後 2 週間において陽性化率が最も高かったのは A(H1N1)であった。しかし、割合が 40%以上を示したものはなかった。

### HI 価と中和抗体価の GMT(GMT ratio)

GMT ratio が 2.5 以上となったのは A(H1N1)のみであった。5 か月後においても GMT ratio 2.5 であった。

## 5. 結論

本研究は、細胞性免疫の指標として用いられている IFN- とグランザイム b との関係性を評価し相関関係があることを示した。インフルエンザワクチンの細胞性免疫の評価する指標として IFN- を用いることが有用であること示唆された。

## 引用文献

Otani N, Shima M, Ueda T, Ichiki K, Nakajima K, Takesue Y, Okuno T. Evaluation of influenza vaccine-immunogenicity in cell-mediated immunity. Cell Immunol. 2016 ;310:165-169.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Otani Naruhito, Shima Masayuki, Ueda Takashi, Nakajima Kazuhiko, Takesue Yoshio, Yamamoto Takuma, Okuno Toshiomi	4. 巻 11
2. 論文標題 Changes in the Epidemiology of Rubella: The Influence of Vaccine-Introducing Methods and COVID-19	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 1358 ~ 1358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines11081358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Otani Naruhito, Nakajima Kazuhiko, Ishikawa Kaori, Ichiki Kaoru, Yoda Yoshiko, Ueda Takashi, Takesue Yoshio, Yamamoto Takuma, Tanimura Susumu, Shima Masayuki, Okuno Toshiomi	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparison of the Hemagglutination Inhibition Titers against Influenza Vaccine Strains in Japan from the 2017/2018 to 2021/2022 Seasons Using a Single Set of Serum Samples	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1455 ~ 1455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14071455	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Otani Naruhito, Shima Masayuki, Yamamoto Takuma, Okuno Toshiomi.	4. 巻 14
2. 論文標題 Effect of Routine Varicella Immunization on the Epidemiology and Immunogenicity of Varicella and Shingles.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14030588	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Otani Naruhito, Nakajima Kazuhiko, Ishikawa Kaori, Ichiki Kaoru, Ueda Takashi, Takesue Yoshio, Yamamoto Takuma, Tanimura Susumu, Shima Masayuki, Okuno Toshiomi	4. 巻 13
2. 論文標題 Changes in Cell-Mediated Immunity (IFN- and Granzyme B) Following Influenza Vaccination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1137 ~ 1137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13061137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Otani Naruhito, Shima Masayuki, Tanimura Susumu, Ueda Takashi, Ichiki Kaoru, Nakajima Kazuhiko, Takesue Yoshio, Honjo Kenta, Okuno Toshiomi	4. 巻 26
2. 論文標題 Sensitivity and specificity of different antibody tests for detecting varicella-zoster virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1283 ~ 1287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2020.07.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大谷成人、奥野壽臣、植田貴史、中嶋一彦、余田佳子、蓮沼英樹、島正之
2. 発表標題 インフルエンザワクチン接種による細胞性免疫の測定と比較
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大谷成人、谷村晋、余田佳子、蓮沼英樹、島正之
2. 発表標題 水痘・帯状疱疹ウイルスの各種抗体検査法における感度・特異度の検討
3. 学会等名 第79回日本公衆衛生学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	奥野 寿臣	兵庫医科大学・医学部・非常勤講師	
	(Okuno Toshiomi)		
	(10221152)	(34519)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	島 正之  (Shima Masayuki)  (40226197)	兵庫医科大学・医学部・教授    (34519)	
研究分担者	中嶋 一彦  (Nakajima Kazuhiko)  (40340955)	兵庫医科大学・医学部・准教授    (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関