

原 著

藤本 知佐
楊河 宏章*
澤淵 貴子**
木戸 博**
武田 憲昭***

阿南医療センター耳鼻咽喉科

*徳島大学病院

総合臨床研究センター

**徳島大学先端酵素学研究所

生体防御病態代謝研究分野

***徳島大学耳鼻咽喉科学教室

日耳鼻 124: 987-997, 2021

成人のインフルエンザウイルス特異的鼻腔分泌型 IgA 抗体価と血清 IgG 抗体価の保有状況と ワクチン接種による影響

インフルエンザウイルスに対するヒトの粘膜免疫と全身免疫を検討した。155名の健常成人を対象に、鼻腔分泌液中のインフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体と血液中のインフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体の抗体価を測定したところ、鼻腔の抗体保有率は約70%で、血液中の抗体保有率はほぼ100%だった。インフルエンザワクチンが鼻腔および血液中の抗体価に及ぼす影響を調査するため、初回の検体採取直後にワクチン接種し、その1カ月後に改めて検体採取して抗体価の変動を調査したところ、インフルエンザワクチン接種1カ月後に鼻腔のインフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体価は上昇せず、血液中のインフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体価は上昇した。サブグループ解析では、血液中の抗体価が低い場合に抗体価は上昇し、高い場合は上昇せず、頭打ち現象が見られた。インフルエンザワクチンは血液中の IgG 抗体価を上昇させ重症化を防ぐ一方、鼻腔の分泌型 IgA 抗体を上昇させないため感染を防御する効果が乏しいと考えられた。また以前報告したインフルエンザ感染患者の鼻腔・血液中の抗体価と本研究の結果を比較検討したところ、健常成人の保有する抗体価は鼻腔・血液中とも低い値から高い値まで幅広く分布していたのに対し、感染患者の保有する鼻腔・血液中の抗体価は低かった。鼻腔に保有する抗体価が低い例では高い例に比べ感染のリスクが高まる可能性がある。

キーワード：インフルエンザ，インフルエンザワクチン，粘膜免疫，
鼻腔洗浄液，分泌型 IgA 抗体

はじめに

病原体の多くは粘膜を介して体内に侵入するため、生体は粘膜に感染防御を担う免疫系を備えている。これを粘膜免疫と呼び、二量体の分泌型 IgA 抗体がその中心的役割を担っている。インフルエンザウイルスは、飛沫や接触により上気道の粘膜を介して体内に侵入して感染し、咽頭痛や発熱などの症状を発症する。過去にインフルエンザウイルスに感染した個体では、鼻腔や鼻咽頭の粘液中にインフルエンザウイルスを特異的に中和する IgA 抗体を常に分泌しており、再びインフルエンザウイルスが上気道に入った時に、粘膜上の分泌型 IgA 抗体がウイルスを中和し、体内への侵入を阻止する。すなわち、粘膜免疫により獲得した病原体に対する抗原特異的分泌型 IgA 抗体は、その病原体の再感染を防御している¹⁾²⁾。

近年、粘膜免疫を応用した粘膜ワクチンの研究開発が

行われているが³⁾⁴⁾、実験動物は病原体の存在しない人工的な環境で飼育されていることから、動物実験の結果をヒトに適応できない。ヒトは生まれてからさまざまな病原体に暴露されてきた結果、粘膜免疫によりさまざまな病原体に対する抗体を既に保有していることから、粘膜ワクチンの研究開発はヒトを対象として行う必要がある。しかし、ヒトの鼻腔や鼻咽頭の分泌液を採取し、分泌液中の IgA 抗体価を測定する方法が確立されていなかったことから⁵⁾⁶⁾、ヒトの IgA 抗体価の保有状況、感染後の変化、ワクチン接種による影響が不明であった。

われわれは、安全で再現性の高い鼻腔や鼻咽頭分泌液の採取方法である Nasal Spray and Aspiration (NSA) 法を開発した⁷⁾。また、NSA 法を用いてインフルエンザに感染した患者から鼻腔洗浄液を採取し、感染後にインフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体価が上昇することを報告した⁸⁾⁹⁾。本研究では NSA 法を用いて、まず健常成



図1 Nasal Spray and Aspiration 法 (NSA 法) による鼻腔洗浄液の採取 (文献7より引用)

少量の生理食塩水を鼻腔に噴霧し (A), シリコン製の細い吸引用カテーテルを鼻孔より挿入して鼻腔分泌液を生理食塩水とともに吸引し, 連結する遠沈管に回収する (B). 小型の吸引器 (C) があればどこでも実施することができる.

人の鼻腔洗浄液中のインフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体の保有状況を調査した. 次に, 健常成人へのインフルエンザワクチンの皮下接種が, 鼻腔洗浄液中のインフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体価と血清中のインフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体価に与える影響についても検討した.

対象と方法

1. 対象と研究デザイン

2006年に徳島大学において155名の健常成人 (男性78名, 女性77名, 平均年齢24.1歳, 年齢分布19~60歳) を対象とし, 前向き観察研究を行った. 本研究は徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会にて承認を受け (承認番号463), すべての被検者から文書によるインフォームド・コンセントを取得してから実施した.

健常成人のインフルエンザウイルス特異的抗体の保有状況を調査する目的で, まずインフルエンザが流行する前の時期である11月初旬に鼻腔洗浄液と血清を同時に採取した. 次に, インフルエンザ三価ワクチン (BIKEN HA, 阪大微研製) 0.5mL を皮下接種した. 接種前に, 発熱や咽頭痛がなく無症状であることと, インフルエンザ迅速診断 (Espline Influenza A & B-N kit, フジレビオ製) が陰性でインフルエンザに感染していないことを確認した. 三価ワクチンのウイルス株は, 毎年わが国の国立感染症研究所により選定されている. 本研究を行った2006/2007年シーズンのインフルエンザ三価ワクチンは, A型株としてA/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) 亜型株とA/広島/52/2005 (H3N2) 亜型株, B型株としてB/マレーシア/2506/2004株をエーテル処理した不活化 HA ワクチン抗原から組成されており, 投与量 0.5mL 中に各 HA ワクチン抗原が 15 μ g ずつ含まれていた. 同時に, 過去12カ月間のインフルエンザワクチン接種の有無, 過去24カ月間のインフルエンザ感染の

有無, 親近者や同僚の過去12カ月間のインフルエンザ感染の有無を, すべての対象者にアンケート形式で調査した. さらに, インフルエンザワクチンの皮下接種によるインフルエンザウイルス特異的抗体価の変動を調べる目的で, 接種から1カ月後の2006年12月に全対象者から改めて鼻腔洗浄液と血清を同時に採取した. 採取前に, 11月の検体採取以降に発熱や咽頭痛がないことと, インフルエンザ迅速診断が陰性でインフルエンザに感染していないことを確認した.

2. 検体採取法

鼻腔洗浄液と血清を, ワクチン接種直前と接種後1カ月後に採取した. 鼻腔洗浄液はわれわれが開発した NSA 法を用いて採取した⁷⁾. まずディスプレイの鼻噴霧用プラスチック容器 (サンケミカル製) に生理食塩水を入れ, 被検者の鼻孔に容器を当て左右各10回ずつ押しつけて生理食塩水を鼻腔に噴霧した (図1 A). 外径 1.7mm の細いシリコン製のチューブ (MD-33105, 秋田住友ベークライト製) を鼻孔より 5cm まで挿入し, 両側から1分間ずつチューブを前後に動かしながら生理食塩水で湿った鼻腔および鼻咽腔の分泌液を吸引し, 連結する遠心分離管内に分泌液を採取した (図1 B). その後 1.0mL の生理食塩水を吸引することによりシリコンチューブ内に残存する分泌液も回収し, 鼻腔洗浄液として検体採取した. 吸引器は持ち運びが可能なブルークロス製 EP-1000 を使用した (図1 C). 遠心分離管の鼻腔洗浄液をただちに氷内で冷却し, 超音波装置を用いて1分間処理した後, 4 $^{\circ}$ C で10分間700 \times g で遠心分離し, 上清を -30 $^{\circ}$ C で凍結保管した. 次に静脈血を採取し, 遠心分離した血清 1.5mL を -30 $^{\circ}$ C で凍結保管した.

3. 抗体価測定法

鼻腔洗浄液中の total IgA 抗体とインフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体の濃度と, 血清中のインフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体の濃度を ELISA 法により測

定した。インフルエンザウイルス抗原に特異的な抗体の測定方法の詳細は以前にわれわれが報告した方法で実施した³⁾⁸⁾。すなわち、本研究で皮下接種したA/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) 亜型株、A/広島/52/2005 (H3N2) 亜型株、B/マレーシア/2506/2004株のHA抗原をELISA法の固相化抗原にして、市販のヒトIgAとヒトIgG抗体測定キット (Human IgA ELISA Kit, Human IgG ELISA Kit, Bethyl製) の二次抗体を用いて吸光度を測定した。ワクチン接種前後のペア検体を同一プレート内で測定した。さまざまなインフルエンザウイルス抗原に対する特異的IgA、IgG抗体の濃度を測定できるELISA法の標準抗体が市販されていないことから、市販のヒトIgAとヒトIgG抗体測定キットの標準抗体の検量線を用いることで吸光度から特異的抗体価を算出した。そのため本研究の特異的抗体価は相対的な値となることから、単位をユニット (unit: U) と表記した。特異的抗体価1U/mLはtotal IgAまたはtotal IgG 1 μ g/mLに相当する。ほかの報告でもわれわれと同様の方法が採用されている¹⁰⁾。

鼻腔洗浄液中のIgA抗体の濃度は、被検者の鼻汁の量や検体採取時の希釈に影響されるために検体間でのばらつきが大きく、血清中の抗体の濃度と比べて再現性が低い⁷⁾。この問題点を解決するため、鼻腔洗浄液中のtotal IgA 1 μ gあたりのインフルエンザウイルス特異的IgA抗体の量であるU/ μ g total IgAを、鼻腔のインフルエンザウイルス特異的IgA抗体価として解析した⁷⁾。total IgAの濃度はヒトIgA抗体測定キット (Human IgA ELISA Kit, Bethyl製) を用いてマニュアルに従い測定した。血清中の特異的IgG抗体の濃度は血中の蛋白濃度がほぼ一定していて再現性が高いため、血清1mLあたりのインフルエンザウイルス特異的IgG抗体の量 (U/mL) を血中のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体価として解析した。

4. 統計解析法

値は平均値 \pm 標準偏差で示した。ワクチン前後の抗体価の二群間比較は、抗体価が連続変数であることと、サンプルサイズが大きいことから、対応のあるt検定を用いた。感染者と健常成人の抗体価の比較にはウェルチのt検定を用いた。一定値以上の血清抗体価を保有する人数とワクチン接種の関連性について χ^2 二乗検定を用いた。P値が0.05以下の場合を統計学的に有意差ありとした。

結 果

1. 対象の概要

本研究の対象である健常成人155名の背景因子を表1に示す。男女比は1対1、年齢は19～60歳に分布してお

り、平均年齢は24.1歳であった。20歳台の若年成人が136名と最も多く、全体の88%を占めていた。60例 (39%) が過去12カ月間にインフルエンザワクチンを皮下接種していたが、95例 (61%) は接種をしていなかった。16例 (10%) が過去24カ月間にインフルエンザに感染していた。そのうち8例は過去12～24カ月間に、9例 (重複例1例を含む) は過去7～12カ月間に感染していたが、過去6カ月以内に感染した例はなかった。また、検体採取後のワクチン接種から接種1カ月後の検体再採取の間に感染した例もなかった。しかし、4例は2回の検体採取の期間中に近親者のインフルエンザ感染があり、濃厚接触した可能性があった。また、47例 (30%) は前年度のインフルエンザ流行期にインフルエンザに感染した近親者や同僚などと濃厚接触した可能性があった。

2. ワクチン接種前の鼻腔IgA抗体価

ワクチン接種前に鼻腔洗浄液を採取した155例のうち、118例 (76%) で鼻腔洗浄液にA (H1N1) 亜型インフルエンザウイルスに特異的なIgA抗体が認められた。A (H1N1) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体価は平均13.8 (U/ μ g total IgA \times 100) で、1.7～81.1 (U/ μ g total IgA \times 100) の範囲に分布していた (図2)。鼻腔洗浄液中のA (H3N2) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体は120例 (77%) に認められ、抗体価は平均17.2 (U/ μ g total IgA \times 100) であり、1.4～88.4 (U/ μ g total IgA \times 100) の範囲に分布していた。鼻腔洗浄液中のB型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体は112例 (72%) に認められ、抗体価は平均14.0 (U/ μ g total IgA \times 100) であり、2.4～73.1 (U/ μ g total IgA \times 100) の範囲に分布していた (表2)。

本研究の健常成人が保有する鼻腔のA (H1N1) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体価と、われわれが以前に報告したA型インフルエンザ感染時に成人が保有する鼻腔のA (H1N1) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体価⁹⁾を比較したところ、インフルエンザ感染者が保有する抗体価は健常成人の保有する抗体価と比べ有意に低かった (図3)。

3. ワクチン接種後の鼻腔IgA抗体価の変動

鼻腔分泌液中のA (H1N1) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体価は、ワクチン接種前には平均13.8 (U/ μ g total IgA \times 100) であり、ワクチン接種後1カ月後には平均11.0 (U/ μ g total IgA \times 100) となり、ワクチン接種によりIgA抗体価は上昇しなかった (図2)。鼻腔分泌液中のA (H3N2) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体価は、ワクチン接種前には平均17.2 (U/ μ g total IgA \times 100) であり、ワクチン接種後1カ月

表1 対象の背景因子

	全体に占める割合	
全体	155人	
性別		
男性	78人	50%
女性	77人	50%
年齢		
平均年齢 (±標準偏差)	24.1 (±6.4) 歳	
年齢分布	19～60歳	
既往		
インフルエンザワクチン接種		
過去12カ月間にワクチン接種の既往あり	60人	39%
過去12カ月間にワクチン接種の既往なし	95人	61%
インフルエンザ感染		
被検者自身の感染	合計16人	10%
本試験期間中に感染あり	0人	0%
過去6カ月の期間中に感染あり	0人	0%
過去7～12カ月の期間中に感染あり	9人	6%
過去12～24カ月の期間中に感染あり	8人	5%
近親者の感染	合計51人	33%
本試験期間中の感染あり	4人	3%
前年度の流行期に感染あり	47人	30%
接種歴がなく、被検者および近親者の感染既往なし	57人	37%

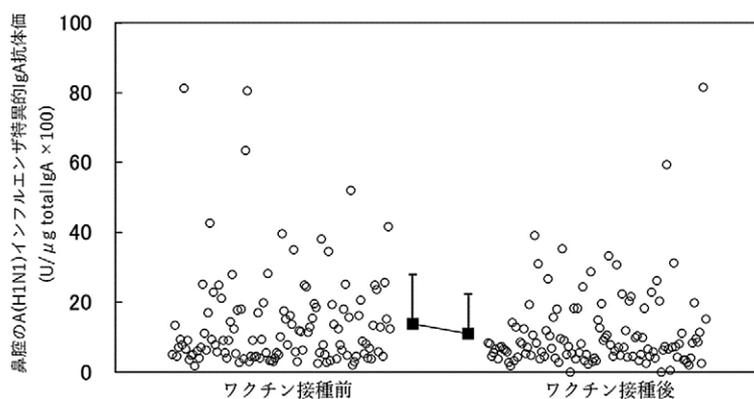


図2 鼻腔のA (H1N1) インフルエンザウイルス特異的IgA抗体価の保有状況

- ：ワクチン接種前後の個々の抗体価
 ワクチン前後ともX軸上で被検者番号順に並ぶ。
 ■：ワクチン前後の平均値
 エラーバー：標準偏差

健常成人の集団において個々の鼻腔のインフルエンザウイルス特異的IgA抗体価は高い例から低い例までばらつきをもち、155例中118例(76%)で保有されていた。インフルエンザワクチン接種から1カ月後に鼻腔のインフルエンザウイルス特異的IgA抗体価は上昇しなかった。

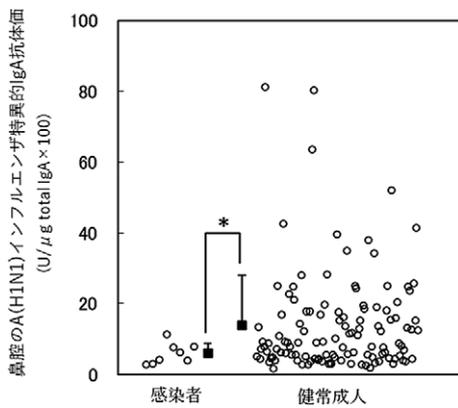


図3 感染者と健常成人における鼻腔のA (H1N1) インフルエンザウイルス特異的IgA抗体価の保有状況の比較

○：個々の抗体価

感染者のデータは過去の報告⁹⁾を引用
健常成人のデータは図1ワクチン前と同じ

■：平均値

エラーバー：標準偏差

*：p<0.0001 (ウェルチのt検定)

インフルエンザ感染者が鼻腔に保有するインフルエンザウイルス特異的IgA抗体価は健常成人の保有するインフルエンザウイルス特異的IgA抗体価と比べ有意に低かった。

後には平均16.7 (U/μg IgA×100) となり、ワクチン接種によりIgA抗体価は上昇しなかった。鼻腔分泌液中のB型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体価は、ワクチン接種前には平均14.0 (U/μg total IgA×100) であり、ワクチン接種後1カ月後には平均16.7 (U/μg total IgA×100) となり、ワクチン接種によりIgA抗体価は上昇しなかった(表2)。

4. ワクチン接種前の血液IgG抗体価

ワクチン接種前に血液を採取した155例の全例(100%)で、血清中にA (H1N1) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体が認められた。表2に示すように、血清中のA (H1N1) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価は平均1,134 (U/mL)で、30～5,888 (U/mL)の範囲に分布していた。血清中のA (H3N2) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体も155例の全例(100%)で認められ、抗体価は平均630 (U/mL)であり、30～2,645 (U/mL)の範囲に分布していた。血清中のB型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体は154例(99%)で認められ、抗体価は平均583 (U/mL)であり、56～3,335 (U/mL)の範囲に分布していた。2005/2006年シーズンのインフルエンザ三価ワクチンにもA型株としてA/ニューカレドニア/20/99

(H1N1) 亜型株が用いられていたことから、前年度にワクチン接種の既往がある60例と前年度にワクチンを接種しなかった95例の血清中のA (H1N1) 亜型特異的IgG抗体価を比較したところ、接種既往のある群は平均1,094 (U/mL)、接種既往のない群は平均1,159 (U/mL)であり、両群に差を認めなかった。過去24カ月間にインフルエンザ感染の既往のある例では、感染既往のない例と比べて、前年度にも流行したA (H3N2) 広島株インフルエンザウイルス特異的鼻腔IgA抗体価および血清IgG抗体価に差を認めなかった。過去12カ月間にワクチン接種の既往がなかった例では、インフルエンザワクチン接種前のA (H1N1) インフルエンザウイルス特異的血清IgG抗体価と鼻腔IgA抗体価との間に相関を認めなかった。

5. ワクチン接種後の血液IgG抗体価の変動

血清中のA (H1N1) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価は、ワクチン接種前には平均1,134 (U/mL)であり、ワクチン接種後1カ月後には平均1,491 (U/mL)となり、ワクチン接種によりIgG抗体価が有意に上昇した(図4)。また、1,000 (U/mL)以上のA (H1N1) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価を保有する例の割合は、ワクチン接種前の43% (155例中67例)から、インフルエンザワクチン接種後1カ月後に67% (155例中104例)まで増加し、オッズ比が2.68であった。血清中のA (H3N2) インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価は、ワクチン接種前には平均630 (U/mL)であり、ワクチン接種後1カ月後には平均771 (U/mL)となり、ワクチン接種によりIgG抗体価が有意に上昇した。血清中のB型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価は、ワクチン接種前には平均583 (U/mL)であり、ワクチン接種後1カ月後には895 (U/mL)となり、ワクチン接種によりIgG抗体価が有意に上昇した(表2)。

次に、インフルエンザワクチン接種前の血清中のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体価が平均値未満であった群と平均値以上であった群に分けてサブグループ解析を行った。血清中のA (H1N1) 亜型のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体価が平均値未満の群では、ワクチン接種前には平均601 (U/mL)であり、ワクチン接種後1カ月後には平均1,160 (U/mL)となり、ワクチン接種後に有意に上昇した。しかしA (H1N1) 亜型のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体価が平均値以上の群では、ワクチン接種前には平均1,955 (U/mL)であり、ワクチン接種後1カ月後には平均2,000 (U/mL)となり、ワクチン接種後に特異的IgG抗体価は上昇しなかった(図5)。血清中のA (H3N2) 亜

表2 ワクチン接種前後の抗体価

	A (H1N1)		A (H3N2)		B	
	ワクチン前	ワクチン後	ワクチン前	ワクチン後	ワクチン前	ワクチン後
鼻腔分泌液中のインフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体						
抗体保有者数 (人)	118		120		112	
インフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体価 (U/ μ g total IgA \times 100)	13.8 \pm 14.1	11.0 \pm 11.4	17.2 \pm 15.6	16.7 \pm 19.5	14.0 \pm 11.3	16.7 \pm 25.9
p 値 (ワクチン後 vs ワクチン前)	0.99		0.66		0.13	
血清のインフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体						
抗体保有者数 (人)	155		155		154	
インフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体価 (U/mL)	1,134 \pm 913	1,491 \pm 909*	630 \pm 418	771 \pm 465*	583 \pm 394	895 \pm 564*
p 値 (ワクチン後 vs ワクチン前)	<0.001		<0.001		<0.001	
サブ解析						
ワクチン前の血清抗体価が平均値未満の群 (人)	94		92		91	
インフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体価 (U/mL)	601 \pm 256	1,160 \pm 745*	397 \pm 146	600 \pm 277*	369 \pm 134	719 \pm 393*
p 値 (ワクチン後 vs ワクチン前)	<0.001		<0.001		<0.001	
ワクチン前の血清抗体価が平均値以上の群 (人)	61		63		63	
インフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体価 (U/mL)	1,955 \pm 951	2,000 \pm 909	971 \pm 451	1,019 \pm 566	900 \pm 438	1,156 \pm 672*
p 値 (ワクチン後 vs ワクチン前)	0.32		0.14		<0.001	

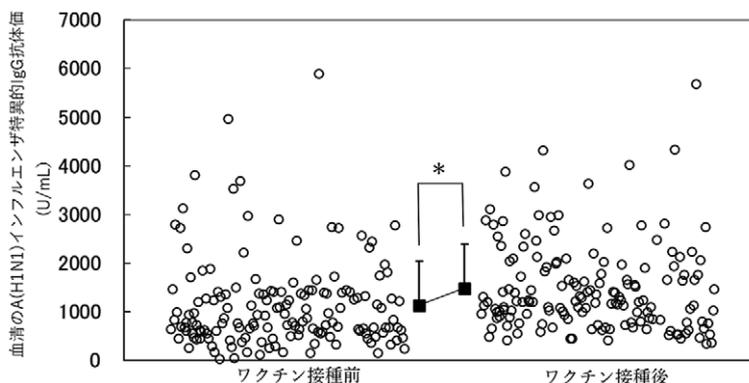


図4 血清のA (H1N1) インフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体価の保有状況

- ：ワクチン接種前後の個々の抗体価
ワクチン前後とも X 軸上で被検者番号順に並ぶ。
- ：ワクチン前後の平均値
エラーバー：標準偏差
- *：p<0.001 (対応のある t 検定)

健常成人の集団において個々の血清のインフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体価は高い例から低い例までばらつきをもち、155例全例 (100%) で保有されていた。ワクチン接種から1カ月後に血清のインフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体価が上昇した。

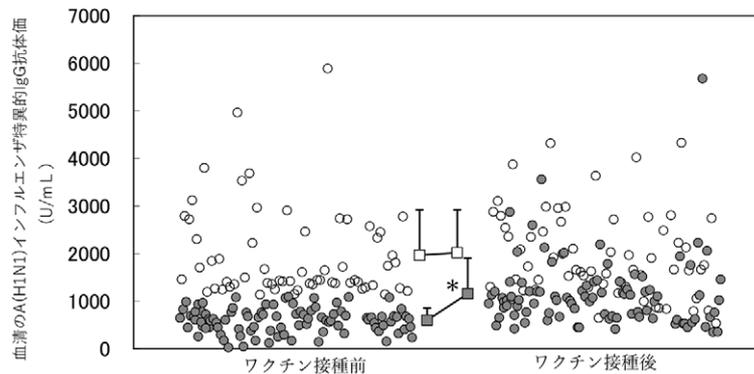


図5 血清のA (H1N1) インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価の保有状況 (サブ解析)

○: ワクチン接種前の抗体価が平均値以上の群のワクチン前後の個々の抗体価
●: ワクチン接種前の抗体価が平均値未満の群のワクチン前後の個々の抗体価
ワクチン前後ともX軸上で被検者番号順に並ぶ。

□: ワクチン接種前の抗体価が平均値以上の群のワクチン前後の平均値

■: ワクチン接種前の抗体価が平均値未満の群のワクチン前後の平均値

エラーバー: 標準偏差

*: $p < 0.001$ (対応のあるt検定)

保有する抗体価が低い場合に限り、ワクチン接種から1カ月後に血清のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体価が上昇した。

型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価もA (H1N1) 亜型と同様に平均値未満の群ではワクチン接種後に有意に上昇し、平均値以上の群ではワクチン接種後に上昇しなかった。一方、血清中のB型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価は平均値未満の群と平均値以上の群のいずれにおいても、ワクチン接種後に上昇した(表2)。

考 察

本研究の対象である健常成人155名のうち、過去2年の間にインフルエンザに感染した既往があったのは16例、約10%であった。日本では毎年冬期にインフルエンザの流行を繰り返し、人口の5~10%がインフルエンザに罹患すると報告されている¹¹⁾。本研究の対象者のインフルエンザ罹患率は従来の報告と同程度であり、本研究の結果からわが国における健常成人のインフルエンザウイルス特異的抗体価の保有状況を検討できると考えられた。

鼻腔のインフルエンザウイルス特異的分泌型IgA抗体は、インフルエンザウイルスに対する局所免疫において主要な役割を担っており、上気道に侵入したインフルエンザウイルスに結合してウイルス活性を中和することにより感染を防御することができる²⁾。また鼻腔のインフルエンザウイルス特異的分泌型IgA抗体は、血液中のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体と比較して

交差反応性が高く、異なる亜型株のインフルエンザウイルスに対しても中和活性を持ち、感染を防御することができる¹²⁾。本研究では、155例のうち118例(76%)が鼻腔にA (H1N1) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体を保有していた。また、155例のうち120例(77%)が鼻腔にA (H3N2) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体を保有し、155例のうち112例(72%)がB型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体を保有していた。われわれは、A型インフルエンザに感染した成人が保有していた鼻腔のA (H1N1) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体価がおおむね10 (U/ μ g IgA \times 100) 以下であったことを報告しており⁹⁾、鼻腔にインフルエンザウイルス特異的IgA抗体を保有していても、抗体価が低い例ではインフルエンザウイルスに感染する可能性がある。本研究では、健常成人が保有する鼻腔のA (H1N1) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体価は1.7~81.1 (U/ μ g total IgA \times 100) の範囲にわたり幅広く分布しており、54% (118例中64例) では鼻腔のA (H1N1) 亜型インフルエンザウイルス特異的IgA抗体価が10 (U/ μ g IgA \times 100) 以下であった。抗体価が低いこれらの例では、インフルエンザウイルスが体内に侵入した場合、ウイルスを中和して再感染を防御する力が弱く、発症しやすと考えられた。

本研究ではインフルエンザワクチン皮下接種の1カ月後に、接種したA (H1N1) 亜型、A (H3N2) 亜型、

B型のインフルエンザウイルスに対する鼻腔の特異的IgA抗体価は上昇しなかった。ヒトを対象としたインフルエンザワクチン皮下接種後のインフルエンザウイルス特異的な鼻腔IgA抗体の変動についての報告は非常に少ないが、2003年にDurrerらは全粒子型の経鼻粘膜型インフルエンザワクチンの臨床試験の対照群にインフルエンザワクチンの筋肉注射を行い、鼻腔のインフルエンザウイルス特異的IgA抗体価が上昇しなかったことを報告している¹³⁾。以上の結果から、わが国で市販されている皮下接種型のインフルエンザワクチンは、鼻腔のインフルエンザウイルス特異的IgA抗体価を上昇させず粘膜免疫を誘導しないことから、感染を予防的に防御する効果が乏しいと考えられた。

鼻腔の分泌型IgA抗体はインフルエンザウイルスの感染により産生されることが知られており²⁾、自験例では、感染後5カ月間は鼻腔のインフルエンザウイルス特異的IgA抗体価の有意な上昇を維持し、感染1年後には感染前と同程度まで抗体価が低下することを報告している⁹⁾。一方で、鼻腔の分泌型IgA抗体はインフルエンザワクチン接種により産生されないことから、鼻腔にインフルエンザウイルス特異的IgA抗体を保有しているということは、過去にインフルエンザウイルスに感染した既往があることを意味している。本研究で、健常成人の70%以上が、A(H1N1)亜型、A(H3N2)亜型、B型のインフルエンザウイルスに対する特異的IgA抗体を鼻腔に保有していたことから、健常成人の70%以上はインフルエンザウイルスに感染した既往があると考えられた。

一方、血液中のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体は、インフルエンザウイルスに対する全身免疫において主要な役割を担っていることから、インフルエンザ感染後の重症化を防ぐ効果がある¹⁴⁾¹⁵⁾。本研究では、健常成人のワクチン接種前の血液中のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体の保有率は、A(H1N1)およびA(H3N2)亜型株では100%、B型株では99%であった。血液中のA(H1N1)亜型、A(H3N2)亜型、B型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価は、幅広く分布していた。本研究の健常成人は、過去2年の間に10%がインフルエンザに感染し、過去12カ月の間に39%がワクチン接種した既往があったが、血液中のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体の保有率はほぼ100%であった。小児期にインフルエンザに感染すると終生免疫が獲得される可能性があることが報告されていることから¹⁶⁾、調査期間より以前のインフルエンザ感染やインフルエンザワクチン接種により獲得された血液中のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体は、抗体価が低いも

のの長期にわたり保有されていると考えられた。

本研究ではインフルエンザワクチン皮下接種の1カ月後に、接種したA(H1N1)亜型、A(H3N2)亜型、B型のインフルエンザウイルスに対する血液中の特異的IgG抗体価が上昇した。血液中のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体はインフルエンザ感染後の重症化を防ぐことから¹⁴⁾¹⁵⁾、わが国で市販されている皮下接種型インフルエンザワクチンは、血液中のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体価を上昇させ、重症化を防ぐ効果があると考えられた。しかし、前年度にワクチン接種の既往がある群と既往のない群で、A(H1N1)亜型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価に差を認めなかった。このことから、インフルエンザワクチンを接種して血液中のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体価が上昇しても、1年後にはIgG抗体価が低下すると推測され、重症化を予防するためにはインフルエンザワクチンを毎年接種し、インフルエンザ流行期に血液中に保有する抗体価を上昇させておく必要があると考えられた。

血液中のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体はインフルエンザ感染後の重症化を防ぐ効果がある¹⁴⁾¹⁵⁾。われわれの以前の研究ではインフルエンザに感染した成人が保有する血液中のA(H1N1)亜型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価が1,000(U/mL)以下と低かったことから⁹⁾、血液中のIgG抗体価が十分に高ければ、インフルエンザ感染の重症化を防ぐだけでなく、気道粘膜のインフルエンザウイルスを早期に排除して感染を防御する可能性は否定できない。本研究では、1,000(U/mL)以上のA(H1N1)亜型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価を保有する健常成人の割合がワクチン接種前の43%から、ワクチン接種1カ月後に67%まで増加したことから、一定の血清抗体価を保有する割合とワクチン接種に関連性が見られた。以上の結果から、インフルエンザワクチン接種により血液中のインフルエンザウイルス特異的IgG抗体価を上昇させることにより、インフルエンザウイルスの感染を防御できる可能性がある。またサブ解析の結果から、A(H1N1)亜型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価が平均値未満の群では、インフルエンザワクチン接種前に約600(U/mL)だった抗体価が、ワクチン接種後1カ月後に約1,160(U/mL)まで有意に上昇した。しかし、A(H1N1)亜型インフルエンザウイルス特異的IgG抗体価が平均値以上の群では、インフルエンザワクチン接種前に約2,000(U/mL)だった抗体価が、ワクチン接種後1カ月後に上昇しなかった。このことから、インフルエンザワクチンは血液中に保有する特異的IgG抗体価

が低い場合に、抗体価を上昇させて全身免疫を誘導すると考えられた。しかし、ワクチン接種前から高い抗体価を保有する場合には、ワクチンを接種しても血液中の特異的 IgG 抗体価は上昇せず頭打ち現象を示すと考えられた。インフルエンザワクチン接種の頭打ち現象については過去にも報告されているが¹⁶⁾¹⁷⁾、その機序はまだ十分に解明されていない¹⁶⁾。

なお、B型インフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体は、A型と比較して接種前の抗体価が低かったことから、平均値以下の群だけでなく平均値以上の群でもインフルエンザワクチン接種後に抗体価が上昇した可能性がある。

現在、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) が世界的に流行している。新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) はプラス鎖 RNA ウイルスであり、インフルエンザウイルスはマイナス鎖 RNA ウイルスであるが、SARS-CoV-2 とインフルエンザウイルスは共にエンベロープをもつ一本鎖 RNA ウイルスで、飛沫や接触により上気道粘膜から感染し、発熱・咳・倦怠感などの症状を引き起こす。インフルエンザウイルスに対する免疫機構は SARS-CoV-2 に対する免疫機構と類似している可能性があることから、本研究で得られた知見は、SARS-CoV-2 ワクチンに対する特異的な鼻腔 IgA 抗体価と血清 IgG 抗体価の変動を予測する上で参考となると考えられた。

本研究は前向き臨床試験で、ワクチン接種前後の比較対照試験である。問題点として、対象者の年齢層は若年成人が主で、高齢者や小児は含まれていないことが挙げられる。このため本研究の結果は、高齢者や小児では異なる可能性がある。また本研究で使用したヒト IgA ELISA 定量キットでは、二量体の分泌型 IgA 抗体と一量体の血清型 IgA 抗体を区別できないが、黒野と茂木は免疫電気拡散法を用い鼻腔分泌液中の分泌型 IgA 抗体と血清型 IgA 抗体を別個に測定したところ鼻腔分泌液中の IgA 抗体の約90%が分泌型 IgA 抗体によって占められていたと報告しており¹⁸⁾、このことから本研究における鼻腔分泌液中の IgA 抗体価は主に分泌型 IgA 抗体の抗体価を反映しているものと考えられた。インフルエンザワクチンの年間使用量が、本研究を実施した2006年の約1,900万本から2019年には約2,800万本に増加していることから¹⁹⁾、インフルエンザワクチン接種により上昇する血液中のインフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体価が、2006年より2019年の方が高い可能性がある。しかし、インフルエンザの流行を表す定点医療機関あたりのインフルエンザ感染者数は、2006年から2019年までの間に大きな変化はない²⁰⁾。なお、われわれは2006年当時

から現在に至るまで測定方法に改変を重ねながら研究を継続している。本報告の相対値としてのインフルエンザウイルス特異的抗体価は現在の臨床試験の抗体価と比べ概して高い傾向が認められるが、これは固相化ウイルス抗原の違いの要因が大きく影響しており、一部検量線の違いも影響していると推定している。

ま と め

本研究では、健康成人の約70%が鼻腔にA (H1N1) 亜型、A (H3N2) 亜型、B型インフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体を保有していた。鼻腔にインフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体を保有する人は、過去にインフルエンザウイルスに感染したことがあると考えられ、鼻腔に保有されたインフルエンザウイルス特異的分泌型 IgA 抗体はインフルエンザウイルスの再感染を防御する可能性が指摘されている。そのため、保有する IgA 抗体価が低い例では高い例に比べ感染のリスクが高い可能性がある。インフルエンザワクチン皮下接種後1カ月後の鼻腔のインフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体価は上昇しなかった。このように、皮下接種型インフルエンザワクチンは、粘膜免疫を誘導しないことから、感染を予防的に防御する効果が乏しいと考えられた。

本研究では、健康成人のほぼ100%が血液中にA (H1N1)、A (H3N2)、B型インフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体を保有していた。保有する IgG 抗体価が低い例では、インフルエンザワクチン皮下接種の1カ月後に接種したインフルエンザウイルスに対する血液中の特異的 IgG 抗体価が上昇した。特異的 IgG 抗体はインフルエンザ感染後の重症化を防ぐ効果があることから、皮下接種型のインフルエンザワクチンは重症化を防ぐ効果があると推定された。また、ワクチンを接種しても1年後には血液中の特異的 IgG 抗体価が再び元のレベルにまで低下していると推察されたことから、重症化を予防するためにはインフルエンザワクチンを毎年接種する必要がある。

文 献

- 1) Holmgren J, Czerkinsky C: Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 2005; 11(Suppl): S45-53.
- 2) Tamura S, Kurata T: Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57: 236-247.
- 3) Mizuno D, Ide-Kurihara M, Ichinomiya T, et al: Modified pulmonary surfactant is a potent adjuvant that stimulates the mucosal IgA production in response to the influenza virus antigen. *J Immunol* 2006; 176: 1122-

- 1130.
- 4) Mizuno D, Kimoto T, Sakai S, et al: Induction of systemic and mucosal immunity and maintenance of its memory against influenza A virus by nasal vaccination using a new mucosal adjuvant SF-10 derived from pulmonary surfactant in young cynomolgus monkeys. *Vaccine* 2016; 34: 1881-1888.
 - 5) Shvartsman YS, Agranovskaya EN, Zikov MP: Formation of secretory and circulating antibodies after immunization with live and inactivated influenza virus vaccines. *J Infect Dis* 1977; 135: 697-705.
 - 6) Powers DC, Murphy BR, Fries LF, et al: Reduced infectivity of cold-adapted influenza A H1N1 viruses in the elderly: correlation with serum and local antibodies. *J Am Geriatr Soc* 1992; 40: 163-167.
 - 7) Fujimoto C, Kido H, Sawabuchi T, et al: Evaluation of nasal IgA secretion in normal subjects by nasal spray and aspiration. *Auris Nasus Larynx* 2009; 36: 300-304.
 - 8) Sawabuchi T, Suzuki S, Iwase K, et al: Boost of mucosal secretory immunoglobulin A response by clarithromycin in paediatric influenza. *Respirology* 2009; 14: 1173-1179.
 - 9) 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 Respir Viruses* 2012; 6: 396-403.
 - 10) de Silva TI, Gould V, Mohammed NI, et al: Comparison of mucosal lining fluid sampling methods and influenza-specific IgA detection assays for use in human studies of influenza immunity. *J Immunol Methods* 2017; 449: 1-6.
 - 11) Ohkusa Y, Sugawara T, Takahashi K, et al: Comparative study of preciseness in the regional variation of influenza in Japan among the National Official Sentinel Surveillance of Infectious Diseases and the National Database of Electronic Medical Claims. *Biosci Trends* 2018; 12: 636-640.
 - 12) Tamura S, Tanimoto T, Kurata T: Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58: 195-207.
 - 13) Durrer P, Glück U, Spyr C, et al: Mucosal antibody response induced with a nasal virosome-based influenza vaccine. *Vaccine* 2003; 21: 4328-4334.
 - 14) Demicheli V, Jefferson T, Rivetti D, et al: Prevention and early treatment of influenza in healthy adults. *Vaccine* 2000; 18: 957-1030.
 - 15) Jefferson T, Rivetti D, Rivetti A, et al: Efficacy and effectiveness of influenza vaccines in elderly people: a systematic review. *Lancet* 2005; 366: 1165-1174.
 - 16) Seidman JC, Richard SA, Viboud C, et al: Quantitative review of antibody response to inactivated seasonal influenza vaccines. *Influenza Other Respir Viruses* 2012; 6: 52-62.
 - 17) 板谷一宏, 黒田高明, 山口文博, 他: インフルエンザワクチン接種後のHI抗体価の変動. *環境感染* 2007; 22: 235-241.
 - 18) Kurono Y, Mogi G: Secretory IgA and serum type IgA in nasal secretion and antibody activity against the M protein. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1987; 96: 419-424.
 - 19) 厚生労働省: 季節性インフルエンザワクチンの供給について(インフルエンザワクチンの製造量および使用量の推移). <https://www.mhlw.go.jp/content/000670038.pdf>, 参照(2020-11-16).
 - 20) 厚生労働省: インフルエンザの発生状況. <https://www.mhlw.go.jp/content/000620809.pdf>, 参照(2020-11-16).
-
- 利益相反に関する事項: 著者らは開示すべき利益相反を有しない.
-
- 本研究は, わが国の文部科学省科学技術振興調整費の重点課題解決型研究「生体成分粘膜アジュバンドによる戦略的予防」によって遂行された.
-
- (2020年10月28日受稿 2021年1月22日受理)
連絡先 〒774-0045 阿南市宝田町川原6番地1
阿南医療センター耳鼻咽喉科 藤本知佐

Anti-Influenza Virus-Specific Nasal Secretory IgA and Serum IgG Titers
in a Japanese Adult Population and their Changes after Subcutaneous Vaccination

Chisa Fujimoto, M.D., Ph.D., Hiroaki Yanagawa, M.D., Ph.D.*, Takako Sawabuchi**
Hiroshi Kido, M.D., Ph.D.** and Noriaki Takeda, M.D., Ph.D.***

Anan Medical Center, Tokushima, Japan

*Center of IRB, Tokushima University Hospital, Tokushima, Japan

**Division of Enzyme Chemistry, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima

***Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, The University of Tokushima Graduate School

In order to clarify human mucosal and systemic immunity against influenza viral infection, the serum titers of anti-influenza virus-specific nasal secretory IgA and serum IgG and their changes after subcutaneous vaccination were measured in a Japanese healthy adult population in the present study. We recruited 155 healthy adults in 2006, with an average age of 24.1 years (range: 19–60 years). The male–female ratio was 1 : 1. Nasopharyngeal lavage fluid and serum specimens were obtained prior to vaccination and a month after subcutaneous vaccination with a trivalent influenza ether split hemagglutinin vaccine of the A (H1N1), A (H3N2) subtypes and type B influenza viruses. Nasopharyngeal lavage fluid specimens were obtained by the nasal spray and aspiration method. The anti-influenza virus-specific IgA titers in the nasopharyngeal lavage fluid and IgG titers in the serum against the A (H1N1), A (H3N2) subtype and type B influenza viruses were measured by ELISA. The anti-influenza virus-specific nasal lavage fluid IgA titers were represented as a ratio to the total IgA titers. About 70% of the subjects had nasal anti-viral IgA against the A (H1N1), A (H3N2) subtype and type B influenza viruses, and almost all had serum anti-viral IgG against the A (H1N1), A (H3N2) subtype and type B viruses. The serum antiviral IgG titers, but not the nasal antiviral IgA titers, were significantly elevated at 1 month after the subcutaneous vaccination. Moreover, the serum antiviral IgG titers were significantly elevated after vaccination only in subjects with low pre-vaccination IgG titers, and not in those with high pre-vaccination IgG titers. The nasal antiviral IgA titers in the subjects of our present study were significantly higher than those in patients with influenza infection reported from our previous study. The presence of nasal anti-influenza virus-specific IgA in about 70% of Japanese adults is considered as being suggestive of a history of influenza infection. The presence of anti-influenza virus-specific IgG in the serum in almost all Japanese adults could suggest a history of influenza infection or influenza vaccination. Currently available subcutaneous influenza vaccines induce systemic immunity, with the appearance of anti-viral IgG in the serum, in adults. However, subcutaneous vaccination does not appear to be capable of inducing mucosal immunity with the induction of antiviral secretory IgA in the nasopharynx. The present findings suggest that subcutaneous influenza vaccination can suppress the progression of influenza infection by inducing the appearance of antiviral IgG in serum, but not by inducing the appearance of antiviral IgA in the nasopharynx. The findings also suggest that subjects with low antiviral secretory IgA titers in the nasopharynx are at a higher risk of influenza infection.

Keywords : influenza, influenza vaccine, mucosal immunity, nasopharyngeal lavage, secretory IgA