

## 2. IgA 抗体によるインフルエンザウイルス感染防御

鈴木 忠樹, 長谷川 秀樹

国立感染症研究所 感染病理部

生体内において最も産生量の多い抗体である IgA 抗体はインフルエンザのように粘膜組織を標的とした感染症に対する生体防御の最前線防御因子として機能している。経鼻ワクチンにより粘膜免疫の中核をなす IgA 抗体を自在に制御することができれば、有効性の高いインフルエンザワクチンの開発に繋がるのが期待できる。最近の我々の研究により、呼吸器粘膜に存在する二量体よりも大きな四量体などの多量体分泌型 IgA(SIgA) 抗体がインフルエンザウイルス感染防御に重要であることが明らかになってきた。さらに、四量体 SIgA 組換え抗体作製技術を用いて作製された同一抗原認識部位を持つ様々な四次構造の抗体の抗ウイルス活性比較検討により、IgA 抗体の四量体化は抗体の最大活性を変化させずに抗ウイルス活性の標的域を拡張させることに寄与していることが明らかになった。これらの研究結果は、二量体以上の多量体 SIgA 抗体のインフルエンザウイルス感染防御における重要性を強調するとともに、従来のインフルエンザワクチンにはない経鼻インフルエンザワクチンに特有のワクチン有効性発現機序の一端を明らかにするものである。

### 1. はじめに

現在、インフルエンザに対しては、ワクチンだけでなく、迅速診断キットと抗ウイルス薬というウイルス感染症へ対抗するための強力なツールが既に実用化され臨床現場で日常的に使用されている。特に、日本においては、諸外国に比べ発症後の受診行動が早いこともあり、迅速診断キットを使った病原体診断に裏付けされた抗ウイルス薬による治療導入が可能であり、インフルエンザの診療に関しては世界的にも充実している<sup>1)</sup>。20年ほど前から徐々に導入されていった診断キットと抗ウイルス薬は、インフルエンザ診療のあり方を変えただけでなく、インフルエンザの疾病負荷を正確に捉えることを可能にし、インフルエンザという日常的な疾病に対する医療従事者および一般市民の認識を一変させた<sup>2)</sup>。それと歩調を合わせるように、1990年代初

頭に激減したインフルエンザワクチン使用量も徐々に回復していき、最近の数年間、年間5000万ドーズ以上のインフルエンザワクチンが使用されており、毎年、約4割の国民がインフルエンザワクチンを接種していると考えられている<sup>3)</sup>。一方で、2018/19シーズン(2018年9月~2019年8月)に医療機関を受診したインフルエンザ患者は1200万人以上と考えられており、現在のように患者数が報告されるようになって以降(1999年4月以降)の最大規模の流行となるなど<sup>4)</sup>、未だにインフルエンザの流行は冬の風物詩として繰り返されており、インフルエンザという感染症のコントロールに完全に成功しているとは言い難い状況が続いている。現在、日本国内で使用されているインフルエンザワクチンは、精製ウイルスの脂質成分をエーテルで除去した不活化抗原を皮下に接種するインフルエンザ HA ワクチンである<sup>5)</sup>。このワクチンによるインフルエンザ予防効果は、流行株とワクチン株との抗原性の相違や流行の規模など様々な因子により変化することから一概に評価することは難しいが、抗原性が一致した流行においてもワクチン効果は5割程度と考えられている<sup>6)</sup>。5割というワクチン効果は、罹患者の総数を減らすという公衆衛生的な観点では非常に重要であるが、流行そのものをコントロールするには不十分であり、個々の接種者にとってもワクチンの効果をなかなか実感しにくく、より効果の高い新しいワクチンの開発が望まれている。その候補の一つとし

### 連絡先

〒162-8640

東京都新宿区戸山1-23-1

国立感染症研究所 感染病理部

TEL: 03-5285-1111

FAX: 03-5285-1189

E-mail: tksuzuki@nih.go.jp

て、筆者らは経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発を目指した研究を続けている。2019年現在、筆者らによる基礎研究の結果を承けて、国内のワクチンメーカーによる臨床開発が進んでおり、近い将来、鼻腔粘膜に不活化抗原を投与するという新たな形態のワクチンが実用化されることが期待されている。一方で、このような粘膜ワクチンの有効性発現機構については、IgA抗体がその中心を担うことが古くから知られているのみで、その詳細についてはこれまで十分に研究が進んでいなかった。本稿では、我々の経鼻不活化インフルエンザワクチン研究<sup>7)</sup>の過程で明らかになってきたIgA抗体によるインフルエンザウイルス感染防御機構について最近の知見を概説する。

## 2. 経鼻インフルエンザワクチン開発の歴史

経鼻インフルエンザワクチンが、注射型ワクチンよりも有効性が高い可能性は1960年代から示唆されている<sup>8)</sup>。季節性インフルエンザではウイルス感染は気道の粘膜上皮に限局しており、その症状はウイルス感染局所の気道粘膜組織の傷害とそれに伴う免疫反応により引き起こされている<sup>9, 10)</sup>。この事実は、インフルエンザ発症を予防するためには、気道粘膜組織でのウイルス感染を抑制する必要があることを意味する。通常、気道粘膜上には、SIgA抗体が多量にしかも絶えず分泌されており、様々な病原体に対する防御因子として機能している<sup>11-13)</sup>。動物もしくはヒトを用いたワクチンの有効性に関する研究により、注射型ワクチンは全身の免疫系を刺激し血清中のIgG抗体を誘導するものの、気道粘膜上のSIgA抗体を誘導できないことが明らかになっている。これに対して、経鼻ワクチンは全身の免疫系のみならず抗原投与局所、つまり感染の場となる粘膜免疫系を刺激し、血清中IgG抗体に加えて気道粘膜上のSIgA抗体を同時に誘導することができ、その結果として注射型ワクチンよりも有効性が高いと考えられている<sup>14-17)</sup>。このような科学的知見に基づき実用化された粘膜ワクチンが経鼻弱毒生インフルエンザワクチンである<sup>8, 18)</sup>。このワクチンは低温馴化培養した病原性の低いインフルエンザウイルスを鼻腔粘膜に感染させ免疫を誘導する。気道粘膜上皮にウイルスを感染させることから自然感染と同様にプライミング効果が強く液性免疫のみならず細胞性免疫も誘導でき、特にインフルエンザウイルスへの感染歴がない小児における免疫誘導能が高いとされている。しかし、病原性は低いものの免疫誘導はウイルスの増殖に依存していることから使用に様々な制限があり、インフルエンザワクチンの最も重要な対象である高齢者には接種することができない。また、既にインフルエンザウイルス感染歴がある成人の場合、既存の免疫によりワクチン株ウイルスの増殖が抑制され、十分なワクチン効果を得られない問題が指摘されている<sup>19)</sup>。さらに、最近ではワクチン株の変更に伴いヒト気道粘膜上での増殖性が低下しワクチン効果が著し

く低下する問題も指摘されており、米国では一時的ではあるが経鼻弱毒生インフルエンザワクチン接種の推奨が取り下げられたことがあった<sup>20)</sup>。

## 3. 経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発研究

このような生ワクチンの弱点を克服すべく、不活化抗原を用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発研究が世界各国で実施されているが、未だ実用化されたものはない。その大きな理由の一つとしては、注射で使用している抗原をそのまま経鼻ルートで投与するだけでは十分な免疫が誘導できず何らかのアジュバントの添加が必要と考えられてきたことによる。そのような考え方から、2000年に大腸菌易熱性毒素をアジュバントとして含む経鼻不活化インフルエンザワクチンが欧州で開発された。しかしながら、このワクチンは接種者の一部にアジュバントが原因と考えられる顔面神経麻痺が発生し使用が中止されている<sup>21, 22)</sup>。それ以後、アジュバントの安全性に対する懸念から経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発は以前にも増して困難になっており、現在までに実用化例が全くない。一般的に感染症予防ワクチンは、病気に罹患する前の健康なヒトを接種対象とするため、安全性の観点から全くの新規物質を含んだワクチンを開発することはハードルが高い。一方、多くの成人は季節性インフルエンザに関しては既に同じ亜型のインフルエンザウイルスに暴露されて基礎免疫を有しており、生ワクチンのようなプライミング効果が無くともブースター効果を有するワクチンであれば十分に有効性を発揮することが考えられる。そこで、我々は、既に技術的に完成され、ヒトでの使用実績もあり安全性の保証されたインフルエンザウイルス不活化全粒子を抗原とする経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンの開発研究を行ってきた<sup>23-25)</sup>。不活化全粒子抗原は現行のスプリットワクチンが実用化される以前に使用されていたワクチン抗原であるが、粒子内部にアジュバントとして機能するウイルスゲノム核酸を含みスプリットワクチンに比べて免疫原性が高いことが知られている<sup>26)</sup>。我々のこれまでの研究により、経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンはヒトにおいて皮下接種インフルエンザワクチンと同程度の血清抗体誘導能を有しており、さらに注射型ワクチンでは誘導できない気道粘膜上のSIgA抗体も誘導できることが明らかになってきた<sup>23, 24)</sup>。経鼻不活化インフルエンザワクチンを実用化するためには、本ワクチンの最大の特徴である気道粘膜上への免疫誘導をヒトにおいて定量的に評価しインフルエンザ予防効果との関係性を明らかにする必要がある。経鼻不活化インフルエンザワクチンにおける粘膜免疫応答の主体は、局所の粘膜直下に分布する形質細胞により産生され粘膜上に分泌されるSIgA抗体である。さらに、気道粘膜上にはIgA抗体の1/3～1/10以下の量であるが、血清中のIgG抗体も濃度勾配に従って受動的に滲出しており、

この両者が気道粘膜組織へのウイルス感染に対する防御因子として機能している<sup>25, 27)</sup>。同様に、経鼻弱毒生インフルエンザワクチンも、血清抗体のみでなく、気道粘膜上のSIgA抗体を誘導することが知られている<sup>28)</sup>。すなわち、経鼻ワクチンの場合、気道粘膜上のSIgA抗体と血清中のIgG抗体が連携して発症抑制に関わっており、血清抗体価の評価のみでは真にワクチンの有効性を評価することは難しい。そこで、我々は気道粘膜の免疫応答を反映した指標として気道粘液を含む鼻腔洗浄液の標準化法を構築し、気道粘膜におけるウイルス特異的な抗体応答を定量的に評価する系を確立してきた<sup>23, 27)</sup>。この系によって計測される経鼻ワクチン接種者の粘膜抗体応答は、血清抗体応答と非常に高い相関を示し、経鼻ワクチン接種により誘導された上気道粘膜局所で起こっている液性免疫応答を定量的に評価できていると考えられている。現在、ワクチンメーカー主導で実施されている経鼻不活化インフルエンザワクチンの臨床開発においても、この方法を用いて粘膜抗体応答を評価しており、今後、ヒトにおいて経鼻ワクチンによる粘膜抗体応答とインフルエンザ予防効果の関係性が定量的に明らかにされることが期待されている。

#### 4. 経鼻ワクチンで誘導されるIgA抗体の性状と抗ウイルス活性

前述のように、注射型ワクチンにはない粘膜投与型ワクチンの最大の特徴は、粘膜組織上に粘膜免疫の最大の担い手である抗原特異的なSIgA抗体を誘導できることにある。粘膜投与型ワクチンにより誘導される免疫の感染防御機構を理解するためには、粘膜局所に誘導されたSIgA抗体の性状を理解する必要があるが、SIgA抗体による感染防御の分子機構は十分に理解されているとは言い難い。そこで、我々は経鼻ワクチン接種によりヒト気道粘膜に誘導されるSIgA抗体に焦点を当て、その高次構造と生理活性の関係性を解析してきた。ヒトでは、血清中のIgA抗体はほぼ全てが単量体で存在するが、粘液などの外分泌液中に分泌されるSIgA抗体は多量体を形成しており、SIgA抗体の多くは二量体として存在することが良く知られている<sup>29-32)</sup>。また、SIgA抗体が見つかった当初から二量体よりも大きなSIgA抗体の存在が指摘されており、半世紀ほど前に主に四量体として存在することが超遠心分析法により明らかにされている<sup>30)</sup>。しかしながら、生体内に存在する四量体SIgA抗体の量は多くなくヒト検体を用いた研究は進まず、その生理的意義や高次構造など、抗体分子に関する基本的な課題すら未解明のままであった。そこで、我々は経鼻不活化インフルエンザワクチン接種によりヒトの気道粘膜上に誘導される抗体のアイソタイプと四次構造を解析し、その機能との関係性について検討した<sup>24, 25)</sup>。まず、経鼻ワクチンを接種した健康成人から回収した鼻腔洗浄液を濃縮後、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画し、

各分画に含まれる抗体量とワクチン株を含む数種類のウイルス株に対する中和抗体価、ウイルスHA抗原結合抗体価を測定したところ、鼻腔洗浄液中の多量体抗体および単量体抗体がウイルス中和活性を有しており、多量体分画ではIgA抗体が、単量体分画ではIgG抗体がウイルス中和を担っていることが明らかになった。さらに興味深い事に、接種したワクチン株のウイルスに対しては多量体分画と単量体分画のいずれも中和活性を認めたが、抗原性が異なる株に対しては多量体分画の中和活性は認めたものの単量体分画の中和活性は全く認められず、粘膜抗体の交叉防御能はSIgA抗体の多量体分画が担っていることが示唆された。次に、この多量体SIgA抗体の分子性状を解析するために鼻腔洗浄液からIgA抗体を精製しNative PAGEを実施したところ、多量体分画には複数の異なる四次構造を持ったSIgA抗体が含まれおり、それぞれが異なる中和能を持つ事が予想された。そこで、それぞれの四次構造と中和活性の関係性を明確にするために、高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)を用いて多量体SIgA抗体の抗体分子形状を1分子レベルで解析した。鼻腔洗浄液から精製したIgA抗体をHS-AFMで観察すると、各分画で明瞭に大きさの異なる分子が観察され、多量体分画には4つのFabを持つ二量体、6つのFabを持つ三量体、そして8つのFabを持つ四量体が存在した<sup>25)</sup>。HS-AFMで観察された三量体および四量体のSIgA抗体は「アスタリスクもしくは四つ葉のクローバー」のような形状をしており、分子中心部から放射状に伸びる「6本もしくは8本の腕」を大きく上下運動させていた。また、この複数の腕が協調することにより一つの抗原への結合性を維持していることが示唆された。一般的に、多量体抗体は単量体に比べ抗原認識部位が多いことにより結合力が高くなり、中和活性などの機能が高くなると考えられているが、このHS-AFMの観察結果は、1つの多量体SIgA抗体上に存在する複数の抗原認識部位が協調して効率良く抗原を捉えるという現象を直接的に可視化しており、多量体抗体の高機能化機構の仮説を支持していると考えられた。また、これらのIgA四次構造と抗ウイルス活性の関係性を明らかにするために、表面プラズモン共鳴法によりインフルエンザウイルスHA抗原と抗体との相互作用を解析すると、抗体分子が大きくなるに従い結合が強くなることが明らかになり、HS-AFMの観察結果を裏付けることができた<sup>24)</sup>。同様に、IgA四次構造と中和活性の関係性を評価すると、抗体分子が大きくなるほど中和活性が高く、さらに、鼻腔洗浄液中に含まれる四量体などの多量体IgA抗体の割合が増加するに従って鼻腔洗浄液全体の中和活性が高くなることが明らかになった<sup>25)</sup>。これらの結果より、経鼻ワクチン接種者のヒト気道粘膜上には二量体に加え、四量体などの多量体を形成するSIgA抗体が誘導されており、これらの抗体が経鼻ワクチンの有効性発現機構において重要な役割を果たして

# 四量体SIgA組換え抗体作製技術の開発

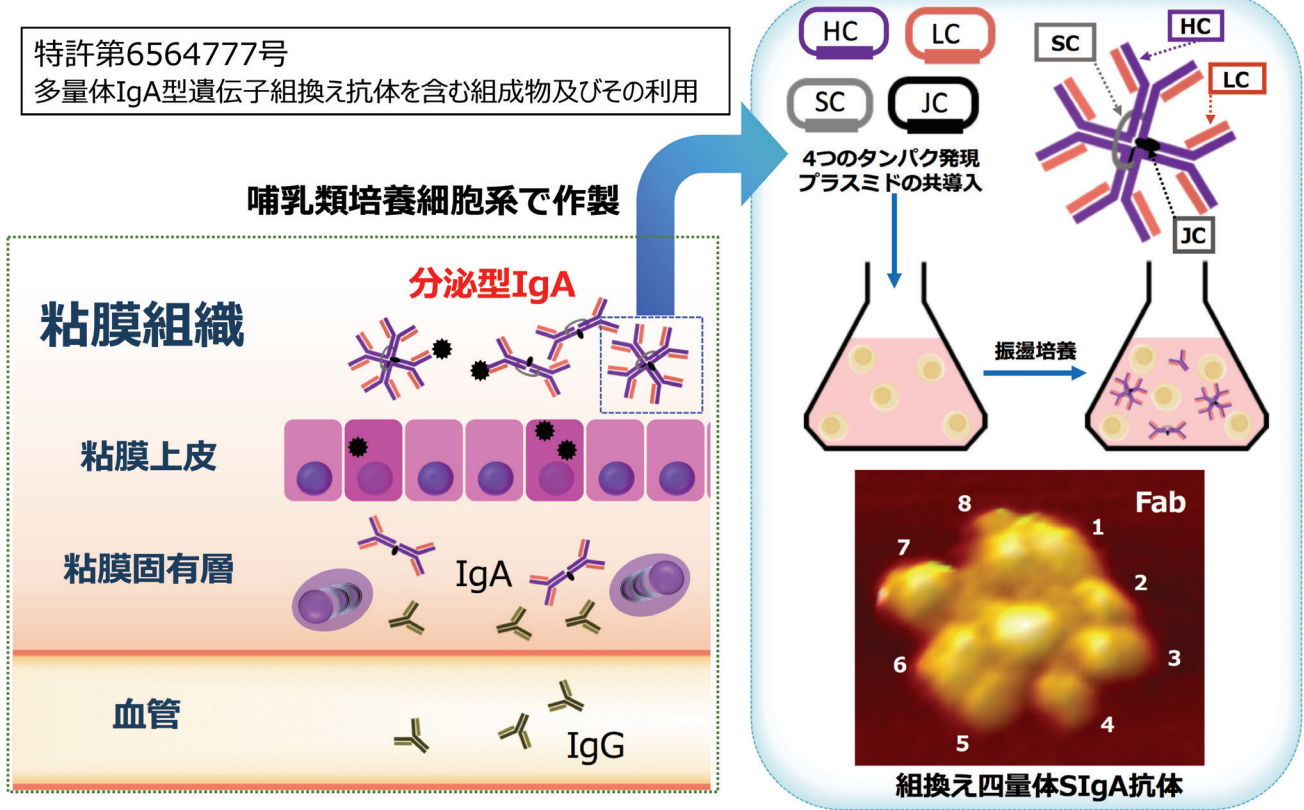


図1 四量体 SIgA 組換え抗体作製技術. ヒトの気道粘膜上に存在しウイルス感染防御に重要な役割を担っていると考えられている四量体 SIgA 抗体を人工的に作製する技術を開発した. 作製した組換え抗体は血液中にある抗体とは異なり, 粘膜中に存在する四量体 SIgA 抗体と同様に病原体を認識する8つの腕を持っており, 花のような形状をしている.

いると考えられた.

## 5. モノクローナル四量体 SIgA 抗体を用いた SIgA 抗体の感染防御機構の解析

以上のような経鼻ワクチン接種者から採取した鼻腔洗浄液中に存在する SIgA 抗体を用いた解析により, 血清中には存在しない高い抗ウイルス活性を持つ多量体 SIgA 抗体が経鼻ワクチンの有効性発現機構において重要であることが分かってきた. しかし, これらの多量体 SIgA 抗体の抗ウイルス活性が高くなる(高機能化する)機構については, 不明である. HS-AFM の観察結果からは抗原認識部位が増加したことによる結合力の亢進が多量体化の効果の中心を担うことが示唆されたが, 抗体の結合力と抗ウイルス活性に対する多量体化の効果を定量的に評価し, 多量体化が IgA 抗体の機能亢進をもたらす分子機構を明らかにするためには, 鼻腔洗浄液中のポリクローナルな状態の抗体の解析のみでは限界がある. このような解析のためには, 様々なアイソタイプ, 四次構造の抗体をモノクローナル抗体として作製し, その機能を比較解析する必要があるが, 二量

体よりも大きな多量体型のモノクローナル IgA 抗体を作製する手法は確立されていなかった<sup>33,34)</sup>. そこで, 我々は, 任意の抗原認識部位をコードする  $\alpha$  鎖および軽鎖, J 鎖 (JC), 分泌片 (SC) を哺乳類培養細胞に共導入することにより四量体化した SIgA 組換え抗体を自在に作製する技術を開発した (図1, 多量体 IgA 型遺伝子組換え抗体を含む組成物及びその利用, 特許第 6564777 号)<sup>35)</sup>. この技術により, 同一の抗原認識部位を有する IgG 抗体, 単量体 IgA 抗体, 二量体 IgA 抗体, 四量体 IgA 抗体の抗ウイルス活性を比較検討し, 抗ウイルス活性に与える多量体 IgA 化の効果を定量的に評価することが可能となった.

抗ウイルス活性に与える多量体 IgA 化の効果は抗原認識部位に依存して変化する可能性が考えられることから, 鼻腔洗浄液由来のポリクローナルな状態の抗体で観察された現象の解明のためには, 鼻腔粘膜中の IgA 抗体の中で抗ウイルス活性の中心的役割を担っている抗体クローンをを用いた評価が必要となる. 抗インフルエンザウイルス活性を持つ抗体の中では, HA 抗原に結合し抗 HI 活性を持つ抗体がインフルエンザの発症抑制に相関することが古くか

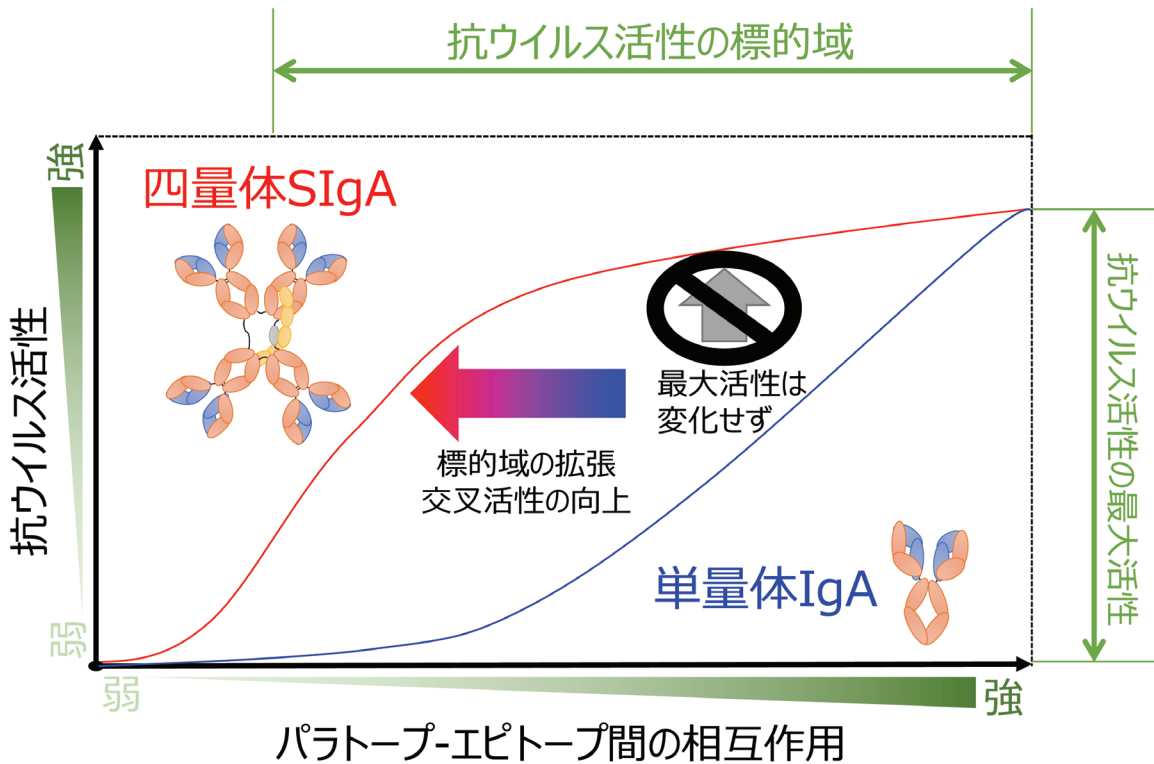


図2 IgA抗体の四量体化による抗ウイルス活性増強の概念図。単量体のIgA抗体の抗ウイルス活性はパラトープとエピトープの間の相互作用により規定されており、パラトープ-エピトープの相互作用が弱い場合には、十分に抗ウイルス活性が発揮されない。一方、この抗体を四量体化させるとパラトープ-エピトープの相互作用が弱い場合でも、高い抗ウイルス活性を示すようになり、最大で抗ウイルス活性が数十倍まで高くなる。しかしながら、強いパラトープ-エピトープ相互作用の存在下で観察される抗ウイルス活性(=抗ウイルス活性の最大活性)は変化せず、IgA抗体の四量体化は抗体の抗ウイルス活性を単純に増加させるのではなく、抗ウイルス活性の標的域(交叉性)を拡張することに寄与していると考えられる。

ら知られており<sup>36, 37)</sup>、血清HI抗体価はワクチン有効性の代替指標(サロゲートマーカー)としても重要視されている<sup>38)</sup>。これまでの解析により鼻腔洗浄液においても中和抗体価とHI抗体価は正の相関性を示しており、HI活性を持つ抗体は鼻腔粘膜中に存在するIgA抗体の中でも抗ウイルス活性の主要な役割を担っていると考えられた。そこで、H3亜型の様々なウイルス株のHA抗原のレセプター認識部位を広く認識し中和活性とHI活性を有する広域中和抗体として報告されていた抗体クローンF045-092<sup>39, 40)</sup>由来の抗原認識部位を持つIgG抗体、単量体IgA抗体、二量体IgA抗体、四量体IgA抗体を作製し、その抗ウイルス活性を比較検討した。その結果、四量体化したIgA抗体では、抗ウイルス活性の標的域が拡大しており、IgG抗体や単量体IgA抗体の状態では十分に中和することができなかった抗原性の異なるウイルス株に対しても、四量体SIgA抗体の状態では高い抗ウイルス活性を示すことが明らかになった。一方で、IgG抗体の状態ですでに十分に高い抗ウイルス活性を示すウイルス株に対しては、四量体化による抗ウイルス活性のそれ以上の増強は認められなかった。このことは、パラトープとエピトープの間の相互作用が十

分に強い場合には、抗体の抗ウイルス活性は抗体の四次構造に依存しないことを意味しており、四量体化は抗原認識部位に依存的に決定される抗体クローン固有の抗ウイルス活性の最大活性は変化させることはできないと考えられた。すなわち、IgA抗体の四量体化は、複数の抗原認識部位を使うことにより弱く不安定なパラトープ-エピトープ間相互作用を安定化させ、IgG抗体の状態では中和活性に十分な結合性がなかった抗原に対して中和活性の発揮に十分なレベルまで結合性を増強させ、交叉活性を向上させていると考えられた<sup>35)</sup>(図2)。これまでの鼻腔洗浄液を用いた研究において鼻腔粘膜の多量体SIgA抗体は交叉中和能が向上していることが明らかになっており<sup>24, 25)</sup>、「1種類の抗原認識部位を有するIgA抗体が多量体化することにより抗原性の異なる多様なウイルスに対応できるようになるのだろう」と考えられていたが、この仮説の検証は十分ではなかった。モノクローナル四量体SIgA抗体を用いた本研究により、IgA抗体の四量体化は抗ウイルス活性の標的域を拡張しウイルス抗原変異に対する頑強性の向上に寄与していることが科学的に証明され、二量体以上の多量体SIgA抗体のインフルエンザウイルス感染防御における重

要性が改めて強調された。この成果は、従来のインフルエンザワクチンにはない経鼻インフルエンザワクチンに特有のワクチン作用機序の一端を明らかにするものであり、経鼻ワクチン有効性の科学的根拠を示すことにより、現在進められている経鼻不活化インフルエンザワクチンの実用化を強力にバックアップするものである。さらに、本研究で開発した四量体 SIgA 組換え抗体作製技術は、ワクチンの有効性を解明する基礎研究のツールとしてだけでなく、粘膜組織に特化した新たな抗体医薬のプラットフォームとしての応用も可能と考えられている。現在、様々な分野で抗体医薬が重要視されているが、現在までに実用化されている抗体医薬は全て IgG 型抗体医薬である。IgG 抗体とは異なる性質を有している IgA 抗体を基本骨格とする IgA 型抗体医薬の開発は抗体医薬の可能性をさらに大きく広げることが期待できる。

### 6. 経鼻不活化インフルエンザワクチン実用化後の研究課題

現在、国内のワクチンメーカーにより経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンの承認申請に向けた臨床開発が着々と進められている。一方、ワクチンの真の有効性を評価するためには治験による評価だけではなく、市販後の継続的な調査が必要不可欠である。特に流行株が毎年のように変わるインフルエンザワクチンにおいては、ことさら市販後調査により毎年のワクチン有効性を評価すべきであり、欧米各国では現行のワクチンに対しても国が主導し毎年のように有効性の調査研究が行われている。また、現在、経鼻ワクチンだけでなく様々な形態のインフルエンザワクチンの開発が進んでおり、それぞれのワクチンの有効性の差異などについても継続的に評価する必要がある。そのためには、ワクチンの有効性発現機序に基づいた適切なサロゲートマーカーの開発が必須である。近年、ヒトにおいてワクチンにより誘導される免疫をモノクローナル抗体レベルで理解することが可能となってきており、インフルエンザワクチン接種者の体内に誘導される個々の抗体の性質を解析する研究が世界中で活発に実施されている<sup>4)</sup>。その結果、各抗体クローンの認識するエピトープや構造によってウイルスへの感染防御機構が異なっており、そのような抗体の機能は古典的な中和抗体測定法では評価できないことが明らかになってきた。このことは、血清中和抗体や血清 HI 抗体の量を指標とした従来のワクチン有効性の評価方法では、インフルエンザワクチンにより誘導される免疫を十分に評価できていない可能性を示唆している。経鼻インフルエンザワクチンにおいても、その有効性発現機構の科学的根拠を明確に示し、ワクチン有効性発現機序に基づいた最適なサロゲートマーカーを開発する必要がある。そのためには、「経鼻インフルエンザワクチン接種によって、どのような構造的・機能的特徴を有する抗体がそれぞれど

の程度ヒト体内で誘導されるのか」という問いに答える必要がある。この問いに解答を与えるために、経鼻ワクチンにより誘導される抗体の特徴をモノクローナルレベルに評価すると同時にワクチン接種者体内で誘導される抗体集団全体（レパトア）を網羅的に俯瞰するような研究を進めていくことが重要である。現在、我々の研究室では、四量体 SIgA 組換え抗体作製技術を経鼻ワクチンで誘導される個々の抗体クローンに応用することにより、個々の抗体の機能をモノクローナル抗体レベルで評価し、さらに抗体レパトア解析を組み合わせることにより、経鼻ワクチンで誘導される液性免疫の高分解かつ網羅的な理解を目指した研究を進めている。このような研究により、精度の高い経鼻ワクチンのサロゲートマーカーの開発に成功すれば、近い将来、様々な形態の製剤が利用可能となっているはずのインフルエンザワクチンの中で経鼻ワクチンの臨床的位置付けが明確化され、インフルエンザワクチンを適切に使い分け、より効果的なインフルエンザ流行制御が可能となることが期待される。

### 謝辞

本稿で紹介した我々の研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 (課題番号 JP18fk0108012, JP18fk0108051, JP19fk0108083) および感染症研究革新イニシアティブ (課題番号 JP18fm0208002)、日本学術振興会科学研究費補助金 (課題番号 17K08386) の支援を受けて実施されたものです。また、四量体 SIgA 組換え抗体作製技術は株式会社ニッピバイオマトリクス研究所の後藤希代子先生らと共同で開発したものです。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

### 引用文献

- 1) 菅谷憲夫. 抗インフルエンザ薬治療, 日本と欧米の違い. *インフルエンザ*. 2019;20(1):13-6.
- 2) 菅谷憲夫. インフルエンザ診療, 最近の進歩. *日本化学療法学会雑誌*. 2003;51(2):55-9.
- 3) 延原弘章, 渡辺由美, 三浦宜彦. わが国におけるインフルエンザワクチン接種率の推計. *日本公衆衛生雑誌*. 2014;61(7):354-9.
- 4) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課. インフルエンザ 2018/19 シーズン. *IASR*. 2019;40(11):177-9.
- 5) 中山哲夫. インフルエンザスプリットワクチンの限界と新規ワクチンの開発. *モダンメディア*. 2015;61(10):283-9.
- 6) 福島若葉, 森川佐依子, 松本一寛, 藤岡雅司, 松下享, 久保田恵巳, 八木由奈, 武知哲久, 高崎好生, 進藤静生, 山下祐二, 横山隆人, 清松由美, 廣井聡, 中田恵子, 前田章子, 伊藤一弥, 大藤さところ, 加瀬哲男, 廣田良夫.

- 6歳未満児におけるインフルエンザワクチンの有効性：2013/14～2017/18シーズンのまとめ（厚生労働省研究班報告として）. *IASR*. 2019;40(11):194-5.
- 7) Sano K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H. Intranasal inactivated influenza vaccines for the prevention of seasonal influenza epidemics. *Expert Rev Vaccines*. 2018;17(8):687-96.
  - 8) Maassab HF. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees c. *Nature*. 1967;213(5076): 612-4.
  - 9) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumaska T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Izuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol*. 2012;25(1):1-13.
  - 10) Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumaska T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol*. 2013;26(3):357-69.
  - 11) Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol*. 2011;4(6):590-7.
  - 12) Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(12):821-32.
  - 13) Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen F-E, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol*. 2008;1(1):11-22.
  - 14) Tamura S. Studies on the usefulness of intranasal inactivated influenza vaccines. *Vaccine*. 2010;28(38): 6393-7.
  - 15) van Riet E, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine*. 2012;30(40):5893-900.
  - 16) Suzuki T, Aina A, Hasegawa H. Functional and structural characteristics of secretory IgA antibodies elicited by mucosal vaccines against influenza virus. *Vaccine*. 2017;35(39):5297-302.
  - 17) Sano K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H. The road to a more effective influenza vaccine: Up to date studies and future prospects. *Vaccine*. 2017;35(40):5388-95.
  - 18) Belshe RB, Mendelman PM, Treanor J, King J, Gruber WC, Piedra P, Bernstein DI, Hayden FG, Kotloff K, Zangwill K, Iacuzio D, Wolff M. The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children. *N Engl J Med*. 1998;338(20):1405-12.
  - 19) Monto AS, Ohmit SE, Petrie JG, Johnson E, Truscon R, Teich E, Rotthoff J, Boulton M, Victor JC. Comparative efficacy of inactivated and live attenuated influenza vaccines. *N Engl J Med*. 2009;361(13):1260-7.
  - 20) Grohskopf LA, Sokolow LZ, Broder KR, Olsen SJ, Karron RA, Jernigan DB, Bresee JS. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines. *MMWR Recomm Rep*. 2016;65(5):1-54.
  - 21) Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, Stry C, Steffen R. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med*. 2004;350(9):896-903.
  - 22) Sendi P, Locher R, Bucheli B, Battegay M. Intranasal influenza vaccine in a working population. *Clin Infect Dis*. 2004;38(7):974-80.
  - 23) Aina A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(9):1962-70.
  - 24) Terauchi Y, Sano K, Aina A, Saito S, Taga Y, Ogawa-Goto K, Tamura SI, Odagiri T, Tashiro M, Fujieda M, Suzuki T, Hasegawa H. IgA polymerization contributes to efficient virus neutralization on human upper respiratory mucosa after intranasal inactivated influenza vaccine administration. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14(6):1351-61.
  - 25) Suzuki T, Kawaguchi A, Aina A, Tamura S, Ito R, Multihartina P, Setiawaty V, Pangesti KN, Odagiri T, Tashiro M, Hasegawa H. Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(25):7809-14.
  - 26) Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, Kumagai Y, Kobiyama K, Tougan T, Sakurai K, Coban C, Horii T, Akira S, Ishii KJ. Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med*. 2010;2(25):25ra4.
  - 27) Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol*. 2012;84(2):336-44.
  - 28) Ambrose CS, Wu X, Jones T, Mallory RM. The role of nasal IgA in children vaccinated with live attenuated influenza vaccine. *Vaccine*. 2012;30(48):6794-801.
  - 29) Tomasi TB, Jr., Tan EM, Solomon A, Prendergast RA. Characteristics of an Immune System Common to Certain External Secretions. *J Exp Med*. 1965;121:101-24.
  - 30) Svehag SE, Bloth B. Ultrastructure of secretory and high-polymer serum immunoglobulin A of human and rabbit origin. *Science*. 1970;168(3933):847-9.
  - 31) Bloth B, Svehag SE. Further studies on the ultrastructure of dimeric IgA of human origin. *J Exp Med*. 1971;133(5):1035-42.
  - 32) Halpern MS, Koshland ME. The stoichiometry of J chain in human secretory IgA. *J Immunol*. 1973;111(6): 1653-60.
  - 33) Chintalacheruvu KR, Morrison SL. Production of secretory immunoglobulin A by a single mammalian cell. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(12):6364-8.
  - 34) Berdoz J, Blanc CT, Reinhardt M, Kraehenbuhl JP, Corthésy B. In vitro comparison of the antigen-binding and stability properties of the various molecular forms of IgA antibodies assembled and produced in

- CHO cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(6):3029-34.
- 35) Saito S, Sano K, Suzuki T, Ainai A, Taga Y, Ueno T, Tabata K, Saito K, Wada Y, Ohara Y, Takeyama H, Odagiri T, Kageyama T, Ogawa-Goto K, Multihartina P, Setiawaty V, Pangesti KNA, Hasegawa H. IgA tetramerization improves target breadth but not peak potency of functionality of anti-influenza virus broadly neutralizing antibody. *PLoS Pathog*. 2019;15(1):e1007427.
- 36) Sugiura A, Yanagawa H, Enomoto C, Ueda M, Tobita K. A field trial for evaluation of the prophylactic effect of influenza vaccine containing inactivated A2-Hong Kong and B influenza viruses. *J Infect Dis*. 1970;122(6):472-8.
- 37) Hobson D, Curry RL, Beare AS, Ward-Gardner A. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J Hyg (Lond)*. 1972;70(4):767-77.
- 38) Ohmit SE, Petrie JG, Cross RT, Johnson E, Monto AS. Influenza hemagglutination-inhibition antibody titer as a correlate of vaccine-induced protection. *J Infect Dis*. 2011;204(12):1879-85.
- 39) Lee PS, Ohshima N, Stanfield RL, Yu W, Iba Y, Okuno Y, Kurosawa Y, Wilson IA. Receptor mimicry by antibody F045-092 facilitates universal binding to the H3 subtype of influenza virus. *Nat Commun*. 2014;5:3614.
- 40) Ohshima N, Iba Y, Kubota-Koketsu R, Asano Y, Okuno Y, Kurosawa Y. Naturally occurring antibodies in humans can neutralize a variety of influenza virus strains, including H3, H1, H2, and H5. *J Virol*. 2011;85(21):11048-57.
- 41) Krammer F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(6):383-97.

## **IgA antibodies contribute to protection against influenza virus infection**

**Tadaki SUZUKI, Hideki HASEGAWA**

Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases

IgA antibody, whose production exceeds that of all other immunoglobulin classes combined, is the major immunoglobulin isotype in humans. In addition, IgA antibody, which is secreted onto the mucosal surface as a secretory IgA antibody (SIgA), plays an important role as a first line of defense by inactivating pathogens such as influenza viruses, and is a key molecule that underpins the action of intranasal influenza vaccines. Therefore, understanding how SIgA works is important if we are to accelerate development of the intranasal influenza vaccines. A recent report shows that the polymerization status of SIgA defines their functionality in the human upper respiratory mucosa. Higher order polymerization of SIgA such as a tetrameric form leads to a marked increase in neutralizing activity against influenza viruses. Moreover, we developed a method for generating tetrameric SIgA monoclonal antibodies, and then compared the anti-viral function of the tetrameric SIgA with that of monomeric IgG or IgA. The analysis revealed that tetramerization of SIgA improved target breadth, but not peak potency of antiviral functions. This phenomenon presumably represents one of the mechanisms by which mucosal SIgAs induced by intranasal influenza vaccines show potential antiviral activities against broad range of influenza viruses. These results broaden our knowledge about the fundamental role of SIgA in influenza protection.