

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

喘息モデルマウスを用いた新型インフルエンザ感染による
気管支喘息発作重症化の病態解析

研究分担者 長谷川俊史 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・准教授
研究協力者 市山高志 鼓ヶ浦こども医療福祉センター・副院長
岡田清吾 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・助教

研究要旨

【目的】 2009 年世界的に流行した新型インフルエンザ（2009 pandemic H1N1, A(H1N1) pdm09）は季節性インフルエンザに比し呼吸器合併症が多く、当科においても喘息症例での重症化が多くみられたが、その病態はいまだ明らかでない。本研究ではその病態解明のため、新型インフルエンザ感染喘息マウスの気管支肺胞洗浄液（BAL）を解析した。

【方法】 BALB/c マウスを卵白アルブミンの感作および吸入により喘息モデルマウスを作成し、新型インフルエンザを感染させ、感染後 7 日に BAL を回収した。サイトカイン濃度、ウィルス力価を測定し、喘息感染群、喘息非感染群、非喘息感染群、非喘息非感染群の 4 群間で比較検討した。

【結果】 感染群では非感染群に比し BAL 中 IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ の濃度が有意に高値だった。喘息感染群では IL-6, IL-10, TNF- α 濃度が非喘息感染群に比し有意に高値だったが、IFN- γ 濃度は有意に低値だった。BAL 中ウィルス力価は喘息感染群が非喘息感染群に比し有意に高値だった。

【結論】 新型インフルエンザ感染は喘息モデルマウスにおいてより高いサイトカイン産生およびウィルス増殖を示し、強い炎症を惹起し、呼吸器症状を重篤化させる可能性が示唆された。

A. 研究目的

新型インフルエンザ（2009 pandemic H1N1, A(H1N1) pdm09）感染では呼吸器症状を主訴に受診する患者が多く、ときに致命的になる。気管支喘息がその増悪因子の一つと考えられているが、その病態の詳細に

については未だ不明である。申請者らが当科に入院した新型インフルエンザ感染入院症例について後方視的に検討したところ、季節性インフルエンザに比し、有意に喘息発作、肺炎や無気肺などの肺合併症が多く、また通常の喘息発作症例に比し、高率に重

篤な気管支喘息発作を合併したことを報告した (Pediatr Allergy Immunol, 2011). 肺合併症を来した全例で血清総 IgE 値が上昇しており,このうち約 70%が気管支喘息と診断されていなかった症例や 1 年以上発作のなかった症例であった (Hasegawa S., et al. Pediatr Allergy Immunol, 2011). 以上のことから新型インフルエンザ感染においては季節性インフルエンザと異なり喘息発作の重症化は気管支喘息の重症度と関係なく一見基礎疾患のないようにみえる軽症の気管支喘息であっても重篤な肺合併症の危険因子である可能性が示唆された.しかしその病態は十分解明されておらず, 予防法もまだ確立されていない.

B . 研究方法

卵白アルブミン (OVA) で喘息モデルマウスを作製し, 新型インフルエンザウイルス(マウス馴化株, 国立感染症研究所から分与) を経鼻感染 (1×10^6 pfu/マウス) させ, 感染後 7 日めに気管支肺胞洗浄液を回収し, フローサイトメトリー, プラークアッセイ, サイトカイン測定を行い, 喘息マウスと非喘息マウスの差異について比較検討する.

(倫理面への配慮)

本研究では培養細胞およびマウスを使用する. マウスの感染実験に関しては敷地内に動物実験施設があり, 研究を行っていく上で同施設内の倫理的かつ技術的な講習を受講し, 研究計画審査を受け, 承認を得たあと本研究を遂行した.

C . 研究結果

分担者らは卵白アルブミンを用いて喘息モデルマウスを作製し (喘息モデルマウスの作製は気管支肺胞洗浄液中の細胞増多, 特に好酸球の増多により確認), 新型イン

フルエンザウイルスを感染させたところ非喘息マウスに比して気管支肺胞洗浄液において炎症性サイトカインの interleukin (IL)-6 が有意に高値であった. Tumor necrosis factor (TNF)- および抗炎症性サイトカインの IL-10 も同様の結果であった. 一方で Th1 タイプのサイトカインである interferon (IFN)- 濃度は感染喘息マウスで有意に低値であった. また感染喘息マウスでは非喘息マウスに比して気管支肺胞洗浄液中ウイルス力価が有意に高値であった.

D . 考察

以上の結果から分担者らが作製したモデルマウスは新型インフルエンザ感染喘息モデルマウスでは感染非喘息マウスに比し, 肺において Th1 細胞活性化低下により強いサイトカイン産生およびウイルス増殖を来し, より強い炎症が惹起されることが示唆され, このモデルマウスは小児気管支喘息患者における新型インフルエンザ感染症例のモデルとして矛盾はないと考える.

E . 結論

新型インフルエンザ感染は喘息モデルマウスにおいて非喘息マウスに比して, より強い細胞浸潤やより高いサイトカイン産生, ウイルス増殖を示し, 強い炎症を惹起し, 呼吸器症状を重篤化させている可能性が示唆された.

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Oka M, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Ishikawa N, Isumi H, Ichiyama T. Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of children with acute disseminated encephalomyelitis.

- Brain Dev.2012, in press.
2. Hasegawa S, Wakiguchi H, Hirano R, Okazaki F, Kudo K, Ichiyama T. Tau protein levels in children do not increase during severe asthma attack-induced hypoxic conditions. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2012, in press.
 3. Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Takahara M, Kajimoto M, Momonaka H, Ishida C, Tanaka S, Morishima T, Ichiyama T. Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2012, in press.
 4. Matsushige T, Inoue H, Fukunaga S, Hasegawa S, Okuda M, Ichiyama T. Serum neurofilament concentrations in children with prolonged febrile seizures. *J Neurol Sci*. 2012, in press.
 5. Kudo K, Hasegawa S, Suzuki Y, Hirano R, Wakiguchi H, Kittaka S, Ichiyama T. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits vascular cellular adhesion molecule-1 expression and interleukin-8 production in human coronary arterial endothelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012; 132:290-294.
 6. Inoue H, Matsushige T, Hasegawa S, Abe A, Iida Y, Inoue T, Ichiyama T. Elevation of tau protein levels in the cerebrospinal fluid of children with West syndrome. *Epilepsy Res*.2012, in press.
 7. Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A. Pertussis-associated encephalitis/encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci*. 2012; 320: 145-8.
 8. Haneda Y, Kando N, Yasui M, Kobayashi T, Maeda T, Hino A, Hasegawa S, Ichiyama T, Ito K. Ovomucoids IgE is a better marker than egg white-specific IgE to diagnose boiled egg allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129: 1681-2.
 9. Shimomura M, Hasegawa S, Seki Y, Fukano R, Hotta N, Ichiyama T. Intravenous immunoglobulin does not increase Fc RIIB expression levels on monocytes in children with immune thrombocytopenia. *Clin Exp Immunol*. 2012; 169: 33-7.
 10. Abe Y, Hashimoto K, Iinuma K, Ohtsuka Y, Ichiyama T, Kusuhara K, Nomura K, Mizuguchi M, Aiba H, Suzuki Y, Mizusawa H, Hosoya M. Survey of subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *J Child Neurol*. 2012; 27: 1529-33.
 11. Wakamoto H, Takahashi Y, Ebihara T, Okamoto K, Hayashi M, Ichiyama T, Ishii E. An immunologic case study of acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures. *Brain Dev*. 2012; 34: 763-7.
 12. Hasegawa S, Ichiyama T, Sonaka I, Ohsaki A, Okada S, Wakiguchi H, Kudo K, Kittaka S, Hara M, Furukawa S. Cysteine, histidine and glycine exhibit anti-inflammatory effects in human coronary arterial

- endothelial cells. Clin Exp Immunol. 2012; 167: 269-74.
13. Tanaka N, Emoto T, Suda H, Kunihiro Y, Matsunaga N, Hasegawa S, Ichiyama T. High-resolution computed tomography findings of influenza virus pneumonia: a comparative study between seasonal and novel (H1N1) influenza virus pneumonia. Jpn J Radiol. 2012; 30: 154-61.
 14. Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. J Med Microbiol. 2012; 61(Pt 3): 410-9.
 15. Yüksel D, Ichiyama T, Yilmaz D, Anlar B. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E levels in subacute sclerosing panencephalitis. Brain Dev. 2012; 34: 298-301.
 16. Inoue H, Orita T, Matsushige T, Hasegawa S, Ichiyama T. Klinefelter's syndrome complicated with West syndrome in a 4-month-old boy. Brain Dev. 2012; 34: 148-50.
 17. 原 正美, 松原知代, 長谷川俊史, 古川 漸. ダニアレルゲン簡易キット「ダニ検査用マイティチェッカー」の使用経験. 小児保健研究 2012; 71: 773-779.
 18. 荘司貴代, 鈴木 陽, 澤井俊宏, 松井亨, 長谷川俊史, 西尾寿乗, 岩田 敏, 尾内一信. 小児感染症専門医育成プログラム. 小児科臨床 2012; 65: 503-506.
 19. 長谷川俊史. 好酸球性肺炎, 過敏性肺炎. 大関武彦, 古川 漸, 横田俊一郎, 水口 雅. 今日の小児治療指針 第15版, 東京, 2012年; pp381-382.
 20. 長谷川俊史. 全身性炎症性症候群. 大関武彦, 古川 漸, 横田俊一郎, 水口 雅. 今日の小児治療指針 第15版, 東京, 2012年; pp285-286.
- ## 2 . 学会発表
- 1 Hasegawa S, Okada S, Hasegawa H, Ainai A, Shirabe K, Toda S, Ikemoto K, Sasaki K, Ichiyama T. Cytokine Profiles in Bronchoalveolar Lavage in a Mouse Model of Bronchial Asthma during H1N1 2009 Infection. 17th Asian Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiratory and Immunology. Taipei, 10月19-21日, 2012年
 - 2 長谷川俊史, 岡田清吾, 市山高志, 調恒明, 戸田昌一. 喘息モデルマウスを用いた新型インフルエンザ感染による気管支喘息発作重症化の病態解析. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 11月29日-12月1日, 2012年.
 - 3 長谷川俊史, 松重武志, 梶本まどか, 井上裕文, 百中 宏, 市山高志. インフルエンザ脳症における血清可溶性CD163濃度の検討. 第44回日本小児感染症学会・学術集会, 小倉, 11月24-25日, 2012年.
 - 4 井上裕文, 長谷川俊史, 松重武志, 梶本まどか, 百中 宏, 高原みどり, 市山高志. インフルエンザ脳症における血清 soluble CD163の検討. 第17回日本神経感染症学会総会・学術集会. 京都, 10月19-20日, 2012年.
 - 5 平野玲史, 長谷川俊史, 脇口宏之, 市山高志, 戸田昌一, 岡本玲子, 調 恒

明. 当科における気管支喘息発作入院症例のウイルス学的検討. 第 49 回日本小児アレルギー学会, 大阪, 9 月 15-16 日, 2012 年.

- 6 長谷川俊史, 岡田清吾, 橘高節明, 平野玲史, 市山高志, 調恒明, 戸田昌一, 岡本玲子, 長谷川秀樹, 相内 章. ヒト気道上皮細胞におけるウイルス感染によるサイトカイン産生の検討 新型インフルエンザおよびエンテロウイルス 68 感染と小児気管支喘息発作増悪の関与について . 第 49 回日本小児アレルギー学会, 大阪, 9 月 15-16 日, 2012 年.
- 7 長谷川俊史, 平野玲史, 岡田清吾, 市山高志. アトピー性皮膚炎患者における末梢血 natural killer (NK) 細胞数の検討. 第 49 回日本小児アレルギー学会, 大阪, 9 月 15-16 日, 2012 年.
- 8 井上裕文, 松重武志, 梶本まどか, 原田紗和子, 長谷川俊史, 市山高志. West 症候群における髄液タウ蛋白の動態. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 4 月 20-22 日, 2012 年.
- 9 百中宏, 中司謙二, 岡田清吾, 井上裕文, 梶本まどか, 松重武志, 長谷川俊史, 市山高志. 新型インフルエンザ脳症における血清及び髄液 high mobility group box 1 (HMGB1) 濃度の検討. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 4 月 20-22 日, 2012 年.
- 10 橘高節明, 市山高志, 伊藤嘉規, 梶本まどか, 松重武志, 長谷川俊史, 大淵典子, 鈴木英太郎, 河野祥二. HHV-6 関連熱性けいれん患者における血清 MMP-9 および TIMP-1 の検討. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 4 月 20-22 日, 2012 年.

G . 知的所有権の取得状況

1 . 特許取得

特になし

2 . 実用新案登録

特になし

3 . その他

特になし

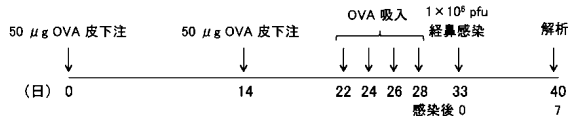


図1 本研究のプロトコール

新型インフルエンザ感染喘息マウスにおける
気管支肺胞洗浄液中 IL-6 濃度

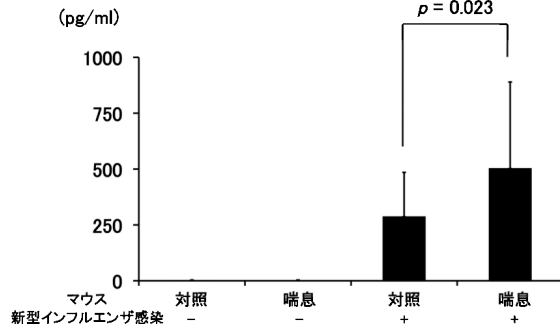


図2 新型インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 IL-6 濃度

新型インフルエンザ感染喘息マウスにおける
気管支肺胞洗浄液中 IL-10 濃度

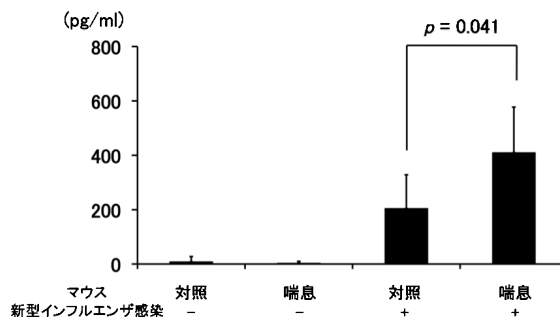


図3 新型インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 IL-10 濃度

新型インフルエンザ感染喘息マウスにおける
気管支肺胞洗浄液中 TNF- α 濃度

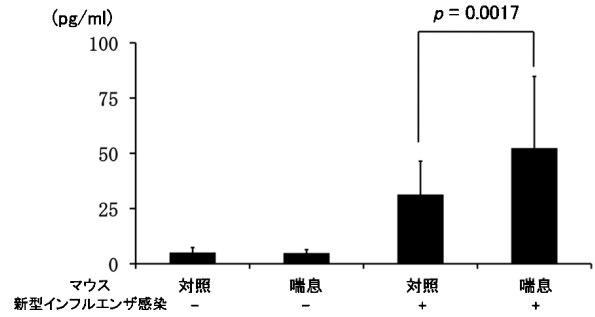


図4 新型インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 TNF- α 濃度

新型インフルエンザ感染喘息マウスにおける
気管支肺胞洗浄液中 IFN- γ 濃度

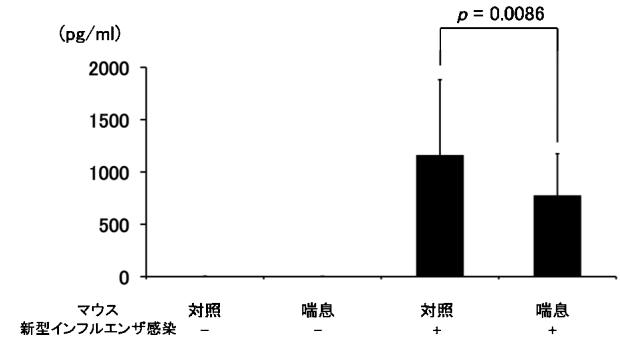


図5 新型インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 IFN- γ 濃度

新型インフルエンザ感染喘息マウスにおける
気管支肺胞洗浄液中ウイルスカ価

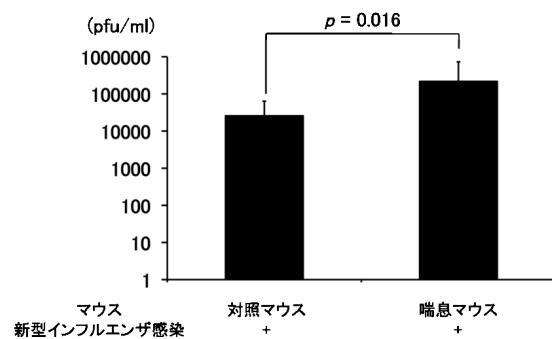


図6 新型インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中ウイルスカ価

