

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
松重武志 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・講師
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
脇口宏之 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（A(H1N1)pdm09）感染では喘息発作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。分担者らはこれまでにA(H1N1)pdm09感染は喘息マウスにおいて非喘息マウスに比し、肺において有意に高いサイトカイン産生およびウイルス増殖を示し、より強い炎症を惹起し、呼吸器症状を重篤化させている可能性を報告した。本研究では更なる病態解明のため季節性インフルエンザ感染における喘息マウスの気管支肺胞洗浄液（BAL）を解析した。

【方法】BALB/cマウスを用いて卵白アルブミンにより喘息モデルマウスを作製し、季節性インフルエンザウイルスを感染させ、感染後7日にBAL中のサイトカイン濃度、ウイルス力価を測定し、非喘息マウスと比較検討した。

【結果】季節性インフルエンザ感染ではA(H1N1)pdm09感染と異なり、喘息マウスにおいてBAL中interleukin (IL)-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ 濃度が非喘息マウスに比し有意に低値で、またBAL中ウイルス力価も有意に低値だった。

【結論】A(H1N1)pdm09感染では季節性と異なって小児気管支喘息発作を重症化させてい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

ついては未だ不明である。分担者らが当科に入院したA(H1N1)pdm09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 (Hasegawa S, et al. *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 **A(H1N1)pdm09 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。

分担者らはこれまでに A(H1N1)pdm09 感染は喘息マウスにおいて非喘息マウスに比し, 肺において有意に高いサイトカイン産生およびウイルス増殖を示し, より強い炎症を惹起し, 呼吸器症状を重篤化させている可能性を報告した (Okada S, et al. *Cytokine*, 2013). 本研究では更なる病態解明のため季節性インフルエンザ感染における喘息マウスの気管支肺胞洗浄液 (BAL) を解析した。

B . 研究方法

卵白アルブミン (OVA) で喘息モデルマウス (BALB/c マウス) を作製し (図 1), 季節性インフルエンザウイルス (A/H1N1/Yamagata, A/H1N1/Puerto Rico, マウス馴化株, 国立感染症研究所から分与) を経鼻感染 (1×10^5 pfu/マウス) させ, 感染後 7 日に BAL を回収し, サイトカイン測定, プラークアッセイを行い, 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 OVA を用いて作製した喘息モデルマウスに **季節性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 BAL 中炎症性サイトカインの interleukin (IL)-6 が有意に低値であった (図 2)**。Tumor necrosis factor (TNF)- (図 3) および抗炎症性サイトカインの IL-10 (図 4) も同様の結果であった。さらに Th1 タイプのサイトカインである **interferon (IFN)- 濃度も感染喘息マウスで有意に低値であった (図 5)**。また感染喘息マウスでは非喘息マウスに比して **BAL 中ウイルス力価が有意に低値であった (図 6)** (論文投稿中)。

D . 考察

以上の結果から季節性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, A(H1N1)pdm09 とは異なって肺においてサイトカイン産生およびウイルス増殖が低く, 炎症が惹起されにくいことが示唆された。当初は A(H1N1)pdm09 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炎症が惹起されることを推測していたが, A(H1N1)pdm09 および季節性インフルエンザ感染いずれにおいても喘息マウスでは非喘息マウスに比し, 有意に IFN- 濃度が低値であることから単に Th1/Th2 バランスだけでは説明できない複雑な病態であることが示唆された。今後更なる病態解明が必要である。

E . 結論

A(H1N1)pdm09 感染は季節性と異なって喘息モデルマウスでは非喘息マウスに比して、肺におい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 . Takahashi K, Hasegawa S, Maeba S, Fukunaga S, Motoyama M, Hamano H, Ichiyama T. Serum tau protein level serves as a predictive factor for neurological prognosis in neonatal asphyxia. Brain Dev. 2013; in press.
- 2 . Kajimoto M, Hasegawa S, Nomura S, Inoue H, Matsushige T, Ichiyama T. An 11-year-old girl with recurrent bacterial meningitis due to liquorrhea caused by bone malformation of the skull base. Brain Dev. 2013; in press.
- 3 . Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Takahara M, Kajimoto M, Momonaka H, Oka M, Isumi H, Emi S, Hayashi M, Ichiyama T. Serum and cerebrospinal fluid levels of visinin-like protein-1 in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. Brain Dev. 2013; in press.
- 4 . Momonaka H, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Okada S, Nakatsuka K, Morishima T, Ichiyama T. High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1

influenza-associated

encephalopathy. Brain Dev. 2013; in press.

- 5 . Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. Cytokine. 2013; 63: 194-200.
- 6 . 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). 2013; in press.
- 7 . Oka M, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Ishikawa N, Isumi H, Ichiyama T. Tau protein concentrations in the cerebrospinal fluid of children with acute disseminated encephalomyelitis. Brain Dev. 2014; 36: 16-20.
- 8 . 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. 2013; 35: 626-9.
- 9 . 長谷川俊史, 岡田清吾, 市山高志. 【感染と喘息】感染と小児喘息の臨床. アレルギーの臨床2013; 33巻11号: 1012-1016.

- 1 0 . 長谷川俊史, 市山高志. 【ワンランク上の小児の臨床検査-病態生理に基づく選び方・考え方-】感染症の臨床検査 敗血症 (Q&A/特集). 小児科学レクチャー. 2013; 3巻2号: 316-322.
- 1 1 . 福島慎二, 阿部克昭, 河合泰宏, 新田雅彦, 長谷川俊史, 弓削昭彦. 脳症の診療をさらに改善するためには? 小児科臨床 2013; 66巻3号: 510-514.
- 1 2 . 原正美, 長谷川俊史, 松原知代, 山口公一, 百瀬希美, 古川漸. 母乳中のアレルゲン濃度と食事との関連(続報) 母乳中のオボアルブミン濃度とラクトフェリンについて. 日本食育学会誌. 2013; 7巻2号: 155-160.
- 1 3 . 原正美, 松原知代, 山口公一, 長谷川俊史, 大山昇一, 加藤重城, 古川漸. 母乳中のアレルゲン濃度と食事との関連 ELISA法による検討. 日本食育学会誌. 2013; 7巻1号: 13-20.
- 2 . 学会発表
- 1 . 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 116 回日本小児科学会学術集会. 広島. 2013.4.19-21.
- 2 . 長谷川俊史. 気管支喘息とウイルス感染. 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 横浜. 2013.5.11-12.
- 3 . Shunji Hasegawa, Reiji Hirano, Hiroyuki Wakiguchi, Reiko Okamoto-Nakagawa, Shoichi Toda, Shuji Hamaoka, Hiroyuki Tsukagoshi, Kunihisa Kozawa, Hirokazu Kimura, Masahiro Noda, Takashi Ichiyama, Komei Shirabe. Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: virus-induced asthma in Japanese children. APAPARI2013. Bangkok. 2013.10.2-4.
- 4 . 長谷川俊史, 岡田清吾, 脇口宏之, 市山高志, 長谷川秀樹, 相内章, 調恒明, 戸田昌一, 熱田了. 喘息モデルマウスを用いた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～新型と季節性インフルエンザの比較～. 第 50 回日本小児アレルギー学会. 横浜. 2013.10.19-20.
- 5 . 長谷川俊史, 脇口宏之, 岡田清吾, 市山高志, 長谷川秀樹, 相内章, 調恒明, 戸田昌一, 熱田了. 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肺胞洗浄液中ケモカイン濃度の検討. 第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会. 札幌. 2013.10.26-27.
- 6 . 長谷川俊史, 岡田清吾, 脇口宏之, 市山高志, 調恒明, 戸田昌一, 熱田了. モデルマウスを用いた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～新型と季節性の比較～. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京. 2013.11.28-30.
- 7 . 梶本まどか, 井上裕文, 松重武志, 岡桃子, 百中宏, 長谷川俊史. Suppression-burst pattern を呈した新生児期発症のてんかん症候群の双子例. 第 47 回日本てんかん学会学術集会. 福岡. 2013.10.11-12.
- 8 . 鈴木康夫, 岡田清吾, 岡山直子, 末広 寛, 梶本まどか, 下村麻衣子, 長谷川俊史. 新生児 Marfan 症候群の 1 例. 第 49 回日本小児循環器学会. 東京. 2013.7.13
- 9 . 鈴木康夫, 岡田清吾, 中家希, 長谷川俊史. 心機能低下を合併し血漿交換療法施行後、デルタ波の出現を認めた川崎病 1 男児例. 第 33 回日本川崎病学会・学術集会. 富山. 2013.9.27-28.
- 1 0 . 松重武志, 井上裕文, 梶本まどか, 百中宏, 長谷川俊史, 市山高志. ケント食療法が著効した GLUT1 異常症

- の1例. 第55回日本小児神経学会学術集会. 大分. 2013.5.30-6.1.
- 1 1 . 松重武志, 井上裕文, 脇口宏之, 岡桃子, 梶本まどか, 百中宏, 長谷川俊史. 3年以上発作コントロール良好な14番環状染色体の1例. 第47回日本てんかん学会学術集会. 福岡. 2013.10.11-12.
- 1 2 . 松重武志, 有吉平, 井上裕文, 岡桃子, 梶本まどか, 脇和之, 百中宏, 尾内一信, 長谷川俊史. 帯状疱疹経過中に無菌性髄膜炎を合併した14歳男児例. 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会. 札幌. 2013.10.26-27.
- 1 3 . 工藤敬子, 木村献, 前場進治, 長谷川俊史. 羊水と出生後児の染色体検査の結果が異なった2症例. 第58回日本未熟児新生児学会・学術集会. 石川. 2013.11.30-12.2.
- 1 4 . 脇口宏之, 岡田清吾, 長谷川秀樹, 相内章, 戸田昌一, 調恒明, 長谷川俊史. 喘息モデルマウスを用いた新型インフルエンザ感染における気管支肺胞洗浄液中ケモカインの検討. 第50回日本小児アレルギー学会. 横浜. 2013.10.19-20.
- 1 5 . 脇口宏之, 長谷川俊史, 岡田清吾, 脇口宏之, 市山高志, 長谷川秀樹, 相内章, 調恒明, 戸田昌一, 熱田了. 喘息モデルマウスを用いた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～新型と季節性インフルエンザの比較～. 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会. 札幌. 2013.10.26-27.
- 1 6 . 井上裕文, 梶本まどか, 松重武志, 百中宏, 片野晴隆, 高橋幸利, 長谷川俊史. 抗GluR抗体陽性非ヘルペス性急性辺縁系脳炎におけるサイトカインの経時的変化. 第18回日本神経感染症学会総会・学術集会. 宮崎. 2013.10.11-12.
- 1 7 . 岡桃子, 長谷川俊史, 松重武志, 井上裕文, 梶本まどか, 石川尚子, 伊住浩史, 市山高志. 急性散在性脳脊髄炎における髄液中タウ蛋白値の検討. 第116回日本小児科学会学術集会. 広島. 2013.4.19-21.
- 1 8 . 岡田清吾, 長谷川俊史, 長谷川秀樹, 相内章, 池本健三, 佐々木功典, 戸田昌一, 調恒明, 市山高志. インフルエンザ A/H1N12009 感染による気管支喘息モデルマウスの気管支肺胞洗浄液解析. 第116回日本小児科学会学術集会. 広島. 2013.4.19-21.
- 1 9 . Seigo Okada, Shunji Hasegawa, Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Ryo Atsuta, Kenzo Ikemoto, Kohsuke Sasaki, Shoichi Toda, Komei Shirabe, Midori Takahara, Sawako Harada, Tsuneo Morishima, Takashi Ichiyama. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. Kuching. 2013.5.9-12.
- 2 0 . 岡田清吾, 鈴木康夫, 有村卓朗, 木村彰方, 鳴海宏子, 長谷川俊史. -Cardiac Myosin Heavy Chain (MYH7) 遺伝子の新規点変異をみとめた肥大型心筋症の12歳男児例. 第49回日本小児循環器学会総会・学術集会. 東京. 2013.7.11-13.
- 2 1 . 岡田清吾, 鈴木康夫, 東良紘, 井上裕文, 高原みどり, 長谷川俊史. 急性期川崎病患児の末梢血単球/マクロファージにおけるCD163発現に関する検討. 第33回日本川崎病学会・学術集会. 富山. 2013.9.27-28.
- 2 2 . 岡田清吾, 中家希, 戸田昌一, 調恒明, 岡本玲子, 尾内一信, 長谷川俊史. 当科における気管支喘息入院患児のウイルス感染関与の検討. 第46回日本小児呼吸器学会. 佐賀. 2013.11.22-23.
- 2 3 . 市村卓也, 前場進治, 長谷川俊史. 出生後に肝内腫瘍が自然消退した超低出生体重児の一例. 第49回日本周産期・新生児医学会総会および学術集会. 横浜. 2013.7.14-16.
- 2 4 . 木村献, 工藤敬子, 前場進治, 長谷川俊史. 結紮術により呼吸状態の改善を認めた動脈管閉存症(PDA)を合併したsevere bronchopulmonary dysplasia(BPD)の1例. 第58回日本

未熟児新生児学会・学術集会. 石川.
2013.11.30-12.2.

25 . 中家希, 岡田清吾, 戸田昌一, 調
恒明, 岡本玲子, 尾内一信, 長谷川
俊史. 当科における気管支喘息入院
患児のウイルス感染関与の検討. 第
45 回日本小児感染症学会総会・学術
集会. 札幌. 2013.10.26-27.

G . 知的所有権の取得状況

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし

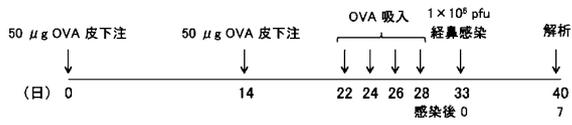


図1 本研究のプロトコール

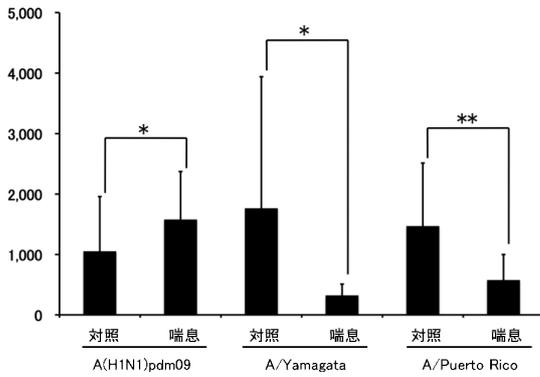


図2 新型および季節性インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 IL-6 濃度

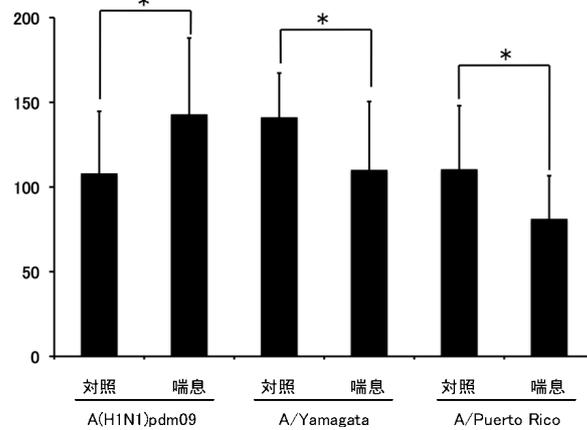


図3 新型および季節性インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 TNF-α 濃度

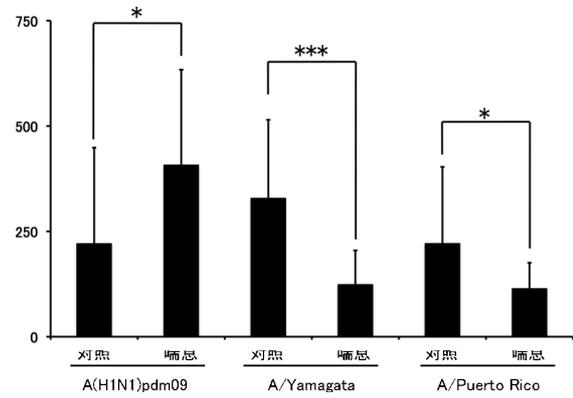


図4 新型および季節性インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 IL-10 濃度

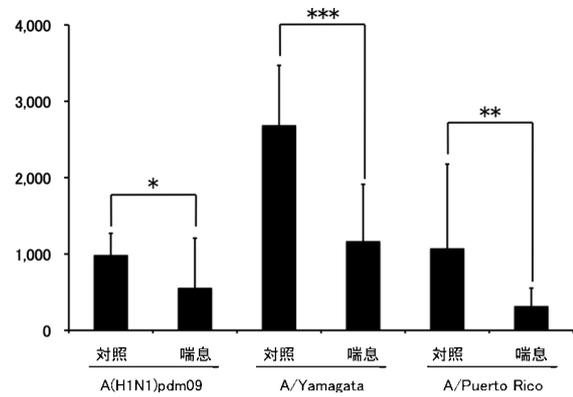


図5 新型および季節性インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 IFN-γ 濃度

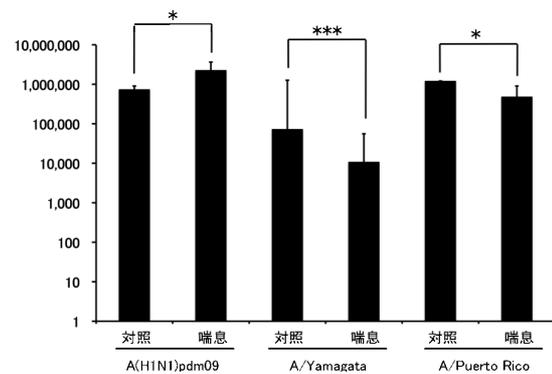


図6 新型および季節性インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中ウイルスカ価