

喘息モデルマウスを用いた A(H1N1)pdm09 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 大賀正一 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・教授
松重武志 山口大学医学部附属病院・講師
脇口宏之 山口大学医学部附属病院・診療助教
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
市山高志 鼓ヶ浦こども医療福祉センター・副院長

研究要旨

【背景】研究分担者らはこれまでに 2009 年に流行した新型インフルエンザ (A(H1N1)pdm09) 感染は喘息マウスにおいて非喘息マウスに比し、呼吸器症状を重篤化させている可能性を報告してきた。

【方法】本研究では A(H1N1)pdm09 と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) 中初期免疫応答 (感染後 3 日) について検討する。

【結果】 季節性感染では喘息マウスにおいて BAL 中活性化 NK 細胞数が非喘息マウスに比して有意に低値であった。 A(H1N1)pdm09 感染では喘息マウスにおいて BAL 中活性化 CD8⁺T 細胞数が非喘息マウスに比して有意に低値であった。 A(H1N1)pdm09 感染では喘息マウスにおいて非喘息マウスに比し、BAL 中 IL-6, TNF- α および IFN- γ 濃度が有意に高値で、さらにウイルス力価も高値であった。

【結論】これまでの研究結果とあわせ A(H1N1)pdm09 感染喘息マウスでは季節性に比して、NK 細胞, CD8⁺T 細胞の細胞性免疫の活性化誘導が弱く、感染後早期から気管支喘息重症化の病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

研究分担者らはこれまでに 2009 年に世界的に大流行した新型インフルエンザ (A(H1N1)pdm09) 感染は季節性と異なって喘息マウスにおいて非喘息マウスに比し、肺で強いサイトカイン産生およびウイルス増殖を示し、呼吸器症状を重篤化させている可能性を報告してきた。本研究ではさらなる病態解明のため A(H1N1)pdm09 と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) 中初期免疫応答

(感染後 3 日) について検討する。

B. 研究方法

Balb/c マウスを用いて卵白アルブミン (OVA) により喘息モデルマウスを作製し、A(H1N1)pdm09 および季節性インフルエンザウイルス (A/H1N1/Puerto Rico 株) を経鼻感染させ (1×10^5 pfu/20 μ L/マウス), 感染後 3 日に炎症細胞浸潤 (CD4 陽性 T 細胞, CD8 陽性 T 細胞および NK 細胞), BAL 中サイトカイン濃度 (cytometric bead array 法)

およびウイルス力価（ブランクアッセイ法）について検討した。

（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

季節性感染では喘息マウスにおいて BAL 中活性化 NK 細胞数が非喘息マウスに比して有意に低値であった（図 1）。

A(H1N1)pdm09 感染では喘息マウスにおいて BAL 中活性化 CD8 陽性 T 細胞数が非喘息マウスに比して有意に高値であった（図 2）。

A(H1N1)pdm09 感染では喘息マウスにおいて非喘息マウスに比し，BAL 中 IL-6（図 3），TNF- α および IFN- γ （図 4）濃度が有意に高値で，さらにウイルス力価（図 5）も有意に高値であった。

D . 考察

これまでの研究分担者らの研究結果とあわせ A(H1N1)pdm09 感染喘息マウスでは季節性に比して，NK 細胞，CD8 陽性 T 細胞の細胞性免疫の活性化誘導が弱く，感染後早期から気管支喘息 重症化の病態に関与している可能性が示唆された。IFN- γ については感染後 3 日と 7 日の結果に乖離があり，また産生細胞など不明な点もあるため今後更なる病態解析および予防法の確立が必要である。

E . 結論

これまでの研究結果とあわせ，A(H1N1)pdm09 感染喘息マウスでは季節性に比して，感染後早期から強いサイトカイン

産生およびウイルス増殖がおり，気管支喘息重症化の病態に関与している可能性が示唆された。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Momonaka H, Hasegawa S, et al. High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev.* 2014; 36: 484-8.
2. Hasegawa S, Matsushige T, et al. Serum and cerebrospinal fluid levels of visinin-like protein-1 in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev.* 2014,36: 608-12.
3. Kajimoto M, Hasegawa S, et al. An 11-year-old girl with recurrent bacterial meningitis due to liquorrhea caused by bone malformation of the skull base. *Brain Dev.* 2014, 36: 637-40.
4. Takahashi K, Hasegawa S, et al. Serum tau protein level serves as a predictive factor for neurological prognosis in neonatal asphyxia. *Brain Dev.* 2014, 36: 670-5.
5. Inamura N, Miyashita N, Hasegawa S, et al. Management of refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: Utility of measuring serum lactate dehydrogenase level. *J Infect Chemother.* 2014; 20: 270-3.
6. Okada S, Hasegawa S, et al. A novel de novo mutation of β -cardiac myosin heavy chain gene found in a twelve-year-old boy with hypertrophic cardiomyopathy. *J Genet.* 2014; 93: 557-60.

7. Inoue H, Hasegawa S, et al. Traumatic head injury mimicking AESD. *Pediatr Int.* 2014, 56: e58-61.
 8. Hasegawa S, Wakiguchi H, et al. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine.* 2014, 69; 206-210.
 9. Kittaka S, Hasegawa S, et al. Serum levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in human herpesvirus-6-infected infants with or without febrile seizures. *J Infect Chemother.* 2014; 20: 716-21.
 10. Maeba S, Hasegawa S, et al. Successful treatment of corticosteroid with antiviral therapy for a neonatal liver failure with disseminated herpes simplex virus infection. *Am J Perinatol Rep.* 2014, in press.
 11. Okada S, Hasegawa S, et al. Acute pericardial effusion representing the TNF- α -mediated severe inflammation but not the coronary artery outcome of Kawasaki disease. *Scand J Rheumatol.* 2014; 29:1-6.
 12. Hasegawa S, Matsushige T, et al. A nationwide survey of opsoclonus-myoclonus syndrome in Japanese children. *Brain Dev.* 2014, in press.
 13. Wakiguchi H, Hasegawa S, et al. The relationship between T cell HLA-DR expression and intravenous immunoglobulin treatment response in Kawasaki disease. *Pediatr Res.* 2014, in press.
 14. Kimura H, Hasegawa S, et al. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. *Sci Rep* 2015, in press.
 15. Wakiguchi H, Hasegawa S, et al. Long-lasting non-IgE-mediated gastrointestinal cow's milk allergy in infants with Down syndrome. *Pediatr Allergy Immunol.* 2015, in press.
2. 学会発表
1. Hasegawa S. Serum and CSF levels of MAP2 in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) patients. European Paediatric Neurology Society Research Meeting, 2014.9.12~13, Bucharest, Romania
 2. 脇口宏之, 長谷川俊史, 他. 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. 第117回日本小児科学会学術総会 2014.4.11-13. 名古屋
 3. 長谷川俊史, 脇口宏之, 他. モデルマウスを用いたインフルエンザ感染による喘息発作重症化の病態解析 新型と季節性の比較. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014.5.9~11, 京都.
 4. 脇口宏之, 長谷川俊史, 他. 間質性肺炎とマクロファージ活性化症候群を合併した若年性皮膚筋炎患児のサイトカインプロファイル. 第24回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 2014.10.3~5, 仙台
 5. 脇口宏之, 長谷川俊史, 他. 全身性エリテマトーデスとシェーグレン症候群を合併したクラインフェルター症候群の1例. 第24回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 2014.10.3~5, 仙台
 6. 兼安秀信, 長谷川俊史, 他. MAP療法前

に4種3剤の生ワクチンを同時接種した多関節型若年性特発性関節炎の1歳児。第24回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 2014.10.3~5, 仙台。

7. 長谷川俊史, 脇口宏之, 他. 喘息モデルマウスを用いたインフルエンザ感染に対する細胞性免疫応答の検討 第46回日本小児感染症学会総会・学術総会 2014.10.18-19, 東京.
8. 長谷川俊史, 脇口宏之, 他. 喘息モデルマウスを用いたインフルエンザ感染に対する初期免疫応答の検討. 第51回日本小児アレルギー学会 2014.11.8-9, 四日市, 三重

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 BAL中活性化NK細胞 (感染後3日)

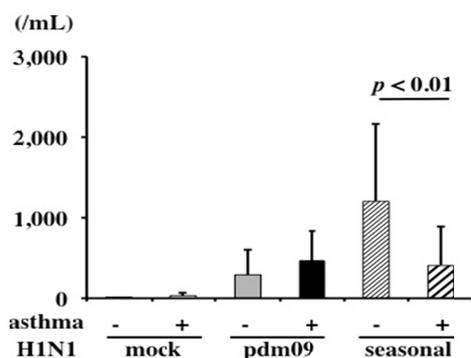


図2 BAL中活性化CD8陽性T細胞 (感染後3日)

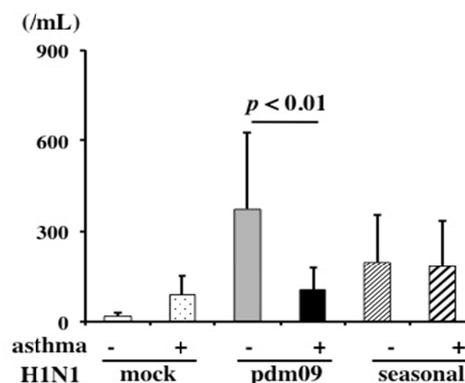


図3 BAL中IL-6濃度 (感染後3日)

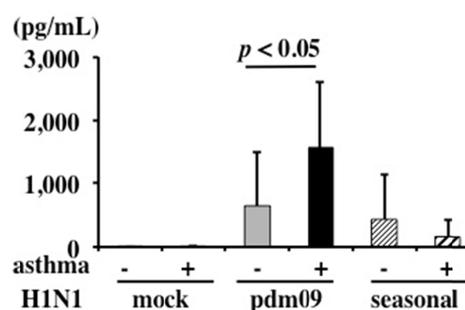


図4 BAL中IFN-濃度 (感染後3日)

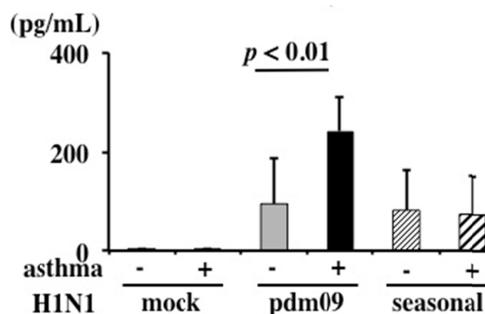


図5 BAL中ウイルス力価 (感染後3日)

