

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 A(H1N1)pdm09 感染による
気管支喘息重症化の病態解析

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

【目的】 2009 年世界的に流行した新型インフルエンザ (A(H1N1)pdm09) は季節性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、A(H1N1)pdm09 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 マウスを用いて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を経鼻感染させ、感染後 3 日および 7 日に BAL を回収した。BAL 中炎症細胞浸潤、サイトカイン濃度およびウイルス力価について検討した。

【結果】 A(H1N1)pdm09 感染では季節性と異なって感染後 3 日および 7 日ともに非喘息マウスに比し、喘息マウスで BAL 中 IL-6 および TNF- α の濃度が有意に高値であった。IFN- γ 濃度は 3 日では有意に高値であったが、7 日では有意に低値であった。BAL 中ウイルス力価は喘息マウスで非喘息マウスに比し有意に高値だった。

【結論】 A(H1N1)pdm09 感染は季節性と異なって喘息マウスの肺において感染後早期から、より高いサイトカイン産生および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

A . 研究目的

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。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。

本研究では病態解明のため A(H1N1)pdm09 および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) を作製し, A(H1N1)pdm09 および季節性ウイルス (A/H1N1/Yamagata, A/H1N1/Puerto Rico) (いずれもマウス馴化株, 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 3 日および 7 日に BAL を回収した. BAL 中炎症細胞浸潤, サイトカイン濃度およびウイルス力価を測定し, 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

A(H1N1)pdm09 感染後 3 日および 7 日において季節性と異なって, 喘息マウスでは非喘息マウスに比して BAL 中 interleukin (IL)-6 が有意に高値であった(図 1, 2). Tumor necrosis factor (TNF)- (感染後 3 日および 7 日) および IL-10 (感染後 7 日) も同様の結果であった. 一方感染後 3 日の interferon (IFN)- 濃度は喘息マウスで有意に高値であったが(図 3), 感染後 7 日では有意に低値であった(図 4). またウイルス力価は喘息マウスで非喘息マウスに比して感染後 3 日, 7 日ともに有意に高値であった(図 5, 6). また 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も示唆された.

D . 考察

以上の結果から A(H1N1)pdm09 感染喘息マウスでは感染非喘息マウスに比し, 季節性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高く, 強い炎症が惹起されていることが示唆された. 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 感染後 3 日においては喘息マウスで非喘息マウスに比し, 有意に IFN- 濃度が高値であることから感染後 7 日の IFN- 濃度の低値は既に急性期をすぎた結果である可能性が示唆された. 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, 肺において感染後早期から, より高いサイトカイン産生および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. Kuroda M, Hasegawa S, et al. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. Sci Rep. 2015; in press.
2. 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.
3. Hasegawa S, et al. A nationwide survey of opsoclonus-myooclonus syndrome in Japanese children. Brain Dev. 2014; in press.

4. 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.
5. 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
6. Hasegawa S, et al. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine*. 2014, 69; 206-210.
7. Inamura 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.
8. 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.
9. Hasegawa S, 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.
10. 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.
11. Okada S, Hasegawa S, et al. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013; 63: 194-200.
12. Hasegawa S, et al. Tau protein levels in children do not increase during severe asthma attack-induced hypoxic conditions. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2014; 42: 83-5.
13. Oka M, Hasegawa S, et al. Tau protein concentrations in the cerebrospinal fluid of children with acute disseminated encephalomyelitis. *Brain Dev*. 2014; 36: 16-20.
14. Hasegawa S, et al. Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2013; 35: 626-9.
15. Matsushige T, Hasegawa S, et al. Serum neurofilament concentrations in children with prolonged febrile seizures. *J Neurol Sci*. 2012; 132:290-4.
16. Kudo K, Hasegawa S, et al. 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.
17. Inoue H, Hasegawa S, et al. Elevation of tau protein levels in the cerebrospinal fluid of children with West syndrome. *Epilepsy Res*. 2012; 102:8-12.
18. Haneda Y, Hasegawa S, et al. Ovomucoids IgE is a better marker than egg white-specific IgE to diagnose boiled egg allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129: 1681-2.
19. Shimomura M, Hasegawa S, et al. Intravenous immunoglobulin does not increase Fc γ RIIB expression levels

on monocytes in children with immune thrombocytopenia. Clin Exp Immunol. 2012; 169: 33-7.

20. Hasegawa S, et al. Cysteine, histidine and glycine exhibit anti-inflammatory effects in human coronary arterial endothelial cells. Clin Exp Immunol. 2012; 167: 269-74.
21. Tanaka N, Hasegawa S, et al. 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.
22. Arakawa M, Hasegawa S, et al. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. J Med Microbiol. 2012; 61: 410-9.

図 1 BAL 中 IL-6 濃度 (感染後 3 日)

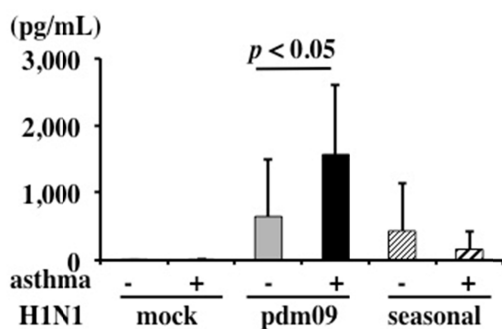


図 2 BAL 中 IL-6 濃度 (感染後 7 日)

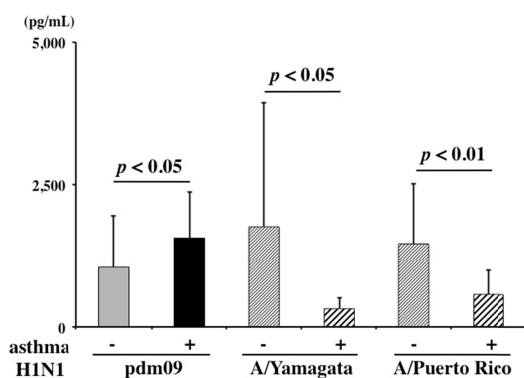


図 3 BAL 中 IFN- 濃度 (感染後 3 日)

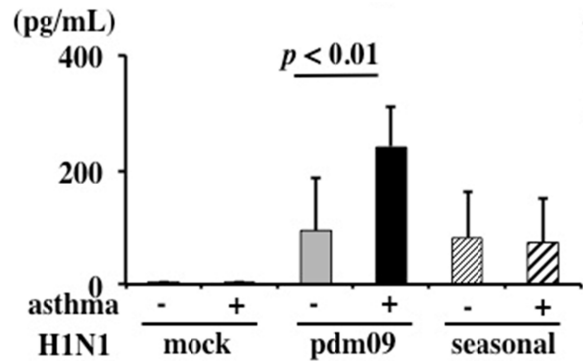


図 4 BAL 中 IFN- 濃度 (感染後 7 日)

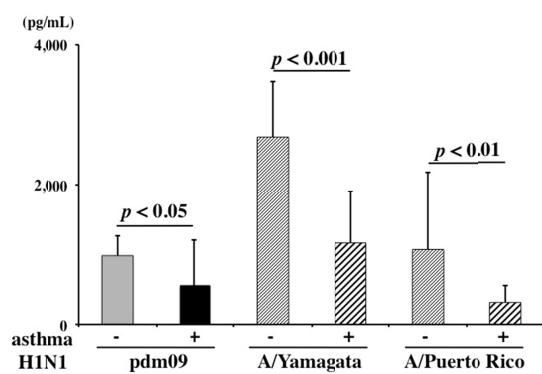


図 5 BAL 中ウイルスカ価 (感染後 3 日)

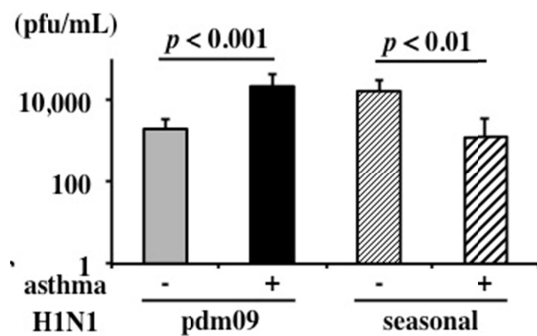


図 6 BAL 中ウイルスカ価 (感染後 7 日)

