

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19619

研究課題名(和文) 新型インフルエンザは気管支喘息の発症因子か？

研究課題名(英文) Bronchial asthma induces excessive inflammation and virus replication in pandemic influenza infection.

研究代表者

松重 武志 (MATSUSHIGE, Takeshi)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60528941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息患者は新型インフルエンザA(H1N1)pdm09感染の際、呼吸器症状が重症化しやすい。その機序の解明と治療法の確立を目的として研究を行った。喘息モデルマウスに新型インフルエンザを感染させると、感染3日目に気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカインおよびウイルス力価がピークに達し、肺病理組織で著明な炎症細胞浸潤と組織破壊を認めた。これは非喘息マウスや季節性インフルエンザ感染群と比べて顕著だった。喘息は新型インフルエンザ感染における増悪因子であり、感染初期に急速なウイルス増殖と過剰な炎症反応をもたらすと考えられた。さらに現在、治療介入群を含めた肺機能および気道過敏性の検討が進行中である。

研究成果の概要(英文)：Asthmatic patients present more rapid progression of respiratory distress after A(H1N1)pdm09 influenza infection than after seasonal infection. Here, we sought to clarify the pathophysiology of early deterioration in asthmatic patients after A(H1N1)pdm09 infection. In asthma/A(H1N1)pdm09 mice, inflammatory cytokines and virus titres in bronchoalveolar lavage fluid peaked at 3 days post-infection and were higher than those in non-asthmatic or seasonal influenza infection groups. Histopathological examination showed more inflammatory cell infiltration and lung tissue destruction in the asthma/A(H1N1)pdm09 group than in any other groups. Thus, bronchial asthma could be a exacerbating factor for pandemic influenza infection with excessive inflammation and virus replication within a few days after infection. Furthermore, the evaluation of pulmonary function in the treatment intervention group is in progress.

研究分野：小児科学

キーワード：新型インフルエンザ 気管支喘息

1. 研究開始当初の背景

新型インフルエンザ A(H1N1) pdm09 は 2009 年から 2010 年にかけて世界的に大流行した。本邦では推定 2,000 万人が医療機関を受診し、1 万人が入院した。中でも 5-9 歳の小児の入院が最多で、人工呼吸管理を要する重症肺炎や急性脳症等の合併症を来した。2010 年以降、A(H1N1) pdm09 は季節性インフルエンザと同様、冬期に流行するようになった。

A(H1N1) pdm09 感染による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て、A(H1N1) pdm09 感染で気管支喘息発作の合併が多く、かつ重篤な喘息発作をもたらしていたことを報告した¹⁾。また、喘息発作や肺炎などの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、それまでは喘息と診断されていない、もしくはごく軽症の喘息であった。すなわち、A(H1N1) pdm09 感染は、アレルギー素因のある児に対して、日常の気管支喘息重症度と無関係に重篤な喘息発作をもたらす可能性が示唆された。しかし、その病態生理は十分解明されておらず、予防法も確立されていない。

2. 研究の目的

本研究は A(H1N1) pdm09 と喘息発作との関係を明らかにすること、喘息誘発や重症肺炎の病態を解明すること、および予防法を確立することを目的として行った。

3. 研究の方法

卵白アルブミンを感作させた喘息マウスを作製し、インフルエンザを経鼻感染させた。気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の炎症性サイトカイン、炎症細胞浸潤、ウイルス増殖、肺の病理組織、呼吸機能解析を用いた病態解析を行った。非感染群/新型インフルエンザ A(H1N1) pdm09 感染群/季節性インフルエンザ A/Puerto Rico 感染群、非喘息群/喘息群、無治療群/治療群の組み合わせで比較検討した。

(1)前処置

卵白アルブミン (OVA) を用いた喘息モデルマウス作製: Balb/c マウスに OVA の皮下注 (day 0, 14) および吸入 (day 22, 24, 26, 28) を行い、喘息モデルマウスを誘導した (喘息群)。対照群として OVA を除いた溶液を皮下注・吸入した (非喘息群)。

感染: インフルエンザウイルスを 1×10^5 pfu/マウスで経鼻感染させた (A(H1N1) pdm09 感染群/ A/Puerto Rico 感染群)。対照群としてウイルス培養液を経鼻投与した (非感染群)。

治療介入: デキサメサゾン腹腔内投与を行った (感作時投与群、感染時投与群、両投与群)。対照群として PBS を腹腔内投与した (無治療群)。

(2)解析

感染後 2、3、7 日目に BAL 採取、肺組織採

取、もしくは呼吸機能解析を行った。

細胞浸潤: フローサイトメトリーおよびサイトスピンにより、BAL 中の好酸球数、好中球数、リンパ球数、CD4 陽性 T 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数、活性化率を評価した。

サイトカイン濃度: cytometric bead array (CBA) 法を用いて、BAL 中の IL-6、IL-10、IL-2、IL-4、IL-17A、TNF-、IFN- を測定した。また ELISA 法で IL-1、IL-13 を測定した。

ウイルス力価: MDCK (Madin-Darby canine kidney) を用いたプラークアッセイ法により BAL 中のウイルス力価を定量的に評価した。

病理学的解析: 肺を採取、固定、切片を作製し、H&E 染色およびインフルエンザウイルス抗原免疫染色で細胞浸潤、気道や肺胞の変化、ウイルス浸潤の評価を行った。

呼吸機能解析: flexiVent (プライムテック株式会社) を用いて解析を行った。気管内にカニューレを挿入し、呼吸機能解析を行った。気道過敏性試験として、コリン作動性気管支収縮薬 (メサコリン) を異なった濃度で吸入させ、呼吸機能の変化を観察した。

4. 研究成果

主な研究成果を図に示す。

(1)BAL 中サイトカイン解析、細胞浸潤
感染後 2、3、7 日目の IL-6、TNF-、IL-1、IFN-、IL-10 の値を図に示す (図 1-5)。

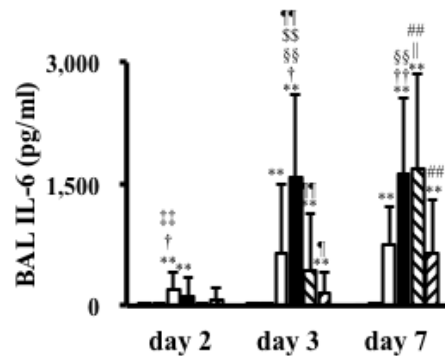


図 1 各群における IL-6 の推移

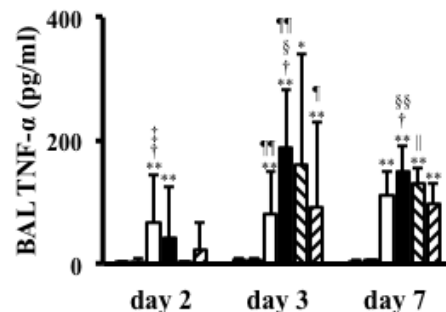


図 2 各群における TNF-α の推移

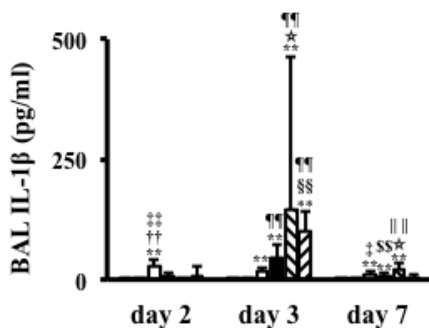


図3 各群における IL-1 の推移

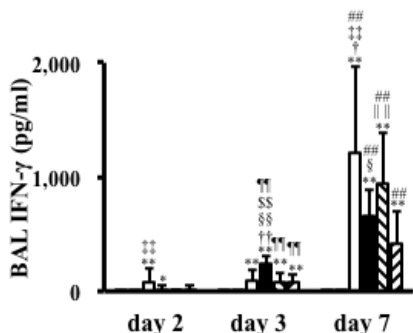


図4 各群における IFN- の推移

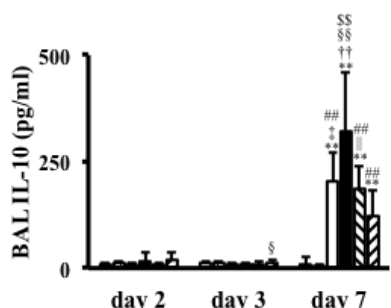


図5 各群における IL-10 の推移

同日の棒グラフは左から非喘息/非感染群、喘息/非感染群、非喘息/A(H1N1)pdm09 群、喘息/A(H1N1)pdm09 群、非喘息/季節性群、喘息/季節性群を示している。非喘息/A(H1N1)pdm09 群 vs 喘息/A(H1N1)pdm09 群: †p < 0.05, ††p < 0.01; 非喘息/季節性群 vs 喘息/季節性群: || p < 0.05, ||| p < 0.01; 非喘息/A(H1N1)pdm09 群 vs 非喘息/季節性群: ☆p < 0.05; 喘息/A(H1N1)pdm09 群 vs 喘息/季節性群: §p < 0.05, §§p < 0.01; 喘息/A(H1N1)pdm09 群 vs 非喘息/季節性群: \$\$\$p < 0.01; 非喘息/A(H1N1)pdm09 群 vs 喘息/季節性群: ‡p < 0.05, ‡‡p < 0.01; 非喘息/非感染群 or 喘息/非感染群 vs 各群: *p < 0.05, **p < 0.01; day 2 vs day 3, ¶¶ p < 0.01; day 3 vs day 7: ##p < 0.01.

IL-6 (図1)

2日目まではIL-6は各群とも低値だったが、3日目以降に感染群で上昇した。

A(H1N1)pdm09 感染においては、非喘息群で3日目と7日目は軽度上昇で推移したが、喘息群では高値で推移した。季節性感染においては、3日目から7日目に緩やかに上昇を示し、特に非喘息群で7日目にピークを迎えた。

TNF- (図2)

TNF- は A(H1N1)pdm09 感染においては、喘息群で3日目にピークを迎え、他のどの群よりも高値を示した。一方、季節性感染においては、喘息群より非喘息群の方が高値を示した。

IL-1 (図3)

IL-1 は季節性感染の3日目で上昇したが、これに比して A(H1N1)pdm09 感染では低値だった。

IFN- (図4)

IFN- は A(H1N1)pdm09 感染においては、喘息群で3日目に他のどの群よりも高値で7日目にさらに上昇した。一方、非喘息群ではこれに比して3日目に低値、7日目に高値となった。

IL-10 (図5)

IL-10 は3日目においていずれの群も検出されなかったが、7日目に喘息/A(H1N1)pdm09 群はどの群よりも高値を示した。

その他のサイトカイン

IL-13 は喘息群が非喘息群より高値で、喘息/A(H1N1)pdm09 においては3日目から7日目にかけて上昇する傾向にあったが、統計学的な有意差を認めなかった。IL-2、IL-4、IL-17A は検出感度以下だった。

細胞浸潤

細胞浸潤に関しては、BAL 中の全細胞数、リンパ球数、CD4 陽性 T 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数は感染群で3日目に増加、7日目に低下傾向を示したが、喘息/A(H1N1)pdm09 群における CD8 陽性 T 細胞数は7日目も同程度を維持した。

(2)BAL 中ウイルス力価

感染後2、3、7日目での BAL 中ウイルス力価を図に示す(図6)。いずれの群も3日目に最も高い傾向を示した。また、2日目には各群間に有意差を認めなかったが、3日目および7日目には喘息/A(H1N1)pdm09 が他の群に比して最も高値を示した。

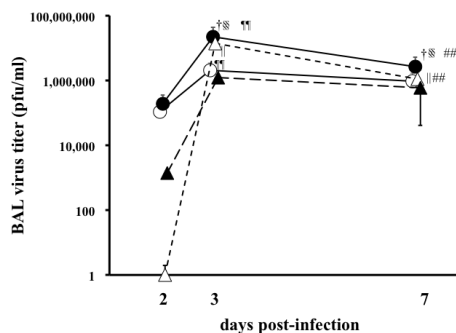


図6 感染群のウイルス力価の推移

○: 非喘息/A(H1N1)pdm09, △: 喘息/A(H1N1)pdm09

A(H1N1)pdm09, : 非喘息 / 季節性,
: 喘息 / 季節性. 平均値 ± SD. 非喘息
/ A(H1N1)pdm09 vs 喘息 / A(H1N1)pdm09: † p <
0.05, †† p < 0.01; 非喘息 / 季節性 vs. 喘息 /
季節性: || p < 0.05, || || p < 0.01; 喘息 /
A(H1N1)pdm09 vs. 喘息 / 季節性: § p <
0.05, § § p < 0.01; day 2 vs day 3, ¶ ¶ p
< 0.01; day 3 vs day 7: ## p < 0.01.

(3) 肺病理組織

感染 3 日目における肺病理組織を図に示す
(図 7: H&E 染色, 図 8: インフルエンザウイルス抗原免疫染色).

喘息 / 感染群では気管支粘膜の肥厚を認め
たが、喘息 / 非感染群ではこの所見は軽微だ
った。炎症細胞浸潤は季節性より
A(H1N1)pdm09 に強くみられ、特に喘息 /
A(H1N1)pdm09 群では著明な肺炎、肺膿瘍を呈
した。また、3 日目の喘息 / A(H1N1)pdm09 群
でウイルス抗原を認めた。

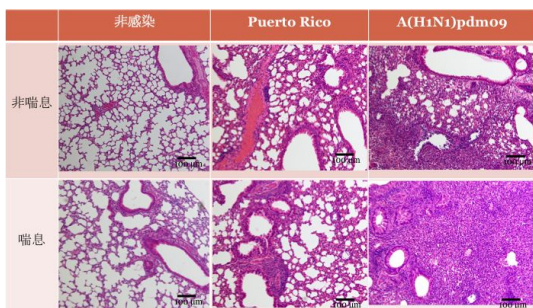


図 7 各群における感染 3 日目の H&E 染色

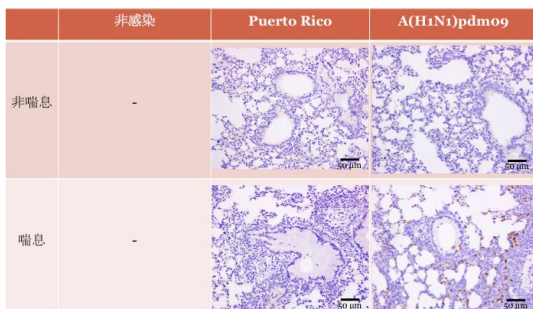


図 8 感染 3 日目のウイルス抗原免疫染色

(4) 呼吸機能解析および治療介入

現在、データを蓄積し、解析中である。

(5) 考察

喘息 / A(H1N1)pdm09 群は、炎症早期の BAL
中 IL-6 および TNF- 上昇、肺の炎症性変化
の特徴を有していた。IL-10 の後期ピークと
不十分な IFN- 産生がウイルスの非効果的
の排除に関係していると考えられた。また、
A(H1N1)pdm09 群では、喘息感作により、強い
ウイルス増殖をもたらすことが証明された。
一方、喘息感作がない場合、A(H1N1)pdm09 感
染のみで気道粘膜の肥厚は認めず、直接的な
誘発因子ではないと考えられた。

新型インフルエンザ感染では、感染初期に

急速なウイルス増殖と過剰な炎症反応を来
し、気管支喘息は新型インフルエンザ感染に
おける炎症病態、肺合併症の増悪因子と考え
られた。今後、A(H1N1)pdm09 感染による気道
過敏性の変化や予防的介入による軽症化に
ついてさらなる検討が必要である。

< 引用文献 >

1) Hasegawa, S. et al. Characteristics of
atopic children with pandemic H1N1
influenza viral infection: pandemic H1N1
influenza reveals 'occult' asthma of
childhood. *Pediatr. Allergy Immunol.* 22,
e119-123;10.1111/j.1399-3038.2010.01090
.x (2011).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

松重武志
気管支喘息モデルマウスを用いたインフル
エンザ感染時の肺病理組織の検討
第 120 回日本小児科学会
2017 年 4 月 14 日～2017 年 4 月 16 日
グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港
区)

松重武志
気管支喘息マウスにおける A(H1N1)pdm09 感
染による肺病理組織の変化
第 48 回日本小児感染症学会
2016 年 11 月 19 日～2016 年 11 月 20 日
岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山
市)

藤本洋輔
喘息マウスにおける A(H1N1)pdm09 感染によ
る BAL 中サイトカイン動態の検討
第 119 回日本小児科学会
2016 年 5 月 13 日～2016 年 5 月 15 日
ロイトン札幌(北海道・札幌市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松重 武志 (MATSUSHIGE, Takeshi)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60528941

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

長谷川 俊史 (HASEGAWA, Shunji)

藤本 洋輔 (FUJIMOTO, Yousuke)

若林 みどり (WAKABAYASHI, Midori)

脇口 宏之 (WAKIGUCHI, Hiroyuki)

中村 圭季 (NAKAMURA, Tamaki)

長谷川 秀樹 (HASEGAWA, Hideki)

相内 章 (AINAI, Akira)

池本 健三 (IKEMOTO, Kenzo)

小賀 厚徳 (OGA, Atsunori)

伊藤 浩史 (ITOH, Hiroshi)

調 恒明 (SHIRABE, Komei)

戸田 昌一 (TODA, Shoichi)

熱田 了 (ATSUTA, Ryo)

大賀 正一 (OHGA, Shouichi)