

主 論 文

Local and Systemic Immune Responses to Influenza A Virus Infection in Pneumonia and Encephalitis Mouse Models

(インフルエンザウイルス A 感染による肺炎および脳炎マウスにおける、局所性および全身性の免疫応答の検討)

[緒言]

インフルエンザウイルス A (IAV) は肺炎、脳炎/脳症など異なる臓器でさまざまな疾患を起こす。サイトカイン/ケモカインはその病態において重要な役割を担う。適切な治療戦略を立てるためには IAV が感染した局所で起こる病態変化を解明する必要がある。IAV に感染した患者の血清でサイトカイン/ケモカインを測定した研究はいくつかあるが、血清のデータが感染局所での免疫応答と相関しているかどうかは不明なところが多い。

我々は IAV をマウスに感染させ肺炎モデルと脳炎モデルを作成し、血清、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、髄液中のサイトカイン/ケモカイン・プロフィールを相互に比較し、血液中と感染局所での免疫応答の特性を明らかにすることにした。

[材料と方法]

倫理的配慮

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科動物実験委員会の承認を得 (番号 OKU-2012628)、米国国立衛生研究所 (NIH) のガイドラインに沿って研究を行った。

実験に使用したウイルスの準備

川崎医科大学微生物学教室から提供されたインフルエンザウイルス A/WSN/33 (H1N1) を使用した。このウイルスはヒトのインフルエンザウイルスであるがマウスに馴化しており、経鼻接種により肺に感染するだけでなく、頭蓋内接種により脳にも感染する。このウイルスを発育鶏卵に接種して培養したのち、Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いてプラーク・アッセイを行い、ウイルス力価を定量した。

動物へのウイルス接種と検体採取

9 週齢のオスの C57BL/6 マウスを 2 グループに分け肺炎群、脳炎群とした。各群、各ポイントでマウスはそれぞれ 6 匹用意した。事前の実験で下記の量のウイルスをそれぞれの方法で接種すると 100%致死となることを確認した。肺炎群のマウスには 5.0×10^3 pfu の IAV を経鼻接種し、脳炎群のマウスには 2.0×10^3 pfu の IAV を髄液中に接種した。非感染群のマウスには同様の方法でリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を接種した。ウイルスを接種した日を day 0 とし、day 5 まで両群のマウスの体重をモニターした。

day 3 に検体を回収した。肺炎群ではまず血液を採取し、次に左肺を結紮・切離し組織学的検討のため保存した。右肺を 500 μ l の PBS で二度洗浄し BALF を回収した。脳炎群ではまず血液を採取し、次に髄液を採取した。髄液採取の手法は、術者の親指と示指でマウスの頸部を前屈させた状態で大泉門を露出させ、先端を針のように加熱加工したガラス管で大泉門を穿刺し、毛細管現象で髄液を採取するものである。血液の混入した髄液は破棄した。最後に脳を摘出し組織学的検討のため保存した。血清、BALF、髄液は凍結保存し後日サイトカイン/ケモカインを測定した。

サイトカイン／ケモカインの測定

マウス用サイトカイン／ケモカイン磁気ビーズパネルと Luminex 100 システムを用いて、血清、BALF、髄液中の顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、インターフェロン γ (IFN- γ)、インターロイキン (IL) -1 β , -6, -10, -12, -13, -15, 単球走化性因子 (MCP-) 1, マクロファージ炎症タンパク (MIP) -1 α , インターフェロン γ 誘導タンパク (IP) -10, 腫瘍壊死因子 (TNF) - α を測定した。

肺および脳組織中のウイルス量の定量

day 0 (ウイルス接種直後) と day 1, 3, 5 にマウスの肺および脳を摘出した。左肺の下半分および右脳の前部を切り出して RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA を作成したのちリアルタイム PCR 法でウイルスゲノムを定量した。

免疫組織学的検討

残りの肺および脳組織を包埋剤にて凍結後、厚さ 4 μ m の切片を作成した。切片をアセトンで処理し IAV の核タンパク質に対する抗体を用いて蛍光免疫組織化学染色を行った。

統計

Prism 6.0 を用いて Mann-Whitney U 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差とした。

[結果]

肺および脳での IAV 感染の確認

蛍光免疫組織化学染色を行い、肺炎群マウスの肺では気管支上皮に、脳炎群マウスの脳では第 3, 第 4 脳室と大脳皮質に IAV 抗原を認めた (別刷 Figure 1-(a), -(b))。肺炎群マウスの脳、脳炎群マウスの肺ではウイルス抗原を認めなかった。

IAV 感染後の肺または脳組織中のウイルスゲノムは、肺炎群、脳炎群ともに最初の 3 日間は 10^2 copies/mg·tissue から 10^6 copies/mg·tissue へ徐々に増加し、その後プラトーとなった (Figure 1-(c), -(d))。肺炎群マウスの脳、脳炎群マウスの肺ではウイルスゲノムは検出されなかった。

サイトカイン／ケモカインの測定結果

肺炎群の血清では今回測定した 12 種類すべてが非感染群より有意に上昇していた (Figure 2-(a))。脳炎群の血清では IL-1 β 以外の 11 種類が非感染群より有意に上昇していた (Figure 2-(b))。肺炎群の BALF では 12 種類すべてが非感染群の BALF より有意に上昇していた (Figure 2-(c))。脳炎群の髄液でも 12 種類すべてが非感染群の髄液より有意に上昇していた (Figure 2-(d))。

サイトカイン／ケモカイン・プロフィールの比較

非感染群の各サイトカイン／ケモカインの平均値と、肺炎群／脳炎群の各サイトカイン／ケモカインの平均値の差を計算し、それを対数軸のレーダーチャートに表示した。検体の種類が血清、BALF、髄液とそれぞれ異なるため、絶対値で比較せず線で囲まれた図形を視覚的に比較し、各項目の相対的な優劣を評価した (特に BALF は採取時に PBS により希釈されていることに留意)。

肺炎群の血清 vs. 脳炎群の血清 <異なる疾患で全身性反応を比較したもの> :

図形は似ていた (Figure 3-(a))。

肺炎群の BALF vs. 脳炎群の髄液 <異なる疾患で局所性反応を比較したもの> :

図形は異なっていた (Figure 3-(b))。

肺炎群の血清 vs. 肺炎群の BALF <同じ疾患で全身性反応と局所性反応を比較したもの> :

図形は似ているが、血清の図は下方に (抗炎症性サイトカイン優位)、BALF の図は左方に偏位していた (炎症性サイトカイン優位) (Figure 3-(c))。

脳炎モデル群の血清 vs. 脳炎モデル群の髄液 <同上> :

図形は異なり、血清に比べ髄液の図は全方向性に大きく拡大していた (Figure 3-(d))。

[考察]

本研究では IAV 感染によって引き起こされる疾患の違いとサイトカイン/ケモカイン・プロフィールとの関係について調べた。インフルエンザ A/WSN/33 (H1N1) ウイルスは多臓器に感染可能なウイルスであり、ウイルス株の違いが結果に影響するのを避けるため研究全体を通してこのウイルスを使用した。ウイルスを経鼻接種することで肺炎モデルマウスを、髄液内接種することで脳炎モデルマウスを作成した。

ウイルスは接種された部位で増殖し、肺炎群の脳および脳炎群の肺では検出されなかった。

今回 12 種類のサイトカイン/ケモカインを測定し、ほとんどすべてが肺炎群と脳炎群の両方で血清、BALF、髄液のいずれの検体でも非感染群より有意に上昇していた。

IAV に感染した患者の血液および感染局所のサイトカイン/ケモカインを測定し、健常または軽症者と比較した報告はいくつかあるが、異なる病態（たとえば肺炎 vs. 脳炎）や異なる検体（たとえば血清 vs. BALF）で比較した研究はほとんどない。本研究では IAV 感染後の全身性および局所性の免疫応答を比較するため、肺炎群および脳炎群の血清と局所検体（BALF または髄液）中のサイトカイン/ケモカインを測定しレーダーチャートに図示して、プロフィールを視覚的に捉えられるようにした。

両群の血清のプロフィールは類似していたが、局所検体（BALF vs. 髄液）のプロフィールには相違があった。BALF の図に比べて髄液の図は全体的に下方に偏位しており、IAV 脳炎罹患時、髄液中では Th2 サイトカイン（IL-10, 13）が優勢に発現していたことが示唆された。Th2 サイトカインは抗炎症性に作用し、炎症を終息させ過剰な傷害から宿主を保護する方向にはたらくと考えられる。IL-13 は活性化したミクログリアを細胞死に誘導するとの報告や、「可逆性脳梁膨大部病変を伴う予後良好な軽症インフルエンザ脳症」では髄液中の IL-10 の上昇が見られるとの報告、IL-10 はウイルス感染後の脱髄性中枢神経障害を抑止するとの報告など、上記の知見を支持するエビデンスがいくつかある。しかしサイトカイン/ケモカインが産生される機序については更なる研究が必要である。

もうひとつの重要な知見は、肺炎群でも脳炎群でも血清 vs. 局所検体（BALF または髄液）でプロフィールが異なることである。インフルエンザ感染患者の血清および局所検体中のサイトカイン/ケモカインを測定した報告の中には、疾病の重症度を評価するためには血清より局所検体のほうが優れると結論づけているものもある（別刷 Table 1, 2）。IAV 感染症の病態を解明し、効果的な治療計画を立てるためには感染局所での免疫応答を知る必要があり、そのためには血液検査のみでは不十分なので局所の検体も採取し検査することが重要であると我々は考えている。

血清と局所検体とでサイトカイン/ケモカインのレベルに解離がある点は本研究では解明されていない。特定のサイトカイン/ケモカインに対するインヒビターにより肺炎、脳炎など重症インフルエンザウイルス感染症を治療できるかどうか、適切な実験モデルを用いて今後検討が必要である。本研究ではその基盤となるデータを提示した。

[結論]

IAV の感染部位が異なっても全身性の免疫応答は同様だったが、局所性の免疫応答は感染部位によって違いが見られた。さらに感染局所のサイトカイン/ケモカイン・プロフィールは全身性のプロフィールと一部異なることも示された。BALF や髄液には感染局所の病態が反映されており、これらを調べて評価することは臨床医が治療戦略を考えるうえで重要である。