

レセプター特異性の違いはトリインフルエンザウイルスのヒトへの感染を防ぐバリアとして機能しうるか

栗原 武幸

川崎医科大学微生物学, 〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学附属川崎病院, 〒700-8505 岡山市北区中山下2-1-80

抄録 鳥類の間では膨大な種類のインフルエンザウイルスが行き交っており、新型ウイルス発生の重要な源になっているが、トリのインフルエンザウイルスは容易にヒトに感染しないのは、レセプター特異性の違いが大きなバリアとなっているためと考えられている。則ち、レセプターとしてトリのインフルエンザウイルスは $\alpha 2,3$ 結合型シアロ糖鎖 (SA $\alpha 2,3$) を、一方、ヒトのウイルスは $\alpha 2,3$ 結合型シアロ糖鎖 (SA $\alpha 2,6$) を認識するが、ヒト上気道細胞には SA $\alpha 2,3$ (言わばトリ型レセプター) がほとんど存在しないため、トリのウイルスはヒト細胞に吸着侵入できないという考え方である。しかし強毒型トリインフルエンザの感染で多数の死者が出ていることに加え、最近、SA $\alpha 2,3$ の存在がヒト呼吸器上皮でも報告されており、この考え方の再検討が必要になってきた。本研究ではヒト呼吸器上皮由来の A549細胞と弱毒型トリインフルエンザウイルスを用いて、レセプターとウイルスの吸着侵入の関連を解析し、ヒト A549細胞上には大量の SA $\alpha 2,6$ に加えて少量の SA $\alpha 2,3$ も存在すること、用いた3種のトリインフルエンザウイルスは細胞上に少量存在するレセプターを利用して細胞に侵入し、ウイルス抗原の合成を開始する能力を持っていること、しかしその効率(能力)はウイルス間で大きな差があること、を明らかにした。従って“ウイルスのレセプター特異性の違いと細胞におけるレセプターの偏在”が形成するバリアは厳密なものではなく、ウイルスの種類によっては容易にバリアを乗り越える可能性が示された。

(平成21年9月2日受理)

キーワード：トリインフルエンザ、レセプター特異性、宿主特異性、シアロ糖鎖

緒言

2009年春、ブタインフルエンザウイルスに由来する新型ヒトインフルエンザが北米で発生し、その感染は忽ち全世界に拡がり、WHOはその警戒レベルを世界的大流行(パンデミック)を意味する最高位のフェーズ6に引き上げることを宣言した。今後、このウイルスがヒトの間でどのような流行を繰り返すのか、北半球のインフルエンザシーズンの到来と共に深刻なパ

ンデミックが起こるのか、それとも季節性インフルエンザの一員となって限定的な流行のまま持続するのか予断を許さない状況にある。しかし、この新型ウイルスの出現によって、これまで論じられてきたトリインフルエンザ由来の新型ウイルスが出現する危険性が減少したわけではない。引き続き、トリインフルエンザの動向を監視すると共に、トリインフルエンザウイルスがヒトに感染する可能性についても研究を進

別刷請求先
栗原武幸
〒700-8505 岡山市北区中山下2-1-80
川崎医科大学附属川崎病院呼吸器病センター

電話：086 (225) 2111
ファックス：086 (232) 8343
Eメール：ths_kuri@yahoo.co.jp

める必要がある。

A型インフルエンザウイルスは様々な哺乳類および鳥類を宿主として全世界に分布し、これまで抗原性の異なる16種類(H1~H16亜型)のヘムアグルチニン(HA)と9種類(N1~N9亜型)のノイラミニダーゼ(NA)が見つかった。水鳥の間にはこの全亜型が存在しており、新型ウイルス発生の重要な源と見なされている¹⁻³⁾。トリとヒトのインフルエンザウイルスではレセプター特異性が異なっており、トリのウイルスは鳥類の呼吸器と腸管に多く存在する α 2,3結合型シアロ糖鎖(SA α 2,3)をレセプターとして認識し、ヒトのウイルスはヒトの上気道に多く存在するSA α 2,6を認識する。ヒトの上気道にはSA α 2,3(言わばトリ型レセプター)がほとんど存在しないため、トリのウイルスはヒトに感染しないと考えられてきた⁴⁻⁹⁾。ウイルスのトロピズム(宿主特異性)を明解に説明するこの仮説は今日まで広く受け入れられてきたが、2003年以来、強毒型トリインフルエンザのヒトへの感染によって多数の死者が出ていること¹⁰⁾、また最近、ヒト呼吸器細胞にもSA α 2,3が存在することが報告されていることなどから、仮説の再検討が必要と考えられる。

SA α 2,3の存在について、Matrosovichらは*in vitro*で分化させたヒト気道上皮培養細胞を用いて、絨毛上皮細胞にはSA α 2,3が、非絨毛細胞にはSA α 2,6が存在することを見出し、トリのウイルスは絨毛細胞に感染しようと報告している¹¹⁾。Shinyaらはヒトの上気道上皮では主にSA α 2,6が発現されているが、下気道にはSA α 2,3を発現する細胞も多数存在することを見出している¹²⁾。Kogureらはヒト気管支上皮初代培養細胞のFACS解析結果からSA α 2,6とSA α 2,3が同一細胞上に共存していると考えている¹³⁾。さらにNichollsらは多数のヒト呼吸器標本を広範囲に検索し、どの組織や細胞においても程度の差はあれ、SA α 2,6とSA α 2,3が共に発現していると報告している¹⁴⁾。前2つの報告ではSA α 2,6とSA α 2,3は別々の細胞上に、後2つの報告では同一細胞上に存在すると、互いに異なる見解

を示しているが、実験法、材料、検出感度の違いなどを考慮すると、おそらく両者は共に存在しており組織や細胞によってそれぞれの発現レベルが異なると考えるのが妥当であろう。そうになると、ウイルスのレセプター特異性と細胞側のレセプターの欠如によって形成されると考えられてきたバリアは本当に機能するのだろうか。それを明らかにするためには、レセプターの発現レベルが低いとトリのウイルスはヒト細胞に侵入できないのか、定量的に解析する必要がある。しかし、上に挙げた4つの実験系はどれもSA α 2,6とSA α 2,3の検出には適しているが、感染実験と定量的な解析には適していない。

そこで我々は、クローニングしたヒト呼吸器上皮ガン由来のA549細胞と弱毒型トリインフルエンザウイルスを用いて、細胞上のSA α 2,6とSA α 2,3レセプター発現状況とウイルスの細胞侵入効率を解析し、この課題、則ちレセプターの発現がSA α 2,6に偏っていれば(換言すればSA α 2,3の発現レベルが低くければ)それがトリインフルエンザウイルス感染のバリアとなりうるかどうかを検討するために本研究を行なった。

材料と方法

細胞とウイルス

理研細胞バンクから購入したヒト肺上皮ガン由来A549細胞を本研究室でクローニングして、その中で比較的均一な単層を形成するクローン#9細胞を本研究に用いた。ちなみに、患者から分離されたばかりのインフルエンザウイルス臨床分離株は本細胞で良く増殖する。A549細胞はDulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)に5%の牛胎児血清(FCS)を加えた培地で増殖させ、ウイルス感染時には血清を除いた培地で細胞を維持した。10日齢の発育鶏卵から得たニワトリ胎児繊維芽初代培養は2%のFCSを加えたDMEMで増殖させた。

インフルエンザウイルスA/duck/Ukraine/1/63(H3N8)、A/chick/Germany/N/49(H10N1)は北海道大学の喜田宏教授より、A/teal/Tottori/150/02(H5N3)は鳥取大学の伊藤壽啓教

授より分与された。これらのウイルスは発育鶏卵でのみ継代され、哺乳類細胞での継代歴はない。CEF 培養系でブラック・クロニングを2回繰り返して得たウイルスを本研究に用いた。対照として、本研究室で分離されたヒトインフルエンザ A/Okayama/6/01(H3N2) 株を用いた¹⁵⁾。

ウイルス抗原陽性細胞の検出

ガラスのカバー・スリップ上に培養した細胞にウイルスを接種し、37°Cで7時間培養後、細胞を3%のホルマリンで固定した。細胞表面のみならず内部にあるウイルス抗原も検出するため、固定細胞を0.1%のTriton X-100を含むPBSで処理して細胞膜の透過性を高めた後、ウイルス免疫モルモット抗血清を一次抗体として、蛍光色素 (FITC) あるいはペルオキシダーゼ (POD) で標識した抗モルモット IgG (Sigma) を二次抗体として加えた。標識されたウイルス抗原を蛍光顕微鏡下あるいは酵素抗体法で検出し、10倍あるいは20倍の対物レンズの視野当たりのウイルス抗原陽性細胞数を20~50視野計測してその平均値をウイルスの感染価および感染効率を求めるのに使用した。

ウイルス免疫モルモット抗血清は、濃縮精製ウイルスをアジュバント (Titer Max Gold; CytRx) と共にモルモットに免疫し、1回ブースター後に心臓から採血して得た。

赤血球吸着試験

新鮮モルモット赤血球浮遊液 (ヘマトクリット: 約2%) を約0.1ml/培養液1mlの割合で細胞培養系に加え、5分間、室温に放置後、1mM Mg²⁺ と1mM Ca²⁺ を含むPBSで細胞を洗って、非吸着赤血球を除き、顕微鏡下で赤血球吸着を観察した。

SAA2,6およびSAA2,3シアロ糖鎖の検出

ガラスのカバー・スリップ上に培養されたA549細胞を3%のホルマリンで固定後、0.5%の牛血清アルブミン (BSA) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で十分に洗った。これはレ

クチンの非特異的吸着を防ぐためである。蛍光色素 (FITC) で標識された *Maackia amurensis* lectin II (MAA, Vector Laboratories) あるいは elderberry bark lectin (SNA, Vector Laboratories) で細胞を1時間染色した。レクチン染色がシアロ糖鎖に特異的であることを確認するため、*Clostridium perfringens* シアリダーゼ (Sigma) で前処理 (0.2 U/ml, 37°C, 24時間) した A549細胞を対照として用いた。

蛍光強度は任意に選んだそれぞれ20個の細胞について、IBAS システム (Zeiss-Kontron) を用いて解析した。

SAA2,6あるいはSAA2,3シアロ糖鎖再構築赤血球の作製

1%のBSAを含むPBSに浮遊させた新鮮ヒト赤血球液 (ヘマトクリット値10%) 1mlに500mUの *Vibrio cholerae* シアリダーゼ (Sigma) を加えて、37°Cで3時間ゆっくり攪拌しながら、シアロ糖鎖を酵素処理した。シアリダーゼ処理によってシアル酸が十分に除去されたかどうかは、赤血球を洗ってシアリダーゼを除いた後、高濃度のウイルス液を用いて赤血球凝集反応を行って確認した。凝集反応が陰性になった (則ちレセプターが除去された) シアリダーゼ処理赤血球液を2分し、一方には28mUの α 2,3-(O)-シアルルトランスフェラーゼ (シアル酸転移酵素, Calbiochem) を、もう一方には3mUの α 2,6-(N)-シアル酸転移酵素 (Calbiochem) を加え、さらにそれぞれに cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid (CMP-シアル酸, Sigma) を最終濃度が1.4mMになるように加えて、37°Cで3時間ゆっくり攪拌しながら、シアル酸を付加して、レセプターとなるシアロ糖鎖を再構築した^{16,17)}。シアロ糖鎖再構築赤血球は1% BSA含有PBSで洗ってから、最終濃度1%の赤血球浮遊液とした。

MAA と SNA によるレセプター・マスキング効果の測定

12-well のプラスチック培養器に培養さ

れた A549細胞を DMEM で洗って、残存する FCS を十分に除去した後、0~20 μ g/ml のレクチン MAA (Sigma) あるいは SNA (Calbiochem) を含む DMEM で 37 $^{\circ}$ C、45 分間、培養して、それぞれのレクチンに対応する SAa2,3 あるいは SAa2,6 レセプターのマスキングを試みた。糖鎖に吸着しなかったレクチンを除去するため、細胞を DMEM で 2 回洗った後、一定濃度のウイルス液を各 well の細胞に接種した。ウイルス接種 7 時間後に細胞を固定して、抗ウイルス抗体を用いた酵素抗体染色法によりウイルス抗原陽性細胞を検出した。顕微鏡下にウイルス抗原陽性細胞数を計測し、レクチンによるレセプター・マスキングの効果を判定した。

結 果

トリインフルエンザウイルスはヒト呼吸器上皮由来の A549細胞に感染できるか？

弱毒型トリインフルエンザウイルス A/duck/Ukraine/1/63(H3N8) (以下 duck/Ukr と略記する)、A/teal/Tottori/150/02(H5N3) (teal/Tot と略記) A/chick/Germany/N/49(H10N1) (chick/Ger と略記) がヒト呼吸器上皮由来の A549細胞に感染しうるかどうかを調べた。対照として、これらのウイルスが感染できることが分かっているニワトリ胎児繊維芽培養細胞 (CEF) を用いた。ウイルスを接種した細胞を 7 時間後に固定して、ウイルス抗原合成の有無を蛍光抗体法で調べたところ、CEF のみならず A549細胞内においてもト

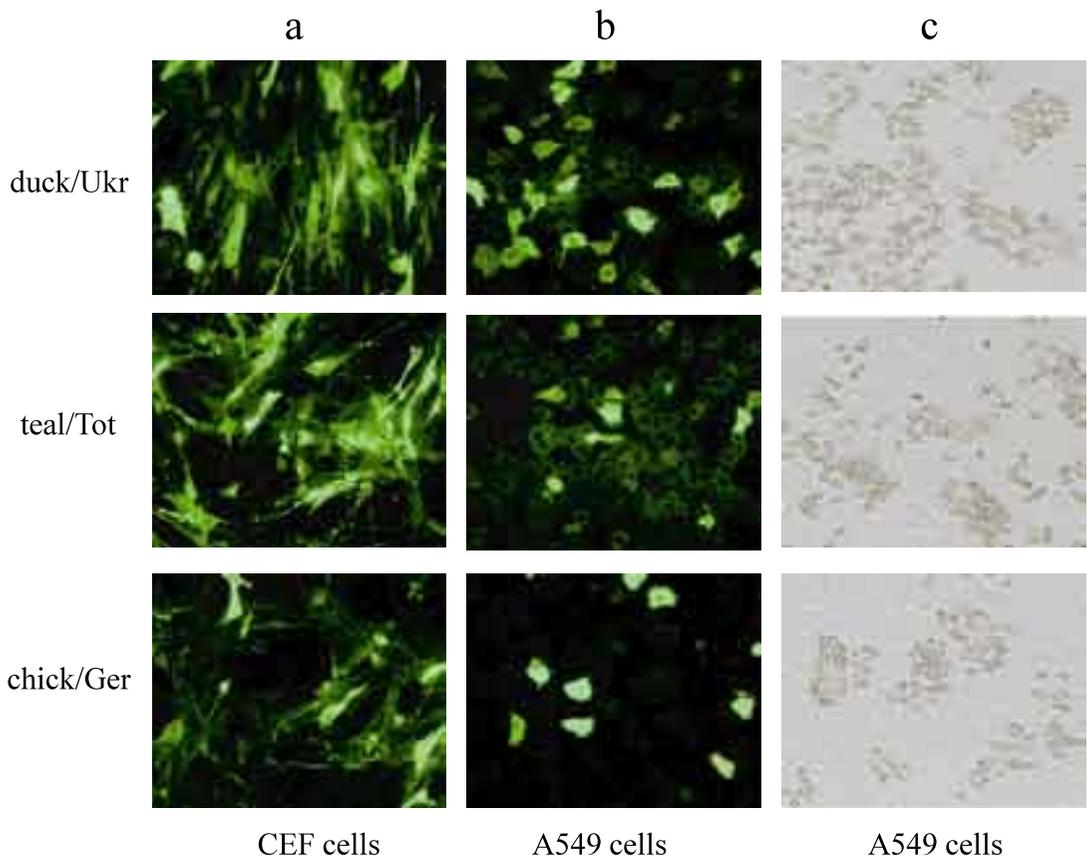


図1 トリインフルエンザウイルスを接種された A549細胞培養系におけるウイルス抗原合成および赤血球吸着細胞の検出。CEF: chick embryo fibroblast 初代培養系におけるウイルス抗原の合成。duck/Ukr: インフルエンザウイルス A/duck/Ukraine/1/63(H3N8), teal/Tot: A/teal/Tottori/150/02(H5N3), chick/Ger: A/chick/Germany/N/49(H10N1)。抗原陽性細胞 (a, b) は視野を広く取るため 10 倍の対物レンズで、赤血球吸着細胞 (c) は吸着した赤血球を明瞭に示すため 20 倍の対物レンズを使用して撮影した。

リインフルエンザウイルスの抗原合成が起きていることが確認された (図1a, 1b). 赤血球吸着試験の成績 (図1c) は合成された HA タンパク質が A549細胞表面まで輸送されていることを示している. ウイルスを接種しなかった細胞では抗原も赤血球吸着も観察されなかった (Data は非表示).

以上のことから duck/Ukr, teal/Tot, chick/Ger は A549細胞に吸着侵入してウイルス抗原の合成を開始する能力を持っていることが判明したので, 次に, その効率を CEF の場合と比較した. ウイルス抗原陽性細胞が顕微鏡 1 視野当たり 5~20 個程度になるようにあらかじめ種ウイルスを希釈し, その一定量を CEF と A549培養細胞に接種し 37℃ で 7 時間培養後に固定して免

疫染色によりウイルス抗原陽性細胞を検出した. 材料と方法に記載したように顕微鏡 1 視野当たりの平均陽性細胞数を求め, 図 2 に示した. 対照として, ヒトのインフルエンザ A/Okayama/6/01(H3N2) ウイルス (human/Oka) を用いた実験の成績も併記した.

同一量のウイルスを接種しても, 感染してウイルス抗原合成に至るまでの効率は A549 と CEF 細胞で異なり, トリのウイルスはやはり CEF に効率良く感染し, 一方ヒトのウイルスは A549 に効率良く感染することが分かった. これは当然予想された結果であるが, しかし, トリのウイルスの A549 に対する感染効率に再注目してみると, duck/Ukr については CEF に約 20 個侵入するウイルス量で, A549 には 10 個

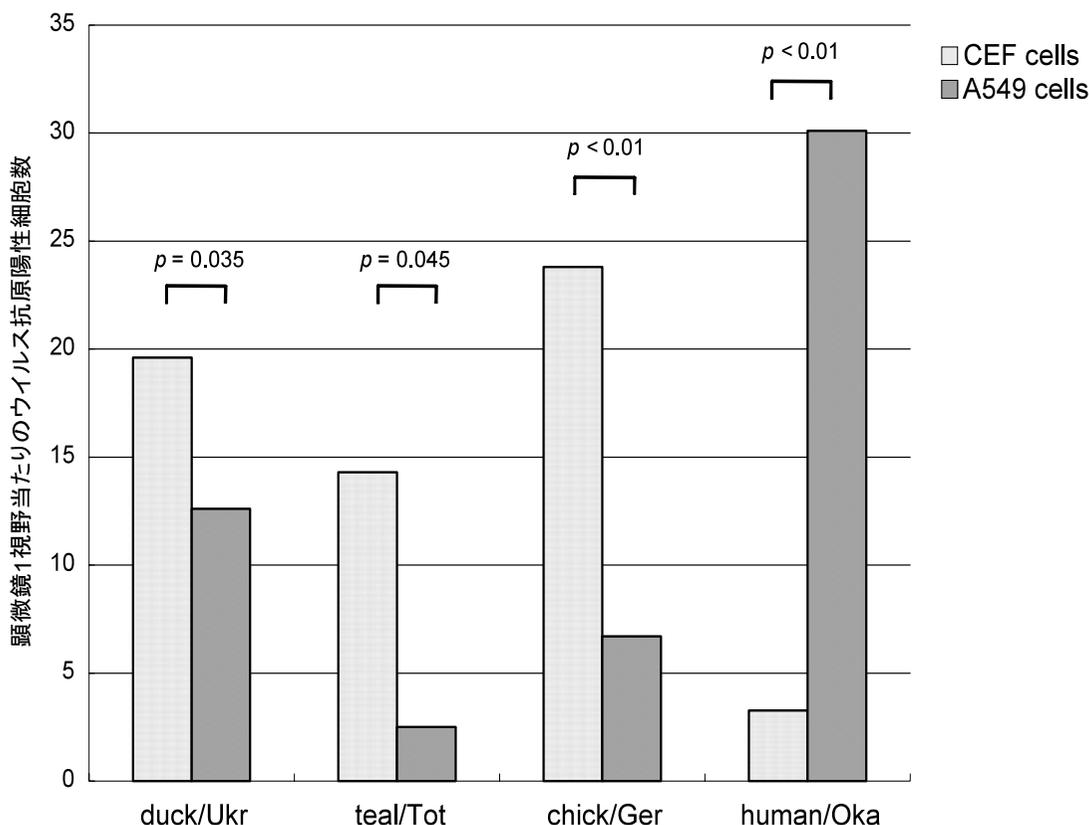


図 2 CEF と A549細胞培養系におけるウイルスの感染効率 (ウイルス抗原陽性細胞の出現比率). 同一量のウイルスを A549 と CEF 細胞に接種し, 7 時間培養後にウイルス抗原陽性細胞を検出した. 倍率 20 倍の対物レンズの 1 視野に観察される陽性細胞の平均値を表した. Human/Oka: インフルエンザ A/Okayama/6/01(H3N2) ウイルス. 3~5 回の実験成績の t 検定を行い, それぞれの p 値も図中に示した.

以上侵入して抗原合成を行なったことになる。また、teal/Totとchick/Gerについては、それぞれCEFに較べ約1/10と1/4のウイルスがA549細胞に侵入し抗原合成を行なったことになる。このようにトリのウイルス間でもA549ヒト細胞に侵入する能力にはかなりの差があることが分かった。

さて、これらのウイルスの感染が実際にA549細胞系で拡大するかどうかは、細胞から産生された子孫ウイルスが次々と新しい細胞に感染する多段階増殖ができるかどうかにかかっている。細胞培養系で通常のインフルエンザウイルス（強毒型トリウイルスを除く）が多段階増殖するためには、トリプシンのような活性化プロテアーゼが必要であるため¹⁾、ウイルス接種12時間後の培養細胞にトリプシンを培地1mlあたり1 μ g添加して、ウイルス感染の拡がりを調べた。

感染拡大率は、トリプシン添加後24時間培養した時のウイルス抗原陽性細胞数とトリプシン添加直前の陽性細胞数の比で表した（表1）。A549細胞系においてhuman/Okaの感染は著しく拡がったが、teal/Totとchick/Gerはほとんど拡がらなかった。つまり、teal/Totとchick/Ger

はたとえA549細胞に侵入してウイルス抗原を合成しても子孫ウイルスの産生にはほとんど至らないことが分かった。一方、duck/Ukrは、human/Okaに較べると効率は低いながらも、A549細胞で多段階増殖が可能であった。このように、用いた3種類のトリインフルエンザウイルスの間でもヒト細胞に感染して増殖する潜在能力には大きな差があることが明らかとなった。

以下の実験では、A549細胞表面のSA α 2,6およびSA α 2,3シアロ糖鎖の存在状況と、用いたウイルスのレセプター認識特異性について調べた。

A549細胞表面におけるレセプターシアロ糖鎖の発現状況

SNAとMAAはそれぞれ特異的にSA α 2,6とSA α 2,3に結合するレクチンで、シアロ糖鎖の検出に広く利用されている。A549細胞をFITC

表1 A549細胞培養系におけるウイルス感染の拡大率

ウイルス	実験1	実験2	実験3	平均
duck/Ukr	12.4 \times	20 \times	7.4 \times	13.3 \times
teal/Tot	1.3 \times	1.8 \times	1.2 \times	1.4 \times
chick/Ger	1.1 \times	1.4 \times	0.6 \times	1.0 \times
human/Oka	277 \times	344 \times	73 \times	231 \times

拡大率 = トリプシン添加24時間培養後の感染細胞数 / トリプシン添加直前の感染細胞数
トリプシンはウイルス感染12時間後に添加した。

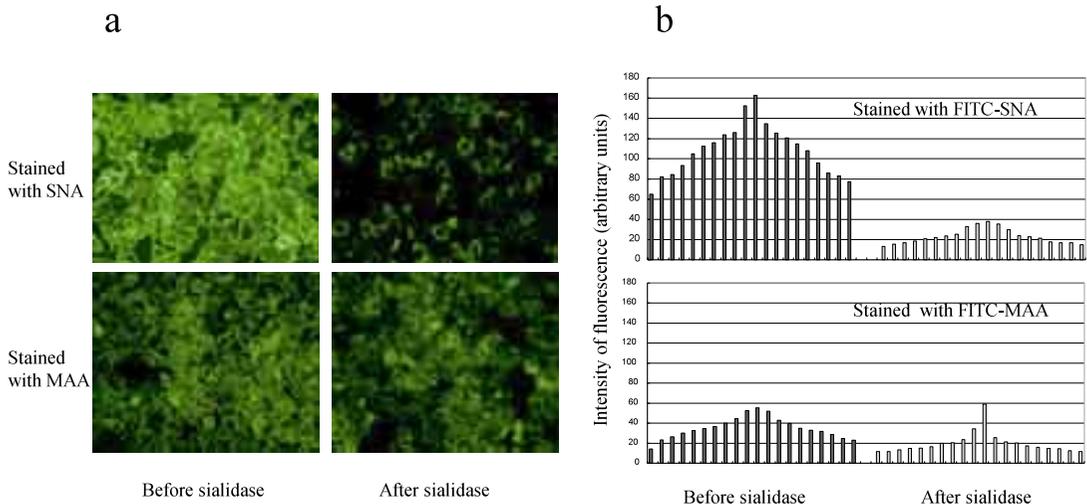


図3 A549細胞上におけるSA α 2,6およびSA α 2,3シアロ糖鎖の分布. SA α 2,6およびSA α 2,3はそれぞれを認識するFITC標識SNAおよびMAAレクチン染色により検出した。観察された蛍光がシアロ糖鎖特異的なものであることを確認するため、シアリダーゼで前処理した細胞の染色も行った（染色した細胞をシアリダーゼ処理前後で観察したものではない）。蛍光強度はそれぞれ20個の細胞上の蛍光をIBASシステムで計測して表示した。

で標識した SNA (FITC-SNA) で染色すると、図3a に示すように、FITC の蛍光が細胞の全面に渡りはっきりと観察された。バクテリア由来のシアリダーゼで細胞を前処理すると、FITC-SNA の結合量が激減することから、この染色がシアロ糖鎖特異的なものであることが確認できる。一方、FITC-MAA による細胞染色では、薄いネット状の蛍光が細胞境界に沿って観察された。このネット状の蛍光もシアリダーゼ処理によって減少するのでシアロ糖鎖特異的なものと考えられる。この成績は A549細胞上には SA α 2,6 と SA α 2,3 が共に発現していることを示している。

最近、Gondran ら¹⁸⁾ と Linman ら¹⁹⁾ は表面プラスモン共鳴を利用した測定法によってレクチンと糖鎖の平衡解離定数 (K_d) を計算し、それぞれ MAA と SA α 2,3 間の K_d は 427nM で検出限界が 83nM、SNA と SA α 2,6 間の K_d は 754nM で検出限界が 50nM と報告している。彼らの成績から MAA と SNA の検出感度は同じ位であり、結合した蛍光強度の測定によって、ある程度の量的比較が可能であることと考えられる。

そこで、それぞれの蛍光染色標本より 20 個の細胞をランダムに選び、IBAS システムによって細胞上の蛍光強度を解析して、図3b に表示した。

これらの成績は、A549細胞上には大量の SA α 2,6 に加えて、少量の SA α 2,3 が存在することを示している。従って、duck/Ukr, teal/Tot, chick/Ger は A549細胞に少量存在する SA α 2,3 をレセプターとして細胞に侵入したと考えられるが、その前にこれらのウイルスのレセプター認識特異性を確認する必要がある。

レセプター認識特異性の確認

ヒト赤血球をシアリダーゼで処理して糖鎖末端のシアル酸を除去後、 α 2,6 あるいは α 2,3 シアリルトランスフェラーゼを用いて、SA α 2,6 あるいは SA α 2,3 のみを持つレセプター再構築赤血球を調製して、duck/Ukr, teal/Tot, chick/Ger, human/Oka のレセプター特異性を調べた。同一濃度のウイルス液を 96-well プレート中で 2 倍階段希釈後、無処理血球、シアリダーゼ処理血球およびレセプター再構築血球を用いてウイルスの赤血球凝集価を測定した。図 4 に示し

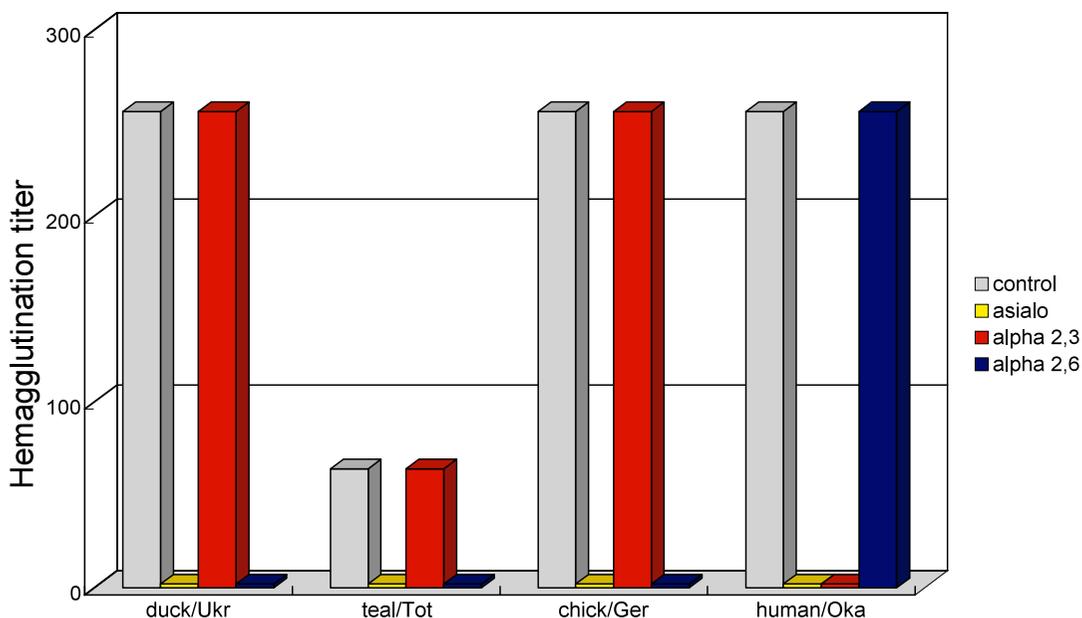


図4 duck/Ukr, teal/Tot, chick/Ger および human/Oka のレセプター認識特異性。無処理 (control)、シアリダーゼ処理 (asialo) およびレセプター再構築ヒト赤血球 (SA α 2,3 および SA α 2,6) を用いてそれぞれのウイルスの赤血球凝集価を測定した。

たように、トリのウイルスは SAa2,3 を持つ赤血球を、ヒトのウイルスは SAa2,6 を持つ赤血球を凝集し、用いたすべてのウイルスはそれぞれの種に応じたレセプター特異性を保持していることが確かめられた。

MAA と SNA によるレセプター・マスクング効果

A549細胞の糖鎖をレクチンで特異的にマスクして、ウイルスの侵入を阻止することができれば、実際にその糖鎖がレセプターとして使われていることが確認できる。しかしウイルス侵

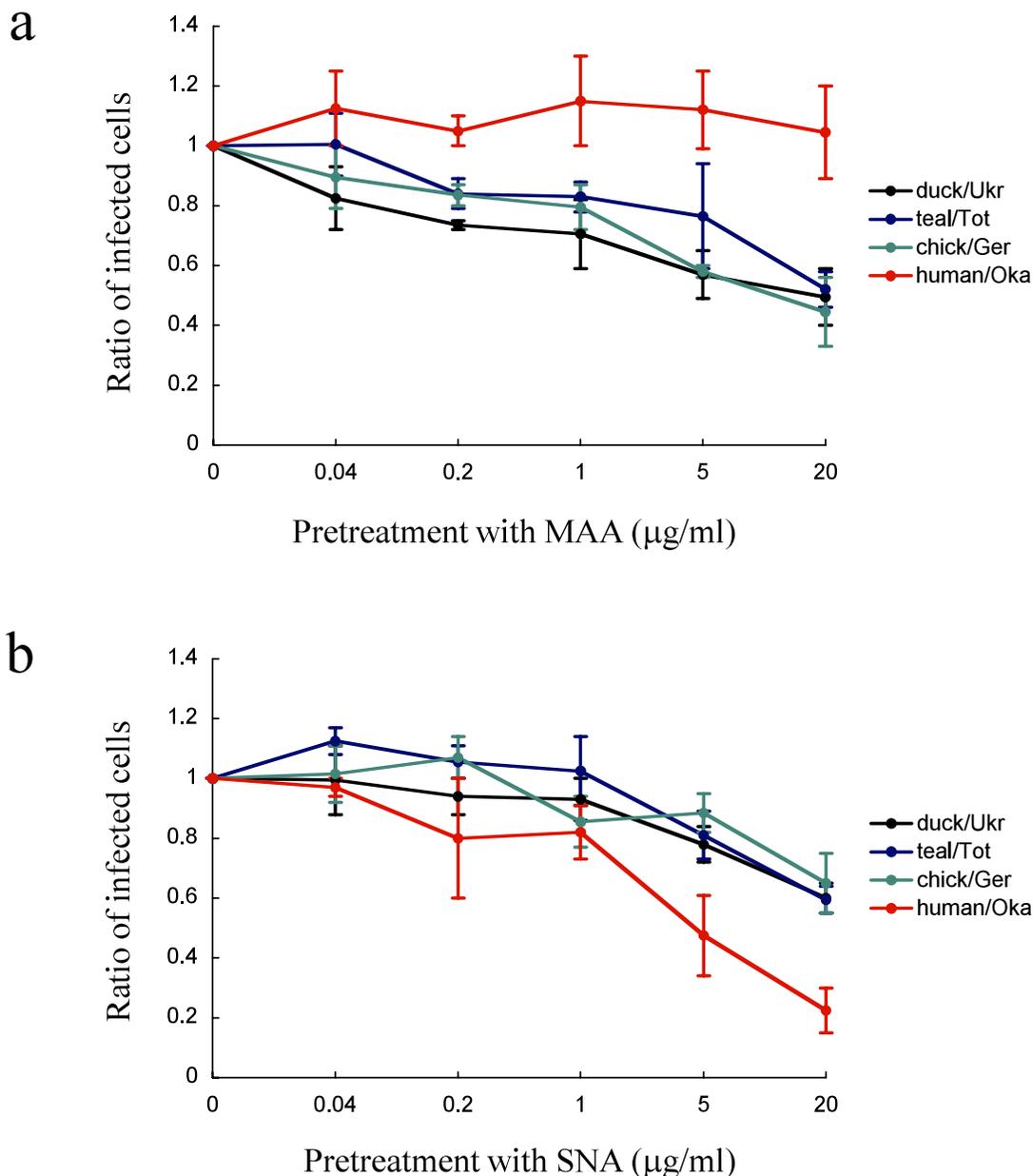


図5 MAA と SNA 前処理によるレセプター・マスクング効果. A549細胞をそれぞれの濃度の MAA あるいは SNA で前処理してから、一定量のウイルスを接種し、7時間後のウイルス抗原合成細胞（則ち感染細胞）数を免疫染色法により計測した. マスクング効果はレクチン0μg/ml処理細胞における感染細胞数を1(control)として、その比で表した.

入の有無をウイルス抗原合成の有無で検定しているため、細胞毒性を示す濃度のレクチンは使用できない。予備実験でMAAもSNAも20 μ g/mlを越えるとウイルス抗原合成を非特異的に抑えることが分かったので、0~20 μ g/mlの範囲でレクチンによるマスキング効果を調べた。

A549細胞を異なる濃度のレクチンで処理してから、一定濃度のウイルスを接種し、感染7時間後にウイルス抗原陽性細胞を検出して、ウイルスの侵入効率を調べた。処理レクチン濃度0 μ g/mlの細胞培養で検出されたウイルス抗原陽性細胞数を1として、それに対する比を図5にまとめた。Duck/Ukr, teal/Tot, chick/Gerの侵入効率はMAA前処理によって低下したがhuman/Okaは影響を受けなかった(図5)。一方、SNA前処理によってhuman/Okaの侵入効率は低下したが、SNA濃度が5-20 μ g/mlのところではduck/Ukr, teal/Tot, chick/Gerの侵入効率も若干低下した。これは、A549細胞上には大量のSAa2,6と少量のSAa2,3が共存している(図3参照)ため、大量のSAa2,6に結合したSNAが立体障害となってトリウイルスのSAa2,3へのアクセスを妨害するためと考えられる。用いたレクチン濃度では完全なマスキング効果は観察されなかったが、これ以上の濃度は細胞毒性のため使用できなかった。それでも、得られた成績はduck/Ukr, teal/Tot, chick/Gerとhuman/Okaではレセプターへのアクセス様式が全く異なることを示しており、トリウイルスはSAa2,3をレセプターとして認識していると考えられる。

考 察

本研究で得られた成績から、ヒトA549細胞上には大量のSAa2,6に加えて少量のSAa2,3が存在すること、トリインフルエンザウイルスduck/Ukr, teal/Tot, chick/Gerは少量のSAa2,3をレセプターとしてヒトA549細胞に侵入し、ウイルス抗原合成を開始する能力を持っていること、その能力にはこの3種のウイルス間でも大きな差があること、などが明らかとなった。従って、これまで言われてきた“レセプター特

異性の違いと細胞におけるレセプターの偏在”則ち“ウイルスのレセプター嗜好性と細胞のレセプターのミスマッチ”がトリインフルエンザウイルスのヒトへの感染のバリアとなっているというコンセプトには若干の修正が必要である。このバリアはそれ程高いものではなくウイルスの種類によっては容易に乗り越えられると考えられる。

本研究の成績はまた、ヒト細胞上にSAa2,6とSAa2,3が共存すれば、その発現量に大きな差があっても、トリのインフルエンザウイルスも感染(少なくとも侵入とウイルス抗原合成開始)できることを示しており、従って、必ずしもブタ細胞(両レセプターの共存が知られている)を通さなくとも、同時感染したウイルス間で遺伝子の交雑が起きて新型ウイルスが出現する可能性があることも示唆している。

Nichollsら²⁰⁾は、ヒトの鼻咽頭、アデノイド、扁桃の培養組織を用いて、SAa2,3の顕在が確認できないにもかかわらず強毒型H5N1トリインフルエンザウイルスが感染できたと報告しているが、本研究で得られた観点に立脚すると、極めて少量存在するSAa2,3をレセプターとしてこれらの組織にウイルスが感染した可能性が考えられる。

Yamadaら²¹⁾とAuewarakulら²²⁾は、トリから分離された強毒型H5N1インフルエンザウイルスはSAa2,3のみに親和性を示すのに対して、ヒト患者から分離されたH5N1ウイルス株の中にはSAa2,3とSAa2,6に同等の親和性を示すものがあることを見出しており、このレセプター認識特異性の変異したHAサブタイプがヒトの世界に持ち込まれると、やがてパンデミックを起こすウイルスになる恐れがあると報告している。本研究で得られた成績、則ち必ずしもレセプター認識特異性の変異がなくともウイルスはヒト細胞に感染できることを考慮すると、上記の変異の意義を次のように考えることができる。ウイルスのレセプター親和性がSAa2,3のみ(言わばトリ型)なら、ヒトに感染するにはムチン中に存在する大量のSAa2,3^{23,24)}に結合

しながら宿主細胞上の少量の SAa2,3 を見つけて細胞に侵入しなければならない, SAa2,3 と SAa2,6 双方に親和性があれば, ムチン中の大量の SAa2,3 に結合しながら宿主細胞上に大量に存在する SAa2,6 に結合して細胞侵入を果たす,そして親和性が SAa2,6 のみ(言わばヒト型)なら, ムチン中の SAa2,3 に煩わされることなく宿主細胞上に大量にある SAa2,6 に結合して細胞に侵入することができる。つまり, ムチンのシアロ糖鎖は SAa2,3 型に, 呼吸器上皮細胞のシアロ糖鎖は SAa2,6 型に偏っていることが, トリインフルエンザウイルスに対するバリアとなっていると考えられるが²⁵⁾, レセプター親和性が SAa2,3 から SAa2,6 にシフトすれば, このバリア機能は損なわれてしまう。

結局, “レセプター特異性の違いはインフルエンザのトリ-ヒト感染を防ぐバリアとして機能しうるか” という課題については, 総合的に見れば“機能しうる”と考えられるが, その仕組みについては, これまで言われてきたような単純で静的なものではなく, 本研究で得られた成果も踏まえて, 今後, よりダイナミックなものに修正して行く作業が必要と考えられる。

謝 辞

本研究を行なうに当たり多大なご指導とご協力をいただいた川崎医科大学微生物学教室の大内正信教授, 後川潤助教, 雑賀康子補助員, 大森幸代補助員, 的場久美子補助員, 大内礼子客員研究員, 生理機能センターの山根和子補助員に深謝いたします。

本研究は基礎研究推進事業 (NIBIO) ならびに川崎医科大学プロジェクト研究費 (17-405M, 18-405, 19-408M) の援助を受けて行われた。

引用文献

- 1) Cox NJ, Kawaoka Y: Orthomyxoviruses: influenza, in Topley and Wilson's microbiology and microbial infections, 9th ed, vol. 1. Virology: 385-433, 1998
- 2) Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from

- black-headed gulls. J Virol 79: 2814-2822, 2005
- 3) Webby RJ, Webster RG, Richt JA: Influenza viruses in animal wildlife populations. Curr Top Microbiol Immunol 315: 67-83, 2007
- 4) Baum LG, Paulson JC: Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity. Acta Histochem Suppl 40: 35-38, 1990
- 5) Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG: Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. Virus Res 29: 155-165, 1993
- 6) Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC: Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. Virology 205: 17-23, 1994
- 7) Ito T, Suzuki Y, Mitnaul L, Vines A, Kida H, Kawaoka Y: Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. Virology 227: 493-499, 1997
- 8) Ito T, Kawaoka Y: Host-range barrier of influenza A viruses. Vet Microbiol 74: 71-75, 2000
- 9) Suzuki Y: Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. Biol Pharm Bull 28: 399-408, 2005
- 10) Sedyaningsih ER, Isfandari S, Setiawaty V, et al. T: Epidemiology of cases of H5N1 virus infection in Indonesia, July 2005-June 2006. J Infect Dis 196: 522-527, 2007
- 11) Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD: Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 4620-4624, 2004
- 12) Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y: Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. Nature 440:435-436, 2006
- 13) Kogure T, Suzuki T, Takahashi T, Miyamoto D, Hidari KI, Guo CT, Ito T, Kawaoka Y, Suzuki Y: Human trachea primary epithelial cells express both sialyl(alpha2-3)Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl(alpha2-6)Gal receptor for human influenza viruses. Glycoconj J 23:101-106, 2006
- 14) Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, Guan Y, Peiris JS: Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential

- binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir Res* 8:73, 2007
- 15) Asaoka N, Tanaka Y, Sakai T, Fujii Y, Ohuchi R, Ohuchi M: Low growth ability of recent influenza clinical isolates in MDCK cells is due to their low receptor binding affinities. *Microbes Infect* 8:511-519, 2006
 - 16) Paulson JC, Rogers GN: Resialylated erythrocytes for assessment of the specificity of sialyloligosaccharide binding proteins. *Methods Enzymol* 138: 162-168, 1987
 - 17) Nobusawa E, Ishihara H, Morishita T, Sato K, Nakajima K: Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2) : A single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides. *Virology* 278: 587-596, 2000
 - 18) Gondran C, Dubois MP, Fort S, Cosnier S, Szunerits S: Detection of carbohydrate-binding proteins by oligosaccharide-modified polypyrrole interfaces using electrochemical surface plasmon resonance. *Analyst* 133: 206-212, 2008
 - 19) Linman MJ, Taylor JD, Yu H, Chen X, Cheng Q: Surface plasmon resonance study of protein-carbohydrate interactions using biotinylated sialosides. *Anal Chem* 80: 4007-4013, 2008
 - 20) Nicholls JM, Chan MC, Chan WY, *et al.*: Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nat Med* 13: 147-149, 2007
 - 21) Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, *et al.*: Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444: 378-382, 2006
 - 22) Auewarakul P, Suptawiwat O, Kongchanagul A, *et al.*: An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J Virol* 81: 9950-9955, 2007
 - 23) van Halbeek H, Breg J, Vliegthart JFG, Klein A, Lamblin G, Roussel P: Isolation and structural characterization of low-molecular-mass monosialyl oligosaccharides derived from respiratory-mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis. *Eur J Biochem* 177: 443-460, 1988
 - 24) Klein A, Carnoy C, Lamblin G, Roussel P, van Kuik JA, Vliegthart JFG: Isolation and structural characterization of novel sialylated oligosaccharide-alditols from respiratory-mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis. *Eur J Biochem* 211: 491-500, 1993
 - 25) Matrosovich M, Matrosovich T, Uhlendorff J, Garten W, Klenk HD: Avian-virus-like receptor specificity of the hemagglutinin impedes influenza virus replication in cultures of human airway epithelium. *Virology* 361:384-390, 2007

A barrier function made up of the receptor preference of the virus and the paucity of receptors in human airways against avian influenza virus infection

Takeyuki KURIHARA

*Center of Respiratory Disease, Kawasaki Medical School Kawasaki Hospital,
2-1-80 Nakasange, Okayama, 700-8505, Japan*

ABSTRACT There are many kinds of influenza A virus distributed amongst bird species worldwide. Birds are thus regarded as an important supplier of new pandemic influenza viruses. Avian and human influenza viruses preferentially recognize $\alpha 2,3$ (SA $\alpha 2,3$) and $\alpha 2,6$ sialosaccharide (SA $\alpha 2,6$) as receptors. Since SA $\alpha 2,3$ can hardly be detected in the epithelium of the human upper respiratory tract, the receptor preference of avian influenza viruses to SA $\alpha 2,3$ and the paucity of SA $\alpha 2,3$ in the human airway have been thought to constitute an important

barrier against avian influenza virus infection in humans. However, the highly virulent H5N1 avian influenza virus has sporadically infected humans and had severe, often fatal, results. Recently several research groups have reported the presence of SA α 2,3 in the human airway. Therefore the above noted concept needs reexamining. In the present study, we examined the effectiveness of this barrier using human lung carcinoma A549 cells and avirulent avian influenza viruses. We found that a small amount of SA α 2,3 was present in A549 cells, along with a large amount of SA α 2,6. The avian viruses tested could enter A549 cells utilizing the small amount of SA α 2,3 present as a receptor and synthesize viral antigens. However, viral entry efficiency differed among the viruses tested. These results indicated that the presence of a small amount of receptor on cell surfaces compromised the barrier function, and so some avian viruses have the potential to overcome the barrier to human infection.

(Accepted on September 2, 2009)

Key words : Avian influenza virus, Receptor preference, Sialosaccharide

Corresponding author

Takeyuki Kurihara

Center of Respiratory Disease, Kawasaki Medical School

Kawasaki Hospital, 2-1-80 Nakasange, Okayama, 700-8505, Japan

Phone : 81 86 225 2111

Fax : 81 86 232 8343

E-mail : ths_kuri@yahoo.co.jp