

ヒト皮膚繊維芽細胞を用いてヒトにおけるトリインフルエンザウイルスの感染増殖能の評価は可能か

葉山（藤井）智子

川崎医科大学 微生物学教室, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 ヒト皮膚繊維芽細胞 (HSF) が, トリインフルエンザウイルスのヒト細胞における感染増殖能を評価するための実験に使用可能かどうかを検討した. 先ず HSF はヒトインフルエンザウイルスに対してヒト気管支上皮細胞と同様な感受性を示すこと, ウイルスレセプターに関しては大量の α 2,3シアロ糖鎖 (いわゆるトリ型レセプター) と少量の α 2,6シアロ糖鎖 (いわゆるヒト型レセプター) が存在すること, 少量のレセプターにもかかわらずヒトインフルエンザウイルスは HSF で良く増殖すること, ウイルスの増殖性は HSF の継代歴 (6~22代) に左右されないことが見出された. そこで15株の HSF に弱毒型トリインフルエンザ A/teal/Tottori (H5N3) ウイルスを感染させ, それぞれの細胞培養系においてウイルスの感染がどれくらい拡がるかを測定した. その結果, HSF 株間でトリのウイルスの感染拡大効率に差があることが見出されたが, いずれの場合もヒトのウイルスと比較すると極めて限定された増殖しか起きないことが明らかとなった. 本研究を通して, HSF がインフルエンザウイルスのヒト細胞における増殖能の評価に使用できることが分かったので, 今後, 他のトリインフルエンザウイルスの増殖能を調べることにより, それぞれのウイルスが持つ新型コロナウイルス出現の潜在的危険性について論ずることが可能となった.

(平成21年7月6日受理)

キーワード: ヒト皮膚繊維芽細胞, トリインフルエンザウイルス, 個体の感受性

緒言

2009年, ブタインフルエンザに由来する新型のヒト H1N1 インフルエンザが北米に発生し, 瞬く間に世界中に拡がって, 日本国内でも感染が拡がりつつある. 現在のところ, この北米型インフルエンザの病原性は従来の季節性インフルエンザと同等という見方がなされているが, もしこれが高病原性のウイルスであれば, 国内でも多大な犠牲者をだすことが予想される. この新型コロナウイルスの出現によって, これまで懸念されてきたトリインフルエンザ由来の新型コロナ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ともに, 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める必要がある.

トリインフルエンザウイルスは, そのレセプター認識特異性とウイルス RNA ポリメラーゼの宿主特異性のためにヒトでは感染増殖が困難と考えられてきた¹⁻¹⁵⁾. しかし, 高病原性 H5N1 トリインフルエンザに感染した患者の体内では激しいウイルス増殖が起きていると考えられ, またこのウイルスのヒト-ヒト感染は血縁関係者間にもみられることから¹⁶⁻¹⁹⁾, ウイ

別刷請求先
葉山 (藤井) 智子
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学 微生物学教室

電話: 086 (462) 1111
ファックス: 086 (462) 1199
Eメール: tomofuji@ruby.ocn.ne.jp

ルスの感染増殖には宿主の遺伝子も大きく関与していると考えられる。つまり、ある一部の人はトリのウイルスが感染増殖しやすい遺伝的要素を持っており、そこに高病原性トリインフルエンザウイルスが感染した場合には重篤な症状を現すことが考えられる。また、トリインフルエンザウイルスと一口に言ってもその遺伝子構成は千差万別であり、ヒト細胞に感染しそこで増殖する潜在能力はウイルスによって大いに異なることが予想される。このような観点から、トリインフルエンザ由来の新型ウイルスが発生する潜在的危険性を評価するためには、個人のトリウイルスに対する感受性とトリウイルスが持つヒト細胞での増殖能力を定量的に測定できる方法が必要とされる。可能であれば個人個人の気道上皮細胞を採取して実験に用いるのが最適と考えられるが、個人から気道上皮細胞を採取すること自体が困難な上に、それを組織培養系で維持して定量的な感染実験に用いるのは尚一層、困難である。市販されているヒト初代気道上皮細胞ですら組織培養系で三回以上継代するのはほとんど不可能である。

一方、ヒト皮膚線維芽細胞は個人から容易に採取することが可能であり、その上、細胞培養系での維持も簡単で、20回以上、安定して継代することができる。したがって、上記の目的にヒト皮膚線維芽細胞を使用することができるなら、トリインフルエンザウイルス（あるいはブタ由来の新型ウイルスについても）感染の個人的リスクの評価とともに、トリウイルスのヒト細胞における増殖能力の評価が容易にできることになる。本研究では、この課題を遂行するためにヒト皮膚線維芽細胞が使用可能かどうかを検討し、十分使用に堪えうることを見出した。そして、異なる遺伝的背景を持った個人から得られた15株のヒト皮膚線維芽細胞を用いて、弱毒型 H5N3 トリインフルエンザウイルスがこれらの細胞で増殖できるかどうか、細胞の違い（言わば個体差）によってウイルスの増殖性に差が見られるかどうか検討した。

材料と方法

細胞とウイルス

ヒト皮膚線維芽細胞 (human skin fibroblast: HSF) は鳥根大学医学部小児科山口清次教授より分与された16株の HSF のうち、増殖の良い15株を、Takusa らの方法²⁰⁾ に従って維持、継代して実験に使用した。正常ヒト気管支細胞 Normal human bronchial/tracheal epithelial cells (NHBE) と小気道上皮細胞 small airway epithelial cells (SAEC) は Cambrex Bio Science Walkersville Inc, USA より購入し、添付のマニュアルに従って培養した。

弱毒型トリインフルエンザウイルス A/teal/Tottori/150/02(H5N3) は鳥取大学農学部伊藤壽啓教授より分与された。本研究では、分与されたウイルスを初代ニワトリ胎児線維芽細胞にてブラック形成法により2回クローニングした後、10日齢の発育鶏卵漿尿膜腔で増殖させた種ウイルスを用いた。

ヒトインフルエンザウイルス A/Osaka/981/98 (H3N2) は大阪公衆衛生研究所奥野良信博士より分与されたウイルスをイヌ腎由来の Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いてブラック形成法によりクローニングしたものを MDCK 細胞で増殖させ種ウイルスとした。

ウイルス抗原陽性細胞の検出

コラーゲンでコーティングされた12-well のプラスチックプレート (Sumitomo Beklite, Japan) に培養された細胞を Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で洗ってからウイルスを感染させ、一定時間37°C で培養後に細胞を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、ビオチンラベル抗モルモット IgG (Sigma, USA) を二次抗体とした間接 ABC (avidin-biotinylated peroxidase complex) 法を用いて免疫染色を行った。ウイルス抗原陽性細胞を10-20倍の対物

レンズを用いて顕微鏡下で30-60視野カウントし、視野あたりの陽性細胞数の平均値を求めた。

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, USA) ととも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。

ブラック形成テスト

培養細胞におけるウイルスの増殖能を評価するためにブラック形成テストを行った。12-wellのプレートに培養した細胞にウイルスを感染させ、37°Cで1時間培養後に、培養液を除き、0.65%のアガロース (Seakem, USA) と1 μ g/mlのアセチル・トリプシン (Sigma) を含んだDMEMを重層して2日間37°Cで培養した。細胞をホルマリンで固定した後、アガロース重層培地を取り除いて、上記と同様に免疫染色を行った。

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。1:100に希釈した蛍光色素 (FITC) 標識 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、別に用意した対照用の細胞を固定して、0.2U/mlのC. perfringens シアリダーゼ (Sigma-Aldrich,

USA) で37°C, 24時間処理した後、上記と同様にレクチンで染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。

結果

ヒト皮膚線維芽細胞におけるヒトインフルエンザウイルスの感染と増殖性

ヒト皮膚線維芽細胞 (HSF) がインフルエンザウイルスの感染・増殖実験に使用可能かどうかを調べるため、ヒト気管支上皮初代培養細胞 (NHBE, SAEC) を対照にして、まずヒトのインフルエンザウイルスがHSFに感染するかどうかを調べた。任意に選んだ6株のHSFと購入したNHBEとSAECを12-wellのプレートに培養し、10倍階段希釈したヒトインフルエンザウイルス A/Osaka (H3/Osaka) の種ウイルスを1wellあたり0.01ml接種し、37°Cで14時間培養後に免疫染色を行ってウイルス感染細胞を顕微鏡下で数えた。ウイルスの感染価は顕微鏡視野あたりの抗原陽性細胞数の平均から求め、2系列の実験結果の平均値を表1に示した。実験に用いた6株のHSFで得られたH3/Osakaの感染価はヒト気管支上皮培養細胞 (SAEC, NHBE) で得られた値と比べると、やや低い傾向が見られるものの、HSFはこのウイルスに対して気管支上皮細胞とほぼ同等の感受性を持つことが明らかとなった。

次に、HSFと気管支上皮細胞の間でH3/Osakaの増殖性に違いが見られるかどうかを調べるため、トリプシン存在下でブラック形成テストを行なった。トリプシンの添加は組織培養系において通常の (強毒型でない) インフルエンザウイルスが多段階増殖するために必要であ

表1 それぞれの細胞におけるインフルエンザウイルス A/Osaka/981/98(H3N2) の感染価

感染価測定に用いた細胞 (継代数)	ウイルス感染価 ¹⁾ ($\times 10^2$ PFU)
NHBE (p4)	5.8 \pm 0.3
SAEC (p3)	8.1 \pm 0.2
HSF-1 (p23)	5.4 \pm 0.4
HSF-6 (p12)	3.4 \pm 0.4
HSF-8 (p10)	2.7 \pm 1.0
HSF-9 (p10)	3.0 \pm 0.3
HSF-11 (p20)	5.9 \pm 0.8
HSF-12 (p7)	3.7 \pm 0.6

¹⁾ 1:100に希釈したA/Osaka種ウイルス0.01ml中に含まれるウイルスの感染価を免疫染色法で測定した。

る¹⁾。ブラック形成テストでは、アガロースを含んだ固形培地で単層培養細胞を覆うために、ウイルス感染細胞から産生された子孫ウイルスは、液体培地中のように自由に浮遊して飛散することができないため、感染細胞と隣接した細胞にのみ感染が可能となる。その結果、1つのウイルス感染細胞を起点にして、その周りに子孫ウイルスに感染した細胞のクラスター（すなわちブラック）を形成することになる。したがってブラックのサイズから、その培養細胞系におけるウイルスの増殖能を容易に推定することができる。H3/Osaka ウイルス感染2日後に形成されたブラックの写真を図1に示した。HSF培養系においても、NHBE培養系と同様なブラックが形成され、HSFはインフルエンザウイルスの増殖能を評価する実験に充分使用可能であることが明らかとなった。

ヒト皮膚線維芽細胞におけるウイルスレセプター・シアロ糖鎖の分布状況

本研究ではHSFを用いてトリインフルエンザウイルスの感染増殖能を評価することを目的としているので、ウイルスのレセプターとなる $\alpha 2,3$ シアロ糖鎖(SA $\alpha 2,3$)がHSFに存在するかどうかを調べる必要がある。植物レクチンMAAは特異的にSA $\alpha 2,3$ に結合することが知られているので、FITC標識MAAを用いて、HSF上のSA $\alpha 2,3$ を検出した。図2に示すように、細胞全面にFITC-MAAの蛍光が明瞭に観察された。この蛍光はバクテリア・シアリダーゼで処理した細胞では見られないことから、シアロ糖鎖特異的なものであることが確認された。一方、 $\alpha 2,6$ シアロ糖鎖(SA $\alpha 2,6$)に結合するFITC-SNAで染色した場合には微弱な蛍光がHSF上に観察され、この蛍光もシアリダーゼで前処理した細胞では見られないので、特異的なものであることが分かる。以上の成績は

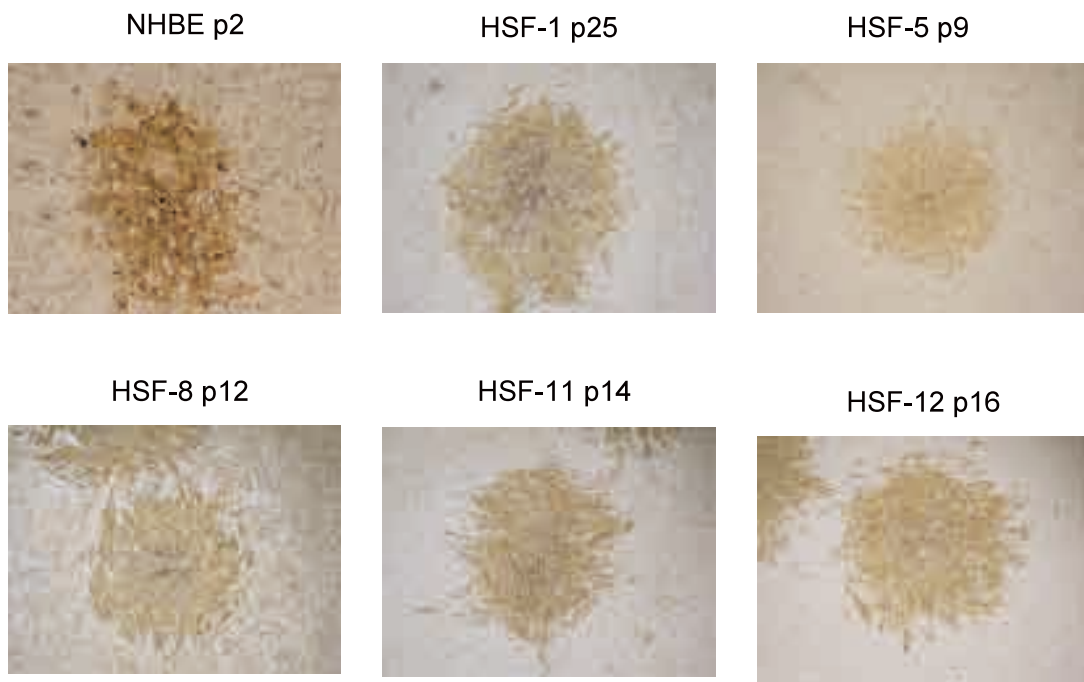


図1 それぞれの細胞培養系におけるインフルエンザH3/Osaka ウイルスのブラック形成。ウイルス感染後に $1\mu\text{g/ml}$ のトリプシンを含むアガロース重層培地下で2日間培養し、ウイルス抗原陽性細胞を免疫染色により検出した。1つのブラックは1つの感染細胞から産生されたウイルスにより形成される。ブラックの直径はウイルス産生能を反映している。4倍の対物レンズを使って撮影。

HSF の表面には SAa2,3 と SAa2,6 とが共存していることを示している. なお他の HSF 株を用いても同様な成績が得られている (データは非表示).

最近, Gondran ら²¹⁾ と Linman ら²²⁾ は surface plasmon resonance - 表面プラズモン共鳴 - の研究からそれぞれ MAA と SAa2,3, SNA と SAa2,6 について均衡解離定数 (K_d) と検出感度を計算して, それぞれの K_d は 472nM と 754nM, 検出限界は 83nM と 50nM と報告している. この数値から MAA と SNA のシアロ糖鎖検出感度はほぼ同程度であると考えられる. したがって, 図 2 の成績は, HSF 表面には大量の SAa2,3 と少量の SAa2,6 が存在することを示しており, シアロ糖鎖の分布パターンは呼吸器上皮細胞に見られるパターン ($SAa2,3 \ll SAa2,6$) と

逆転関係にあることが分かる. HSF 表面にはトリインフルエンザウイルスのレセプターとなる SAa2,3 がふんだんに存在することが明らかとなったが, これはトリインフルエンザウイルスの増殖ポテンシャルを評価するには好都合と考えられる.

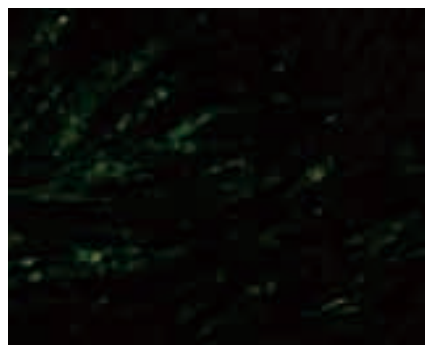
ヒト皮膚繊維芽細胞の継代歴によってウイルスの増殖性が左右されないか

HSF は樹立された細胞株ではないため, その寿命には限界がある. ウイルスの感染増殖実験に用いる場合, 細胞の継代数が進んで寿命に近づくにつれて, 細胞の活性が低下してウイルスの増殖を支え切れなくなることが十分に考えられる. したがって, 細胞の継代歴によってウイルスの増殖がどれくらい影響を受けるのか,

a <FITC-MAA>



HSF-01 p23



Sialidase-pretreated

b <FITC-SNA>



HSF-08 p9

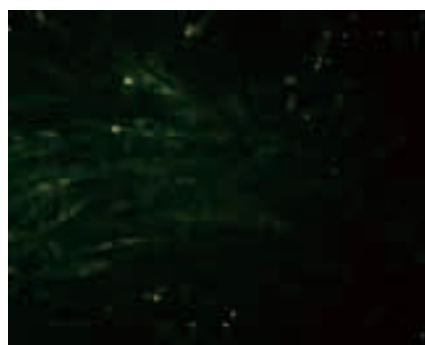


図2 HSF細胞表面のSAa2,3およびSAa2,6シアロ糖鎖. FITCで標識したMAA (SAa2,3を認識) (a)およびSNA (SAa2,6を認識) (b)でHSFを染色した. この染色で観察される蛍光がシアロ糖鎖特異的なものであることを確認するため, シアリダーゼで前処理した細胞の染色も行った. 10倍の対物レンズを使って撮影.

実験の再現性はどれくらいの継代歴まで保証できるのか、あらかじめ査定しておく必要がある。異なる継代歴の HSF を液体窒素保存タンクより取り出し、継代歴によってインフルエンザウイルスの増殖性に差が出ないかどうか調べた。

継代歴の異なる HSF-6, 11, 12 を 12-well プレートに培養して、それぞれに H3/Osaka を感染させ、0.65% アガロースと $1\mu\text{g/ml}$ トリプシンを含んだ重層培地下で 2 日間、 37°C で培養してブラックを形成させた。それぞれの継代歴の細胞から 20 個のプラークをランダムに選び、その直径の平均値を図 3 に示した。調べた 3 株の細胞では p6 から p22 までの継代数の細胞を使う限りでは H3/Osaka の増殖性に有意差を認めなかった。継代数が進むにつれてウイルスの増殖性が低下する傾向もまったく観察されなかったことから、この継代範囲では実験の再現性は十分に確保されると考えられる。

ヒト皮膚繊維芽細胞におけるトリ H5N3 ウイルスの増殖性の検討

異なる遺伝的背景を持つ 15 株の HSF を 12-well プレートに培養して、弱毒型 H5N3 トリインフルエンザウイルス (H5/Tottori) を感染させ、

トリプシンを含むアガロース重層培地で 2 日間培養して、ウイルス抗原合成陽性 (すなわち感染細胞) を免疫染色により検出した。対照としてヒト H3/Osaka を感染させた場合にはウイルスの増殖が十分に起こって大きなブラックが形成されることを確認した (図 4a)。これはトリ H5/Tottori ウイルスの増殖が悪い場合に、それが細胞の活性低下に起因するものでないことを確認するためのものである。

H5/Tottori を感染させたどの HSF 培養系においても、肉眼的には H3/Osaka 感染に見られるような明瞭なブラックは見られなかったが、顕微鏡では、感染細胞が単独で存在するものからある程度の感染細胞が集まってクラスターを形成しているものまで観察された (図 4b)。アガロース重層培地を用いているので、1 つの感染細胞から感染が広がった場合は感染細胞のクラスターが観察される。したがって、それぞれのクラスターに含まれる感染細胞数を数えれば、感染が何倍に広がったか評価できる。ランダムに選んだ 50 のクラスター (感染細胞 1 個の場合もある) に含まれる感染細胞数を数え、1 個の感染細胞から感染が平均何倍に広がったか計算した。6 系列の実験から得られた平均値 (つまり計 300 クラスターの平均値) を図 5 に

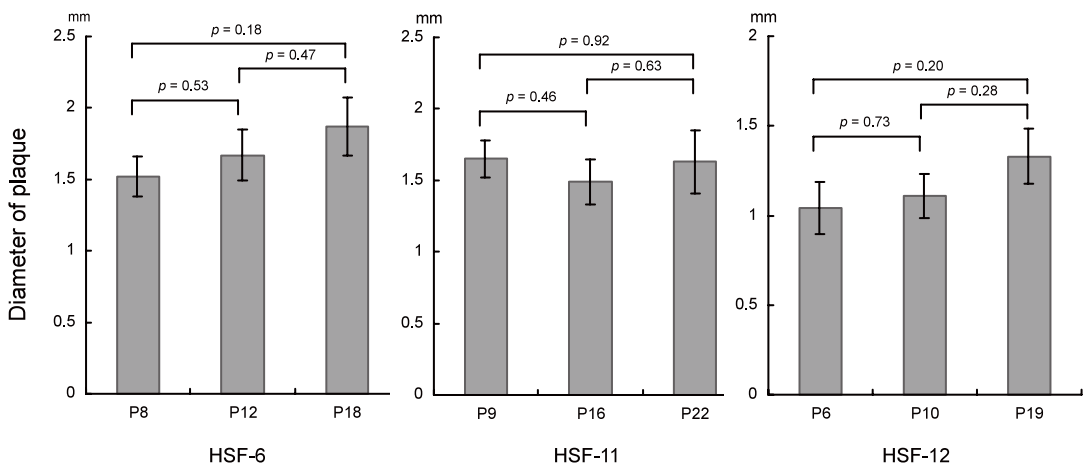


図 3 異なる継代歴の HSF 培養系における H3/Osaka ウイルスのブラック形成。HSF-6 (継代数 p8,12,18), HSF-11 (継代数 p9,16,22), HSF-12 (継代数 p6,10,19) 細胞をそれぞれ 12-well の培養器に準備し、H3/Osaka ウイルスを感染後、 $1\mu\text{g/ml}$ のトリプシンを含むアガロース重層培地下で 2 日間培養し、ウイルス抗原陽性細胞を免疫染色により検出した。ブラックの直径はそれぞれ 20 個の平均値で表した。

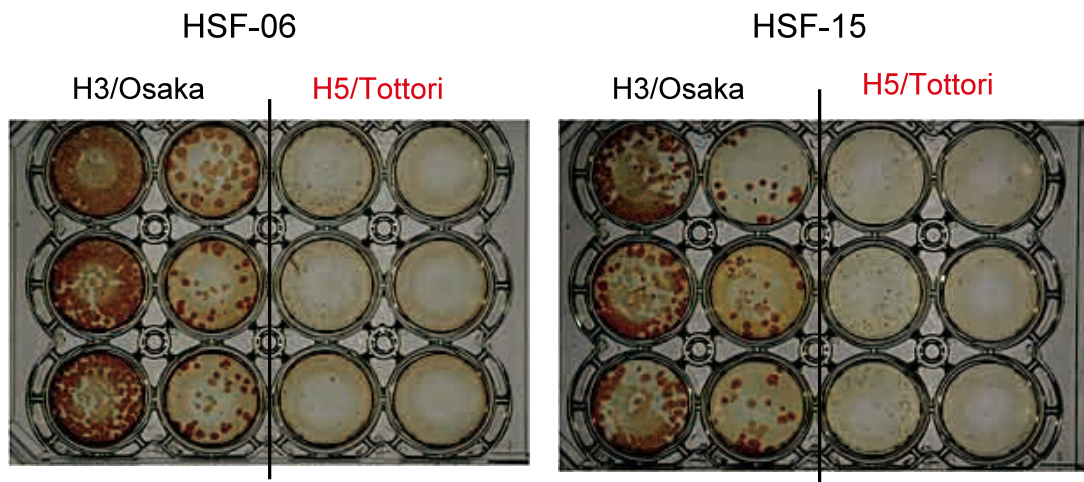


図4a ブラックの全体像. HSF培養系で形成されたH3/OsakaとH5/Tottoriのブラックを免疫染色した全体像を示した.

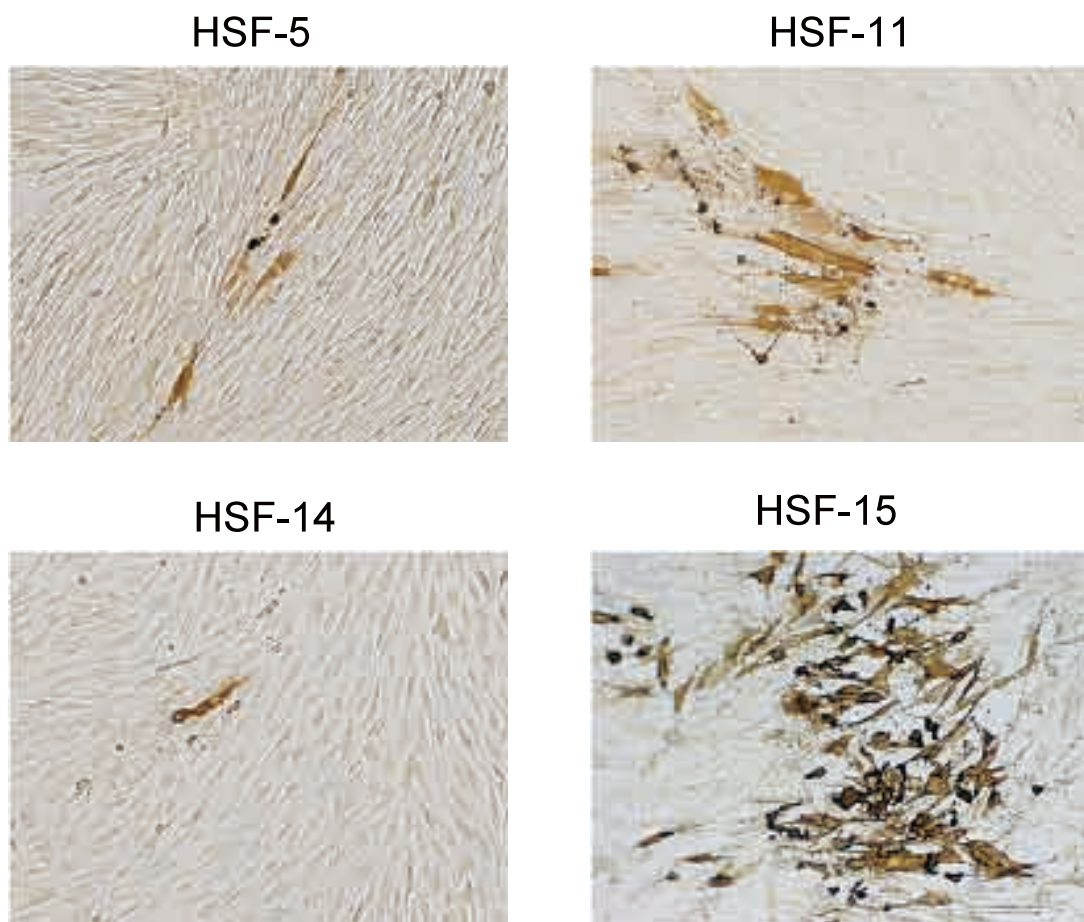


図4b H5/Tottori を感染させた HSF 培養系. 図4a の H5/Tottori 感染細胞を10倍の対物レンズで顕微鏡観察したもの.

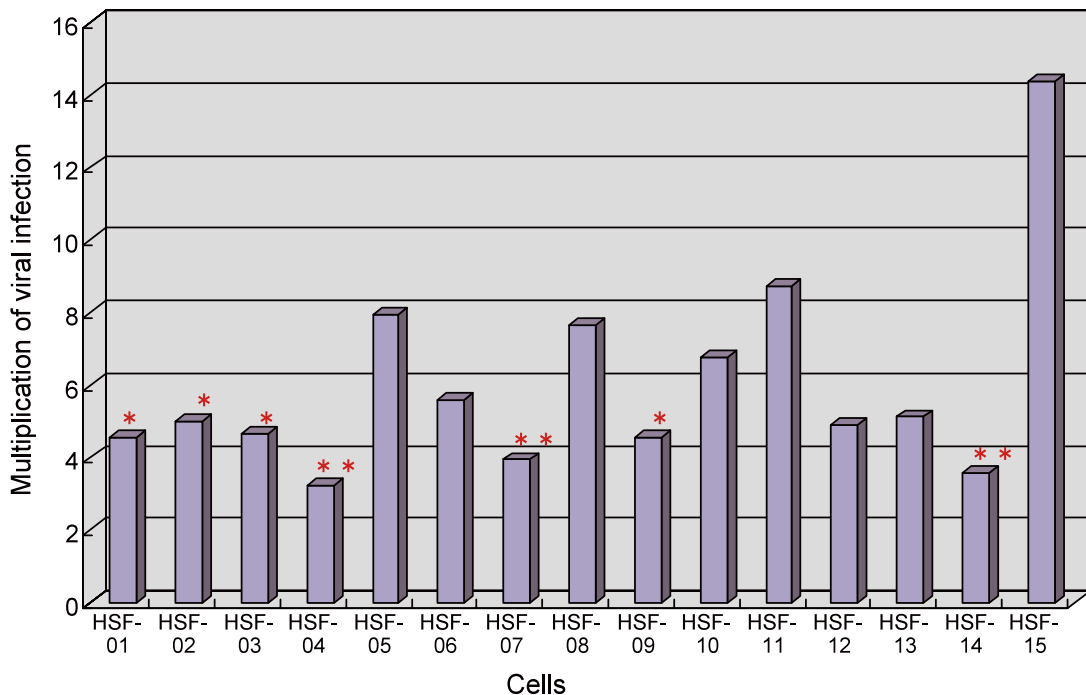


図5 様々なHSF株におけるH5/Tottoriの感染拡大率. 1つの感染細胞から産生されるウイルスにより2日間でどれくらい感染が拡大するかを表した. **: HSF-15に対する有意差検定で $p < 0.01$. *: $0.01 < p < 0.05$. 無印: $0.05 < p < 0.2$

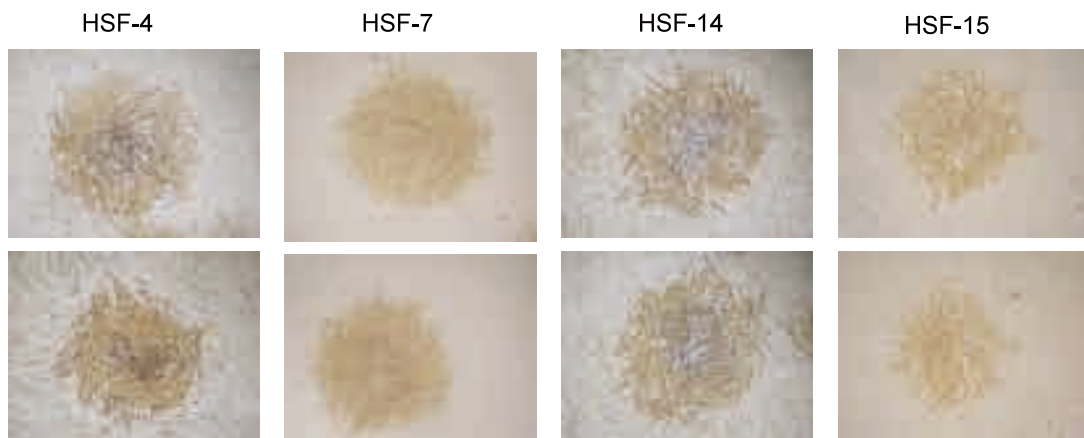


図6 H3/Osakaのプラック形成能のHSF細胞間比較. H5/Tottoriの感染拡大率が低いHSF株(HSF-15に対する有意差検定で $p < 0.01$ であったHSF-4,7,14株)においてもH3/Osakaの感染拡大率はHSF-15と差がない(むしろそれ以上)であることが分かる.

示した。

HSF-15は他の株、特にHSF-01~04, 07, 09, 14と比べると、若干H5/Tottoriが増殖しやすい性質を有していることが分かる。HSF-15に比べてH5/Tottoriの増殖率ははっきりと低かったHSF-04, 07, 14でも、対照として用いたH3/Osakaの増殖は十分に起きていた(図6)。これらの結果は、ヒト皮膚繊維芽細胞の培養系を用いてトリインフルエンザウイルスの増殖能の評価が可能であることを示唆している。今回、実験に用いた、いずれの細胞株においてもH5/Tottoriの増殖率はH3/Osakaに比べると格段に低い。細胞を採取した15人の宿主においては、H5/Tottoriにたとえ感染してもウイルスの増殖はほとんど起こらないと推測される。

考 察

本研究で、HSFにはトリインフルエンザウイルスのレセプターとなるSA α 2,3が十分に存在することが明らかとなっているので、H5/TottoriトリインフルエンザウイルスがHSFでほとんど増殖できなかったのはレセプターの不足によるものではないことになる。したがって、このウイルスの宿主細胞域を決めているのは、ウイルスがその細胞に吸着・侵入できるのではなく、細胞からどれくらい子孫ウイルスを生み出すことができるかに懸かっていると考えられる。インフルエンザウイルスの増殖率を規定する因子としてウイルスRNAポリメラーゼPB2の重要性が注目を集めており、特に627番目のアミノ酸がトリ型(グルタミン酸:Glu)かヒト型(リジン:Lys)かによって宿主でのウイルス増殖性が大きく左右されると考えられている¹⁰⁻¹³⁾。強毒型H5N1トリインフルエンザ患者から分離されたウイルス株の多くは627Gluすなわちトリ型のままであるが、これは前述したように、ある遺伝的背景を持った人の体内ではトリのインフルエンザウイルスが増殖可能と考えたと説明できる。強毒型H5N1ウイルスが未だヒト-ヒト感染を起す能力を獲得していないのも納得できる。しかし、一方では、少

なからぬ数のH5N1ヒト分離株のPB2がヒト型(627Lys)に変異していることも報告されている²³⁻²⁸⁾。個人によってヒト型PB2の要求度が異なる、すなわち、ある人の体内ではトリ型PB2のままウイルスが効率良く増えるが、ある人の体内ではトリ型PB2は効率が悪く、もしヒト型に変異したPB2が出現すればそれが優勢になって入れ替わってしまう可能性もある。これらのことを調べるためにも、個人におけるウイルスの増殖性を評価できる実験系が必要になってくる。

2009年春に出現した新型の北米型インフルエンザは、瞬く間に全世界にその感染が広がったことから推定して、そのウイルスはヒトで効率良く増殖できると考えられるが、現在(2009.7.6)までにアミノ酸配列が知られている187株の分離ウイルスはすべてトリ型のPB2を保持している²⁹⁾。このことは、このウイルスのヒトでの増殖能力はPB2にあまり左右されないか、もしくはPB2と他のウイルス遺伝子との組み合わせで決定されている可能性を示唆しているが、同時にまた別の解釈も可能である。つまり、現在流行中の北米型ウイルスは、プタインフルエンザ時代のなごりを引きずっており、ヒトでの増殖能は十分でない、言わば発展途上にあり、今後、PB2がヒト型に変異することで、更に増殖効率が上がって感染が爆発的に広がる可能性も考えられる。今後、PB2遺伝子の動向について監視を続けると共に、もしヒト型に変異した北米型ウイルスが見つかった場合、ヒト細胞における増殖効率がどのように変わるかを緊急に調べる必要がある。

本研究から、ヒトの皮膚繊維芽(HSF)細胞上には大量の α 2,3結合型シアロ糖鎖(SA α 2,3)に加えて、極めて少量のSA α 2,6が存在することが明らかとなったが、これは今まで知られているヒト呼吸器上皮細胞上の分布と逆の関係にある。ヒトのインフルエンザウイルスはSA α 2,6をレセプターとして認識して細胞に吸着侵入す

るが、本研究の結果から少量のレセプターがあればインフルエンザウイルスは細胞に感染できることが分った。これはまたインフルエンザウイルスは機会さえあれば呼吸器以外の細胞にも感染して増殖できる能力を持っていることを示している。インフルエンザウイルスは眼からも感染すると言われているが、これは眼に入ったウイルスが鼻涙管を通過してそのまま鼻腔に入り込む経路以外にも、結膜に感染してそこで増殖したウイルスが鼻涙管経由で上気道に流れ込む経路が考えられる。結膜細胞のシアロ糖鎖が SAa2,6あるいは SAa2,3どちらがメインであろうとも、少量のレセプターさえあれば感染可能となると、眼はインフルエンザウイルスに対して極めて無防備な場所であることになる。涙液中にトリプシン様プロテアーゼの存在は知られていないので、ウイルスが眼で多段階増殖することはないにしても、ウイルスの中継増幅地点としての役割を担っている可能性は高い。

HSF におけるヒト H5/Osaka とトリ H5/Tottori の増殖能には大きな差があることが分かったが、繊維芽細胞にはインターフェロン β の産生能があることが知られているので、増殖の違いにインターフェロンが関与している可能性も考えられた。市販の ELISA 検出キットを使って、さまざまなドースでウイルスを感染させた HSF 培養液中のインターフェロンの検出を試みたが、いずれのウイルス感染でも検出できなかった（データ非表示）。両ウイルスの増殖能の違いは細胞内におけるウイルス遺伝子そのものの働きに起因すると考えられる。

今回用いた15株の HSF では弱毒型 H5/Tottori の感染はほとんど拡がらなかったが、中には極く少しだけ感染が拡がる HSF 株もあることも分った。強毒型 H5N1 トリウイルスを用いた場合、どれくらいの頻度で、感染が良く拡がる細胞株が見つかるのか興味深い。

今後、HSF を用いて、H5のみならずさまざまな亜型のトリインフルエンザウイルスについてヒト細胞で増殖可能かどうか、個人によって

増殖効率が異なるか、あるいは人によって増殖可能なウイルス株が異なるかどうかを調べることが出来る。また新型の北米型ウイルスについても、個体によって感染増殖効率が異なるかどうかを調べることも可能である。現在までに、数種類のトリインフルエンザウイルスが HSF で効率良く増殖できること、個々人の HSF によってウイルスの増殖率と増殖パターンに差があることを見出しており、更なる実験の展開と解析が期待される。

謝 辞

本研究を行なうに当たり、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、雑賀康子研究補助員、大森幸代研究補助員、的場久美子研究補助員、大内礼子客員研究員そして貴重なヒト皮膚繊維芽細胞を分与いただいた島根大学医学部小児科山口清次教授に深謝いたします。

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. *Virology* 9: 385-433, 1998
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) Ito T, Suzuki Y, Mitnau 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
- 6) Ito T, Kawaoka Y: Host-range barrier of influenza A viruses. *Vet Microbiol* 74: 71-75, 2000

- 7) Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, Gambaryan A, Klimov A, Castrucci MR, Donatelli I, Kawaoka Y: Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol* 74: 8502-8512, 2000
- 8) Suzuki Y: Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull* 28: 399-408, 2005
- 9) Subbarao EK, London W, Murphy BR: A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* 67: 1761-1764, 1993
- 10) Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y: Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293: 1773-1775, 2001
- 11) Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y: PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology* 320: 258-266, 2004
- 12) Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, Hoffmann E, Webster RG, Matsuoka Y, Yu K: Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol* 79: 12058-12064, 2005
- 13) Gabriel G, Herwig A, Klenk HD: Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog* 4: e11, 2008
- 14) Manzoor R, Sakoda Y, Nomura N, Tsuda Y, Ozaki H, Okamatsu M, Kida H: PB2 protein of a highly pathogenic avian influenza virus strain A/chicken/Yamaguchi/7/2004(H5N1) determines its replication potential in pigs. *J Virol* 83: 1572-1578, 2009
- 15) Steel J, Lowen AC, Mubareka S, Palese P: Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS Pathog* 5: e1000252, 2009
- 16) Sedyaningsih ER, Isfandari S, Setiawaty V, *et al.*: Epidemiology of cases of H5N1 virus infection in Indonesia, July 2005-June 2006. *J Infect Dis* 196: 522-527, 2007
- 17) Yang Y, Halloran ME, Sugimoto JD, Longini IM Jr: Detecting human-to-human transmission of avian influenza A (H5N1). *Emerg Infect Dis* 13: 1348-1353, 2007
- 18) Uyeki TM: Global epidemiology of human infections with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses. *Respirology* 13: S2-9, 2008
- 19) Wang H, Feng Z, Shu Y, *et al.*: Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China. *Lancet* 371: 1427-1434, 2008
- 20) Takusa Y, Fukao T, Kimura M, Uchiyama A, Abo W, Tsuboi Y, Hirose S, Fujioka H, Kondo N, Yamaguchi S: Identification and characterization of temperature-sensitive mild mutations in three Japanese patients with nonsevere forms of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* 75: 227-234, 2002
- 21) 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
- 22) 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
- 23) Govorkova EA, Rehg JE, Krauss S, *et al.* *J Virol* 79: 2191-2198, 2005
- 24) Maines TR, Lu XH, Erb SM, *et al.*: Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. *J Virol* 79: 11788-11800, 2005
- 25) Amonsin A, Payungporn S, Theamboonlers A, *et al.*: Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. *Virology* 344: 480-491, 2006
- 26) Chen H, Li Y, Li Z, *et al.*: Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China. *J Virol* 80: 5976-5983, 2006
- 27) Zhou JY, Shen HG, Chen HX, Tong GZ, Liao M, Yang HC, Liu JX: Characterization of a highly pathogenic H5N1 influenza virus derived from bar-headed geese in China. *J Gen Virol* 87: 1823-1833, 2006
- 28) Le QM, Sakai-Tagawa Y, Ozawa M, Ito M, Kawaoka Y: Selection of H5N1 influenza virus PB2 during replication in humans. *J Virol* 83: 5278-5281, 2009
- 29) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database> (2009.6.20)

Availability of human skin fibroblast cells for assessment of individual susceptibility to avian influenza virus infection

Tomoko HAYAMA (FUJII)

Department of Microbiology, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

ABSTRACT The availability of human skin fibroblast cells (HSFs) for assessment of individual susceptibility to avian influenza virus was examined. It was found that HSFs were as susceptible to a human influenza virus as are human bronchial epithelium primary cultures. A large amount of α 2,3-linked sialosaccharide (that is, avian type receptor) was present on HSFs along with a small amount of α 2,6-linked sialosaccharide (human type receptor). The human influenza virus grew efficiently despite the very small amount of human type receptor. As well, the growth characteristics of the virus were reproducible in HSFs with different passage histories from p6 to p22. These results indicated that HSFs are available to estimate the growth characteristics of the influenza virus. The growth potential of an avirulent avian H5N3 influenza virus in human cells was examined in cultures of HSFs derived from 15 different individuals. The growth characteristics of the avian virus were different among individual HSF cells; however, avian virus growth in HSF was very poor as compared with that of the human virus. The present study showed that HSFs are useful to assess the potential of avian influenza viruses to grow in human cells; thereby, facilitating the evaluation of the risk of the emergence of a new pandemic virus.

(Accepted on July 6, 2009)

Key words : **human fibroblast, avian influenza virus, individual susceptibility**

Corresponding author

Tomoko Hayama (Fujii)

Department of Microbiology, Kawasaki Medical School, 577
Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 462 1199

E-mail : tomofuji@ruby.ocn.ne.jp