

10%FCS 添加 DMEM 培地を用いた。インフルエンザウイルスは、一昨年度の分離株 (AH1、AH3) を用いた。細胞を無血清培地で洗浄後、一定量のウイルス液を入れ 34°C で 30 分、あるいは室温に一定時間孵置した。細胞を無血清培地で洗浄し、2%BSA 添加 EMEM 培地を加えて、アセチルトリプシン存在下に 34°C で培養した。

2) NA 発現 MDCK 細胞

WSN-NA を pcDNA、あるいは pTet-Off に導入した。得られたプラスミド DNA を、それぞれ MDCK 細胞、MDCK Tet-Off 細胞に導入し、G418、あるいはハイグロマイシン耐性細胞を選択した。なお、組み換え DNA 作製は、当研究所組み換え DNA 実験安全管理規程に従った。

3) 免疫染色

カバーガラス上に培養した細胞にウイルスを感染させ、定時間培養後 4%パラフォルムアルデヒド (PFA) /0.1%Triton-X で固定した。固定した細胞を 10%goat 血清/TBS 中に 30 分間、ヒト抗ウイルス血清、次いで FITC 標識抗ヒト IgG 抗体中に各 1 時間ずつ孵置することにより染色した。レクチンを用いた $\alpha 2-3$ 、 $\alpha 2-6$ 結合シアル酸染色には、ロシュ社の DIG Glycan Differentiation kit を用いた。

4) ウェスタンブロット

細胞を PBS にて洗浄後、SDS-PAGE サンプルバッファーにより溶解して回収した。溶解液を 100°C、3 分間処理した後、12%SDS-PAGE により分離した。定法に従って試料をゲルからニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜は、5%スキムミルク/TTBS、ヒト抗ウイル

ス血清/TTBS、次いで HRP 標識抗ヒト IgG 抗体/TTBS 中で各 1 時間ずつ室温に孵置した後、TMB キット (VECTOR 社) により染色した。

C. 研究結果

1) MDCK 細胞、および Caco-2 細胞における AH1 と AH3 ウイルスとの感染の比較

AH1 では、Caco-2 細胞への感染が MDCK 細胞に比較して非常に少なかったのに対して (平成 18 年度報告書)、AH3 では、Caco-2 細胞で感染率が高い傾向を示した。(図 1)。

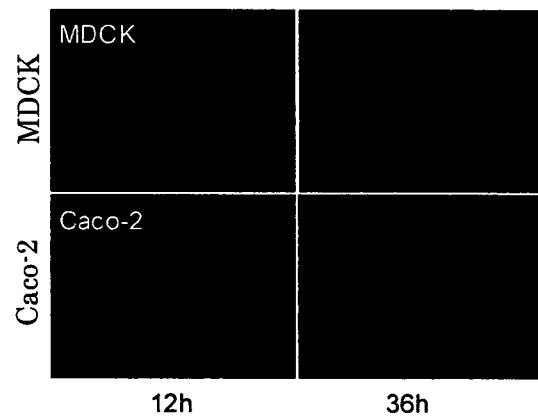


図 1. MDCK、Caco-2 細胞における AH3 ウイルスの感染細胞数の比較

MDCK、Caco-2 細胞に AH3 ウイルスを感染させた後、トリプシン存在下に定時間培養し、感染細胞を染色した。

Caco-2 細胞は長期間培養を続けると、高度に分化しドームを形成することが報告されている。このドームへのインフルエンザウイルス感染効率を検討したところ、AH1 はドームにほとんど感染しなかったのに対して (図 2)、AH3 はドームにもよく感染することが判明した (図 3)。

また、AH1 では、Caco-2 細胞の分化に伴い感染細胞数がさらに減少することも判明した (図 2 グラフ)。MDCK 細胞と Caco-2 細胞とでは、 $\alpha 2-3$ 、 $\alpha 2-6$ 結合シアル酸のどちらもよく染色され (データ未提出)、ドームでは、さらに強く染色される傾向を示した (図 4)。

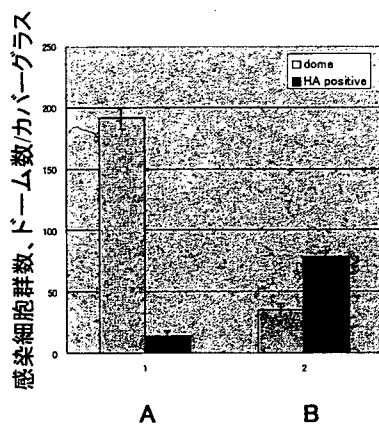
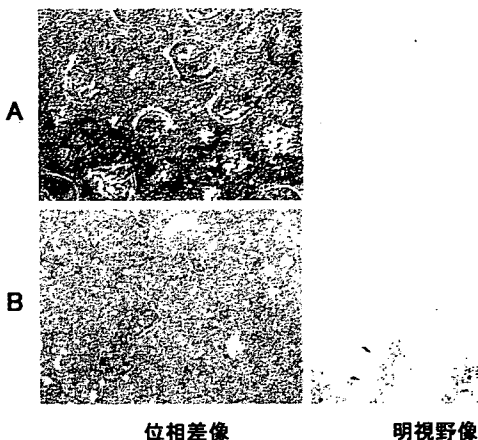


図 2. Caco-2 細胞をそれぞれ 3 週間(A)、1 週間(B)培養した後、AH1 ウイルスを感染させた。トリプシン存在下に 48 時間培養後染色した。同一視野の位相差像と明視野像を示す。感染細胞群数と、分化マーカーとしてのドーム数を比較した。3 カバークラス上の平均値をグラフに示した。ドーム数が 5 倍多い細胞 (A) では、少ない細胞(B)に比して、感染細胞群数が 1/5 程度に減少した。



図 3. Caco-2 細胞に AH3 ウイルスを感染後、トリプシン存在下に 36 時間培養し、感染細胞を染色した。

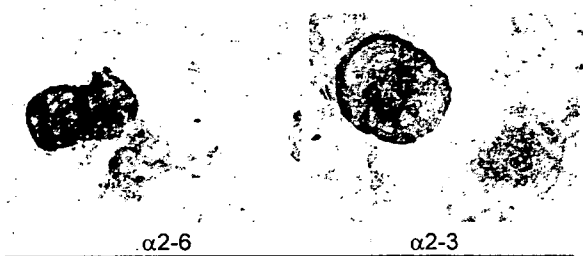


図 4 レクチンによる Caco-2 細胞の染色

2) NA 発現 MDCK 細胞作製

MDCK 細胞に WSN-NA を恒常的、あるいは誘導可能な形で発現する細胞の作製を試みた。MDCK 細胞に NA 発現プラスミドベクターを導入し、各マーカー薬剤耐性細胞を選択した。14 個の pcDNA-NA 導入細胞、2 個の pTet-Off-NA 導入細胞をそれぞれ分離した。予備実験では、AH3 ウイルスの感染効率は、NA 発現細胞ではコントロール細胞に比してやや低い傾向を示した。pTet-Off-NA 導入細胞は、テトラサイクリン除去による NA の発現誘導能を検討しているところである。

D. 考察

AH1 ウイルスでは、Caco-2 細胞への感染効率が MDCK 細胞より 10 分の 1 程度に低下したのに対して、AH3 ウイルスの Caco-2 細胞への感染効率は MDCK 細胞と同等以上だった。また、腸管系細胞への分化を示すドームには、AH1 ウイルスはほとんど感染しなかったのに対して、AH3 ウイルスはよく感染した。レクチン染色では、いずれの細胞も $\alpha 2-6$ 、 $\alpha 2-3$ 結合シアル酸の染色性に大きな差はないように見えることから、AH1 と AH3 ウイルスの Caco-2 細胞への感染効率の違いは、ウイルス側に主な要因があると推定される。今後、両者の感染効率の差を定量的に測定することが必要である。さらに、これらのウイルスの各遺伝子分節の比較を行うことにより、腸管系細胞での増殖効率に関わるウイルス因子を明らかにできるものと期待される。

MDCK 細胞に NA を恒常的に発現させた場合、導入 NA のウイルス感染初期過程への影響、細胞増殖そのものへの影響などが予想されることから、ウイルス感染過程の任意の時期に NA を発現誘導できることが望ましいと考えられる。今後、選択した細胞での、NA 発現レベル、ウイルス感染効率、変異 NA を持つウイルスの分離効率等をそれぞれ検討していく。

E. 結論

1. インフルエンザウイルス (AH1、AH3) を MDCK 細胞と、ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞とを用いて感染様式を検討したところ、AH1 ウイルスは、MDCK 細胞に効率よく感染するのに対して、Caco-2 細胞では悪か

った。AH3 ウイルスは、Caco-2 細胞にも MDCK 細胞と同等以上に効率よく感染した。

2. Caco-2 細胞で AH1、AH3 の間で感染効率が異なるのは、ウイルス側に要因があることが推定された。

3. ノイラミニダーゼを恒常的に、あるいは誘導可能な形で発現する MDCK 細胞の作製を試み、複数の細胞を得た。

F. 健康危険度情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 堀元栄詞、小原真弓、岩井雅恵、長谷川澄代、滝澤剛則、倉田 毅、田中桂子、南部厚子、中澤保文、田中有易知、上田順子、宮田英喜：インフルエンザ流行予測調査、富山県衛生研究所年報、30、81-90、2007.

2. 富山県衛生研究所編集：インフルエンザ、平成 17 年度感染症流行予測調査報告書、p28-39、2007.

3. Yoshinobu Nakanishi¹, Yumi Hashimoto¹, Takenori Takizawa and Akiko Shiratsuchi Mechanisms and Consequences of Phagocytosis of Influenza Virus-Infected Cells Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (in press).

2. 学会発表

1. 堀元栄詞、小原真弓、岩井雅恵、長谷川澄代、滝澤剛則、倉田 毅：過去4シーズン

におけるインフルエンザワクチン接種前後の抗体価のへんどうについて. 第48回日本臨床ウイルス学会(富山) 2007. 06. 02.

2. 滝澤剛則、堀元栄詞、岩井雅恵、小原真弓、長谷川澄代、中村一哉、倉田 毅: ヒト大腸がん由来Caco-2細胞でのインフルエンザウイルス感染様式の検討. 第55回日本ウイルス学会(札幌) 2007. 10. 21.

H. 知的財産の出願・登録情報

なし