

インフルエンザウイルスによる マウス鼻咽腔糖鎖構造の変化

平野 隆 黒野 祐一 一宮 一成 茂木 五郎
大分医科大学耳鼻咽喉科

Influenza A virus infection and changes of lectin binding patterns in nasopharyngeal mucosa in mice

Takashi HIRANO, Yuchi KURONO, Issei ICHIMIYA, Goro MOGI
Department of Otolaryngology, Oita medical university, Oita, Japan

Otitis media is thought to occur when bacteria adherence to the mucosal surface of the nasopharynx, enter middle ear via the Eustachian tube and replicate in the middle ear space. Bacteriological studies of children suffering from otitis media reveal the consistent finding that haemophilus influenzae is among frequent isolated pathogens. However, viral infection may also be related to this pathogenesis, since it is suggested that influenza infection predisposes the host to bacterial colonization and infection, by enhancing the adherence of some bacteria to virus-infected respiratory cells. Cell surface glycoconjugates are known to play an important role in cellular communication, migration, and adherence. Recently, it has been reported that terminal glycosylation sequences of glycoconjugates mediate biological recognition, such as a receptor in bacterial adherence.

Viral infection is considered to be one of causes for changing the terminal glycosylation sequence. In this study, we examined the effect of influenza A virus infection on glycosylation of the nasopharyngeal epithelial cells, as well as the effect of the virus on the colonization of haemophilus influenzae on nasopharynx.

はじめ

急性中耳炎は鼻咽腔粘膜表面に定着した細菌が経耳管的に中耳腔に至り発症する。小児における中耳炎の起炎菌としてインフルエンザ菌は重要であり、鼻咽腔での菌定着性は中耳炎発症と大きく関与している。鼻咽腔粘膜表面には、複合糖質が豊富に存在し、その中の糖蛋白、糖

脂質のオリゴ糖鎖は細胞間の相互認識、粘液線毛運動機能の制御、そして細菌やウイルスの宿主細胞表面のレセプターとしても重要であるといわれている。今回、我々はインフルエンザウイルス暴露によるマウス鼻咽腔の糖鎖構造の変化及びインフルエンザ菌の鼻咽腔の定着性の変化につき検討したので報告した。

対象と方法

5週齢, 雄性, BALB/Cのマウスを用いた。マウスにインフルエンザAウイルス (PR8, H1N1, 3.7×10^8 PFU/ml) を経鼻的に50 μ l投与した後に1, 3, 5, 7, 9日目にネプタール麻酔後, 10%中性緩衝ホルマリン液にて経心臓的に還流固定を行なった後, 頭部を取出し同固定液にて2時間追加固定した。0.12M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液にて脱灰後, エタノール上昇系列にて脱水し, パラフィン包埋した。切片は耳管咽頭口周囲の咽頭部中心に6 μ mの連続切片を作成した。対照として, Phosphate buffur saline (PBS) を経鼻投与したマウスを用いた。作成した切片を3% H₂O₂メタノール溶液にて処理した後, 2% Bovine serum albumine 溶液にて非特異的反應を抑制後, EY社製ビオチン化レクチンを室温にて12時間反応させた。染色はABC法にて行い, 0.01% H₂O₂を加えた0.05% Diaminebenzidine (DAB) にて発色した。使用したレクチンはTable 1に示す (Table 1)。また, 正常マウスの切片をNew Castle disease virus由来のシアリダーゼにて, 37°C18時間処理し

た後, 同様の手技にてレクチン染色し, インフルエンザウイルス投与例との比較を行なった。

ウイルス感染後のインフルエンザ菌の鼻咽腔における定着性を見るため, インフルエンザAウイルス感染前, 及び感染後1, 5, 9日目のマウスにインフルエンザ菌 (10⁸CFU/ml) を各群4匹ずつ経鼻的に50 μ lづつ投与した。18時間後, マウス鼻咽腔を100 μ lPBSにて洗浄し, 洗浄液を段階希釈し, チョコレート寒天培地にて一晚培養し, 菌数を測定した。

結 果

ウイルス経鼻投与後3日目より, 活動性の低下, 体重減少といったマウスの全身状態に変化を認め, マウス断頭時に肺での出血斑を認めた。

正常マウスにおいて, WGA, LFAにおいて は絨毛上皮細胞表面, 杯細胞, 粘液腺組織は染色されるが, SNA, PNA, sWGAにおいては絨毛上皮細胞表面, 杯細胞, 粘液腺組織に染色をほぼ認められなかった。sWGAにおいては漿液性腺組織に軽度の染色を認めた。ウイルス感染によるマウス鼻咽腔粘膜でのレクチン染色性の変化は3日目より出現し, 5, 7日目に強く

Table 1 Lectins used in this study

Lectin (common name)	Abbreviation	Normal carbohydrate binding specificity
Triticum vulgaris (wheat germ)	WGA	N-acetylglucosamine Sialic acid
Limax flavus (slug)	LFA	Sialic acid
SuccinylWGA (wheat germ)	sWGA	N-acetylglucosamine
Arachis hypogaea (peanut)	PNA	Gal β 1,3GalNAc
Elderberry bark (Sambucus nigra)	SNA	NeuAc(α 2,6)Gal/GalNAc

Table 2 Colonization of *H. influenzae* in nasal washing

	Control	1st day	5th day	9th day
Number of colonies (CFU/ml)	7×10^4	4×10^4	6×10^6	3×10^5

見られた。

LFA および WGA の染色性は、ウイルス感染マウスにおいても、細胞表面、胚細胞、粘液腺組織が染色され、2群の差はあまり認められなかった。しかし、感染マウスにおいて PNA, sWGA, SNA の染色性は、繊毛上皮細胞表面を中心に染色を認めた。

シアリダーゼ処理群とインフルエンザウイルス感染群では各種レクチンの染色性の変化は類似しており、sWGA, PNA, SNA は、繊毛上皮細胞表面の染色性が発現した。

ウイルス感染後の鼻咽腔でのインフルエンザ菌のコロニー形成について、コントロール群と比較して、ウイルス感染1日目ではコロニー形成に変化を認めないものの、ウイルス感染後5日目には、コロニー形成は有意に増加した (Table 2)。

考 察

ウイルス感染と粘膜上皮の細菌定着性との関連は以前より指摘されており、インフルエンザウイルス感染により、細菌の粘膜上皮への定着性が上昇すると報告されている。その理由として、線毛運動機能の低下、多核白血球の貧食能及び殺菌活性の低下などが挙げられている^{1,2)}。しかし、鼻咽腔粘膜表面の複合糖質は細菌、ウイルスの宿主細胞表面のレセプターとしても重要であり、細菌及びウイルス感染により糖鎖構造に変化を来すとの報告はされているものの³⁾、ウイルス感染後における糖鎖構造の変化と細菌の定着性についての報告はされていない。

上野らによると、マウス鼻粘膜呼吸上皮及び耳管上皮の糖鎖構造は NeuAcα2-3galactose であり、今回我々の実験においても、マウス鼻咽腔細胞表面の糖鎖構造も同様であると考えられた⁴⁾。インフルエンザウイルス感染により、マウス鼻咽腔細胞表面の糖鎖構造は変化し、PNA, sWGA, SNA といったレクチンの染色性が発現する事により、様々な糖鎖が表出されると推察された。

New Castle disease virus 由来のシアリダーゼ処理した正常マウス切片とウイルス感染マウス切片とに、レクチン染色性の類似性を認めることより、細胞表面の糖鎖構造の変化の一因として、インフルエンザウイルス由来のシアリダーゼが関与しているものと推察された。

今回我々の実験において、ウイルス感染後に細胞表面の糖鎖構造の変化を認め、またインフルエンザの菌の鼻咽腔での定着性が亢進を認めていることより、ウイルス感染による糖鎖構造の変化が細菌定着性に何らかの影響をあたえるものと推察された。

ま と め

今回、我々はインフルエンザウイルス暴露によるマウス鼻咽腔の糖鎖構造の変化及びインフルエンザ菌の鼻咽腔の定着性の変化につき検討した。

1. 正常マウスにおいて、WGA, LFA においては繊毛上皮細胞表面、杯細胞、粘液腺組織は染色され、SNA, PNA, sWGA においては染色性をほぼ認めなかった。
2. LFA および WGA の染色性は、正常マウ

ス及びウイルス感染マウスにおいて、2群の差はあまり認められなかった。感染マウスにおいてPNA, sWGA, SNAの染色性は、繊毛上皮細胞表面を中心に染色を認めた。

3. 鼻咽腔でのインフルエンザ菌のコロニー形成について、コントロール群と比較して、ウイルス感染後5日目には、コロニー形成は有意に増加した。
4. ウイルス感染による糖鎖構造の変化が細菌定着性に何らかの影響をあたえるものと推察された。

文 献

- 1) Abramson JS, Giebink GS, Mills EL, Quie PG : Polymorphonuclear Leukocyte Dysfunction During Influenza Virus Infection in Chinchilla. *J. Infect. Dis.* 143 : 836-845, 1981.
- 2) Park K, Bakaletz LO, Cotichia JM, Lim DJ : Effect of Influenza A Virus on Ciliary Activity and Dye Transport in the Chinchilla Eustachian Tube. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 102 : 551-558, 1993.
- 3) Linder TE, Lim DJ, DeMaria TF : Changes in the structure of the cell surface carbohydrates of the chinchilla tubotympanum following Streptococcus pneumoniae-induced otitis media. *Microb Pathogen.* 13 : 293-303, 1992.
- 4) Ueno K, Hanamura Y, Ohya M. Differences in terminal carbohydrate structures of sialomucin in the murine nasal cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 251 : 119-112, 1994.

（連絡先：平野隆
〒879-55 大分県大分郡挾間町医大ヶ丘 1-1
大分医科大学耳鼻咽喉科）