

期待できる。鳥のH5インフルエンザウイルスHAの抗原性が20年以上に亘って保たれていたという成績は、新型ウイルスが侵入した直後にはこのような野鳥由来のウイルスがワクチン株として抗原的にも優れていることを示している。今後新型インフルエンザウイルスのHA亜型を予測するため、より広範な疫学調査を実施しなければならない。現在、ロシア、韓国、中国、台湾に加え、イラン、タイ、ミャンマーとの研究打合せが進行中である。

## E. 結論

新型インフルエンザウイルスの起源がシベリアに営巣する水禽類の間で保存されていることが示された。新型ウイルスのHA亜型を予測するため、シベリア、アジアを含む広範な地域で鳥類インフルエンザの疫学調査を実施する必要がある。また野鳥から分離されるウイルスは、新型インフルエンザウイルスによる大流行に備えたワクチン株として利用することが期待できる。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Shortridge, K.F., Zhou, N.N., Guan, Y., Gao, P., Ito, T., Kawaoka, Y., Kodihalli, S., Krauss, S., Markwell, D., Murti, K.G., Norwood, M., Senne, D., Sims, L., Takada, A., Webster, R.G. (1998) Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology* 252: 331-342.
2. Takakuwa, H., Ito, T., Takada, A., Okazaki, K. and Kida, H. (1998) Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations. *Jpn. J. Vet. Res.*, 45, 207-215.
3. Ito, T., Couceiro, J.N.S.S., Kelm, S., Baum, L.G., Krauss, S., Castrucci, M.R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J.C., Webster, R.G. and Kawaoka, Y. (1998) Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.* 72, 7367-7373.
4. Ito, T., Kawaoka, Y., Vines, A., Ishikawa, H., Asai, T. and Kida, H. (1998) Continued circulation of reassortant H1N2 influenza viruses in pigs in Japan. *Arch. Virol.* 143, 1129-1143.
5. 喜田 宏 (1998) 新型インフルエンザウイルスの出現予測と流行防止. *科学* 68, 691-699.
6. 喜田 宏 (1998) 動物のインフルエンザ. *モダンフィジシャン* 18, 1295-1298.
7. 喜田 宏 (1998) 新型インフルエンザウイルスの出現にかかわる動物とその役割. *今日の感染症* 17, 12-14.
8. 喜田 宏 (1999) 新型インフルエンザウイルスの出現のメカニズムとその対策. *小児科診療*. 62, 340-345.
9. 喜田 宏 (1999) 新型インフルエンザの発生メカニズムと対策. *学術月報*. 52, 182-187.

### 学会発表

1. 伊藤壽啓, P.Gao, G.Yee, 高田礼人, 河岡義裕, K.F.Shortridge, R.G. Webster (1998) ホンコンにおけるH5N1インフルエンザの動物疫学調査. 第15回中国・四国ウイルス研究会. 徳島市. 5月15-17日.
2. 岡崎克則 (1998) 北方圏におけるインフルエンザウイルスの生態. 日本ウイルス学会北海道支部第32回夏季シンポジウム. 恵庭市. 7月31日-8月1日.
3. 高田礼人 (1998) 1997年に香港に出現したH5N1インフルエンザウイルス. 日本ウイルス学会北海道支部第32回夏季シンポジウム. 恵庭市. 7月31日-8月1日.
4. 今井正樹, 高田礼人, 岡崎克則, 喜田宏 (1999) 香港H5N1インフルエンザウイルスの起源. 第14回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム. 新潟県六日町. 2月27日-3月1日.

## 1997年に香港でニワトリとヒトに感染したH5N1インフルエンザウイルスの ニワトリとマウスに対する病原性試験

研究分担者：喜田 宏（北海道大学大学院獣医学研究科）

共同研究者：岡崎克則、高田礼人（北海道大学大学院獣医学研究科）

**研究要旨** 1997年に香港でヒトから分離されたH5N1インフルエンザウイルス、A/Hong Kong/156/97(HK156)およびA/Hong Kong/483/97(HK483)はニワトリに全臓器向性の致死感染を惹き起こした。HK156を接種したニワトリの殆ど全ての臓器は血管内皮細胞の損傷が著しかった。また、それらの血管内皮細胞中にはウイルス抗原が検出された。したがって、このウイルスはニワトリの血管内皮細胞に感染し、それに伴う血管炎および血液凝固系の破綻が病原性の発現に深く関わっていると考えられた。一方、HK156およびHK483ではマウスに対する病原性に差があった。ウイルス液50 $\mu$ lを鼻腔内に麻酔下で接種した場合、いずれのウイルスもマウスに致死感染を惹き起こした。ところが、HK156を鼻腔内に5 $\mu$ l接種したマウスは臨床症状を示すことなく全てが生残したが、HK483を接種したマウスは全て斃死した。両ウイルスともそのヘマグルチニン(HA)は易開裂性であることから、哺乳動物に対するインフルエンザウイルスの病原性発現にはHAの開裂性以外の因子が関わるものと考えられた。

### A. 研究目的

1997年に香港でヒトから分離されたH5N1インフルエンザウイルスのH5ヘマグルチニン(HA)は、ニワトリ体内の広範な組織に存在する蛋白分解酵素で開裂活性化されるので、ウイルスは全臓器向性の致死感染を惹き起こす。一方、これまでヒトで流行したH1、H2およびH3亜型のHAは上気道などの限られた組織でしか開裂活性化されないの、ニワトリに対しては弱毒である。それでも、スペイン風邪に代表されるように、人類に甚大な被害をもたらしてきた。したがって、H5やH7のような易開裂型のHAをもつウイルスがヒトの世界に入った場合には、これまでにない深刻な事態を招く恐れがある。今回ヒトから分離されたH5N1ウイルスのレセプター結合部位のアミノ酸配列から、このHAはいわゆるトリ型の結合様式のシアル酸を認識し、ヒト型のレセプターに対する親和性は殆どないと予想された。そのため、何故このウイルスがヒトに感染したのかは判っていない。本研究の目的はH5N1インフルエンザウイルスの病原性発現と宿主域に与る因子を解明することである。

### B. 研究方法

ヒトから分離されたH5インフルエンザウイルスA/Hong Kong/156/97(HK156)およびA/Hong Kong/483/97(HK483)を用いた。また、HK156のHA遺伝子のみを弱毒のカモ由来ウイルスA/duck/Hong Kong/836/80(H3N1)(HK836)に組み込んだリコンビナントウイルス(HK156/836)、HK156のHAの開裂部位を弱毒型に改変して同様にHK836に組み込んだウイルス(HK911)をリバースジェネティク

ス法を用いて作出し、実験に用いた。ニワトリに対する病原性試験は主にニューカッスル病ウイルスの病原性試験を基に行った。HK156を鼻腔内に接種したニワトリまたはマウスから経時的に臓器を採取し、ウイルス分離ならびに病理学的検索を行った。

### C. 研究結果

HK156はニワトリに対して高い病原性を示した。静脈内にウイルスを接種したニワトリでは、その60%が接種後6日以内に斃死した。斃死したニワトリの病変の肉眼所見は、肉冠チアノーゼ、脚皮膚の充血ならびに点状出血、全身性散発性点状出血等であった。組織学的には、著しい血管内皮細胞の損傷が検査した殆ど全ての臓器に認められた。さらに、脾臓でのリンパ球壊死、心外膜から筋層にかけてのリンパ球の浸潤と血管変性、脾臓外分泌細胞の広範な壊死、脳の多発性巣状性グリオーシスないし壊死等が認められた。また、血管内皮細胞中にウイルス抗原が検出された。鼻腔内にウイルスを接種したニワトリでは、48時間後から少なくとも168時間後まで血液、脳、肺、脾臓および脾臓からウイルスが分離された。ウイルス増殖のピークは感染4日後であった。これらのニワトリの30%は感染6日後までに斃死した。病変の肉眼所見および組織学的所見共に、静脈内にウイルスを接種したニワトリと同様であった。HK911およびHK836はニワトリに対して病原性を示さなかったが、感染2週間後に抗体が検出されたことから、感染は成立していたものと考えられる。

HK156/836を鼻腔内に接種したニワトリは全て4日以内に斃死した。病理所見はHK156を接種し

たニワトリと同様であった。HK156/836を静脈内に接種したニワトリでは、その86%が48時間以内に斃死した。24時間以内に斃死したニワトリでは著明な肉眼所見は認められなかったが、肝臓小葉間組織へのリンパ球浸潤および漿膜炎、腎髄質にリンパ球および偽好酸球の浸潤、心筋の変性壊死と血管周囲炎、間質性肺炎、脳の多発性巣状性グリオーシス等が認められた。また、これらのニワトリでは接種後8-12時間後から末梢血中の栓球(血小板母細胞)の減少が認められた。

HK156およびHK483では、マウスに対する病原性に差があった。HK156を鼻腔内に5 $\mu$ l接種したマウスは臨床症状を示すことなく全てが生残したが、HK483を接種したマウスは全てが9日以内に斃死した。一方、ウイルス液50 $\mu$ lを鼻腔内に麻酔下で接種した場合、HK156およびHK483のいずれのウイルスもマウスに致死感染を惹き起こした。

#### D. 考察

HK156またはHK156/836を接種したニワトリの血管内皮細胞の障害が著しく、細胞中にウイルス抗原が検出されたことから、これらのウイルスは血管内皮細胞を標的にすることが明らかになった。ウイルス感染によって血管内皮が損傷剥離した箇所に栓球が集積し、末梢血中の栓球が減少したと考えられる。栓球および血管内皮細胞から様々な血液凝固因子が放出され、結果的に汎発性血管内凝固症候群を起こすと考えられる。

一方、HK156は肺に至るまでウイルスを接種しない限りマウスに致死感染を惹き起こさなかったが、HK483は上部気道のみへの接種で致死感染を引き起こした。マウスに対する病原性の違いは、ウイルスが上部気道の局所感染に留まらずに下部気道にまで感染が拡大し、肺炎ならびに全身感染を引き起こすか否かによると考えられた。両ウイルスともそのHAは易開裂性であることから、この病原性違いには開裂性以外の他の因子が関わることを示している。それに関わる因子を今後詳細に検討する予定である。

#### E. 結論

香港 H5N1 インフルエンザウイルスはニワトリの血管内皮細胞に感染し、それに伴う血管炎および血液凝固系の破綻が本ウイルスの病原性の発現に深く関わっている。

H5インフルエンザウイルスのマウスに対する病原性はHAの開裂性のみでは説明できないことから、哺乳動物に対するインフルエンザウイルスの病原性発現に与る宿主およびウイルスの因子を解析する必要がある。

#### F. 研究発表

#### 論文発表

1. Ryan-Poirier, K., Suzuki, Y., Bean, W.J., Kobasa, D., Takada, A., Ito, T., and Kawaoka, Y. (1998) Changes in H3 influenza A virus receptor specificity during replication in humans. *Virus Res.* 56: 169-176.
2. Shortridge, K.F., Zhou, N.N., Guan, Y., Gao, P., Ito, T., Kawaoka, Y., Kodihalli, S., Krauss, S., Markwell, D., Murti, K.G., Norwood, M., Senne, D., Sims, L., Takada, A., Webster, R.G. (1998) Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology* 252: 331-342.
3. Takada, A and Kawaoka, Y. (1998) Pathogenesis of Ebola virus infection: recent insights. *Trends in Microbiology* 6, 258-259.
4. Takakuwa, H., Ito, T., Takada, A., Okazaki, K. and Kida, H. (1998) An attenuation mechanism of Newcastle disease vaccine strain TCND. *Arch. Virol.* 143, 1129-1143.
5. Imai, M., Sugimoto, K., Okazaki, K. and Kida, H. (1998) Fusion of influenza virus with the endosomal membrane is inhibited by monoclonal antibodies to defined epitopes on the hemagglutinin. *Virus Res.* 53, 129-139.
6. 喜田 宏 (1998) 動物のインフルエンザ。モダンフィジシャン 18, 1295-1298.

#### 学会発表

1. 伊藤壽啓、河岡義裕、喜田宏、大槻公一 (1998) In vivo継代によるトリインフルエンザウイルス病原性獲得機構。第13回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム。北海道倶知安町。2月15-17日。
2. 伊藤壽啓、喜田宏、大槻公一 (1998) トリインフルエンザウイルスの病原性獲得機構。第125回日本獣医学会。家禽疾病分科会シンポジウム。宇都宮市。4月5-7日。
3. 伊藤壽啓、P.Gao, G.Yee, 高田礼人、河岡義裕、K.F.Shortridge, R.G. Webster (1998) ホンコンにおけるH5N1インフルエンザの動物疫学調査。第15回中国・四国ウイルス研究会。徳島市。5月15-17日。
4. 高田礼人 (1998) 1997年に香港に出現したH5N1インフルエンザウイルス。日本ウイルス学会北海道支部第32回夏季シンポジウム。恵庭市。7月31日-8月1日。
5. 板村繁之、西村秀一、田代真人、岡崎克則、喜田宏 (1999) 新型インフルエンザ(A/H5N1)に対するワクチン候補株弱毒化の分子基盤。第14回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム。新潟県六日町。2月27日-3月1日。

インフルエンザウイルスHA蛋白質機能の動的変化に関する研究

分担研究者 中島 捷久

名古屋市立大学医学部教授

研究要旨

インフルエンザウイルスH1N1ウイルスのHA蛋白質のレセプター特異性を解析し、1992年以降ニワトリ血球にインフルエンザウイルスが結合できないのは225番目のアミノ酸がリジンよりアスパラギン酸に変異したものであることを明かにしたが、同じHAのアミノ酸配列をもつにもかかわらず、ニワトリ血球と結合するものがあるので、この原因を解明しようとしたところ、M1蛋白質がHA蛋白質の結合機能に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

新型インフルエンザウイルスの出現の際には何か兆候があるのか？兆候を見つけるにはどうしたらよいか？このような予測の問題は2つの面から検討される必要がある。1つはトリウイルスのブタまたはヒトへの浸潤の状況の把握である。2つめは既存流行ウイルスの状況である。新型ウイルスが出現した際には既存流行ウイルスが駆逐されるのが常である。新型ウイルスは既存流行ウイルスと競合し、競り勝つ必要がある。したがって、既存流行ウイルスの抗原変異能力、病原性の強弱は新型ウイルス発生のバックグラウンドとなるとおもわれる。本研究の主題は現在流行しているH1N1、H3N2ウイルスの抗原変異能力、病原性を解析し、新型ウイルス出現の時期の予測に努めることにある。

B. 研究方法

HAのレセプター特異性の解析：分離されたウイルスのニワトリ、ガチョウ血球に対する結合能を検討する。

ウイルスのリアソータントの解析：A/Aichi/4/92とWSN/33との間でリアソータントを作製した。

HA蛋白質の機能解析：HA遺伝子を発現ベクターpME18Sに挿入してリポフェクタミン法でCos細胞に導入して40-48時間後にHA蛋白質のニワトリ血球吸着能を測定する

C. 研究結果

1) A/Aichi/4/92とWSNのリアソータントで、HAがA/92由来でNAがWSN由来のウイルスはニワトリ血球凝集できるウイルス（+ウイルス）と凝集出来ないウイルス（-ウイルス）に分類された。2) +ウイルスと-ウイルスにおいてHAとNAに変化がないことが塩基配列からまた機能についてはノイラミニダーゼ活性の測定や発現HAの機能（ガチョウ血球には結合するがニワトリ血球には結合しない）解析から確認された。3) 遺伝子解析はM遺伝子産物が（+）、（-）に関与していることを示した。4) しかし、HA,NA遺伝子の共発現、発現HA蛋白質のノイラミニダーゼ処理、（-）ウイルス感染後のノイラミニダーゼ処理によりHA蛋白質はニワトリ血球に結合するようになった。5) HAとMの共発現ではHA蛋白質はニワトリ血球への吸着能を示さなかった。6) （+）ウイルスをMDCK細胞に感染させると、細胞表面に出現したHA蛋白質はガチョウ血球のみに結合し0。5-1時間の後にニワトリ血球に結合するようになった。7) ノイラミニダーゼ活性の測定はこのラグを説明できなかった。8) ニワトリ血球吸着前にM1蛋白質は核から細胞質に移行した。9) （-）ウイルスをMDCK細胞に感染した際にはM1蛋白質の核から細胞質への以降が遅いことがわかった。

D. 考察

以上の結果からHA蛋白質の糖鎖からのシアル酸切断はNA蛋白質によって細胞表面でおこなわれる。NA蛋白質のこの

働きはM1蛋白質によって促進されることから、細胞表面に輸送されたHA,NA糖蛋白質はM1が細胞膜下に以降することによって再配列がおこることが推定された。

#### E.結論

1992年以降出現したニワトリ非凝集性、凝集性ウイルスの比較からHA蛋白質のレセプター結合能はHA,NA以外にM1蛋白質も関与していることがわかった。

#### F.研究発表

##### 1. 論文発表

M protein correlates with the receptor-binding specificity of haemagglutinin protein of reassortant influenza A(H1N1) virus  
J.Gen.Virol. 79. 2425-2434. 1998

## 分担研究報告書

### アジア型インフルエンザウイルスのヘムアグルチニン蛋白の 抗原構造に関する研究

分担研究者 中村喜代人 山形大学医学部教授

研究要旨:アジア型インフルエンザウイルス(A/H2N2)の再登場に備えて態勢を整えておくべく、感染防御抗原であるヘムアグルチニン(HA)蛋白の抗原構造の解明を試みている。これまでに1957年分離株(A/カヤノ/57)に対する17個の単クローン抗体の採取と、各抗体との反応性を欠く併せて27個のエスケープ変異株の分離を終えた。さらにこれらの単クローン抗体とエスケープ変異株の性状分析から、すでに次の4つの結論を得ている。①17個の単クローン抗体は、HI活性と中和活性の有無に基づき、グループⅠ(双方とも陽性)、グループⅡ(中和のみ陽性)、グループⅢ(双方とも陰性)に分類される。②グループⅠの抗体が認識するエピトープは、4つの抗原領域(I-A~I-D)に分かれて存在する。③抗原領域I-AとI-CはHA分子の球状部に位置し(I-BとI-Dは解析中)、グループⅡは球状部と茎状部の境界もしくは茎状部に位置する。④グループⅢが認識するエピトープは、発育鶏卵由来のウイルスには存在するが、MDCK細胞由来のウイルスには存在しない。これらの抗体との反応の有無は、HA分子の糖鎖におけるグルコース残基のトリミングの有無に対応する。現在未解析のエスケープ変異株のアミノ酸置換部位の同定を急ぐと共に、エスケープ変異株の増殖能を調べることにより、抗原変異に対する機能的拘束の強さを推定しようとしている。

#### A. 研究目的

インフルエンザの次期パンデミーはアジア型ウイルス(A/H2N2)によって引き起こされる可能性がある。このウイルスが1968年にヒトの世界から姿を消したため、それ以降に生まれた30才以下のすべてのヒトが免疫を欠く状況になっているからである。このため我々は、A/H2N2の登場に備えて態勢を整える目的で、同ウイルスのヘムアグルチニン(HA)分子の抗原構造の解明を試みている。それがワクチン開発やウイルスサーベイランスの基礎になると考えるからである。

#### B. 研究方法

1. 単クローン抗体の作出:発育鶏卵で増殖させたA/カヤノ/57株で免疫したBALB/Cマウスから脾臓細胞を採取し、X-63ミエローマ細胞と融合させることにより、抗H2単クローン抗体産生性のハイブリドーマを得た。

2. エスケープ変異株の分離:2度クローニングした親ウイルスと単クローン抗体を混ぜ合わせ、中和反応を起こさせたのち、MDCK細胞上でプラックを形成させた。生じたプラックをエスケープ変異株の候補と見做し、2度プラッククローニングしたのち、当該抗体と反応しないことを確かめた上で、エ

スケープ変異株とした。

3. オペレーショナルマッピング: グループ I に属する 11 個の抗体と、各抗体との反応性を欠く併せて 22 個のエスケープ変異株の全ての組み合わせについて HI 試験を実施し、各抗体が認識するエピトープの異同を決定した。

4. エスケープ変異株の変異部位の同定: 発育鶏卵で増殖させたエスケープ変異株の精製標品から vRNA を抽出した。これを鋳型として RT-PCR 法により HA 遺伝子を増幅させたのち、dideoxy 法により塩基配列を決定した。

### C. 研究結果

1. 単クローン抗体の性状: 採取した 17 個の抗 H2 単クローン抗体の HI 活性と中和活性を調べた結果、11 個は強い HI 活性と中和活性をもち(グループ I)、4 個は中等度の中和活性をもつものの HI 活性をもち(グループ II)、残りの 2 個はいずれの活性も欠く(グループ III)ことが明らかになった。

2. オペレーショナルマッピング: グループ I の 11 個のすべての抗体、並びにグループ II の中で比較的強い中和活性をもつ 2 つの抗体を用いて、各抗体との反応性を欠く合計 27 個のエスケープ変異株を分離した。まず、グループ I の抗体とそれらとの反応性を欠くエスケープ変異株の全ての組み合わせについて HI 試験を実施した結果、グループ I の抗体が認識するエピトープは、4 つの抗原領域 (I-A ~ I-D) に分かれて存在することが明らかになった。現在、グループ II の抗体とエスケープ変異株の反応性を中和試験を用いて調べることにより、同グループの抗体が認識するエピトープの分布を解析中である。

3. 中和エピトープの局在: 中和エピトープを H2 分子の三次構造上に位置づけるべく 27 個のエスケープ変異株の全てについて、アミノ酸置換部位の同定を試みている。これまでに、3 つの抗原領域 (I-A, I

-C, II) を認識する抗体との反応性を欠く 11 個のエスケープ変異株の解析を終了した。その結果、抗原領域 I-A は球状部の最先端 (H3 の抗原領域 B) に位置すること、並びに I-C がレセプター結合ポケットの開口部 (H3 の抗原領域 A) に存在することが明らかになった。さらに興味深いことに、I-C 由来の 6 個の変異株の全てが、レセプター結合ポケットの入口に糖鎖を付加する変異をもつのが認められた。また抗原領域 II に関する変異株は、球状部と茎状部の境界領域 (H3 の抗原領域 C) 並びに茎状部 (H3 に該当する抗原領域なし) に変異を生じていた。従って今までのところ、茎状部にも中和エピトープが存在することを除けば H2 分子における中和エピトープの分布は、H3 分子に似ているとの印象が強い。

4. A/H2N2 分離株の抗原解析: 1957 ~ 1968 年に世界各地で分離された 12 株の分離ウイルスの抗原性を、抗原領域 I-A ~ I-D を認識する 11 個の単クローン抗体を用いて HI 試験により比較した結果、次の 2 点が明らかになった。① 1957 ~ 61 年に分離された 5 株はよく似た抗原性をもっており I-C を認識する 2 つの抗体との反応性に多少の違いが見出せる程度であった。② ところが 1962 年以降の分離株の違いは大きく、I-A に対する抗体との反応性が比較的よく残っている程度で、他の抗体との反応性は殆ど消失していた。1962 ~ 63 に大きな抗原変異があったことを示す知見で、この当時かなり大きな流行が発生したとの報告とよく符号する。

5. グループ III の抗体が認識するエピトープの特性: Asn 残基に付加された直後のコア糖鎖は、非還元末端に 3 残基のグルコースをもつが、ER 内でグルコシダーゼにより順次トリミングされる。グループ III の抗体と HA 分子の反応性を解析した結果、同抗体はグルコースがまだトリミングされていない(もしくはトリミングを免れた)糖鎖をもつ HA 分子とだけ反応することが明らかになった。その証拠は次の 3 つである。① パルス・

チェイス実験において、グループⅢの抗体は、パルス直後の HA 分子とはよく反応するものの、チェイスと共に急速に反応性が低下する。②ER からゴルジ装置への移動を阻止するブレフェルジン A 存在下でチェイスしても、グループⅢの抗体は H2 分子と反応しなくなる。③ところがグルコシダーゼ阻害剤 (castanospermine) 存在下でチェイスすると、同抗体は HA と反応し続ける。グループⅢの抗体は、MDCK 細胞増殖ウイルスとは一切反応しないものの、発育鶏卵増殖ウイルスとはよく反応する。後者の HA では、グルコースが除去されることなくウイルス粒子に取り込まれる可能性を示唆する知見であり、発育鶏卵増殖ウイルスが MDCK 細胞増殖ウイルスに比べて多量の高マンノース型糖鎖をもつという、かつての我々の観察結果とよく符号する。糖鎖の動物種差を、グルコシダーゼが決めている可能性を疑わせる興味深い知見といえる。

#### D. 考察

1. 本研究の目的の 1 つは、H2 分子の全ての抗原領域に対する単クローン抗体のパネルを作成し、A/H2N2 ウイルスの詳細な抗原解析を行う態勢を整えることである。これまでの研究により、1957 年分離株の 6 つの抗原領域 (I-A~I-D, II, III) に対する 17 個の抗 HA 単クローン抗体を採取した。しかし 1957~68 年分離株の抗原解析の結果、1962 年以降の分離株には、これでは十分対応できないことが明らかになった。1962~63 年に大きな抗原変異が生じたためである。1963 年以降は抗原性の変化は少ないといわれているので、1968 年分離株 (A/パークレイ/68) に対する単クローン抗体を採取すれば、目的とするパネルは完成すると予測される。

2. A/H2N2 は短命で、1957 年にヒトの世界に登場したものの、11 年後の 1968 年には姿を消している。A/H2N2 が短命であった理由を探るのも本研究の 1 つの目的である。我々の作業仮説は、H2 分子では、機

能的もしくは構造維持に重要な位置にエピトープが存在するため、抗原変異を起こしにくいと言うものであった。しかしこれまでに得られたデータは、中和エピトープの分布は長命の H3 分子によく似ていることを示唆している。今後は、エスケープ変異株の増殖能を調べることにより、上記の仮説の真否をさらに検討する方針である。

3. グループⅢの抗体が、グルコースを糖鎖にもつ HA 分子とだけ反応することが明らかになった。グルコースがトリミング除去されないと、糖鎖は高マンノース型から複合型に成熟できないことが知られている。従ってグルコースの存否が、糖蛋白の立体構造を微妙に調整することにより、糖転移酵素による糖付加を制御している可能性が強い。グループⅢの抗体が認識するエピトープは、グルコース除去により、HA 分子の立体構造が変化すると、抗体が近づけなくなる位置に存在すると推測される。

#### E. 結論

これまでに得られた結論は、次の 4 つに要約される。

1. 17 個の抗 H2 単クローン抗体は、HI 活性と中和活性の双方をもつグループ I、中和活性だけをもつグループ II、どちらの活性も欠くグループ III に分類される。

2. グループ I が認識する中和エピトープは、4 つの抗原領域 (I-A~I-D) に分かれて存在する。

3. エスケープ変異株の変異部位の解析結果は、H2 分子上での中和エピトープの分布が、基本的には H3 分子に似ていることを示唆する。

4. グループⅢの抗体は、グルコースがトリミングされていない糖鎖をもつ H2 分子とだけ反応する。

#### F. 研究発表

1. 論文発表:  
なし



2. 学会発表:

- 1) アジア型インフルエンザウイルス  
(H2N2)に対する単クローン抗体の  
作出: 第13回インフルエンザ研究  
者交流の会シンポジウム, 平成10  
年2月、北海道・倶知安
  
- 2) インフルエンザウイルスHA蛋白  
(H2)のエピトープ形成に及ぼす  
糖鎖の影響. 第46回日本ウイル  
ス学会, 平成10年10月、東京

## 分担研究報告書

### インフルエンザウイルスの宿主域およびその変異機構に関する研究

研究者 鈴木 康夫 (静岡県立大学・薬学部・教授)

#### 研究要旨

我々は、昨年度の報告で「インフルエンザウイルスが宿主の壁をどのように越えるのか」という今まで不明であった課題をかなり明確に、分子・遺伝子のレベルで明らかにすることが出来た。今回は、1997年にホンコンで発生したトリ由来の新型インフルエンザウイルス(H5N1)がどのような分子生物学的基盤に基づいてヒトへ侵入したのかを明らかにする目的で、1) ホンコンおよび南中国で分離された多くのトリインフルエンザウイルス(H1- HXX)が持つレセプター認識の特異性を調べ、さらに、2) トリからヒトへの伝播したインフルエンザウイルスがヒト世界で維持される間にレセプター認識特異性がどのように変化するのかを調べた。また、3) インフルエンザウイルスのレセプター破壊酵素であるノイラミニダーゼに基質特異性、4) インフルエンザウイルスと特異的に結合し、ウイルスの増殖を阻害するシアロ糖鎖高分子ポリマーの開発などについても研究した。

トリから分離されたインフルエンザウイルスのシアロ酸結合様式認識特異性は Neu5Ac2-3Gal > Neu5Ac2-6Gal であったが、多くの場合、Neu5Ac2-6Gal への結合性も強く維持されており、ヒト気道上皮細胞に存在するインフルエンザウイルス受容体糖鎖(Neu5Ac2-6Gal)へ結合できる可能性が示唆された。すなわち、ウイルス受容体の特異性に関するかぎり、トリインフルエンザウイルスが直接ヒトの気道上皮細胞へ感染出来る強い可能性が示された。1997年にホンコンでヒトおよびトリから分離されたH5N1ウイルスにもその性質は見いだされた。

また、トリからヒト世界へ侵入し、現在ヒトの中で流行を繰り返しているH3亜型ウイルスは、ヒトへ導入された直後(1968年)~数年後(1975年)はトリウイルスが持つレセプター認識特異性(Neu5Ac2-3Gal)を保っているが、1997年以降では完全にヒト型(Neu5Ac2-6Gal)の特異性に移行することが判明した。この結果から、ヒトへ導出されたトリインフルエンザウイルスはヒト間で感染を繰り返す間に、受容体認識に対する選択を受け、ヒト型へと進化を遂げることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

1997年、ホンコンで新しい型(H5N1)のインフルエンザウイルスがヒトから分離された。これは、トリ由来であり、同時期にホンコンで多くのニワトリがこのウイルスに感染死した。本ウイルスの流行により、世界規模の流行への拡大が危惧された。現在までに18人が本ウイルスに感染し、内6名が死亡した。致死率は30%を超える。今回、このウイルスがどのような分子基盤に基づいてトリからヒトへ伝播したのかについて、特に受容体認識に関する側面から検討した。

#### B. 研究方法

##### インフルエンザウイルス

ヒト、トリA型インフルエンザウイルスは、発育10日鶏卵の漿尿腔に接種し、34℃で2日間培養後、ウイルスを含む漿尿液よりショ糖密度勾配遠心(70,000×g, 90 min)分画法を用いて精製した。

##### 抗インフルエンザウイルス抗体

インフルエンザウイルスに対する抗体は、各ウイルスをウサギに免疫して作製した抗血清を用いた。

##### 薄層プレートを用いた Virus Binding Assay

シリカゲル薄層板(POLYGRAM SIL G)に125, 250, 500, 1000nmolのGM3(Neu5Ac)、GM3(Neu5Gc)、IV<sup>3</sup>(Neu5Gc)nLc4Cer、IV<sup>3</sup>(Neu5Ac)nLc4Cerをスポットし、クロロホルム/メタノール/12mM MgCl<sub>2</sub>水溶液=5:4:1 (V/V/V)にて展開後、1%OVA,1%PVP含有PBS溶液(溶液A)で4℃一晩ブロッキングした。PBSで5回洗浄したのち、インフルエンザウイルスのPBS懸濁液(2<sup>8</sup>HAU)を加え4℃一晩振とうした。これをPBSで5回洗浄したのち、溶液Aにて500倍に希釈した抗A型インフルエンザウイルス(H3N2)抗体を加え、4℃で3時間振とうした。これをPBSで5回洗浄したのち、3% PVP-PBS溶液にて500倍に希釈したHRP標識ProteinAを加え、4℃で3時間振とうした。PBSで5回洗浄し、N,N-Diethyl-p-phenylene-diamine-Dihydrochloride,4-Chloro-1-Naphtolにて染色後、デンストメータにて測定し、ウイルスの結合活性を求めた。

#### 糖脂質を取り込ませた再構築ニワトリ赤血球による Assay

10%(V/V)ニワトリ赤血球-PBS浮遊液1mlに対してシアリダーゼ(*A.ureafaciens*)を100m unitsの割合で加え、37℃、30分振とう後、冷PBSで5回洗浄し、アジアロニワトリ赤血球-PBS浮遊液を調製した。10%のアシアロニワトリ赤血球-PBS浮遊液1mlに対して糖脂質を1.25, 2.50, 5.00, 10.0, 20.0 μg加え、37℃、30分振とう後、冷生理食塩水にて3回洗浄し、糖脂質を取り込ませた再構築ニワトリ赤血球-PBS浮遊液を調製した。この2%(V/V)再構築赤血球-冷生理食塩水浮遊液0.5mlに精製インフルエンザウイルス-冷生理食塩水懸濁液(2<sup>8</sup>HAU)20 μlを加え4℃、15分間振とうした。この反応液に2mM酢酸緩衝液(pH5.2)を含む冷生理食塩水0.5mlを加え、37℃、30分間振とうした。これに冷PBS1mlを加え、1500rpm,10分間遠心した上清のヘモグロビン量を540nmにて測定し、各糖脂質に対するインフルエンザウイルスの反応性を比較した。

#### C. D. 研究結果および考察

#### 1) 中国南部で分離された多くのトリインフルエンザウイルスの受容体認識特異性

インフルエンザA型ウイルスは、水トリを自然宿主とするが、家禽トリ(ニワトリ、七面鳥など)からも分離される。トリのインフルエンザウイルスがどのような機構で他の動物種に感染し、その種に維持されるのか、どんな機構で宿主の壁を越えるのかは、不明である。今までヒトへ導入されたトリウイルスはH1-3, 5であるが、トリの中には全てのH(1-15)およびN(1-9)の型が含まれており、これがヒトへいつ導入されるのかは予測がつかない。また、トリからヒトへのインフルエンザウイルスの導入は、南中国で起こって来た。そこで、ホンコン大学のKennedy F. Shortridge教授の協力を得て、ホンコン大学で分離されたトリウイルスの受容体認識特異性を調べた。その結果、1) トリから分離されたインフルエンザウイルスのシアル酸結合様式認識特異性は Neu5Ac2-3Gal > Neu5Ac2-6Galであったが、多くの場合、Neu5Ac2-6Galへの結合性も強く維持されており、ヒト気道上皮細胞に存在するインフルエンザウイルス受容体糖鎖(Neu5Ac2-6Gal)へ結合できる可能性が示唆された。すなわち、ウイルス受容体の特異性に関するかぎり、トリインフルエンザウイルスが直接ヒトの気道上皮細胞へ感染出来る強い可能性が示された。1997年にホンコンでヒトおよびトリから分離されたH5N1ウイルスにもその性質は見いだされた。

#### 2) トリH3インフルエンザウイルスがヒトで維持されることによる受容体認識特異性の変化

1968年にヒトから分離された新しいH3型ウイルス(A/Aichi/2/68, H3N2)のヘマグルチニンは遺伝子解析からトリに由来することが判明している。今回、このH3型ウイルスがヒトでメインテナンスされる間に受容体認識特異性がどのように変化するかを調べた。その結果、1) トリからヒト世界へ侵入し、現在ヒトの中で流行を繰

り返しているH3亜型ウイルスは、ヒトへ導入された直後(1968年)～数年後(1975年)はトリウイルスが持つレセプター認識特異性(Neu5Ac2-3Gal)を保っているが、1997年以降では完全にヒト型(Neu5Ac2-6Gal)の特異性に移行することが判明した。この結果から、ヒトへ導出されたトリインフルエンザウイルスはヒト間で感染を繰り返す間に、受容体認識に対する選択を受け、ヒト型へと進化を遂げることが明らかとなった。

### 3) インフルエンザウイルスの生物活性を中和する受容体類似高分子ポリマーの合成

インフルエンザウイルスは、上記のように宿主域を超えた進化を続けている。これに対応するには、進化に対応したワクチンや抗インフルエンザ薬が早急に開発される必要がある。新しい型のインフルエンザウイルスが現れた場合、そのウイルスに対するワクチン生産が間に合わず世界規模の流行へと拡大する可能性は極めて大きい。そこで常に供給可能は抗インフルエンザウイルス薬の開発は重要である。今回、インフルエンザウイルスA、Bいずれにも有効でかつトリやブタなどのウイルスにも有効な受容体シアロ糖鎖(Neu5Ac2-6Gal, Neu5Ac2-3Gal)をミミックし、天然の受容体よりもウイルスの中和活性の高いシアロ化合物の研究に着手した。その結果、試験管内でウイルス中和活性のウイルスを持つ高分子ポリマーを開発することが出来た。すなわち、ヒト、ブタインフルエンザウイルスに結合するNeu5Ac2-6Galおよびトリ、ウマ、ブタなどのインフルエンザウイルスへ結合するNeu5Ac2-3Gal糖鎖のいずれをも発現したポリスチレンポリマー素材を開発した。これは、ヒトインフルエンザウイルスを低濃度で中和し、これによりヒトインフルエンザウイルスの細胞増殖は抑制された。同じ構造を持つモノマーの活性に比べポリマーは数千倍の活性を有し、シアロ糖鎖のクラスター効果が明らかとなっ

た。また、昔から抗菌材として伝承されてきた檜から採った精油、ヒノキチオールがインフルエンザウイルスに対して阻害活性があることを見いだした。そして、その阻害様式がウイルスよる宿主細胞のアポトーシスの抑制であることを明らかにした。

以上の結果から、より活性が高く安全な抗ウイルス薬開発の可能性が開けた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ryan-Poirier, K., Suzuki, Y., Bean, W.J., Kobasa, D., Takada, A., Ito, T., Kawaoka, Y. Changes in H3 influenza A virus receptor specificity during replication in humans. *Virus Res.*, 56, 169-176 (1998).
- 2) Sato, K., Hanagata, G., Kiso, M., Hasegawa, A., Suzuki, Y. Specificity of N1 and N2 sialidase subtypes of human influenza A virus for natural and synthetic gangliosides. *Glycobiology*, 8(6), 527-532 (1998).
- 3) Tsuchida, A., Kobayashi, K., Matsubara, N., Muramatsu, T., Suzuki, T., Suzuki, Y. Simple synthesis of sialyllactose-carrying polystyrene and its binding with influenza virus. *Glycococonjugate J.*, in press (1999).
- 4) Miyamoto, D., Kusagaya, Y., Endo, N., Sometani, A., Kakeo, S., Suzuki, T., Arima, Y., Nakajima, K., Suzuki, Y. Thajaplicin-copper chelates inhibit replication of human influenza viruses. *Antiviral Res.*, 312, 183-189 (1998)
- 5) Kamitakahara, H., Suzuki, T., Nishigori, N., Suzuki, Y., Kanie, O., Wong, C.-H. A lysoganglioside/poly-L-glutamic acid conjugate as a picomolar inhibitor of influenza hemagglutinin. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37(11) 1724-1528 (1998).
- 6) Hosaka, Y., Kuroda, K., Ikeura, A., Iwamoto, T., Suzuki, Y. Binding of influenza and paramyxoviruses to group B

*Streptococcus* with the terminal  
sialyl-galactose linkage.

*J. Electron Microscopy*, 47(2), 169-174  
(1998).

総説、著書

1) 鈴木康夫

インフルエンザウイルスの宿主域変異の  
分子機構  
ファルマシア、34, 678-683 (1998).

2) 鈴木康夫

ウイルスの酵素活性測定、ノイラミニダーゼ  
微生物学実習提要 (東京大学医科学研究  
所学友会編、丸善) 214-215 (1998).

3) 鈴木康夫

インフルエンザウイルスと受容体糖鎖認識  
蛋白質核酸酵素、特集：糖鎖生物学、43,  
No.12, 1112-1118 (1998).

4) 鈴木康夫

ウイルスとレセプター相互作用  
医薬科ウイルス学 (医薬ジャーナル社)  
146-158 (1998).

## B型インフルエンザウイルスBM2蛋白の性状および機能解析に関する研究

分担研究者 小田切 孝人 金沢医科大学医学部助教授

**研究要旨** B型インフルエンザウイルスの第7分節RNAは、膜蛋白M1と機能不明の蛋白BM2をコードしている。本研究では、BM2蛋白の性状と機能を解明するために、遺伝子操作法を用いて抗BM2抗体を作成した。この抗体を用いて、B/山形株感染細胞およびウイルス粒子内におけるBM2蛋白の性状解析を行った。その結果、感染細胞内では、感染後期に12 kDのBM2蛋白と17 kDの新ウイルス蛋白が合成され、これらはその後、ウイルス粒子に取り込まれ、粒子の感染性発現に関与することが明らかになった。

### A. 研究目的

B型インフルエンザウイルスは、粒子形状、各ウイルス蛋白、増殖機序、病原性など多くの点でA型ウイルスと酷似している。このことから、B型ウイルスを用いた研究はひじょうに少なく、インフルエンザウイルスの研究の多くはもっぱらA型ウイルスを用いて行われてきた。しかし、B型ウイルスの第6、第7分節RNAがコードしているウイルス蛋白は、A型やC型ウイルスとは異なり bicistronic mRNAから合成される。さらに、第7分節RNAがコードしているBM2蛋白は、これに相当する蛋白がA型やC型ウイルスには存在しない。従って、本研究では、ウイルス増殖過程におけるBM2蛋白の性状と機能を解明して、まだ全容が明らかにされていないインフルエンザウイルスの増殖機序をB型ウイルスの側から明らかにする。

### B. 研究方法と結果

#### 1. 遺伝子発現系を用いた抗BM2抗体の作成。

我々は、昨年の本研究班において、B/山形/73株のBM2蛋白のアミノ酸配列（全長110アミノ酸）の同定結果をもとにして、38-57および59-78アミノ酸領域に対する合成ペプチド抗体を作成した。しかし、これら抗体では、B/山形株感染細胞内に発現される12 kDのBM2蛋白を検出する

ことはできなかった。そこで我々は、BM2の2-110アミノ酸領域を大腸菌で発現させ、これを抗原として、新たな抗BM2抗体(αBM2#3)を作成した。この抗体は、大腸菌で発現させたBM2蛋白のみならず上記2つの合成ペプチドに対しても高い抗体価(>3000倍)を示した。

#### 2. ウイルス感染細胞内におけるBM2蛋白の検出。

αBM2#3抗体を用いてB/山形株感染細胞内に合成されるBM2蛋白の検出を試みた。ウイルス感染8時間目のcell lysateをWestern Blot(WB)法で解析した。その結果、感染細胞内に12 kDと17 kDの蛋白が検出された。このうち、12 kDの蛋白は、対照として用いた非感染細胞やA/WSN株感染細胞では全く検出されず、B/山形株感染細胞でのみ検出された。また、B/山形株BM2コード領域は、最大12.6 kDのポリペプチドをコードしうることから、12 kDのポリペプチドがB/山形株のBM2と同定された。

#### 3. 感染細胞内におけるBM2蛋白合成。

B/山形株感染細胞内で合成されるBM2蛋白の合成パターンを他のウイルス蛋白と比較するために、ウイルス感染細胞を経時的に採取して、B/山形ウイルス粒子に対する抗体(αB/Yamagata)とαBM2#3抗体とを混合したWB法で解析した。BM2蛋白は感染後4時間目から検出され、この

出現時間はM1蛋白よりも1時間、核蛋白 (NP) よりも2時間遅れることが分かった。また、合成のピークは感染後9時間目であった。すなわちBM2はウイルス後期蛋白として合成されることが示された。一方、17 kD蛋白は、BM2よりもさらに3時間遅れて出現し、ウイルス蛋白の中で最も遅れて合成される産物であることが明らかになった。

#### 4. 感染細胞内におけるBM2蛋白の局在。

ウイルス感染細胞内におけるBM2蛋白の経時的局在を調べるために、ウイルス感染細胞を2時間ごとに固定して、 $\alpha$  BM2 #3抗体を用いた間接蛍光抗体法で解析した。BM2蛋白は核膜周辺にあるER/Golgi複合体領域で合成された後に、時間の経過とともにウイルス粒子の出芽部位である細胞膜近傍へと移動した。また、BM2蛋白は増殖サイクルの中で、一度も核内では検出されないことから、この蛋白は細胞質内で機能するものと考えられた。

#### 5. ウイルス粒子内でのBM2蛋白の検出。

B/山形株感染細胞から産生されたウイルス粒子を精製し、この中にBM2蛋白が検出されるか否かを $\alpha$  BM2 #3抗体を用いたWB法により解析した。その結果、ウイルス粒子にはBM2蛋白に加えて17 kDの蛋白も含まれていることが明らかになった。次に、ウイルス粒子内におけるBM2蛋白の局在を調べるために、粒子をヌクレオカプシド(vRNP)およびそれ以外の成分(HA, M1)とに分画した。それぞれの画分をWB法で解析したところ、BM2および17 kD蛋白はvRNPと結合していることが示された。これらの結果から、BM2蛋白はウイルス内部蛋白として粒子内へ取り込まれる性質を持つことが示された。さらに、17 kD蛋白もウイルス粒子内に存在することから、これはBM2蛋白に結合した新しいウイルス蛋白である可能性が示唆された。

#### D. 考察

B/山形株のBM2コード領域の全長から翻訳される蛋白を抗原にして抗BM2抗体を作成した。この抗体は、感染細胞内にBM2と17 kDの2つの蛋白を特異的に検出した。感染細胞内におけるこれら蛋白の経時的な合成パターンや局在の解析から、BM2はウイルス増殖の後期に細胞質内で機能する蛋白である可能性が示唆された。さらに、vRNPと結合してウイルス粒子内に取り込まれることから、BM2蛋白はvRNPの細胞質内輸送に関与している可能性も示唆された。従って、今後はBM2が結合しているvRNP複合体成分の同定、および、それらの結合が細胞質内で起きているのかなどを明らかにする必要がある。

一方、BM2蛋白とともに検出される17 kD蛋白の由来および合成機序の解明も重要な課題として残された。現在の所、17 kD蛋白をコードするB型ウイルスゲノムRNAは見つかっていない。この蛋白は、我々の作成した抗BM2抗体を用いるとB/Lee/40株でも検出される。従って、17 kD蛋白はBM2と同様に、B型ウイルスのみに特有な新たな翻訳機構によってできる産物である可能性が考えられる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

小田切 孝人 (1998)。インフルエンザのウイルス学。臨床と微生物 25、645-653.

小田切 孝人 (1998)。インフルエンザウイルスの生態。Infection Control 7、16-21.

Takata, H., Obuchi, M., Yamamoto, J., Odagiri, T., Roos, R.P., Iizuka, H., and Ohara, Y. (1998). L\* protein of the DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus is important for virus growth in a murine macrophage-like cell line. J.

Virology 72, 4950-4955.

Obuchi, M., Odagiri, T., Iizuka, H., and Ohara Y. (1999) Expression of lymphotoxin gene inserted into Theiler's murine encephalomyelitis virus. Microbiol. Immunol. 43, 83-86.

## 2. 学会発表

小田切 孝人、大原義朗 インフルエンザBウイルスBM2蛋白の性状。第46回日本ウイルス学会

総会、東京、10月(1998)。

小田切 孝人、大原義朗 インフルエンザBウイルスBM2蛋白の性状と機能。第21回日本分子生物学会年回、横浜、12月(1998)。

小田切 孝人、金 紅、小淵 正次、大原義朗。B型インフルエンザウイルスBM2蛋白の性状解析。第35回日本細菌学会中部支部総会。名古屋、10月(1998)。



## 研究成果の刊行に関する一覧

小田切 孝人 (1998) 。インフルエンザのウイルス学。 臨床と微生物 25、645-653.

小田切 孝人 (1998) 。インフルエンザウイルスの生態。 Infection Control 7、16-21.

Takata, H., Obuchi, M., Yamamoto, J., Odagiri, T., Roos, R.P., Iizuka, H., and Ohara, Y. (1998). L\* protein of the DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus is important for virus growth in a murine macrophage-like cell line. J. Virol. 72, 4950-4955.

Obuchi, M., Odagiri, T., Iizuka, H., and Ohara Y. (1999) Expression of lymphotoxin gene inserted into Theiler's murine encephalomyelitis virus. Microbiol. Immunol. 43, 83-86.

## 分担研究報告書

### B型インフルエンザウイルスの2系統への分岐の解析

分担研究者 中島 節子 国立公衆衛生院衛生微生物学部分子疫学室長

#### 研究要旨

B型インフルエンザウイルスは1940年にウイルスが分離されて以降、1970年代に分子進化学的に異なる2系統に分岐し、それぞれの系統のウイルスのどちらか一方が流行を起こしていたが、1996/97シーズン以降は2系統のウイルスが同時に分離されている。2系統に分岐したB型ウイルスのHA遺伝子は、1964年のウイルスと比較して、最近の1系統のウイルスでは欠損・付加がないが、もう1系統では3塩基の付加が認められた。但し、分岐以前主流の変化に3塩基の欠損が起こっていた。分岐がいつ起こったかについてはわかっていないので、HA遺伝子およびポリペプチドの分岐時期および欠損・付加の時期についての詳細な解析を行った。分岐は1976年から1979年の間に起こったと推定された。さらに同一個所の主流の変化におけるアミノ酸の欠損が1964年から1973年の間に1度、付加は1系統では1991年から1993年の間で、またもう1系統では1976年から1985年の間に起こっていた。後者の系統では近傍の更にもう1個所でアミノ酸の付加が起こっていた。

#### A. 研究目的

最近抗原性が殆ど交差しない2系統のB型インフルエンザウイルスが流行を起こしている。過去におけるB型ウイルスのHA遺伝子およびポリペプチドを解析し、進化系統樹を作成することにより、2系統への分岐がいつ起こったかを明らかにすることを目的とする。また2系統には、特徴的な塩基およびアミノ酸の欠損・付加がみられたので、進化のどの時点でこれらが起こったかを調べた。

#### B. 研究方法

ウイルス：国立公衆衛生院、愛知県衛生研究所、横浜市衛生研究所等で分離・保存されていたウイルス株を10日令孵化鶏卵の羊膜腔或いはしょう尿膜腔、またはMDCK細胞で増殖させた。RT-PCR：市販のIsogen-LS（ニッポンジーン）を用いてRNAを調製した後、RT-PCRを行いcDNAを作製した。プライマー：B型ウイルスのHA遺伝子のHA1部分をカバーする2ペアのプライマーを用いた。PCR産物はTベクター（Novagen）へ組み込んだ後、塩基配列を決定した。

#### C. 研究結果

1968年から1998年までに国内で分離されたB型ウイルス31株、国外で分離された1株についてHA遺伝子のHA1部分の塩基配列を決定して、更に、塩基配列からアミノ酸配列を推定した。既に報告されている5株のB型ウイルスの同じ部位の塩基配列から推定したアミノ酸配列を加えて、1964年から1998年までのHA1ポリペプチドの進化系統樹を作成した。64年のB/シンガポール/64株から8アミノ酸変化した位置（76年と79年の間）から2系統（I, II）に分岐し、79年のB/シンガポール/79および84年のB/愛知/1/84はI系統に属したが、85年のB/茨城/2/85および87年の株はII系統に属した。88年のB/山形/16/88の出現以降、次のシーズンからはB/兵庫/2/91株を除いてI系統のウイルスが流行を起こしていたが、97年にはI, II両系統のウイルスが流行を起こした。I系統のウイルスは64年から98年までの34年間にHA1の40個所のアミノ酸が主流の変化として固定された。

一方、I I 系統のウイルスは 33 個所のアミノ酸が主流の変化として固定された。B / シンガポール / 64 から B / 香港 / 8 / 73 の間で 165 番目のアミノ酸が欠失し、I 系統ではこの部位におけるアミノ酸の欠失を引き継いでいたが、91 年から 93 年の間で同部位にアミノ酸の付加が起こった。1973 年には更に 166 番目のアミノ酸が欠失したウイルスも流行したが、この変化は以降のウイルスには引き継がれなかった。一方、I I 系統では 76 年から 85 年の間で 165 番目および 166 番目の後ろにアミノ酸の付加が起こった。

#### D. 考察

B 型インフルエンザウイルスの HA 1 の分子進化の速度は 1964 年から 1998 年の 34 年間で I 系統では 40 個のアミノ酸 (1.18 個/年) が、I I 系統では 33 個のアミノ酸 (0.97 個/年) が主流の変化として固定された。A (H1N1) ウイルスでは 1977 年から 1998 年までの 21 年間に 28 個 (1.33 個/年)、A (H3N2) ウイルスでは 1968 年から 1998 年までの 30 年間に 66 個のアミノ酸が主流の変化として固定された (2.20 個/年) のに比較すると B 型ウイルスの分子進化の速度はやや遅い。I 系統のウイルスは 76 年以降 84 年まで流行を起こしていたが、85 年に突然 I I 系統のウイルスが出現した。85 年のウイルスは 84 年のウイルスと比較すると、18 個の主流のアミノ酸の変化をきたしており、84 年のウイルスに由来するとは考えにくい。85 年のウイルスは 76 年のウイルスに最も近く、進化系統樹を作成すると 76 年から 79 年の間で両系統に分岐したことが推定された。165 番目から 166 A 番目のアミノ酸に欠失・付加がしばしば起こっているが、この部位の塩基配列は B / シンガポール / 64 では A C A A A - - - で、166 番目の A A A コドン (K) を挟んで 165 番目の A A C コドン (N)

の欠失・付加と 166 a 番目の - - - への A A A コドン (K) の付加が起こっている。165 番目近辺の塩基は A に富んでおり、このことがコドンの欠失・付加と関係しているのかもしれない。この部位は抗原部位であるので、欠失・付加は抗原性に影響すると予想される。B 型インフルエンザは殆ど毎年のように流行を起こしているが、最近の両系統のウイルスは抗原性が殆ど交差しないので、ワクチンには両系統のウイルスを含めることが望ましい。

#### E. 結論

現在流行している B 型の 2 系統のインフルエンザウイルスは 1976 年から 1979 年の間に分岐したと推定される。165 番目から 166 A 番目にかけてのアミノ酸に欠失・付加がしばしば起こっている。I I 系統のウイルスは I 系統のウイルスに較べて HA 1 ポリペプチドのアミノ酸の数が 1 個多い。両系統のウイルスは抗原性が殆ど交差しないので、ワクチンには両系統のウイルスを含めることが望ましい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

M protein correlates with the receptor-binding specificity of haemagglutinin protein of reassortant influenza A(H1N1) virus. N. Tong, E. Nobusawa, M. Morishita, S. Nakajima and K. Nakajima. J. Gen. Virol. 79:2425-2434, 1998.

##### 2. 学会発表

インフルエンザ A (H1N1) ウイルス HA 1 ヘマグルチニンの分子進化 - 新旧 H1N1 ウイルスの比較。中島節子、西川文雄、森下高行、中島捷久 第 46 回日本ウイルス学会 東京 1998。

## 分担研究報告書

### 抗インフルエンザウイルスCTLのウイルス増殖抑制活性に関する研究

分担研究者 黒田 和道 大阪薬科大学助教授

**研究要旨** 抗インフルエンザウイルスCTLのウイルス増殖抑制能をin vitroにおいて検討した。CTLとしては、以前に確立したK<sup>k</sup>拘束性NP特異的CTLクローンNP102を、また、CTLの標的細胞には感染許容細胞であるMDCKにK<sup>k</sup>遺伝子を導入した細胞(MDCK-K<sup>k</sup>)を用いた。NP102の認識するエピトープを持つインフルエンザウイルスPR8株をMDCK-K<sup>k</sup>に接種後、NP102を重層すると感染細胞上清中へのウイルスの放出は抑えられた。一方、MDCK細胞に接種した場合には、NP102による顕著な抑制は見られなかった。以上の結果は、インフルエンザウイルス感染細胞内での成熟ウイルス粒子形成以前に、CTLが感染細胞を破壊しウイルス増殖を抑制することができることを強く示唆する。

#### A. 研究目的

細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte; CTL)は、インフルエンザウイルス感染からの回復ばかりでなく、感染防御においても重要な役割を果たすことが示唆されている。しかしながら、CTLがインフルエンザウイルスの増殖を抑制し得ることを直接的に示す結果は報告されていない。本研究では、抗インフルエンザウイルスCTLのウイルス増殖抑制能を検証し得るin vitro系を確立し、その系を用いた解析を行った。

#### B. 研究方法

インフルエンザウイルスは、A/PR/8/34(PR8)およびB/Bangkok/163/90(Bangkok)を用いた。

CTLは、K<sup>k</sup>拘束性NP特異的CTLクローンNP102を用いた。このCTLの認識するエピトープ(NP50-57)は、PR8株のNPタンパク質の50から57番目のアミノ酸上に存在する。

H-2K<sup>k</sup>遺伝子cDNAは、L929細胞のpoly(A)<sup>+</sup>RNAからRT-PCR法により調製した。このcDNAをSV40初期プロモーター下に導入し、K<sup>k</sup>遺伝子発現ベクターpSV-K<sup>k</sup>を得た。

DNAの真核細胞への導入は、DOTAPを用いたリポフェクション法で行った。また、K<sup>k</sup>遺伝子を恒常的に発現する導入細胞の選択はgeneticinを用いて行った。

#### C. 研究結果

抗インフルエンザウイルスCTLがウイルス増殖を抑制し得るかどうかを調べるためには、CTLが認識可能なクラスI分子を発現しているウイルス増殖許容細胞が必要である。インフルエンザウイルスは多くの細胞に感染し得るが、大部分の細胞は感染性を持つインフルエンザウイルスを効率良く産生し得

ない。NP特異的CTLであるNP102は、K<sup>k</sup>分子上のエピトープペプチドを認識するが、L929細胞などのK<sup>k</sup>分子を発現する既存の細胞は、調べた範囲内では、どれも感染性インフルエンザウイルスをほとんど産生しなかった。そこで、増殖許容細胞であるMDCK細胞にK<sup>k</sup>遺伝子を導入することを試み、発現量はそれ程高くないものの、K<sup>k</sup>遺伝子を恒常的に発現するMDCK-K<sup>k</sup>細胞を樹立した。この細胞は、親細胞のMDCK細胞には若干劣るものの、インフルエンザウイルスを産生し、また、NP102の標的ともなり得ることが確かめられた。そこで、この細胞を用い、NP102がインフルエンザ増殖を抑制できるかどうかを調べた。PR8接種後1時間でMDCK-K<sup>k</sup>細胞にNP102を重層した場合には、ほぼ完全に培養上清中へのウイルスの放出は抑制された。ウイルス接種後3時間にNP102を重層した場合には、効果は減弱するものの、抑制効果は観察された。しかしながら、感染7時間以降にCTLを重層した場合には、増殖抑制効果は観察されなかった。一方、MDCK-K<sup>k</sup>細胞の代わりにMDCK細胞を用いた場合や、PR8の代わりにNP102の認識するエピトープを持たないBangkokを用いた場合には、NP102によるインフルエンザウイルス増殖抑制は全く観察されなかった。以上の結果は、NP102が、K<sup>k</sup>拘束性にインフルエンザウイルス感染細胞を破壊することにより、ウイルス産生を抑制し得ることを強く示唆している。

#### D. 考察

CTLがインフルエンザウイルスの感染を防御し得ることを示す最も直接的な証拠は、抗インフルエンザウイルスCTLを移入されたマウスが、致死的なインフルエンザウイルス感染を生き残り得るという結果であろう。このCTLによる防御効果がどのよう