

厚生省
平成12年度

厚生科学研究研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業)

研究報告書

新型インフルエンザ対策に関する総合研究

平成13年3月

主任研究者 田代 真人
(国立感染症研究所ウイルス製剤部)

新型インフルエンザ対策に関する総合研究

平成12年度 研究組織

主任研究者 田代真人 国立感染症研究所 ウイルス製剤部長

分担研究者

喜田 宏 北海道大学大学院 獣医学研究科教授

河岡義裕 東京大学医科学研究所 ウイルス研究部門教授

中村喜代人 山形大学医学部 細菌学講座教授

小田切孝人 国立感染症研究所 ウイルス第一部呼吸器系室長

鈴木 宏 新潟大学医学部 公衆衛生学講座教授

榎並正芳 金沢大学医学部 第一生化学講座助教授

菅谷憲夫 日本鋼管病院 小児科部長

奥野良信 大阪府公衆衛生研究所 ウイルス課長

目 次

平成12年度

I. 総括研究報告書

- 新型インフルエンザ対策に関する総合研究 P. 1
主任研究者：田代真人

II. 分担研究報告書

1. シベリアおよびアジアにおける鳥インフルエンザウイルスの生態学的研究 P. 7
喜田宏
協力研究者：岡崎克則、高田礼人
2. 強毒インフルエンザウイルスの鶏胎子における増殖 P. 9
喜田宏
協力研究者：梅村孝司
3. イムノPCRによるインフルエンザ迅速高感度診断法の開発 P. 11
喜田宏
4. インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼは増殖に必須か？ P. 13
河岡義裕
5. インフルエンザウイルスの宿主域とレセプター特異性 P. 15
河岡義裕
6. 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 P. 18
中村喜代人
7. サーベイランスに基づく分子疫学、新型インフルエンザの危機管理行動に関する研究 P. 22
小田切孝人
共同研究者：西藤岳彦、板村繁之、斉藤利憲、渡辺真治、今井正樹、松永泰子、
山下和予、新藤奈邦子、岡部信彦、鈴木宏、柏木征三郎、
8. アマンタジン耐性インフルエンザウイルスの分子疫学的研究 P. 27
鈴木宏
共同研究者：斎藤玲子、押谷仁、増田寛樹
9. 遺伝子組換えによるインフルエンザウイルスの弱毒化とワクチン株の開発に関する研究 P. 31
榎並正芳
10. インフルエンザウイルス感染症の迅速診断、Directigen FluA+Bの検討 P. 32
菅谷憲夫
11. モノクロナール抗体による新型インフルエンザの予防と治療 P. 36
奥野良信

新型インフルエンザ対策に関する総合研究

主任研究者 田代真人 国立感染症研究所ウイルス製剤部長

近く新型インフルエンザが出現することが想定されているが、その際には未曾有の健康被害と社会的混乱が生じることが危惧される。現在厚生労働省では、平成9年の新型インフルエンザ対策検討会報告書および平成11年のインフルエンザ特定感染症対策要綱に沿って、新型インフルエンザ対策の策定・実施を進めている。この間に、香港におけるトリH5N1型やH9N2型ウイルスの流行があり、またWHOから新型インフルエンザ対策指針及び大流行間期におけるワクチン接種勧告が出されたので、これらを考慮して、従来の方針の見直しと、その実施要領の策定を進めた。また、その計画を実現するための基礎研究と、政策策定の議論に必要な調査研究を進めた。その結果、新型インフルエンザ対策の基本方針に大きな変更の必要は無いものの、その実施のための行動計画を早急に作成する必要がある、またその計画を実現するために必要な基礎研究を推進させるとが緊急課題であると結論された。

分担研究者

喜田 宏 北海道大学大学院獣医学研究科教授
河岡 義裕 東京大学医科学研究所ウイルス研究部門教授
中村喜代人 山形大学医学部細菌学講座教授
小田切孝人 国立感染症研究所呼吸器系ウイルス室長
鈴木 宏 新潟大学医学部公衆衛生学講座教授
榎並 正芳 金沢大学医学部第1生化学講座助教授
菅谷 憲夫 日本鋼管病院小児科部長
奥野 良信 大阪府公衆衛生研究所ウイルス課長
研究協力者
永田 恭介 東京工業大学生命工学部助教授

A. 研究目的

A型インフルエンザでは、数10年に一度の割合で新（亜）型ウイルスがヒトの世界に出現して世界的な大流行を起こす。様々な状況証拠から、近くその出現が想定されているが、近年における人口増加、交通の発達など地球全体の生活環境の大きな変化によって、短期間に集中して大流行が拡がり、未曾有の健康被害と社会的混乱が生じることが危惧されている。

厚生省では、新型インフルエンザ対策のために、平成9年に新型インフルエンザ対策検討会を組織し

て、対策の基本方針を定めた。さらに、感染症新法の施行に応じて、インフルエンザを重要な感染症としてインフルエンザ特定感染症基本指針を定め、その後、引き続いて厚生労働省ではその対策を進めている。

本研究では、これらの経緯を踏まえ、更にその後の香港におけるトリH5N1型およびH9N2型インフルエンザの流行、WHOの新型インフルエンザ対策要綱や大流行間期におけるワクチン接種勧告、抗インフルエンザ薬や迅速診断キットの実用化などの状況の変化を考慮して、1) わが国の新型インフルエンザ対策基本方針の見直し、2) 新型ウイルス出現予想方法・早期検知方法の確立、3) 新型インフルエンザ大流行の規模、健康被害、社会的影響の予測とシナリオの作成および事前準備計画の策定、4) ワクチン緊急開発・増産や抗インフルエンザ薬の備蓄など、新型インフルエンザ出現時に各シナリオ状況下での被害を最小限に留めるための行動計画の策定、5) 事前準備計画および行動計画を実施するための諸条件の検討、6) 国際協力体制の検討等、新型インフルエンザ対策のための議論に必要な科学的根拠を与える調査研究及び基礎研究を行い、総合的インフルエンザ危機管理体制の確立に資することを目的とした。

B. 研究方法

本研究は3年計画であるが、1年目の本年は、研究目的項目の検討・議論に必要な資料を収集・作成することを共通課題として、各分担研究者においてその準備のための調査を進めた。

特に、平成9年の香港におけるトリH5N1型インフルエンザ出現の際の対応についての評価、反省に基づく多くの教訓から、現在及び今後の問題点を列挙するとともに、現在までの新型インフルエンザ対策の見直し作業を進めた。

一方、各項目に対する準備計画・対応計画の実現を図るために、新型インフルエンザ出現機構の解明、予測・早期検出方法の開発、ワクチン緊急増産体制の確立、抗インフルエンザ薬の意義と限界、新規の新型インフルエンザ治療・予防法の開発等に関してそれぞれの分担項目についての基礎研究を進めた。

また、緊急に対応が必要であり、現在その実施が可能と考えられる準備計画・対応計画については、その具体的な実施方法を検討した。

C. 研究結果

1) わが国の新型インフルエンザ対策基本方針の再検討

平成9年の厚生省新型インフルエンザ対策検討会の報告書は、新型インフルエンザに対する事前準備と行動計画の骨子を示している。また、新型インフルエンザ対策は、流行間期の通常のインフルエンザ対策の延長線上にあるとの認識を示し、毎年のインフルエンザ対策の確立を求めている。

その後WHOにおいても新型インフルエンザ対策要綱が提出され、地球レベルでの新型インフルエンザ対策が進められている。更に平成12年6月に東京で開催されたWHOインフルエンザ会議において、流行間期のインフルエンザの健康被害の総計は、数十年に一回おこる大流行の被害に匹敵するとの見地から、流行間期のインフルエンザ対策の充実が勧告された。

この間に、香港においてトリ強毒H5N1型、続いてH9N2型ウイルスが直接ヒトに感染して、健康被害をもたらすという予想外の事態が生じた。そこでまず、この際の教訓と対応についての評価を行った。その結果、まず第1に、トリのウイルスが直接ヒトに感染したこと、また従来のインフルエンザと言う呼吸器疾患の概念を超える強毒株ウイルスによる感染が起こったことから、これまでのインフルエンザに対する考え方を大幅に修正する必要がある。

H5N1型の起源については、遺伝子解析の結果、H9N2、H5N1、H6N1型のトリウイルスが、

カモ、ウズラなどのトリを宿主して、20年以上前から東アジアを中心に拡がっており、これらのウイルス遺伝子が複雑に交雑した再集合体として、香港H5N1が出現したことが想定された。さらに、香港で流行したウイルスには、系統を異にする2種類のH5N1が同時に流行していたことが示され、偶然とはいえ、従来の予想を超えるものであった。今後どのようなウイルスが新型として出現する可能性があるかを考えるためには、従来の概念よりも更に広くトリ、ブタにおけるインフルエンザウイルスの生態を解明し、その動向を監視する必要がある。このための基礎研究、野外研究を緊急に進める必要がある。

また、動物とヒトとの間の宿主域を決める障壁の実態、動物からヒトへのウイルスの馴化機構等についても、従来の学説では説明し得ない現象が起こっていた。HA蛋白に対するレセプターの特異性のみでは、トリのウイルスがなぜヒトに感染できたのか、またヒトからヒトへの伝播性を獲得する条件に関して十分には説明し得ないことが示された。宿主域を決定するその他の宿主因子についても、現時点では十分な知見が得られておらず、そのためにサーベイランスの結果分離されたウイルスの解析結果についての解釈・評価が不十分である。今後の新型インフルエンザ対策の方向性を決める上で、これらに関する基礎研究も緊急課題である。

以上の検討から、トリインフルエンザウイルスに対するサーベイランスと早期発見のための診断体制の確立、および15亜型すべてに対するワクチンの事前開発・緊急増産体制の確立が必要であることが明らかになった。そのために、平成10年度からトリ及びブタインフルエンザウイルスの系統保存事業を開始しているが、これらを用いた診断体制の確立とワクチンの開発、更にその安全性と有効性を検証するために、前臨床試験およびヒトにおける臨床試験が必要であることが討議された。

香港H5N1型については、WHOの要請に応じて国立感染症研究所では世界に先駆けてウイルスの弱毒化に成功した。しかし、トリ由来のウイルスを用いたワクチンの有効性及び安全性に関しては、全く経験が無かったために、その後のワクチン試験製造及びその実用化には多くの検討を要することとなり、実際に接種の必要性が生じた際には対応できないことが明らかになった。そこで、H5N1型ワクチンについて、前臨床試験および臨床第1相試験を行った。

その結果、ヒトに対して安全性には問題が無いも

の、現行のHAワクチンの2回接種では、HI抗体も中和抗体も十分に誘導できないことが示された。

これは、動物実験においては良好な結果を得られても、ヒトにおいては必ずしも適用出来ないことを示している。同様の成績は、英国、米国においても得られており、トリインフルエンザすなわち新型インフルエンザに対するワクチン開発が容易ではないことを暗示している。トリのウイルスがなぜヒトに免疫原性を示さないのか、どこをどのように改変すれば免疫原性を持つようになるのかという基本問題の解明が緊急課題である。一方、HAワクチンではなく、全粒子ワクチンを用いれば、有効な免疫を賦与しうる可能性、および免疫賦活剤としてのアジュバントの併用等の検討も必要である。H5N1型全粒子ワクチンについては、緊急に安全性と有効性を検証しておくことの必要性が提起された。この結論を受けて、来年度には緊急にこれらの試験を行う予定にしている。

新型インフルエンザに対するワクチンの緊急開発と緊急増産は依然大きな課題である。緊急開発については、H5N1型ウイルスの弱毒化に成功したことにより、分担研究者である榎並博士の開発したリバーシ・ジェネティクスを駆使した方法の有用性が示された。しかし、これに用いた技術は第1世代の方法であり、その応用範囲には制約がある。その後、更にこの方法に改良を加えて、同じく河岡博士らは任意のインフルエンザウイルスを作製しうる最新のリバーシ・ジェネティクス技術の開発に成功した。今後、これらの方法を更に簡易に行えるように改良し、どのような新型ウイルスが出現しても対応できるようにすることが期待される。これは、世界に対する日本の大きな貢献であると評価できる。

一方、平成11年から抗インフルエンザ薬としてのアマンタジン、更にノイラミニダーゼ阻害剤が2種類実用化されて、発売承認を受けた。これらの薬剤の効果には限界があり、決してワクチンに代わるものではない。しかし、新型インフルエンザウイルス出現の際には、ワクチンの大量製造は緊急には間に合わず、また地球上のすべての人にワクチンを供給出来る見通しはない。そこで、新型インフルエンザ対策として、これらの抗インフルエンザ薬の備蓄が有力な手段になりうるものと評価できる。わが国においても、新型インフルエンザ対策の柱の1つとして、緊急に検討すべきである。今後その費用負担、備蓄設備、緊急時の供給体制等の問題を解決する必要がある。

2) 新型ウイルス出現予想方法・早期検知方法の確立

新型ウイルスの出現予想は現時点では不可能である。中国・北京インフルエンザセンター、香港大学等との共同研究によって、中国南部を中心とした動物インフルエンザウイルスの流行状況を調査した結果、香港で流行したH5N1型ウイルスの起源は複雑な遺伝子再集合の結果もたらされたものであり、その遺伝子供与ウイルスは、中国及び東アジアのトリの間で広く維持されていることが示された。

今後の新型ウイルスの候補としては、H5N1型、H9N2型、H6N1型などが考えられ、特にこれらに対する動向調査と、診断キットの開発、ワクチン株の準備が必要である。

一方、ヒトの世界への新型ウイルス侵入についての早期発見、早期検知方法に関しては、ヒトにおけるサーベイランスをきめ細かく進めることに尽きるが、感染症新法によるインフルエンザサーベイランス事業により毎年1万株近くのウイルスが分離され、その抗原解析が迅速になされている現在の体制は、世界的にも高い水準にあると判断される。

地方衛生研究所から感染症研究所へのウイルス分離報告は、従来は、週に1回のファックスによる報告であった。これは、大量の報告を検索するのにも能率が悪く、さらに必要なウイルスの分与が迅速に出来ないために、新型ウイルス出現の際には、後手に回る危険性が指摘された。そこで、現行のWISH Netを利用したコンピューター・ソフトを緊急に開発した。これによって、瞬時に新型ウイルスの可能性を持つ分離株を検出し、その送付依頼と詳細な解析が迅速に行える体制が整った。現在この試用を行っている。

3) 事前準備計画の策定と実施

平成10年度から始まったトリ及びブタインフルエンザウイルスの系統保存事業では、現在までに分離されている15亜型すべての代表的ウイルス株の収集が終わっている。更に、それ以外のウイルスの分離・検出を目的として、地方衛生研究所の協力の下に、野生のカモ及びブタからインフルエンザウイルスの分離を進めた。

収集したウイルス株の抗原性状、遺伝子解析を進めるとともに、発育鶏卵での増殖性などワクチン製造株としての適格性を検討し、幾株かの候補ウイルスを見出した。しかし上記の通り、H5N1型HAワクチンは、ヒトに対して十分な抗体を誘導できないことが示されたので、これらのトリウイルスをそ

のままワクチン製造に使用することは不適當である可能性がある。従って、今後は、ヒトに免疫原性を持たせるための改変を、リバーシ・ジェネティクス技術を駆使して検討する必要あり、この作業を進めている。また、ワクチン製造株の事前開発および緊急開発方法については、リバーシ・ジェネティクスを用いた任意のウイルス製造方法が応用できる可能性が高まった。

一方、これらのトリウイルスの不活化抗原と抗血清を製造した。これを基にして15亜型の同定キットを作製した。2年前から導入されたA型インフルエンザウイルス迅速診断キットと併用することにより、新型ウイルスが分離された際の迅速診断体制が整いつつある。

ワクチンの緊急増産については、現行不活化ワクチンは発育鶏卵を用いているので、発育鶏卵の供給体制が鍵となる。今後、高齢者に対するワクチン接種が広く普及すれば、毎年2000万人分以上のワクチンを製造することになる。新型インフルエンザには単味ワクチンを使用するが、2回の接種が必要となるので、単純計算で現行の1.5倍である3000万人分位の製造量が確保できよう。これは全国民の25%に相当するが、さらに海外からのワクチン供与の依頼が予想されるので、更に増産を図る必要がある。新型インフルエンザの際に国民全員にワクチン接種を行うためには、1億2000万人分のワクチンが必要であり、そのためには現在の4倍の製造が必要とされる。現在の設備では、1週間で1~200万人分程度のワクチンしか製造できず、必要量を満たすには数ヶ月掛かることになる。

この間に、ワクチン接種の優先順位を予め設定しておく必要があるものと考えられる。全員が免疫を持たない事態では、国民全員がワクチン接種の対象者となるが、特に健康被害が予想される群、または社会機能の維持に不可欠な職種等をどのように設定するかは、大きな問題であり、広く国民の意見を聞いて同意を得ておく必要がある

緊急時のワクチン大量製造を確保するためには、製造設備の拡充に加えて、毎年それらの設備を稼働させる必要がある。新型ウイルスを用いてワクチンを製造する際には、従業員が感染を受ける危険性、また感染した従業員から社会へ感染が拡大する危険性、さらに製造所から外部へウイルスが漏出する危険性などのバイオハザードの面からの検討も必要である。これらを考慮して、厚生省では、国内のワクチンメーカーの製造施設を物理的封じ込め可能な構造に改善するように勧告し、その工事が進んでいる。

製剤の品質管理上のGMPに準拠しながら、環境への汚染を防ぐという二律背反の条件ではあるが、順調に進行していると評価できる。

ワクチンの緊急増産体制を維持するためには、例年における国内のワクチン接種率を更に向上させるとともに、ワクチンの海外への供与、輸出も積極的に考慮すべきである。この政策には、カナダ政府が検討している方式が参考になる。すなわち、全国人口の110%のワクチンを毎年国内で製造し、ワクチン接種率を100%まで高める。一方、余剰分はワクチンを製造していない国に輸出するというものである。例年のインフルエンザに関しては、ワクチンの輸入も許容されようが、新型インフルエンザの際にはワクチンの緊急輸入は事実上不可能であるので、ワクチンの自給体制の確保は健康政策における安全保障上からも不可欠であると考えられる。

発育鶏卵の供給には限界があるので、組織培養細胞を用いたワクチンの開発は緊急課題である。これに関しては、国内外の研究者、ワクチンメーカーが既に候補となるものの開発に成功しており、今後は安全性、有効性の検証とともに、大量生産と安定供給体制の検討が必要である。

新型インフルエンザ対策として、これらの抗インフルエンザ薬の備蓄が有力な手段になりうるということが示唆された。わが国においても、新型インフルエンザ対策の柱の1つとして検討すべきであるが、その費用負担、備蓄設備、緊急時の供給体制等の問題を解決する必要がある。

更に、これらの抗インフルエンザ薬に使用に関しては、薬剤耐性ウイルスの出現が問題となっている。もしも新型ウイルスが耐性を獲得していた場合には、現在の新型インフルエンザ対策は大きく躓くことになる。特にアマンタジンについては、数日の連用により50%にも及ぶ耐性ウイルスが出現し、さらに耐性ウイルスが感染伝播している実状が明らかにされた。一方、ノイラミニダーゼ阻害剤についても、国際的な耐性ウイルスのモニター耐性が整備されつつあるが、今後もしも耐性ウイルスが出現した際には、どのような対応を執るのかを予め検討しておく必要がある。

4) 新型ウイルスが出現、侵入、流行した場合、また大流行が起こった場合の行動計画の策定

1999年のWHO新型インフルエンザ対策要綱では、新型インフルエンザウイルスがヒトから分離された場合、ヒトからヒトへの伝播が確認された場合、流行が起こった場合などに分けて、WHOが執

るべき行動、各国が執るべき対応などの指針を示している。さらに、この指針に沿って、各国でそれぞれの場合に応じた行動計画を予め建てるように勧告している。わが国の新型インフルエンザ対策検討会報告者では、指針に相当する要領は示されているが、未だ具体的な行動計画案は出来ていない。

今後、本研究班で行動計画案の草稿を作成し、厚生労働省の新型インフルエンザ対策検討会において検討し、国が策定する必要がある。

5) 国際協力体制の再検討

新型インフルエンザによる大流行は全世界を席卷する規模で起こるので、その対策には国際協力が不可欠である。近年における人口増加、交通の発達など地球全体の生活環境の大きな変化によって、短期間に集中して大流行が拡がり、未曾有の健康被害と社会的混乱が生じることが危惧されている。特に、1918年のスペインインフルエンザの大流行に際しては世界中で2～4千万人の死亡が推定されているが、当時に比べて現在の地球上の人口は3倍以上に増加しており、人口密度も3倍以上になっているので、死亡者数は6千万人に上るものと推定される。

また交通の発達と人の移動も飛躍的で、スペインインフルエンザでは流行が約6ヶ月かかって地球を一周したのに対して、現在では4日間で世界中に拡がるのが想定される。そのために、健康被害も短期間に集中的に起こるので、未曾有の社会的混乱が生じるものと危惧される。

このような健康危機、社会危機に対応するためには、健康危機管理の面からのみの対応では不可能であり、国家レベル、地球レベルでの危機管理が必要である。

一方、過去の例や、動物ウイルスの動向などから、中国南部が新型インフルエンザ出現のエピ・センターと目されている。従来から中国におけるインフルエンザの動向は一部しか明らかにされておらず、その実態の多くは不明であった。平成9年の香港におけるH5N1型、11年のH9N2型に関しても、中国本土における情報は不透明であった。更に各国が独自に様々な経路で情報の提供を依頼すると言う事態も重なって、正確な情報が流れずに、不要な混乱をもたらしたことは否めない。平成10年8月に中国南部でH9N2型ウイルスがブタとヒトから分離されたとの非公式報告があった。これについてもその後の情報が途切れていたが、平成12年5月に中国の国内インフルエンザセンターと5カ所の省公衆衛生研究所インフルエンザセンターを査察した結果、ヒトにおけるH9N2インフルエンザの流行があっ

たことを確認した。しかしヒトからの分離ウイルスについては、実験室内の交叉汚染による紛れ込みの可能性も否定できず、実験施設の整備が必要であることが明らかになった。

しかし最近、中国側のインフルエンザに対する認識の変化と、WHOを中心とする地道な努力によって、ようやく中国を対象としたサーベイランス体制が整いつつある。WHOでは今後5年計画で、中国自身でインフルエンザサーベイランスを行えるような国内計画を承認し、資金援助と技術支援を約束した。これに関しては、わが国の大きな貢献も期待されており、国内におけるインフルエンザ対策と平行して、中国をはじめ東アジア諸国との国際協力を促進する必要がある。これまで、多くのチャンネルが錯綜して、かえって円滑な協力関係を阻害する傾向もあり、これらの反省に立って、今後、その具体的な方策を検討する必要がある。

D. 考 察

わが国における新型インフルエンザ対策を再検討した。平成9年の厚生省新型インフルエンザ対策検討会で検討した当時は、わが国のインフルエンザ政策はほとんど崩壊状態にあった。従って、同報告書では、新型インフルエンザ対策は例年の大流行間期の対策の延長上にあり、新型インフルエンザ対策を検討するためには、まず毎年のインフルエンザ対策を確立することが前提であるとの結論を出している。その後、この報告に基づいて、毎年のインフルエンザ対策の再構築が図られ、更に感染症新法に基づいたインフルエンザ特定感染症対策指針によって、サーベイランスおよびワクチン政策の充実が進んでいる。

例年のインフルエンザ対策にも未解決の部分は多いが、一応の基本方針が定まったといえる。そこで、改めて、新型インフルエンザ対策の実施について検討する時期に来たと言えよう。この間に、WHOでは新型インフルエンザ対策指針を出し、WHOの役割を規定するとともに、新型インフルエンザに対する事前準備と行動計画を各国で整備するように勧告した。一方、香港におけるH5N1型、H9N2型の出現は、従来の概念を超える事態であり、多くの教訓を残している。

これらの新展開を考慮して、平成9年の厚生省新型インフルエンザ対策検討会の報告書を見直すとともに、事前準備と行動計画の作成が急務である。一方、H5N1インフルエンザにおける多くの教訓から、緊急に進めるべき基礎研究の項目も明らかになってきた。さらに、新型インフルエンザは地球レベル

での健康危機管理、社会危機管理の問題でもあるので、その検討には、人文・社会・経済・法律などの幅広い専門家の参加が不可欠である。さらに、新型インフルエンザ対策の有効な実施には国民の納得と合意が必要であり、そのためにも開かれた議論が必要である。

今後はこれらを平行して、わが国の新型インフルエンザ対策の確立と継続・維持に寄与していきたい。

E. 結論

最近のわが国におけるインフルエンザ政策の進展と、香港におけるH5N1型インフルエンザ流行時の教訓に基づいて、新型インフルエンザ対策の再検討を進めた。

この数年間にわが国のインフルエンザ対策は大きな進展があったと評価できる。現時点では、新型インフルエンザ対策検討会報告書の方針を大幅に改定する必要はないが、今後緊急に事前準備と行動計画を具体的に策定する必要がある。また、この計画を実施可能とするための基礎研究が必要である。特に、以前考えられていた範囲を超えて、動物インフルエンザのサーベイランスの必要性、宿主域を超えてヒトの間で流行するための条件の解明、ワクチンの事前準備と安全性・有効性の事前検証、ワクチン緊急増産体制の構築、抗ウイルス剤の備蓄についても、緊急に検討を必要とする。

F. 研究発表

1. Takeuchi, K., Miyajima, N., Kobune, F., Tashiro, M. Comparative nucleotide sequence analyses of the entire genomes of B95a cell-isolated and Vero cell-isolated measles viruses from the same patient. *Virus Genes* 20: 253-257, 2000
2. Okada, H., Kobune, F., Sato, T. A., Kohama, T., Takeuchi, Y., Abe, T., Takayama, N., Tsuchiya, T., Tashiro, M. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch. Virol.* 145: 905-920 2000
3. 森島恒雄、富樫武弘、横田俊平、奥野良信、宮崎千明、田代真人、岡部信彦、葛西 健. インフルエンザに合併する脳炎・脳症に関する全国調査 *日本医事新報* 3953: 26-28 2000
4. Takeda, M., Takeuchi, K., Miyajima, N., Kobune, F., Ami, Y., Nagata, N., Suzuki, Y., Nagai, Y., Tashiro, M. Recovery of pathogenic

measles virus from cloned cDNA. *J. Virol.* 74: 6643-6647 2000

5. Hasan, M. K., Kato, A., Muranaka, M., Yamaguchi, R., Sakai, Y., Hatano, I., Tashiro, M., Nagai, Y. Versability of the accessory C protein of Sendai virus: contribution to virus assembly as an additional role. *J. Virol.* 74: 5619-5628 2000

6. Nishimura, H., Itamura, S., Iwasaki, T., Kurata, T., Tashiro, M. Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection. *J. Gen. Virol.* 81: 2503-2519 2000

7. Yamamoto, A., Nakayama, M., Tashiro, M., Ogawa, T., Kurane, I. Hydroxyapatite-coated nylon beads as a new reagent to develop a particle agglutination assay for detecting Japanese encephalitis virus-specific antibodies. *J. Clin. Virol.* 19: 195-204 2000

8. Reickert, T., Sugaya, N., Fedson, D., Glezen, W., Simonen, L., Tashiro, M. Experience in Japan of the vaccination of schoolchildren against influenza. *New Engl. J. Med.* 2001

9. Fukuda, K., Takahashi, K., Iwata, Y., Mori, N., Gonda, K., Horimoto, T., Sawada, T., Tashiro, M., Yamaguchi, K., Niwa, S., Shigetani, S. Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan. *J. Infect. Dis.* 39: 2001

10. Kato, A., Ohnishi, Y., Hohase, M., Saito, S., Tashiro, M., Nagai, Y. The smallest Y2 of Sendai virus C proteins is fully capable of both counteracting the anti-viral action of interferons and inhibiting viral RNA synthesis. *J. Virol.* 76: 2001

11. Umino, Y., Tashiro, M. Inhibition of rubella virus growth by Fungizone. *Vaccine* 19: 1369-1372, 2001

12. Okada, H., Sato, T. A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N., Tashiro, M. : Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch. Virol.* 146: 2001

シベリアおよびアジアにおける鳥インフルエンザウイルスの生態学的研究

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 新型ウイルスの出現に備え、その亜型の予測とワクチンおよび診断に供するウイルス株を確保するため、シベリアおよび北海道において鳥インフルエンザの疫学調査を実施した。渡りガモの糞便968検体を採取し、それらから21株のインフルエンザウイルスを分離した。分離ウイルスのサブタイプはH3N8、H4N6、H5N3、H6N2、H9N2、およびH10N4であった。これらのウイルス株と1995~1999年に中国のニワトリから分離されたH9N2ウイルス遺伝子の系統解析を行った結果、1997年に香港でヒトおよびニワトリから分離された強毒H5N1ウイルスおよび同時期にニワトリの間で流行していたH9N2ウイルスの内部蛋白遺伝子はシベリアに営巣するカモのウイルスに由来することがわかった。

A. 研究目的

研究分担者らは新型インフルエンザウイルスの供給源が渡りガモの腸内ウイルスにあること、カモはそのウイルスを新型ウイルスの登場舞台と想定される中国南部までシベリアの営巣湖沼から運ぶことを証明した。さらに、北海道の渡りガモから分離した弱毒H5N4ウイルスを精製、不活化し、これをワクチンとして鼻腔内に投与したマウスは致死量の強毒H5N1ウイルス攻撃に耐過することを示した。

本研究は新型ウイルスとして出現するインフルエンザウイルスの亜型を予測するとともに、調査で分離される弱毒ウイルスをワクチン製造および診断に供する目的で実施した。

B. 研究方法

1) ウイルス分離および同定

2000年、8月、マガダン市郊外の水禽営巣湖沼およびイルクーツク市内で水禽の糞便485検体を採取した。同年10月、北海道宗谷地区において483検体を採取した。これらを発育鶏卵に接種して赤血球凝集因子を分離した。同定は標準抗血清を用いた赤血球凝集阻止試験およびノイラミニダーゼ阻止試験による。

2) 遺伝子解析

本研究でシベリアのカモ糞便から分離された1株、北海道のカモ糞便から分離された6株ならび

に1995~1999年に中国のニワトリから分離された4株のH9N2ウイルスのNPおよびNS遺伝子を解析した。ウイルスRNAを抽出し、これを鋳型、ランダムヘキサマーをプライマーとした逆転写酵素反応を行いcDNAを得た。インフルエンザAウイルスNPおよびNS遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用い、各々の遺伝子断片を増幅し、それらを鋳型としたdirect sequencing法によって塩基配列を決定した。

3) 系統進化解析

NP遺伝子の1,216~1,430塩基位、NS遺伝子の23~850塩基位についてGenbank登録塩基配列と比較し、Neighbor-joining法を用いて進化系統樹を作成した。

4) 動物インフルエンザのグローバルサーベイランス

新型ウイルスの出現に備え世界の動物インフルエンザの疫学調査とワクチン候補株を系統保存・管理するプロジェクトをWHO専門家協議会で提案し、各国とのネットワーク形成に支援が得られることになった。北海道大学を含む世界の動物インフルエンザセンター5機関の間で25株のH9ウイルス株を交換し、比較解析を開始した。

アジアにおけるインフルエンザサーベイランスネットワークを強化するため、タイ国立衛生研究所で技術指導を行った。また、韓国家畜衛生試験場および北京農業大学の研究員を受け入れ、研修を行った。

C. 研究結果

1) 水禽糞便からのインフルエンザウイルスの分離

2000年8月、イルクーツクで採取した290検体の水禽糞便から2株のH3N8ウイルスを分離した。同年10月に稚内市大沼および浜頓別町クッチャロ湖で採取した483検体から19株のインフルエンザウイルス(1H4N6、2H5N3、2H6N2、1H9N2、および13H10N4)を分離した。

2) シベリアおよび北海道で分離されたカモ由来ウイルスならびに中国で分離されたニワトリ由来ウイルス遺伝子の系統解析

2000年にシベリアおよび北海道でカモの糞便から分離したインフルエンザウイルス7株ならびに1995～1999年に中国のニワトリから分離された4株のH9N2ウイルスのNPおよびNS遺伝子の塩基配列を決定し、Genbank登録配列とともに系統解析を行った。その結果、調べた11株の両遺伝子はいずれもユーラシア系統に属し、二つのサブグループに分けられた。一方はシベリアで分離された1株と北海道で分離された4株が属し、シベリアで分離された株の両遺伝子は強毒H5N1ウイルスのそれと近縁であった。他方には北海道のカモから分離された2株および中国本土あるいは香港のニワトリから分離されたH9N2ウイルスが属した。

D. 考察

2000年、ロシア共和国マガダン州、イルクーツクならびに渡りガモの飛翔路下にある北海道宗

谷地区において水禽の糞便を採取し、それらから21株のインフルエンザウイルスを分離した。分離ウイルスのサブタイプはH3N8、H4N6、H5N3、H6N2、H9N2およびH10N4であった。内部蛋白遺伝子の系統解析の結果、シベリアのカモから分離された株は香港で分離された強毒H5N1ウイルスに近縁であることがわかった。

これまで世界各地で分離したインフルエンザウイルスについて、抗原性、生物性状ならびに遺伝子を解析し、バンクに系統保存する作業を進めている。

E. 結論

シベリアおよび北海道で採取したカモの糞便から様々な亜型のインフルエンザウイルスを分離した。新型ウイルスの出現に備えたワクチンおよび診断に供するため、分離ウイルスの系統保存・管理を開始した。動物インフルエンザのグローバルサーベイランス計画を提案し、その実施を開始した。

F. 研究発表

1. Okazaki, K., Takada, A., Ito, T., Imai, M., Takakuwa, H., Hatta, M., Ozaki, H., Tanizaki, T., Nagano, T., Ninomiya, A., Demenev, V. A., Tyaptirganov, M. M., Karatayeva, T. D., Yamnikova, S. S., Lvov, D. K., and Kida, H. (2000) Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. *Arch. Virol.* 145, 885-893.

強毒インフルエンザウイルスの鶏胎子における増殖

研究分担者：喜田 宏（北海道大学大学院獣医学研究科）

研究協力者：梅村孝司（北海道大学大学院獣医学研究科）

研究要旨 インフルエンザウイルスの病原性発現機序を明らかにするため、強毒ウイルスおよび弱毒ウイルスを各々発育鶏卵の尿膜腔内に接種して胎子を免疫組織化学検索に供した。その結果、強毒株は尿膜の上皮細胞で増殖した後、漿尿膜の血管内皮細胞および胎子の内臓諸臓器で増殖して胎子を死に至らしめることがわかった。一方、弱毒株は尿膜に局限して抗原が検出された。

A. 研究目的

強毒インフルエンザウイルスを発育鶏卵の尿膜内に接種すると胎子は全身感染を起こして24時間以内に死亡する。ウイルスの体内伝播経路および病理発生は不明のままであった。本研究ではインフルエンザウイルスの病原性発現機序を明らかにするため、強毒ウイルスおよび弱毒ウイルスを各々発育鶏卵の尿膜腔内に接種して胎子の組織を免疫組織化学検索した。

B. 研究方法

強毒インフルエンザウイルスとしてA/tern/South Africa/61 (H5N3; Tern/SA)、A/whistling swan/Shimane/499/83 (H5N3; 24a5b)、A/Hong Kong/483/97 (H5N1; HK483) およびA/Hong Kong/156/97 (H5N1; HK156)、弱毒株としてA/duck/Pennsylvania/10128/84 (H5N2; Dk/Penn) を用いた。各々のウイルス液 10^3EID_{50} を10日令の発育鶏卵の尿膜腔内に接種し、12、15、18、21、24、27および36時間後に胎子を摘出した。ホルマリンで固定後、パラフィンに包埋し、薄切してHE染色ならびに抗インフルエンザウイルス抗体を用いた免疫組織化学染色に供した。

C. 研究結果

強毒株を接種された卵の胎子はHK156を除き何れも死亡したが、HK156とDk/Pennを接種された胎子は生残した。組織学的変化はTern/SAを除き接種後15時間までは認められなかった。一方、ウイルス抗原は12時間後から強毒株

を接種された卵の尿膜上皮に検出された。次いで、漿膜上皮に抗原が検出された。漿膜上皮の抗原はTern/SAで最も早く検出され、以下、HK483、24a5b、HK156の順であった。ウイルス抗原はその後漿尿膜の血管内皮細胞で検出されるようになった。一方、弱毒株を接種された卵ではウイルス抗原は尿膜に局限して観察された。

強毒株を接種された卵の胎子では、接種後21時間(Tern/SA)、24時間(HK483)、27時間(24a5b)および36時間後(HK156)から内臓諸臓器の血管内皮細胞にウイルス抗原が検出された。また、それと同時にやや遅れて肝細胞、胆嚢上皮細胞、心筋細胞、中枢神経系の血管周囲のグリア細胞などに抗原が認められた。しかしながら、HE染色ではこれらの細胞に変性は観察されなかった。弱毒のDk/Pennを接種された卵の胎子ではウイルス抗原は全く検出されなかった。

D. 考察

発育鶏卵の尿膜腔内に接種されたインフルエンザウイルスは、その毒力に関わらず、まず尿膜細胞で増殖した。その後、強毒株のみが漿膜細胞に感染して漿尿膜の血管内皮細胞に伝播し、全身感染を引き起こすことがわかった。血管内皮細胞への感染の速さはニワトリに対する病原性と平行していた。

ニワトリの強毒インフルエンザウイルス感染症は皮下および内臓漿膜の出血、全身性の浮腫、肉冠・肉髯の腫脹と紫変を主徴とする。組織学的には壊死、血管炎、血栓症を含む血管系の障害を示す。本研究では強毒株に感染した胎子には感染鶏に認められるような病変は認められなかったが、強毒インフルエンザウイルスの血管内皮細胞への

指向性は共通していた。

本研究の成績から、強毒インフルエンザウイルスによる鶏胎子の死は尿膜組織の破壊による低酸素血症や血管内凝固によるものではなく、全身臓器への感染によってもたらされることがわかった。

E. 結論

強毒インフルエンザウイルスは鶏胎子の尿膜の上皮細胞で増殖した後、漿尿膜の血管内皮細胞に伝播し、その後全身臓器で増殖することによって胎子を死に至らしめることがわかった。

F. 研究発表

1. Park, C. H., Ozaki, H., Takada, A., Kida, H., Ochiai, K., and Umemura, T. (2001) Primary target cells of virulent strains of type A influenza virus in chicken embryos. *Avian Pthol.* (in press)

イムノPCRによるインフルエンザ迅速高感度診断法の開発

研究分担者：喜田 宏（北海道大学大学院獣医学研究科）

研究要旨 イムノPCRによってウイルス抗原を検出するインフルエンザの迅速高感度病原診断法を開発した。インフルエンザAウイルス間で抗原性が共通の非構造蛋白を検出するイムノPCRの感度はウイルスゲノムを検出するRT-PCRの $10^{1.0-2.0}$ 倍であった。本法によるサブタイプ特異的なヘマグルチニン抗原の検出感度はウイルス分離あるいはRT-PCRの $10^{7.0-3.0}$ 倍であった。

A. 研究目的

インフルエンザは病原ウイルスの分離あるいは抗ウイルス抗体の検出によって診断される。しかしながら、ウイルス分離には数日を要し、また、症状を顕してウイルスの感染源となる急性期には抗体検出が困難である。したがって、感染早期に迅速かつ高感度で病原ウイルスを診断する方法を開発する必要がある。

イムノPCRはELISAの特異性とPCRの感度を組み合わせた高感度抗原検出法として開発された。本研究では、インフルエンザAウイルスに共通な非構造蛋白(NS1)および亜型特異的ヘマグルチニン(HA)抗原を検出するインフルエンザの迅速高感度抗原検出による診断法を開発した。

B. 研究方法

1) NS1の発現と抗NS1モノクローン抗体の作出

A/equine/Malawi/63 (H3N8) 株のゲノムRNAを鋳型とし、RT-PCRによってNS遺伝子全長cDNAを増幅した。これを鋳型にPCRを行ってNS1cDNAを得、大腸菌発現ベクターpPROEX-1にクローニングした。NS1をヒスチジンタグ融合蛋白として発現させ、ニッケルカラムで精製後、これでBalb/cマウスを免疫した。ミエローマとしてSP2/O細胞を用い、抗NS1モノクローン抗体産生ハイブリドーマを得た。特異抗体産生細胞をBalb/cマウス腹腔内に接種して腹水を得、これをモノクローン抗体として用いた。

2) 抗H3HAモノクローン抗体

H3HA分子上の異なるエピトープを認識するモノクローン抗体を混合して用いた。

3) イムノPCR

インフルエンザウイルス感染鶏胎子の尿液あるいは実験感染マウスの鼻腔肺胞洗浄液をTritonX-100を含む緩衝液で処理後、96穴プレートに吸着させた。1%BSAでプレートをブロックし、モノクローン抗体を加えた。ビオチン標識抗マウスIgG抗体を加え、ストレプトアビジンを反応させた。これにビオチン標識したpUC19のHindIII/AccI断片を加え、pUC19断片DNAに特異的なプライマー対を加えてPCRを行った。DNA増幅産物はアガロースゲル電気泳動によって確認した。

C. 研究結果

1) イムノPCRの感度

インフルエンザAウイルスNS1あるいはH3HA抗原を検出するイムノPCRの感度を調べるため、ウイルス感染鶏胎子尿液($10^{7.9-3.0}$ PFU/ml)の10倍階段希釈列を作り試験に供した。その結果、NS1およびHA抗原は各々 $1:10^{5.0-6.0}$ および $1:10^{11.0-12.0}$ 希釈まで検出された。一方、RT-PCRによるウイルスゲノムの検出は $1:10^{4.0}$ 希釈までが陽性であった。

2) インフルエンザウイルス感染マウス鼻腔肺胞洗浄液中に含まれるウイルス抗原の検出

A/Aichi/2/68 (H3N2)を経鼻接種したマウスから継時的に鼻腔肺胞洗浄液を採取し、イムノPCR、RT-PCRおよびウイルス分離に供した。イムノPCRおよびRT-PCRでは各々NS1抗原およびウイルスゲノムを、ウイルス分離に先駆け検出した。イムノPCRの感度はRT-PCRのその $10^{3.0}$ 倍であった。また、HA抗原を検出するイムノPCRではNS1抗原の $10^{1.5}$ 倍の感度が得られた。

NS1 抗原を検出するイムノ PCR ではウイルス接種後 14 日まで抗原が検出され、RT-PCR では 7 日後まで NS 遺伝子が検出された。これに対し、感染性ウイルスはウイルス接種 4 日後には検出されなかった。

D. 考察

最近、インフルエンザ A ウイルスに共通な NP 抗原を酵素抗体法によって検出する Directigen が市販され、賞用されつつある。研究分担者等は以前、イムノ PCR によるウシヘルペスウイルス 1 感染の迅速高感度診断法を開発し、ウイルス抗原の検出では酵素抗体法の $10^{7.0}$ 倍の感度が得られることを示した。したがって、本研究で開発したインフルエンザ診断用イムノ PCR は Directigen よりも高感度にウイルス抗原を検出するものと予想される。さらに、イムノ PCR はサブタイプ特異的な HA 抗原の検出感度が極めて高い。

インフルエンザの病原診断としては RT-PCR も実施されている。本研究で開発した NS1 および

H3HA 抗原検出イムノ PCR は各々 RT-PCR の $10^{1.0-2.0}$ 倍および $10^{7.0-8.0}$ 倍の感度を示した。また、ウイルスを実験感染させたマウスの鼻腔肺胞洗浄液からは感染性ウイルスおよびウイルス遺伝子が検出されなくなった後も NS1 抗原が本法で検出された。

E. 結論

インフルエンザ A ウイルスの NS1 抗原および H3HA 抗原を高感度に検出するイムノ PCR を開発した。インフルエンザ A ウイルス間で抗原性が共通の NS1 を高感度に検出する本法は、新型ウイルスが出現した際の迅速診断に有用と考えられる。

F. 研究発表

1. Ozaki, H., Sugita, S., and Kida, H. (2001) A rapid and highly sensitive method for diagnosis of equine influenza by antigen detection using immuno-PCR. *Jpn. J. Vet. Res.* (in press)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担 研究報告書

インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼは増殖に必須か？

分担 研究者 河岡 義裕 東京大学医科学研究所教授

研究要旨 インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ(NA)活性を欠失させたミュータントウイルス(23 Δ NA)を NA を恒常的に発現する MDCK 細胞を用いて作出した。このウイルスを、シアリダーゼを加えた培地で徐々にその濃度を下げながら継代する事によって、外来シアリダーゼ非依存性に増殖可能なウイルス(CK2-29)を得た。この成績はインフルエンザウイルスの増殖において、NA の活性は必須でない事を示している。CK2-29 の MDCK および発育鶏卵における増殖能は低かったが、発育鶏卵で継代する事によって親株の 1/10 程度にまで回復した。これらの継代株では、ヘマグルチニンのレセプター結合領域に変異が認められ、シアル酸レセプターへの親和性が著しく低下していた。これらの成績は NA を欠損したウイルスは、HA のレセプター結合活性を低下させる事によって NA の働きを補い、増殖効率を上げる。

A. 研究目的

インフルエンザ A ウイルスは2種類の糖蛋白質、ヘマグルチニン(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)をもつ。HA は細胞表面に存在する糖鎖末端のシアル酸をレセプターとして認識し、これに結合する。一方、NA にはシアリダーゼ活性があり、シアル酸を糖鎖から切断する働きがある。この相反する働きをもつ2つの蛋白質の相互作用は、ウイルスの増殖過程で重要であると思われる。

本研究では、シアリダーゼ活性を欠損させた NA をもつミュータントウイルスを作出して増殖性を調べると共に、シアリダーゼ活性を欠損しているにもかかわらずウイルスが効率良く増殖できるような馴化に伴う変異を調べた。

B. 研究方法

A/ NWS/ 33 の HA および A/ tern/ Australia/ G70c/ 75 の NA をもつインフルエンザウイルス (NWS-G70c) を A/ duck/ Hong Kong/ 7/ 75 の NA を発現する MDCK 細胞を用いて、抗 NA 抗体存在下で 17 回継代した。それによって NA 遺伝

子の1部が欠損し、かつ翻訳領域内に終止コドンが挿入された結果、NA 蛋白質の N 末端のアミノ酸 30 個しか発現しないミュータントウイルス(23 Δ NA)を得た。

このウイルスをシアリダーゼを加えた培地で徐々にその濃度を下げながら継代する事によって、最終的に外来シアリダーゼ非依存性に増殖可能なウイルス(CK2-29)を得た。

CK2-29 を発育鶏卵で 17 回継代し、2種類の発育鶏卵馴化株(E17A および E17E)を得た。

CK2-29 を BALB/ c マウスの肺で 18 回継代してマウス継代株(M18B)を得た。

これらのウイルスの増殖性を MDCK 細胞、発育鶏卵およびマウスを用いて比較すると共に、ウイルスのシアル酸レセプターへの親和性を調べた。また、上述の馴化に伴って HA 蛋白質上に変異が起こるか否かを解析した。

C. 研究結果および考察

1. NA 欠損ミュータントウイルスの増殖能：まず、NWS-G70c、23 Δ NA、CK2-29、E17A、E17E および M18B の MDCK 細胞および発育鶏卵での増殖性を比較した。

親株 NWS-G70c は MDCK 細胞よりも、発育鶏卵でよく増殖したが、NA 欠損ウイルス 23 Δ NA では、発育鶏卵での増殖性は著しく低下していた。一方、23 Δ NA を親株とする馴化株 CK2-29、E17A、E17E では、発育鶏卵における増殖性が回復していた。

次に、CK2-29 のマウスにおける増殖性を調べるために、ウイルスをマウスの鼻腔内に接種して、肺のウイルス感染価を測定した。また、マウスの肺で継代することによる増殖性の変化を調べた。初回感染では、 4.6×10^4 PFU/g のウイルスが回収され、継代後も、 10^3 - 10^4 PFU/g のウイルスが回収された。しかし、マウスの肺で 18 回継代した M18B では、MDCK 細胞および発育鶏卵における増殖能は低下していた。

以上の成績は、インフルエンザウイルスの増殖において、NA は必須でない事を示している。しかし、NA の欠損は増殖効率を低下させる事も明らかになった。

2. NA 欠損ミュータントウイルスのレセプター結合特性：23 Δ NA を親株とし、NA 非依存性に増殖できるようになった MDCK 細胞馴化株(CK2-29)、発育鶏卵馴化株(E17A および E17E)、およびマウス継代株(M18B)のレセプター結合特性を調べた。最初にウイルス蛋白量当りの赤血球凝集活性を比較した結果、CK2-29、E17A、E17E および M18B のいずれも 23 Δ NA と比較して、凝集活性が顕著に低下していた。特に、E17E および M18B では、検出限界以下だった。

次に、これらのウイルスのレセプター結合活性をペルオキシダーゼ標識フェツインを用いた固相法で測定した。その結果、赤血球凝集試験の結果と同様に、CK2-29、E17A、E17E および M18B のレセプター結合活性は著しく低い事が明らかとなった。

3. NA 非依存性馴化株の HA に起こる変異：HA と NA は相反する機能を持つので、この2つの蛋白質はウイルス増殖過程において、絶妙な機能的バランスをとっていると考えられる。そこで、NA 欠損ウイルスが、

MDCK 細胞および発育鶏卵において NA 非依存性に増殖できるように馴化する過程で生じたレセプター結合活性の減少に伴う変異が HA 分子上に認められるか否かを調べた。

その結果、CK2-29、E17A、E17E および M18B のレセプター結合活性の減少は HA 分子上のレセプター結合領域に変異が起きた結果である事が明らかになった。

D. 結論

- ・ インフルエンザウイルスの増殖において、NA の活性は必須でない。
- ・ NA を欠損したウイルスは、HA のレセプター結合活性を低下させる事によって NA の働きを補い、増殖効率を上げる。

E. 研究発表

1. Hughes MT, McGregor M, Suzuki T, Suzuki Y, Kawaoka Y. Adaptation of influenza A viruses to cells expressing low levels of sialic acid leads to loss of neuraminidase activity. *J Virol* (in press)
2. Hughes MT, Matrosovich M, Rodgers ME, McGregor M, Kawaoka Y. (2000) Influenza A viruses lacking sialidase activity can undergo multiple cycles of replication in cell culture, eggs, or mice. *J Virol* 74, 5206-5212.
3. Mitnaul LJ, Matrosovich MN, Castrucci MR, Tuzikov AB, Bovin NV, Kobasa D, Kawaoka Y. (2000) Balanced Hemagglutinin and Neuraminidase Activities Are Critical for Efficient Replication of Influenza A Virus. *J Virol* 74, 6015-6020.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担 研究報告書

インフルエンザウイルスの宿主域とレセプター特異性

分担 研究者 河 岡 義 裕 東京大学医科学研究所教授

研究要旨 インフルエンザ A ウイルスは多くの動物に広く分布し流行を引き起こす。一般に分離されるウイルスは宿主特異性を持っているが、ウイルスの宿主域を決定する因子ははっきりと分かっていない。これまでに、N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) がガラクトースに $\alpha 2,3$ 結合したシアル酸レセプター (NeuAc $\alpha 2,3$ Gal) または $2,6$ 結合したシアル酸レセプター (NeuAc $\alpha 2,6$ Gal) が宿主域を左右する分子として重要視されてきた。一方、インフルエンザウイルスは NeuAc の他に N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) をもつ糖鎖レセプター (NeuGc $\alpha 2,3$ Gal) を認識する事も知られている。本研究では、シアル酸レセプター分子種の認識の違いがウイルスの宿主特異性にどのように関わっているかをウマおよびカモのウイルスについて解析した。ウマの呼吸器およびカモの腸管粘膜上皮細胞には NeuGc $\alpha 2,3$ Gal が存在した。ウマおよびカモのウイルスのレセプター結合活性を調べた結果、NeuGc $\alpha 2,3$ Gal を強く認識する事が分かった。さらに、ヒト分離株 A/Udorn/307/72 はウマの呼吸器およびカモの腸管では増殖しないが、その HA の 226 番目のアミノ酸をグルタミンに、228 番目のアミノ酸をグリシンに変異させた HA をもつリアソータントウイルスでは、NeuAc $\alpha 2,3$ Gal および NeuGc $\alpha 2,3$ Gal の両方のレセプターへの結合能を獲得する事によって、それらの動物で増殖できるようになる事が示唆された。これらの成績は NeuGc $\alpha 2,3$ Gal レセプターに対する親和性がウマの呼吸器およびカモの腸管におけるインフルエンザウイルスの増殖において重要である事を示唆している。

A. 研究目的

インフルエンザ A ウイルスはヒト、ウマ、ブタ、アザラシ、クジラ、トリ等多くの動物に広く分布し流行を引き起こす。一般にそれぞれウイルスは宿主特異性を持っているが、ウイルスの宿主域を決定する因子ははっきりと分かっていない。

全てのインフルエンザウイルスは細胞表面に存在する糖鎖末端のシアル酸をレセプターとして認識しこれに結合する。しかし、分離される動物種によって、ウイルスが認識する分子は異なっている。例えば、トリあるいはウマから分離されるウイルスは N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) がガラクトースに $\alpha 2,3$ 結合したシアル酸 (NeuAc $\alpha 2,3$ Gal) に高

親和性をもつものに対し、ヒトから分離されるウイルスは NeuAc がガラクトースに $\alpha 2,6$ 結合したシアル酸 (NeuAc $\alpha 2,6$ Gal) に対する親和性が高い。これらの事実はレセプター特異性がインフルエンザウイルスの宿主域を決定する因子として重要である事を示唆している。また、インフルエンザウイルスは NeuAc の他に N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) をもつ糖鎖レセプター (NeuGc $\alpha 2,3$ Gal) を認識する事も知られているが、インフルエンザウイルスの宿主特異性への関与は不明である。

本研究では、このシアル酸分子種の認識の違いがウイルスの宿主特異性にどのように関わっているかを解析した。

B. 研究方法

ウマ、ブタおよびニワトリの気管、カモの腸管の凍結切片を作成し、NeuAc α 2,6Gal または NeuAc α 2,3Gal を特異的に認識するレクチンを用いて蛍光染色した。同様のサンプルを NeuGc α 2,3Gal に対するニワトリ抗血清で染色した。

A/ Udorn/ 307/ 72(H3N2)、A/ mallard/ New York/ 6750/ 78(H2N2)、A/ teal/ Alberta/ 69/ 87(H1N4)、A/ mallard/ Alberta/ 58/ 89(H3N8)、A/ duck/ Ukraine/ 1/ 63 (H3N8)A/ duck/ Hokkaido/ 8/ 80、A/ mallard/ Alberta/ 24/ 92(H11N9)、A/ equine/ Kentucky/ 1/ 91(H3N8)、A/ equine/ Miami/ 1/ 63(H3N8)、A/ equine/ Fontainebleau/ 1/ 79(H3N8)、A/ equine/ Tennessee/ 5/ 86(H3N8)、A/ equine/ Prague/ 1/ 56(H7N7)、A/ equine/ London/ 1416/ 76(H7N7)、A/ LosAngels/ 2/ 87 (H3N2)、A/ Memphis/ 8/ 88(H3N2) および A/ Tottori/ 849/ 94(H3N2)の各種レセプターに対する親和性を薄層クロマトグラフィーを利用したウイルス結合試験 (TLC/ virus binding assay) で調べた。

インフルエンザウイルスに対する抗体陰性のポニーを用いて、感染実験を行った。鼻腔内にウイルス (10^7 EID₅₀)を噴霧して感染させた後、鼻汁スワブを毎日採取し、ウイルス感染価を測定した。

C. 研究結果および考察

1. ウマおよびブタの気管上皮細胞のレセプター：ウマおよびブタの気管を NeuAc α 2,6Gal または NeuAc α 2,3Gal を特異的に認識するレクチンで蛍光染色した結果、ブタの気管には NeuAc α 2,3Gal および NeuAc α 2,6Gal の両方が検出されたが、ウマの気管には NeuAc α 2,3Gal のみが認められた。また、ウマの気管上皮に含まれるシアル酸分子種をクロマトグラフィーで解析した結果 90%が NeuGc であった。

以上の成績によって、ウマの気管には NeuGc α 2,3Gal が優勢である事が示された。またこれは NeuGc α 2,3Gal に対する抗血清

を用いた蛍光抗体法によっても確認された。

2. ウマおよびヒト由来のウイルスのレセプター特異性：ウマのウイルスのレセプター結合活性を TLC/ virus binding assay よって調べた。A/ equine/ Kentucky/ 1/ 91、A/ equine/ Fontainebleau/ 1/ 79、A/ equine/ Tennessee/ 5/ 86(H3N8)A/ equine/ Prague/ 1/ 56、A/ equine/ London/ 1416/ 76 は NeuGc α 2,3Gal および NeuAc α 2,3Gal の両方に結合活性を示したのに対して、ヒトのウイルス、A/ LosAngels/ 2/ 87 (H3N2)、A/ Memphis/ 8/ 88(H3N2) および A/ Tottori/ 849/ 94(H3N2)は NeuAc α 2,6Gal にのみ強い結合活性を示した。一方、発育鶏卵で継代をくり返したウマのウイルス、A/ equine/ Miami/ 1/ 63(H3N8) では、NeuGc α 2,3Gal に対する結合活性は他のウマのウイルスと異なり著しく低かった。これらの成績はウマとヒトが保有するシアル酸の分子種の違いがインフルエンザウイルスの宿主特異性に関与している事を示唆する。

3. NeuGc α 2,3Gal の親和性とウマにおけるインフルエンザウイルスの増殖能：これまでの我々の成績から、A/ Udorn/ 307/ 72 の HA の 226 番目のアミノ酸がロイシンだと NeuAc α 2,6Gal に、グルタミンだと NeuAc α 2,3Gal に結合する事が分かっている。またさらに、228 番目のアミノ酸がセリンからグリシンに変異すると NeuAc α 2,3Gal および NeuGc α 2,3Gal の両方に結合する事が分かっている。そこで、226 番目のアミノ酸をグルタミンに置換し、さらに 228 番目のアミノ酸をグリシンに置換した A/ Udorn/ 307/ 72 のミュータント HA と、A/ equine/ Kentucky/ 1/ 91 とのリアソータントウイルスを作成し、ウマにおける増殖能を調べた。

その結果、A/ Udorn/ 307/ 72 の wild-type HA をもつウイルス、226 番目のアミノ酸にグルタミンに置換したウイルスは、殆どウマの呼吸器粘膜で増殖しなかったのに対して、226 番目のアミノ酸をグルタミン、さらに 228 番目のアミノ酸をグリシンに置換

した HA をもつウイルスでは、ウイルス感染後に $10^{2.7}$ - $10^{5.3}$ EID₅₀ のウイルスが検出された。

これらの成績は NeuGc α 2,3Gal レセプターに対する親和性がウマの呼吸器におけるインフルエンザウイルスの増殖において重要である事を示唆している。

4. カモの腸管上皮細胞のレセプター： これまでに我々はカモの腸管には NeuAc α 2,3Gal が優勢に存在し、NeuAc α 2,6Gal はほとんど存在しない事を明らかにした。本研究では、それに加えて、シアル酸分子種についても解析した。NeuGc α 2,3Gal に対する抗血清を用いてカモの腸管の凍結切片を免疫染色した結果、結腸陰窩の粘膜上皮細胞が陽性、盲腸および空腸では弱いながら陽性、十二指腸には検出されなかった。この成績は NeuGc α 2,3Gal はカモの下部腸管粘膜に多く存在する事を示しており、カモのウイルスが下部腸管でよく増殖するという事実との関連を示唆する。

5. カモ由来のウイルスのレセプター特異性： カモのウイルス、A/ mallard/ New York/ 6750/ 78、A/ teal/ Alberta/ 69/ 87、A/ mallard/ Alberta/ 58/ 89、A/ duck/ Ukraine/ 1/ 63、A/ duck/ Hokkaido/ 8/ 80、A/ mallard/ Alberta/ 24/ 92 のレセプター結合特異性を TLC/ virus binding assay で調べた結果、殆どのウイルスは NeuAc α 2,3Gal および NeuGc α 2,3Gal の両方を認識する事が明らかになった。一方、ウマのウイルスの場合と同様に、発育鶏卵で継代をくり返したウイルスでは、NeuGc α 2,3Gal に対する結合活性が低かった。

A/ Udorn/ 307/ 72 は、その HA がカモ由来であるのにも関わらず、カモの腸管では増殖しない。しかし、A/ Udorn/ 307/ 72 の HA の 226 番目のアミノ酸がグルタミンに、228 番目のアミノ酸がグリシンに変異すると増殖できるようになる事が知られている。

本研究によって、A/ Udorn/ 307/ 72 の HA の 226 番目と 228 番目のアミノ酸の変異が、NeuAc α 2,3Gal および NeuGc α 2,3Gal の

両方のレセプターへの結合能を獲得させ、カモの腸管で増殖する事ができるようになる事が示唆された。

D. 結論

- ・ インフルエンザウイルスのレセプター特異性を規定する因子として、シアル酸の結合様式の他に、シアル酸分子種も関わっている。
- ・ HA が認識するシアル酸分子種の違いはインフルエンザウイルスの宿主特異性と関係がある。

E. 研究発表

1. Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, Gambaryan A, Klimov A, Cox N, Castrucci M, Donatelli I, Kawaoka Y. (2000) Alterations of receptor-binding properties of H1, H2 and H3 avian influenza virus hemagglutinins upon introduction into mammals. *J Virol* 74, 8502-8512
2. Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland Jr, RE, Chambers TM, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y. (2000) Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol* 74, 11825-11831.
3. Ito T, Suzuki Y, Suzuki T, Takada A, Horimoto T, Wells K, Kida H, Otsuki K, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y. (2000) Recognition of N-glycolylneuraminic acid linked to galactose by the alpha2,3 linkage is associated with intestinal replication of influenza A virus in ducks. *J Virol*. 74: 9300-9305.