2. インフルエンザウイルスの生態： 新型コロナウイルスの出現機構とその予測

喜田 宏

北海道大学獣医学部

I. はじめに

人類はこれまで、数多くの伝染病を克服して来た。しかし、インフルエンザはその病原ウイルスの抗原性が変化する上に、新型コロナウイルスが出現するため、効果的な対策が確立されないまま、重要な伝染病として残されている。新型インフルエンザウイルスは世界規模の流行を惹き起こして社会に損失をもたらす上に、多数の人命を脅かす。新たな抗原亜型のヘマグルチニン (HA) をもつウイルスに対して、人々には免疫がなく、またそれまでの流行株で製造されたワクチンは無効である。すなわち、インフルエンザウイルスの HA は抗原変異の主役であり、感染防御の鍵である。もし、今後出現する新型コロナウイルスの HA 抗原亜型が予測できれば、迅速な対応が可能となり、インフルエンザの大流行を未然に防ぐことができる。

インフルエンザウイルスの遺伝子は8分節に分かれているので、遺伝的に異なるウイルスが同一宿主細胞に感染すると、高頻度に遺伝子分節の交換が起り、遺伝子再集合体が産生される。1918年、1957年および1968年にそれぞれ新型コロナウイルスとして登場したH1N1、H2N2およびH3N2株は何れも人や動物または鳥類のウイルスの間の遺伝子再集合体であると推定されている。このような遺伝子再集合がどこで起こり、遺伝子再集合体がどのように人に導入されたのであろうか？ これらが明らかになれば、今後出現し得る新型コロナウイルスを予測することが可能となる。

インフルエンザAウイルスは人、豚、馬および各種鳥類に分布し、さらに海豹、鯨およびミンクからも分離されている。特に鳥類からはすべてのHAおよびノイラミニダーゼ (NA) 抗原亜型 (それぞれH1-14およびN1-9) のインフルエンザAウイルスが得られており、その宿主域は各種の家禽、愛玩鳥および膨大な数の野鳥にわたる。なかでも鴨や雁などの水禽は最も高率にインフルエンザAウイルスを保有している。鴨はインフルエンザウイルスに高い感受性を有し、大腸上皮で増殖した多量のウイルスを糞便と共に排泄するが、不顕性感染で、抗体応答が弱い (Kida *et al.*, 1980)。従って、鴨の

渡りのシーズンには、鴨が集まる湖沼水中に多くの異なるインフルエンザウイルスが排泄されるので、水を介してさらに鴨の間にウイルスが伝播し、遺伝子再集合体が産生される。野生の鴨はこのように、自然界でインフルエンザウイルスの維持、運搬、散布を効率的に行なっており、インフルエンザAウイルス遺伝子の重要な *reservoir* である。

新型インフルエンザウイルスの出現機構を解明するには、まず、ウイルス遺伝子の供給源と考えられる鴨等の野生水禽の間でウイルスがどのように維持され、循環し、進化しているかを知る必要がある。次にそのウイルス遺伝子が人に導入される際の疫学的条件を明らかにする必要がある。私達は1968年に新型コロナウイルスとして出現したA/Hong Kong/68 (H3N2) のHA遺伝子について、その起源とこれが人に導入された経路を解明する目的で、インフルエンザウイルスの生態学的研究を行なった。

得られた成績から、A/Hong Kong/68 (H3N2) のHA遺伝子はその *reservoir* である鴨のウイルスから、南中国あるいは台湾の家鴨や鵞鳥および豚を介して人に導入されたとの結論を得た。次に、豚が豚または人のウイルスと鴨のウイルスの間の遺伝子再集合体を産生する“*mixing vessel*”の役割を演ずることを感染実験により実証した。さらに、今後の新型コロナウイルスの出現予測に資するため、異なるHA亜型 (H1-13) の鳥類インフルエンザウイルスに対する豚の感受性を検討した。以下にその成績の要旨を述べる。

II. 鴨におけるH3インフルエンザウイルスの 抗原性および遺伝子の保存

H3HA分子上の10の異なるエピトープに対するモノクローナル抗体のパネルを確立し、これを用いて鴨と人のH3インフルエンザウイルスの抗原性を解析した。人のH3ウイルスはその分離年を経るに従い、モノクローナル抗体との反応性を失ったことから、HAの抗原性が年々変異したことが確認された。一方、鴨のウイルスは分離年にかかわらず、A/Hong Kong/68と同じ抗原性を示したことから、HAの抗原性が極めてよく保存され

ていることが判明した。

次に、1977年から1985年の間に、シベリアまたはアラスカから北海道に飛来した鴨から分離された7株のH3ウイルスについて、HA遺伝子の塩基配列を決定した。成績から、6株のHA遺伝子はA/Hong Kong/68のそれと極めて近縁であり、高度に保存されていることが判明した。ウイルス株によって異なるアミノ酸はHA分子上で、抗原部位と無関係に分散していた。さらに、従来人のH3HA遺伝子の起源と考えられていたA/duck/Ukraine/63(H3N8)株よりはるかにA/Hong Kong/68に近縁なHAをもつウイルスが今もなお鴨の間で維持されていることが明らかとなった。また、鴨のウイルスのHA遺伝子の変異頻度は人のウイルスと比べ、非常に小さいことならびにアミノ酸置換の頻度はさらに小さく、silent mutationが相対的に多いことが判明した。これらの成績は鴨の間で、抗体による選択圧力がない環境でインフルエンザウイルスが受け継がれており、その遺伝子にはrandomなpoint mutationのみがわずかに蓄積されていることを示している(Kida *et al.*, 1987)。

さて、A/Hong Kong/68のHA遺伝子は鴨のウイルスからどのような経路で導入されたのであろうか？ HA分子頭部の細胞レセプターとの結合部位内のアミノ酸配列がレセプター特異性を左右し、宿主域を決定する重要な因子として考えられている。すなわち、HA1のアミノ酸配列226-228が人のH3ウイルスではすべてLeu-Ser-Serであり、鴨のH3ウイルスではGln-Ser-Glyである。異なる宿主、ことに鴨から人へのウイルス伝播にはこのレセプター特異性が関門となるであろう。もし、鴨と人のウイルスHA両者に対するレセプターを有する動物宿主が介在すれば、両ウイルスの遺伝子再集合は容易に産生されるであろう。

Ⅲ. 中国の豚から分離されたH3N2インフルエンザウイルスのHA遺伝子の起源

豚から分離されるH3N2ウイルスにはHAの抗原性がヒトの流行株と似ているものとA/Hong Kong/68と似ているものがある。従来、豚のH3N2ウイルスはすべて人から導入されたものと考えられていた。しかし、初期のH3ウイルスは抗原変異によって人の間から消え去って久しいにもかかわらず、豚からはA/Hong Kong/68と同じ抗原性のH3HAをもつウイルスが分離されている。従って、これらの豚H3N2ウイルスは少なくとも最近人から導入されたものではない。

1978年の冬に南中国で、また1982年の夏に台湾で豚から分離されたH3N2ウイルスそれぞれ1株および3株のHAについて、その起源を明らかにする目的で抗原性と遺伝子を解析した。

モノクローナル抗体パネルを用いた抗原解析から、これらの豚由来H3N2ウイルスのHAの抗原性はA/Hong Kong/68と近縁であり、これよりさらに1980年に北海道で渡り鴨から分離されたH3ウイルスのHAと近縁であることが明らかとなった。

次にこれら4株のHA遺伝子の塩基配列を決定した。台湾の豚から分離されたウイルス3株のHA遺伝子は何れもA/Hong Kong/68と非常に近縁であり、それよりさらに渡り鴨由来ウイルスA/duck/Hokkaido/8/80(H3N8)およびA/duck/Hokkaido/7/82(H3N8)と似ていることが判明した。台湾の豚由来ウイルス3株のHA1のアミノ酸226-228の配列は何れもGln-Ser-Glyで鴨のウイルスと同じであった。南中国の豚由来ウイルスHAのそれは人のH3HAと同じLeu-Ser-Serであった。従って豚の呼吸器上皮細胞は人および鴨のウイルスHAの何れに対するレセプターをも有するものと考えられる(Kida *et al.*, 1988)。

Ⅳ. 中国の家禽から分離されたH3インフルエンザウイルスのヘマグルチニンの解析

以上の研究成績から、A/Hong Kong/68インフルエンザウイルスのHA遺伝子は、渡り鴨の間で保存されているH3ウイルスに由来し、豚を介してH2N2ウイルスに導入されたものと考えられる。では鴨のウイルスはどのような経路で豚に伝播したのであろうか？

A/Hong Kong/68ウイルスの発生地と考えられる中国南部では、家鴨や鷺鳥などの家禽が豚と共に密に飼育されていることから、これらの家禽がH3ウイルスを豚に導入する役割を果たした可能性が考えられる。そこで、中国南部の家鴨および鷺鳥から分離されたH3ウイルスの抗原性を詳細に解析すると共にそのHA遺伝子の塩基配列を決定した。

モノクローナル抗体パネルによって抗原性を解析した6株の家禽由来H3インフルエンザウイルスのうち、3株のHAの抗原性は渡り鴨由来株、豚由来株およびA/Hong Kong/68と極めて近縁であることが明らかとなった。他の2株のHAの抗原性はこれらのウイルスと部分的に共通であり、残りの1株は全く異なる抗原性を示した。

家禽由来のウイルス4株のHA遺伝子の塩基配列およびHAのアミノ酸配列は互いに高い相同率を示した。その中でA/Hong Kong/7/75(H3N2)のHAは渡り鴨由来のA/duck/Hokkaido/8/80(H3N8)および台湾の豚由来H3N2ウイルス3株のHAと極めて近縁で、アミノ酸配列の相同率はそれぞれ98.7%および99.5%と驚くべき高い値を示した。

以上の成績は南中国で家鴨が渡り鳥由来のインフルエ

ンザウイルスを豚に導入する役割を果たしたことを示している (Yasuda *et al.*, 1991)。

V. 渡り鴨由来 H 3 インフルエンザウイルスの ヘマグルチニンに対する豚の感受性

A/Hong Kong/68 (H 3 N 2) インフルエンザウイルスの出現に際して、豚が果たした役割を実証し、今後出現し得る新型ウイルスの予測に資するため、鴨、豚および人由来インフルエンザ A ウイルスならびにこれらの遺伝子再集合体を豚に実験感染させた。

豚由来 H 3 N 2 および H 1 N 1 ウイルスならびに人由来 H 3 N 2 ウイルスは豚の呼吸器で増殖した。一方、鴨由来 H 3 N 8 ウイルスを単独で接種した豚ではウイルス増殖が認められなかった。鴨由来 H 3 N 8 ウイルスと豚由来 H 1 N 1 ウイルスを混合感染させた発育卵の尿液を接種した豚では、その鼻腔拭い液から H 3 N 8 および H 1 N 1 ウイルスが 5 日間回収された。予め豚由来 H 1 N 1 ウイルスに感染させた後 7 日目に上記尿液を接種した豚からは H 3 N 8 ウイルスのみが回収された。鴨由来 H 3 N 8 ウイルスと豚由来 H 1 N 1 ウイルスを混合して接種した豚からは H 3 N 8, H 1 N 1 および H 3 N 1 ウイルスが回収された。これらの豚から回収された H 3 N 8 ウイルスの多くはその遺伝子がすべて鴨のウイルスに由来しており、次に豚に接種しても増殖しなかった。回収された H 3 N 1 ウイルス 2 株の遺伝子構成は、1 株では NP と M 遺伝子が、他の 1 株では NP と NS 遺伝子が豚のウイルスに由来していた。これらの 2 株はいずれも豚の呼吸器で増殖し継代された。

以上の成績から、豚の呼吸器上皮は人のインフルエンザ A ウイルスばかりでなく、鴨の H 3 ウイルス HA にも感受性があることが明らかとなった。また、豚の呼吸器が鴨のウイルスと豚または人のウイルスの遺伝子再集合体を産生する場となることが実証された。

VI. 家鴨およびその他の鳥類由来インフルエンザ ウイルスの豚における増殖と抗体応答

これまで、鳥類から得られているインフルエンザウイルスの HA 抗原亜型は H 1-14 である。豚が H 1 および H 3 ウイルスに感受性を示すことは知られている。そこで、H 4-13 の鳥類インフルエンザウイルスおよび家鴨由来 H 3 および H 2 ウイルスに対する豚の感受性を検討した。すなわち、中国南部の家鴨から分離された H 3, H 4, H 5, H 6, H 7, H 9, H 10, H 11, H 12 および H 2 インフルエンザウイルスならびに七面鳥由来の H 8, 鴨由来の H 13 インフルエンザウイルスを 40-60 日齢の豚 2-4 頭の鼻腔内に滴下接種した。

家鴨由来の H 3 N 2 および H 3 N 6 ウイルス 6 株中 3 株が呼吸器で増殖した。ウイルス増殖を認めた豚の血清は高い ELISA 抗体価を示したが、ホモのウイルスの血球凝集を阻止しなかった。5 株の H 4 ウイルスのうち 4 株、4 株の H 5 ウイルス中 3 株、3 株の H 6 ウイルス中 1 株、4 株の H 7 ウイルス中 3 株、1 株の H 8 ウイルス、2 株の H 9 ウイルス両者、7 株の H 10 ウイルスすべて、2 株の H 11 ウイルス両者、1 株の H 12 ウイルス、1 株の H 13 ウイルスおよび 3 株の H 2 ウイルス中 1 株が豚の呼吸器で増殖した。

鳥類のみを宿主とすると考えられていた H 4-13 HA 亜型のインフルエンザウイルスに対して、豚が感受性を示したことは注目される。これらの鳥類由来ウイルスに感染し、鼻汁中にウイルスを排泄した豚の血清中には ELISA によって明らかな抗体応答が認められたが、ホモのウイルスの血球凝集を阻止しなかった。これまで、豚は H 1 および H 3 インフルエンザウイルスにのみ感染するものと考えられていたが、以上の成績はこれら以外の HA 亜型のウイルスも豚に導入され得ることを示している。また、血球凝集阻止試験による血清疫学成績が豚の間のウイルス分布を正確に示していないことが示唆された。

今後はインフルエンザウイルス遺伝子の供給源である水禽の間のウイルス分布をさらに明らかにし、豚におけるインフルエンザウイルスの疫学情報を得ることによって新型ウイルス出現の予測に資することができるであろう。

文 献

- 1) Kida, H., Yanagawa, R. and Matsuoka, Y. (1980). Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infect. Immun.* **30**, 547-553.
- 2) Kida, H., Kawaoka, Y., Naeve, C. W. and Webster, R. G. (1987). Antigenic and genetic conservation of H 3 influenza virus in wild ducks. *Virology* **159**, 109-119.
- 3) Kida, H., Shortridge, K. F. and Webster, R. G. (1988). Origin of the hemagglutinin gene of H 3 N 2 influenza viruses from pigs in China. *Virology* **162**, 160-166.
- 4) Yasuda, J., Shortridge, K. F., Shimizu, Y. and Kida, H. (1991). Molecular evidence for a role of domestic ducks in the introduction of avian H 3 influenza viruses to pigs in southern China, where the A/Hong Kong/68 (H 3 N 2) strain emerged. *J. Gen. Virol.* **72**, 2007-2010.