

—最近における動物衛生研究情報 (XIII)—

鶏卵培養による豚インフルエンザウイルスの
レセプター結合性の変化

竹前喜洋[†] 西藤岳彦 (動物衛生研究所ウイルス・疫学研究領域インフルエンザ研究員)



竹前喜洋

1 豚インフルエンザ

豚インフルエンザは、A型インフルエンザウイルスの感染により引き起こされる豚の急性呼吸器疾患である。豚インフルエンザウイルス (SIV) に感染した豚には、咳、消化不良、熱、意気消沈などが認められ、一週間程度で急速に回復する [1]。SIVは、養豚業に

被害をもたらす病原体の一つとして世界各地で広く認識されているが [1]、日本での認識はいまだに低いのが現状である。豚インフルエンザは、スペイン風邪が大流行していた1918年にアメリカの豚で初めて報告された [2]。現在なお世界各地の豚で循環しているスペイン風邪に由来するSIVは古典的豚H1亜型ウイルスと呼ばれる。豚の中では、主に3つの亜型、H1N1、H1N2、H3N2亜型が流行しているが、それらの遺伝的な成り立ちは地域性があり複雑である。A型インフルエンザウイルスは、8本のRNA遺伝子分節を持ち、由来の異なる2つ以上のウイルスの同一宿主へ同時感染により遺伝子の交雑が起こる。これは、遺伝子再集合と呼ばれ、新しい遺伝子の組み合わせを持ったインフルエンザウイルス産出のメカニズムである [3]。SIVの遺伝的背景は、人や鳥ウイルスの豚への侵入やそれらの遺伝子再集合や抗原変異によって複雑化している。

新型インフルエンザウイルスの出現には、豚でのインフルエンザウイルスの遺伝子再集合が重要な役割を果たしていると考えられてきた [3]。インフルエンザウイルス感染は、ウイルス粒子表面上の赤血球凝集素 (HA) タンパク質が宿主細胞膜に発現している糖タンパク質や糖脂質の糖鎖末端のシアル酸をレセプターとして結合することで開始する。鳥のインフルエンザウイルスは、ガラクトースに $\alpha 2,3$ 結合したシアル酸 (SA $\alpha 2,3$ Gal) を優先的に認識し、人の季節性インフルエンザウイルスは、 $\alpha 2,6$ 結合したシアル酸 (SA $\alpha 2,6$ Gal) を優先的に認識することが知られている。インフルエンザウイルス感染

の標的臓器である野鳥の上部気道や腸管にはSA $\alpha 2,3$ Gal、人の上部気道にはSA $\alpha 2,6$ Galがそれぞれ主要なシアル酸として発現している。一方、SIVの主な増殖の場である豚の気管や肺胞の上皮細胞には、SA $\alpha 2,3$ GalとSA $\alpha 2,6$ Galの両方が発現している [4]。そのため、豚は、人と鳥のインフルエンザウイルスの両方に感受性がある [5]。遺伝子再集合によりヒトウイルスと鳥ウイルスに由来する遺伝子の組み合わせを持ったSIVは、世界各国で豚から分離されている [1]。また、1957年のアジア風邪ウイルスや1968年の香港風邪ウイルスの出現に豚が関わっていた可能性が指摘されている。41年ぶりのインフルエンザパンデミックの原因となったパンデミック2009 (H1N1) ウイルスが、北アメリカで循環するSIVとユーラシア大陸で循環するSIVの遺伝子再集合体であったことから [6]、新型ウイルス産生に関わる豚の役割が再び注目されている。

2 豚インフルエンザウイルスのレセプター結合性

インフルエンザウイルスの分離と培養には、発育鶏卵または犬腎臓由来 (MDCK) 細胞が一般的に用いられている。1980年代にヒトウイルスを発育鶏卵で培養すると $\alpha 2,3$ 結合性の高いウイルスが分離されることが見出された [7]。この現象は、「エッグアダプテーション」と呼ばれ、HAタンパク質のレセプター結合部位のアミノ酸置換に起因することが分かっている。RNAウイルスであるインフルエンザウイルスは、RNAを複製する際に生じるエラーを修復する機能を持たないために、真核生物のDNA遺伝子よりも約200万倍の塩基置換率を示し、選択圧によるアミノ酸置換が起こりやすい [8]。発育鶏卵中のウイルス増殖の場であるしょう尿膜細胞表面には、SA $\alpha 2,3$ Galが豊富に発現している。そのため、 $\alpha 2-3$ 結合性の上昇したウイルスが選択的に増殖してくる。もう一方の分離基質であるMDCK細胞の表面には、 $\alpha 2-3$ 結合と $\alpha 2-6$ 結合の両方が発現しており [9]、ウイルス分離によるレセプター特異性の変化への影響は少ない。エッグアダプテーションによるレセプター結合性

[†] 連絡責任者：竹前喜洋 (動物衛生研究所ウイルス・疫学研究領域)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎・FAX 029-838-7760 E-mail : ntakemae@affrc.go.jp



図1 HAタンパク質の立体構造. 190番目と225番目のアミノ酸残基をスペースフィルで示し、レセプター結合部位を網掛けした.

の変化を避けるために、ヒトウイルスの分離にはMDCK細胞、鳥ウイルスの分離には発育鶏卵が主に利用されている。ヒトウイルスと異なりSIVのエッグアダプテーションに関する研究はほとんどない。そのため、SIVの分離には、発育鶏卵とMDCK細胞の両方が利用されているのが現状である。本稿では、豚臨床検体からのSIV分離におけるウイルス分離基質の違いがレセプター結合性に与える影響について報告する。

タイ国におけるSIV疫学調査で得た鼻腔ぬぐい液と日本で咳と高熱を示した豚の肺組織をMDCK細胞または鶏卵に接種し、SIVを分離した（タイ株：A/swine/Ratchaburi/NIAH101942/2008 (H1N1)、日本株：A/swine/Tochigi/1/2008 (H1N2)）。HA遺伝子の塩基配列の解読によって、MDCK細胞で分離したウイルスはタイ株と日本株ともに、臨床検体内に存在しているウイルスと同一のHA遺伝子配列を保持していることが明らかとなった。一方、鶏卵で分離・培養したタイ株ではHAタンパク質の190番目のアミノ酸がアスパラギン酸(D)からバリン(V)又はアスパラギン(N)に、日本株鶏卵分離ウイルスでは225番目がアスパラギン酸(D)からグリシン(G)に置換されていた。これらのアミノ酸残基は、HAタンパク質のレセプター結合部位に位置していることが分かっている(図1) [10]。

MDCK分離ウイルスと鶏卵分離ウイルスのレセプター結合性を、 $\alpha 2,3$ 又は $\alpha 2,6$ 結合したシアル酸ポリマーを用いたレセプター特異性試験により調べた。MDCKで分離したウイルスは、 $\alpha 2,6$ 結合した糖鎖に対する結合性は、 $\alpha 2,3$ 結合に対するそれより有意に高かった

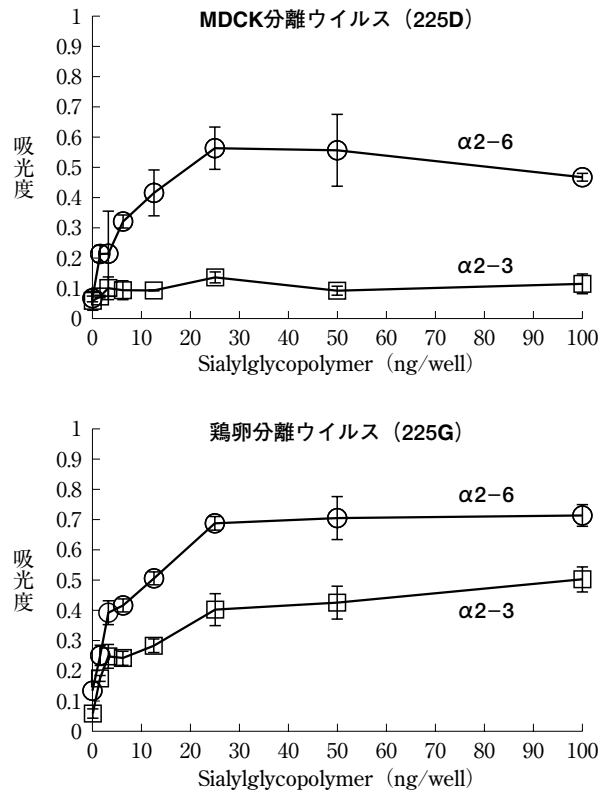


図2 日本株におけるシアル酸ポリマーを用いたレセプター特異性試験. MDCK分離ウイルスと鶏卵分離ウイルスのSA $\alpha 2,3$ Gal又はSA $\alpha 2,6$ Galに対する親和性を示す.

(図2; $P < 0.05$)。一方で、鶏卵で分離されたウイルスは、MDCK分離ウイルスに比べて高い $\alpha 2,3$ 結合性を示していた(図2)。MDCK分離ウイルスと鶏卵分離ウイルスを用いて異なる動物種に対する赤血球凝集反応(HA活性)を行うとともに、各血球表面に発現しているシアル酸結合様式をSA $\alpha 2,3$ Gal又はSA $\alpha 2,6$ Galに特異的に結合するレクチンを用いたフローサイトメトリー解析により解析した(表1)。HAタンパク質の225番目のアミノ酸がDからGに置換した日本株の鶏卵分離ウイルスは、鶏血球に対するHA活性が増加していた。一方で、190番目のアミノ酸がDからVまたはNに置換したタイ株の鶏卵分離ウイルスとMDCK分離ウイルス間には、鶏血球に対するHA活性の違いは見られなかった。鶏血球の表面には、SA $\alpha 2,3$ GalがSA $\alpha 2,6$ Galよりも多く発現していることが示された。マウスと羊の赤血球表面には、SA $\alpha 2,3$ Galの発現だけが確認され、SA $\alpha 2,6$ Galは確認されなかった。これらの赤血球に対しては、両株のMDCK分離ウイルスは、凝集を起こさなかったが、鶏卵分離ウイルスでは凝集活性が認められた。ウサギ血球は、SA $\alpha 2,6$ Galのみが確認された。両株のMDCK分離ウイルスは、凝集活性を示したが、鶏卵分離ウイルスはウサギ血球を凝集しなかった。

表1 MDCK細胞又は鶏卵分離ウイルスのHA活性と各動物由来の赤血球のシアル酸結合様式

	赤血球種			
	鶏	マウス	羊	ウサギ
タイ株				
MDCK分離ウイルス (190D)	32	<1	<1	256
鶏卵分離ウイルス1 (190D→V)	32	32	16	<1
鶏卵分離ウイルス2 (190D→N)	32	32	16	<1
日本株				
MDCK分離ウイルス (225D)	4	<1	<1	8
鶏卵分離ウイルス (225D→G)	32	2	4	<1
シアル酸の結合様式	a 2,3 > a 2,6	a 2,3	a 2,3	a 2,6

3 おわりに

本実験から、SIVを鶏卵で分離することによりHAタンパク質のレセプター結合部位のアミノ酸置換が起こり、レセプター結合性が変化することが明らかになった。このことは、SIVの分離にはMDCK細胞を用いることが望ましいことを示している。1997年の高病原性H5N1亜型鳥インフルエンザウイルスによる人感染事例以降、インフルエンザウイルスの種間伝播に対する関心が高まっている。SIVの人感染事例 [11, 12] に加え、中国やインドネシアにおける高病原性H5N1亜型鳥インフルエンザウイルスの豚感染も問題視されている [13]。また、人での感染拡大に伴い、パンデミック2009 (H1N1) ウイルスは2011年8月現在までに22カ国/地域の豚から分離されている。こうした状況の中、パンデミック2009 (H1N1) ウイルスと季節性インフルエンザウイルスとの遺伝子再集合体の発生の可能性も無視でき

ない [14]。ウイルスのレセプター特異性は、人での伝播性を決める重要な因子の一つである。本稿で述べたとおり、ウイルスのレセプター結合性の変化は、HAタンパク質のたった一つのアミノ酸置換で起こる。生体内で増殖しているウイルスのレセプター特異性を正しく解析するためには、そのウイルスを分離した基質が大きく影響することを念頭に置く必要がある。

参考文献

- [1] Easterday BC, Van Leeth K Swine influenza in Diseases of Swine BE Straw, et al eds 277h290 (1999)
- [2] Koen JS : Am J Vet Med 4, 468h470 (1919)
- [3] Webster R, Bean W, Gorman O, et al. : Microbiol Rev, 56, 152h179 (1992)
- [4] Sriwilaijaroen N, Kondo S, Yagi H, et al. : PLoS ONE, 6, e16302 (2011)
- [5] Kida H, Ito T, Yasuda J, et al. : J Gen Vir 75, 2183h 2188 (1994)
- [6] Novel Swine Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team : N Engl J Med 60, 2605h2615 (2009)
- [7] Komadina N, Roque V, Thawatsupha P, et al. : Virus Genes, 35, 161h165 (2007)
- [8] Hayashida H, Toh H, Kikuno R, et al. : Mol Biol Evol, 2, 289h303 (1985)
- [9] Ito T, Suzuki Y, Takada A, et al. : J Vir 71, 3357h 3362 (1997)
- [10] Gambaryan AS, Robertson JS, Matrosovich MN : Virology, 258 (2), 232h239 (1999)
- [11] Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, et al. : N Engl J Med, NEJMoa0903812 (2009)
- [12] Myers KP, Olsen CW, Gray GC : Clin Infect Dis 44, 1084h1088 (2007)
- [13] Takano R, Nidom C, Kiso M, et al. : Arch Virol 154, 677h681 (2009)
- [14] Octaviani CP, Li C, Noda T, et al. : Virus Res 156, 147h150 (2011)