

ヒトへの感染力の強い高病原性鳥インフルエンザウイルスの変異シグナル簡易監視材料の開発と次期パンデミック阻止-2

鈴木康夫*

Development of a Device to Survey Human Adaptation of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses and its Application to Control of the Influenza Pandemic-2

Yasuo Suzuki*

Abstract: A new technologies are required for rapid surveillance of the current highly pathogenic H5N1 avian influenza A circulations to survey the potential for adaptation of the virus to the human type receptor, an important step in the emergence of pandemic influenza virus strains. Hemagglutinins (HAs) from avian and human viruses are characterized by their preference for $\alpha 2-3$ (Avian type receptor: Neu5Ac $\alpha 2-3$ Gal $\beta 1-$) and $\alpha 2-6$ -linked *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) (Human type receptor: Neu5Ac $\alpha 2-6$ Gal $\beta 1-$), respectively. Owing to the species-specific nature of the interaction between the virus and host glycans, attention has focused on novel immunochromatography technologies that can rapidly assess virus receptor specificity with high sensitivity and the potential emergence of human type receptor-adapted H5N1 viruses. We have developed an advanced prototype of immunochromatography-based device to differentiate H5N1 viruses that bind to avian- and human-type receptors. This procedure enables us high-sensitivity detection of sialo-glycan binding of avian and human influenza viruses (4HAU-128 HAU). This technology allows investigation and surveillance of mutated avian influenza viruses that acquired the adaptation to the human type receptors (Neu5Ac $\alpha 2-6$ Gal $\beta 1-$) on single strip to which different receptor sialo glycan structures can be coupled.

Keywords : *Highly pathogenic avian influenza virus, Receptor, Human adaptation*

1. はじめに

A 型インフルエンザは世界で最も広く分布する人獣共通感染症の一つといえる。2009 年、ブタを起源とする A 型インフルエンザウイルス (H1N1 亜型) (以後、2009pandemicH1N1 と略記) は、ヒト世界で大流行を起こした。これまでにインフルエンザの世界的大流行は、少なくとも 4 回おきている。すなわち、スペインインフルエンザ (1918 年)、アジア風邪 (1957 年)、ホンコン風邪 (1968 年) および 2009 年ブタ由来新型インフルエンザである。インフルエンザウイルスの自然宿主は、カモなどの野生水鳥である。

これまでのインフルエンザの世界的大流行は、いずれも、自然界で、鳥インフルエンザウイルスが陸棲の家禽、ブタなどの中間宿主に伝播し、そこで安定した流行を繰り返す間にヒトへの適応性および病

* 生命健康科学部・理学療法学科・教授

原性を獲得したものである。1997年にホンコンで発生した高病原性A型鳥インフルエンザウイルス（H5N1亜型、以後H5N1と略記）は、その後、世界63を超える国のニワトリを殺し、さらに、世界15カ国でヒトへの伝播を果たしている。世界におけるH5N1感染者は615人、うち364人が死亡（WHO, 2013年2月1日）しており、ヒトに対する病原性も極めて高い。本ウイルスは幸いなことに、ヒト世界での流行は、未だ極めて限定的である。筆者らは、インフルエンザウイルスの宿主域は、ウイルスヘマグルチニン（HA）が認識する強敵宿主細胞膜上のシアロ糖鎖受容体への結合性により、第一義的に規定されることを見だしてきた。即ち、鳥間で流行しているウイルスのHAは鳥型レセプター「Neu5Ac(N-アセチルノイラミン酸) α 2-3Gal(ガラクトース) β 1-, (α 2-3)と略」と特異的に結合し、ヒト間で流行するウイルスは、ヒトの上気道に存在するヒト型レセプター「Neu5Ac α 2-6Gal β 1-, (α 2-6)と略」と特異的に結合することを発見、高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）の哺乳動物間（ヒトインフルエンザウイルス感染モデル動物であるフェレット間）飛沫感染可能な変異は、HA分子内の複数のアミノ酸置換によるヒト型レセプターへの結合性獲得が深く関わることを見だした¹⁾。

本研究は、次期パンデミックを起こす高い可能性が指摘されている高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1のヒト型レセプターへの結合性獲得を、簡便かつ高感度に監視するデバイスの開発を目的としている。昨年度までに、イムノクロマトを原理とする監視デバイスのプロトタイプを開発した。本年度において、このデバイスをさらにより優れたウイルス抗体およびアビジン-ビオチンシステムの導入により高感度化を達成した。さらに、本学には高病原性鳥インフルエンザウイルスを扱えるBSL3施設がないため、それを持つ大阪大学微生物病研究所との共同研究により、実際にエジプトで分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1株を用いてその実用性を評価した結果、4HAU-128HAUのウイルス量で、鳥およびヒトインフルエンザウイルス、さらに鳥インフルエンザウイルスがヒト型レセプターへの結合性を獲得した変異株²⁾を15分以内で識別できることを確認した。

2. 研究計画と実験方法

2.1. イムノクロマトグラフィーを原理とする鳥およびヒト型レセプター結合性インフルエンザウイルスの検出デバイスの構築

ウイルス遺伝子や抗原性の解析では感知できないH5N1の鳥→ヒト宿主域の変異（変異のフェノタイプ：すなわち、新型インフルエンザウイルス発生に伴うレセプター認識特異性変異）を高感度に且つ簡便に監視できるデバイスを構築した。すなわち、化学合成したウイルスの疑似レセプターシアロ糖鎖（ヒト型：Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-；鳥型：Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-）をビーズ担体（ヒト型レセプター糖鎖を赤色ビーズに、鳥型レセプター糖鎖を青色ビーズに結合させた）に結合させ、これに被検ウイルスを結合させ、そのウイルスをH5N1抗体（C-179）とヒト型、鳥型糖鎖を特異的に識別・結合できるレクチンを塗布したストリップ上に展開し、ヒト型、鳥型レセプター結合性H5N1を特異的に識別、検出するデバイスを構築した（図1）。

Device 構成 (2: テストストリップ)

テストストリップ(断面図)

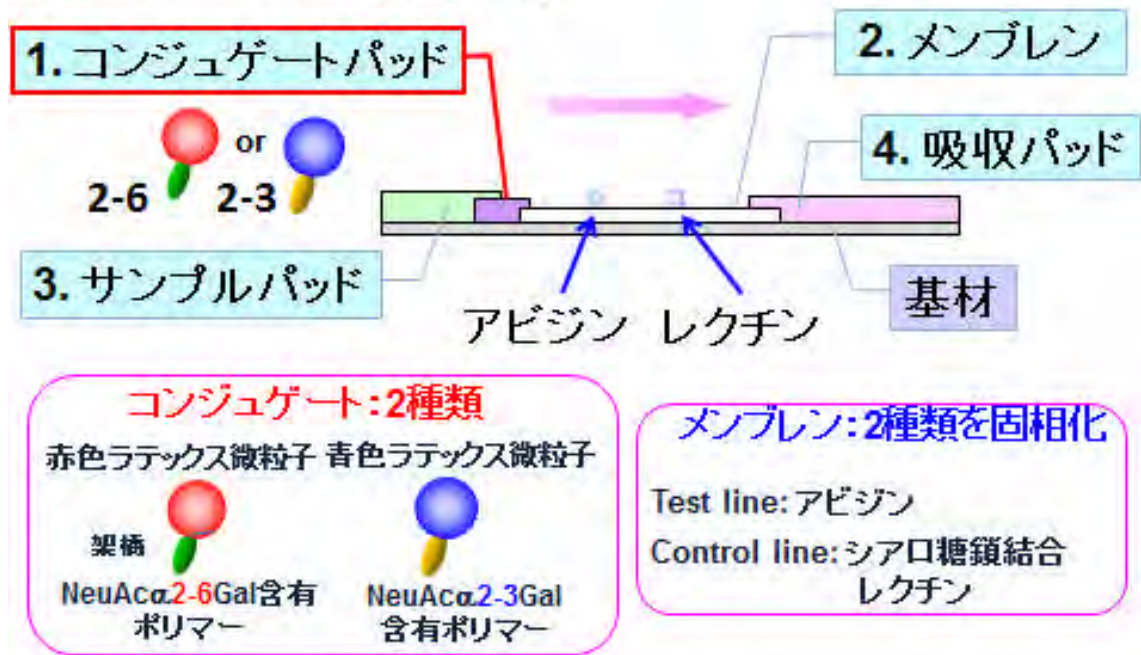


図1 イムノクロマトグラフィーを原理とする鳥およびヒト型レセプター結合性インフルエンザウイルスの検出デバイスの構築

3. 研究成果

3.1. 高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) およびそのヒト型適応変異ウイルスを簡便かつ高感度に識別できるイムノクロマトグラフィーの原理を応用したアッセイデバイスの構築と操作

具体的には、ラテックスポリマー（ビーズ）に H5N1 のレセプターシアロ糖鎖 (Neu5Ac α 2-3Gal) （青色ビーズに結合させる） または、ヒト間で流行するインフルエンザウイルス（高病原性鳥インフルエンザウイルスが変異してヒト-ヒト感染可能となったウイルス）のレセプターシアロ糖鎖 (Neu5Ac α 2-6Gal) （赤色ビーズに結合）を結合させ、それをあらかじめ、H5N1 被検ウイルスと反応させる。この時、高病原性鳥インフルエンザウイルスは青色ビーズに結合し、ヒト型レセプター結合性を獲得した変異ウイルスは赤色ビーズへ結合する。それをイムノクロマトの担体（ストリップ）上で毛管現象により展開し、あらかじめストリップ上に塗布した H5 の抗体（C-179 が最も感度が良いことを見いだした）により、ウイルスと結合したビーズを補足する。これにより、被検ウイルスがヒト型のレセプターへ結合する変異体であった場合は、赤色ビーズが補足され、赤色のバンドがイムノクロマトストリップ上に現れる。バンドが青色であれば、鳥レセプターを認識するウイルスであることが目視できる。H5 ウイルスでなく、季節性のインフルエンザウイルス（H1N1 や H3N2 亜型）の場合は、抗体と反応しないのでバンドは現れない。また、反応が問題無く進んでいるか否かは、対照においたレクチンとの反応性を調べることによりモニターする。以上の原理に基づくイムノクロマトグラフィーデバイスを構築できた。操作概念を図2に示す。

判定方法

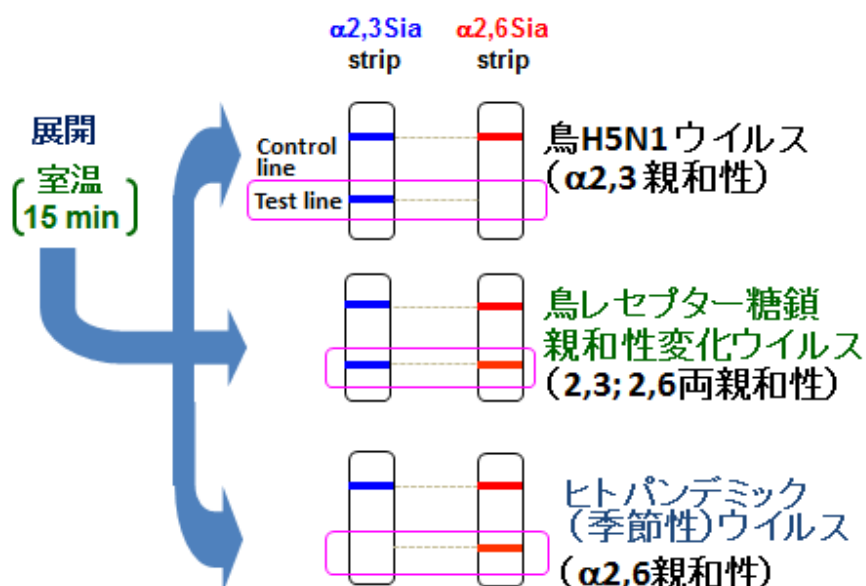


図2 イムノクロマトグラフィーを原理とする鳥およびヒト型レセプター結合性インフルエンザウイルスの検出デバイスの操作概念図。

3.2. エジプトで分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) (ニワトリ分離株, 鳥型レセプター結合性), そのヒト型レセプター結合性獲得変異株 (鳥およびヒト型レセプター結合性) およびヒト間伝播する2009年パンデミックヒトインフルエンザウイルス (H1N1) (ヒト型レセプター結合性)の本デバイスによる識別

本デバイスが, 実際に屋外で分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) (鳥型レセプターのみへ結合), そのヒト型レセプター結合性獲得変異株 (鳥およびヒト型両レセプター結合性, 我々が大阪大, 微研と共同でエジプトで分離された H5N1 から見いだした²⁾), およびヒト間伝播する 2009 年パンデミックヒトインフルエンザウイルス (H1N1) (ヒト型レセプターのみへ結合性)を識別できるのかを検証した. 用いたウイルス株は, エジプトのニワトリから分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) (α2-3 結合性), 野生カモから分離された低病原性の鳥インフルエンザウイルス (H5N3) (α2-3 結合性), エジプトのニワトリから分離された高病原性ヒト型レセプター結合性獲得変異株 (H5N1) (α2-3 および α2-6 結合性), 2009 年パンデミックインフルエンザウイルス (H1N1) (α2-6 結合性)である. 上記, 4 種類のウイルスの鳥およびヒト型レセプター結合特異性を本デバイスにより調べた. その結果, これまでの ELISA による検出結果と一致したパターンが得られることが判明した (図3). すなわち, 鳥間で流行している高および低病原性インフルエンザウイルス (H5N1, H5N3)は鳥型レセプター (α2-3) へ結合し, ヒト間で流行しているインフルエンザウイルス (2009 年パンデミックウイルス, H1N1) はヒト型レセプター (α2-6) へ, そして, ヒト型レセプターへの結合性を獲得した変異高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) (鳥型レセプター α2-3, ヒト型レセプター α2-6 の両レセプターへ結合)は, 実際に両者へ結合してことが明らかとなった. また, この結合性を目視で捉えるためのウイルス量は 4-128HAU で良いことも明らかとなった. このウイルス濃度は, ウイルス分離のために, 屋外で採集された鳥の糞あるいはヒト喉ぬぐい液を, 1 度, MDCK 細胞で培養することにより得られるものであり, 実際に高病原性鳥インフルエンザウイルスが発生している現場でも実用化が可能であることも示唆された.

結果

判定結果のまとめ
ELISAによる検出パターンと一致していた。



図3 高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）（ニワトリ分離株，鳥型レセプター， $\alpha 2-3$ 結合性），そのヒト型レセプター結合性獲得変異株（鳥およびヒト型レセプター結合性， $\alpha 2-3$ ， $2-6$ 結合性）およびヒト間伝播する 2009 年パンデミックヒトインフルエンザウイルス（H1N1）（ヒト型レセプター， $\alpha 2-6$ 結合性）の本デバイスによる識別。

4. 総括および今後の展望

本研究により構築されたヒトへの感染力の強い（ヒト型レセプターシアロ糖鎖への結合性を獲得した）高病原性インフルエンザウイルスの変異シグナル簡易監視材料は，次の特徴を持つことが判明した。即ち，1）実際に屋外で分離される高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）のヒト型レセプター結合性変異を高感度（4HAU-128HAU）で検出・監視できるデバイスである。すなわち，鳥インフルエンザウイルス（鳥型レセプター， $\alpha 2-3$ へ結合），ヒトインフルエンザウイルス（ヒト型レセプター， $\alpha 2-6$ へ結合），鳥インフルエンザウイルスが変異してヒト適応性（ヒト型レセプターへの結合性）を獲得したウイルス（鳥およびヒト型レセプターの両者， $\alpha 2-3$ ， $\alpha 2-6$ 結合性）の3種を高感度（4-128HAUのウイルス量で良い）に識別できる。2）軽量（5グラム），操作は簡便なので持ち運び可能。3）検出は赤色，青色の目視検出なので，高価な器機を必要とせず，発展途上の高病原性鳥インフルエンザウイルス発生国でも実用可能。4）全操作が15分間で完了するため迅速監視が出来る，など多くの特徴をもつ。

今後は，エジプト，インドネシア，ベトナムなど，高病原性鳥インフルエンザウイルスの発生頻度が高い国で，このデバイスを用いた鳥ウイルスのヒトへの適応性変異を監視する連携体制を構築していく。現在，関係国の大学，国家機関と連携調整を始めている。これにより，これまで不可能であった，高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト適応変異を地球規模で監視する連携システムを構築していく。本デバイスの構築は，世界初であると同時に，遺伝子，抗原変異による監視のみであった高病原性鳥インフルエンザウイルスの変異監視を，これまで不可能であった鳥インフルエンザウイルスの受容体結合変異，すなわち，ヒトへの適応性変異の監視まで可能とするものであり，技術的，社会的意義が高いものであると思われる。

謝辞

本研究は中部大学総合工学研究所 平成 23 年度～24 年度の第 4 部門の援助を受け遂行されたものであり、ここに謝意を表します。

成果発表

本研究成果の一部は、第 61 回日本ウイルス学会学術集会³⁾ および 2nd Negative Strand Virus-Japan Symposium on Okinawa で口頭発表した⁴⁾。

参考文献

- 1) Imai, M., Watanabe, T., Hatta, M., Das, S.C., Ozawa, M., Shinya, K., Zhong, G., Hanson, A., Katsura, H., Watanabe, S., Li, C., Kawakami, E., Yamada, S., Kiso, M., Suzuki, Y., Maher, E.A., Neumann, G., Kawaoka, Y.: Experimental adaptation of an influenza H5 haemagglutinin confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*, 486 (7403) 420-428 (2012).
- 2) Yohei Watanabe, Madiha S. Ibrahim, Hany F. Ellakany, Norihito Kawashita, Rika Mizuike, Hiroaki Hiramatsu, Nongluk Sriwilaijaroen, Tatsuya Takagi, Yasuo Suzuki and Kazuyoshi Ikuta: Acquisition of Human-Type Receptor Binding Specificity by New H5N1 Influenza Virus Sublineages during Their Emergence in Birds in Egypt. *PLoS Pathogens*, 7, issue 5, e-1002068 (2011).
- 3) 渡邊洋平, 伊東哲男, Madiha S. Ibrahim, Hany F. Ellakany, #Sriwilaijaroen, N., #平松宏明, 林 司, 高橋忠伸, 鈴木 隆, 生田和良, 鈴木康夫: 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト型レセプター結合性変異監視デバイス 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, グランキューブ大阪 (大阪国際会議場) (2012 年 11 月).
- 4) 鈴木康夫, 渡邊洋平, 伊東哲男, Madiha S. Ibrahim, Hany F. Ellakany, Nongluk Sriwilaijaroen, 平松宏明, 林 司, 高橋忠伸, 鈴木 隆, 生田和良: エジプトにおけるヒト型レセプター結合性高病原性 H5N1 およびヒト型レセプター結合変異を監視するデバイスの開発 2nd Negative Strand Virus-Japan Symposium on Okinawa (ラグナガーデンホテル) (2013 年 1 月) .