

# 赤血球凝集素に変異を加えた H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスが ほ乳類への感染性を獲得した画期的な河岡義裕教授らの論文について — デュアルユースが懸念された事例 —

平成 24 年 5 月 24 日受付

大 槻 公 一<sup>1,2,3,4)</sup>

高 桑 弘 樹<sup>1,3)</sup>

井 上 瑞 江<sup>1)</sup>

常 國 良 太<sup>1)</sup>

藪 田 淑 子<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 京都産業大学鳥インフルエンザ研究センター

<sup>2)</sup> 京都産業大学先端科学技術研究所

<sup>3)</sup> 京都産業大学総合生命科学部

<sup>4)</sup> 鳥取大学農学部附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター

## 1. はじめに

2011 年 8 月 18 日付けで、東京大学医科学研究所教授で米国ウイスコンシン大学獣医学部教授を勤める河岡義裕氏の研究グループが、世界を代表する科学雑誌 Nature に投稿した、鳥インフルエンザウイルスの赤血球凝集素 (HA) に変異を加えることにより、鳥インフルエンザウイルスが人の新型インフルエンザウイルスになる可能性が出てくる事を実験的に示唆した画期的な論文に「注文」がつき、掲載が遅れた。

2011 年 12 月 20 日に、米国の Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (アメリカ疾病予防管理センター等いくつかの和名が用いられている。) から、この論文を公表するには論文の一部削除が必要であるというクレームがついた。この論文に書かれている手法を用いれば、製造および使用が禁止されているはずの生物兵器あるいはバイオテロ等の犯罪に使われる道具が作られてしまう事が懸念されたのである。河岡教授たち世界の関係する研究者は討議を行ない、この種の研究を 60 日間停止して、CDC からの注文にどのように対応するのか検討する旨声明を 2012 年 1 月 20 日に出した。一方、国連の世界保健機構 (World Health Organization; WHO) も、研究者によるこの種の懸念を払拭させる条件が出されるまでは、論文の全面公開の見送りを 2012 年 2 月 17 日に勧告した。研究の自由と規制に関する論議が多く場でなされた。デュ

アルユースというこれまであまり関心が示されなかった用語も急に注目されるようになった。

河岡教授たちの払った多大な努力により、2012年3月30日に米国のCDCも、論文の趣旨を理解して全面公開に同意した。その結果、2012年5月3日付けで、論文名“Experimental adaptation for an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets”という河岡教授たちの大きな仕事が、Natureに掲載されるに至った。

この論文の主要な箇所を概略紹介して、本論文の意義及び近い将来出現する可能性のある新型インフルエンザウイルスの候補株との関連性について考察する。

## 2. 論文の概略

長い間、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスが何らかの変異を起こして、次の新型インフルエンザウイルスになる、そのウイルスの出現する地域も東南もしくは南アジアまたは中国と予想されてきた。ところが、2009年春に出現した新型インフルエンザウイルスは予想と異なるブタ由来のH1N1 亜型であり、アジアではなくメキシコ、アメリカで最初に検出された。しかも、人に対して顕著な病原性を示す事例は少なく、2012年4月に厚生労働省は、このウイルス感染によるインフルエンザを、新型インフルエンザから通常の季節性インフルエンザの呼称に変えた。

そこで、再びH5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスの存在に関心が持たれるようになった。しかし、東南アジア等で分離されるH5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスは、鳥類に強い感染力を示すものの、人に対する感染力が極めて弱い、典型的な鳥インフルエンザウイルスのままである。

河岡らは、人及びほとんどの種類のほ乳類の呼吸器粘膜細胞表面に存在するインフルエンザウイルスに対するレセプター、すなわちガラクトースに $\alpha$  2,6結合しているシアル酸を選択的に認識する変異を導入したH5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスの赤血球凝集素(HA)を、新型インフルエンザウイルスと呼ばれたH1N1 2009に組み込んだ遺伝子再集合体を作成した。これまで野外から分離されたH5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス株のほとんどすべては、鳥類の呼吸器粘膜細胞表面に存在するレセプター、すなわちガラクトースに $\alpha$  2,3結合しているシアル酸を主に認識する。

河岡らは、氏らが作成した遺伝子再集合体は、小型の肉食性のほ乳類であるフェレットの呼吸器に容易に感染することができ、狭い実験環境下において経過を見たところ、感染させたフェレットから感染させていない同居させただけの別のフェレットにも感染する事を実験的に見いだした。すなわち、レセプターとして鳥類に認められるガラクトースに $\alpha$  2,3結合しているシアル酸を主に認識して、人には感染する事が困難な鳥インフルエンザウイルスも、ウイルスが宿主に感染する時に最も都合の良いHAが用意されれば、人から人へ容易に感染する人インフル

エンザウイルスに変わる可能性のあることを初めて証明したのである。

ただし、この実験では、A型及びB型インフルエンザウイルスが有する8本の遺伝子（PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS）のうち、宿主域、病原性に深く関与して、宿主細胞への感染時に重要な役割を果たすHAを発現するHA遺伝子だけがH5亜型鳥インフルエンザウイルス由来であり、残りの7本の遺伝子は人由来のH1N1 2009ウイルスが用いられている。このHAは鳥類ではなく2004年ベトナムで人から分離されたH5N1亜型鳥インフルエンザウイルスに由来する。さらに、このHAは、感染を受ける細胞側に存在するレセプターに吸着する部位に3か所、ウイルス粒子表面に存在するエンベロープと細胞質膜の融合に関与する部位にも1か所に人インフルエンザウイルスと同じアミノ酸に置き換えられている。

今回作成した鳥型のHAを持つインフルエンザウイルスが、ほ乳類であるフェレット間での感染を起こす事を、世界で初めて実験的に成功したことは画期的な成果である。しかし、HAが人の呼吸器粘膜上のレセプターを認識できるような変異を起こした純粋なH5N1鳥インフルエンザウイルス、すなわち、8本の遺伝子すべてが鳥インフルエンザ型のウイルスが自然界で出現しても、その鳥インフルエンザウイルスが、人から人へ容易に感染できるか否かは分からないと河岡らは述べている。すなわち、HAのみならず、残りの7本の遺伝子も人への感染に何らかの役割を果たしている可能性は否定できず、更に詳細な実験が必要であると河岡らは考察している。

### 3. 実験の概要

図1は2012年5月2日付けでNatureに掲載された論文の最初のページのコピーである。

図2に今回H5N1亜型鳥インフルエンザウイルスとして用いられた、ヒトから分離されたA/Vietnam/1203/2004(H5N1)株のHAを3次元構造で表している。細胞レセプターに吸着するHAの頭部(a)及び全体(b)を示している。図2—aに示すように、実験前に226番目のグルタミンをロイシンに置き換える事により人型ウイルスのレセプターに対する親和性を高め(Q226L: 図では青色で表示)、224番目のアスパラギンをリジンに置き換える事により人型ウイルスのレセプターに対する粘着力を高め(N224K: 図では緑色で表示)、さらには158番目のアスパラギンをアスパラギン酸に置き換える事により、細胞での増殖性とフェレットからフェレットへの感染力を高めてあった(N158D: 図では赤色で表示)。以上の3か所のアミノ酸置換が重要であった。図2—bに示したが、細胞質膜との融合機能を示す部位である318番目のスレオニンをイソロイシンに置き換える事により、フェレット間におけるウイルス伝達がより活発になった。

以上4か所のHAのアミノ酸に変異を加えたH5N1ウイルスとH1N1 2009ウイルスの遺伝子再集合体を含むあらかじめ作成した各種遺伝子再集合体及び親ウイルスのフェレットへの感染実験がなされた。各ウイルスにつき6または12匹のフェレットが用いられた。そのうちの半数

のフェレットにウイルスが  $10^6$  TCID<sub>50</sub> 宛点鼻接種された。残りのフェレットにはウイルスを接種せず同居させた。その結果、図3に示されているように、人由来の H1N1 2009 (CA04) ウイルスは、同居フェレットに高率に感染し、フェレット間のウイルス伝達が認められた (図3—a)。一方、4か所のアミノ酸を置き換えたウイルス (N158D/N224K/Q226L/T318I) も H1N1 2009 (CA04) 程ではないが、フェレット間で高頻度のウイルスの同居感染が成立している (図3—e)。すなわち、鳥型の HA を持ったインフルエンザウイルスがほ乳類のフェレット間で空気あるいは飛沫感染が起きることを実験的に初めて成功させたのである。

しかし、変異を起こさせていない H5N1 親ウイルスの HA 遺伝子を組み込んだ H1N1 2009 ウイルスはフェレット間でのウイルス伝達を起こさず (図3—b)、2か所のアミノ酸置換を施した N224K/Q226K ウイルスの場合や1か所のアミノ酸置換を施した T318I ウイルスでも同居感染は成立していない (図3—c, f)。以上から、H5 亜型鳥ウイルスの HA に4か所のアミノ酸置換を施さねば、フェレット間でのウイルスの呼吸器感染は起きないことも明らかになった。

ウイルス接種あるいは同居フェレットの免疫応答 (血中抗体産生) の状況も調べられている。鶏赤血球凝集抑制試験 (HI 試験) で抗体産生状況が調べられている。採血はウイルス接種後14及び20日目に実施されている。

その成績は表1の示す通りである。接種実験に用いたすべてのウイルス株は、直接接種したフェレット全例に抗体を産生させた。同居感染が成立してフェレット間でのウイルス伝達の認められたウイルスでは、同居感染を受けたフェレットで抗体は産生されたが、抗体価にはばらつきが認められた。一方、同居感染を起こさなかった HA 遺伝子に変異が加えられていないウイルス及び細胞融合機能にのみ変異の加えられた (T318I) ウイルスの接種を受けたフェレットの抗体価は、低いまま経過した。逆に、同居感染を起こさなかったウイルス (N224K/Q226L) 接種フェレットの抗体価は高かった。

河岡らは、本研究を通して、感染実験に用いたフェレットで死亡した事例を認めていない。4か所の置換を施した H5 ウイルスの HA 遺伝子を挿入した H1N1 2009 ウイルスは、ほ乳類であるフェレットに対する感染力を増したが、病原性を増すことはなかった。氏は、実験に供したフェレットの鼻腔粘膜について病理組織学的及び免疫組織学的にも検討を加えている。同居によりウイルスの感染を受けたフェレットで認められた病変がより強く、検出されたウイルス抗原も多かったという成績を得ている。

#### 4. 論文の評価

1996年 H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスが中国南部に出現して以来、すでに16年を経過した。ウイルスは莫大な数の家きん類に感染して大きな被害を及ぼし続けている。現在、アジアのみならずヨーロッパ、アフリカにもウイルス感染は拡大している。人にも少なからぬ被

害を及ぼしている。2012年3月29日現在、分かっているだけでも、15か国で598名の患者と352名の死者が出たと報ぜられている。しかし、このウイルスは変異を起こし続けているが、それでも依然として鳥型のウイルスであり、人への感染力は極めて弱い。

2009年4月までは次の新型インフルエンザウイルスは、人に高度に馴化したH5N1亜型鳥インフルエンザウイルスがなると長らく考えられてきた。2009年に出現したH1N1 2009ウイルスは、ブタ由来であり、しかも20世紀初頭以来長い間人に感染し続けてきたH1N1亜型のHAを持つためと思われるが、人類に対する脅威は著しく低いまま現在に至っている。

河岡らの研究でユニークな点は、いまだに東南アジアあるいは南アジアの家きん類で猛威を振るい続け、それらの地域に定着した可能性のあるH5亜型鳥ウイルスに着目したことが先ずあげられる。多くの研究者は現在でもH5N1ウイルスが何らかの変異を起こして、次の新型インフルエンザウイルスとなる可能性が高いと考えている。実際に、おびただしい数のH5N1亜型ウイルスが現在でも鳥類等から分離され続けているが、いまだに人から人へ容易に感染するパンデミックを引き起こす可能性のあるウイルス株は見つかっていない。

H5N1ウイルスとして鳥類から分離された株ではなく、人に感染したウイルス株、すなわち人の体内を通過した鳥インフルエンザウイルスを、今回の実験に用いたことも注目される。このウイルスは、人に感染したことによって、いずれかの遺伝子に変異を起こして僅かでも人に感染しやすい性質を獲得した可能性がある。

しかし、細胞に感染する時にもっとも重要な役割を果たすHAに実験の中心をおき、細胞側のウイルスに対するレセプターに付着する主要な部位 (locus) を慎重に選択して、人インフルエンザウイルスのそれと置換したことが最も大きな特徴であろう。

HAを人由来のH1N1 2009ウイルスに導入したウイルスを用いたことも注目される。H1N1 2009ウイルスの場合と異なり、H5N1亜型の親ウイルスのHA遺伝子に置き換えたH1N1 2009ウイルスでは、フェレットからフェレットへのウイルス伝達がまったく起こらず、HA遺伝子にどのような変異が生ずれば、フェレットに対する感染性に変化が起きるのか容易に分かる非常に勝れた実験系を構築している。

また、ブタ由来のH1N1 2009ウイルスは、2009年4月に出現して以来瞬く間にアジア全域にも拡散して定着した。アジア全域での養豚産業は極めて盛んで、日本以外のアジアの国々の農村地帯のいたるところで多くのブタが飼育されている。人との距離も非常に近い。中国南部で飼育されているブタの多くがH5N1ウイルスに対する抗体を保有していることが知られている。ブタからもまれにH5N1ウイルスの分離されることも知られている。中国、東南アジア、南アジアでブタを介して、H5N1ウイルスとH1N1 2009ウイルスとの遺伝子再集合体が作られる可能性は決して低くない。したがって、今回作られたようなウイルスがこれらの地域で出現する可能性のあることも考慮しておく必要がある。その意味においても、H1N1 2009ウイルスを実験に供した事には大きな意義がある。

感染実験にフェレットを用いたことも、勝れた実験成績を得ることに役立っていたのではないか。フェレットがほ乳類の中でも鳥インフルエンザウイルスに感染しやすい動物のひとつであることは、以前から知られ多くの鳥インフルエンザウイルスの感染実験に用いられてきた。したがって、フェレットで得られたような成績が他の種のは乳類を使用した実験でも得られるか否かは、現時点では分からないが、鳥インフルエンザウイルス感染に対して高い感受性を持つフェレットを用いた事は極めて妥当であろう。人の感染を想定した動物種を含む多くの種類の動物を用いる実験が今後必要になろう。

河岡らの研究から、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスは今後とも、厳重な警戒を要することが鮮明になった。今回実験的に作出された変異を持つウイルスが自然界で出現する可能性があるからである。しかし、今回の実験結果が、直ちに次の新型インフルエンザウイルスにつながると結論付けるのは早計である。今回作成されたウイルスがパンデミックを起こすインフルエンザウイルスになり得るか否か更に詳細な検討が必要であろう。したがって、本論文が直ちに生物兵器に使用されたりすることは、考え難い。

H5N1 ウイルスは出現以来 16 年経過した。しかし、いまだ鳥インフルエンザウイルスから人インフルエンザウイルスは出現していない。そのようなウイルスが人に強い感染力を獲得するためには、未知のファクターが必要なかもしれない。

#### 4. 終わりに

河岡らの Nature への投稿論文から、デュアルユースという聞き慣れない用語が出てきて、種々取りざたされた。インフルエンザ防疫対策の発展という人類の幸福のためになされている研究成果が、バイオテロあるいは生物兵器に悪用される問題である。バイオテロあるいは生物兵器に使われることは不可能ではなく、歴史的に見ても実例は少なくない。最近でも、2001 年のアメリカでの炭疽菌事件、オウム真理教による炭疽菌窃盗未遂事件など通常の健康な生活を脅かす犯罪が起きており、デュアルユースは決して軽視できない社会問題である。

現在考えられているように、国際的な学会等の研究者団体による自己規制、バイオテロを阻止する仕組みの構築、あるいは研究の相互監視等研究の妥当性、安全性を証明する方法の確立は必須である。研究者各個人による徹底した病原体等の管理及びその方法の確立などが大原則であるが。しかしながら、最終的には研究者それぞれの倫理観の確立によらねばならないであろう。今回起きた問題を契機に、各研究者は、実施している研究の目的を常に明らかにする努力を払う必要がある。

Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets : Nature : Nature Publishing Group 12/05/14 12:19

nature.com Sitemap Login Register

Research Letters Article

NATURE | LETTER OPEN

## Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets

Masaki Imai, Tokiko Watanabe, Masato Hatta, Subash C. Das, Makoto Ozawa, Kyoko Shinya, Gongxun Zhong, Anthony Hanson, Hiroaki Katsura, Shinji Watanabe, Chengjun Li, Eiryo Kawakami, Shinya Yamada, Maki Kiso, Yasuo Suzuki, Eileen A. Maher, Gabriele Neumann & Yoshihiro Kawaoka

Nature (2012) doi:10.1038/nature10831  
Received 18 August 2011 Accepted 09 March 2012 Published online 02 May 2012

**Highly pathogenic avian H5N1 influenza A viruses occasionally infect humans, but currently do not transmit efficiently among humans. The viral haemagglutinin (HA) protein is a known host-range determinant as it mediates virus binding to host-specific cellular receptors<sup>1,2,3</sup>. Here we assess the molecular changes in HA that would allow a virus possessing subtype H5 HA to be transmissible among mammals. We identified a reassortant H5 HA/H1N1 virus—comprising H5 HA (from an H5N1 virus) with four mutations and the remaining seven gene segments from a 2009 pandemic H1N1 virus—that was capable of droplet transmission in a ferret model. The transmissible H5 reassortant virus preferentially recognized human-type receptors, replicated efficiently in ferrets, caused lung lesions and weight loss, but was not highly pathogenic and did not cause mortality. These results indicate that H5 HA can convert to an HA that supports efficient viral transmission in mammals; however, we do not know whether the four mutations in the H5 HA identified here would render a wholly avian H5N1 virus transmissible. The genetic origin of the remaining seven viral gene segments may also critically contribute to transmissibility in mammals. Nevertheless, as H5N1 viruses continue to evolve and infect humans, receptor-binding variants of H5N1 viruses with pandemic potential, including avian–human reassortant viruses as tested here, may emerge. Our findings emphasize the need to prepare for potential pandemics caused by influenza viruses possessing H5 HA, and will help individuals conducting surveillance in regions with circulating H5N1 viruses to recognize key residues that predict the pandemic potential of isolates, which will inform the development, production and distribution of effective countermeasures.**

### Main

Main Methods References Acknowledgements Author information Supplementary information Comments

Although H5N1 viruses continue to cause outbreaks in poultry and there are cases of human infection in Indonesia, Vietnam, Egypt and elsewhere ([http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/H5N1\\_cumulative\\_table\\_archives/en/index.html](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/index.html)), they have not acquired the ability to cause human-to-human transmission. Investment in H5N1 vaccines has therefore been questioned. However, because humans lack immunity to influenza viruses possessing an H5 HA, the emergence of

<http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature10831.html> 1/27 ページ

図 1. Nature に掲載された論文の最初のページ

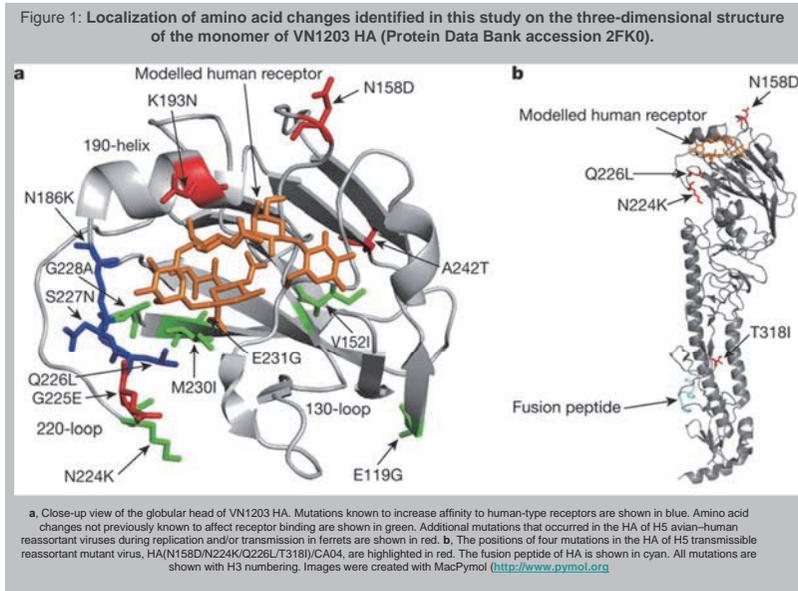


図 2. H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスの HA 三次元構造におけるアミノ酸変換の表示. a は HA 三次元構造における細胞側のレセプターと付着する部位のアミノ酸変換の表示. b は HA 全体の三次元構造.

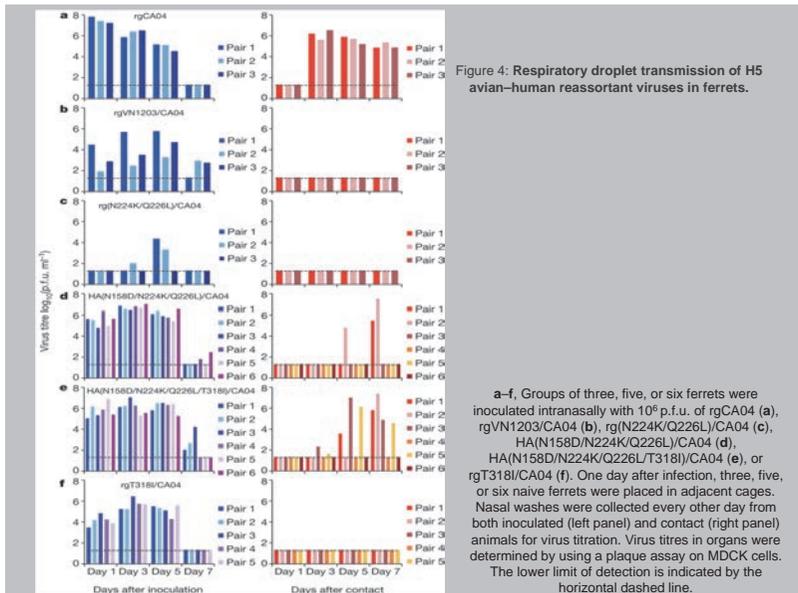


図 3. フェレットの点鼻感染した場合の同居感染が成立するかどうかの検討. a は新型インフルエンザウイルス H1N1 2009 株; b は H5N1 親ウイルス株; c は H5N1 親ウイルスの HA に 2 か所のアミノ酸置換を施したウイルス; d は H5N1 親ウイルスの HA に 3 か所のアミノ酸置換を施したウイルス; e は H5N1 親ウイルスの HA に 4 か所のアミノ酸置換を施したウイルス; f は H5N1 親ウイルスの HA に 1 か所のアミノ酸置換を施したウイルスの場合.

**Table 1: Transmission in ferrets inoculated with H5 avian–human reassortant viruses**

Virus	Inoculated ferrets			Contact ferrets	
	Weight loss (%) <sup>*</sup>	Peak virus titre in nasal wash (mean log <sub>10</sub> (p.f.u. ml <sup>-1</sup> )) (days after inoculation)	Seroconversion (positive and total numbers) (HI titre) <sup>†</sup>	Virus detection in nasal wash (positive and total numbers)	Seroconversion (positive and total numbers) (HI titre)
rgCA04	3 of 3 (15.1)	7.5 (1)	3 of 3 (≥1,280, ≥1,280, ≥1,280)	3 of 3	3 of 3 (≥1,280, ≥1,280, ≥1,280)
rgVN1203/CA04	3 of 3 (5.9)	5.3 (5)	3 of 3 (80, 40, 80)	0 of 3	0 of 3 (<10, <10, <10)
rg(N224K/Q226L)/CA04	2 of 3 (7.8) <sup>‡</sup>	3.9 (5)	3 of 3 (≥1,280, ≥1,280, ≥1,280)	0 of 3	0 of 3 (<10, <10, <10)
HA(N158D/N224K/Q226L)/CA04	6 of 6 (5.7)	6.7 (3)	6 of 6 (640, ≥1,280, ≥1,280, 640, ≥1,280, ≥1,280)	2 of 6	5 of 6 (160, 320, 20, 160, 40, <10)
HA(N158D/N224K/Q226L/T318I)/CA04	6 of 6 (9.8)	6.1 (5)	6 of 6 (≥1,280, ≥1,280, 640, ≥1,280, ≥1,280, ≥1,280)	4 of 6	6 of 6 (640, 640, ≥1,280, 80, ≥1,280, 320)
rgT318I/CA04	3 of 5 (1.5) <sup>§</sup>	5.6 (3)	5 of 5 (40, 20, 20, 40, 40)	0 of 5	0 of 5 (<10, <10, <10, <10, <10)

<sup>\*</sup> Maximum percentage weight loss is shown.

<sup>†</sup> Haemagglutination inhibition (HI) assays were carried out with homologous virus and turkey red blood cells.

<sup>‡</sup> One animal did not lose any body weight.

<sup>§</sup> Two animals did not lose any body weight.

表 1. 感染実験に用いたフェレットにおける抗体産生.

