

“侏羅紀公園”病毒版—1918 西班牙流感病毒再現

李文珍

長庚兒童醫院 兒童感染科

西元 1918-1919 年，造成近五千萬人死亡的 1918 西班牙流感病毒，已經由美國馬里蘭州的陸軍傳染病研究所及亞特蘭大的疾病管制局等研究團隊，自一名 1918 年 11 月死亡軍人的肺部組織複製出當年流感病毒的 RNA，利用反轉基因學的技術(reverse genetics)轉成 DNA，並完成八段基因的定序，重組出活的 1918 流感病毒來，結果發現 1918 流感病毒果然擁有驚人的致病力。以 1918 流感病毒感染人類肺臟細胞，一天後的病毒即增量到野生株 Tx/91 的 50 倍；感染 1918 流感病毒的小鼠，第二天即有 13% 的體重減輕；感染四天之後的小鼠肺部的病毒量，1918 流感病毒可大量增殖到野生株 Tx/91 的 39,000 倍；且感染 1918 流感病毒的小鼠，全數在六天之內死亡。1918 流感病毒的基因解碼，帶來更多的憂慮及爭議，因為其強大的致病特性，足可用來製造散播力超強的生物戰武器。但更積極的意義則是，為了解碼流感病毒與宿主間的謎團，期待預防及治療疫病的新發展。

狂掃全球的 1918 西班牙流感病毒

西元 1918-1919 年間，流行性感冒病毒在全球大流行，造成近五千萬人死亡。當時正逢第一次世界大戰，流感病毒在軍隊中流傳，並且造成洲際間的散佈。據估計，美軍官兵的折損，十之有四染上世紀病毒-1918 西班牙流感病毒而致死的。這次全球性大流行的結果，約有 30% 的人口因此殞滅。可怕的是，在 15-34 歲的青壯族群中，發生史所未見的高致死率，使得當時美國人的平均壽命，減少十年。這樣的流行規模，是後來 1957 及 1968 年的流感病毒疫情所望塵莫及的。2003 年底至今(2006 年 1 月)，造成 148 人確定感染，79 人死亡的 H5N1 禽流感病毒，是否會造成第二個世紀疫病？答案有待病毒學者解出更多的基因密碼。

自阿拉斯加凍原甦醒

美國馬里蘭州的陸軍傳染病研究所 Taubenberger 的研究團隊，為了解答上一世紀的世紀病毒之謎，將一名在 1918 年 11 月不幸染上流感病毒死亡的士兵掘出，解剖遺體並從其肺部組織複製出當年的病毒 RNA，利用反轉基因學技術(reverse genetics)轉成 DNA，再重組成 1918 流感病毒(以下簡稱 1918 流感病毒)八段基因的序列。他們將這些病毒 DNA 送進腎細胞而成功複製出活的 1918 流感病毒，並且進一步完成動物實驗，結果發現 1918 流感病毒果然擁有驚人的致病力。

重組 1918 流感病毒的病理特點

一般流感病毒在呼吸系統的病理發現，主要集中在支氣管及細支氣管黏膜上皮細胞的變性及壞死。感染 1918 流感病毒死亡者的肺部組織切片，則可見急性局部的細支氣管炎症及肺泡炎，並合併廣泛性的肺水腫。此

外也有表現瀰漫性的肺出血、繼發性細菌性肺炎，造成肺泡架構的完全破壞。感染 1918 流感病毒死亡者的其他器官，包括腦部，並未發現有感染的跡象。

Tumpey 等人，將 A/WSN/33(H1N1) 流感病毒的(hemagglutinin; HA)及(neuraminidase; NA)基因置換為 1918 病毒(1918 HA/NA:WSN)、WSN 病毒的 HA 及 NA 基因置換為 A/New Caledonia/20/99(H1N1) 流感病毒(NC HA/NA:WSN)及野生株 WSN 病毒，分別感染小鼠，看病理變化及肺組織的 expression cDNA microarray。WSN 病毒對於小鼠的致病力強，所以看到 1918 HA/NA:WSN 及野生株 WSN 病毒，均使小鼠肺部產生中重度的壞死性支氣管炎及明顯的肺泡炎性浸潤；感染 NC HA/NA:WSN 病毒的小鼠肺部，則僅有輕度的壞死性支氣管炎及輕微肺泡炎。同樣的，前兩種病毒也造成 T 細胞和巨噬細胞活化相關基因(如 TNF- α)、細胞凋亡和組織傷害及氧化壓力相關基因的大量表現；這是感染 NC HA/NA:WSN 病毒所未見的情況。這樣的結果，說明 1918 流感病毒的 HA 及 NA 基因，與肺部的嚴重病理變化，有著重要的相關性。

Taubenberger 等則重組了 Tx/91 HA: 1918 (將 A/Texas/36/91(H1N1) 的 HA 與 1918 流感病毒其它七段基因重組)、1918 HA/NA:Tx/91(將 A/Texas/36/91 的 HA 及 NA 基因與 1918 流感病毒的置換)、1918 NA:Tx/91(將 A/Texas/36/91 的 NA 基因與 1918 流感病毒的置換)、1918 HA/NA/M/NP/NS:Tx/91(1918 流感病毒 HA、NA、M、NP、NS 基因與 A/Texas/36/91 的三個 polymerase gene-PA、PB1、PB2 重組)及 1918 流感病毒的實驗。

首先，在 MDCK 細胞株的病毒溶菌斑數分析(plaque assay)，可發現 1918 HA/NA:Tx/91、1918 NA:Tx/91、1918 流感病毒可以不藉 trypsin 幫助，而感染細胞。這表示 1918 流感病毒的 HA 切位(cleavage site)，並不具有一段 basic amino acids (而高致病性 H5、H7 則具有)；1918 流感病毒 NA 基因 amino acid 146 位置未如 WSN 病毒有突變，所以可以幫助 HA 感染細胞。也就是說，1918 流感病毒的高感染力，可能是 NA 切斷 HA 的鍵結，以助病毒與細胞膜上的受體結合。

以小鼠為感染模型的實驗，則有更驚人的結果：感染 1918 流感病毒的小鼠，第二天即有 13% 的體重減輕；感染野生株 Tx/91 的小鼠，則僅暫時減輕一點體重，但很快回升。感染四天之後的小鼠肺部的病毒量，1918 流感病毒可大量增殖到野生株 Tx/91 的 39,000 倍；Tx/91 HA: 1918 流感病毒與 1918 HA/NA/M/NP/NS:Tx/91 的致病力也較野生株 Tx/91 強，病毒量為 100-1000 倍之多。所有感染 1918 流感病毒的小鼠，在六天之內均死亡；感染 1918 HA/NA/M/NP/NS:Tx/91 者，也全數活不過八日；然而，感染野生株 Tx/91 及 Tx/91 HA: 1918 者，則全數存活。感染 1918 流感病毒的小鼠肺部，可見嚴重的肺泡炎、壞死性細支氣管炎、肺泡內充滿中性球及出血的狀況；感染 1918 HA/NA/M/NP/NS:Tx/91 的小鼠肺部炎症反應，較感染 1918 流感病毒者稍輕，但仍明顯可見肺泡有中量發炎浸潤；Tx/91 HA: 1918 病毒感染者的肺部，則只有輕微支氣管周圍發炎及少許肺泡炎；感染野生株 Tx/91 的肺部切片，則幾乎正常。

以上實驗的結論可知，1918 流感病毒具有比人流感 Tx/91 更超強的感染力、繁殖力，以及致病力。重組病毒的結果，可推測，1918 流感病毒的 HA 及 polymerase genes 在毒性上，扮演最重要的角色。

此外，在抗藥性的研究中，oseltamivir 及 amantadine 分別可抑制帶有 1918 流感病毒 NA 及 M 基因的重組病毒。

1918 流感病毒的起落

流感病毒不斷的累積突變，找機會進行基因重組的最大原因，可回歸到達爾文的物競天擇定律，亦即爲了適應新的物種，傳遞遺傳的訊息。流感病毒的 polymerase genes(PA、PB1、PB2)，參與重要的病毒複製過程，與宿主的互動極多，所以被認爲是宿主專一性的重要基因。經過基因圖譜及演化樹的分析，發現 1918 流感病毒的 polymerase 基因，與禽流感病毒間僅有少數氨基酸的差異，也就是說 1918 流感病毒極可能是禽流感病毒。PB1 的功能是 RNA-dependent RNA polymerase，其在禽流感病毒演化史中，變動很少；而禽流感病毒 PB1 的轉錄效力，又較其它病毒爲高。這告訴我們，保留禽流感病毒 PB1 的高效力，將提供能力去適應新的宿主。不但 1918 流感病毒的大流行可證實這點，被證實是禽流感病毒與人流感病毒重組的 1957 及 1968 年的全球疫病，也支持這個結論。1918 流感病毒，是禽流感病毒在演化過程中得以適應人體的結果。這個世紀傳出感染人類的 H5N1 及 H7N7 禽流感病毒的部份氨基酸訊息與 1918 流感病毒相同；這些遺傳訊息，可能代表禽流感病毒獲得適應人體的能力，也與其高致病力有密切相關。這也是病毒學家所應致力釐清，以研究出預防下一波全球流感大流行的方向。

參考文獻

1. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, et al: Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005;310:77-80.
2. Anonymous. The 1918 flu virus is resurrected. *Nature* 2005;437:794-5.
3. Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Taubenberger JK, et al: Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:3166-171.
4. Kash JC, Basler CF, Garcia-Sastre A, et al: Global host immune response: pathogenesis and transcriptional profiling of type A influenza viruses expressing the hemagglutinin and neuraminidase genes from the 1918 pandemic virus. *J Virol* 2004;78:9499-511.
5. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, et al: Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 2005;437:889-93.