

Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple years

多年にわたる野外ウイルスの遺伝子変化に対応した、H5 高病原性鳥インフルエンザからのワクチンによる鶏の防御

David E. Swayne/, Michael L. Perdue, Hoan R. Beck, Maricarmen Garcia 1, David L. Suarez

Southeast Poultry Research Laboratory, USDA-ARS, 934 College Station Road, Athens, GA, 30605, USA

要約

不活化全粒子型鳥インフルエンザ(AI)ウイルスワクチン、バキュロウイルス由来 AI ヘマグルチニンワクチン、遺伝子組換え鶏痘-AI ヘマグルチニンワクチンの、多様な高病原性(HP)H5 型 AI ウイルスに対する防御能力について調べた。ワクチンウイルス株と攻撃ウイルス株、またはそれらのヘマグルチニンたんぱく質成分は、4 か国で 6 種類の宿主から 38 年間にわたって分離された多様な背景を持つ野外株 AI ウイルスから得た。ワクチンは、H5 型 HP AI ウイルス攻撃後の発症と死亡を防ぎ、ウイルスを排出する個体数を減らし、排出されるウイルスの力価を低下させた。

これらワクチンによる免疫化で、AI ウイルスに曝露した鶏の気道および消化管からの AI ウイルスの排出量と、鳥 鳥間の伝播は減少するはずである。ワクチン株が攻撃株により近ければ気道からの排出量はほぼ一貫して減少するが、ヒトインフルエンザで報告されているように連続抗原変異が全般的な防御を阻害することは鳥インフルエンザの場合にはない。

キーワード: 鳥インフルエンザ、鶏、免疫、インフルエンザ、ワクチン

1. 序論

鳥インフルエンザ(AI)は世界で発生しており、原因は 15 種類のヘマグルチニン(HI)と 9 種類のノイラミニダーゼを持つ A 型オルソミクソウイルスである(Easterday et al., 1997)。AI ウイルスが感染できる鳥類の種にはさまざまなものがあり、家禽もそれに含まれる。AI ウイルスには、鶏と七面鳥への感染性に基づいた病原型として主に次の 2 種類がある:(1) 低病原性 (MP)AI は典型的には、呼吸器疾患、産卵率の低下、死亡率の軽度から中等度の増加が見られる。(2) 高病原性 (HP)AI は典型的には、重度の全身性疾患と高い損失が見られる (Swayne et al., 1998; Perdue et al., 2000)。先進国の統合された商業的家禽体制においては AI ウイルスは蔓延しておらず、AI 導入を予防する対策や、MPAI または HPAI の散発的流行が発生した場合に AI を根絶する対策がとられている。

歴史的に個々の国の抑止・根絶戦略は、それぞれの国内の事情、そしてそれほどではないにしても、家禽および家禽製品の国際取引の要件に合わせて選択されてきた(Lancaster, 1981)。そうした戦略としては、家禽における感染を耐え忍ぶというものから、多方面にわたる抑止プログラムに至るまで幅広いものがある。抑止プログラムで用いられる方法としては、農場主および農場作業員への鳥インフルエンザ抑止に関する教育、農場のバイオセキュリティの強化、監視調査と診断法の増強、感染地域内における検疫地帯の設置と鳥の移動制限、感染した鳥の廃棄などがある(Lancaster, 1981)。また、米国では1970年代後半以降、七面鳥におけるMPAIの散発的流行の抑制のためにワクチンが使用されている(Lancaster, 1981)。最近では、メキシコとパキスタンにおいて鶏のHPAI流行の抑止プログラムにワクチンが使用されている(Maeem and Hussain, 1995)。米国では、緊動植物衛生検査部が承認した今後のHPAI抑止戦略の中に、緊急根絶プログラムの一環としてワクチンの使用の可能性が盛り込まれている(Myers and Morgan, 1998)。

それに対して、インフルエンザはヒト集団においては蔓延しており、ワクチン接種を毎年実施するのが先進国では通例になっている(Murphy and Webster, 1996)。A型およびB型のインフルエンザの抑止と予防には、3価不活化ワクチンが中心になっているが、野外株のAIウイルスは連続抗原変異をするので、ワクチンの使用期間に限界があり、ワクチンを構成する株を1年ごとに変更している(CDC, 1998)。

本稿に記載した試験の目的は、野外株の経時的な抗原変異を克服し、鶏における有効性を維持するためには、H5型AIワクチンの変更を頻繁に行う必要があるかどうかを判定することである。

2. 材料と方法

2.1 実験1: 不活化鳥インフルエンザウイルスワクチン

Southeast Poultry Research Laboratory で管理している鶏群から、特定病原除去(SPF)白色レグホン(WL)種の4週齢の鶏10羽からなる群を構成し、試験対象である12種類の不活化ワクチンのいずれか1種類を指示に従って皮下に接種した(Stone, 1987)。用いたワクチンは、未接種卵液(擬処置)、H7 AIウイルス、10 H5 AIウイルスである(表1)。攻撃は、ワクチン接種後(PV)3週間の時に、HPA/chicken/Queretaro/14588/95 (H5N2)AIウイルス(Q1/95)の $10^{7.7}$ ELD₅₀量を鼻内(IN)に接種して行った。ウイルス排出量をもっとも多くなる接種後(PI)第3日に、口腔咽頭とクロアカの綿棒ぬぐいサンプルを採取し、以前に記載した方法(Swayne et al., 1998)を用いて、10日齢発育鶏卵でウイルスの分離を試みた。HA1の推定アミノ酸配列をGenBankから入手し、以前に記載した方法(Swayne et al., 1999)でもってワクチンウイルスと攻撃ウイルスの相同性を決定した。

ワクチンウイルスと攻撃ウイルスのヘマグルチニン配列相同性と、クロアカおよび口腔咽頭から排出される攻撃ウイルスの力価の低減との間の連関性について、スピアマンの順位相関(r_s)によって検定を行った。スピアマンの順位相関はPCソフトウェアで実行した(SigmaStat, Jandel Scientific, San Rafael,

CA)。

2.2 実験 2: バキュロウイルス由来インフルエンザヘマグルチニンたんぱく質ワクチン

1 日齢の White Plymouth Rock 種の鶏 10 羽を、A/chicken/Jalico/14589-660/94 (H5N2) 由来のヘマグルチニン遺伝子挿入部を含むバキュロウイルス由来インフルエンザヘマグルチニンワクチンで免疫化した。各鶏に、250 赤血球凝集単位のたんぱく質を鉱油性の油中水型アジュバントにしたものを各鶏の皮下に 0.2 ml 投与した(Crawford et al., 1999)。PV4 週において、5 羽には Q1/95 AI ウイルスを、5 羽には A/chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2) AI ウイルス(CP/83) を、 10^4 50%鶏致死量(CLD₅₀)にして攻撃した。サンプルの採取とウイルス分離は 2.1 節と同じ方法で行ったが、再分離ウイルス株の力価測定は行わなかった。

2.3 実験 3: インフルエンザ遺伝子挿入部を含む組換え鶏痘ウイルスワクチン

1 日齢の SPF WL 種の鶏 90 羽を、A/turkey/Ireland/83 (H5N8)由来のヘマグルチニン遺伝子挿入部を含む組換え鶏痘ウイルスワクチン (fowlpox-HA)で免疫化した(Swayne et al., 1997, 2000)。さらに 90 羽の鶏を、鶏痘ベクター (fowlpox-Control)で免疫化した。PV3 週において、fowlpox-HA で免疫化した鶏 10 羽ずつと、fowlpox-Control で免疫化した鶏 10 羽ずつに、9 種類のそれぞれの HPAI ウイルス(表 3)を $10^{2.4}$ CLD₅₀にして IN 攻撃を行った。サンプルの採取は 2.1 節と同様にした。

3. 結果

3.1 実験 1: 不活化鳥インフルエンザウイルスワクチン

H5 ワクチンウイルスのヘマグルチニンたんぱく質の HA1 セグメントは、H5 型 HP Q1/95 攻撃ウイルスの HA1 に対して 91.9-100%の推定アミノ酸配列相同性があった。型が異なる H7 型 AI ワクチンの H5 型攻撃 AI ウイルスに対する HA1 の相同性は、35.9%であった。H5 型のワクチン AI ウイルスと攻撃 AI ウイルスは、H5 型 AI ウイルスの北米系統のものである。

H5 型ワクチン群では、ワクチン接種された鶏のほとんどが臨床徴候を現さず、H5 型 HP Q1/95 AI ウイルスの攻撃を受けても生存した(表 1)。対して、擬処置群と H7 ワクチン群は臨床徴候を現し(100%)、同様の攻撃後に死亡した(90%)。AI 攻撃ウイルスは、PI 第 3 日において 12 群すべての鶏の口腔咽頭から高頻度で回収された(83%)。回収された AI ウイルスのぬぐいサンプル培養液 1 ml あたりの力価は H5 ワクチン群のほうが、擬処置群ないしは H7 ワクチン群よりも $10^{1.3}$ - $10^{3.5}$ ELD₅₀ 小さかった。クロアカから AI ウイルスが回収された頻度は、H5 ワクチン群の鶏(<20%)のほうが擬処置群ないしは H7 群の鶏(60%)よりも少なかった。ウイルス力価は、擬処置群、H7 ワクチン群、H5 ワクチン群のすべてのクロアカサンプルで低かった。ワクチンウイルスと攻撃ウイルス間の推定アミノ酸配列相同性と、PI 第 3 日に口腔咽頭(P =

0.10)およびクローカ(P = 0.97)から分離された攻撃ウイルスの量の減り方との間には相関は見られなかった。

表 1: 4 週齢の時に不活化鳥インフルエンザワクチンで免疫化され、その 3 週間後に高病原性 A/Chicken/Queretaro/14588/95 (H5N2)ウイルスで経鼻的に攻撃された鶏におけるヘマグルチニン(HA)たんぱく質の相同性、症状の発症率、死亡率

ワクチン株	略号	攻撃株との HA たんぱく質相同性(%)	発症した鶏数 / 総数	死亡数 / 総数
擬処置	Sham	0	10/10	9/10
A/Turkey/Oregon/71 (H7N3)	TO/71	35.9	10/10	9/10
A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9)	TW/68	91.9	1/10	1/10
A/Mallard/Ohio/556/87 (H5N9)	MO/87	93.1	0/10	0/10
A/Chicken/Mexico/31383-7/94 (H5N2)	M10/93	96.9	0/10	0/10
A/Chicken/Mexico/26654-1374/94 (H5N2)	M5/94	95.4	1/10	1/10
A/Turkey/Minnesota/10734-5/95 (H5N2)	TM/95	92.5	0/10	0/10
A/Chicken/Jalisco/14589-660/94 (H5N2)	J12/94	97.9	0/10	0/10
A/Chicken/Queretaro/14588-19/95 (H5N2)	Q1/95	100	0/10	0/10
A/Chicken/Veracruz/28159-398/95 (H5N2)	V1/95	97.9	1/10	1/10
A/Chicken/Puebla/28159-474/95 (H5N2)	P3/95	93.1	1/10	1/10
A/Chicken/Chiapas/28159-488/95 (H5N2)	C4/95	96.7	0/10	0/10

3.2 実験 2: バキュロウイルス由来インフルエンザヘマグルチニンたんぱく質ワクチン

ワクチンのヘマグルチニンたんぱく質の、攻撃株の Q1/95 および CP/83 AI ウイルスのヘマグルチニンたんぱく質に対する相同性は、それぞれ 87.6%と 97.6%であった(表 2)。ワクチンは、Q1/95 および CP/83 の致死量の攻撃による死亡を防いだ(表 2)。PI 第 3 日においてすべての鶏の口腔咽頭から攻撃ウイルスが分離されたが、クローカからは分離されなかった(表 2)。

表 2: 1 日齢の時にバキュロウイルス由来 H5 ヘマグルチニンたんぱく質ワクチンで免疫化され、その 3 週間後に高病原性 A/Chicken/Queretaro/14588/95 (H5N2)ウイルスで攻撃された鶏におけるヘマグルチニン(HA)たんぱく質相同性、死亡率、攻撃ウイルス株回収率

攻撃ウイルス	攻撃株との HA たんぱく質相同性 (%)	死亡率	攻撃ウイルスが回収された個体数 / 総数	
			口腔咽頭	クロアカ
A/chicken/Queretaro/14588-19/95 (H5N2)(Q1/905)	97.6	0/5	5/5	0/5
A/chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2)(CP/83)	87.6	0/5	5/5	0/5

3.3 実験 3: インフルエンザ遺伝子挿入部を含む組換え鶏痘ウイルスワクチン

9 種類の H5 型 AI ウイルスと Fowlpox-HA ワクチンウイルスとのヘマグルチニンたんぱく質推定アミノ酸配列の相同性は 87.3-100%であった(表 3)。このワクチンは、H5 型 AI ウイルスのユーラシア系統のヘマグルチニン遺伝子挿入部を含んでおり、5 種のユーラシア系統の H5 型攻撃ウイルスに対するヘマグルチニン推定遺伝子配列の相同性は 90.2-100%であった(表 3)。また、H5 型 AI ウイルスの北米系統に対するこのワクチンのヘマグルチニン推定遺伝子配列の相同性は、87.3-89.3%であった(表 3)。

表 3: 1 日齢の時に fowlpox-Control (Control) または fowlpox-HA (HA)ワクチンで免疫化され、その 3 週間後に 9 種類の高病原性 H5 型 AI ウイルスで攻撃された鶏におけるヘマグルチニン(HA)たんぱく質相同性と死亡率

鳥インフルエンザ攻撃株ウイルス	略号	攻撃株との HA たんぱく質相同性 (%)	死亡率	
			Fowlpox-control	Fowlpox-HA
A/turkey/Ireland/83 (H5N8)	TI/83	100	10/10	0/10
A/turkey/England/91 (H5N1)	TE/91	94.2	10/10	0/10
A/tern/South Africa/61 (H5N3)	TSA/61	93.1	10/10	0/10
A/chicken/Scotland/59 (H5N1)	CS/59	92.0	9/10	0/10
A/human/Hong Kong/156/97 (H5N1)	HK/97	90.2	8/10	0/10
A/chicken/Queretaro/14588-19/95 (H5N2)	Q1/95	89.3	1/10	0/10
A/turkey/Ontario/77322/66 (H5N9)	TO/66	89.1	9/10	0/10
A/emu/TX/399924/93 (H5N2) ^a	ET/93	88.8	7/10	0/10
A/chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2)	CP/83	87.3	10/10	0/10

^a HP ウイルスは、実験室において 14 日齢発育鶏卵継代に由来する (Swayne et al., 1996)

Fowlpox-HA ワクチン群の鶏では、H5 型 HP AI ウイルスの致死量での攻撃でも死亡例なかったが、Fowlpox-Control ワクチン群の鶏では、同じ AI ウイルスの攻撃により 60%-100%が死亡した(表 3)。Fowlpox-Control ワクチン群の鶏では、HP AI ウイルスで攻撃して PI 第 3 日にサンプル採取すると、口腔咽頭(90%)およびクロアカ(88%)から AI ウイルスが回収されるが一般的であった。それに対して、Fowlpox-HA 群の鶏では、攻撃ウイルスが口腔咽頭(27%)およびクロアカ(3%)から回収される頻度は対応する Fowlpox-Control 群に比べてずっと少なかった。ほとんどの Fowlpox-HA 群では、PI 第 3 日に口腔

咽頭およびクロアカから AI ウイルスが回収された鶏の割合は 20%未満であったが、CP/83 と Q1/95 の Fowlpox-HA 群では、口腔咽頭からそれぞれ 100%および 90%の割合で分離された。

Fowlpox-HA ワクチンの接種によって、口腔咽頭(10^2 - 10^4 ELD₅₀/ml)およびクロアカ(10^1 - 10^3 ELD₅₀/ml)から回収される攻撃 AI ウイルスの力価が、C1/95 群と CP/83 群を除くすべての群において減少した。ワクチン株と攻撃株のヘマグルチニン配列の相同性とクロアカから回収されたウイルス力価との間には相関が見られなかったが($P = 0.78$)、ヘマグルチニン配列の相同性と、口腔咽頭に排出されるウイルス力価を減少させる能力との間には、直接的な相関が見られた($P = 0.009$)。

4. 考察

不活化全粒子型 AI ウイルスワクチン、バキュロウイルス由来 AI ヘマグルチニンワクチン、遺伝子組換え鶏痘 AI ヘマグルチニンワクチンは、多様な H5 型 HP AI ウイルスによる致死量の攻撃を受けた鶏を、発症および死亡から防御した。ワクチンウイルスと攻撃ウイルス、またはそのヘマグルチニンたんぱく質成分は、異なる 4 か国(北米、ヨーロッパ、アジア、アフリカ)の異なる 6 種類の宿主(鶏、七面鳥、マガモ、エミュー、アジサシ、ヒト)から 38 年間(1959-1997)にわたって分離されたという、多様な背景を持つ野外 AI ウイルスである。さらに、AI に対するワクチンの接種によって、クロアカもしくは口腔咽頭から攻撃 AI ウイルスが分離される鶏の個体数が減少し、クロアカもしくは口腔咽頭で検出されるウイルスの力価も小さくなった。このことから、ワクチン接種は AI ウイルスによる環境汚染を低減させ、それに引き続く水平的な伝播を止めることができる可能性があると考えられる。過去には、遺伝子組換え鶏痘ウイルスワクチンによって、H5 型 HP AI ウイルスの接触伝播が減少したことがメキシコで示されている(Swayne et al., 1997)。

鳥インフルエンザワクチンの有効性に影響する複数の問題点を扱った。第 1 に実験 1 において、攻撃ウイルスとのヘマグルチニンたんぱく質配列相同性が 89-90%である北米系統 H5 型ウイルス 10 種類をワクチンウイルスとして用い、H5 型の攻撃 HP AI ウイルスに対して防御力があることを示した。この防御は、発症と死亡を防ぎ、ワクチン接種された鶏から排出される攻撃ウイルス量を擬処理ワクチン接種群に比べて少なくした。しかし、口腔咽頭およびクロアカから排出されるウイルスの力価の減り方と、ワクチン株および攻撃株のヘマグルチニン配列の相同性との間には統計的相関性がなかった。

第 2 に、バキュロウイルス由来サブユニットワクチンを用いた実験 2 において、ワクチン株に対するヘマグルチニンたんぱく質配列の相同性がそれぞれ 87.6%と 97.6%である H5 型 HP AI ウイルス 2 種の攻撃を受けたのちの発症と死亡が、ヘマグルチニンたんぱく質単独で防御できることが示された。また、ワクチン接種された鶏のクロアカからは攻撃ウイルスが全く分離されなかったが、口腔咽頭からは全個体でウイルスが分離されたことから、ワクチンの使用は野外ウイルスの複製を抑えはするが、完全には停止させないものと考えられる。

第3に、遺伝子組換え鶏痘ウイルスワクチンを用いた実験3において、9種類のH5型HP AIウイルスの攻撃による発症や死亡に対する広範囲の防御力が、ワクチン株のAIヘマグルチニンで得られることが示された。攻撃ウイルスはともに北米系統とヨーロッパ系統の代表的な株であり、ワクチン株との間のヘマグルチニンたんぱく質相同性は87.3-100%であった。このワクチンによって、クロアカまたは口腔咽頭からAIウイルスが回収される鶏の個体数が減り、回収されるウイルスの力価も減少した。ヘマグルチニンたんぱく質配列の相同性は、口腔咽頭から排出されるウイルス量の低下との間には関連性があったが、クロアカからの排出量との間には関連性がなかった。この関連は、ワクチン株と攻撃株のヘマグルチニン配列相同性と間で有意に相関していた。ただし、攻撃ウイルス株がワクチン株と同じ系統(AIウイルスのヨーロッパ系統など)に属する場合には、口腔咽頭のウイルス力価がほぼ一定であったことのほうが重要である。

家禽におけるHP AIウイルス分離株に対する長年にわたる広範囲な防御力は、ヒトのインフルエンザの場合と対照的である。ヒトの場合は、季節的に出現するウイルスの連続抗原変異に対処して防御力を最大にするために、ワクチンが毎年変更されている(CDC, 1998)。こうした違いの一部は、家禽とヒトにおいてインフルエンザウイルスが引き起こす疾患の病態発生に差異があることに原因があると考えられる。鶏や七面鳥においては、高病原性AIウイルスは重度の全身性疾患を引き起こし、ウイルスの複製が複数の内臓、脳、血管内皮で起こる(CDC, 1998)。曝露したワクチン株もしくは野外株の亜型に特異的なヘマグルチニンで誘導される血清抗原が防御力となって、発症や死亡が防がれてきた(CDC, 1998)。しかし、呼吸器および消化器でのウイルスの複製と排出を防ぐためには、特異的な液性免疫を最大にしなければならない場合もある(Ruben, 1987)。それに対してヒトではインフルエンザは主に上気道の疾患であるが、一部の高リスク群で間質性肺炎や神経疾患などの重度の疾患が現れる(CDC, 1998)。ワクチンによって、全人口のおよそ30-70%の発症が予防でき、高リスク群の死亡率をおよそ60-70%低下できることが示されている(Ruben, 1987)。

実用の見地から見て今回の結果で示されたのは、現行のH5型AIワクチンはさまざまなH5型HP AIウイルスに対する防御となることができ、AIウイルス株の頻繁な変更や、ヘマグルチニン部分の遺伝子組換えワクチン、サブユニットワクチンは必ずしも野外のHP AIウイルスに対する防御にはなりえないことである。こうしたワクチンを用いた免疫化によって、AIウイルスに曝露した鶏の気道や消化管からのAIウイルス排出量は減少するに違いない。しかし、ワクチン株と攻撃株の間のヘマグルチニンたんぱく質相同性が90%未満である場合には、気道からの攻撃AI株または野外株の排出量が一貫して低下するという結果にはならないことがある。

謝辞

このデータはヨーロッパ獣医ウイルス学会インフルエンザシンポジウム(1999年5月16-18日、ベルギー、ヘント)で発表したもので、詳細を揃えて別所に掲載した(Crawford et al., 1999; Swayne et al., 1999,

2000).