

Immunology of avian influenza virus: a review

トリインフルエンザウイルスの免疫: 総説

D.L. Suarez, S. Schultz-Cherry

Southeast Poultry Research Laboratory, Agricultural Research Service, U.S.D.A., 934 College Station Rd, Athens, GA 30605, USA

米国農務省 農業研究部 サウスイースト家禽研究所

要約

トリインフルエンザウイルスは、広範囲の鳥類および哺乳類に深刻な疾患を引き起こすことがあるが、その自然宿主の範囲は、野生のアヒル、ガンカモ類、シギ・チドリ類である。家禽における感染は、不顕性になることもあれば、呼吸器疾患、生産性の低下、または高病原性トリインフルエンザ(HPAI)で知られているような急激な致死性全身性疾患に至ることもある。家禽を守るためにはヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼたんぱく質に対する中和抗体が疾患に対する主要な防御力になる。中和抗体を発現させるワクチンにはいろいろなものがあり、不活化ウイルス全粒子型ワクチンや遺伝子組み替え鶏痘ワクチンも含まれる。ワクチンが奏効しないことにおいて、インフルエンザウイルスの連続抗原変異は家禽ではほど重要でないと思われる。キラーTリンパ球の反応は、低病原性トリインフルエンザウイルスではウイルス排出量を減らすことができるが、HPAIに対する防御力になるかどうかは疑問である。インフルエンザウイルスは感染個体の免疫反応を直接的に障害することができ、疾患からの防御におけるMx遺伝子、インターフェロンを始めとするサイトカイン類の役割についてはいまだ不明である。発行: Elsevier Science Ltd.

キーワード: 連続抗原変異、高病原性トリインフルエンザ、呼吸器、全身性感染、家禽、アヒル、ヘマグルチニン、ノイラミニダーゼ

1. 序論

高病原性トリインフルエンザ(HPAI)ウイルスは、家禽において最初に記載されたウイルス性疾患のひとつである。臨床的にHPAIが初めて記載されたのはおそらく、1878年のPerroncitoによるものであり、この疾患の原因は濾過性病原体であることが1901年に複数の研究グループによって証明された[1]。HPAIはそれ以来、家禽業において深刻な損害をもたらし続け、国際獣疫局のリストA疾患に挙げられている。トリインフルエンザに対する数多くのワクチンが開発され、疾患の予防に効果があることが実験的に示されてきたが、コマーシャル家禽におけるHPAIの流行の回数は抑止・根絶されているのではなく、むしろ増え続けている[2]。そのように抑止ができていないことの原因は数多くあるが、ウイルスの生態とインフルエンザ感染に対する宿主の免疫反応についての理解が深まることで、さらに優れた抑止対策の開発が可能になるとと思われる。

2. 背景

オルソミクソウイルス科は、エンベロープを有し、分節化したマイナスの一本鎖RNAを持つウイルスである(図1)。

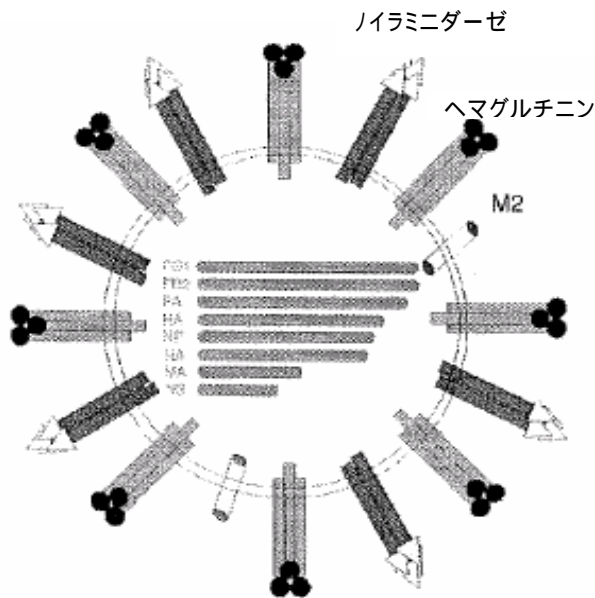


図1. インフルエンザウイルス粒子の模式図。インフルエンザには8個のRNA分節があり、20種類のたんぱく質がコードされている。ウイルス粒子の表面たんぱく質にはHA、NA、M2の3種類があり、これらはウイルスのエンベロープに埋め込まれている。この3種類のたんぱく質のいずれによっても、発病を防止したり低減することができる宿主の抗体反応が誘発される。また、ウイルス粒子がコードする内部たんぱく質は6種類ある(図には示していない)。内部たんぱく質であるPB2、PB1、PA、NPは、ウイルスゲノムの転写に必要なポリメ

ラーゼ複合体を形成する。M1 たんぱく質はウイルス RNA と伴っており、NS2 たんぱく質も少量しか存在しない。NS1 たんぱく質のみは、ウイルス粒子の中に包み込まれていると考えられている。

このグループにはA、B、Cの3種類のインフルエンザウイルスがある。B型とC型のウイルスはヒトにのみ感染するが、A型のウイルスはヒト、ウマ、ブタ、その他の哺乳類、および広範な種類の家禽・野生鳥類に感染する。しかし、このウイルスの正常宿主の範囲は、野生のガンカモ類、カモメ類、シギ・チドリ類だと考えられる[3-6]。野生の鳥類がインフルエンザの生態系に初めて組み込まれたのは、自由生活をしている野生のアヒルからウイルスが初めて分離された1972年のことであった[3]。その最初の報告以来、野生鳥類の調査研究が数多く行なわれ、野生鳥類からは15種類のヘマグルチニン亜型と9種類のノイラミニダーゼ亜型の全部が見つかった[7-10]。野生のガンカモ類(主にマガモなどの水面ガモ)の調査研究では、大部分のヘマグルチニン(HA)亜型とすべてのノイラミニダーゼ(NA)亜型が見つまっている[5]。しかし、HAおよびNAのそれぞれの亜型の分布は、サンプルになった個体群の中で均等なものではなく、ある研究によれば、HA亜型ではH6、H3、H4が、NA亜型ではN8、N2、N6が優勢である[9]。HAおよびNAの亜型の分布は、分離された年、分離した季節、宿主動物によって変動することがある[7,8]。とはいえ、HA亜型の中には、野生のアヒルからは少数しか分離されないのが通常なものもある。そうした亜型の中にH5とH7も含まれていることから、ある研究者は、野生アヒルはすべてのインフルエンザHA亜型についての主要な病原体保有動物ではないかもしれないとの考察を行なっている[11]。しかし、ガンカモ類から移ってきたインフルエンザウイルスが家禽における感染の主要な源であるという考えは依然として続いている[12]。自然宿主におけるインフルエンザの完全な宿主生態は、ウイルスと野生鳥類との間に複雑な相互作用があるために分かっていない。これを完全に解明することはあまり期待できない。

キジ目(主に鶏類とキジ類)と哺乳類はインフルエンザ感染の変則宿主に当たる。この考えは、家禽に関するいくつかの証拠によって支持される。その第1として、2つの血清学的調査において野生の七面鳥にインフルエンザ感染の証拠が見つかっていないことがある[13,14]。このことから、野生では七面鳥はインフルエンザウイルスの増殖に関与しておらず、自然宿主ではないと考えられる。家禽鶏の先祖であるセキショクヤケイについて同様の調査は行われていないが、キジ類のもう一つの種である鶏もインフルエンザの生態に重要な役割を果たしているとは考えにくい。哺乳類では、インフルエンザウイルスはさまざまな種に日常的に感染するが、大流行に至ることは稀である。また、それぞれのインフルエンザ流行ウイルスが、新しい宿主において絶滅することもしばしばある。例えば、ヒトではH2N2亜型がもはや見られず、H7N7亜型がウマから分離されることはもうなくなっている[6]。どちらの場合も、流行ウイ

ルスがおそらくはもっと適合している別のインフルエンザ亜型に取って代わられたのである。インフルエンザが本来ならこうした動物種には感染しないことの説得力のある証拠として、哺乳類、鶏、七面鳥においてはインフルエンザが急速に進化するという事実がある[15-19]。急速な変化は、ウイルスが正常でない宿主内で増殖するために行う適応の結果であると考えられている。それに対して、野生鳥類のインフルエンザウイルスで観察される進化速度は遅く、これはウイルスがよく適応しているためだと考えられる[6,20]。家禽化されたアヒルは、トリインフルエンザウイルスに感染することが多く、本来のウイルス保有野生動物からその他の家禽や哺乳類への伝播において重要な役割を果たしている可能性が高い[6,7,21]。しかし、この宿主の中でのウイルスの進化速度がどれほどかは判っていない。

家禽がトリインフルエンザウイルスに感染することで示される症状は広範囲にわたり、無症候性感染、軽度から重度の呼吸器疾患、生産性の低下、稀に、高い罹患率と死亡率を伴う重度の疾患などがある。トリインフルエンザウイルスは一般的に、低病原性トリインフルエンザ(MPAI)ウイルスまたはHPAIウイルスのどちらかの性質を持っており、これは静注病原性試験でもって判定される。この病原性試験の方法は、ウイルスを継代した発育鶏卵の尿膜腔液を10倍に希釈して、その0.2mlを4から6週齢の特定病原体除去(SPF)鶏に接種するものである。8羽に接種してそのうち6羽以上が10日以内に死亡した場合には、そのウイルスは高病原性とされる。死亡数がそれより少ない場合には、そのウイルスは低病原性だとされる。病原性試験でHPAIと判定されるウイルスは一般に野外において高死亡率の重症疾患を引き起こす。MPAIウイルスの野外における家禽に対する病原性は非常に幅広く、無発病から、生産性低下を伴う呼吸器疾患、稀に、高い死亡率を伴う高頻度の発病まで幅がある。MPAIによる症状は幅広く、HPAIと重なる部分もあるが、野外においてMPAIが原因の高死亡率は二次性の病原体によることが少なくなく、分離株を実験室内でSPF鶏を用いて試験すると、死亡率はかなり低いのが通常である。

HPAIウイルスとMPAIウイルスの主な違いは、それぞれ、複製が全身で起きるか、局所で起きるかの違いである。複製部位の違いは、ヘマグルチニン(HA)たんぱく質がHA1およびHA2のサブユニットに開裂することに関係している。この開裂は、ウイルスが感染するのに不可欠である。HPAIのHAたんぱく質は、身体のほとんどの細胞に存在する内因性プロテアーゼによって開裂することができるが、MPAIのHAたんぱく質は、主に呼吸器と消化管に存在するトリプシン様プロテアーゼでなければ開裂しない。HPAIウイルスのHAの開裂部位には複数の塩基性アミノ酸があり、そのためにいろいろな内臓の多様な種類の細胞における開裂活性が高い[22]。こうした複製部位の違いがウイルスの病原性において重要であり、最適な防御を達成するためには免疫反応も多様にならざるを得ない。

3. 宿主反応

インフルエンザウイルスが宿主に疾患を起こさせる能力と、宿主がインフルエンザウイルス反応する能力は、動物種によって大きく異なる。例えば、鶏において高病原性であるウイルスが、3種類のアヒルに対してはまったく病原性がないか、軽度の徴候しか引き起こさない[23-26]。種間での病原性の差は、キジ目の鳥類にMPAIおよびHPAIウイルスを用いた実験研究でも観察されている[25,27]。例えば、鶏と七面鳥にMPAIの2つの分離株を用いた実験では、鶏に対しては症候を引き起こさなかったが、七面鳥に対しては致死率25%の疾患を引き起こした[27]。ウイルスの実験的接種を行った実験のほとんどにおいて明白な感染が起こっていることから、疾患の様相の違いは一般に、ウイルスが特定の種に感染可能かどうかの結果として表れるのではない。それぞれの種におけるトリインフルエンザの病原性も非常に広範囲にわたることがあり、特にアヒルと鶏および七面鳥を比べたときに差が大きい。アヒルにおけるトリインフルエンザの複製は主に消化管内で起こると考えられているが、コマーシャル飼育のアヒルに実験的に感染させた実験で呼吸器疾患が報告されている[23,28-31]。アヒルにおけるインフルエンザの疾患と複製パターンの一般的な特徴が明らかになっているとはいえ、野生および家禽のアヒルにはたくさんの異なった種類が存在し、それらはインフルエンザ感染に対して異なった反応をする可能性があるため、注意が必要である。

さまざまな動物種のトリインフルエンザウイルス感染に対する免疫反応を比較した場合も、特に抗体力価の面で差が現れる。さまざまな抗原を用いたいろいろな種の鳥類の実験によれば、抗体産生の強さは鶏 > キジ > 七面鳥 > ウズラ > アヒルであった(Higginsによる総説、1996)[32]。同様の免疫反応は、不活化インフルエンザウイルスでワクチン接種した場合と、トリインフルエンザウイルスに実験的に感染させた場合でも観察された[33-35]。アヒルは、トリインフルエンザの自然および実験的感染に対して抗体産生能が低く、HI抗体反応を欠いていることが報告されている[29,36]。アヒルがヘマグルチニン抗体を産生することができないのは、アヒルには沈降、補体活性化、オプソニン化といったその他の抗体も欠損していることに関係すると思われる。こうした欠損は、アヒルの血清抗体の主な種類である5.7S型IgYの構造によるものと考えられる。ペキンダックは大きさの異なる2種類のIgYを持っている(それぞれ沈降係数が5.7Sと7.8S)[37]。この2種類のIgYの配列を比較すると、小型の方のIgYのH鎖には定常ドメインが2か所しかないのに対し、大きい方の型のIgYでは定常ドメインが4か所ある。5.7S型のIgYには定常ドメインが2か所しかないのは正常IgYのF(ab')₂断片によく似ており、そのために、抗体のFc部位に関連する効果器としての機能、例えば赤血球凝集作用が失われているものと考えられる。

4. 液性免疫反応

家禽における自然感染の液性免疫反応には、全身性のものだけでなく粘膜での抗体産生も含まれ

ていると考えられる。鶏と七面鳥における全身性の抗体反応はその他の動物種に類似しており、感染の5日後という早期にIgMが検出され、それにすぐ続いてIgYが検出される。産生される抗体は、インフルエンザウイルスの多様なたんぱく質を標的にしており、このことが疾患の防御と感染の診断の両方にとって重要である。インフルエンザウイルスが産生する10種類のウイルスたんぱく質は、表面たんぱく質、内部たんぱく質、それに、ウイルス粒子の内部には含まれない非構造たんぱく質の大きく3つに分類できる。ウイルス粒子に含まれる表面たんぱく質には、HA、ノイラミニダーゼ(NA)、基質2(M2)たんぱく質の3種類がある。内部たんぱく質にはPA、PB1、PB2、核たんぱく質、基質1(M1)、非構造たんぱく質2(NS2)がある。非構造たんぱく質1(NS1)は、感染細胞の中で大量に産生されるが、ウイルス粒子の中には含まれない唯一のたんぱく質である。

中和抗体すなわち防御的免疫反応を誘導する能力があるのは表面たんぱく質だけである。HAとNAの両たんぱく質とも配列に高度な抗原変異を有しており、遺伝子は15の異なるHA亜型と9のNA亜型に分かれている。それぞれの亜型は抗体によって区別がつけられる。すなわち、あるウイルスによって誘導された抗体は同じHAまたはNA亜型を持ったほかのウイルスを中和することができるが、異なるHA亜型と異なるNA亜型を持つウイルスを交差中和することはできない。インフルエンザウイルスには変異があってそれぞれの亜型が重要であるので、インフルエンザウイルスの分類は、HAおよびNAの亜型で行うのが一般的である。

HAたんぱく質の主な役割は、ウイルス受容体結合部位になること、及び融合ドメインを含むことの2つであり、ともにウイルスRNAが宿主細胞内に放出されるのに不可欠である。HAたんぱく質は、膜に組み込まれた糖タンパク質であり、ウイルス表面でホモ三量体を形成している。ヒトインフルエンザウイルスには抗原部位が少なくとも5か所あることが判っており、その各部位は中和抗体を誘導することができる[39]。H5型のトリインフルエンザウイルスでも同様の観察がある[40]。HAたんぱく質に対する抗体が、疾患に対する宿主の防御能の主要な決定因子であり[41]、家禽におけるインフルエンザワクチンは主にこのHA亜型を標的にしている。防御におけるHAたんぱく質の重要性は、HAたんぱく質のみを含んだサブユニットワクチンで鳥を防御できることでも示される。HAたんぱく質に対する抗体の力価の測定は通常、間接抗体試験であるヘマグルチニン抑制(HI)試験で行う。このHI試験は亜型特異的な試験であり、一定量のウイルスによる赤血球凝集を被験血清が阻害する活性を測定するものである。家禽に存在するHI力価は、同じHA亜型を持つウイルスによる病原性攻撃に対する防御力に強く相関している。

NAたんぱく質は酵素活性を持つたんぱく質であり、シアル酸を開裂させてウイルスが細胞表面から遊出できるようにするのに重要であると考えられている。またNAたんぱく質は、鶏において中和抗体を

発現させ、NA特異的ワクチンはHPAIの攻撃を防御することができる[42,43]。NAたんぱく質に対する抗体は、HAほどの重要性はないと考えられているが、少なくともマウスにおいては、HAとNAの遺伝子を両方含んだDNAワクチンを接種すると、より大きな防御力を引き出すことができた[44]。とはいえ、NAたんぱく質のみでワクチン接種したマウスではウイルス排出量が減少しただけだが、HAたんぱく質でワクチン接種したマウスではウイルスの排出が完全に止まった[41]。

M2たんぱく質は膜に組み込まれたたんぱく質であり、ウイルス粒子にとってのイオンチャネルの働きをしている。ウイルス粒子が宿主細胞の受容体に結合してエンドサイトーシスされる時に、エンドソーム内のpHが下がるとM2イオンチャネルのおかげでウイルス粒子内部のpHも下がり、それが引きがねとなってHAたんぱく質が融合活性を現わすようになる。マウスにおいて、M2たんぱく質に対する抗体は完全な防御にはならなかったが、排出されるウイルス量は低下し、疾患に対するある程度の防御にはなった[45-47]。M2に対する抗体を発現させることの本来的な利点は、M2たんぱく質はすべてのA型インフルエンザウイルスによく保存されており、すべてのHAおよびNA亜型に対して防御力を発揮できる可能性があることである[45]。しかし、M2に対する抗体が家禽において防御力になるかどうかを調べた文献は今までのところ存在しない。

内部たんぱく質、特に核たんぱく質(NP)と基質1(M1)たんぱく質に対しても抗体反応は起こる。どちらのたんぱく質も配列が高度に保存されていて、A型インフルエンザウイルスならどれであっても感染した鳥から抗体が検出されるので、診断検査に利用される重要なたんぱく質である。家禽においては、型に特異的な抗体の検出には主に、寒天ゲル免疫拡散(AGID)試験と何種類かの酵素結合免疫吸収アッセイ(ELISA)という2つの方法が用いられている。AGID試験はNPとM1の両方のたんぱく質に対する抗体を測定するもので、その簡便さから、鶏および七面鳥の検査に広く利用されている[48]。AGID試験の主な欠点は、ELISAやHI試験に比べて感度が低いことである[49,50]。ELISAは、市販のELISAも含めて、核たんぱく質に対する抗体のみを検出するのが一般的である。ELISAの形式には、間接ELISAと競合ELISAの2種類がある。間接ELISAは、抗鶏/七面鳥二次抗体を用いて、種特異的な試験を行うものである[50,51]。この形式のELISAは、現在市販キットが2種類販売されている。2番目の形式の競合ELISAが用いているマウスモノクローナル抗体は、被験血清と競合して標的インフルエンザNPに結合する。二次抗体はマウスモノクローナル抗体を標的とし、陽性サンプルは吸光度が低くなる。競合ELISAの主な特長は、マウスを除いて鳥類・哺乳類の多様な種の血清サンプルを試験できる点である[52,53]。

粘膜の免疫防御における分泌抗体は、感染からの回復およびその後の感染、特に主に粘膜感染をするMPAIに対する防御力の獲得にとって重要な役割を果たしていると考えられている。ウイルスへの

初回曝露は粘膜を介して起きるので、粘膜免疫反応はHPAI感染からの防御においても働いていると考えられている。しかし、鶏および七面鳥における粘膜免疫反応について直接的に調べた研究はわずかしかない。アヒルでは、いろいろなインフルエンザ分離株に感染した個体の胆汁からIgAが検出されており、IgA遺伝子発現パターンに基づけば、その他の粘膜表面にもIgAはおそらく存在しているとされた[54,55]。鶏では、ニューカッスル病ウイルスおよび伝染性気管支炎ウイルスへの感染後にIgA免疫反応が起きることが示されており、こうした呼吸器系ウイルスの病原性攻撃に対してIgAが防御的な免疫反応を発揮していることを示す証拠がいくつか示されている[55-60]。

5. 連続抗原変異

ヒトインフルエンザウイルスでは、野外型ウイルスとワクチン株がどの程度類似しているかを調べる監視が毎年行われている[61]。その時点でインフルエンザウイルスに対してワクチンの防御力を最大にするために、もっとも新しい野外分離株でワクチンを製造し直すことも少なくない。ウイルスの一つの亜型が絶え間なく進化し、抗原が変化することを連続抗原変異と呼び、このためにヒトにおいてはワクチンの有効性が小さくなってしまふ。しかし、鶏におけるインフルエンザワクチンは、ヒトのものよりも連続抗原変異に対する耐容性がずっと強いようであり、ワクチン株とHPAI攻撃株のHA遺伝子の核酸配列の類似性が90%未満であっても、疾患に対する良好な防御力を持っている[62-64]。とはいえ、ある試験によれば、ワクチン株と攻撃株との相同性が高いほど、気道から排出されるウイルス量が減少した[63]。家禽におけるインフルエンザHAたんぱく質の進化の速度は哺乳類でみられるものと同じであるので、ヒトで起きているのと同じように家禽においても連続抗原変異が起きていると考えられている[15,17]。連続抗原変異に対する感受性がヒトのほうが鶏よりも高い理由については不明である。ヒトでは主に呼吸器感染として起きるが、家禽の実験ではHPAIウイルスが全身で複製されるというところに違いの一つがあるのかもしれない。血液中を循環する抗体は、全身感染に対するほうが呼吸器感染よりも強く抑制できるはずである。また、そうした反応性の違いには、宿主の差および宿主の免疫反応の差も関与している可能性が強い。

6. 細胞性免疫

鳥類の細胞性免疫に関する知識は、この10年間で急速に拡大した。細胞性免疫反応は多くのウイルス感染に対する防御にとって重要であることはよく知られている。新生物性および非新生物性のウイルス疾患における細胞性免疫の役割についてはよく解っている[65]。しかし、トリインフルエンザウイルスに対する細胞性免疫の意義についてはよく解っていない。本節では、トリインフルエンザウイルスの病

原性における細胞性免疫の各面について論じる。

6.1. CD4+とCD8+とTリンパ球

ウイルス感染への反応として抗体と活性Tリンパ球の両方が産生される[66]。A型インフルエンザウイルス感染のマウスモデルとは異なり、トリインフルエンザの病態におけるヘルパー(CD4+)とキラー(CD8)Tリンパ球の役割に注目した研究は非常にわずかしかない。トリインフルエンザウイルスは、ウイルス複製がない場合には、コンカナバリンAに対する鶏の末梢血リンパ球(PBL)と胸腺の反応を用量依存性に増強し[67-70]、その結果、*in vitro*においてIL-2活性を亢進させる[68]。興味深いのは、高病原性のトリインフルエンザ株であるA/Turkey/Ontario/7732/66 (Ty/Ont, H5N9)は*in vivo*でも*in vitro*でも直接的にリンパ球を破壊する[69,70]。こうしたリンパ組織の破壊はTy/Ontに独特なものであり、このウイルスの特徴である[69,70]。組織障害のタイプと程度に違いがあることが、トリインフルエンザウイルスの複数の高病原性株で見られる病原性の違いの説明になりうる[71]。驚くべきことに、Ty/Ontは*in vitro*[72]でも*in vivo*でもウイルス複製とは関係なくリンパ球を殺す。これは、鳥のマクロファージ内でTy/Ontが複製され、水溶性因子(例えば、リンパ球のアポトーシスを誘導するサイトカイン類など)が放出されるためであることが考えられる。

ガンカモ類でのインフルエンザ病態発生における細胞性免疫反応の役割についてはあまり明確になっていない。Laudertらが、3週齢のアヒルをA/Mallard/Ohio/184/86 (h5N1)に感染させ、*in vitro*でのT細胞反応が低下することを示した[73]。しかしこれは、感染した鳥の*in vivo*において示されている単球/マクロファージの活性亢進で代償される可能性がある。以上の研究で示されているように、インフルエンザウイルスはマガモ類の免疫系を変容することができる。

6.2. マクロファージ

哺乳類では、マクロファージは感染微生物に対する第1の防御ラインとして働くスカベンジャー細胞である。鳥類のマクロファージも同様の働きがあると言われている[74,75]。この細胞は骨髄に由来し、単球として血中を循環している[76]。マクロファージはいったん活性化すると、侵入物に対する非特異的および特異的免疫においてきわめて重要な役割を演じ、炎症反応の重要なメディエータになる。

哺乳類のA型インフルエンザウイルスの病原性におけるマクロファージの重要性は、比較的よく解っている[77]。ヒトおよびげっ歯類のマクロファージはA型インフルエンザウイルスの複製の場となり[77-80]、その結果マクロファージが細胞死する[77,81]。同様に、鳥類のマクロファージの培養系であ

るHD11も、13種類のHA亜型の複製の場となる[82]。また、HPAI株であるTy/Ontに感染した鶏から分離した脾臓マクロファージが感染中心アッセイでウイルス陽性であったことから、この細胞がin vivoで感染することが想定されている[70]。

マクロファージは炎症反応においてサイトカインを産生し[76,77]、貪食作用によって異物粒子を捕食する。マクロファージの貪食機能は、異物粒子の除去の面で特に重要であり、アポトーシスや壊死を起こした細胞を排除し、抗原を取り込んで処理して、Tリンパ球に提示したり、食胞内で破壊したりする[76]。マクロファージは貪食の際に呼吸バーストを起こし、その結果、フリーラジカル酸素と活性酸素種(ROS)を生成する[83,84]。これらROSの代謝産物が殺菌活性において重要であり、炎症を起こしている局所の組織を顕著に損傷することがある。哺乳類マクロファージがA型インフルエンザウイルスに感染すると、呼吸バーストと外来刺激への走化性が抑制される[85-87]。このことが、インフルエンザウイルスに感染した個体が細菌への二次感染を起こしやすくなることの理由の一つと考えられている。鳥類のマクロファージの反応も同様な様式である。LyonとHinshawは、鳥類マクロファージの2種の培養細胞系にいろいろな鳥A型インフルエンザウイルスを感染させると、一酸化窒素(NO)の産生量が未感染対照細胞よりも少なくなることを示した[88]。マクロファージはインフルエンザウイルスに感染すると、哺乳類と鳥類のマクロファージにおいてNOの誘導物質であることが判っているリポポリサッカライド(LPS)[89]に反応してNOを産生することをしなくなった。A型インフルエンザウイルスが鳥類のマクロファージにおけるNO産生を阻害するメカニズムは不明である。しかし、ウイルス複製が必須であることから、鳥類マクロファージにおけるNO合成の抑制は、ウイルスの活動のためであることが考えられる。

トリインフルエンザウイルスの感染によってin vivoでもマクロファージの機能が障害される。MPAI株のA/Turkey/Minnesota/534/78 (H6N1)に感染した七面鳥から分離した肺マクロファージは、感染10日後において貪食作用と肺内での殺菌活性の低下を示した[90]。インフルエンザウイルスの感染によるマクロファージ抑制に関わるメカニズムは不明であるが、こうした興味深い研究により、家禽においても哺乳類と同じように、インフルエンザ感染中はマクロファージの機能が抑制され、細菌二次感染に罹りやすくなる可能性のあることを示している。以上の所見は、家禽における低病原性株のインフルエンザウイルス感染の病態発生において重要であると考えられる。

炎症反応の初期にはマクロファージが活性化することによってサイトカイン類が産生される。サイトカイン類はリンパ系および非リンパ系の細胞群における免疫反応に対して劇的な作用を有している。また、インターフェロン(IFN)などの特定のサイトカイン類には抗ウイルス活性があり、ウイルス複製を直接的に抑制すると考えられている。インフルエンザウイルスの病態発生におけるサイトカイン類の重要性については、哺乳類系で詳しく記載されている[77,91-93]。残念ながら、鳥類のサイトカイン類につい

では全般的にあまりよく判っておらず[94,95]、特徴が解明されている鳥類サイトカインはほんの少数である。

かつて我々は、マウスがインフルエンザウイルスに感染すると、 α 型トランスフォーミング増殖因子(TGF- β)の活性が高まることを示した[96]。TGF- β は増殖因子と分化因子である小型ペプチドのファミリーであり、細胞過程、生理過程、免疫過程に対してさまざまな働きを持つ[97-99]。TGF- β はマクロファージも含めたほぼすべての種類の細胞が分泌しており、すべての動物種を通じて保存されている[97]。免疫反応においては、TGF- β は自らが免疫抑制物質および強力な炎症誘発性分子の両方として作用し、炎症性分子の誘引や制御、サイトカイン分泌の誘導、ヘルパーT細胞サブセット1型を刺激する[99]。このようにして、TGF- β は免疫反応の開始、進行、解消においてきわめて重要な事象を制御している。

TGF- β はすべての動物種を通じて高度に保存されているので、我々はインフルエンザウイルスに感染した鶏のTGF- β の活性を調べてみた。それによると、Ty/Ontに感染した鶏は、血清TGF- β 活性が感染8時間後に上昇し、高値が48時間持続した(データ未掲載)。感染鶏の肺と脾臓においてもTGF- β 活性が上昇した。免疫蛍光抗体法を用いた実験では、*in vivo*においてTGF- β 活性亢進とインフルエンザウイルス感染の部位が一致した。こうした所見はTy/Ontウイルスに限ったものでない。最近のH5N1香港株も含めたその他のHPAI株でもTGF- β が活性化される。以上の研究は、我々が知るかぎり、インフルエンザウイルスに感染した鶏におけるサイトカイン濃度を調べた初めてのものである。現在は、トリインフルエンザの非病原性株に感染した場合のTGF- β 活性を調べ、トリインフルエンザウイルスの病態発生におけるTGF- β の役割を解明することに研究の焦点を移している。

7. インターフェロンとMxたんぱく質

哺乳類においては、インフルエンザウイルスへの感染によってI型INF(およびINF[INF-1])のアップレギュレーションが起こる。ウイルス感染細胞によって産生されたIFNは、宿主細胞のさまざまなたんぱく質の合成を誘導する。Mxと呼ばれるたんぱく質ファミリーもそのひとつである[100]。Mxたんぱく質は、INFで処理した細胞およびインフルエンザウイルスに感染した細胞の中に高レベルに蓄積する。マウスでは、*in vitro*[100,101]、*in vivo*[102-106]において、Mxたんぱく質が発現することでインフルエンザウイルスに対する高い抵抗力が得られる。Mxが誘導するインフルエンザウイルスへの抵抗力の正確なメカニズムについてはよく解っていないが、INFで処理したMx細胞の中にはインフルエンザのたんぱく質が現れないことから[107]、ウイルスの複製が初期段階でブロックされていると考えられる。

マウスモデルとは反対に、鳥類のIFN-1系についてはよく解っていない。1957年にIsaacsと

Lindenmannが初めて、発育鶏卵の中のINFを同定した[108]。しかし鶏IFN分子の特徴の解明は、つい最近になって鶏IFN-1のクローニングされたことで緒に付いたばかりである[109,110]。哺乳類のI型IFN同様に、鶏のIFN-1もウイルス感染への反応の時に誘導され、鶏Mx遺伝子を強力に活性化する[111]。ただし、鶏のMx遺伝子は培養細胞の中で発現した場合には、インフルエンザを始めとする複数種類のウイルスに対する抗ウイルス活性を示さなかった[112]。アヒルのMx遺伝子をマウスの3T3細胞または鳥類のC32線維芽細胞やLMH肝がん細胞の中でクローニングしても、インフルエンザウイルスへの抵抗力が現れなかった[113]。同様の細胞内でマウスMxたんぱく質を発現させると、インフルエンザウイルスの複製を阻害した。以上の研究から、アヒルのMxたんぱく質では、ヒトのMxB[101]やラットMx3たんぱく質[114]のような抗ウイルス活性は欠損していると想定される。このことは、アヒルはインフルエンザウイルスの自然の保有動物であり、ほとんどのインフルエンザウイルス株は明白な疾患を引き起こすことなしにアヒルの中腸において複製できることから[30,115]、大変に興味深い。

クローンされた鶏II型IFN(IFN-2)も、哺乳類のINFに類似した物質のようである[116,117]。IFN-2はワクチン接種鶏において、NO分泌、マクロファージ細胞表面抗原のアップレギュレーション、抗体産生の増進を行う[117-119]。また、IFN-2は水疱性口内炎ウイルスに対してある程度の抗ウイルス活性を有しているが、IFN-2が鶏のインフルエンザウイルスに対する防御能を持っているかどうかは不明である[117,119]。

8. ワクチン

トリインフルエンザウイルスによる疾患を防ぐ十分な防御力をワクチンによって得られることが多数の研究で示されている。そのほとんどの研究は、HPAIに対する防御力を調べており、全身性疾患は循環血液中の抗体に強く左右されるものであると想定している。しかしMPAIも、一般的に強い粘膜免疫反応は引き起こさない不活化ワクチンを主に用いた非経口的接種に反応する。現在用いられているワクチンおよび今後用いられる可能性があるワクチンについて述べる。

家禽において現行で用いられているトリインフルエンザワクチンは全粒子ワクチンとサブユニットワクチンの2種類に分けられる。全粒子ワクチンは主に不活化ワクチンのみを含んでいる。これは卵で培養し、不活化、アジュバント化して、非経口的経路で投与する。アジュバント不活化ワクチンは、強い液性反応を引き起こすことが可能で、MPAIおよびHPAIの攻撃による発病を防ぐ効果があることが証明されている。不活化ワクチンの主な欠点は、ワクチン接種した鳥が作るのが、HAおよびNAたんぱく質にあるエピートプに対する防御に役立つ抗体だけでなく、インフルエンザ内部たんぱく質であるM1やNPに対する抗体も作ることである。こうしたたんぱく質に対する抗体は、AGID試験で検出され、NPに対する

抗体はELISAで検出される。それゆえに、ワクチン接種された鳥と自然感染した鳥とを、一般に用いられている血清学的検査で鑑別することができない。ひとたび大流行が発生した時にはワクチン接種した個体と自然感染した個体とを鑑別することが重要なことなので、それが一つの理由となって、不活化ワクチンは家禽におけるHPAI流行の抑止手段の中のひとつとして常には用いられて来なかった。

サブユニットワクチンは、様々は様式で利用することができるが、一般的にはどれもHA遺伝子を標的にしたものである。この種のワクチンとしては、市販の遺伝子組み替え鶏痘ワクチン、バキュロウイルス発現たんぱく質、DNAワクチン、植物由来ワクチンがある。いくつかのベクターについてHA遺伝子をベクターのゲノムに挿入したさまざまなベクターワクチンが記載されており、鶏痘ウイルスやレトロウイルスを用いたワクチンがある[12,121]。鶏痘ベクターHAワクチンは、優れた防御力が得られることが多数報告されており、H5鶏痘ワクチンが市販されている[122,123]。

その他のサブユニットワクチンとしては、バキュロウイルス発現HAたんぱく質をアジュバントとともに用いると、防御能が得られる。バキュロウイルス発現系は真核細胞系で糖タンパク質が産生でき、家禽での利用に見合うだけの費用でできる利点がある[124]。植物性ベクターワクチンも、ワクチンに使用するためのHA糖たんぱく質の経済的な供給源になり得る(Mason, H. 私信)。家禽のインフルエンザウイルスに対しては、混餌すなわち経口でのワクチン投与が少なくとも可能であることが示されている[125]。

新しいワクチン技術として、真核細胞系の助けを借りて発現させたHA遺伝子の裸のDNAプラスミドを用いたDNAワクチンが家禽で使用され、報告されている[62,126-128]。裸のDNAは筋肉内接種もしくは遺伝子銃で直接的に投与することが可能である。鶏において、DNAワクチンが有効であり、液性免疫反応とおそらくは細胞性免疫反応も引き起こすことが示されている[129]。家禽における手技は現在開発中であり、費用と実戦面での問題を解決する必要がある。

トリインフルエンザに対するワクチン接種の原理的な欠点は、HAおよびNAの多様な亜型に対するワクチンを接種する必要がある点である。HPAIを起こすのはH5とH7亜型のみであることは判っているが、いかなるHA亜型を持つMPAIウイルスも深刻な疾患を引き起こす可能性がある。例えば、ミネソタ州の1987会計年度の七面鳥業界では、トリインフルエンザの少なくとも6種類のHA亜型に26飼育群が感染し、抑止のために4種類のHA亜型に対するワクチンが使用された[130]。それゆえに、すべてのA型インフルエンザウイルスに対して防御力のあるワクチンを開発することが、多くのインフルエンザ研究者の目標の一つになっている。NP、M1、M2たんぱく質などのインフルエンザ遺伝子のいくつかは高度に保存されており、インフルエンザウイルスに対する幅広い防御力を得るための候補になりうる。しかし、主に抗体反応を発現させるワクチンにおいては、内部たんぱく質であるNPおよびM1に対する抗体では中和できず防御力が得られないので、NPおよびM1といった内部たんぱく質は使えない。M2たんぱく

質はインフルエンザの表面たんぱく質であり、広範ではあるが限られた防御力が得られることがマウスにおいて早くから報告されているが、家禽においてはまだ調べられていない[46,47]。NPたんぱく質はよく保存されているので、このたんぱく質に対する細胞性免疫反応を刺激する試みがいくつかの研究で行われている。マウスとフェレットでは、NP遺伝子を含んだDNAワクチンを使用することで、異種混合的な攻撃に対してある程度の防御力が得られることが示されている[131-134]。鶏痘ウイルスおよびレトロウイルスを用いてNP遺伝子を発現するワクチンを家禽に使用した別の実験では、防御反応を引き起こすことはできなかったが、生ウイルスを用いれば細胞性免疫反応を引き起こせたとはいえる[123,135]。あるワクチン接種実験によれば、ウイルス複製が弱まったときにある程度の細胞性免疫の防御効果が示されたが、一番早くに検出できた反応が現れたのは攻撃後4日以上経ってからだった[136]。細胞性免疫反応の効果は遅く、HPAIの実験的攻撃ではたった1日で死に至ることもあるので、この様式の免疫はHPAIの防御に十分であるとはまず考えられない[137]。

9. 結論

トリインフルエンザは過去30年間にわたり詳細に研究されているが、この病原体に対する免疫反応の知識は依然として限られている。その限られた知識のひとつが、トリインフルエンザ自身が多様な宿主の中で多様なあり方で存在していることである。このウイルスによって発病し、免疫が発現する種間のみで狭い一般化ができるだけである。家禽については、MPAIおよびHPAIに対する防御において全身性の抗体が重要であることが数多く報告されている。しかし、HPAIまたはMPAIに対する防御における粘膜性および細胞性の免疫反応の意義についての理解はまだ限られたものでしかない。多数の抗原亜型を持ち急速に進化するというトリインフルエンザの性質が、トリインフルエンザウイルスを攻撃的な病原体にし、鳥の免疫反応についてよりよく理解することを困難にしているが、この重要な病原体を抑制できれば、それまでの研究努力は報われることになるだろう。