

Evaluation of Inactivated Influenza Vaccines in Market Turkeys

コマーシャル七面鳥におけるインフルエンザ不活化ワクチンの評価

Daniel Karunakaran,[A] J. A. Newman, D. A. Halvorson,[B] and Albert Abraham[C]

ミネソタ大学獣医学部獣医病理学科

要約 インフルエンザ油性エマルジョン不活化ワクチンの感染、発病、ウイルス排出に対する効力と効果について、コマーシャル用七面鳥を用いて調べた。ワクチン接種に伴う望ましくない局所 / 全身性の反応は起こらなかった。

ワクチンは、ウイルスのヌクレオカプシドとヘマグルチニンに対する抗体を検出可能なレベルで誘導した。攻撃後には、未接種対照群では気嚢炎が見られたが、ワクチン接種群では見られなかった。経鼻的攻撃の後にウイルスを排出した固体の割合は、ワクチン接種群のほうが対照群よりも小さく、排出されるウイルス量もワクチン接種群のほうが対照群よりも少なかった。

A 型インフルエンザウイルスはその表面に、13 種類のヘマグルチニンのどれかひとつと、9 種類のノイラミニダーゼのどれかひとつを持っている。これらの表面抗原に基づいてウイルスは血清学的に独立した亜型に明確に分かれ、分類される(22)。

ヒトおよび動物用の A 型インフルエンザ感染に対する不活化ワクチンが利用できるようになって多年になる(7,8,10,13)。鶏では、死滅化ウイルス懸濁液を筋肉内注射し、その後に生ウイルス懸濁液で 2 度目の注射を行うと、ある程度のヘマグルチニン抑制(HI)抗体とノイラミニダーゼ抑制抗体とが産生される。それによって同種の生ウイルス攻撃に対する防御力が得られる(2)。単価および多価の油性エマルジョンワクチンを用いた同様の実験でも、鶏と七面鳥はインフルエンザに対してワクチン化された(6)。

ヘマグルチニン(H)とノイラミニダーゼ(N)は、感染に対して防御能を持つ抗体を誘導する。インフルエンザ感染からの防御は、血清中の抗ヘマグルチニン抗体の濃度に比例する(10)。ノイラミニダーゼに対する抗体でも免疫が得られることが示されている(14)。最大の防御力を得るためには、おそらく表面抗原に対する抗体が両方とも必要である(9,16,19)。

ある亜型のワクチンもしくはウイルスの感染によって、全く異なる亜型に対する防御力が得られるかどうかに関しては、食い違う報告がなされている。H1N1 または H1N2 型の A 型インフルエンザウイルスにあらかじめ感染させたことがある 6 週齢の鶏に、その後にそれぞれ H5N3 または H5N1 亜型のウイルスで攻撃させると、事前の感染のなかった対照群に比べて発病率と死亡率が低くなった(1)。しかし、異なるヘマグルチニン亜型間の交差防御は非常に軽微のものしかないようである。ヘマグルチニンのある亜型に対する宿主の免疫反応は、それとは異なる亜型に

よる感染に対する防御力にならない(23)。過去の感染や、インフルエンザウイルス不活化ワクチンを用いた人工的免疫化によって誘導された特異抗原には、同じ亜型のインフルエンザウイルスの感染による病原作用に対する防御力がある(6)。その免疫メカニズムは、感染が起きやすい曝露環境における初回の感染を抑制することであると考えられる。または、免疫では初回の感染が防がれない場合でも、その後のウイルスの複製を病気を引き起こさない程度にまで減少させるということも考えられる。

ある新規の亜型のインフルエンザウイルスを用いた不活化ワクチンへの免疫反応は、接種された抗原の量に密接に関係する。鶏および七面鳥においては、接種を反復して行くと数週間のうちに抗体価が顕著に増大する(6)。

実験的に曝露させた七面鳥においては、抗体が長くて 7 か月間持続することが観察されている。その免疫反応(HI 力価)には加齢に伴う差は見られなかった(11)。

本稿の実験では、全粒子型不活化ワクチン製剤のヘマグルチニンおよびヌクレオカプシド成分に対するたコマール用七面鳥の免疫反応について調べた。同じ H 型を持つ野外株で攻撃し、その後の抗体反応、臨床症状、ウイルス排出量を測定することでワクチンの強さと有効性を判定する実験を行った。

表 1 ワクチンを 1 回投与した七面鳥におけるインフルエンザ(H4N8)に対する抗体反応

ワクチン 接種時 の週齢	ワクチン接種後の週数									
	二重免疫拡散					ヘマグルチニン抑制				
	1	2	3	4	5 ^A	1	2	3	4	5 ^A
2	0/10 ^B	1/10	2/10	2/8	6/7	0 ^C	0	2.6	3.5	91
4	1/10	5/140	5/10	2/10	7/7	0	0	8.6	8.6	239
6	1/10	2/10	6/10	5/10	7/7	0	0.15	3.7	9.0	104
総数	2/30	8/30	13/30	9/28	20/21	-	-	-	-	-
対照群	0/15	0/15	0/15	0/15	6/6	0	0	0	0	29

A 攻撃の 1 週間後。この時点までに各群あたり 3 羽を殺処分した。

B 陽性数 / 検査数

C 幾何平均した力価

材料と方法

実験的なデザイン 孵卵を同時に行い、孵化後一群として隔離したコマール用ニコラス種七面鳥 90 羽を用いた。七面鳥は、各部屋ごとに換気設備が独立した隔離施設に収容した。平飼い、完全飼料で飼育した。ワクチン接種の 4 週間後に各ワクチン群とワクチン未接種対照群とをそれぞれ別々の部屋に分けて収容し、攻撃を行った。

ワクチン接種群 A/turkey/Minnesota/78 (H4N4)単価油性エマルジョンワクチン (Maine Biological Laboratories [メイン州ウォータービル]製造)を試験した。1 回目の接種は 2、4、6 週齢のいずれかの時点で行った。各週齢群を 20 羽ずつで構成し、頸部前背側部の皮下に 1 ml 接種した。ワクチン接種した七面鳥の半数に、4 週間後に 2 回

目の接種を行った。おのおの 10 羽からなる各ワクチン接種群と、それに週齢をマッチさせたワクチン未接種の対照群 5 群に対して、ワクチン接種の 4 週間後に攻撃を行った。

ウイルス攻撃 野外症例から分離された低病原性インフルエンザウイルスである A/turkey/Minnesota/1248/80 (H4N2)を用いて攻撃を行った。感染尿膜腔液を未希釈で 0.5 ml (およそ 105.5EID₅₀/ml を含有)を用いて経鼻的に七面鳥各個体を攻撃した。

生ウイルスの経鼻的攻撃後は七面鳥を綿密な観察下に置き、咳、くしゃみ、顔面浮腫、元気消失、食欲不振、下痢の症状を観察した。攻撃の 7 日後の実験終了時に、生存している七面鳥をすべて殺処分し、綿密な剖検を行った。

ウイルスの分離と力価測定法 攻撃の 3 日後に、ワクチン接種群と未接種群の気管とクロアカの綿棒ぬぐいサンプルを採取した。それぞれの綿棒を、ペニシリン(100 U/ml)、ストレプトマイシン(200 µg/ml)、ゲンタマイシン(150 µg/ml)、ポリミキシン(100 U/ml)、ナスタチン(50 U/ml)を添加した veal infusion broth の中に 3 日間置いた。この veal infusion broth の 0.2 ml を 10 日齢の発育鶏卵に接種した。接種の 72 時間後に接種した卵から尿膜腔液を採取し、その赤血球凝集(HA)活性を調べた。発育鶏卵の中のウイルスの定量を、EID₅₀ 法(18)で測定した。各群から無作為に選んだ 3 羽から採取した材料(肺、気管、糞) 1 g を veal infusion broth で 25%の懸濁液にした。この懸濁液の 10 分の 2 ml について、発育鶏卵を用いてウイルススクリーニングを行った。材料にウイルスが含まれていることが判明した場合には、10 倍に希釈して、その希釈液を発育鶏卵に接種し、72 時間後に HA 活性を調べて、力価を測定した。

血清学的手法による免疫反応の検出 週ごとに血清を採取して、検査時まで -29 で保存した。(3,4)の記載に従って、二重免疫拡散法(DID)と赤血球凝集抑制(HI)検査を行った。HI 抗原には A/Turkey/Minnesota/80 (H4N1)ウイルスを用いた。HI 検査は U 字形マイクロタイターピペットを使い、ウェルごとに 8HA 単位の抗原を用いた。HI の結果は、(5)の概要に従って、各処置群ごとに平均して幾何平均力価(GMT)とした。

結果

血清学 ワクチン(H4N8)によって、ヌクレオカプシド抗原とヘマグルチニン抗原の両方に対する抗体が誘導され、DID および HI 検査によって測定可能であった。1 回目のワクチン接種後では、DID 抗体の反応は良好だったが、HI 抗体の濃度は低かった(表 1,2)。2 回目のワクチン接種後には既往反応が見られた(表 2)。ワクチン接種を 1 回ないし 2 回受けたすべて群において、攻撃後に既往反応が現れた(表 1,2)。

ウイルスの回収 個々の七面鳥から採取した気管とクロアカの綿棒ぬぐいサンプルと各群 3 羽ずつから採取した肺組織のウイルス回収量は、ワクチン接種群のほうが非接種群よりも少なかった(表 3)。ワクチン接種した 6 群のうち 4 群では、いずれの肺サンプルからもウイルスはまったく回収されなかった。全体として、ウイルス回収量で測定される感染に対する防御力は、ワクチン接種した鳥が 2 倍大きかった。

肺、気管、糞のサンプルにおけるウイルス量(表 3)を見ると、いずれのワクチン接種スケジュールであっても攻撃後のウイルス排出量がかなり減少すると考えられた。

臨床徴候と剖検病変 攻撃後のどの群にも臨床徴候は見られなかった。未接種対照群には軽度の気嚢炎が見られたが、ワクチン接種群にはまったく見られなかった。

表2 ワクチンを2回投与した七面鳥におけるインフルエンザ(H4N8)に対する抗体反応

ワクチン接種時週齢	ワクチン接種後の週数																	
	二重免疫拡散									ヘマグルチニン抑制								
	1	2	3	4	5 ^A	6	7	8	9 ^B	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	0/10 ^C	6/10	8/10	4/10	9/10	9/10	7/10	7/10	7/7	0 ^D	2.0	5.3	5.0	17.0	30	30	40	223
4	0/10	2/10	9/10	7/10	9/10	6/10	7/10	8/10	7/7	0	0	2.0	4.3	7.0	28	11	34	832
6	2/10	1/10	6/10	3/10	10/10	8/10	8/10	9/10	7/7	0	0.3	6.5	3.0	7.0	40	64	37	676
総数	2/30	9/30	23/30	14/30	28/30	23/30	22/30	24/30	21/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
対照群	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	6/6	0	0	0	0	0	0	0	0	96

A 2回目の接種の1週間後

B 攻撃の1週間後。この時点までに各群あたり3羽を殺処分した。

C 陽性数 / 検査数

D 幾何平均した力価

考察

インフルエンザ感染への感受性とワクチン接種への反応の制御における七面鳥の免疫状態の意義についてはこれまで明確にはされてこなかった。ミネソタ七面鳥におけるインフルエンザは、ウイルス曝露時に、その他のウイルス / 細菌性病原体や、長期にわたる環境ストレスが同時に見られるのが通常である(17)。そのために、低病原性株による感染や疾患に対するワクチンの有効性を決定するための優れた攻撃手法がこれまで存在しなかった。今回の試験では、感受性のある群が攻撃ウイルスによって気嚢炎病変を現した。感染や有症状疾患に対する防御力の程度は、免疫系がワクチンによって刺激される度合いによって決まる。

最適な抗原量が健康な七面鳥に投与された場合には、検出可能な抗体反応が起きるのが通常である。しかし我々が以前行った試験では、ワクチン接種に対する抗原反応が不良であっても、ワクチン接種群の死亡率は未接種群よりも優位に低くなった(12)。

今回の試験では、H4N8抗原に対する七面鳥の血清学的反応は低かった。これはBrughら(6)の報告に一致しており、その報告では、HI反応はワクチン接種のウイルス株、抗原濃度、動物種によって影響を受けることが示された。我々の観察でも、七面鳥はインフルエンザの各亜型を通じて、DID試験上で一貫した反応は示さなかった(データ未掲載)。

我々の試験の一部において防御力が観察されたのに有意なHI力価が見られなかったのは、おそらく、局所性ないし細胞性免疫機構のためか、HI試験に感度がなかったためだと思われる。ワクチン誘導性の抗体と抵抗力の

程度との間には相関があり、また、ヒトの野外試験の経過で見られた経験的観察もあることから、誘導された HI 力価が 128 というのは、ヒトにおいては一貫して高い防御力であると言える(15,21)。レベルが閾値未満出あることは、ワクチンの有効性の予測に関して確実性を危ぶむ懸念を生む。だが、ヒトにおいて最低限の防御力になるために最小限必要な血清 HI 力価は、同型のウイルスに対して 24 から 48 であることがこれまでの研究で報告されているので(10)、これでは不完全であるということにはなり得ない。これまでの試験の結果(未掲載)では、七面鳥においては HI 力価の幾何平均が約 315 で、同型のウイルスの攻撃に対する HI 既往反応の発現が予防されることが示されている。この群では攻撃の3日後の気管ぬぐいサンプルの11%からウイルスが回収されたことから、これは完全な防御力にはならなかった。以前の研究では、鶏および七面鳥においてさまざまなウイルスの濃度によるワクチン接種で発病と死亡が防御できたが、攻撃後の既往反応を予防することはできなかった(6)。既往反応と感染防御の欠如は、発病と死亡を予防するワクチンの有効性の指標としては不適切であることが考えられる。

攻撃 3 日後のウイルス回収についてを表 3 に示した。陽性%は、今回の試験における全七面鳥の気管と糞便のぬぐいサンプルと、各群から無作為に選んだ 3 羽の肺についてである。ウイルス力価測定の結果は、各群から無作為に選んだ 3 羽の材料(気管、肺、糞便)1 g で得たものである。ウイルス力価測定の作業によって V2V6C10 群の 1 羽からウイルスが分離されたが、これは直接的なぬぐいサンプルでは分離されなかった。その反対に、ひとつの群のうち 1~3 羽からぬぐいサンプルで検出されても、無作為に選んだ 3 羽からは検出されないことがときどきあった。

血清中の抗体によって、感染後のマウスの肺に存在するウイルスの量が抑えられることが示されている。しかし、防御群の中においても個々のマウス個体の抗体濃度と感染への抵抗力との相関はあまりよくなかった(20)。我々の実験では、ワクチン未接種の鳥から得た肺のうち 18 個が、検出可能なレベルの抗原を発現した。ワクチン接種した鳥では、18 個の肺のうちでウイルスが陽性であったのは、2 個のみであった。肺においてウイルスが陰性であったワクチン接種済七面鳥の 4 羽は、循環血液中に検出可能なレベルの HI 抗体がなかった。こうした鳥における防御のメカニズム(5)は不明である。

ワクチン接種群のほとんどで攻撃後に既往反応が現れたことは、たとえ攻撃された七面鳥には臨床徴候や剖検での異常がまったく見られなかったとしても、これらの鳥が攻撃ウイルスの感染にたいして防御されていなかったことを示す。攻撃後に既往反応を示した鳥はおそらく感染したのであろう。これまでの研究では、ウイルスの複製なしに抗体反応を強化するには攻撃用量が不十分であった(6)。

このワクチン接種プログラムの野外条件における有用性を正確に判定することは、野外の攻撃を予測することができないために、現在のところ方法がない。しかしこのワクチンには有用な効果があることが今回の実験で強く示されており、野外の経験では、ミネソタ州においてワクチン接種された数百万羽の七面鳥から同型の H 亜型はまったく分離されていない。

表 3 攻撃の 3 日後におけるウイルス回収量

群 A	陽性% B			力価平均値 C		
	気管	肺	糞	気管	肺	糞
V2C6	30	0D	30	0	0	0
C6	100	100	80	1.9×10^6	8.7×10^2	9.7×10^4
V2V6C10	0	0	30	$< 1 \times 10^1$	0	0
C10	80	100	60	$< 1 \times 10^1$	1.1×10^2	6.9×10^5
V4C8	30	0	20	0	0	0
C8	100	100	60	$< 1 \times 10^1$	9.3×10^2	1.1×10^4
V4V8C12	10	33	10	$< 1 \times 10^1$	1.1×10^2	1×10^2
C12	80	100	100	1.8×10^3	$< 1 \times 10^1$	7.5×10^4
V6C10	50	33	20	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$
C10	110	100	40	$< 1 \times 10^1$	1.1×10^2	8.7×10^3
V6V10C14	10	0	10	0	0	0
C14	20	100	80	7.7×10^2	1.1×10^2	2.7×10^4

A V = ワクチン接種群、数値は週齢を表す。C = 対照群

B 気管ぬぐいサンプルと糞サンプルについては、各ワクチン接種群から 10 羽ずつと対照群から 5 羽のもの。肺サンプルは無作為に選択した 3 羽のもの。

C 10 羽のうちから無作為に選択した 3 羽

D ウイルスは回収されなかった