

**北米株およびヨーロッパ株による H5N2 型鳥インフルエンザウイルス
不活化ワクチンはアジア株 H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルスから
鶏を防御する**

Avian Pathology (April 2006) 35(2), 141-146

David E. Swayne*, Chang-Won Lee, Erica Spackman

米国農務省農業研究部南東部家禽研究所 (College Station Road 934, Athens, GA 30605, USA)

高病原性 (HP : high-pathogenicity) 鳥インフルエンザ (AI : avian influenza) ウイルスのサブタイプ H5N1 は、1996 年の初報以来、アジアの 9 つの国/地域の鳥類に空前の動物間流行病を引き起こしている。将来的な根絶を目的としたこの感染の管理の方法としてワクチン接種が浮上してきている。本試験は、ヨーロッパ株と北米株の低病原性 AI ウイルス由来の 2 種類の H5N2 型市販のワクチン株が、新しい H5N1 型 HPAI ウイルスアジア株から鶏を防御する可能性を判定するために実施された。ワクチンウイルスである北米株およびヨーロッパ株と、感染攻撃ウイルスである H5N1 型 HPAI インドネシア株の血球凝集素蛋白 HA1 セグメントのアミノ酸配列の相同性は、各々 84% および 91% と推定された。これら 2 種のワクチン株は、臨床症状および死亡に対して完全な防御効果を示した。これらのワクチンによって感染個体数の減少がみられ、ウイルス増殖のピーク時における呼吸器・腸管からの排出ウイルス数は減少した。さらに、排出されるウイルス量は 50% 胚感染量で $10^4 \sim 10^5$ 減少した。ワクチン接種群内の感染鶏は、特異的ノイラミダーゼ阻害試験によって同定が可能であった。以上のデータから、現在利用可能なヨーロッパ株および北米株系 H5 ワクチンは、H5N1 型 HPAI ウイルスアジア株から鶏を防御し、H5N1 型 HPAI ウイルスによる環境汚染を低減させることが示唆される。これらのワクチンは、ウイルス伝播を低減させるためのバイオセキュリティ対策の有効な手段の 1 つとなると考察される。

緒言

高病原性 (HP) H5N1 型鳥インフルエンザ (AI) アジア株は、1996 年に中国の食用ガチョウで最初の大発生が報告され (Xu ら、1999)、その後、香港や中国で大発生が続いている (Sims ら、2003a, b ; Chen ら、2004)。2003 年 12 月からは、東アジアおよび東南アジアの 9 カ国において、家禽、野生鳥類または捕獲された非家禽鳥類において H5N1 型 HPAI の発生が報告された (Li ら、2004 ; Lee ら、2005)。コントロール対策の主要措置として、隔離、殺処分、清掃洗浄および消毒が用いられた (FAO 2004)。さらに、中国、香港およびインドネシアでは、この疾患の予防または管理に有効な対策として、最終的な根絶を目的とした H5 型鳥インフルエンザ不活化ワクチンを用いたワクチン接種プログラムが制定されている (FAO、2004)。

市販および実験的 H5 型 AI 不活化ワクチン、H5 型 AI 血球凝集素遺伝子を組み入れた遺伝子組換え鶏痘ワクチンおよびバキュロウイルス圧搾血球凝集素蛋白ワクチンが、人および鶏から分離された H5N1 型 HPAI ウイルス 1997 年香港株に対して鶏を防御することは、これまでに明らかとなっている (Swayne ら、2000a、b、2001)。香港は、1997 年からの 3 度にわたる H5N1 型 HPAI の大発生を受けて、2002 年 4 月、生鳥市場で販売する農場で飼育される鶏に対してのワクチン接種プログラムを導入した (Sims ら、2003a)。1994 年にメキシコの鶏から分離された低病原性 (LP: low-pathogenicity) H5N2 型 AI ウイルス株を含有する現行の市販の不活化ワクチンを使用した。2003 年、このワクチン接種プログラムは範囲を広げ、中国本土から輸入される全ての鶏が対象となった (Ellis ら、2004c)。このワクチン接種プログラムの導入後、鶏において鳥インフルエンザの罹患や死亡の発生は見られていない (Ellis ら、2004b、c)。

十分な予防効果を得るために頻繁な変更が必要なヒトインフルエンザワクチン株とは異なり、鶏用の H5 型 AI ワクチンは分離された H5 型 AI ウイルスに対して長年にわたり予防効果を示すことが証明されている (Swayne ら、1999、2000a、b)。しかし、最近、メキシコで 9 年間使用された H5N2 型不活化ワクチンを再評価したところ、野外ウイルスの顕著な変異がみられ、もはや中央アメリカに蔓延している H5N2 型 LPAI ウイルスに対しては予防効果がないことが判った (Lee ら、2004)。本試験は、インドネシアの鶏から分離された H5N1 型 AI ウイルス 2003 年アジア株に対して、現在市販されている異なるバックグラウンドを持つ 2 種類のワクチンの防御効果を判定するために実施された。

材料および方法

ウイルス . ワクチンウイルスは市販のワクチンを供試し、これは LPAI ウイルス株 A/duck/Potsdam/1402/86 (H5N2) (Potsdam/96) (Matrosovich ら、1999) および A/chicken/Mexico/232/94 (H5N2) (Mexico/94) (Lee ら、2004) 由来であった。感染攻撃ウイルスは、HPAI ウイルスアジア株 A/chicken/Indonesia/7/03 (Indonesia/03) を使用した。このウイルスは、2003 年 12 月初旬にプロイラーで高死亡率が発生した 1 農場から提出された診断材料から分離された。AI ウイルスは、全て、標準法により (Swayne ら、1998)、9 日齢発育鶏卵の尿膜腔内に接種して増殖させた。

連絡先: TEL: +1 706 546 3433、FAX: +1 706 546 3161、E-mail: dswayne@seplr.usda.gov
2005 年 8 月 22 日受付、2005 年 10 月 29 日条件付き受理。2005 年 11 月 28 日受理。

ISSN 0307-9457 (印刷物) /ISSN 1465-3338 (オンライン) /06/20141-06©2006 Houghton Trust Ltd

DOI:10.1080/03079450600597956

ワクチン中 AI ウイルスの定量 . ワクチンウイルス定量のための RNA 抽出。オイルエマルジョンワクチンから RNA を抽出する特殊な方法を開発した。ワクチンは、回転式振とう器を用いて室温で中速度 30 分間混和後、100 μ L を取り分け、ヌクレアーゼ不含有水 150 μ L と Trizol LS 試薬 750 μ L (Invitrogen, Inc. Carlsbad, California, USA) を添加した。そのサンプルを、ボルテックスで混和、室温にて 7 分間インキュベート後、クロロホルム 200 μ L を添加した。さらに、室温にて 7 分間インキュベート後、14000 x g、15 分間遠心分離した。上部 2 層を同時に取り、同量の RLT 緩衝液 (Qiagen, Inc., Valencia, California, USA) および同量の 70%エタノールを添加して、転倒混和した。Qiagen RNeasy カラム (Qiagen, Inc.) に注入し、キットの使用法に従って洗浄およびヌクレアーゼ不含有水に溶出させた。オイルエマルジョンワクチンからの各 RNA の抽出は、各々 6 回反復し、再現性を確認した。

定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 . 定量標準物質として相同なウイルス分離株を使用した。尿膜腔液ウイルス保存株をブレインハートインヒュージョン培地 (Becton-Dickinson, Sparks, Maryland, USA) で希釈し、標準法にしたがって (Swanye ら、1998) 発育鶏卵の希釈倍数で滴定した。同じ方法で、ワクチンサンプルからウイルスの全 RNA を抽出した。インフルエンザマトリックス遺伝子についてリアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RRT-PCR) を実施した (Spackman および Suarez, 2005)。全 6 種の RNA 抽出物は、サンプルごとに個別に測定を行った。既に報告されているように、オイルエマルジョンワクチンから抽出した RNA には AI ウイルスは含まれていなかったため、陰性対照として使用した。ワクチン中の血球凝集素 (HA) 蛋白量は、ワクチンの感染価および HA 蛋白量を報告した過去のデータ (Swayne ら、1999) から算出した。

系統発生解析および塩基配列の比較 . ワクチンウイルスの塩基配列は Genbank より入手し (AF082042 および AV497063)、感染攻撃ウイルスの塩基配列は Genbank に提出した (Genbank 承認番号申請中)。これら 3 種のウイルス全ての血球凝集素遺伝子 HA1 領域について、Clustal W アルゴリズム (Lasergene, DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA) を用いてアライメントを行った。500 回のブートストラップを実施した発見的探索法による最大節約系統樹作製法を用いた PAUP* 4.0b10 (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, マサチューセッツ州、USA) で系統樹を作成した。

動物および飼育 . 米国農務省南西部家禽研究所で維持されていた鶏群より 3 週齢の SPF 白色レグホン種を入手した。試験のワクチン接種および感染攻撃のため、鶏は陰圧のステンレス製アイソレーションキャビネット内で飼育した。HEPA フィルターでろ過した空気での換気を行い、連続照明とした。感染攻撃試験は全て、米国農務省の承認を受けたバイオセーフティレベル 3 の農場施設で実施した。飲水および飼料は自由摂取とした。

試験計画 . 1 群あたり 10 羽の鶏の頸部に皮下に、Nobilis Hepatitis +ND 不活化 (Intervet、Boxmeer、オランダ：プラセボ)、Nobilis IA 不活化 (Mexican/94) および Nobilis インフルエンザ H5N2 (Potsdam/86) の 3 種類のワクチン各 0.5 ml を接種した。ワクチン接種後 3 週間目に HPAI ウイルス indonesia/03 株 $10^{6.0}$ 50% 胚致死量 (ELD₅₀) を鶏の鼻腔内に接種し、感染攻撃を行った。臨床症状を感染攻撃後 14 日間記録し、ワクチンによって得られる防御効果を確認した。臨床症状としては、消瘦、うずくまり姿勢、起立遅延または不能ならびに翼の下垂、そして死亡が観察された。

ワクチン接種日、感染攻撃日、感染攻撃後 14 日に、各個体から血清を採取した。核蛋白/マトリックス蛋白に対する抗体の有無 (寒天ゲル沈降 [AGP] 試験)、血球凝集素 (血球凝集素阻害 [HI] 試験) およびノイラミダーゼ (ノイラミダーゼ阻害 [NI] 試験) について血清を検査した (Van Deusen ら、1983、Swayne ら、1998)。HI 試験では、10 倍以上の力価を陽性とみなした。感染攻撃後 2 日に口咽頭および総排泄腔ぬぐい液を採取し、標準法にしたがって (Swayne ら、1998) 10 日齢 SPF 発育鶏卵でのウイルス分離および力価測定を実施した。予備試験では、感染攻撃後 2 日の分離ウイルス力価が最も高かった。力価はぬぐい液 1 mL あたりの ELD₅₀ で示した。

統計分析 . パーソナルコンピュータ用ソフトウェア (SgimaStat 2.0, Jandel Scientific, San Rafel、カリフォルニア州、USA) を用い、罹患率、死亡率、ウイルス分離率および抗インフルエンザウイルス抗体検出率の有意性 ($P < 0.05$) を Fisher の正確確率検定により検定した。ウイルス分離および血清 HI 力価の正規性を検定した。正規分布していたデータセットは、パラメトリックな一元配置分散分析 (ANOVA) でさらに検定した。これらの有意差のある ANOVA データセットは、さらに Student-Newman-Keuls の多重比較検定で検定した。データセットが正規分布していない場合は、ノンパラメトリックな分散分析法 (Kruskal-Wallis) で解析し、有意差のある群 ($p < 0.05$) については Dunn の多重比較検定を行った。正規性、ANOVA、Kruskal-Walis、Student-Newman-Keuls および Dunn の検定は、パーソナルコンピュータ用ソフトウェア (SigmaStat) で行った。

本試験のウイルス分離法によって検出された最小ウイルス力価は $10^{1.0}$ ELD₅₀ /ml であった。したがって、統計分析では、ウイルスが分離されなかった全ての口咽頭および総排泄腔ぬぐい液を $10^{0.9}$ ELD₅₀ /mL とした。これは、1 サンプルあたり発育鶏卵 3 個を使用するのではなく、発育鶏卵 4 個を使用するようにウイルス分離法を変更した場合の最低ウイルス検出レベルに相当する。

結果

ワクチン中 AI ウイルス量の定量 . AI ウイルス標準力価曲線および定量的 RRT-PCR より、Potsdam/86 および Mexico/94 AI ウイルス分離株を含有するワクチンのウイルス力価はワク

チン 1 mL あたり各々 $10^{5.1}$ および $10^{5.9}$ ELD₅₀ に相当した。血球凝集素蛋白に関する以前の力価測定 (Swayne ら、1999) から、Potsdam/86 および Mexico/94 AI ウイルス分離株 1 mL 中の HA 蛋白量は各々0.025 および 0.16 μ g、すなわち 接種 1 回あたりの HA 蛋白量は各々 0.0125 および 0.08 μ g に相当すると考えられる。

系統発生解析および塩基配列比較 . 感染攻撃ウイルス Indonesia/03 と 2 種類の AI ワクチンウイルスの HA1 遺伝子配列を比較した。感染攻撃ウイルス indonesia/03 株は、Mexico/94 分離株よりも Potsdam/86 株により近縁であった (図 1)。Potsdam/86 分離株と 感染攻撃ウイルス Indonesia/03 株のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の相同性は、各々 89.4% および 91.9% であった。Mexico/94 分離株と感染攻撃ウイルス Indonesia/03 株のヌクレオチドとアミノ酸配列の相同性は、各々 78.5% および 84.8% であった。3 種の分離株はともに、11 番および 286 番に N 結合型糖鎖付加の可能性のある同一部位が存在する。

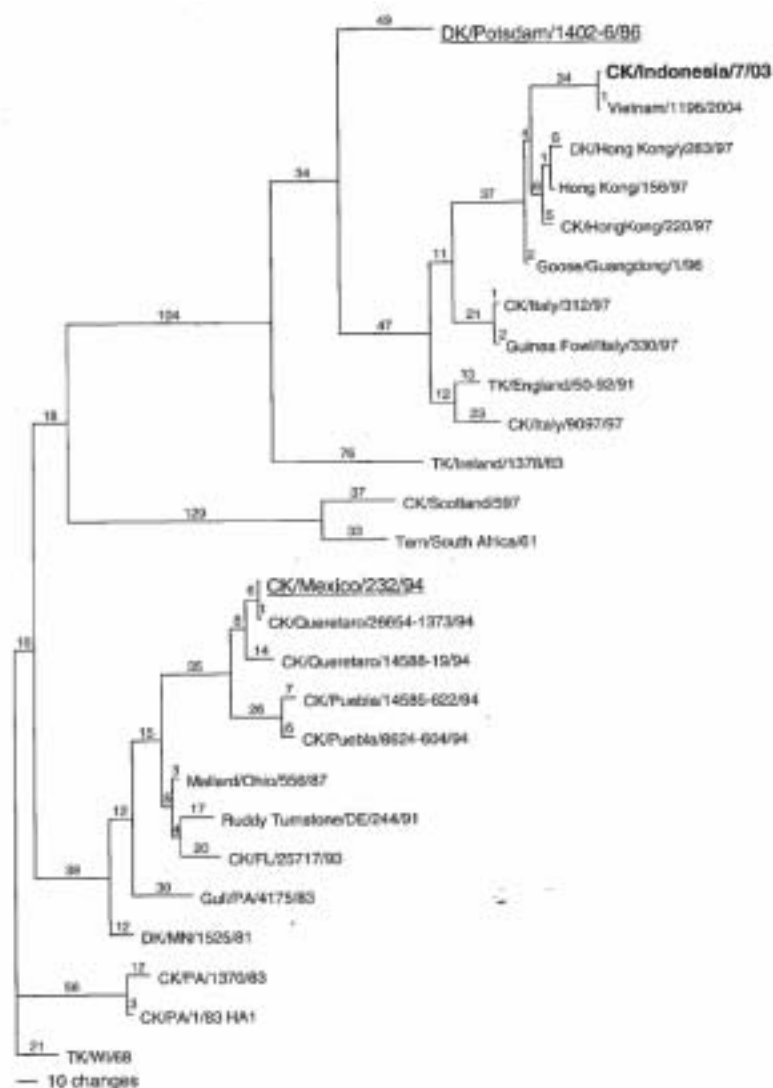


Figure 1. Phylogenetic tree with the selected H5 subtype HAI segment of the haemagglutinin gene. The tree was constructed with PAUP 4.0b10 with the maximum parsimony tree building method by heuristic search with 500 bootstrap replicates. Sequence distances are noted on the tree. The vaccine viruses used in this study are underlined and the challenge strain appears in bold-face type. CK, chicken; DK, duck; TK, turkey. States are denoted by their standard two-letter postal code.

血清学的検査 . ワクチン接種日の AGP、HI (H5) および NI (N1、N2) 抗体は、全個体とも陰性であった。感染攻撃日、プラセボワクチン群では抗 AI 抗体陰性であった (表 1)。しかし、Mexico/94 および Potsdam/86 H5N2 型ワクチン群では、ワクチン接種 3 週間後に AGP および HI 抗体が各々 100% および 90% 誘導され、感染攻撃後 14 日目に生存した個体の AGP および HI 抗体保有率は 100% であった。感染攻撃日の平均 HI 力価については、2 種類の AI ワクチン群に有意差は認められなかった。感染攻撃後 14 日には、両 AI ワクチン群の力価が 3 倍に上昇し、既往応答が見られた。数字の上では Mexico/94 群の平均力価の方が高いが、Potsdam/86 群の平均力価との有意差は認められなかった (表 1)。NI 抗体に関して、H5N2 型ワクチン群では、感染攻撃前および感染攻撃後ともに N2 抗体が 100% 確認されたが、N1 抗体が確認されたのはわずかな割合であり H5N1 型 HPAI ウイルスによる感染攻撃後に

限られていた。

罹患率、死亡率および感染率 . Indoneasia/03 株による感染攻撃後、プラセボ群では全個体が臨床徴候を発現し、死亡した（表 2）。感染攻撃後 2 日には、プラセボ群全個体の口咽頭および総排泄腔から、高力価のウイルスが回収された。2 種類のワクチンは、臨床症状および死亡を 90 ~ 100% 予防した。Potsdam/86 接種群では 1 個体が臨床症状を発現し、死亡した。この個体は、感染攻撃日に抗 AI 抗体が確認されなかった。

ウイルス排出ピーク時（感染攻撃後 2 日）の調査では、2 種類のワクチンによって感染個体数および排出される感染攻撃ウイルス数は減少した。総排泄腔ぬぐい液では、ワクチン接種群のウイルス排出個体数は減少し、プラセボ投与群と比べて有意に少なかった。しかし、ワクチン接種群間のウイルス排出個体数には有意差は認められなかった。口咽頭ぬぐい液では、プラセボ群に対して Mexico/94 群は有意に減少していたが、2 種類のワクチン群間には有意差は認められなかった（表 2）。2 種類のワクチン群では、排出される感染攻撃ウイルス量がプラセボ群と比べて $10^4 \sim 10^5$ EID₅₀/1 mL 有意に減少していたが、排出される感染攻撃ウイルス量にはワクチン接種群間の差は認められなかった（表 2）。

Table 1. Serological data from chickens vaccinated at 3 weeks of age and challenged intranasally at 6 weeks of age with $10^{6.5}$ EID₅₀ Indoneasia/03 HPAI virus

Vaccine group	AGP serology ^a (number positive/total)		HI serology ^a (number positive/total) (GMT)		NI serology ^a (number positive/total)			
	Pre-challenge	Post-challenge	Pre-challenge	Post-challenge	Pre-challenge		Post-challenge	
					N1	N2	N1	N2
Sham	0/10 ^A	NA	0/10 ^A (<8) ^{3a}	NA	0/10 ^A	0/10 ^A	NA	NA
Mexican/94	10/10 ^B	10/10 ^A	10/10 ^B (128) ^{3b}	10/10 ^A (776) ⁴	0/10 ^A	10/10 ^B	2/10 ^A	10/10 ^A
European/86	9/10 ^B	9/9 ^A	9/10 ^B (120) ^{3b}	9/9 ^A (445) ⁴	0/10 ^A	9/10 ^B	1/9 ^A	9/9 ^A

Pre-challenge was 3 weeks after vaccination and post-challenge was 2 weeks after challenge.

^aAll birds were negative for anti-AI viral antibodies on the day of vaccination. HI titres reported as the geometric mean titre (GMT). Different uppercase superscripts denote significance between treatment groups; Fisher's exact test, $P < 0.05$. Different lowercase superscripts denote significance ($P < 0.05$) between treatment groups using one-way ANOVA, or Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks when the normality test failed, or Mann-Whitney rank sum test when comparing groups 2 and 3 of HI serology p.c.

考察

本試験において、2 種類の市販の H5N2 型 AI ワクチンは両方とも、高用量の H5N1 型 HPAI ウイルス 2003 年インドネシア株で感染攻撃した鶏に対し同等の防御効果を示した。この防御効果とは、死亡および臨床症状の予防、感染攻撃後 2 日目の感染個体数および呼吸器・消化管から排出される感染攻撃ウイルス量の減少、ならびに抗インフルエンザウイルス抗体の産生であった。既報では、ウイルス複製のピーク日だけでなくピーク前後の数日間にわたり感染個体数および呼吸器・腸管から排出される LPAI または HPAI 感染攻撃ウイルス量の減少が明らかとなっている（Stone、1987 ; Kodihalli ら、1994）。しかし、このような予防効果は、ワクチン接種済みの鶏がまったく感染しない、あるいは少量のウイルスさえ排泄しない

ことを示しているわけではない。臨床的に疾病が認められずに感染している個体（すなわち「不顕性感染」）が存在していることから、野外での AI ウイルスの伝播、拡散および維持を予防するための管理戦略にはバイオセキュリティ対策の導入が必要である（Swayne ら、1997；Swayne および Akey、2005）。有効な予防接種によって、家禽間の HPAI ウイルスの接触感染が低減したことがこれまでに報告されている（Swayne ら、1997）。

有効なワクチンには適量の HA が不可欠であるが、従来の検査法を用いた HA 含量の定量には問題がある。この方法では、油脂や乳化によって最終製品を製剤化する前に、HA 蛋白、血球凝集単位または感染力価を測定する。HA 蛋白含量の測定は、最も直接的な方法であるが、複雑で比較的感度が低い方法であるためウイルスを大量に増殖させる必要があり超遠心で濃縮し一元放射免疫拡散法で測定する（Wood ら、1985；Swayne ら、1999）。血球凝集単位は HA 蛋白含量の間接測定法として使用されているが HA 蛋白含量との相関性は低く、感染力価は HA 含量との相関性が良好である（Swayne ら、1999）。一方、間接定量的 RRT-PCR は、HA 含量と相関している RNA 量を技術的に正確に測定するもので、ワクチンを製剤化する前でも製剤化した後でも使用することができる。各サンプルを各々6回測定した結果は、今回の測定では 1.5 サイクルの標準偏差の正常範囲内であったので、定量的 PRT-PCR 測定は有望であると考えられる（Spackman および Suarez、2005）。さらに、PRT-PCR 産物のサイズは小さく 99 塩基対であるため、ワクチン中での RNA 分解の影響は軽微なものと考えられる。本試験では、定量的 RRT-PCR 測定を用いてワクチン中の HA 含量を測定し、ウイルス感染力価と比較して HA 蛋白含量を求めた。

Table 2. Morbidity, mortality and virus isolation data from 3-week-old chickens vaccinated with inactivated AI vaccine at 3 weeks of age and intranasally challenged at 6 weeks of age with $10^{6.0}$ EID₅₀ Indonesia/03 HPAI virus

Vaccine group	Morbidity (number ill/total)	Mortality (number dead/total) (mean time to death [days])	Virus isolation, day 2 p.c. (number positive/total, log ₁₀ EID ₅₀ titers/ml)	
			Oropharyngeal swab	Cloacal swab
Sham	10/10 ^A	10/10 ^A (2.2)	10/10 ^A (6.16) ^{3a}	10/10 ^A (5.82) ³
Mexican/94	0/10 ^B	0/10 ^B	5/10 ^B (1.23) ^{3b}	3/10 ^B (1.00) ^{3b}
Potsdam/86	1/10 ^B	1/10 ^B (2.0)	6/10 ^{AB} (1.78) ^{3b}	3/10 ^B (1.53) ^{3b}

Different uppercase superscripts denote significance between treatment groups; Fisher's exact test, $P < 0.05$. Different lowercase superscripts denote significance ($P < 0.05$) between treatment groups using one-way ANOVA or Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks when the normality test failed.

既報では、Mexico/94 ワクチン株 HA 蛋白 0.016 μ g は、感染攻撃ウイルス H5N2 型 HPAI メキシコ株（A/chicken/Queretaro/14588-19/94 [H5N2]）に対して 50%感染予防量（PD₅₀）であった（Swayne ら、1999）。本試験における Mexico/94 および Potsdam/86 ワクチンの HA 蛋白含量は各々0.0125 および 0.08 μ g と優れており、臨床徴候および死亡に 90~100%の防御効果を示し、感染攻撃ウイルス indonesia/03 株の複製を大幅に抑制した（ $10^4 \sim 10^5$ に対して $10^1 \sim 10^{2.1}$ EID₅₀/mL）。鶏の週齢、ワクチン接種経路と部位および感染攻撃ウイルス量は両試験間で同一であったことから、この優れた防御効果は独自のアジュバントシステムによるものと考えられる。既報では Mexico/94 ワクチンと H5N2 型 HPAI 感染攻撃ウイルス株

の HA1 アミノ酸配列の相同性は 98.2%であったのに対して (Swaine ら、1999)、本試験におけるワクチンと感染攻撃ウイルス間の HA1 アミノ酸配列の相同性は各々 89.4 および 91.9%にすぎなかったにもかかわらず優れた防御効果が明らかであった。鶏痘-H5 型 AI 遺伝子組換えワクチンに関する鶏を対象とした研究では、感染攻撃ウイルスとワクチン株間の口咽頭ぬぐい液の力価低下の亢進と HA アミノ酸配列の相似性の増大 (87.3% ~ 100%) の間に有意な相関性が証明された。しかし、不活化ウイルスワクチンを使用した別の試験では、ワクチンと感染攻撃ウイルスの HA アミノ酸配列の相同性 (91.7% ~ 100%) とは関係なく、口咽頭ぬぐい液での複製がかなり減少していることが証明された (Swayne、1999、2000a)。

香港では、2002 年以降、Mexico/94 ワクチン株が使用されており、鶏に防御効果を示し、野外の AI 対策に有効であることが証明されている (Ellis ら、2004a、b)。従来の AI 北米株不活化ワクチン、H5N1 型 AI リバースジェネティクスワクチンおよび AI H5 遺伝子を組み込んだ遺伝子組換え鶏痘ワクチンなど、その他のワクチンが、多様な H5N1 型 HPAI アジア株に防御効果があることは実験室内で証明されている (Swayne ら、2001; Liu ら、2003; Qiao ら、2003; Swayne、2004; Swayne および Beck、2005)。このことは、人の A 型インフルエンザのサブタイプ H1 および H3、ならびに B 型インフルエンザワクチン株では抗原性が急激に変異するため頻繁に変更しなければならないが、家禽の H5 型 AI ワクチン株ではこのような必要性はないことを示唆している。しかし、家禽感染攻撃モデルにおける AI ワクチンウイルスの評価は、蔓延している野外ウイルスに対する防御効果を評価するために、少なくとも 2 年毎に行う必要がある。防御効果が不十分であれば、ワクチン株を変更する必要がある。さらに、十分な抗原量の高品質のワクチンだけを認可し、使用しなければならない (Garcia ら、1998)。

家禽集団における AI ウイルス感染の有病率を評価する際にはサーベイランスが不可欠であり、コントロール対策の各項目の有効性を評価するには適切な特異的血清学的サーベイランスがきわめて重要である (Swayne および Suarez、2000)。適正に計画された血清学的サーベイランスなしにワクチン接種を行うと、ワクチン接種群内における感染の検出および科学的な根拠に基づいたコントロールプログラムの変更実施が妨げられるために、根絶への取り組みは大幅に制限されると考えられる (Capua ら、2003; Swayne、2003)。AGP、ELISA および HI などの従来の血清学的検査は、各々、核蛋白/マトリックス蛋白に対する抗体ならびに血球凝集素を検出するもので、不活化全粒子 AI ワクチンの接種によって誘導される。このようなワクチン接種集団において感染を検出するには、ワクチン未接種の指標個体の AGP および HI 試験、ワクチン接種個体の非構造蛋白または異種ノイラミダーゼに対する抗体を検出する特殊な試験など、特別な検出法をあらかじめ計画した上で実施する必要がある (Beard、1987; Swayne および Suarez、2000; Capua ら、2003; Swayne、2003; Tumpey ら、2005)。本試験では、H5N2 型 AI ワクチン接種群において AGP、HI (H1) および NI (N2) 抗体が

証明された。Mexico/94 ワクチン接種群 10 羽中 6 羽の HI 既往応答が $3 \log_2$ で認められたにもかかわらず、N1NI 抗体が検出されたのは H5N1 型 HPAI ウイルスで感染攻撃後においてワクチン接種群の少数の個体のみであった。このことから、NI 試験は、その感度が HI 既往応答よりも低いために不活化ワクチン接種免疫群で感染を検出するための個別検査法としては実用的ではないが、農場レベルでの検出には有用であることが示唆される。野外では、ワクチン未接種のおとり鶏およびワクチン接種群の異種ノイラミダーゼ試験の両方に使用され、成果をあげている (Halvorson, 2002 ; Capua ら、2003 ; Swayne および Akey, 2005)。最後に、定量的 RRT-PCR は、さらに評価の必要はあるものの、抗体に基づく放射免疫拡散法とは異なり抗原性変異の影響を受けず、オイルエマルジョンワクチンの HA 含量の評価に使用することが可能だと考えられ、また、最終製品の定量的評価が可能であるという有効性もあわせ持っている。

謝辞

本試験における Joan Beck、Scot Lee および James Doster の技術的支援に深謝する。

図 1 の説明 :

選抜した H5 サブタイプの血球凝集素遺伝子 HA1 セグメントの系統樹。この系統樹は、500 回のブートストラップを実施した発見的探索法による最大節約系統樹作成法を用いた PAUP 4.0BI0 によって作成した。配列間の距離は系統樹に示す。本試験で使用したワクチンウイルスには下線をつけ、感染攻撃株は太字で表す。CK ; 鶏、DK ; アヒル、TK ; 七面鳥。州は、2 文字の標準郵便番号で示す。

表 1 の説明 :

3 週齢でワクチン接種し、6 週齢で HPAI ウイルス Indonesia/03 株 $10^{6.0}$ EID₅₀ で感染攻撃した鶏群の血清学的データ

1/ワクチン群

2/血清 AGP 試験 (陽性数/総数)

3/感染攻撃前

4/感染攻撃後

5/血清 HI 試験^a (陽性数/総数) (GMT)

6/血清 NI 試験^a (陽性数/総数)

7/プラセボ

Mexican/94

European/86

8/ 感染攻撃前はワクチン接種後 3 週間であり、攻撃感染後は感染攻撃後 2 週間であった。

^a ワクチン接種日、全個体の抗 AI ウイルス抗体は陰性であった。HI 力価は、相乗平均力価

(GMT)として報告した。

大文字は、各々、処置群間の有意差を意味する (Fisher の正確確率検定、 $P<0.05$)。小文字は、各々、一元配置 ANOVA、正規性検定が否定された場合の Kruskal-Wallis の順位による一元配置 ANOVA、または感染攻撃後の血清 HI 試験で第 2 群と第 3 群を比較する場合の Mann-Whitney の順位和検定を用いた処置群間の有意性 ($P<0.05$) を示す。

表 2 の説明：

3 週齢で AI 不活化ワクチンを接種し、6 週齢で HPAI ウイルス Indonesia/03 株 $10^{6.0}$ EID₅₀ で経鼻感染攻撃した鶏群の罹患率およびウイルス分離データ

1/ワクチン群

2/罹患率 (病鳥数/総数)

3/死亡率 (死亡数/総数) (死亡までの平均期間[日])

4/感染攻撃後 2 日目のウイルス分離

5/ (陽性数/総数、 \log_{10} EID₅₀ 力価/mL)

6/口咽頭ぬぐい液

7/総排泄腔ぬぐい液

8/プラセボ

Mexican/94

Potsdam/86

9/大文字は、各々、処置群間の有意性を表す (Fisher の正確確率検定、 $P<0.05$)。小文字は、各々、一元配置 ANOVA または正規検定が否定された場合の Kruskal-Wallis の一元配置 ANOVA 順位検定を用いた処置群間の有意性 ($P<0.05$) を表す。

References

- Beard, C.W. (1987). To vaccinate or not to vaccinate. In C.W. Beard (Ed.), *Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza* (pp. 258–263). Richmond, VA: US Animal Health Association.
- Capua, I., Terregino, C., Cattoli, G., Minelli, F. & Rodriguez, J.F. (2003). Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathology*, *32*, 47–55.
- Chen, H., Deng, G., Li, Z., Tian, G., Li, Y., Jiao, P., Zhang, L., Liu, Z., Webster, R.G. & Yu, K. (2004). The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *101*, 10452–10457.
- Ellis, T.M., Barry, B.R., Bissett, L.A., Dyrting, K.C., Luk, G.S.M., Tsim, S.T., Sturm-Ramirez, K., Webster, R.G., Guan, Y. & Peiris, J.S.M. (2004a). Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathology*, *33*, 492–505.
- Ellis, T.M., Leung, C.W., Chow, M.K., Bissett, L.A., Wong, W., Guan, Y. & Peiris, J.S.M. (2004b). Vaccination of chickens against H5N1 avian influenza in the face of an outbreak interrupts virus transmission. *Avian Pathology*, *33*, 405–412.
- Ellis, T.M., Sims, L.D., Wong, H.K.H., Bissett, L.A., Dyrting, K.C., Chow, K.W. & Wong, C.W. (2004c). Evaluation of vaccination to support control of H5N1 avian influenza in Hong Kong. In G. Koch & R. Schrijver (Eds.), *Avian Influenza, Prevention and Control* (pp. 75–84). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- FAO. (2004). Update on the avian influenza situation (as of 2/23/2004). *FAO AIDE News—AI Bulletin*, *6*, 10.
- Garcia, A., Johnson, H., Srivastava, D.K., Jayawardene, D.A., Wehr, D.R. & Webster, R.G. (1998). Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/Chicken/Queretaro/1995 infection. *Avian Diseases*, *42*, 248–256.

- Halvorsen, D.A. (2002). Twenty-five years of avian influenza in Minnesota. In *Proceedings of the 33rd North Central Avian Disease Conference* (pp. 65–69). Minneapolis, MN: NCADC.
- Kodihalli, S., Sivanandan, V., Nagaraja, K.V., Shaw, D. & Halvorsen, D.A. (1994). A type-specific avian influenza virus subunit vaccine for turkeys: Induction of protective immunity to challenge infection. *Vaccine*, *12*, 1467–1472.
- Lee, C.W., Senne, D.A. & Suarez, D.L. (2004). Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *Journal of Virology*, *78*, 8372–8381.
- Lee, C.W., Suarez, D.L., Tumpey, T.M., Sung, H.W., Kwon, Y.K., Lee, Y.J., Choi, J.G., Joh, S.J., Kim, M.C., Lee, E.K., Park, J.M., Lu, X., Katz, J.M., Spackman, E., Swayne, D.E. & Kim, J.H. (2005). Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea. *Journal of Virology*, *79*, 3692–3702.
- Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G.J.D., Xu, K.M., Duan, L., Rahardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estocapangene, A.T.S., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H.T., Hanh, N.T.H., Webby, R.J., Poon, L.L.M., Chen, H., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Webster, R.G. & Peiris, J.S.M. (2004). Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, *430*, 209–213.
- Liu, M., Wood, J.M., Ellis, T., Krauss, S., Seiker, P., Johnson, C., Hoffmann, E., Hamber, J., Hulse, D., Zhang, Y., Webster, R.G. & Perez, D.R. (2003). Preparation of a standardized, efficacious agricultural H5N3 vaccine by reverse genetics. *Virology*, *314*, 580–590.
- Matrosovich, M., Zhou, N., Kawawaka, Y., Webster, R. & Zhou, N.N. (1999). The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *Journal of Virology*, *73*, 1146–1155.
- Qiao, C.L., Yu, K.Z., Jiang, Y.P., Jia, Y.Q., Tian, G.B., Liu, M., Deng, G.H., Wang, X.R., Meng, Q.W. & Tang, X.Y. (2005). Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Pathology*, *32*, 25–31.
- Sims, L.D., Ellis, T.M., Liu, K.K., Dyrting, K., Wong, H., Peiris, M., Guan, Y. & Shortridge, K.E. (2003a). Avian influenza in Hong Kong 1997–2002. *Avian Diseases*, *47*, 832–838.
- Sims, L.D., Guan, Y., Ellis, T.M., Liu, K.K., Dyrting, K., Wong, H., Kung, N.Y.H., Shortridge, K.F. & Peiris, M. (2003b). An update on avian influenza in Hong Kong 2002. *Avian Diseases*, *47*, 1083–1086.
- Spackman, E. & Suarez, D.L. (2005). Use of a novel virus inactivation method for a multicenter avian influenza real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction proficiency study. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *17*, 76–80.
- Stone, H.D. (1987). Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccines in chickens of various ages. *Avian Diseases*, *31*, 483–496.
- Swayne, D.E. (2003). Vaccines for list A poultry diseases: emphasis on avian influenza. *Developments in Biologics (Basel)*, *114*, 201–212.
- Swayne, D.E. (2004). Application of new vaccine technologies for the control of transboundary diseases. *Developments in Biologics (Basel)*, *119*, 219–228.
- Swayne, D.E. & Akay, B. (2005). Avian influenza control strategies in the United States of America. In G. Koch (Ed.), *Proceedings of the Wageningen Frontiers International Workshop on Avian Influenza Prevention and Control* (pp. 113–130). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Swayne, D.E. & Beck, J.R. (2005). Experimental study to determine if low pathogenicity and high pathogenicity avian influenza viruses can be present in chicken breast and thigh meat following intranasal virus inoculation. *Avian Diseases*, *49*, 81–85.
- Swayne, D.E. & Suarez, D.L. (2000). Highly pathogenic avian influenza. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, *19*, 463–482.
- Swayne, D.E., Beck, J.R. & Mickle, T.R. (1997). Efficacy of recombinant fowl pox vaccine in protecting chickens against highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus. *Avian Diseases*, *41*, 910–922.
- Swayne, D.E., Senne, D.A. & Beard, C.W. (1998). Influenza. In D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson & W.M. Reed (Eds.), *Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th edn (pp. 150–155). Kennel Square, PA: American Association of Avian Pathologists.
- Swayne, D.E., Beck, J.R., Garcia, M. & Stots, H.D. (1999). Influence of virus strain and antigen mass on efficacy of H5 avian influenza inactivated vaccines. *Avian Pathology*, *28*, 245–255.
- Swayne, D.E., Garcia, M., Beck, J.R., Kirney, N. & Suarez, D.L. (2000a). Protection against diverse highly pathogenic avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowl pox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine*, *18*, 1088–1095.
- Swayne, D.E., Pentec, M.L., Beck, J.R., Garcia, M. & Suarez, D.L. (2000b). Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple years. *Veterinary Microbiology*, *74*, 165–172.
- Swayne, D.E., Beck, J.R., Pentec, M.L. & Beard, C.W. (2001). Efficacy of vaccines in chickens against highly pathogenic Hong Kong H5N1 avian influenza. *Avian Diseases*, *45*, 355–365.
- Tumpey, T.M., Alvarez, R., Swayne, D.E. & Suarez, D.L. (2005). A diagnostic aid for differentiating infected from vaccinated poultry based on antibodies to the nonstructural (NS1) protein of influenza A virus. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*, 676–683.
- Van Deusen, R.A., Hinkshaw, V.S., Senne, D.A. & Pellizzeri, D. (1983). Micro neuraminidase-inhibition assay for classification of influenza A virus neuraminidases. *Avian Diseases*, *27*, 745–750.
- Wood, J.M., Kawawaka, Y., Newberry, L.A., Bordwell, E. & Webster, R.G. (1985). Standardization of inactivated H5N2 influenza vaccine and efficacy against lethal A/chicken/Pennsylvania/137083 infection. *Avian Diseases*, *29*, 867–872.
- Xu, X., Subbarao, K., Cox, N.J. & Guo, Y. (1999). Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology*, *264*, 15–19.