

資料

我が国におけるアフリカ豚熱ワクチンの開発研究について

北村 知也

(国立研究開発法人 農研機構 動物衛生研究部門 越境性家畜感染症研究領域 海外病グループ)

Kitamura, T. (2024). Development of African swine fever vaccine candidates in Japan.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 84, 8-12.

キーワード：アフリカ豚熱、ASF、ワクチン

1. はじめに

アフリカ豚熱ウイルス (ASFV) はアスファウイルス科アスフィウイルス属に属するウイルスであり、豚やイノシシに感染すると熱性の致死性感染症であるアフリカ豚熱 (ASF) を引き起こす。ASFV は全長170~190キロ塩基対の2本鎖 DNA ゲノムを有し、ゲノム上には150~170種類以上のウイルスタンパク質がコードされている。ウイルスの粒子は内外2層のエンベロープを含む複雑な5層構造から成り、その大きさは260~300ナノメートルである。ウイルスは、粒子を構成する主要なタンパク質の1つである p72タンパク質をコードする B646L 遺伝子の塩基配列の違いによって、少なくとも24種の遺伝子型 (遺伝子型 I ~ XXIV) に分類されている^{2,5)}。

ASFV はもともとアフリカ大陸に生息するイボイノシシなどのイノシシ科の動物と *Ornithodoros* 属の軟ダニを自然宿主とし、森林サイクル (Sylvatic cycle) を形成している。ASF は1920年代初頭にケニアやウガンダで初めて発見・認識され、アフリカ土着の風土病としてこれまで主にサハラ以南のアフリカ大陸で流行してきた。アフリカ大陸外へも過去2度に渡り伝播し、発生国で甚大な社会・経済的被害をもたらした。1度目は1960年頃、遺伝子型 I のウイルスが西欧や中南米にまで伝播した。2度目は2007年、遺伝子型 II のウイルスがジョージア国に伝播し、この十数年の間に東欧や中欧、ならびにアジア諸国、さらにはカリブ海の国々へも感染を拡大し、依然としてその流行が続いている。特にアジアでは日本、台湾、スリランカを除くすべての国で ASF が蔓延しており、直近の2024年3月には海を隔ててわずか数百キロメートル先の韓国 (釜山) の都市部でも発生が認められている⁴⁾。

ASF の防疫は、衛生管理と早期の摘発淘汰が対策の

中心であったが、昨年 (2023年) にベトナム政府が世界初となる ASF ワクチンの野外利用を承認し、その商用利用が開始されたことで新たな局面を迎えている。

本稿では、我が国における ASF ワクチン開発研究として3種類の遺伝子欠損 ASFV 株について紹介する。

2. ASF に対するワクチンの開発の変遷

ワクチンには、典型的な生ワクチンや不活化ワクチンを始めとして、昨今に登場した mRNA ワクチンといったものまで幅広い種類が存在する。ASF に対するワクチンの開発においても、様々な種類のワクチンが試作・検討されてきた¹⁾。その結果、不活化ウイルス粒子を免疫源とする不活化ワクチンや特定の ASFV タンパク質を免疫源とするサブユニットワクチンはほとんど有効性を示さないことが分かっている。これらのワクチンは液性免疫を強く誘導するが、ASF を防ぐためには細胞性免疫も同時に誘導する必要がある。また、特定の ASFV 遺伝子発現プラスミドを免疫源とする DNA ワクチン、あるいは他のウイルス種に ASFV 遺伝子を組み込んだウイルスベクターワクチンについても有効性は低いと考えられている。これらのワクチンは不活化ワクチンと異なり、細胞性免疫の誘導も期待できるが、導入できる遺伝子数には限りがあるため、高い有効性を得られないことが示唆される。一方、弱毒生ワクチンは ASF に対する最も有効なワクチン候補として知られ、強毒 ASFV 株に自然に変異が導入された自然弱毒株あるいは人為的に変異が導入された遺伝子組換え弱毒株が検討されている。

3. 我が国におけるワクチン候補株開発の現状について

昨今のアジアでの ASF の蔓延を受け、ASF の国内侵入のリスクが高まっている。これに対する対策の一環として、我々は農林水産省の「安全な農畜水産物安

定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業：官民・国際連携による ASF ワクチン開発の加速化」において、遺伝子組換え弱毒株をベースとした ASF ワクチン候補株の作出を進めている。

我々がワクチン候補株を作出する場合、まず ASFV の遺伝子の中から任意の遺伝子を選択し、遺伝子組換え技術を駆使してその遺伝子を欠損させた ASFV 株を作出する。作出した株の培養細胞における増殖性などを解析した後に、豚に接種しその病原性の程度を評価する。病原性が低下した株は、同株を免疫した豚に対して強毒株で攻撃する試験を実施し、その防御効果を評価する。次項からはこのようにして作出したワクチン候補株の中から 3 種類（遺伝子欠損株 A、B、C）を紹介する。

3.1. 親株について

まず初めに、これらの遺伝子欠損株の作出に用いた株（親株：AQS-C-1-22株）の性質について示す。親株は2019年に国内の空港にて国際旅客の携帯品として収去された豚肉加工品から分離された株であり、近年アジアで流行している遺伝子型 II の強毒型の ASFV である³⁾。10² TCID₅₀ (50%組織感染量) の同株を接種した 6～8 週齢の LWD 豚は感染後数日で 41℃ を超える

発熱を呈し、その後に元気消失及び食欲廃絶し、その全てが発熱後 1 週間以内に死亡した（図 1 A）。血液 1 mL あたりのウイルス遺伝子量は、感染の数日後には初期感染量の 100 万～1000 万倍にもなった（図 1 B）。このように親株は豚に対して非常に強い病原性を示す。

3.2. 遺伝子欠損株 A について

遺伝子欠損株 A は ASFV の特定の遺伝子 A が欠損した株である。同株の豚腎由来不死化マクロファージ細胞（IPKM）における増殖性について親株と比較したところ、100 倍程度の増殖性の低下が認められた（図 2 A）。一方、親株も欠損株もそれぞれの最大の力価に達するまでの時間に大きな違いはなかった。これらの結果から、遺伝子欠損株 A は培養細胞における増殖性が低下した株であるが、次世代のウイルス（娘ウイルス）は産生されることが分かった。

次に遺伝子欠損株 A の病原性を明らかにするため、10⁵ TCID₅₀ の同株を 6～8 週齢の 4 頭の LWD 豚に接種し、28 日間に渡って観察した。遺伝子欠損株 A を接種した豚は同株接種の約 1 週間後に一過性の体温上昇が確認され、このうち 2 頭は 40℃ を超える発熱となった（図 1 A）。しかしながら、その後の観察期間はいずれの豚も発熱しなかった。また、観察期間を通して元

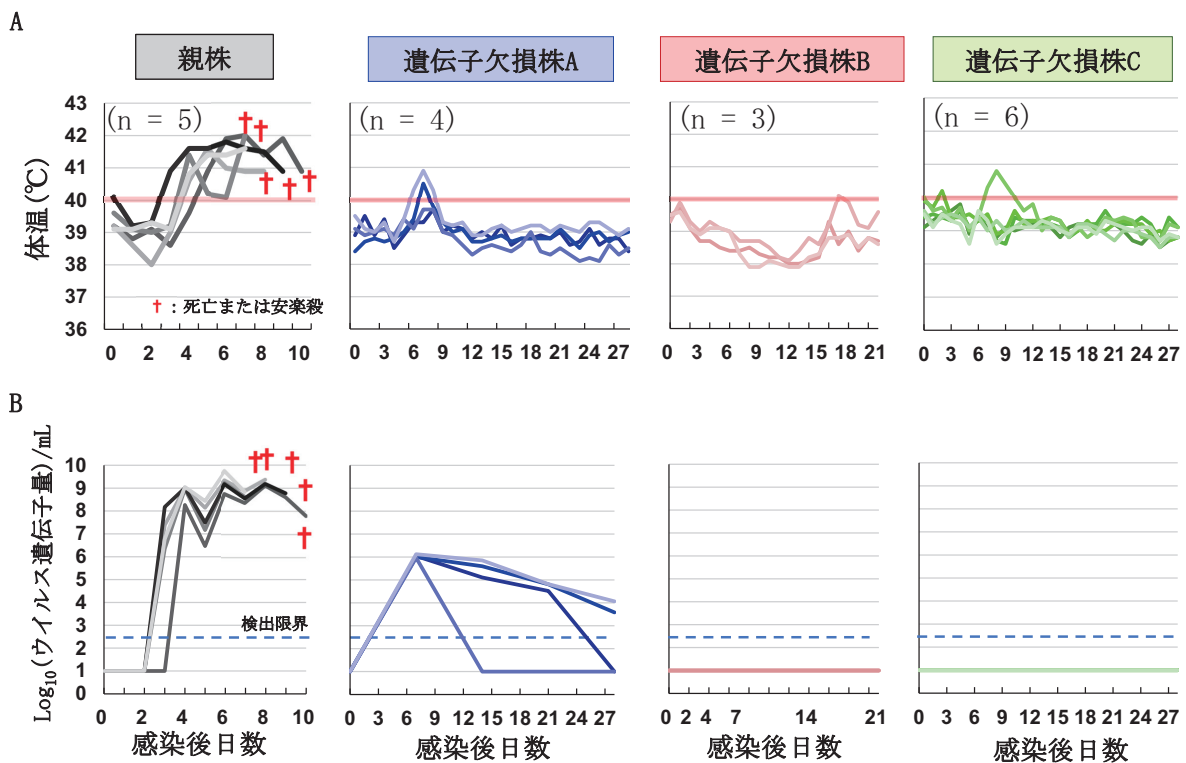


図1 遺伝子欠損株を感染させた豚の体温と血中ウイルス遺伝子量の推移

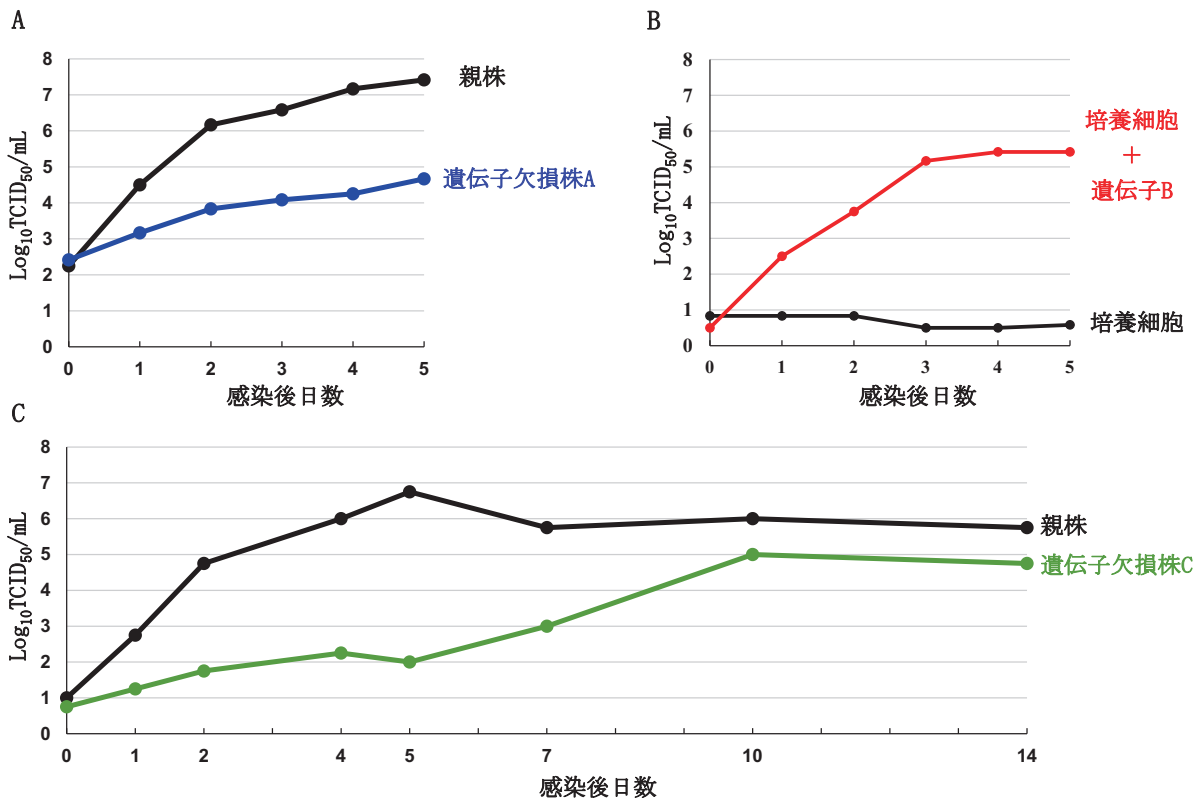


図2 遺伝子欠損株の培養細胞における増殖性の比較

気消失や食欲不振といった臨床症状も認められなかった。一方、感染豚の血液中のウイルス遺伝子量の推移をリアルタイム PCR により評価したところ、多くの豚が感染後に弱いウイルス血症になり、少なくとも感染後2週間以上は持続していた (図1B)。以上の結果から、遺伝子欠損株 A は豚体内における増殖性が低下することで病原性が低下し、弱毒化していることが分かった。

最後に遺伝子欠損株 A の防御効果を評価した。 10^5 TCID₅₀の同株を6～8週齢の4頭のLWD豚に免疫し、28日間後に 10^2 TCID₅₀の親株で攻撃した。興味深いことに、親株で攻撃した豚は発熱を含めて全く症状をしめさず、全頭が観察期間を通じて生存した (図3A)。また、血中のウイルス遺伝子量については免疫時からの遺伝子欠損株 A のウイルス血症が攻撃時にも残存していたものの、攻撃後に明瞭な遺伝子量の増加は確認できず、むしろ観察期間を通じて緩やかに減少していった (図3B)。以上の結果から、遺伝子欠損株 A はASF ワクチン候補として高い有効性を有していることが示唆された。

3.3. 遺伝子欠損株 B について

遺伝子欠損株 B はASFV の特定の遺伝子 B が欠損した株である。遺伝子欠損株 B は通常の培養細胞で増殖することができないが、遺伝子 B を導入した培養細胞では増殖するようになった (図2B)。これは遺伝子 B がASFV の増殖に必須な遺伝子であることを意味している。この結果から、遺伝子欠損株 B は培養細胞で増殖しない、すなわち娘ウイルスの産生ができない株であることが分かった。

遺伝子欠損株 B の病原性を明らかにするため、 10^5 TCID₅₀の同株を6～8週齢の3頭のLWD豚に接種し、21日間に渡って観察した。遺伝子欠損株 B を接種した豚は観察期間を通じて明瞭な発熱は示さなかった (図1A)。また、観察期間を通じて、感染豚の血液中からはウイルス遺伝子がまったく検出されなかった (図1B)。以上の結果から、遺伝子欠損株 B は豚体内における増殖性がない、もしくは非常に低下することで病原性が低下し、弱毒化していることが示唆された。

遺伝子欠損株 B についても防御効果を評価した。 10^5 TCID₅₀の同株を6～8週齢の3頭のLWD豚に免疫し、21日間後に 10^2 TCID₅₀の上記親株で攻撃した。遺伝子欠損株 A とは異なり、遺伝子欠損株 B で免疫し

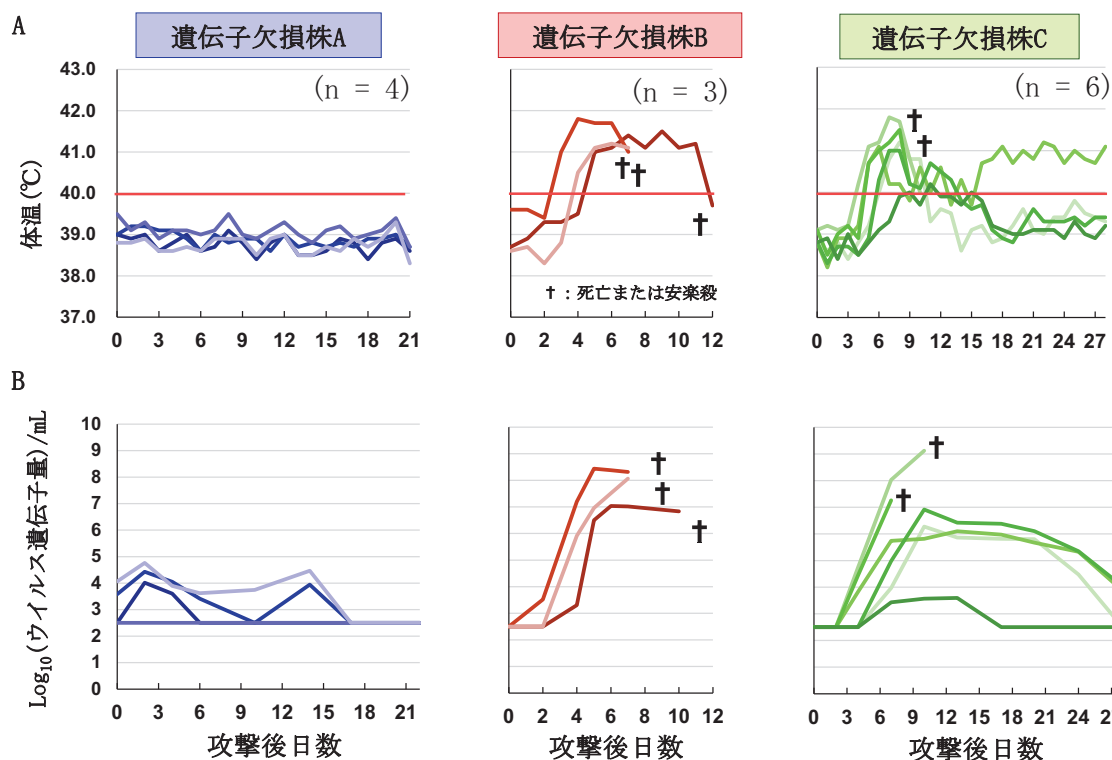


図3 遺伝子欠損株を免疫した豚を攻撃した際の体温と血中ウイルス遺伝子量の推移

た豚は親株で攻撃した際に全頭が発熱し、ASF 症状を示した後に全頭が死亡した (図 3 A)。また、血中のウイルス遺伝子量も攻撃後に顕著に増加していた (図 3 B)。以上の結果から、遺伝子欠損株 B は高度に弱毒化しているもののワクチンとして有効性は低いことが分かった。

3. 4. 遺伝子欠損株 C について

遺伝子欠損株 C は ASFV の特定の遺伝子 C が欠損した株である。遺伝子欠損株 C は遺伝子欠損株 A と同様に、培養細胞における増殖性が 10~100 倍程度低下していることが分かった (図 2 C)。また、増殖速度も低下していた。この結果から、遺伝子欠損株 C は培養細胞における増殖性及び増殖速度が低下している株であることが分かった。

遺伝子欠損株 C についても病原性を明らかにするため、 10^5 TCID₅₀ の同株を 6~8 週齢の 6 頭の LWD 豚に接種し、28 日間に渡って観察した。遺伝子欠損株 C を接種した豚では、1 頭を除いて観察期間を通じて発熱は認められなかった (図 1 A)。また、観察期間を通じて、感染豚の血液中からはウイルス遺伝子がまったく検出されなかった (図 1 B)。以上の結果から、遺伝子欠損株 C は豚体内での増殖性が非常に低下すること

で病原性が低下し、弱毒化していることが示唆された。

遺伝子欠損株 C の防御効果を評価するため、 10^5 TCID₅₀ の同株を 6~8 週齢の 6 頭の LWD 豚に免疫し、その 28 日間後に 10^2 TCID₅₀ の親株で攻撃した。攻撃後は全頭が発熱し、6 頭中 2 頭が ASF 症状を伴い死亡した (図 3 A)。一方、残りの 4 頭は発熱以外に臨床症状を示さず生存した。死亡豚の血中ウイルス遺伝子量は、遺伝子欠損株 B を免疫した豚と同様に、攻撃後に顕著に増加していた (図 3 B)。一方、生存豚の血中ウイルス遺伝子量は死亡豚と比較するとピークが 1/100 になっており、その後は減少に転じた。以上の結果から、遺伝子欠損株 C は高度に弱毒化しており、かつ強毒株に対する一定の防御効果を有していることが分かった。

4. おわりに

このように我々が作出した遺伝子欠損株はそれぞれ異なる特徴を有するワクチン候補株であることが分かった。ところで、理想的な ASF ワクチンはどのようなものだろうか？ ワクチンの有効性の観点からは、強毒株による感染を 100% 防御し、かつ症状や強毒株によるウイルス血症を示さないことが肝要である (表 1)。一方、ワクチンの安全性の観点からは、免疫したワク

表1 各遺伝子欠損株の有効性と安全性について

	ワクチンの有効性			ワクチンの安全性	
	強毒株からの 防御率	強毒株の 症状	強毒株の ウイルス血症	ワクチン株の 症状	ワクチン株の ウイルス血症
理想的なワクチン	100%	なし	なし	なし	なし
遺伝子欠損株A	100%	なし	減弱	一過性の発熱	あり
遺伝子欠損株B	0%	発熱	あり	なし	なし
遺伝子欠損株C	67%	発熱	減弱	なし	なし

チン株による症状やウイルス血症が無いことが肝要である。すなわち、有効性と安全性を兼備したものが理想的なワクチンであると考えられる。これを踏まえ、各遺伝子欠損株の現状をまとめる。まず、遺伝子欠損株 A は有効性が高いものの、遺伝子欠損株 A によるウイルス血症を防げないことから安全性に改良の余地が必要である。反対に、遺伝子欠損株 B は同株による症状やウイルス血症が全く認められないことから安全性は高いものの、これに反比例するように有効性が低下した。遺伝子欠損株 C は遺伝子欠損株 B と同様に安全性は高いものの、一定の有効性も示した。

以上の結果を踏まえ、我々はこれらの遺伝子欠損株の更なる改変により有効性や安全性を向上させることを試みている。より理想に近い有効性と安全性を兼備するワクチン候補株を早急に完成すべく研究を続けている。

5. 利益相反状態の有無

著者は開示すべき利益相反はない。

6. 謝辞

本研究は、安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業「官民・国際連携による ASF ワクチン開発の加速化」において実施された。

7. 引用文献

- 1) Chathuranga K, et al. (2023) African swine fever virus (ASFV): Immunity and vaccine development. *Vaccines*, 11: 199.
- 2) 國保健浩 (2020) アフリカ豚熱 (ASF). ウイルス, 70: 15-28.
- 3) Masujin, et al. (2019) The isolation of infectious African swine fever viruses from pork products seized at Japanese animal quarantine stations.

Proc Jpn Pig Vet Soc, 74: 7-14.

- 4) 農林水産省 消費・安全局 動物衛生課 (2022) アフリカ豚熱 (ASF) について.

<https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/asf.html> (2024年6月9日閲覧)

- 5) 農研機構 動物衛生研究部門 疾病情報 ASF (アフリカ豚熱).

<https://www.naro.go.jp/laboratory/niah/asf/index.html> (2024年6月9日閲覧)