

総説

海外 ASF ワクチン事情

國 保 健 浩

(国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門)

Kokuho, T. (2024). Advancements in global African swine fever vaccine development.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 84, 13-18.

キーワード：アフリカ豚熱、遺伝子改変株、ワクチン

アフリカ豚熱とは

アフリカ豚熱 (African swine fever; ASF) は、アスファウイルス科アスフィウイルス属に分類される巨大な DNA ウイルスであり、ダニ媒介性のアルボウイルスでもある ASF ウイルス (ASFV) によって引き起こされる豚、イノシシ (*Sus* 属) の致死性感染症である。ASFV は170キロから190キロ塩基対に及ぶ長大な二本鎖 DNA をゲノムにもつ、巨大核質 DNA ウイルス群 (Nucleocytoplasmic large DNA virus; NCLDV) に属するウイルスであるが、この群に属するウイルスはいずれもコードする遺伝子の塩基配列が既知の生物との類似性を示さず、それらの遺伝子の機能の多くは未解明のまま残されている。ASFV は長らくアスファウイルス科の唯一のウイルス種と考えられてきたが、近年近縁のウイルスが相次いで発見されている。

ASFV を媒介するダニは *Ornithodoros* 属の軟ダニ (soft tick) で、主にサハラ以南 (sub-Saharan) のアフリカ東部に棲息するため、1921年のケニア、ウガンダでの初報告^①以来、本病の流行はこの地を中心にみられ、一時期は“East African swine fever”とも呼ばれたが、現在は ASF に呼称が統一されている。軟ダニの棲息するこれらの地域では ASFV はダニとそれに咬刺されるイボイノシシ等の固有のイノシシ (*Suidae*) 科動物との間で維持されており (sylvatic cycle、※1)、棲息するイボイノシシの80%以上が陽性といった地域があるものの^②、これらの野生動物は臨床症状を呈さないため、「発生」として報告されることはない。一方、19世紀末頃から食用として欧州から持ち込まれた西洋種の豚 (以下、単に豚と記載) が感染ダニを通じてウイルスに暴露されると極めて激しい熱性・出血性病態を呈して死に至り、顕在化する (tick-pig cycle)。

※1 これらのアフリカ固有の野生のイノシシ科動物では直接的な水平伝播は生じず、ウイルスは常に軟ダニを介して伝播する。

症状の重篤度や致死率はウイルス株間で違いがみられるが、概ね急性の経過をたどり、感染したすべての豚が斃死することも珍しくない。ASFV に豚が感染すると、甚急性ないしは急性の発熱や出血性病変を呈して7日から10日程度で死に至る。感染すると2～7日の潜伏期を経て発熱 (41℃以上) し、その後耳や腹部の紅斑、沈鬱、食欲喪失を呈する。典型的には血液の凝固不全や紅斑、脾臓の腫大、リンパ節の暗赤色化、腹水貯留、肺水腫、腸や扁桃、腎臓の出血などが観察される。緩慢な経過を示す例では、さらに呼吸症候群や関節炎、皮膚炎などを認め、妊娠中の母豚では流産することがある。血液の凝固不全に伴って出血傾向が強まるため、しばしば創傷部位などから継続した出血が認められるが、この血液には大量のウイルスが含まれるため注意が必要である (※2)。解剖時には脾臓の腫大に加えて、(主に胃周囲の) リンパ節の腫大と暗赤色化や腸管漿膜面の点状出血などが認められる。しかし、これらの所見は常に認められるというわけではなく、発熱すら認めずに急死する例もあるため注意が必要である。逆に明瞭な症状を認める場合であっても、それらの所見は豚熱などと極めて類似するため観察結果のみにもとづいて「ASF」と診断することは困難で、異常な事象を検知した場合には予断を持たず専門機関による検査に供するべきである。ASFV に感染した豚では発熱に先んじてウイルス血症がみられるほか、唾液や鼻汁中にウイルスが排泄される。そのため、第一義的には PCR などの遺伝子検査によって血液中の ASFV 遺伝子を検出することとなる。

※2 豚及び (いわゆる一般的な) イノシシが ASFV に感染するとウイルスは体内で極めて効率的に増殖し、血液中に大量のウイルスが出現する。この膨大な量

のウイルスを未感染の個体が経口的に摂取すると直接的な水平伝播が成立する (pig-pig cycle)。言うまでもなく、豚の骨格筋や内臓にも大量の血液が存在するため、感染豚に由来する加熱不十分な精肉や豚肉加工品を豚が摂取することによって爆発的な流行を招く。

現在世界的な流行をみせる ASF の多くはアフリカ東岸からコーカサス地方 (ジョージア) へと持ち込まれた遺伝子型 II の強毒株を原因とするものである。ASFV はゲノムに存在する約2,000塩基対ほど長さの B646L 遺伝子の塩基配列によって24ないしは25の遺伝子型に分類される。この B646L 遺伝子はウイルス粒子の外殻に近いカプシド (ウイルス殻) の主要な成分である P72タンパク質をコードしている。1950年代以降、ASFV は数回にわたってアフリカ大陸外で大流行をもたらしているが、それらはいずれも遺伝子型 I の株によるもので、2007年のジョージアでの発生に端を発する現在の流行は、遺伝子型 I 以外の株としては初となる大規模なものである。

ASF ワクチン開発上の課題

ASF の発生を阻止するため、これまで数多くのワクチンの開発が試みられてきたが、野外利用に十分な効果性と安全性を兼ね備えたワクチンは未開発である。開発が困難な理由として様々なものが考えられるが、主なもののだけでも

- ① ウイルス由来の遺伝子やタンパク質の機能の大半が未知であること
- ② 安定した増殖系がないこと
- ③ 細胞性免疫を増強する類のワクチン剤型が必要なこと
- ④ ワクチンの効果を感度良く、効率的にモニタリ

グする系がないこと

- ⑤ ワクチンの効果を評価する適切な動物モデルがないこと

- ⑥ ワクチンの製造や評価の基準が定められていないこと

などが挙げられる。誌面の都合からこのすべてに触れる余裕はないが、ワクチンを作出する上で重要と考えられる②及び③について以下に解説してみたい。

【②安定した増殖系がないこと】

ワクチン開発のみならず、ASF 研究全体の阻害要因となっているのが「ASFV を安定的に増殖させ得る細胞培養系の不在」である。ASFV は豚のマクロファージや単球といった系列の細胞の内部で増殖するため、大半の研究では直接豚から採取したこれらの細胞 (初代細胞) にウイルスを接種し、増殖させる系が利用されてきた。マクロファージ、単球といった初代細胞を実験環境下で維持することは極めて難しいため、培養の都度、豚から細胞を調製、準備する手間を要することに加え、ロット間で品質にばらつきが生じること、検査に際して用いるドナー豚の清浄性を確保することに多大なコストがかかるといった理由から、ワクチン製造のような規模でのウイルスの増殖操作に向かないことは明らかである。そのため既存の株化細胞の利用も試みられているが、非宿主動物に由来する細胞株 (サル由来の Vero 細胞など) や非指向性の組織に由来する細胞株 (上皮由来の PIPEC 細胞など) ではウイルス増殖性が低く、また継代過程でウイルスゲノムに大規模な変異が生じて、次第に性状が変化してしまうといった問題がみられる。ASF ワクチンの製造においてはウイルス株の性状を保持しつつ、効率的な増殖に適した細胞培養系を確保することが極めて重要である。そ

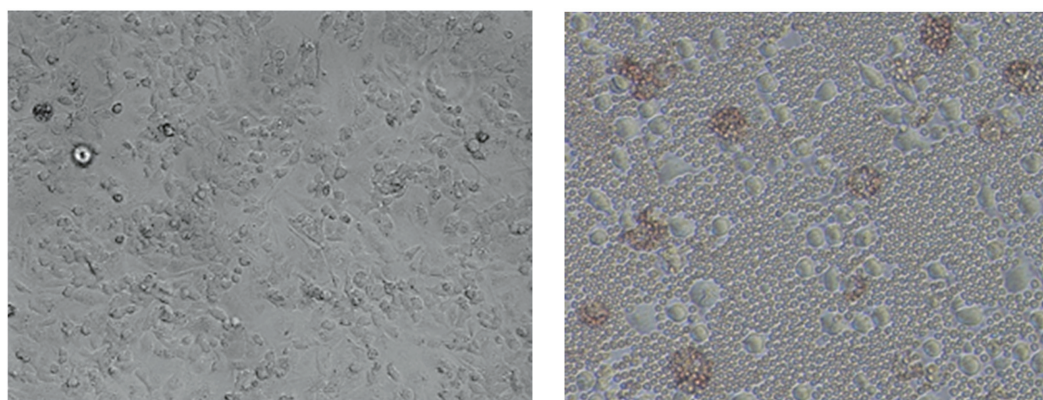


図 1 IPKM 細胞の単層培養像 (左) と ASFV 接種後に形成される血球吸着像 (右)

ここで我々は、実験室で持続的に維持、増殖でき、ASFV の効率的な増幅を促すことに適した不死化豚腎マクロファージ (IPKM 細胞、図1) を樹立した⁷⁾。この細胞株は ASFV に高い感受性を持ち、その増殖においても初代細胞に劣らない能力を示すだけでなく、ASFV のゲノムの安定的な複製にも適しており、IPKM 細胞を用いて50代以上継代した ASFV でも元株とほぼ変わるところのないゲノムを保持することを確認している。IPKM 細胞の樹立により、ウイルスの増殖や力価測定、人為的な遺伝子改変を容易に実施できるようになっている。

ASFV に感染した細胞の細胞膜表面上には CD2v と呼ばれる ASFV 由来のタンパク質が現れる。このタンパク質は赤血球膜表面に存在する CD58 と呼ばれる分子と特異的に結合するため顕微鏡下では感染細胞の周囲に赤血球が吸着した像として観察される。これを血球吸着反応 (図1右) と言い、ASFV の感染に伴って認められる現象である。

【③細胞性免疫を増強する類のワクチン剤型が必要なこと】

ワクチン開発が困難な理由のひとつとして「ASFV に感染しても中和能を有する抗体が誘導されない」という点がある。そもそも ASF では感染豚は急性症状を示して短期間に死に至るため病状の回復に抗体が役立つ余地は殆ど無いが、稀に耐過して回復する個体が見られることがあり、このような個体は免疫を獲得しているため、同じウイルス株を接種しても発症することがない (異なる遺伝子型のウイルスを接種すると典型的な ASF を示す)。このような個体では血中に高力価の抗体も認められるのだが、感染耐過した豚の血清を未感染の豚に移入しても免疫が付与されることはなく、同じウイルス株の再攻撃によって発症して斃死する。一方、感染耐過した豚の血液中の細胞成分を移入してみると受動的な免疫が成立する¹⁰⁾。果たして、これまで数多く試みられてきた不活化ウイルスやサブユニットタンパク質ワクチンといった抗体の誘導を目指すワクチン (※3) では、いずれも有効性が認められていない。これらの事実から ASF では細胞性免疫を惹起するワクチンが有望と考えられ、ア)弱毒化ウイルスワクチン、イ)ベクターワクチン、ウ)核酸 (DNA や RNA) ワクチンといった、接種した動物の体内でのウイルスタンパク質 (=抗原) の生合成を前提とするワクチンに開発者の興味が向けられている。しかし、

上記①にも記したように、ASFV の遺伝子やタンパク質の多くは依然として機能未解明で、防御抗原の特定に至っていないことから、イ) やウ) のように有効な標的タンパク質の遺伝子を組み込んだワクチンを理論的に設計することは難しい。そのため、現在は自然に、あるいは人為的な遺伝子の変異により弱毒化した ASFV を用いた「生ワクチン」の開発が精力的に進められている。

※3 現行のインフルエンザワクチンのように化学的に殺滅されたウイルスやウイルス由来のタンパク質を主成分とするワクチン (不活化ワクチン) では、接種されたこれらの成分は抗原提示細胞と呼ばれる特殊な機能を有する細胞群に取り込まれて分解され、もっぱら抗体を誘導するための免疫応答に利用されるため細胞性免疫を高めることには役立たない。抗体が生体防御において中心的な役割を果たす感染症においては、不活化ワクチンは有用である。

ASF ワクチンの開発状況

前項で述べたように現在のワクチン開発では弱毒化した ASFV を用いる「生ワクチン」が主な研究対象となっており、米国、欧州、中国ならびに日本で強力に進められているが、必ずしも情報が十分に公開されていないため、ここでは論文等での公開情報にもとづいて、以下の主要な候補ワクチン (株) について紹介する。

【Lv17/WB/Rie1株 (スペイン/欧州)】

2017年にラトビアで捕獲された野生イノシシから分離された遺伝型IIの自然変異弱毒株である。この株は ASFV で特徴的にみられる血球吸着 (HAD) 反応に関連する遺伝子 (EP402R) 領域に塩基の欠落が生じているため、HAD 反応を示さない (ただし、HAD 反応の消失と弱毒化との関連性は不明)。この株を豚に経口的に接種すると、接種豚は概ね正常に経過し、その後の攻撃において遺伝子型IIの強毒株の攻撃を防御する¹⁰⁾。ただし、当該株を接種した豚では接種後7日目から21日目までウイルス血症がみられ、一部発症例も認められている。現在、スペインを中心とする欧州の ASFV ワクチンコンソーシアムでは、この株にワクチンと野外感染とを識別する機能を搭載した DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) ワクチンの開発が進められている。

【Arm07-ΔMGF-11GD株 (日本)】

この株は2007年にアルメニアで分離された遺伝子型

IIの強毒株を上掲のIPKM細胞で連続継代する過程で出現した自然変異弱毒株である⁶⁾。Multi Gene Family (MGF)と呼ばれるASFVに特徴的な遺伝子群のうち、連続した11個の遺伝子を含む領域 (MGF300-4L からMGF505-3R までの領域)の欠落に伴って病原性が大幅に減弱した遺伝子型IIのワクチン候補株である。この株を豚に接種すると短期間の軽度な発熱と一過性のウイルス血症を生じるのみで概ね正常に経過し、高度に弱毒化していることが示されるが、強毒株の攻撃を完全に防御するまでには至らず、攻撃株によるウイルス血症がみられるとともに、一部の豚では致死的な転帰も観察され、実用化に向けては更なる改良が求められる。

【ASFV-G-ΔMGF-6GD株、ASFV-G-Δ9GL/ΔMGF-6GD株 (米国／ベトナム)】

ASFV-G-ΔMGF-6GD株は2007年にジョージアで分離された遺伝子型IIの強毒株を元に、米国農務省がMGFの6つの遺伝子群が存在するゲノム領域を人為的に欠落させた遺伝子組換え弱毒株である (以下、単にASFV-G-ΔMGFと表記)⁹⁾。この株は、上述のArm07-ΔMGF-11GD株と同じ系統の株から作出されたウイルス株であり、重複した6遺伝子を欠いているため、互いに類似した特性を示すことが期待される。Arm07-ΔMGF-11GD株との主な違いは、欠落した遺伝子の数と培養に用いる細胞の種類 (ASFV-G-ΔMGF株では豚マクロファージ初代細胞を使用)にある。ASFV-G-ΔMGF株はArm07-ΔMGF-11GD株に比べてワクチン効果が高く、接種した豚は強毒株の攻撃を完全に防御する一方で、接種後28日以上にわたり高レベルでウイルス血症が持続する。この株の“完全な”

ワクチン効果に期待してベトナムNAVETCO社は米国から製造ライセンスを取得し、国内で製造体制を構築するとともに監視当局による検証を実施して、世界初となるASFワクチンの販売を開始した (2022年5月)。この株を主成分とするASFワクチン (ASFVAC、図2)は初売直後に接種事故が続発し、一時的に使用が中止されたが、現在は利用が再開されているようである。ASFV-G-Δ9GL/ΔMGF-6GD株は、同じく米国農務省がASFV-G-ΔMGF株を元に、更に過去の研究で病原性への関与が示唆された9GL遺伝子 (B119L遺伝子)を欠失させた二重欠損株である。米国内ではASFV-G-ΔMGF株とともに、一時 (日本では「レベル3病原体」に相当する) Select Agent Regulationの対象リストから除外されたものの、安全性に関する懸念が生じたことから、2022年10月27日付けで除外が取り下げられた⁴⁾。

【ASFV-G-ΔI177L株 (米国／ベトナム)】

この株も米国農務省が開発した遺伝子型IIの非病原性遺伝子組換え株で¹⁾、同じくベトナムのAVAC社がライセンスを取得し、承認を経て同国で2番目のワクチン (ASF LIVE、図3)として上市された (2022年7月)。報告によれば、ASFV-G-ΔI177L株は親株に比べ試験管内での増殖が遅く、最終的な力価も1/100から1/1000程度と低い。またウイルスを 10^2 から 10^6 まで豚に接種 (筋注)しても症状を呈することがない。接種後28日目に親株である強毒株で攻撃してもASFの症状を示すことはなく、全頭が生存したが、免疫期間の28日間及び攻撃後から21日間は高レベルでウイルス血症が継続した (ワクチン株によるウイルス血症の問題については次項で議論する)。このウイルス株は

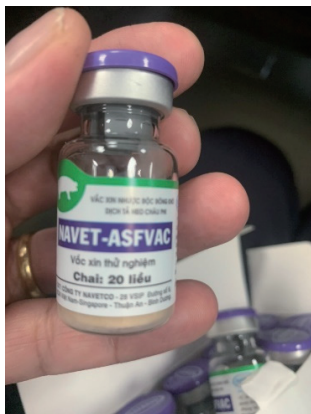


図2 NAVETOCO社製ASFVACワクチン (ASFV-G-ΔMGF株)



図3 AVAC社製ASF LIVE ワクチン (ASFV-G-ΔI177L株)

DMAC 細胞と呼ばれる IPKM 細胞に類似した不死化豚マクロファージで増殖させるため上述のようなワクチン製造上の幾つかの懸念は解消されており、ベトナム国内では接種に伴う大規模な事故はこれまで報告されていない。しかし、欧州が支援するプロジェクト研究において、当該株を細胞培養ならびに豚生体を用いて連続継代した際に、いずれの条件下でも病原性の亢進が観察されたため、最近になって、前述の ASFV-G-ΔMGF 株などと同様に Select Agent Regulation の対象リストからの除外措置が取り下げられた（2024年5月16日）³⁾。ASF LIVE ワクチンはフィリピン政府からの要請により、本年中に AVAC 社から同国へ輸出される予定だが¹¹⁾、上記の措置を踏まえて今後如何なる対応が取られるかが注目される。

【ASFV-G-ΔI177L/ΔLVR 株（米国／ベトナム）】

開発当初にマクロファージ初代細胞を用いて増殖されていた ASFV-G-ΔI177L 株の品質向上を目的に、豚上皮細胞由来の株化細胞である PIPEC 細胞への馴化を試みたところ、PIPEC 細胞で高い増殖性を示し、かつ LVR (Left Variable Region; MGF360-4L から11L 遺伝子までの10遺伝子を含む領域) を欠失した二重欠損体が樹立されるに至った。この株は PIPEC 細胞で 10^8 HAD₅₀（試験管内で50%の培養細胞に HAD 反応を認めるウイルス力価）/mL 程度まで増幅し、また 10^2 から 10^6 HAD₅₀/頭の範囲で豚に接種（筋注）しても症状を示さず、また強毒株による攻撃を100%防御したことが報告されているが²⁾、接種豚の体内で長期間にわたりウイルス血症を示す点は改善がみられていない。この株も既にベトナムの DABACO 社がライセンスを取得し、同国で薬事承認を申請しているとのことである。

現在開発中の ASF ワクチンの課題

前項に挙げた主なワクチン候補株に加えて、多くの国で ASF に有効で安全な生ワクチンの開発が進められているが、これら“第一世代”のワクチンには「生ワクチン」であることに付随する幾つかの懸念がある。既に見てきたように、例えば米国で開発されたワクチン候補株では（ベトナムにおける評価がなされたにも拘わらず）継代の過程で病原性が復帰する可能性が新たに示され、病原体としての取り扱いがより厳しいものへと再度変更されている。更には、昨年中国から遺伝子型 I と II に由来するゲノムを併せ持つ「交雑型」

かつ強毒型のウイルスが分離されたとの報告がなされ、関係者に衝撃を与えた¹²⁾。このウイルス株の起源は明らかではないが、同国内には遺伝子型 II の弱毒野外株が存在するとの報告がなされていたことに加えて、本来存在するはずのない遺伝子型 I の弱毒株の豚からの分離例も報告されている。この株は遺伝的には1950年代以降に欧州で流行した弱毒のウイルス株に近縁なことから、欧州から不法に持ち込まれた“ワクチンもどき”ではないかと推測される。ここで強調すべき点は、本来劇的な症状を呈することのない（であろう）弱毒株同士が野外で組換えを起こし、新たに「致命的な」病原性を獲得しているということにある。ウイルスが生体内（細胞内）への侵入を経て増殖するという事実を勘案すると、接種した動物の体内でウイルス血症という形で高レベルに長期間ウイルスが維持される株では遺伝子の交雑とそれに伴う病原性復帰のリスクが避けられない。

このような事態を受けて国際獣疫事務局（WOAH）では、加盟各国に対して「（ワクチンとしての性能が）現在 WOAH が策定作業を進めている国際基準に満たない（substandard な）ワクチンの使用自粛」を勧告（2024年10月）するとともに、ASF ワクチンに求められる性能及び製造上の要件を規定する国際基準（WOAH マニュアル）の策定作業を開始した。基準案が WOAH 総会で採択されたあかつきには、この基準に準拠したワクチンの開発が進められて行くものと期待される。

おわりに

これまで述べてきたように、現在、ASF の防御に有効かつ十分な安全性が確保されたワクチンは存在せず、その開発に向けて熾烈な競争が続いている。有望なワクチン候補株が開発された場合には、その実用化に向けて当該株の効果や安全性を慎重に評価する必要があることは勿論、利用を想定する地域における ASFV - 特に、ここまで見てきたように弱毒の ASFV 株の - 浸潤状況や、異なるワクチン株の使用状況を十分精査するとともに、何らかの異常が生じた際の迅速な通報や調査、防疫措置の実施に向けた体制の整備が極めて重要である。また ASF 未発生の日本においてはバイオセキュリティの強化こそが ASF の防疫において最善、最良の道であることは論を俟たない。我々としてはこれからもワクチンの実現とバイオセキュリティの向上の両面から防疫に資する技術開発に邁進したいと考えている。

利益相反

本論文における利益相反はない。

引用文献

- 1) Borca MV, et al. (2020) Development of a highly effective African swine fever virus. *J Virol*, 94: e02017-19.
- 2) Borca MV, et al. (2021) A cell culture-adapted vaccine virus against the current African swine fever virus pandemic strain. *J Virol*, 95: e00123-21.
- 3) DEPARTMENT OF AGRICULTURE Animal and Plant Health Inspection Service [Docket No. APHIS-2024-0010] Notice of withdrawal of select agent regulatory exclusion for African swine fever virus-G-ΔI177L vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain. (2024年5月16日公布) (2024年5月27日閲覧)
- 4) FEDERAL REGISTER.
<https://www.federalregister.gov/documents/2022/10/27/2022-23446/notice-of-withdrawal-of-select-agent-regulatory-exclusions-for-two-strains-of-african-swine-fever> (2024年5月27日閲覧)
- 5) Jori F, et al. (2009) Role of wild suids in the epidemiology of African swine fever. *Ecohealth*, 6: 296-310.
- 6) Kitamura K, et al. (2023) A spontaneously occurring African swine fever virus with 11 gene deletions partially protects pigs challenged with the parental strain. *Viruses*, 15: 311.
- 7) Masujin K, et al. (2021) An immortalized porcine macrophage cell line competent for the isolation of African swine fever virus. *Sci Rep*, 11: 4759.
- 8) Montgomery RE. (1921) On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J Comp Path*, 34: 243-262.
- 9) O'Donnell V, et al. (2015) African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of MGF360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection against challenge with virulent parental virus, *J Virol*, 89: 6048-6056.
- 10) Pedrera M, et al. (2024) Characterization of the protective cellular immune response in pigs immunized intradermally with the live attenuated African swine fever virus (ASFV) Lv17/WB/Rie1. *Vaccines*, 12: 443.
- 11) PIG PROGRESS ASF Philippines: vaccine procurement underway.
<https://www.pigprogress.net/health-nutrition/health/asf-philippines-vaccine-procurement-underway/> (2024年5月24日付) (2024年5月27日閲覧)
- 12) Zhao D, et al. (2023) Highly lethal genotype I and II recombinant African swine fever viruses detected in pigs. *Nat Commun*, 14: 3096.