

総説

アフリカ豚熱ワクチン開発の現状

舩 賢太郎

(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

越境性家畜感染症研究領域 海外病グループ)

Masujin, K. (2021). The current situation of the development of vaccines for African swine fever.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 78, 17-23.

キーワード：アフリカ豚熱 (ASF)、アフリカ豚熱ウイルス (ASFV)、ワクチン

はじめに

アフリカ豚熱 (African swine fever: ASF) は、ASF ウイルス (ASFV) の感染によって引き起こされる豚及びイノシシの熱性感染症で、その致死率は、ほぼ100%に達する。アフリカ常在の伝染病であった ASF は、2007年に黒海沿岸の国ジョージアで突如として摘発され、2020年までにロシアを含む欧州20カ国に拡散した。2018年、アジア圏で初めて中国にて ASF の発生が確認されると、その初発例から僅か2年半で東アジア及び東南アジアの15カ国に拡散し、甚大な被害をもたらしている。日本での ASF の発生は確認されていないが、アジア諸国での発生に終息がみられない現状において、ASF はもっとも注意すべき伝染病である。ASF の蔓延の理由の1つに未だ有効かつ安全なワクチンが開発されていないことが挙げられる。現在、さらなる拡散が懸念される本病のワクチン開発及びその実用化が世界的に喫緊の課題となっている。本稿では、ASF ワクチンの開発研究のこれまでと現状について概説する。

アフリカ豚熱ウイルス (ASFV)

ASFV は、アスファウイルス (*Asfarviridae*) 科アスフィウイルス (*Asfivirus*) 属に分類される唯一のウイルス種で、長大な二本鎖 DNA をゲノムに持つ、直径約200nm の正二十面体をした巨大なウイルスである³⁾。ゲノム DNA サイズは170-190kb で、170以上の遺伝子が発現することにより、宿主である豚及びイノシシの単球やマクロファージなどの免疫に関わる細胞に感染し、増殖する¹²⁾。本ウイルスはヒトには感染しない。ASFV はゲノム上の一部の塩基配列の違いに基づく遺

伝子型別により分類されており、24種の遺伝子型 (I ~ XXIV 型) が存在する。現在、欧州、アジア圏で蔓延している ASFV 株の遺伝子型は II 型である。

ASF ワクチンの開発

ASF 感染豚には、ASFV 感染及び病原性を抑制する作用のある ASFV 中和抗体が産生されない。ASFV は、細胞内で形成される「細胞内成熟ウイルス」と、細胞内成熟ウイルスが宿主細胞膜由来脂質膜を被った「細胞外外皮ウイルス」の2つの感染性ウイルス粒子を形成し、また ASFV の外殻は50以上のタンパク質から構成され、かつ多層構造を形成している。この ASFV の構造多様性が宿主に中和抗体の作出を不可能にさせる要因の1つとして考えられている。一方、ASFV 感染耐過豚または弱毒 ASFV 株を感染させた豚に、感染した株と同一のまたは極めて近縁の株を接種するとその感染を防御する。この防御機構については、未だ詳細は不明であるが、何らかの ASFV に対する宿主免疫機構の関与が推測され、免疫応答が誘導される事実は、ASF ワクチン開発の実現可能性を示唆する。ASF ワクチン開発に関する研究は1960年代から始まり、これまでに不活化ウイルス、組換え蛋白質・ペプチド、核酸 (DNA) 及び弱毒生ウイルスを用いたワクチンの開発が試みられている。

不活化ワクチン

不活化ワクチンの開発に、不活化 ASFV 感染細胞抽出物、不活化 ASFV 感染末梢白血球、不活化精製 ASFV 粒子、グルタルアルデヒド固定 ASFV 感染マクロファージ及び界面活性剤処理 ASFV 感染マクロファージとウイルス増殖細胞・組織、さらには精製法及び不活化法が異なる不活化ウイルスを抗原として用いられてきたが、豚に感染防御を誘導する抗原性のあ

る不活化ウイルスは見出されていない。また、不活化ウイルスを免疫した豚に ASFV を接種すると、症状が重症化する抗体依存性感染増強 (ADE) が確認されている^{13, 17, 23, 37)}。近年、最新のアジュバントや不活化法を用いた不活化ワクチンの開発が試みられているが、ASF に対する防御効果は確認されていない^{6, 10)}。これらのことから、典型的な不活化ウイルスを用いた方法では、ASF に対する効果的なワクチン開発は期待できないと考えられている。

サブユニットワクチン

ASFV の外殻であるカプシドを構成する蛋白質 p72 と、ASFV の宿主細胞への侵入に関与する蛋白質 p54 及び p30 に対する抗体は、*in vitro* において ASFV の宿主由来培養細胞への感染を阻害する¹⁵⁾。このことから、この 3 種の ASFV に特異な蛋白質は、ASFV の中和抗原になる可能性が考えられた。そこで、組換え蛋白質の豚への免疫及び免疫個体への攻撃試験が実施されている。3 種の組換え蛋白質は、豚に高い抗体価を誘導し、その防御効果が期待されたが、攻撃試験において、全ての個体が ASF を発症し、死亡が確認されている²⁷⁾。ASFV 由来の蛋白質を抗原とした ASF ワクチン開発において、豚に 100% の防御効果を誘導する抗原性のある組換え蛋白質は、これまでに見出されていない^{16, 34)}。

p30 及び p54 は、DNA ワクチン開発の抗原としても利用されている。p30 及び p54 の遺伝子配列を含む DNA 構築物は、豚に ASFV 特異的な T 細胞の産生を誘導するが、ASFV 感染に対する防御効果は誘導できないことが報告されている⁴⁾。CD 8 陽性細胞障害性 T 細胞による細胞性免疫を誘導させることを目的に、プロテアソームによるプロセッシングの標的となるようユビキチン遺伝子の下流に p30、p54 及び ASFV に特徴的な血球吸着に関与する CD2v の遺伝子配列を融合させた DNA 構築物が作出されている。このユビキチン/p30/p54/CD2v 構築物を免疫した豚は、ASFV 特異的な CD 8 陽性細胞障害性 T 細胞が誘導され、ASFV 感染に対する部分的な防御効果 (生存率 25%) が認められている⁵⁾。また、p30 及び p54 をコードする遺伝子以外のウイルス遺伝子をユビキチン遺伝子と融合させた約 4000 個の DNA 構築物から成る DNA 発現ライブラリーを免疫された豚は、強毒株を用いた攻撃に対して 60% が生存する¹⁸⁾。このことから、p30 及び p54 以外にも ASFV 免疫防御抗原としての能力があるウイルス遺伝子の存在が示唆されている。DNA ワクチン開発

における一連の試験成績において、DNA ワクチンで誘導される感染防御と ASFV 特異 T 細胞の産生量との間に強い相関が認められることから、T 細胞応答が ASFV 感染防御に重要な役割の一端を担っているのではないかと考えられている。DNA ワクチンの現状として、ある一定の防御効果はあるものの 100% の防御効果を示す抗原は見出されておらず、野外で使用するのに十分な効果のある DNA ワクチンの開発には至っていない。サブユニットワクチンの利用には、サブユニットワクチンに適した免疫防御抗原の特定と ASFV の防御に関与する宿主免疫システムの同定、さらには豚への免疫誘導効果を向上させるのに適したデリバリーシステムの開発が重要な課題となっている。

弱毒生ワクチン

ポルトガルにて野外より分離された弱毒株 NH/P68 株 (遺伝子型: I 型) または OUR/T88/3 株 (I 型) を感染された豚は、同地区で分離された強毒株 L60 株 (I 型) 及び OUR/T88/1 株 (I 型) で攻撃しても感染は認められず、その生存率は 100% を示す。一方、同地区で分離された強毒株に対して完璧な防御効果を示した OUR/T88/3 株は、遺伝子型は I 型に分類されるが、東アフリカの国マラウイで分離された強毒株 Malawi 株 (I 型) の感染を防ぐことができないだけでなく、分離された地域が近く、遺伝的背景が類似する強毒株 Lisobon57 株 (I 型) に対しても防御効果が認められず、全ての個体が ASF を発症する^{7, 19)}。これらのことから、弱毒生ウイルスによる防御効果は非常に限定的で ASFV 株特異的であると考えられていた。近年、NH/P68 株は異種株である欧州、アジア流行株の 1 つ Armenia07 (Arm07) 株 (II 型) の感染も防御するという研究報告があり¹⁴⁾、そのワクチンとしての利用が期待されたが、発熱、関節炎や皮膚のびらん・潰瘍及び死亡などの副作用、さらにはウイルス毒性の復帰などの安全面で多くの問題を解消できず、その実用化には至っていない。

遺伝子組換え生ワクチン

弱毒 ASFV 株は、不活化 ASFV、ASFV 由来の蛋白質及び核酸と比較して、顕著にかつ堅固な感染防御効果を豚に誘導することから、現在、最も期待される ASF のワクチン候補として考えられている。その一方、実際の実用化には、弱毒株 NH/P68 株や OUR/T88/3 株の免疫時に認められる副作用の排除が必須で、さらな

る安全面での改善が重要な課題となっている。近年、副作用がなく、かつ防御効果に優れた弱毒生ワクチンの開発を目的に、ASFV の増殖複製及びウイルス毒性への関与が明らかとなっている11遺伝子 (DP71L、K196R、A238L、A224L、EP153R、A276R、B119L、EP402、DP96L、DP148R、I117L) と1遺伝子群 (MGF) について、これらの遺伝子を ASFV 強毒株または弱毒株のゲノムから単一または複数欠損させた遺伝子組換え ASFV 株が作出され、感染試験及び攻撃試験による作出株の性状解析とそれらに基づくワクチン候補株の検討が行なわれている^{1,9,11,14,20,25,26,28-33,38} (表1)。遺伝子組換え ASFV 株の性状解析から明らかとなった ASFV の生物学的性状と遺伝子組換え弱毒生ワクチン開発の課題の概要は以下のとおりである。

1) ASFV 株依存的な遺伝子欠損効果

DP71L 遺伝子をスペインにて分離された強毒株 E70 株 (I 型) より欠損させると弱毒化するだけでなく、親株 (同種株) を用いた攻撃試験において、その感染を完全に防御する³⁸⁾。一方、アフリカ大陸にて分離された強毒株 Malawi 株及び Pretoriuskop/96/4 株 (共に I 型) の DP17L 遺伝子欠損株は弱毒化せずに、免疫された個体は ASF を発症し、全て死亡する²⁾。K196R 遺伝子の欠損は、遺伝子型の異なる強毒株 Malawi 株 (I 型) と強毒株 Georgia 株 (II 型) をそれぞれ弱毒化するが、K196R 遺伝子欠損 Malawi 株は親株の感染を防御する一方で、K196R 遺伝子欠損 Georgia 株を免疫された豚は、親株を用いた攻撃試験において ASF を発症する^{26,36)}。また、DP148 遺伝子及び EP402R 遺伝子を

表1 遺伝子組換え ASFV 株の性状とその防御効果

遺伝子(群)	ASFV 株 [遺伝子型]	弱毒化	防御効果/攻撃株	文献
DP71L	E70 株 [I]	する	あり/同種 (E70 株)	[38]
	Malawi 株 [I]	しない(死亡)		[2]
	Pretoriuskop/93/4 株 [I]	しない(死亡)		[2]
K196R	Malawi 株 [I]	する	あり/同種 (Malawi 株)	[26]
	Georgia 株 [II]	する	なし/同種 (Georgia 株)	[36]
A238L	NH/P68 株 [I:弱毒株]		あり/同種 (L60 株): 異種 (50%防御, Arm07 株)	[14]
A224L	NH/P68 株 [I:弱毒株]		あり/同種 (L60 株): 異種 (40%防御, Arm07 株)	[14]
EP153R	NH/P68 株 [I:弱毒株]		あり/同種 (L60 株)	[14]
A276R	NH/P68 株 [I:弱毒株]		あり/同種 (L60 株)	[14]
B119L	Malawi 株 [I]	する	あり/同種 (Malawi 株)	[20]
	Georgia 株 [II]	する	あり/同種 (Georgia 株)	[29]
EP402R	BA71 株 [I]	する	あり/同種 (BA71 株・E75 株): 異種 (Georgia 株)	[25]
	Georgia 株 [II]	しない(死亡)		[8]
	HLJ/18 株 [II]	しない(死亡)		[11]
DP148R	Benin 株 [I]	する	あり/同種 (Benin 株)	[33]
	HLJ/18 株 [II]	しない(死亡)		[11]
I117L	Georgia 株 [II]	する	あり/同種 (Georgia 株)	[9]
MGF	Benin 株 [I]	する	あり/同種 (Benin 株)	[32]
	Georgia 株 [II]	する	あり/同種 (Georgia 株)	[28]
	HLJ/18 株 [II]	する	あり/同種 (HLJ/18 株)	[11]
DP71L・DP96L	OUR T88/3 株 [I:弱毒株]		あり/同種 (70%防御, OUR T88/1 株)	[1]
B119L・DP96L	Georgia 株 [II]	する	あり/同種 (66%防御, Georgia 株)	[31]
	HLJ/18 株 [II]	する	なし/同種 (HLJ/18 株)	[11]
MGF・B119L	Georgia 株 [II]	する	なし/同種 (Georgia 株)	[30]
MGF・EP402R	HLJ/18 株 [II]	する	あり/同種 (HLJ/18 株)	[11]

欠損させた ASFV 株でも同様の成績が報告されている^{8,11,25,33)}。これらのことから、ASFV は同一の遺伝子を欠損させても、株依存的に弱毒化できない、または防御免疫応答が誘導されない特質をもつことが分かる。この株依存的な性状の違いは ASFV に認められる遺伝的背景の多様性に起因し、ASFV は株間で異なる遺伝子及び感染メカニズムを利用して感染・増殖しているのではないかと考えられている。それゆえに、広範囲に有効で、かつ安全面でも優れたワクチンの開発には、ASFV 株間での詳細な性状比較解析が求められている。

2) 複数の遺伝子欠損による効果

野外発生弱毒株 OUR T88/3株から DP71L 遺伝子と DP96L 遺伝子の二つの遺伝子を欠損させた OUR T88/3ΔDP2株は、OUR T88/3株に認められる副作用の軽減には成功したが、その一方で、防御効果の低下が認められている¹⁾。高い防御効果が認められるが接種量依存的にウイルス毒性を呈する B119L 欠損 Georgia 株の安全面での改善を目的に、DP96L 遺伝子または MGF 遺伝子群を欠損させた遺伝子組換え ASFV 株が作出されている。B119L 遺伝子のみの欠損では、高ドーズで免疫された豚は ASF を発症して死亡するのに対し、DP96L 遺伝子または MGF 遺伝子群欠損株を免疫された豚は、死亡することなく副作用の改善が認められている³⁰⁾。しかしながら、その一方で、OUR T88/3ΔDP2株と同様に防御効果の低下または欠失が生じている。したがって、ASFV の病原性に関与する遺伝子を複数欠損することは、副作用の抑制と同時に防御効果を減衰させると考えられていた。一方、近年、HLJ/18株 (Ⅱ型) から MGF 遺伝子群と EP402R 遺伝子を欠損させた株は、副作用が認められないだけでなく、親株の攻撃に対して100%の完全な防御効果を示し、これまでとは全く対照的な試験成績が報告されている¹¹⁾。このことは、欠損させる遺伝子の機能とその組み合わせを考慮することにより、遺伝子組換え ASFV 株のワクチン効果や安全性を最大限に引き出せる可能性を示唆する。しかしながら、現在までに、ASFV ゲノム上の遺伝子について、他のウイルス種との比較から、ある程度は遺伝子機能の推測は進んでいるものの、実際の機能が明らかとなっている遺伝子は極めて限定的であり、さらには ASFV に特異な遺伝子が多数存在することも分かってきた。安全性と有効性を両立した遺伝子組換え弱毒生ワクチン候補株を作出するために

も、ASFV を構成する遺伝子の詳細な機能解析が必須の課題となっている。

3) 遺伝子組換え弱毒生ワクチンの安全性

B119L 欠損 Georgia 株は、 10^3HAD_{50} (HAD: 血球吸着反応に基づき算出されたウイルス力価) で免疫すると副作用もなく、親株を用いた攻撃試験において100%の防御効果を示す²⁹⁾。ところが、高ドーズ (10^4HAD_{50}) で免疫すると ASF を発症し、また低ドーズ (10^2HAD_{50}) で免疫すると、副作用は認められないが親株の攻撃を防御できず、ASFV の感染が成立し、発症・死亡する。また、EP402R 遺伝子欠損 BA71株は、 10^4PUF_{50} または 10^6PUF_{50} の高ドーズで接種すると親株の攻撃を防御できるが、低ドーズ (10^3PUF_{50}) では感染防御できずに ASF を発症し、死亡する²⁵⁾。このように、免疫するウイルス量の僅かな違いが、ウイルス毒性と防御効果を規定することから、遺伝子組換え弱毒 ASFV 株のワクチンとしての有効範囲は非常に狭く、その利用には十分な注意が必要だと考えられている。ASFV 弱毒生ワクチンとその実用化には、安全面での改善に加え、独自の評価法及び基準を厳しく制定する必要があるだろう。

強毒株 Georgia 株から MGF 遺伝子群を欠損させると弱毒化し、親株を用いた攻撃試験では感染個体は認められず全頭生存する²⁸⁾。その一方で、生存個体にはウイルス血症が認められ、血液中に攻撃試験28日後においても攻撃株由来の ASFV が排除されることなく検出される。EP402R 遺伝子欠損 BA71株においても同様に、感染防御豚からは攻撃株由来のウイルスが検出されており、さらに体外へのウイルス排出が長期的に観察されている²⁵⁾。おとり試験等による排出されるウイルスの伝播性及び感染性についての検討は実施されておらず、またウイルス残存による病原性の復帰についても明らかにはされていない。それゆえに、両弱毒株の防御効果は優れているものの、ウイルス残存と体外排出がワクチン利用の安全性の面で危惧される問題となっている。Georgia 株と同派生の欧州・アジア圏流行株である強毒株 HLJ/18株より MGF 遺伝子群を欠損させると、MGF 遺伝子群欠損 Georgia 株と同様の性状を示し、副作用もなく親株に対して防御効果を示す¹¹⁾。MGF 遺伝子群欠損 HLJ/18株については、病原性復帰試験によりその安全性が評価されており、豚を用いて当該株を継代すると、継代5代目でその病原性は復帰することが明らかとなっている。病原性復帰

のメカニズム解析及びウイルスゲノムの変異導入に関与する因子の特定に加え、感染防御豚体内での攻撃株の体内動態とその病原性についての解析が求められている。

4) 交差防御効果と防御免疫機構

遺伝子組換え弱毒 ASFV 株の交差防御効果に関する検討事例は少なく、これまでに A224L 遺伝子欠損 NH/P68株、A238L 遺伝子欠損 NH/P68株及び EP402R 遺伝子欠損 BA71株（全株 I 型）の 3 株の報告のみである。遺伝子型 II 型の ASFV 株（異種株）を用いた攻撃試験での生存率は、それぞれ40%（A224L 欠損 NH/P68株）、50%（A238L 欠損 NH/P68株）及び100%（EP402R 欠損 BA71株）と効果にばらつきはあるが、交差防御が確認されている^{14,25)}。ただし、交差防御効果試験に使用された 3 株には、安全面で危惧される副作用や攻撃 ASFV 株の長期的な体内残存が認められている。ASF の撲滅には、安全かつ交差防御効果のある汎用性の高いワクチンが強く求められているが、その実用化にはまだ解決すべき多くの課題がある。

ASFV を中和する抗体の存在を証明する報告はない。弱毒 ASFV 株によって誘導される防御効果がどのような宿主の免疫機能を活性化させ成立しているのか、インターフェロン- γ の上昇、ASFV 特異に反応する CD8陽性細胞障害性 T 細胞の増殖活性や抗 ASFV 抗体の上昇^{18,31,32,35)} などの関与が挙げられているが、未だ詳細は不明のままである。ASFV に注目したウイルス側の性状解析だけでなく、宿主側の防御免疫メカニズムの解析がワクチン開発を加速させるためにも重要である。

5) ASFV 感受性細胞

遺伝子組換え弱毒 ASFV 株の作出は、ASFV の宿主である豚由来の初代培養マクロファージ細胞または感染できる ASFV 株は限定されるがアフリカミドリザル腎臓由来の不死化細胞株が使用されている。豚の肺胞マクロファージで増殖させた野外発生弱毒株 NH/P68株を免疫された豚は、ASF の慢性型の症状（発熱、皮膚の壊死、関節の腫れ）が観察されるが、遺伝子型の異なる強毒株 Arm07株（II 型）の感染を防御する。一方、アフリカミドリザル腎臓由来の不死化細胞株(COS7)で培養した NH/P68株を免疫された豚は、Arm07株の感染を防御できず、全頭が ASF を発症し、死亡する¹⁴⁾。ウイルス増殖に用いる細胞に依存的な防

御効果の違いは、ASFV の異種動物細胞への馴化によって生じるゲノム変異に起因すると考えられている。したがって、弱毒 ASFV 株の増殖及び遺伝子組換え弱毒 ASFV 株の作出には、ウイルスゲノムへの変異導入頻度が異種動物由来細胞より少ないとされる宿主由来細胞の利用が必須となっている。しかしながら、豚由来の初代培養細胞は、個体からの採取する労力もさることながら、その生存率や品質にばらつきがあることから、安定的に多量のウイルスを得ることは向いておらず、加えて、細胞採取用の豚が予期せぬ病原体に感染している可能性も否定できない。弱毒 ASFV 株の防御効果を変化させることなく、安定的に均一なワクチンを製造するためにも、ASFV に高感受性のウイルス増殖効率に優れた豚由来の不死化細胞株の樹立が重要な課題となっていた。我々は、ASFV に高感受性の不死化豚腎マクロファージ(IPKM)細胞株を樹立し、IPKM細胞が野外発生強毒 ASFV 株や弱毒 ASFV 株を効率よく増殖させることができることを明らかにした²²⁾。IPKM細胞は、初代培養マクロファージ細胞と同等の性状をもつことから、遺伝子組換え ASFV 株の効率的な作出だけでなく、ASF の発症及び免疫応答メカニズムの解明などに大きく貢献することが期待される。また、優れたワクチン候補株が作出された場合には、IPKM細胞は生体由来の病原体の混入を心配することなく、安定的に均一な ASF ワクチン製剤の製造を可能とするだろう。

おわりに

ASF ワクチン開発は、2007年以降の欧州及びアジア諸国での ASF の流行を機に、急速に進められている。開発されたワクチン候補株を用いた農場レベルでの試験的な利用に関するいくつかの報告はあるが、効果及び安全性が担保され、商業的に実用化に至った ASF ワクチンはこれまでにない。本稿でも紹介したが、ASF ワクチン開発の現状として、遺伝子組換え弱毒 ASFV 株を基盤とした弱毒生ワクチンが ASF ワクチン候補として最も有力になっている。最近、副作用も特段なく親株に対する防御効果にも優れた遺伝子組換え ASFV 株が作出され^{9,11)}、弱毒生ワクチン候補株として期待はされているが、病原性の復帰等の安全性や交差防御効果については明らかにされておらず、さらにはワクチン接種による生産性への影響（養豚の肥育及び繁殖性等）などの検証すべき課題が多く残っている。ASF ワクチン開発を取り巻く現状として、国際的な

ASF ワクチンに関わる使用及び規制基準は未だ整備されておらず、このことは ASF ワクチンの実用化を遅らせる要因となるかもしれない。これまで日本での ASF の発生は認められていないが、2019年以降、渡航外国人の携帯品として国内の空港で収去された加熱不十分な 4 件の豚肉加工品から、感染性を保持した ASFV が分離されている^{21,24)}。この事実は、海外で蔓延する ASFV が既に我が国の水際まで到達しており、ASF 汚染国から持ち込まれる豚肉や豚肉加工品を介して本病が国内に侵入するリスクが極めて高いことを示している。安全かつ効果的な ASF ワクチンの実用化には、まだかなりの時間を要する可能性が高いことから、日本への ASFV の侵入と蔓延を阻止するためにも、農場にウイルスを入れないことを徹底する「飼養衛生管理基準の遵守」及び流行を阻止する「早期発見」に基づく迅速な初動対応が何よりも重要である。

利益相反

著者は開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Abrams CC, et al. (2013) Deletion of virulence associated genes from attenuated African swine fever virus isolate OUR T88/3 decreases its ability to protect against challenge with virulent virus. *Virology*, 443: 99-105.
- 2) Afonso CL, et al. (1998) African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence. *J Gen Virol*, 79: 2543-2547.
- 3) Alonso C, et al. (2018) ICTV virus taxonomy profile: Asfarviridae. *J Gen Virol*, 99: 613-614.
- 4) Argilagué JM, et al. (2011) Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. *Vaccine*, 29: 5379-5385.
- 5) Argilagué JM, et al. (2012) DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. *PLoS One*, 7: 1-11.
- 6) Blome S, et al. (2014) Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine*, 32: 3879-3882.
- 7) Boinas FS, et al. (2004) Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J Gen Virol*, 85: 2177-2187.
- 8) Borca M V, et al. (2020) Deletion of CD2-like gene from the genome of African swine fever virus strain Georgia does not attenuate virulence in swine. *Sci Rep*, 10: 1-8.
- 9) Borca MV, et al. (2020) Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain. *J Virol*, 94:1-15.
- 10) Cadenas-Fernández E, et al. (2021) High doses of inactivated African swine fever virus are safe, but do not confer protection against a virulent challenge. *Vaccines*, 9: 242.
- 11) Chen W, et al. (2020) A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs. *Sci China Life Sci*, 63: 623-634.
- 12) Dixon LK, et al. (2013) African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res*, 173: 3-14.
- 13) Forman AJ, et al. (1982) The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus. *Arch Virol*, 74: 91-100.
- 14) Gallardo C, et al. (2018) African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses. *Vaccine*, 36: 2694-2704.
- 15) Gómez-Puertas P, et al. (1996) Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *J Virol*, 70: 5689-5694.
- 16) Gómez-Puertas P, et al. (1998) The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*, 243: 461-471.
- 17) Kihm U, et al. (1987) Approaches to vaccination, In: Becker Y. (eds) African swine fever. *Developments in Veterinary Virology*, 3: 127-144
- 18) Lacasta A, et al. (2014) Expression library immunization can confer protection against lethal challenge with African swine fever virus. *J Virol*, 88:

- 13322-13332.
- 19) Leitão A, et al. (2001) The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J Gen Virol*, 82: 513-523.
 - 20) Lewis T, et al. (2000) An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. *J Virol*, 74: 1275-1285.
 - 21) 舩甚賢太郎ら (2019) 旅客携帯品として海外から持ち込まれた輸入禁止の豚肉加工品からのアフリカ豚コレラウイルス (ASFV) の分離. 日本豚病研究会会報 74: 7-14.
 - 22) Masujin K, et al. (2021) An immortalized porcine macrophage cell line competent for the isolation of African swine fever virus. *Sci Rep*, 11: 4759.
 - 23) Mebus CA (1988) African swine fever. *Adv Virus Res*, 35: 251-269.
 - 24) 農林水産省動物検疫所 (2021) 中国等アジア地域からの旅客携帯品等におけるアフリカ豚熱ウイルス遺伝子検査陽性例について. https://www.maff.go.jp/aqs/topix/pdf/asf_pcrpositive_89_jpn.pdf (2021年5月18日閲覧)
 - 25) Monteagudo PL, et al. (2017) BA71ΔCD2: A new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities. *J Virol*, 91: 1-17.
 - 26) Moore DM, et al. (1998) The African swine fever virus thymidine kinase gene is required for efficient replication in swine macrophages and for virulence in swine. *J Virol*, 72: 10310-10315.
 - 27) Neilan JG, et al. (2004) Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*, 319: 337-342.
 - 28) O'Donnell V, et al. (2015) African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of MGF 360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection against challenge with virulent parental virus. *J Virol*, 89: 6048-6056.
 - 29) O'Donnell V, et al. (2015) African swine fever virus Georgia 2007 with a deletion of virulence-associated gene 9GL (B119L), when administered at low doses, leads to virus attenuation in swine and induces an effective protection against homologous challenge. *J Virol*, 89: 8556-8566.
 - 30) O'Donnell V, et al. (2016) African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of 9GL and MGF360/505 genes is highly attenuated in swine but does not confer protection against parental virus challenge. *Virus Res*, 221: 8-14.
 - 31) O'Donnell V, et al. (2017) Simultaneous deletion of the 9GL and UK genes from the African swine fever virus Georgia 2007 isolate offers increased safety and protection against homologous challenge. *J Virol*, 91: e01760-16.
 - 32) Reis AL, et al. (2016) Deletion of African swine fever virus interferon inhibitors from the genome of a virulent isolate reduces virulence in domestic pigs and induces a protective response. *Vaccine*, 34: 4698-4705.
 - 33) Reis AL, et al. (2017) Deletion of the African swine fever virus gene DP148R does not reduce virus replication in culture but reduces virus virulence in pigs and induces high levels of protection against challenge. *J Virol*, 91: e01428-17.
 - 34) Ruiz-Gonzalvo F, et al. (1996) Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. *Virology*, 218: 285-289.
 - 35) Sánchez-Cordón PJ, et al. (2018) Evaluation of protection induced by immunisation of domestic pigs with deletion mutant African swine fever virus BeninΔMGF by different doses and routes. *Vaccine*, 36: 707-715.
 - 36) Sanford B, et al. (2016) Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. *Virus Res*, 213: 165-171.
 - 37) Stone SS, et al. (1967) Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs. *Am J Vet Res*, 28: 475-481.
 - 38) Zsak L, et al. (1996) An African swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34.5 gene. *J Virol*, 70: 8865-8871.