

## ＜別紙様式2＞研究実績報告書

令和5年度 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」  
研究実績報告書

### I. 研究の進捗状況等

委託事業「官民・国際連携によるASFワクチン開発の加速化」の4年目として、下記1から4の小課題（及び内部実施課題）において、研究の基盤となるASFウイルス（ASFV）の遺伝子改変技術の効率化、ASF増幅技術の最適化、ASF（及びCSF）の診断技術の高度化ならびに動物試験手順の標準化等の検討を行った。ASFV遺伝子改変技術の効率化（小課題1）では、実施課題2において、昨年度までに作出した機能既知ならびに未知の6つの遺伝子を欠失した単一遺伝子改変株6種類の作出、増殖技術を確立した。これらの株はいずれもIPKM細胞上で増殖が見られることから、ウイルス複製に必須の遺伝子ではないことが確認されている。（小課題2）においては昨年度までの豚不死化マクロファージ細胞株の樹立の一環として肺由来の不死化細胞株（IPLuM）を樹立したほか、アフリカのイノシシ科固有種の血液から不死化血液マクロファージ細胞株を作製した。この細胞株についてはASFV感染、増殖能を解析中である。またIPKMについて、検出された内在性レトロウイルス（PERV）活性を除去するためゲノム編集を実施し、PERV活性が不活化された改良型細胞株を樹立した。（小課題3）では、前年度に作出した血清検査用の新規ELISA法についてDIVA機能の搭載による検査法の改良を目指すため、抗体誘導に適した（実際にはこの欠損により人為的なウイルスによる免疫誘導の効果であることを可能とする）標的抗原を検討し、6種の候補分子を特定した。（小課題4）では、本プロジェクト事業で作出した上記遺伝子改変株のうち1種類について、成豚を用いた病原性評価ならびに感染防御試験を実施した。当該遺伝子欠損株では、完全な病原性の喪失（非病原性化）と防御効果が確認された。

これらのことから本課題は当初設定目標を概ね達成していると考えるが、次年度には課題の進捗状況を勘案して積極的に研究推進体制の最適化を図る予定である。

#### 1. ASFV リバースジェネティクス法の開発

（令和3年度をもって中止）

#### 2. 遺伝子組換えASFVの作出とその性状解析に基づくASFワクチン候補株の検討

組換えASFV作出法の迅速化及び効率化を達成し、遺伝子欠損ASFV株作出のシステム化が進んでいる。また、ASFVの特定遺伝子を安定的に発現する細胞株を樹立することで、ウイルス複製に必須な遺伝子を欠損したASFV株の単離が可能となっている。本年度は新たに5種類の遺伝子改変株が作出され、このうち1株については課題11でワクチン候補株としての評価を実施した。

#### 3. ウイルス由来タンパク質の網羅的機能解析

ASFV強毒株と弱毒株のゲノム・エピゲノムの比較解析を行い、強毒株と弱毒株のORF構成の違い、および発現量の異なるORFの特定を行った。次に、ASFVの感染性・毒性に寄与する

MGFタンパク質47種類同士の分子間相互作用を網羅的に解析し、11種類のMGFが複合体を形成しうることを明らかにした。この11種類のうち3種類は宿主の自然免疫応答を抑制することが示されており、他のMGFの感染性・毒性への寄与について今後解析する。

#### 4. ASFV表層タンパク質の機能解析

ASFVの由来のB602L遺伝子産物についてシャペロン機能を解析し、ASFV構造タンパク質であるp72タンパク質および非構造タンパク質であるS273R遺伝子産物の立体構造の構成に寄与していることを明らかにした。これと並行してASFVがコードする4種の小タンパク質分子が宿主細胞の生存率を低下させることを見出した。この効果の解析を目的に、現在宿主タンパク質との相互作用の解析を実施している。

#### 5. 豚組織由来不死化マクロファージの作製

豚主要組織適合性抗原（SLA）の遺伝型が固定されたクラウン系ミニ豚の血液及び腎臓からマクロファージを単離し、不死化細胞株を樹立して実行課題2003に提供した。また、豚肺の初代混合培養系からマクロファージを単離し、不死化細胞株（IPLuM）を樹立して、ASFVに対する感受性を確認した。さらに、アフリカ在来の固有種から血液由来マクロファージの混合培養を行い、これを用いて不死化血液マクロファージ細胞株の作出に成功した。現在この細胞株についてASFV感受性等を解析中である。

#### 6. 豚腎臓由来不死化マクロファージ（IPKM）細胞株の特性解析

IPKM細胞の各継代数での染色体解析を行い、染色体の安定性を確認した。また、昨年度までに存在が確認された豚内在性レトロウイルス（PERV）の不活化を目的に遺伝子改変を試み、完全にウイルス活性が失活した改良型IPKM細胞株の樹立に成功した。

#### 7. 不死化マクロファージ細胞等宿主細胞ならびに宿主の抗ASFウイルス免疫応答機構の解析

課題番号2001で作出された豚リンパ球抗原型（SLA）固定クラウンミニ豚由来の血液マクロファージ（SLA C2型）培養系を用いてASFV特異的なTリンパ球クローンの作出を試みた。ASFV弱毒株（OURT88/3株）で免疫したSLA近交系固定ミニ豚では免疫能の誘導を示唆する結果が観察されたが、ASFV特異的なT細胞クローンの樹立には至っていない。次年度に問題点の洗い出しを行い、再試験を実施して抗原特異的な細胞のライン化、クローン化を試みる。また、この間ワクチン候補株の製造に資する遺伝的安定性を高めたウイルス株の作出を目的にDNA合成に関与する機能を欠失させた遺伝子改変ウイルスを作出した。現在、ウイルスの複製に与える影響を解析中である。

#### 8. ASF/CSFマルチプレックスqPCR法の開発

（令和4年度をもって完了）

##### 【成果の活用】

本課題で開発した検出試薬ならびに核酸抽出試薬は上市され、特定家畜伝染病防疫指針（令和3年10月1日改正）の診断マニュアルならびに事務連絡（2023/7/31付および2023/11/15付）等により認められたASF（およびCSF）の正式な検査法として、既に現場での利用が開始されている。

## 9. ASFVの抗体価測定法の開発

ASFV由来の標的候補抗原を用いたASFVタンパク質を同定し、これを固相化抗原とするASFV血清ELISAを構築した。海外の研究機関との協力のもと、現在性能の検証を行っている。また、感染とワクチン接種とを区別するDIVA機能の搭載を目的に、DIVAの標的となる抗原を検索して6種類の候補分子を特定した。次年度には当該遺伝子を欠失した遺伝子改変ウイルス（疑似ワクチン株）を用いてDIVA機能の精度の検証を行う。

## 10. 豚におけるASFV弱毒株の動態解析ならびに豚由来の白血球を移植した免疫不全マウスのASF感染モデルとしての有効性評価

細胞継代により弱毒化されたASFV Lisbon' 60BM89BC1株（L60BM株）について、哺乳豚を用いた継代を3代目まで実施した。各継代において、感染7日後に採取した血液及び一部の臓器におけるウイルス力価及び遺伝子量を測定したところ、いずれの検体でもウイルス力価及び遺伝子量は初代より2～3代目で高い値となる傾向が認められた。今後さらに継代を重ね、病原性復帰や変異の有無を検証する。また、重度免疫不全NOGマウスを用いて、静脈内投与により不死化豚腎マクロファージ（IPKM細胞）を移植した。その結果、移植1～2週間後に採取した血液では豚由来遺伝子が検出されなかったものの、移植5週後に採取した一部の個体の脾臓及び腎臓から微量の豚由来遺伝子が検出され、IPKM細胞が移植後早期に臓器に移行したことが示唆された。R5年度内に新たにNOGマウスへのIPKM細胞移植及びASFV接種試験を行う予定であり、これらの結果をもってASF感染モデルとしての有効性を評価する。

## 11. ASFウイルスの病原性評価に優れた動物モデルの探索およびワクチン候補株の防御効果の評価

本年度は課題番号1002で作出されたX遺伝子欠損組換えASFV（AQSΔX）の病原性確認及び防御効果について豚を用いて解析した。AQSΔX株では完全な病原性の抑制と防御効果が認められたが、ウイルス血症の継続が認められたためこの点への対応が求められることが明らかになった。