

令和5年3月31日

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
委託事業のうち短期課題解決型研究
研究成果報告書

課題番号：20320649

いのしし用国産CSF経口ワクチンの開発

研究期間：令和2年度～令和4年度（3年間）

研究総括者名：山田 学

試験研究機関名：CSF経口ワクチンコンソーシアム

- ・ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
- ・ 共立製薬株式会社
- ・ 県立広島大学

<別紙様式3>最終年度報告書

1 研究目的

農林水産省では野生いのししを介したCSFの拡散防止対策として、野生いのししに対して2019年度3月から経口ワクチンを散布しており、2020年3月までに累計約389,000個、同年6月までに累計約604,000個を散布。2021年3月までに累計約100万個を散布する計画となっている。この経口ワクチンはドイツからの輸入に依存しており、対策が長期化する可能性を考慮すると、国内において経口ワクチンを開発することが望ましい。

本研究課題では、いのしし用豚熱（CSF）用経口ワクチンを開発することを目的として、次の3つの小課題を立てて研究を行う。

1. 経口ワクチンに適したウイルス株の作出
2. 国内での使用に適したベイト剤等の開発
3. 試作経口ワクチンの効果確認

これにより、国産CSF経口ワクチンの試作品を開発し、その有効性を、豚（可能であればいのしし）を用いて確認することを達成目標とする。

その結果、

1. 国内でのCSF経口ワクチンの開発
2. CSF経口ワクチンの安定的な供給体制構築
3. 農林水産省によるCSF拡散防止対策の強化

が期待される。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) 経口ワクチンに適したウイルス株の作出（農研機構・動物衛生研究部門、共立製薬株式会社）

国内でCSF生ワクチンに使用されている弱毒CSFウイルス GPE 株は、皮下または筋肉内注射用に開発されているため、経口経路による投与によって注射と同等の免疫を誘導するかどうかは不明である。また、一般に経口投与で感染を成立させるためのウイルス量は、筋肉内投与によるそれよりも多く必要である。本課題では弱毒CSFウイルス GPE 株が、経口経路による投与により抗体誘導等の免疫応答を惹起するかどうか、また誘導するのに必要なウイルス量の検討を行う。初年度の結果を踏まえ、GPE 株での免疫賦与率の向上を目指し、いのしし対策用にドイツから輸入している経口ワクチン（Riems C 株）を用いた投与試験を豚で実施して免疫付与率を比較するとともに、抗原の継代・培養方法や力価の影響を検討する。さらに、現在使用されている初代培養細胞に比して、安定的且つ大量に培養可能な株化継代細胞による培養系の確立および遺伝子組換え技術を利用した組換えワクチンの開発も試みる。

(ア) CSFウイルスGPE 株の経口投与での有効性の検討

弱毒CSFウイルスGPE 株の経口経路による投与によって抗体応答等の免疫を誘導可能か検証する。また投与ウイルス量を変えて免疫応答を解析し、経口経路での50%感染量を推定する。

(イ) 新規株化細胞の検索

本開発ワクチンの抗原であるCSFウイルスが属するペスチウイルス属に感受性の報告がある細胞を中心に、株化細胞を複数入手し、GPE 株の増殖性の有無を確認する。現行CSF生ワクチンの製造用細胞であるモルモット腎初代細胞と同等以上の増殖性を示した場合には、ワクチン株の連続継代による病原性復帰等の安全性の確認を行う。また、モルモット腎初代細胞には及ばないものの、増殖性を示した細胞については、安定的に高いウイルス力価が得られるようにワクチン株の馴化を検討する。

(ウ) 細菌を用いたCSFベクターワクチンの開発

本研究では、生体内および自然界で生残できないように理論的に弱毒化させた豚丹毒菌を用い、この株にCSFウイルスの防御エピトープを発現させたベクターワクチン候補株を構築する。この株を豚に経口的に投与し、中和抗体の誘導を解析する。

2) 国内での使用に適したベイト剤の開発（農研機構・食品研究部門、県立広島大学、共立製薬株式会社、農研機構・畜産研究部門、農研機構・動物衛生研究部門）

国内のいのししが経口ワクチンを効率的に摂取するように嗜好性に優れたベイト剤および安定性の高い素材とワクチンの抱合法等を検討する。また、飼育個体を対象とした摂食量評価などにより、国内におけるいのししの嗜好性を評価する。試作したベイト剤の環境での安定性およびいのししの嗜好性を評価した上で、材料の配合および成形条件を見直すことによって素材の改良を行い、国内のいのししへの適用性に優れたベイト剤を開発する。

(ア) ベイト剤素材の開発

国内のいのししへの使用に適したベイト剤を試作するために、各種形状の金型を作

製し、射出成型機・焼成機等を使用することにより、ベイト剤用の素材を試作する。国内のいのししについて高い嗜好性と誘因性が報告されているトウモロコシおよび米糠等を主な原料として、これに油脂等を添加しながら、各種の温度条件等で成形することにより素材を作製する。試作した素材について、成形性・強度といった物理特性を評価することにより、加工適性に優れた素材を選定する。

(イ) いのししの嗜好性の確認

試作したベイト剤素材について、飼育個体等で採食の有無や採食量および頻度等の観察を、センサーカメラを用いて行い、国内におけるいのししの嗜好性を評価する。

(ウ) ベイト剤とワクチンの抱合の検討

試作したベイト剤素材について、生ウイルスを含まない原液を封入して、保存試験を実施し、素材の耐熱性および耐水性を明らかにする。

3) 試作経口ワクチンの効果確認（農研機構 動物衛生研究部門、共立製薬株式会社）

本課題では小課題1および2で得られた研究成果から試作された経口ワクチンの有効性を、豚（可能であればいのしし）を用いて検証する。

(ア) 試作ワクチンの免疫付与効果確認試験

試作ワクチンを豚もしくはいのししに経口経路で投与し、免疫応答を解析することで試作したワクチンが豚もしくはいのししに免疫付与できるかどうか検証する。

(イ) 試作ワクチンのCSFウイルス感染防除効果確認試験

試作ワクチンを豚もしくはいのししに経口経路で投与した後、CSFウイルス野外株で攻撃して、試作したワクチンによるCSFウイルスの感染および発症防御効果、ウイルス排泄の抑制効果を検証する。

(2) 達成目標及び進捗目標

現行のCSF生ワクチンである弱毒CSFウイルスGPE株を使用して、経口経路による投与によって免疫を誘導可能かどうか検証する。また、ウイルス量を変えて経口経路による50%感染量を推定する。さらに、安定してGPE株の大量生産を可能とする株化継代細胞等の検索を行い、1つ以上の大量培養系を確立する。また、CSFベクターワクチンを1つ以上開発する。

数種の穀物由来の素材を使用してベイト剤を試作し、その中から野外環境での安定性および国内のいのししの嗜好性が高いベイト剤を2種類以上作製する。ベイト剤を安定的に生産していく上で、特定の穀物の供給に依存することを避けることが望ましく、上記のように、3年間の研究期間の中で2種類以上の異なる穀物を主原料としたベイト剤を作製することを目指す。

試作した経口ワクチンをいのししもしくは豚に摂食させた後で、国内流行株で攻撃し、試作経口ワクチンの有効性を明らかにする。

(3) 研究成果の行政施策・措置への貢献

農林水産省では野生いのししを介したCSFの拡散防止対策として、野生いのししに対して経口ワクチンを散布している。この経口ワクチンはドイツからの輸入に依存しており、対策が長期化する可能性を考慮すると、経口ワクチンを安定的に供給できる体制が望ましい。本研究成果により、経口ワクチンの国内製造につながれば、農林水産省によるCSF拡散防止対策の強化が可能となる。

(4) 年次計画

研究課題	研究年度		
	令和2年度	令和3年度	令和4年度
1. 経口ワクチンに適したウイルス株の作出			
(1) CSFウイルスGPE株の経口投与での有効性の検討	CSFウイルスGPE株の経口投与での有効性の検討		
(2) 新規株化細胞の検索	製造可能な新規株化細胞の検索		
(3) 細菌を用いたCSFベクターワクチンの開発	豚丹毒菌弱毒株を用いたCSFベクターワクチンの開発		豚におけるワクチンの免疫付与効果の検証(注1)
2. 国内での使用に適したベイト剤の開発			
(1) ベイト剤素材の開発	ベイト剤の開発(注2)		
(2) いのししの嗜好性の確認	嗜好性の調査(注3)		
(3) ベイト剤とワクチンの抱合の検討	ワクチンの抱合		
3. 試作経口ワクチンの効果確認			
(1) 試作ワクチンの免疫付与効果確認試験		ワクチンの免疫付与効果の検証	
(2) 試作ワクチンのCSFウイルス感染防除効果確認試験		感染試験によるワクチン効果の検証	

注1) 組換え株を作成することに成功したため、組換え株を豚に経口投与し免疫血清を用いてウイルス中和活性を調べる試験を最終年度の計画に追加した（中間評価の研究成果報告書の提出の際に追加）。

注2) ベイト剤およびワクチン抱合剤の試作品の開発を完了したため、計画を前倒しして令和3年度で実施課題を完了する。令和4年度は共同研究機関として開発したベイト剤と抱合剤の試作品を小課題3へ供給する。

注3) 新型コロナウイルス対策に係る移動制限や調査地等における野生いのししでの豚熱発生により、現地調査・試験の実施に影響が出ており、かつ、実施課題2－(3)の抱合材への採食効果を検証するため、令和4年度も継続して実施課題を進める（中間評価の研究成果報告書の提出の際に追加）。

(5) 研究体制



(6) 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者	エフォート (%)
	機関	研究室		
研究総括者	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 (動物衛生研究部 門)	病理・生産病グループ	◎山田 学	15
1. 経口ワクチンに適した ウイルス株の作出	動物衛生研究部門	ウイルスグループ	○大橋誠一	15
(1) CSFウイルスGPE ⁻ 株の 経口投与での有効性 の検討	動物衛生研究部門	ウイルスグループ	△大橋誠一	前出
	動物衛生研究部門	ウイルスグループ	宮崎綾子	10
	動物衛生研究部門	ウイルスグループ	岸田なつみ	10
	動物衛生研究部門	ウイルスグループ	岩丸祥史	10
	動物衛生研究部門	新興ウイルスグループ	宮澤光太郎	10
	動物衛生研究部門	ウイルスグループ	池田圭吾	10
	動物衛生研究部門	病理・生産病グループ	山田 学	前出
	動物衛生研究部門	海外病グループ	生澤充隆	10
	共立製薬株式会社 先端技術開発セン ター (共立製薬)	ワクチン開発部ワクチン 1課	首藤洋三	10
	共立製薬	製薬統轄本部	川上和夫	5
	共立製薬	ワクチン開発部ワクチン 1課	槻尾麻奈絵	20
	共立製薬	ワクチン開発部ワクチン 1課	池田 剛	20
	共立製薬	ワクチン開発部ワクチン 1課	皿田雄二	20
(2) 新規株化細胞の検索	共立製薬	ワクチン開発部ワクチン 1課	△首藤洋三	前出
	共立製薬	製薬統轄本部	川上和夫	前出
	共立製薬	ワクチン開発部ワクチン 1課	槻尾麻奈絵	前出
	共立製薬	ワクチン開発部ワクチン 1課	池田 剛	前出
	共立製薬	ワクチン開発部ワクチン 1課	皿田雄二	前出
	動物衛生研究部門	ウイルスグループ	大橋誠一	前出
	動物衛生研究部門	ウイルスグループ	岩丸祥史	前出
(3) 細菌を用いたCSFベク ターワクチンの開発	動物衛生研究部門	細菌グループ	△下地善弘	10

2. 国内での使用に適した ベイト剤の開発	動物衛生研究部門	細菌グループ	小川洋介	10
	動物衛生研究部門	細菌グループ	西川明芳	10
	国立研究開発法人 農業・食品産業技 術総合研究機構食 品研究部門（食品 研究部門）	食品加工グループ	○根井大介	10
	(1) ベイト剤素材の開発			
	食品研究部門	食品加工グループ	△根井大介	前出
	県立広島大学	生命環境学部 生命科学科	吉野智之	10
	国立研究開発法人 農業・食品産業技 術総合研究機構畜 産研究部門（畜産 研究部門）	動物行動管理グループ	平田滋樹	10
	畜産研究部門	動物行動管理グループ	秦 彩夏	10
	畜産研究部門	動物行動管理グループ	長沼知子	10
	畜産研究部門	動物行動管理グループ	遠藤友彦	10
	共立製薬	ワクチン開発部ワクチン 1課	首藤洋三	前出
	共立製薬	製薬統轄本部	川上和夫	前出
	共立製薬	ワクチン開発部ワクチン 1課	槻尾麻奈絵	前出
	共立製薬	ワクチン開発部ワクチン 1課	池田 剛	前出
	共立製薬	ワクチン開発部ワクチン 1課	皿田雄二	前出
	(2) いのししの嗜好性の 確認			
	畜産研究部門	動物行動管理グループ	△平田滋樹	前出
	畜産研究部門	動物行動管理グループ	秦 彩夏	前出
	畜産研究部門	動物行動管理グループ	長沼知子	前出
	畜産研究部門	動物行動管理グループ	遠藤友彦	前出
	県立広島大学	生命環境学部 生命科学科	吉野智之	前出
	食品研究部門	食品加工グループ	根井大介	前出
	動物衛生研究部門	病理・生産病グループ	山田 学	前出
	動物衛生研究部門	海外病グループ	生澤充隆	前出
	(3) ベイト剤とワクチン の抱合の検討			
	食品研究部門	食品加工グループ	△根井大介	前出
	県立広島大学	生命環境学部 生命科学科	吉野智之	前出

	共立製薬	ワクチン開発部ワクチン 1課	皿田雄二	前出
--	------	-------------------	------	----

(注1) 研究総括者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

(注2) 代表機関及び共同研究機関並びに研究総括者の変更を行う必要が生じた場合はその理由を明記した書面を添付すること。

異動等による研究者の交代

前任者石神聡士（～2021.1）後任者首藤洋三（2021.2～）

異動等による研究者の追加

皿田雄二（2021.7～）

遠藤友彦（2021.10～）

長沼知子（2022.04～）

（7）各年度の研究費

令和2年度 25,000千円

令和3年度 25,000千円

令和4年度 25,000千円

3 研究推進会議の開催状況

別添のとおり。

4 研究成果の概要（別紙参照）

（1）主な成果

1） 成果の内容

ア）経口ワクチンに適したウイルス株の作出

- ・ワクチン株として GPE 株を選択し、GPE 株は経口投与でも豚への抗体誘導が可能であることを確認した。
- ・大量培養に適した製造用株化細胞候補として、豚由来株化細胞を選択し、現行方法以上に GPE 株を大量に培養することに成功した。
- ・製造を念頭に置いた培養条件を検討し、豚由来株化細胞を用いた大量培養法での製造が可能であることを確認した。
- ・血清の種類による GPE 株の増殖性については、豚由来株化細胞は血清の種類や濃度による影響は少なかったものの、総じて山羊血清が高いウイルス含有量となる傾向を示した。更に今回新たに検討した馬血清では、他の血清と同等の成績が得られることも確認された。馬血清は安定供給の確認は必要であるものの、CSF ウイルスと交差反応性を示す牛ウイルス性下痢症ウイルス（BVDV）抗体を保有していない点は大きな利点であると考えられた。
- ・豚由来株化細胞馴化 GPE 株の安全性確認のための特異的遺伝的指標（マーカー）の保持を確認した。
- ・CSF ベクターワクチンの開発では、CSF ウイルス E2 蛋白質の防御エピトープ遺伝子を導入した組換え株 10 株によるマウスへの抗体誘導を確認し、ワクチン候補株としての組換え株を作成することに成功した。

イ）国内での使用に適したベイト剤の開発

- ・米ぬかおよびトウモロコシ等を素材としたベイト剤試作品の作成に成功した。
- ・ベイト剤試作品によるいのししの誘引、摂食を確認した。
- ・ワクチンの散布に係るいのししとタヌキの行動時間帯の差を明らかにした。
- ・既存の抱合材（アルミ素材）と比較して分解能の高い抱合材の作成に成功した。

ウ）試作経口ワクチンの効果確認

- ・試作ワクチン摂食 5 頭中 3 頭で抗体の上昇を確認した。
- ・抗体の上昇を確認した 3 頭ではウイルスで攻撃しても臨床症状なし、解剖所見なし、ウイルス血症なし、の結果が得られた。
- ・抗体陰性の 2 頭の豚でもウイルス攻撃後の臨床症状低減効果を確認した。
- ・今回の結果から、試作経口ワクチンは抗体誘導できれば有効性が有ることを確認した。
- ・追加試験では試作ワクチン摂食 5 頭中 4 頭で抗体の上昇を確認した。

2） 成果の活用

- ・ワクチン株として GPE 株を用い、米ぬかおよびトウモロコシ等を素材としたベイト剤による国産 CSF 経口ワクチンの試作品の開発に成功した。
- ・国産 CSF 経口ワクチンの社会実装化につながる基礎的データ、課題が得られ、国産 CSF 経口ワクチンの早期の社会実装化への活用が期待される。
- ・いのししの嗜好性についてのデータは現在行っている現行のベイトワクチンの効率的な運用に対して活用できる。また今後のワクチンの散布戦略への活用も期待される。

(2) 各研究課題の成果

1) 小課題名：経口ワクチンに適したウイルス株の作出（大橋 誠一・農研機構 動物衛生研究部門）

(ア) 研究目標

現行のCSF生ワクチンである弱毒CSFウイルスGPE株を使用して、経口経路による投与によって豚に免疫を誘導可能かどうか検証する。また、安定してGPE株の大量生産を可能とする株化継代細胞等の検索を行い、1つ以上の大量培養系を確立する。さらに、細菌を用いたCSFベクターワクチンを開発する。

(イ) 研究内容

小課題1は研究目標達成のため、「1-1：CSFウイルスGPE株の経口投与での有効性の検討」、「1-2：新規株化細胞の検索」、「1-3：細菌を用いたCSFベクターワクチンの開発」の3つの実施課題に分けて実施する。

実施課題1-1：CSF生ワクチンに使用されている弱毒CSFウイルスGPE株は、皮下または筋肉内注射用に開発されているため、経口経路による投与によってどの程度の免疫を誘導するかは不明である。まず、通常の皮下投与量およびそれよりも多い投与量のウイルスを豚に経口的に投与し、発熱等の臨床症状の有無、血中抗体価の経時的推移、ウイルス血症の有無等を解析し、免疫が成立するか否かを確認する（令和2年度）。比較のため、通常の皮下または筋肉内接種による抗体応答等の免疫応答の解析および経時的なウイルスの体内分布を解析する（令和2年度）。前年度のGPE株の結果を踏まえ、いのしし対策用にドイツからの輸入している経口ワクチン（Riems C株）との免疫賦与の比較検討のため、輸入経口ワクチン（Riems C株）を用いて前年度と同様の給与方法による投与試験を豚で実施して臨床症状の有無や免疫賦与について解析を行う（令和3年度）。また、GPE株の経口投与による免疫賦与が確認された場合は、ウイルス量の調整や、継代・培養方法を改良したウイルスを経口投与し、免疫応答およびウイルス学的解析を行う（令和3年度）。さらに、1-3で作出されたベクターワクチンについても必要に応じて経口投与実験を実施する（令和3年度）。

実施課題1-2：現在、国内で使用されている豚用CSF生ワクチンは、モルモット腎初代細胞を用いて製造されている。そのため、一般的に注射ワクチンより高いウイルス力価が求められる経口ワクチンでは、より効率的な製造法の改良が必要となる。そこで、現在のワクチン製造用株であるGPE株が増殖可能である株化細胞の検索を行う。新規株化細胞の検索に当たっては、論文等での情報を元に国内外で入手可能な細胞を入手し、ウイルス産生能の確認を行う（令和2～3年度）。次に連続継代により、GPE株の病原性復帰の確認を行い、より生産性および安全性の高い株化細胞の選出を行う（令和3～4年度）。

実施課題1-3：本研究では、生体内および自然界で生残できないように理論的に弱毒化させた豚丹毒菌を用い、この株にCSFウイルスの防御エピトープを発現させたベクターワクチン候補株を構築する（令和2～3年度）。この株を豚に経口的に投与し、中和抗体の誘導を解析する（令和3～4年度）。

(ウ) 研究結果

実施課題 1-1 :

弱毒CSFワクチンGPE株を豚に経口投与し、どの程度の免疫を誘導するか検証した。具体的には8週齢の去勢豚を用いて経口、対照として経鼻および皮下投与の3群（6頭/群）に分けて実施した。経口投与群は1.5cm角のパンに染み込ませて個別に給与した。経鼻投与群は2.5mLシリンジで左右の鼻腔から投与、皮下投与群は耳根部に注射した。それぞれの群には未接種同居豚を2頭配置した。いずれの経路も1頭当たりの投与量は 10^4 TCID₅₀（CPK細胞による免疫ペルオキシダーゼ法）とした。また、初回投与21日後に免疫賦与が確認できない場合は追加投与を行った。免疫賦与の確認のため7日毎に採血し、抗体価をELISAおよび中和試験で測定した。さらに、投与後0、3、5、7および14日目に採血を実施し、RT-PCR法によりウイルス血症の確認をした。

結果として、実験期間（40日間）を通して3群ともに臨床上の異常や発熱は観察されず、ワクチン投与後14日までの血清中からウイルス遺伝子は検出されなかった。各群の免疫賦与状況を検討するため、ELISA法とウイルス中和試験の2通り方法で血清中の抗体価を測定した。投与後3週目の経口投与群では6頭中2頭、経鼻投与群では6頭中4頭、皮下投与群では5頭中5頭で抗体が検出された。経口投与群の陽性率が低いため21日後に追加投与を行ったが、4週目に明確な抗体価の上昇および陽性率の上昇は認められなかった（表1-1-1）。

表1-1-1：各群の抗体陽性率の推移

経路	検査方法	1週目	2週目	3週目	4週目
経口投与群	ELISA	0/6	0/6	2/6	2/6
	中和試験	0/6	2/6	2/6	2/6
経鼻投与群	ELISA	0/6	0/6	4/6	4/6
	中和試験	0/6	4/6	6/6	6/6
皮下投与群	ELISA	0/5	3/5	5/5	5/5
	中和試験	0/5	5/5	5/5	5/5

次に比較対照として現在使用しているのしし用経口ワクチン、Riems C株の免疫賦与試験を8週齢の去勢豚1群6頭で、1.5cm角のパンに染み込ませて給与する群（パン群）とカプセルに入れて給与する群（カプセル群）の2群に分けて実施した。いずれも1頭当たり $10^{5.1}$ TCID₅₀を投与した。投与後、ウイルス血症の確認や抗体応答を経時的に解析した。そしてGPE株の免疫賦与試験を8週齢の去勢豚1群6頭として、前年度よりも感染価を10倍高い1頭当たり $10^{5.1}$ TCID₅₀を投与する群（GPE株群）と豚腎細胞で継代したGPE株を1頭当たり $10^{5.1}$ TCID₅₀を投与する群（継代株群）の2群に分けて実施した。ウイルスの給与はどちらの群もカプセルに入れて実施した。また、初回投与21日後に免疫賦与が確認できない場合は追加投与を行う。すべての動物試験は投与後0、3、5、7および14日目に採血を実施し、RT-PCR法によりウイルス血症の確認をした。また、免疫賦与の確認のため7日毎に採血し、抗体価をELISA法および中和試験で測定した。

結果として、Riems C株の免疫賦与試験では投与後14日目には両群ともにELISA法では6頭中4頭、中和試験ではパン群で6頭中4頭、カプセル群では全頭で抗体が検出された。21日目以降、パン群の免疫賦与率は変わらなかったが、カプセル群では21日目にはELISA法でも全頭で抗体が検出された。実験最終日（投与42日目）の中和抗体価は幾何平均で114倍（32~256倍）であった。また、ワクチン投与後3、5、7及び14日目の血清が

らウイルス遺伝子が検出され、ウイルス血症を起こしていることが確認された（表1-1-2）。

GPE株の免疫賦与試験では投与後14日目の中和試験でGPE⁻株群で6頭中2頭、継代株群で6頭中1頭抗体が検出された。21日目の抗体陽性率が低いため29日目に追加投与を行ったところ、42日目にはGPE株では新たに1頭、継代株群では新たに3頭から中和試験で抗体が検出され、免疫賦与率に改善が見られた。また、実験期間中に採材したすべての血清中からウイルス遺伝子は検出されなかった（表1-1-3）。

表1-1-2：Riems C株投与方法の違いによる免疫賦与率の比較

給与方法	検査方法	0日目	7日目	14日目	21日目	28日目	35日目	42日目
パン	ELISA	0/6	0/6	4/6	4/6	4/6	4/6	4/6
	中和試験	0/6	0/6	4/6	4/6	4/6	4/6	4/6
カプセル	ELISA	0/6	0/6	4/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	中和試験	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

表1-1-3：継代方法の異なるGPE株を経口投与にした時の免疫賦与率の比較

ウイルス*	検査方法	0日目	7日目	14日目	21日目	28日目	35日目	42日目 [†]
GPE ⁻	ELISA	0/6	0/6	0/6	2/6	2/6	2/6	2/6
	中和試験	0/6	0/6	2/6	2/6	2/6	2/6	3/6
豚腎細胞	ELISA	0/6	0/6	0/6	1/6	1/6	1/6	1/6
継代GPE ⁻	中和試験	0/6	0/6	1/6	1/6	1/6	1/6	4/6

*:29日目に経口で1回目と同ドーズを追加投与

†:ウイルスの投与はカプセルに入れて実施。

(エ) 研究成果の活用における留意点

いのしし用に散布している経口ワクチンと同様にGPE株を豚の株化細胞で継代馴化することで 10^6 TCID₅₀/mL以上のウイルスが得られた。豚の株化細胞で継代馴化することで、ウイルス株が豚に対して病原性を示すようになる可能性が危惧される。豚の株化細胞で継代馴化したウイルスの安全性を確認する必要がある（実施課題1-2で実施）。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

CSFウイルスGPE株の経口投与での有効性を検討し、試作ワクチンをGPE株で作成することを決定した。本実施課題の最終目標である、「現行のCSF生ワクチンである弱毒CSFウイルスGPE株を使用して、経口経路による投与によって免疫を誘導可能かどうか検証する。」ことは達成された。現在使用されている経口ワクチンと比較して、若干免疫賦与率は低かったがウイルス抗原の培養手法や調整法、添加剤を工夫することで免疫賦与率の向上は望めると考えられた。

実施課題 1－2：

本開発ワクチンの抗原であるCSFウイルスが属するペスチウイルス属に感受性の報告がある細胞を中心に株化細胞を複数入手し、GPE株の増殖性の有無を確認した。具体的には、細胞培養用フラスコで培養したげっ歯類由来の株化細胞（104C1細胞、BHK-21細胞）及びVero細胞（Vero細胞、VERO76細胞、Vero細胞KY-5株）にMOI=0.1に希釈調整したGPE株を接種したのちに30℃または37℃の条件で14日間培養し、経日採取した培養上清のウイルス含有量測定試験を実施した。ウイルス含有量測定試験結果をもとに各株化細胞でのウイルスの増殖曲線を作成した。また各株化細胞で増殖させたGPE株のマーカー試験を実施した。

製造用の候補となる各株化細胞で培養したGPE株の各日でのウイルス含有量成績を表1-2-1に示した。試験の結果、104C1細胞（30℃培養）及びVERO76細胞（37℃培養）でGPE株の増殖性が確認された。104C1細胞では、ウイルス接種後6日目のウイルス含有量が $10^{4.75}$ TCID₅₀/mL、VERO76細胞では、ウイルス接種後13日目で $10^{4.25}$ TCID₅₀/mLであった。

GPE株の増殖性が確認された104C1細胞（30℃培養）及びVERO76細胞（37℃培養）のGPE株の増殖曲線を図1-2-1に示した。

104C1細胞及びVERO76細胞で培養したGPE株の特異的な遺伝的指標となるマーカー試験（Eマーカー、Tマーカー及びGマーカー）を実施した。その結果、両細胞で培養したGPE株はTマーカー及びGマーカーが維持されていることを確認した。また、Eマーカーについては、104C1細胞で培養したGPE株では維持されていることが確認されたが、VERO76細胞で培養したGPE株については、現時点では未確認である。

表1-2-1：各株化細胞におけるGPE株の増殖性確認試験成績

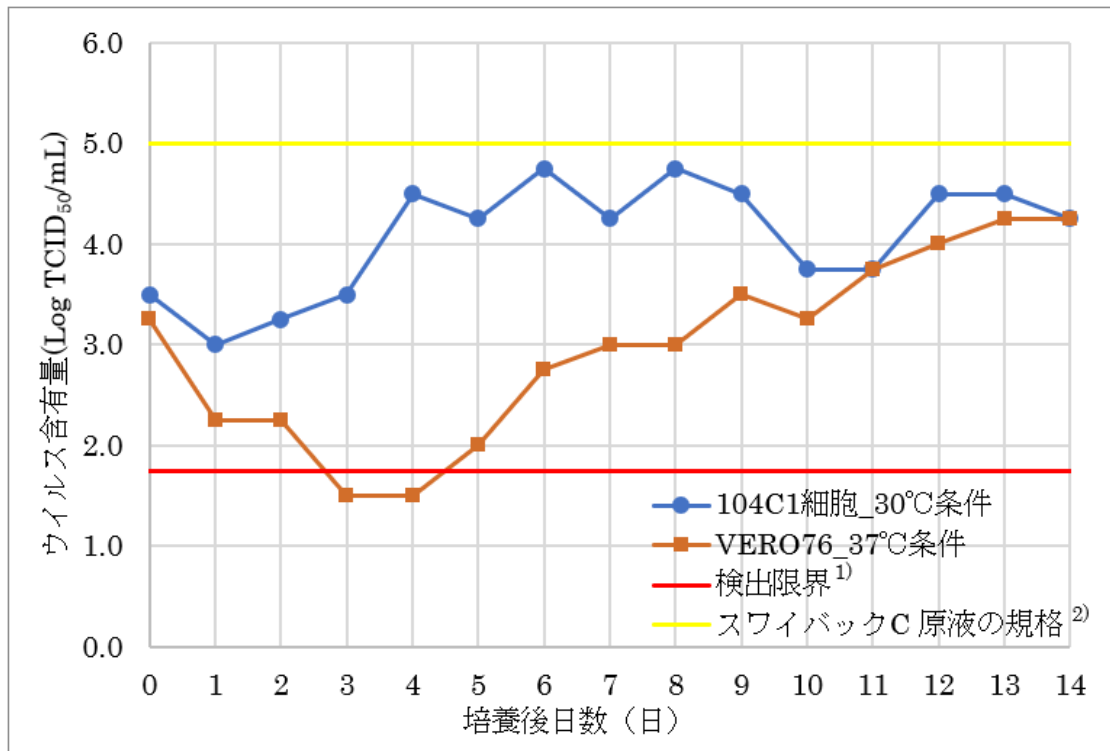
株化細胞 培養温度	104C1		BHK-21		Vero		Vero76		Vero KY-5	
	30℃	37℃	30℃	37℃	30℃	37℃	30℃	37℃	30℃	37℃
0dpi*	3.50 [†]	3.25	4.00	3.75	3.00	3.75	2.50	3.25	1.75	2.25
1dpi	3.00	3.25	3.25	2.50	2.50	2.75	3.00	2.25	<1.75	<1.75
2dpi	3.25	4.00	3.00	2.25	1.75	<1.75	2.25	2.25	<1.75	<1.75
3dpi	3.50	3.75	2.50	2.25	1.75	<1.75	1.75	<1.75	<1.75	<1.75
4dpi	4.50	3.75	3.25	2.25	<1.75	<1.75	2.75	<1.75	<1.75	<1.75
5dpi	4.25	4.00	2.50	1.75	<1.75	<1.75	2.25	2.00	<1.75	<1.75
6dpi	4.75	3.75	2.25	<1.75	<1.75	<1.75	1.75	2.75	<1.75	<1.75
7dpi	4.25	3.75	2.25	<1.75	<1.75	<1.75	2.00	3.00	<1.75	<1.75
8dpi	4.75	3.50	2.25	<1.75	<1.75	<1.75	1.75	3.00	<1.75	<1.75
9dpi	4.50	3.50	1.75	<1.75	<1.75	<1.75	<1.75	3.50	<1.75	<1.75
10dpi	3.75	2.75	1.75	<1.75	<1.75	<1.75	<1.75	3.25	<1.75	<1.75
11dpi	3.75	2.75	1.75	<1.75	<1.75	<1.75	<1.75	3.75	<1.75	<1.75
12dpi	4.50	4.75	1.75	<1.75	<1.75	<1.75	<1.75	4.00	<1.75	<1.75
13dpi	4.50	3.00	1.75	<1.75	<1.75	<1.75	<1.75	4.25	<1.75	<1.75
14dpi	4.25	2.75	1.75	<1.75	<1.75	<1.75	<1.75	4.25	<1.75	<1.75

*：dpi（days post inoculation：接種後日数）

[†]：Log TCID₅₀/mL

赤字：CSFウイルスGPE⁺株の増殖性が確認された株化細胞及び増殖温度

■：検出限界以下（ ≤ 1.75 TCID₅₀/mL）



1) ; CSFウイルス含有量測定試験の検出限界 (1.75 Log TCID₅₀/mL)

2) ; スワイバックCの原液のウイルス含有量の規格 (5.0 LogTCID₅₀/mL以上)

※ ; <1.75 Log TCID₅₀/mLのウイルス含有量については、1.5 Log TCID₅₀ /mLとして、グラフを作成した。

図1-2-1： 株化細胞の培養上清のCSFウイルス増殖曲線

令和2年度に検討した104C1細胞及びVERO76細胞に代わり、令和3年度は新たにJH4clone1細胞及びMDBK細胞を入手しGPE株の増殖性の有無を確認した。具体的には、JH4clone1細胞またはMDBK細胞にGPE株を接種し、30℃条件で培養した。培養期間中に培養上清を採取し、ウイルス含有量を測定した。なお、ウイルス接種後の培養液に供試する血清は牛または山羊を使用し、ウイルスの増殖性を比較した。また、令和2年度の研究でGPE株に感受性が確認された2種類の株化細胞（104C1細胞及びVERO76細胞）及び令和3年度にGPE株の増殖性を検討した2種類の株化細胞（JH4clone1細胞及びMDBK細胞）を用いた連続継代によるウイルスの馴化を継続して検討した。そしてベイト剤製造時の熱負荷に対するGPE株の熱安定性を確認した。具体的には、GPE株原液を各温度条件（20℃、37℃及び45℃）で処理し、処理後30分まで経時的にサンプリングを行い、各温度でのウイルス含有量を測定し熱安定性を評価した。

本試験で使用したJH4clone1細胞での各日でのウイルス含有量成績を表1-2-2に、また、増殖曲線を図1-2-2に示した。試験の結果、いずれの血清を添加した培地でもJH4clone1細胞でGPE株の増殖性が確認され、牛血清添加培地では、ウイルス接種後7日目に105.24 TCID₅₀/mL、一方、山羊血清添加培地では、ウイルス接種後8日目に105.74 TCID₅₀/mLを示した。JH4clone1細胞のウイルス含有量は、モルモット腎初代細胞の成績より低かったが、豚用豚熱ワクチンの規格以上のウイルス含有量であった。また、牛血

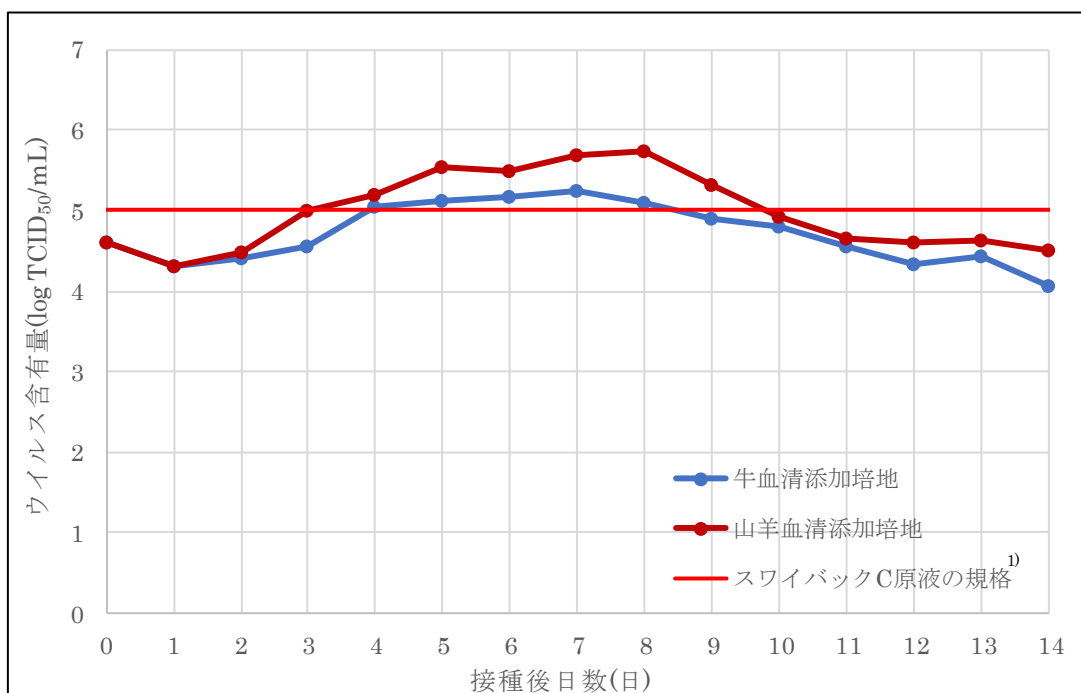
清に比べ山羊血清の方が、ウイルス含有量がより高く、且つ高値で維持される傾向が認められた。更に今回検討を行ったMDBK細胞については、各日におけるウイルス含有量成績を表1-2-3に、また、増殖曲線を図1-2-3に示した。試験の結果、いずれの血清を添加した培地でもMDBK細胞ではCSFワクチンの原液として必要な105.0 TCID₅₀/mLを超える増殖性が確認されなかった。

表1-2-2：JH4clone1細胞におけるGPE 株の増殖性確認試験成績

株化細胞	JH4clone1細胞	
	牛血清添加培地	山羊血清添加培地
接種後日数（日）		
0	4.60	4.60
1	4.30	4.30
2	4.41	4.48
3	4.55	5.00
4	5.04	5.20
5	5.11	5.55
6	5.18	5.50
7	5.24	5.68
8	5.10	5.74
9	4.90	5.31
10	4.81	4.92
11	4.55	4.65
12	4.34	4.60
13	4.44	4.64
14	4.05	4.50

*：Log TCID₅₀/mL

赤字：各条件の最大のウイルス含量



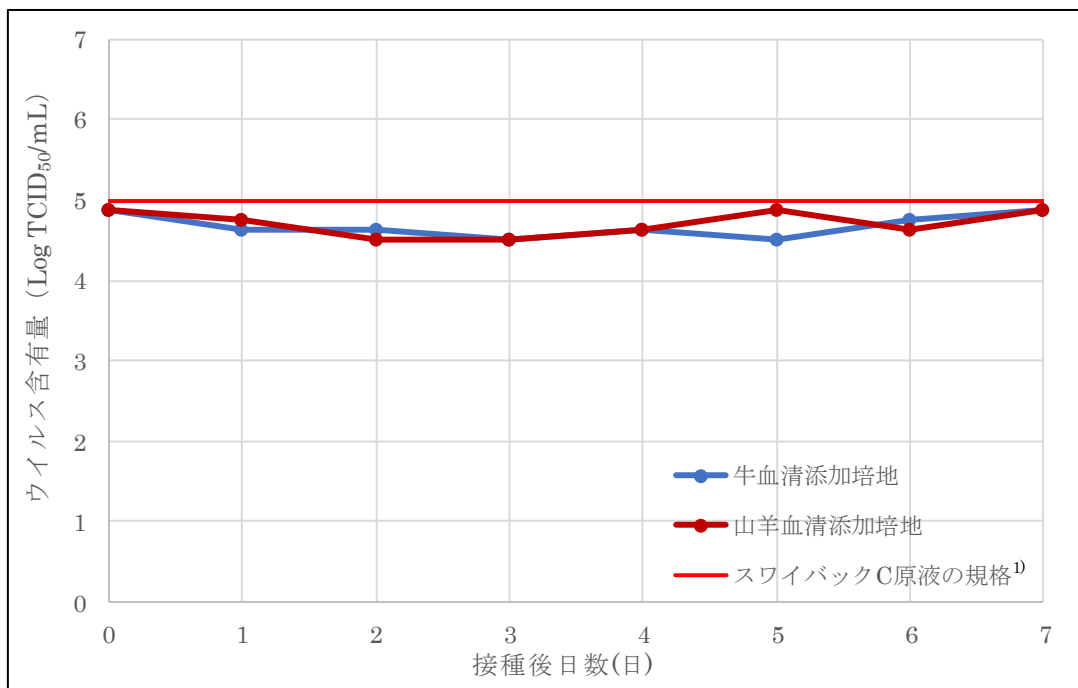
1) ; スワイバックCの原液のウイルス含有量の規格 (5.0 Log₁₀ TCID₅₀/mL以上と規定)

図1-2-2 : JH4clone1細胞培養上清のGPE 株の増殖曲線

表1-2-3 : MDBK細胞におけるGPE 株の増殖性確認試験成績

株化細胞 接種後日数(日)	MDBK細胞	
	牛血清添加培地	山羊血清添加培地
0	4.88*	4.88
1	4.63	4.75
2	4.63	4.50
3	4.50	4.50
4	4.63	4.63
5	4.50	4.88
6	4.75	4.63
7	4.88	4.88

* ; Log TCID₅₀/mL



1) ; スワイバックCの原液のウイルス含有量の規格 (5.0 Log TCID₅₀/mL以上と規定)

図1-2-3 MDBK細胞培養上清のGPE株の増殖曲線

本試験に使用したJH4clone1細胞、104C1細胞及びVERO76細胞の各株化細胞で連続継代（1代から6代）したウイルス接種後14日目の培養上清中のウイルス含有量成績を表1-2-4に示す。また、MDBK細胞で2代連続継代したウイルス含有量成績を表1-2-5に示す。モルモット由来の2種類の株化細胞（JH4clone1細胞及び104C1細胞）では、連続継代による明らかなウイルス産生能の向上は確認されなかった。一方、VERO76細胞では、継代が進むごとにウイルス含有量は低下した。

MDBK細胞の継代は2代のみであるが、使用した血清の種類によらず初代に比べ2代目ではウイルス含有量の低下が確認された。

表1-2-4：各株化細胞で継代したGPE株のCSFウイルス含有量試験成績

ウイルスの 継代数（代）	培養細胞		
	JH4clone1	104C1	VERO76
1	4.05	3.42*	4.41
2	3.61	3.81	3.71
3	3.50	3.26	3.10
4	3.70	3.46	2.50
5	3.50	3.20	2.20
6	3.50	3.80	1.60

* ; Log TCID₅₀/mL

表1-2-5：MDBK細胞で継代したGPE株のCSFウイルス含有量試験成績

ウイルスの 継代数（代）	MDBK	
	牛血清添加培地	山羊血清添加培地
1	4.88*	4.88
2	4.38	3.88
3	現在試験中	現在試験中

*；Log TCID₅₀/mL

経時的にサンプリングしたGPE株のウイルス含有量成績を表1-2-6に、また、その推移を図1-2-4に示した。試験の結果、時間の経過に従って処理温度の上昇に伴い、ウイルス含有量が低下する傾向が認められたものの、その幅は極めて小さくGPE株は、少なくとも45℃、30分までの条件に対しては、安定であることが確認された。

表1-2-6：経時サンプリングしたGPE株原液の熱安定性試験成績

処理温度 (℃)	接種後時間（分）						
	0	3	5	7	10	20	30
20	5.75*	5.63	5.63	5.50	5.75	5.75	5.75
37	5.75	5.63	5.63	5.75	5.63	5.75	5.63
45	5.63	5.63	5.50	5.63	5.50	5.50	5.50

*；Log TCID₅₀/mL

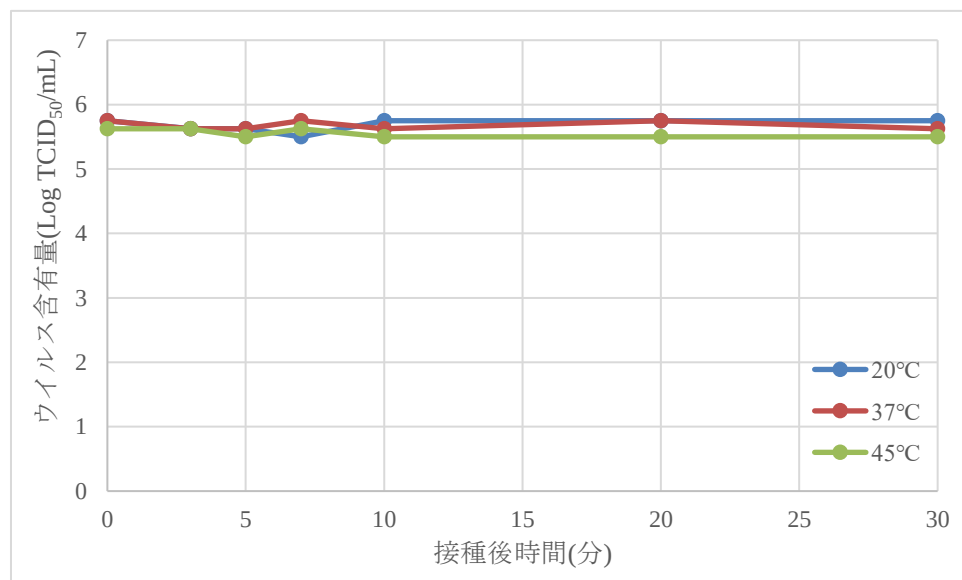


図1-2-4：処理温度ごとのGPE株原液の経時的な減衰曲線

最終年度の令和4年度では、昨年度までに検討しGPE株のスワイバックC原液の規格以上の増殖性が確認されたJH4clone1細胞に加えて、豚腎由来株化細胞であるSK-H細胞、PK-15細胞及びPPK3F細胞を入手し、GPE株の増殖性の有無を確認し、大量培養系の検討に供する株化細胞を選定した。具体的には、SK-H細胞、PK-15細胞及びPPK3F細胞の

各細胞にGPE株（6.0 Log₁₀TCID₅₀/mL）を接種し、30℃条件で培養した。培養期間中に培養上清を採取し、ウイルス含有量を測定した。なお、ウイルス接種後の培養には、牛胎児血清または山羊血清を5%の濃度で添加した培養液を使用し、ウイルスの増殖性を比較した。また、GPE株の増殖性が確認された2種類の株化細胞（SK-H細胞、JH4clone1細胞）について、大量培養系に向けての詳細な条件（接種ウイルス量、ウイルス増殖時の培地に添加する血清量、血清の種類）を検討した。具体的には、接種ウイルス量の検討では、SK-H細胞またはJH4clone1細胞にGPE株を異なる多重感染度（Multiplicity of Infection; MOI ; MOI 0.1、0.3、0.03、0.003及び0.0003）で接種し、30℃条件で培養した。培養期間中に培養上清を採取し、ウイルス含有量を測定した。なお、ウイルス接種後の培養には、山羊血清を5%の濃度で添加した培養液を使用し、ウイルスの増殖性を比較した。添加血清の検討では、SK-H細胞またはJH4clone1細胞にGPE株（6.0 Log₁₀TCID₅₀/mL）を接種し、30℃条件で培養した。培養期間中に培養上清を採取し、ウイルス含有量を測定した。なお、ウイルス接種後の培養には、牛胎児血清または山羊血清を5%、2%、1%の濃度で添加した培養液を使用し、ウイルスの増殖性を比較した。加えて、SK-H細胞またはJH4clone1細胞にGPE株（6.6 Log₁₀TCID₅₀/mL）を接種し、30℃条件で培養した試験も実施して、ウイルス接種後の培養には、牛胎児血清または山羊血清、馬胎児血清、馬血清を5%、の濃度で添加した培養液を使用し、ウイルスの増殖性を比較した。

本試験に使用したSK-H細胞、PK-15細胞及びPPK3F細胞の3種類の細胞における各日でのウイルス含有量成績を表1-2-7に、また、増殖曲線を図1-2-5に示した。試験の結果、いずれの細胞においても、GPE株の増殖性が確認され、その中でもSK-H細胞においては、牛胎児血清（FBS）添加培地では、ウイルス接種後7日目に6.75 Log₁₀ TCID₅₀/mL、一方、山羊血清（GS）添加培地では、ウイルス接種後6日目に7.38 Log₁₀ TCID₅₀/mLを示した。PK-15細胞及びPPK3F細胞は、SK-H細胞程の増殖性は確認できず、また、JH4clone1細胞と同程度もしくはそれ以下の増殖性しか確認できなかった。但し、両細胞の増殖性は、豚用豚熱ワクチンの原液の規格値以上のウイルス含有量であった。

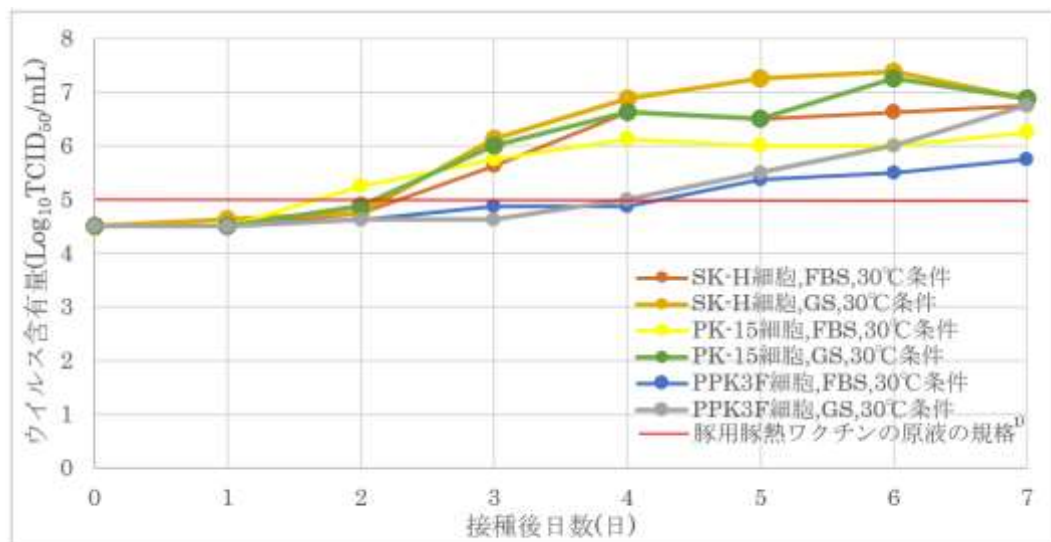
加えて、いずれの細胞においても牛胎児血清に比べ山羊血清の方が、ウイルス含有量がより高くなる傾向が認められた。

株化細胞	SK-H		PK-15		PPK3F	
接種後日数	FBS	GS	FBS	GS	FBS	GS
1	4.50 *	4.63	4.50	4.50	4.50	4.50
2	4.75	4.75	5.25	4.88	4.63	4.63
3	5.63	6.13	5.75	6.00	4.88	4.63
4	6.63	6.88	6.13	6.63	4.88	5.00
5	6.50	7.25	6.00	6.50	5.38	5.50
6	6.63	7.38	6.00	7.25	5.50	6.00
7	6.75 †	6.88	6.25	6.88	5.75	6.75

* ; Log₁₀TCID₅₀/mL

† ; 増殖曲線のピークの値

表1-2-7：各豚腎由来株化細胞におけるGPE株の増殖性確認試験成績



1): 豚用豚熱ワクチンの原液の規格(5.0 Log₁₀TCID₅₀/mL)

図1-2-5：各豚腎由来株化細胞におけるGPE株の増殖曲線

SK-H細胞、JH4clone1細胞でのウイルス接種量の検討では、SK-H細胞、JH4clone1細胞の両細胞における各日でのウイルス含有量成績を表1-2-8に示した。また、SK-H細胞の増殖曲線を図1-2-6に、JH4clone1細胞の増殖曲線を図1-2-7に示した。試験の結果、SK-H細胞では、MOI 0.1では、ウイルス接種後2日以降試験終了日である14日まで、また、MOI 0.03ではウイルス接種後5日以降14日まで豚熱ワクチンの原液の規格値以上の数値を維持することが確認された。

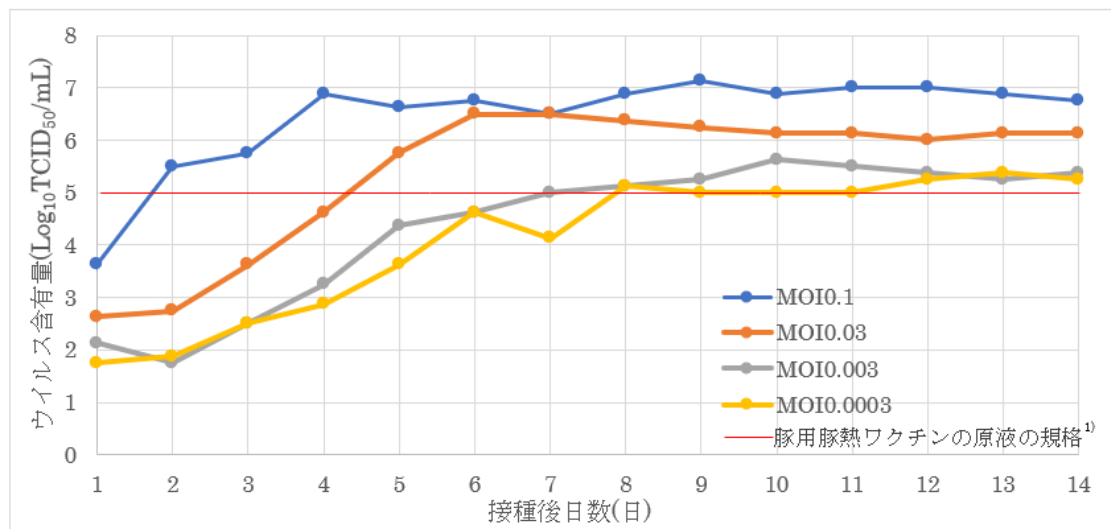
株化細胞 接種後日数	SK-H				JH4clone1			
	MOI 0.1	MOI 0.03	MOI 0.003	MOI 0.0003	MOI 0.3	MOI 0.03	MOI 0.003	MOI 0.0003
1	3.63 *	2.63	2.13	1.75	5.38	3.75	2.50	<1.63 ‡
2	5.50	2.75	1.75	1.88	5.50	4.38	2.50	<1.63
3	5.75	3.63	2.50	2.50	6.00	4.88	3.00	2.38
4	6.88	4.63	3.25	2.88	6.38	6.00	3.50	2.50
5	6.63	5.75	4.38	3.63	6.75	6.38	3.63	2.63
6	6.75	6.50	4.63	4.63	6.88	6.38	4.00	3.25
7	6.50	6.50	5.00	4.13	6.75	6.13	4.38	3.63
8	6.88	6.38	5.13	5.13	6.13	6.25	5.75	4.88
9	7.13 †	6.25	5.25	5.00	6.38	6.25	5.88	5.63
10	6.88	6.13	5.63	5.00	6.25	6.38	6.13	5.63
11	7.00	6.13	5.50	5.00	5.75	6.00	5.88	5.63
12	7.00	6.00	5.38	5.25	5.88	5.88	6.13	5.88
13	6.88	6.13	5.25	5.38	5.75	5.88	6.00	5.88
14	6.75	6.13	5.38	5.25	5.50	6.25	6.13	6.00

* ; Log₁₀TCID₅₀/mL

† ; 増殖曲線のピークの値

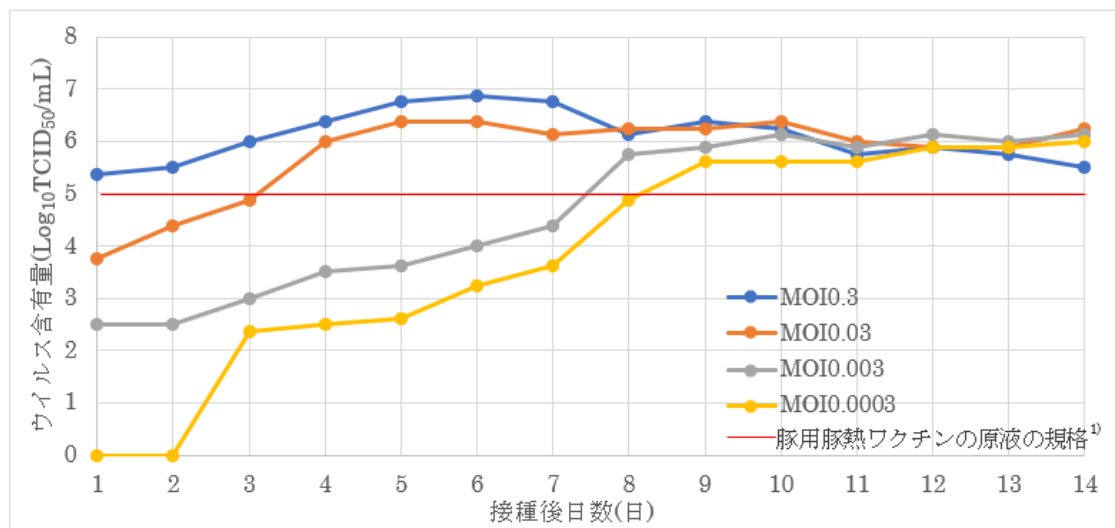
‡ ; 検出限界以下

表 1-2-8：ウイルス接種量ごとの各株化細胞における GPE 株の増殖性確認試験成績



1); 豚用豚熱ワクチンの原液の規格 (5.0 Log₁₀TCID₅₀/mL)

図 1-2-6 : ウイルス接種量ごとの SK-H 細胞における GPE 株の増殖曲線



1); 豚用豚熱ワクチンの原液の規格 (5.0 Log₁₀TCID₅₀/mL)

図 1-2-7 : ウイルス接種量ごとの JH4clone1 細胞における GPE 株の増殖曲線

SK-H細胞、JH4clone1細胞でのウイルス増殖時の血清の種類及び濃度の検討では、本試験に使用した牛胎児血清 (FBS) または山羊血清 (GS) の添加濃度を変えて培養した際の SK-H細胞、JH4clone1細胞における各日でのウイルス含有量成績を表1-2-9に示した。また、SK-H細胞の増殖曲線を図1-2-8に、JH4clone1細胞の増殖曲線を図1-2-9に示した。試験の結果、SK-H細胞においては、血清の種類や血清濃度の違いによる影響は少なくウイルス接種後2～3日以降試験終了までの14日まで豚熱ワクチンの原液規格である 5.0 Log₁₀ TCID₅₀/mL以上の GPE 株の増殖性が確認された。一方、JH4clone1細胞においては、牛胎児血清に比べ山羊血清の方が、培養上清中のウイルス含有量がより高く、また、添加する山羊血清濃度に準じて高い血清濃度 (5%) の方が、ウイルス含有量がより高くなる傾向が

認められた。

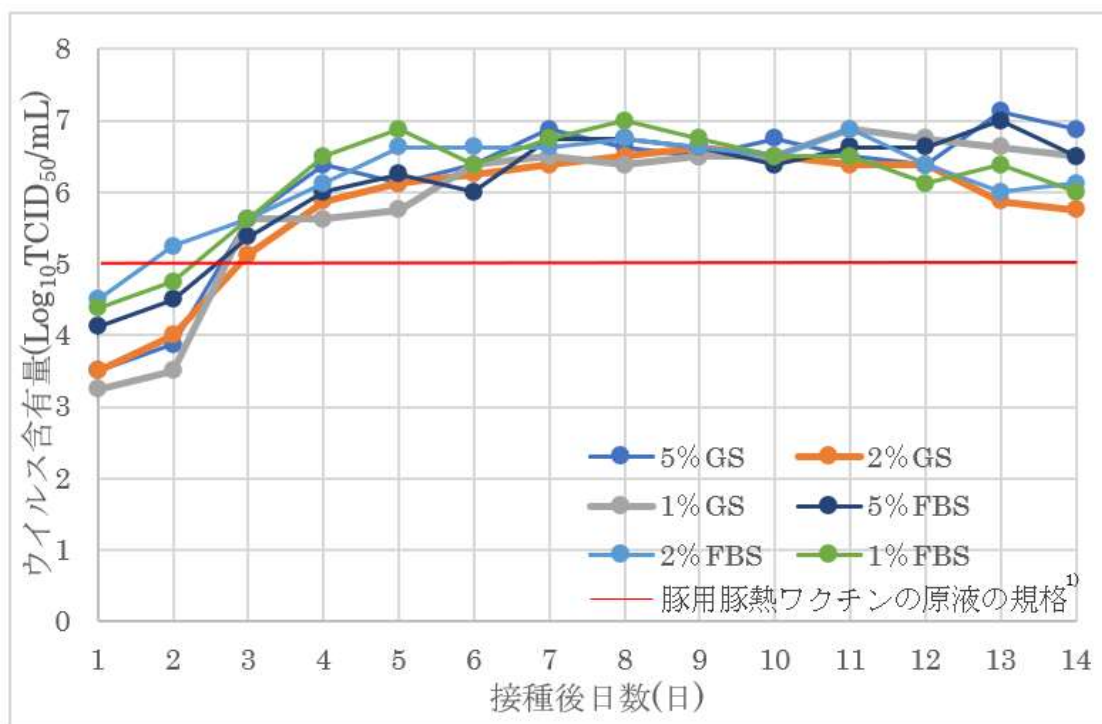
更に、JH4clone1細胞では、SK-H細胞同様にウイルス接種後3～4日から5.0Log₁₀TCID₅₀/mLを超える増殖性が確認されたものの、早い場合には接種後9日までしか維持できず、SK-H細胞と比較して規格値以上の維持期間が短く、且つ低値のウイルス含有量となる傾向が確認された。

表 1-2-9：血清の種類及び濃度ごとの各株化細胞における GPE 株の増殖性確認試験成績

株化細胞 接種後日数	SK-H						JH4clone1					
	GS 5%	GS 2%	GS 1%	FBS 5%	FBS 2%	FBS 1%	GS 5%	GS 2%	GS 1%	FBS 5%	FBS 2%	FBS 1%
1	3.50*	3.50	3.25	4.13	4.50	4.38	3.75	3.25	3.00	3.13	2.63	3.13
2	3.88	4.00	3.50	4.50	5.25	4.75	4.88	4.38	4.75	4.50	4.25	4.38
3	5.63	5.13	5.63	5.38	5.63	5.63	4.88	5.50	5.50	4.75	5.13	5.25
4	6.38	5.88	5.63	6.00	6.13	6.50	6.00	5.88	5.25	5.38	5.88	5.88
5	6.13	6.13	5.75	6.25	6.63	6.88	5.88	5.88	5.50	5.50	5.88	5.88
6	6.38	6.25	6.38	6.00	6.63	6.38	6.38	6.00	5.25	5.75	5.50	5.75
7	6.88	6.38	6.50	6.75	6.63	6.75	6.00	6.00	5.38	5.63	5.00	5.25
8	6.63	6.50	6.38	6.75	6.75	7.00	6.13	5.75	5.13	5.63	5.00	5.13
9	6.50	6.63	6.50	6.63	6.63	6.75	6.38	5.75	5.13	5.38	5.00	5.13
10	6.75	6.50	6.50	6.38	6.50	6.50	6.00	5.25	5.25	5.38	4.63	5.38
11	6.50	6.38	6.88	6.63	6.88	6.50	5.63	5.25	5.00	4.63	4.88	5.88
12	6.38	6.38	6.75	6.63	6.38	6.13	5.75	4.75	5.00	4.88	4.63	4.50
13	7.13†	5.88	6.63	7.00	6.00	6.38	5.00	5.25	4.88	4.75	4.75	4.50
14	6.88	5.75	6.50	6.50	6.13	6.00	4.88	4.50	4.25	4.75	4.63	3.88

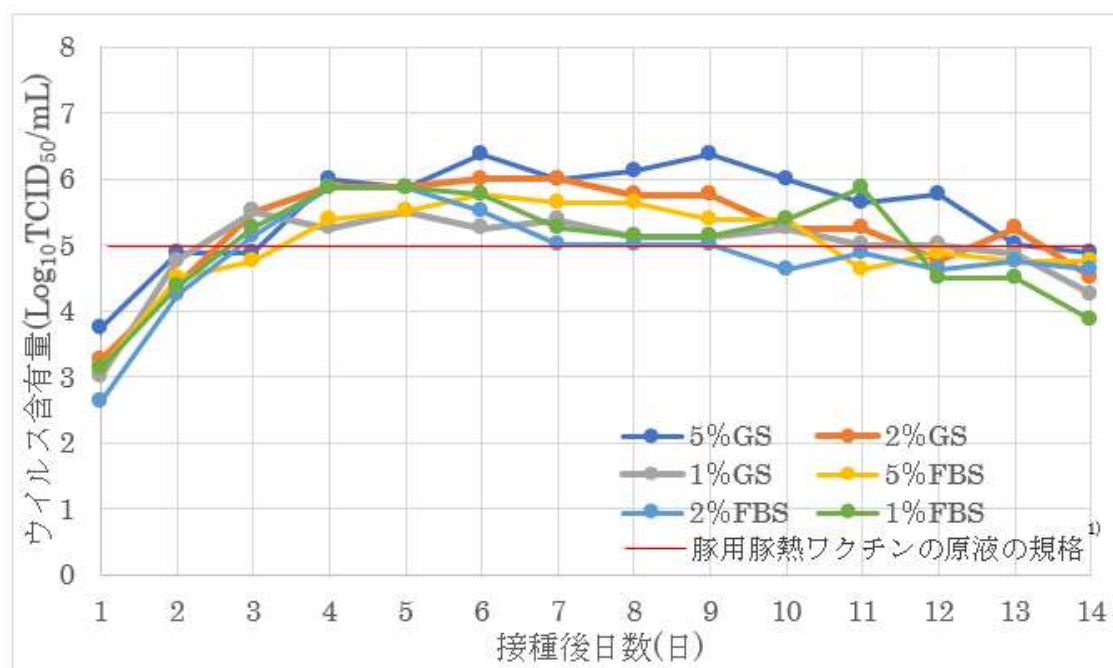
* ; Log₁₀TCID₅₀/mL

† ; 増殖曲線のピークの値



1); 豚用豚熱ワクチンの原液の規格 (5.0 Log₁₀TCID₅₀/mL)

図 1-2-8：血清の種類及び濃度ごとの SK-H 細胞における GPE 株の増殖曲線



1); 豚用豚熱ワクチンの原液の規格(5.0 Log₁₀TCID₅₀/mL)

図 1-2-9：血清の種類及び濃度ごとの JH4clone1 細胞における GPE 株の増殖曲線

SK-H細胞、JH4clone1細胞でのウイルス増殖時の血清の種類の検討では、ウイルス増殖時の血清の種類を牛胎児血清（FBS）、山羊血清（GS）、馬胎児血清（FHS）、馬血清（HS）で培養した際のSK-H細胞、JH4clone1細胞における各日のウイルス含有量成績を表 1-2-10に、また、増殖曲線を図1-2-10、1-2-11に示した。

いずれの細胞においても、本試験では、血清によるウイルス原液中のウイルス含有量の傾向における差は確認されなかった。

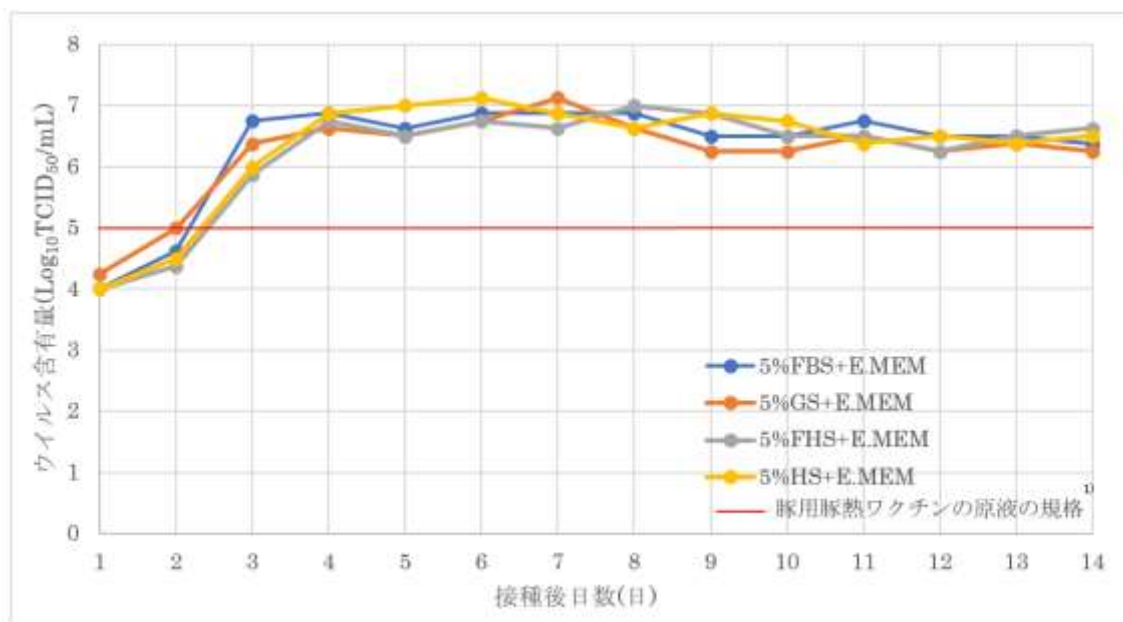
今回の試験では、CSFウイルスと交差反応性を示す牛ウイルス性下痢症ウイルス（BVDV）抗体を保有していないと考えられる馬血清での増殖性は、他の血清との明確な差は認められないことが確認された。馬血清自体の安定供給の確認が必要であるものの、増殖性に影響を及ぼす抗体を保有していない血清として使用できる可能性が確認されたことは、製品の安定供給においては、大きな利点であると考えられる。

表 1-2-10：各種細胞の血清の種類ごとの GPE 株の増殖性確認試験成績

株化細胞 接種後日数	SK-H				JH4clone1			
	FBS	GS	FHS	HS	FBS	GS	FHS	HS
1	4.00*	4.25	4.00	4.00	4.13	4.13	4.75	4.75
2	4.63	5.00	4.38	4.50	4.50	4.00	5.38	4.88
3	6.75	6.38	5.88	6.00	5.13	4.75	5.13	5.13
4	6.88 [†]	6.63	6.75	6.88	5.50	5.38	5.38	5.25
5	6.63	6.50	6.50	7.00	5.50	5.25	5.13	5.38
6	6.88	6.75	6.75	7.13	5.38	5.63	5.38	5.25
7	6.88	7.13	6.63	6.88	5.25	5.50	5.13	5.25
8	6.88	6.63	7.00	6.63	5.25	5.50	5.38	5.13
9	6.50	6.25	6.88	6.88	5.13	5.50	5.00	4.88
10	6.50	6.25	6.50	6.75	4.88	5.50	5.00	4.88
11	6.75	6.50	6.50	6.38	5.00	5.63	5.25	5.25
12	6.50	6.25	6.25	6.50	5.13	5.13	5.00	5.00
13	6.50	6.38	6.50	6.38	5.00	5.38	5.25	5.25
14	6.38	6.25	6.63	6.50	5.25	5.50	5.13	4.75

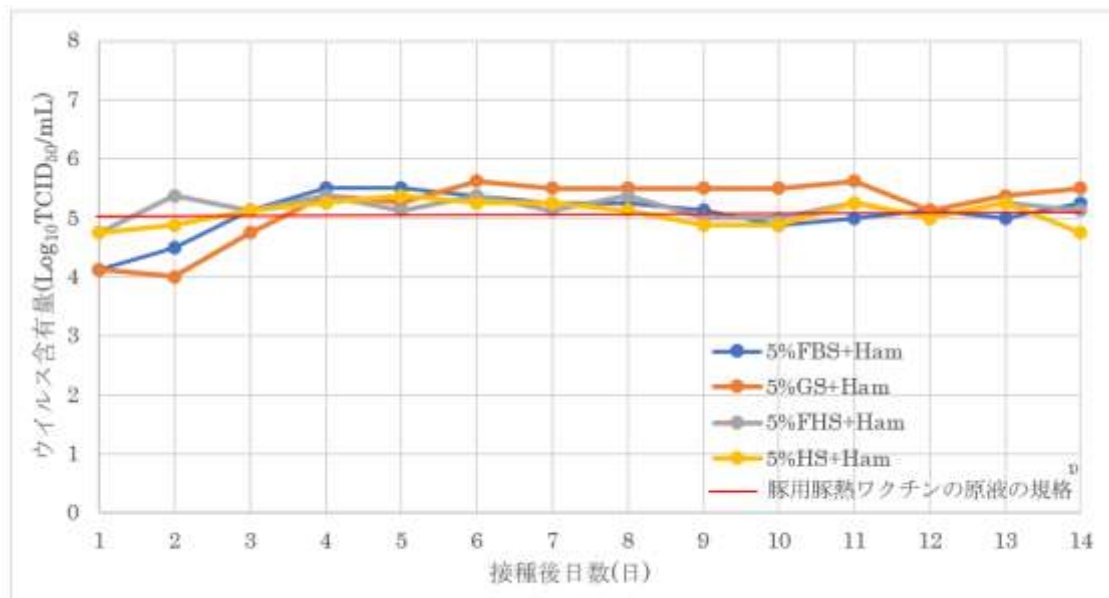
* ; $\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$

[†] ; 増殖曲線のピークの値



1): 豚用豚熱ワクチンの原液の規格($5.0 \text{ Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)

図 1-2-10：SK-H 細胞における血清の種類ごとの GPE 株の増殖曲線



1): 豚用豚熱ワクチンの原液の規格(5.0 Log₁₀TCID₅₀/mL)

図 1-2-11 : JH4clone1 細胞における血清の種類ごとの GPE 株の増殖曲線

最終年度の令和 4 年度の研究で GPE 株に感受性が確認された SK-H 細胞を用い、GPE 株 ウイルス原液の大量培養系の検討を行った。具体的には、セルファクトリー（10 段、1 段）または 225cm² フラスコに SK-H 細胞をシートさせたのちに、GPE 株（6.0 Log₁₀TCID₅₀/mL）を接種し、30℃ 条件で培養した。培養期間中に培養上清を採取し、ウイルス含有量を測定した。なお、ウイルス接種後の培養には、山羊血清を 5% の濃度で添加した培養液を使用した。また SK-H 細胞、JH4clone1 細胞について、担体を用いた高密度培養を検討し、GPE 株の増殖性を確認した。具体的には、細胞が付着する担体が入った培養用容器（BelloCell ボトル）に SK-H 細胞または JH4clone1 細胞を播種し、担体への各種細胞の付着を確認したのちに、GPE 株（6.6 Log₁₀ TCID₅₀/mL）を接種し、30℃ 条件で培養した。培養期間中に培養上清を採取し、ウイルス含有量を測定した。なお、ウイルス接種後の培養には、牛胎児血清又は山羊血清を 5% の濃度で添加した培養液を使用した。

SK-H 細胞でのセルファクトリーを用いた大量培養系の検討では、最も高いウイルス含有量が期待できる SK-H 細胞を用いて、多段培養容器である“セルファクトリー”を用いた大量培養系の検討を行った。尚、試験実施に際しては、先の検討において得られた成績を元に、MOI 0.1、使用血清は山羊血清 5% として培養を行った。10 段及び 1 段のセルファクトリー、並びに 225cm² フラスコの各日でのウイルス含有量成績を表 1-2-11 に、また、増殖曲線を図 1-2-12 に示した。試験の結果、いずれの培養においてもウイルス接種後 2 日には、豚熱ワクチンの原液規格の 5.0 Log₁₀TCID₅₀/mL 前後の増殖が確認され、以降数値的なばらつきはあるものの、試験終了時の 14 日まで安定したウイルス含有量が認められた。この成績から、少なくとも多段培養法による大量培養系においても、安定して高いウイルス含有量が得られることが確認された。

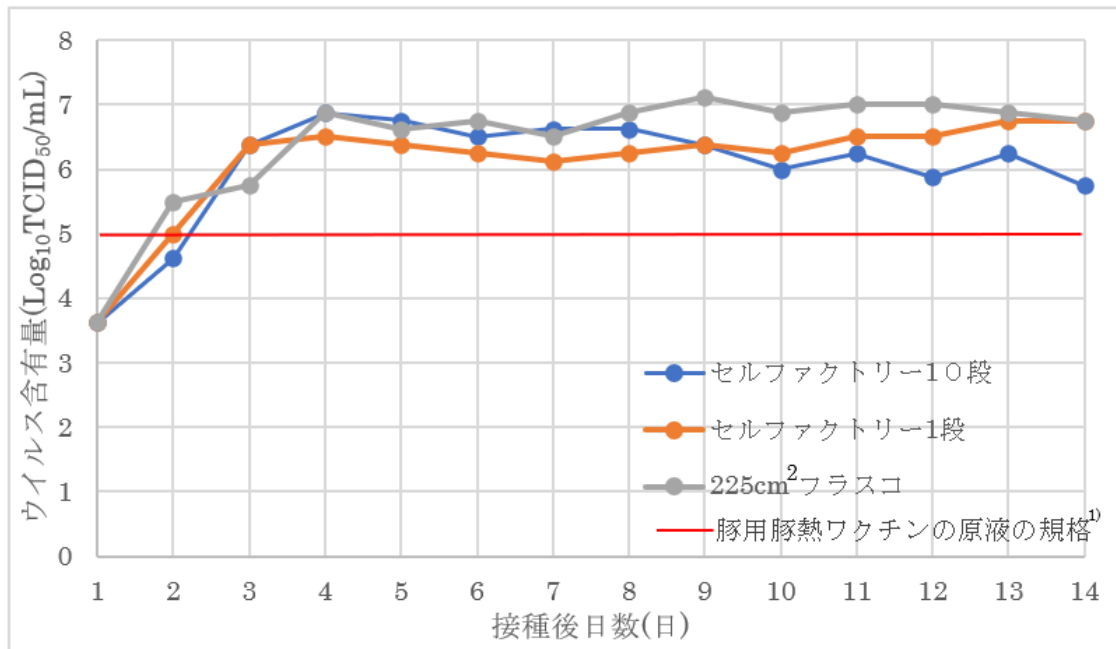
表 1-2-11 : SK-H 細胞における培養容器ごとの GPE 株の増殖性確認試験成績

株化細胞	SK-H*		
接種後日数	10段セルファクトリー	1段セルファクトリー	225cm ² フラスコ
1	3.63 [†]	3.63	3.63
2	4.63	5.00	5.50
3	6.38	6.38	5.75
4	6.88 [‡]	6.50	6.88
5	6.75	6.38	6.63
6	6.50	6.25	6.75
7	6.63	6.13	6.50
8	6.63	6.25	6.88
9	6.38	6.38	7.13
10	6.00	6.25	6.88
11	6.25	6.50	7.00
12	5.88	6.50	7.00
13	6.25	6.75	6.88
14	5.75	6.75	6.75

*;ウイルス増殖時、5%GS添加培地を使用

[†];Log₁₀TCID₅₀/mL

[‡]; 増殖曲線のピークの値



1); 豚用豚熱ワクチンの原液の規格 (5.0 Log₁₀TCID₅₀/mL)

図 1-2-12 : SK-H 細胞における培養容器ごとの GPE 株の増殖曲線

SK-H細胞、JH4clone1細胞での担体による高密度培養の検討では、使用したSK-H細胞、JH4clone1細胞における各日のウイルス含有量成績を表1-2-12に、また、増殖曲線を図1-2-13に示した。試験の結果、いずれの細胞においても、GPE株の増殖性が確認され、その中でもSK-H細胞においては、牛胎児血清（FBS）添加培地では、ウイルス接種

後9日目に7.50 Log₁₀ TCID₅₀/mL、山羊血清（GS）添加培地では、ウイルス接種後6日目に7.75 Log₁₀ TCID₅₀/mLを示した。JH4clone1細胞においては、牛胎児血清添加培地では、ウイルス接種後6日目に6.63 Log₁₀ TCID₅₀/mL、山羊血清添加培地では、ウイルス接種後6日目に6.88 Log₁₀ TCID₅₀/mLを示した。

また、いずれの細胞においても牛胎児血清に比べ山羊血清の方が、ウイルス含有量がより高くなる傾向が認められた。

今回の試験では、高密度培養によるウイルス含有量の上昇を期待して、BelloCell1ボトルでの担体培養の検討を行ったところ、225cm²フラスコやセルファクトリーと比較して、BelloCell1ボトルでの培養上清中のウイルス含有量がSK-H細胞、JH4clone1細胞において0.5Log₁₀TCID₅₀/mL程度高くなる傾向が確認され、担体を用いた高密度培養での大量培養系の可能性を見出した。

表 1-2-12：各種細胞の高密度培養における GPE 株の増殖性確認試験成績

株化細胞 接種後日数	SK-H		JH4clone1		SK-H [‡] (セルファクトリー10段)	SK-H [‡] (225cm ² フラスコ)
	FBS	GS	FBS	GS	GS	GS
1	5.25*	5.25	5.75	5.50	3.63	3.63
2	5.25	5.63	5.50	5.13	4.63	5.50
3	5.63	6.25	5.75	5.63	6.38	5.75
4	6.13	7.25	6.13	6.00	6.88	6.88
5	6.63	7.38	6.25	6.13	6.75	6.63
6	7.00	7.75	6.63	6.88	6.50	6.75
7	6.83	7.50	6.50	6.75	6.63	6.50
8	7.00	7.50	6.50	6.88	6.63	6.88
9	7.50 [†]	7.38	6.50	6.88	6.38	7.13
10	7.13	7.50	6.38	6.75	6.00	6.88
11	7.00	7.50	6.38	6.63	6.25	7.00
12	6.88	7.38	6.25	6.38	5.88	7.00
13	6.63	7.50	5.88	6.50	6.25	6.88
14	6.63	7.00	5.88	6.38	5.75	6.75

* ; Log₁₀TCID₅₀/mL

[†]; 増殖曲線のピークの値

[‡]; (5) SK-H細胞でのセルファクトリーを用いた大量培養系の検討_表6より参照

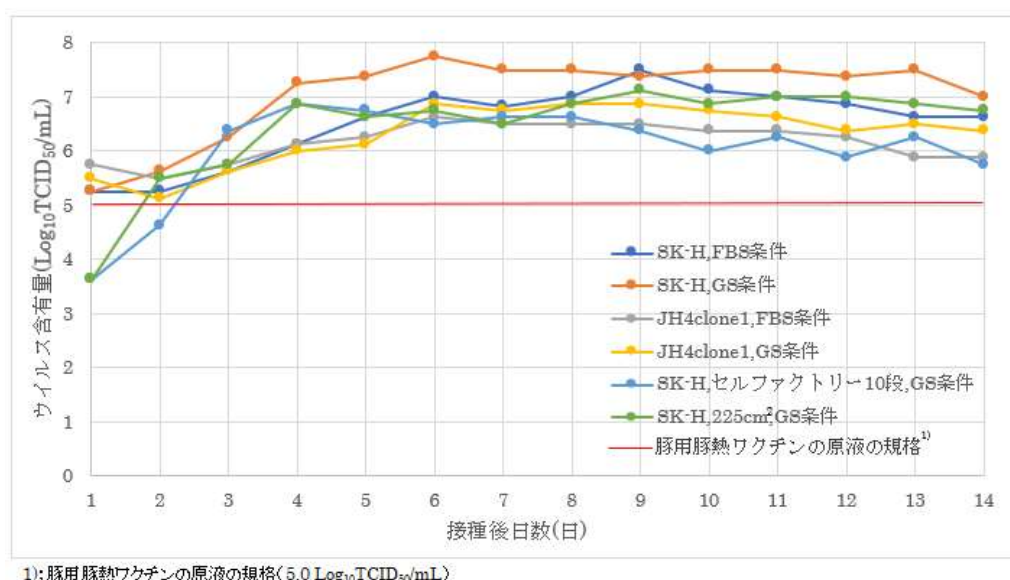


図 1-2-13：各種細胞の高密度培養における GPE 株の増殖曲線

令和 4 年度では、連続継代によるウイルスの馴化を継続して検討し、継代馴化した GPE 株のワクチン株のマーカーの維持についても確認した。SK-H細胞またはJH4clone1細胞にGPE株を接種し、連続継代によるウイルスの増殖性を検討した。初回のウイルス接種には、6.0Log₁₀TCID₅₀/mLのGPE株を接種し、2代目以降は、採材したGPE株を希釈せずウイルス接種液として供した。継代馴化を10代目まで実施したウイルス原液については、GPE株のマーカー試験（表1-2-13）を実施した。

GPE株感受性株化細胞を用いたウイルスの馴化の検討では、使用したSK-H細胞、JH4clone1細胞で10代目まで連続継代して得られたGPE株培養上清（SK-H細胞；ウイルス接種後4日目、JH4clone1細胞；ウイルス接種後6日目）中のウイルス含有量成績を表1-2-14に示す。尚、本試験では、通常の培養液量の半分で継代を実施した。連続して10代の継代を実施したが、SK-H細胞及びJH4clone1細胞において、明らかなウイルス産生能の向上は確認されなかった。

また10代継代時点の馴化GPE株について、GPE株の特異的な遺伝子指標となるEマーカー、Tマーカー及びGマーカーが保存されていることを確認した。

本試験成績から、少なくともGPE株は、豚由来細胞であるSK-H細胞及びハムスター由来JH4clone1細胞のいずれにおいても、10代の連続継代では遺伝子指標である3つのマーカーに変化が認められないことが確認され、豚における安全性の確認は必要であるものの当該株は比較的安定した株であることが確認された。

表 1-2-13 : GPE 株のマーカー試験について

試験方法	検査するマーカー*	GPE 株のマーカーに関する性状
Eマーカー試験	Eマーカー	豚精巢初代細胞で増殖するが、END現象（ニューカッスル病ウイルスとの重感染を増強する現象）を示さない。
T及びGマーカー試験	Tマーカー	30℃でのモルモット腎初代細胞における増殖は、40℃での増殖性を上回る。
	Gマーカー	モルモット腎初代細胞での増殖性が強毒豚コレラウイルスの増殖を100倍以上上回る。

* : Eマーカー、Tマーカー及びGマーカーは、野外株と区別できるGPE 株に特異的な遺伝的指標である。

表 1-2-14 : 株化細胞で継代した GPE 株の CSF ウイルス含有量試験成績

ウイルスの 継代数 (代)	培養細胞	
	SK-H	JH4clone1
1	7.75 *	6.63
2	7.88	5.38
3	7.38	4.75
4	7.13	5.25
5	7.25	5.38
6	7.25	5.50
7	7.00	5.75
8	7.13	6.38
9	7.50	5.25
10	7.88	6.25

* ; Log₁₀TCID₅₀/mL

(エ) 研究成果の活用における留意点

豚の株化細胞で継代馴化したウイルスの安全性については、遺伝子指標マーカーでの検討に加えて、豚を用いた安全性の確認が必要と考えられた。ワクチンウイルス株の培養条件検討については、製造を念頭に置いた培養条件の検討を引き続き行う必要がある。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

安定してGPE 株の大量生産を可能とする株化継代細胞等の検索を行い、製造用株化細胞として、SK-H細胞及びJH4clone1細胞を選定すると共に培養に使用する血清及び培養条件を確認した。また、実際の製造に応用可能なセルファクトリーを用いたSK-H細胞でのGPE 株の大量培養系の基礎を確立し、更にセルファクトリーでの大量培養系以上に高いウイルス含有量のウイルス原液が得られる見込みのある担体による高密度培養法の可能性も見出した。本実施課題の最終目標は達成された。

実施課題 1－3：

令和2年度では、CSFウイルスE2蛋白質の防御エピトープペプチド

(①CKEDYRYAISSTNEIGLLGAGGLT (E2蛋白質の693-716アミノ酸領域) の10回繰り返し配列、②CKEDYRYAISSTNEIGLLGAGGLTCFRREKPFPHRMDCVTTTVENED (E2蛋白質の693-716及び844-865アミノ酸領域) の5回繰り返し配列) 遺伝子を豚丹毒菌表層抗原SpaA遺伝子内に組み込んだキメラ遺伝子をそれぞれ構築した(表1-3-1)。

キメラ遺伝子を温度感受性プラスミドを使ってアミノ酸プロリン合成遺伝子を欠損させた豚丹毒菌弱毒株に導入し、染色体上のSpaA遺伝子とキメラ遺伝子が完全に置き換わった組換え株を作製した。

表1-3-1 CSFウイルスE2蛋白質の防御エピトープペプチド遺伝子を組み込んだ組換え株
a: 欠損させた遺伝子を示す。b: 組込んだアミノ酸配列と繰り返し回数を示す。c: 組込んだアミノ酸の発現箇所を示す。

組換え株No.	親株(ベクター株)*	導入エピトープ ^b	導入位置 ^c
1	$\Delta proA$	①	SpaA中央部
2	$\Delta proA$	②	SpaA中央部
3	$\Delta proA$	①	SpaA N末端
4	$\Delta proA$	②	SpaA N末端
5	$\Delta proBA$	①	SpaA中央部
6	$\Delta proBA$	②	SpaA中央部
7	$\Delta proBA$	①	SpaA N末端
8	$\Delta proBA$	②	SpaA N末端
9	$\Delta proBAC$	①	SpaA N末端
10	$\Delta proBAC$	②	SpaA N末端

a

b

CSFウイルスE2蛋白質防御エピトープ

① CKEDYRYAISSTNEIGLLGAGGLT (aa693-716) (x10)

② CKEDYRYAISSTNEIGLLGAGGLTCFRREKPFPHRMDCVTTTVENED (aa693-716 & 844-865) (x5)

c

SpaA蛋白

作製した2種類の組換え株について、表層抗原SpaAとE2蛋白質防御エピトープとのフュージョンタンパク質の菌体表層への発現をrSpaA高度免疫家兔血清 (Anti-SpaA抗体) を用いてドットブロット解析により行った。

また、これらの組換え株について、抗E2抗体 (Anti-E2抗体) 及び抗E2モノクローナル抗体 (Anti-E2 Mab) を用いてドットブロット解析を行った。

結果として、豚丹毒菌弱毒株 $\Delta proA$ に上記①及び②ペプチドのキメラ遺伝子をそれぞれ導入し、それらの遺伝子が変異株のゲノム上に組み込まれたことを確認した。それぞれの防御エピトープ遺伝子を持つ変異株について、Anti-SpaA抗体を用いてドットブロット解析を行いSpaA抗原の発現を確認した。Anti-E2抗体及びAnti-E2 Mabを用いたドットブロット解析では、E2蛋白質エピトープの発現は確認できなかった (図1-3-1)。

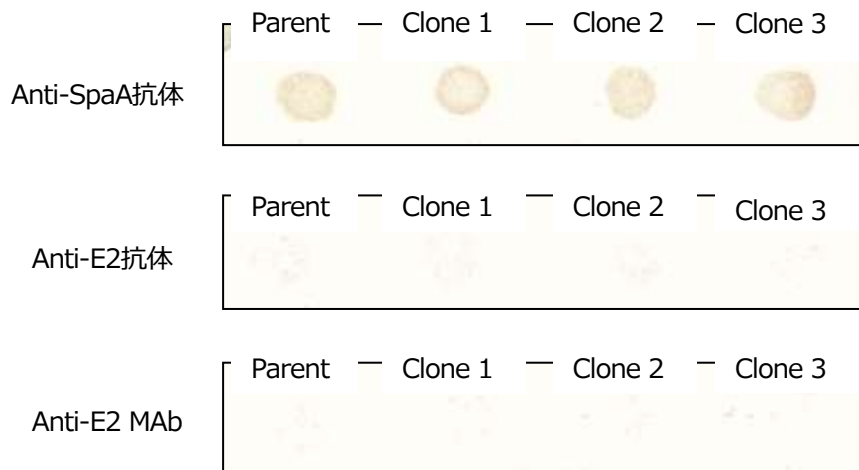


図1-3-1：ペプチド②遺伝子を保有する3株のみの解析結果

令和3年度では、アミノ酸プロリン合成に関わる遺伝子を欠損させた複数の豚丹毒菌弱毒株を用いて、これらの株にCSFウイルスのE2蛋白質の防御エピトープを発現させたワクチン候補株を構築した。そしてこれらの株を経口投与したマウス及び豚で中和抗体が産生されるかどうかを解析した。

マウスを用いた実験では、CSFウイルスE2蛋白質防御エピトープ遺伝子を導入した組換え株10株（下表）をddYマウスに2週間隔で2回皮下接種した（5匹/株）（接種ドース；1回目： $0.32\text{--}3.53 \times 10^8$ CFU/head；2回目： $1.52\text{--}3.03 \times 10^8$ CFU/head）。2回目接種から2週後に採血し血清を分離後、非動化した。CSFウイルスE2蛋白質を固相化抗原とする「豚熱エライザキットII（ニッポンジーン）」を用いて希釈血清中（x50）の抗体価を測定した。また、CSFウイルスを用いた中和試験を実施した。

豚を用いた実験では、親株、その組換え株No. 5及びNo. 8（下表）をそれぞれ約2週間隔でSPF豚計10頭（ ΔproBA 2頭、No. 5株4頭、No. 8株4頭）に経口投与した（接種ドース；1回目3日連続：約 10^{10} CFU/head；2回目：約 10^{10} CFU/head）。2回目接種から9日後に採血し血清を分離・非動化後、同上キットを用いて、希釈血清中（x50）の抗CSFウイルス抗体価を測定した。また、CSFウイルスを用いた中和試験を実施した。豚丹毒菌に対する抗体価を発育凝集反応により測定した。

マウスを用いた実験の結果として、E2蛋白質に対する抗体価は、組換え株を接種したマウスで高い傾向が見られたが、抗体価はベクター株の免疫原性（ $\Delta\text{proBA} > \Delta\text{proA} > \Delta\text{proBAC}$ ）が高いほど、高い傾向が見られた（図1-3-2）。この結果から、これらの株においてE2蛋白質防御エピトープは発現していると判断した。導入した遺伝子（① or ②）、発現様式の違いによる抗体価の差は認められなかった。CSFワクチン株GPE株と野外株JPN/1/2018株を用いて中和試験を実施したが、中和活性は認められなかった。

豚を用いた実験の結果として、豚丹毒菌に対する抗体価は、No. 5株、No. 8株を投与したいずれの豚においても、親株（ ΔproBA ）を投与した豚に比較して低かった（表1-3-2）。No. 5株及びNo. 8株を投与した豚において、CSFウイルスE2蛋白質に対する抗体は検出されず、また、CSFウイルスに対する中和活性は認められなかった（2倍未満）。

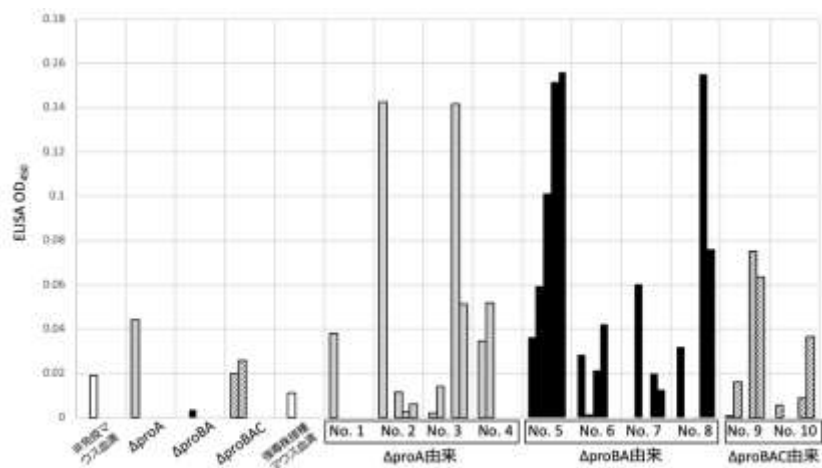


図 E2蛋白質に対する抗体価

図1-3-2 E2蛋白質に対する抗体価

表1-3-2 豚丹毒菌に対する生菌発育凝集反応抗体価（2ME未添加）

接種菌株	豚番号	採血日			
		免疫前	免疫1週後	免疫2週後	免疫3週後
ΔproBA (親株)	3628	2	>128	>128	>128
	3629	2	64	>128	>128
No.5株	3627	2	8	8	4
	3630	<2	8	16	16
	3631	2	8	16	4
	3637	2	8	4	4
No.8株	3638	2	<2	<2	4
	3639	<2	2	2	4
	3643	2	2	2	4
	3644	2	4	4	4

最終年度の令和4年度では、豚丹毒菌弱毒株にCSFウイルスのE2蛋白質の防御エピトープを発現させたワクチン候補株を構築した。また、これらの株を経口投与した豚で免疫効果を検証した。具体的には、豚丹毒小金井株を用いて、表層抗原である SpaA 分子の中央部分にE2蛋白質防エピトープ（配列A: CKEDYRYAISSTNEIGLLGAGGLT (aa693-716) (x10)、配列B: CKEDYRYAISSTNEIGLLGAGGLT CFRREKPFPHRMDCVTTTVENED (aa693-716 & aa844-865) (x5)、配列C: CTAVSPTTLRTEHECLIGNTTEDYRYAISST (aa829-837) (aa254-262) (aa8-13) (x7)（下線部はこれまで報告があった3種類の配列））が組込まれた状態で発現された株、また、免疫原性を高めるため、それぞれの配列中にヘルパーT細胞エピトープ配列 (Tetanus toxin, TT: 20個アミノ酸) を付加した配列を発現する株を作製した（表1-3-3, 図1-3-3）。

CSFウイルスE2蛋白質防御または中和エピトープ遺伝子を導入した組換え株6株を4週齢、雌ddYマウスに計3回免疫を行った。初回：4.79-5.91×10⁸ CFU/匹を皮下接種。初回接種から2週間後に2回目：1.10-1.53×10⁸ CFU/匹を経口接種。2回目接種から1週後に3回目：2.22-2.92×10⁸ CFU/匹を皮下接種した。3回目の免疫から6日後に血清を分離し、非動化後、rSpaA-ELISAにより、これらの血清中の抗体価を測定した。また、CSFウイルスE2蛋白質を固相化抗原とする「豚熱エライザキットII（ニッポンジーン）」を用いて希釈血清中（x50）の抗体価を測定した。さらに、CSFウイルス GPE 株を用いた中和試験を実施した。

CSFウイルスE2蛋白質防御または中和エピトープ遺伝子を導入した組換え株3株（下表KO-CSF1, KO-CSF2, KO-CSF3）を3週齢豚に約10¹⁰ CFU/頭/回の菌量を人工ミルクに混ぜ計3回経口投与した（2日連続2回投与後、2週後に1回投与）。最終投与から7日後にCSFウイルス Riems C株を含むいのしし用経口ワクチン溶液 1.5ml（10^{5.2} TCID₅₀/ml）を筋肉内接種後、経時的に採血して血液中ウイルスRNA量を測定した。またRiems C株接種後2週後に解剖し、臓器内のウイルスRNA量を測定した。

表1-3-3 豚丹毒菌弱毒株にCSFウイルスのE2蛋白質防御エピトープまたはヘルパーT細胞エピトープ配列（Tetanus toxin）を付加した配列を導入したワクチン候補株

候補菌株名	E2蛋白質防御エピトープ		Tヘルパー細胞エピトープ	
	候補配列	繰返し数	付加	繰返し数
KO-CSF1-TT	A	6	有	5
KO-CSF2-TT	B	4	有	4
KO-CSF3-TT	C	5	有	4
KO-CSF1	A	10	無	—
KO-CSF2	B	5	無	—
KO-CSF3	C	7	無	—



図1-3-3 ヘルパーT細胞エピトープ配列を付加した菌株（KO-CSF1-TT, KO-CSF2-TT, KO-CSF3-TT）の構成

SpaAに対する抗体価は、A～Cのそれぞれのエピトープを発現する株を接種したマウス群では差が認められなかった。一方、ヘルパーT細胞エピトープ配列を付加した株を接種したマウス群で抗体価が低くなった群が存在した。「豚熱エライザキットII」を用いた解析において、すべてのマウス群で血清中の抗E2蛋白質抗体は検出されなかった。CSFワ

クチン株GPE株を用いて中和試験を実施したが、中和活性は認められなかった。

A～Cのそれぞれのエピトープを発現する小金井株組換え株（上記KO-CSF1, KO-CSF2, KO-CSF3）を経口投与した豚にCSFウイルスRiems C株を筋肉内接種し、血液中及び臓器内のウイルスRNA量を測定した。その結果、KO-CSF3を経口投与した豚群で血液中及び臓器内のウイルスRNA量が低下した（表1-3-4）。なお、解剖時に採取したすべての臓器においてウイルスは分離されなかった。今回、3種類の配列のうち、1種類の配列を発現する小金井株（KO-CSF3）を経口投与した豚において、CSFウイルス Riems C株を攻撃後に血液中及び臓器内のウイルスRNA量の低下が認められ、免疫効果が確認された。

表1-3-4 ワクチン候補株接種後にCSFウイルスRiems C株で攻撃2週間後のCSFウイルスのRNA量

血液中のウイルスRNA量 (RT-qPCR Ct値)								臓器中のウイルスRNA量 (RT-qPCR Ct値)								
豚No.	接種菌株名	接種期	2日目	4日目	7日目	10日目	14日目	豚No.	接種菌株名	大脳	肺	脾臓	腎臓	胃腸	腸胃腸リンパ節	結果
14	KO	-	-	-	-	-	-	14	KO	-	-	-	36.81028	-	-	-
15	KO	-	-	-	38.73626	-	-	15	KO	-	28.78668	34.44117	-	-	36.06690	-
16	KO	-	-	-	36.53895	-	-	16	KO	-	31.24355	35.96078	-	-	-	-
17	KO-CSF1	-	-	-	38.95126	-	-	17	KO-CSF1	-	29.58117	37.92154	-	-	38.96670	-
18	KO-CSF1	-	-	-	-	39.95575	-	18	KO-CSF1	-	34.31046	36.74184	-	-	-	-
19	KO-CSF1	-	-	-	-	-	-	19	KO-CSF1	-	31.38795	37.16052	-	-	-	-
20	KO-CSF2	-	37.67332	-	-	-	-	20	KO-CSF2	-	31.77860	36.85086	-	-	-	-
21	KO-CSF2	-	-	-	-	-	-	21	KO-CSF2	-	28.51846	-	-	-	-	-
22	KO-CSF2	-	-	-	36.46136	-	-	22	KO-CSF2	-	29.90444	-	-	-	33.88661	-
23	KO-CSF3	-	-	-	-	-	-	23	KO-CSF3	-	28.81217	37.11028	-	-	-	-
24	KO-CSF3	-	-	-	-	-	-	24	KO-CSF3	-	28.45673	-	-	-	-	-
25	KO-CSF3	-	-	-	-	-	-	25	KO-CSF3	-	30.08250	-	-	-	-	-

-：陰性
核酸抽出：MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit/KingFisher Flex
RT-qPCR：CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe(with ROX Reference Dye)
IC：全検体(+)

-：陰性
核酸抽出：MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit/KingFisher Flex
RT-qPCR：CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe(with ROX Reference Dye)
IC：全検体(+)

（エ）研究成果の活用における留意点

いのしし用に散布している経口ワクチンと同様にGPE株を豚の株化細胞で継代馴化することで 10^6 TCID₅₀/mL以上のウイルスが得られた。豚の株化細胞で継代馴化することで、ウイルス株が豚に対して病原性を示すようになる可能性が危惧される。豚の株化細胞で継代馴化したウイルスの安全性を確認する必要がある（実施課題1-2で実施）。

（オ）研究目標の達成に当たっての問題点

CSFウイルスのE2蛋白質の防御エピトープを発現させた豚丹毒菌ワクチン候補株を作製し、その免疫効果を確認する当初の目的は達成できた。

2) 小課題名：国内での使用に適したベイト剤の開発（根井 大介・農研機構 食品研究部門）

（ア）研究目標

現行のCSF生ワクチンである弱毒CSFウイルスGPE株を使用して、経口経路による投与によって豚に免疫を誘導可能かどうか検証する。また、安定してGPE株の大量生産を可能とする株化継代細胞等の検索を行い、1つ以上の大量培養系を確立する。さらに、細菌を用いたCSFベクターワクチンを開発する。

（イ）研究内容

小課題2は研究目標達成のため、「2-1：ベイト剤素材の開発」、「2-2：いのししの嗜好性の確認」、「2-3：ベイト剤とワクチンの抱合の検討」の3つの実施課題に分けて実施する。

実施課題2-1：国内のいのししに適用することを想定して、ベイト剤向けの素材を試作し、原料・製造条件と素材品質の関係を評価した（令和2年度）。前年度と異なる原料についてベイト剤用素材を作製した（令和3年度）。嗜好性・ワクチン抱合試験の結果を踏まえて改良を行うことにより、ベイト剤として最適な素材を提案した（令和3年度）。令和3年度までに数種類の原料および成形方法により試作品を作製することを終えたため、最終年度は小課題2-2および小課題3に向けてベイト剤を供給する役割を担当した。

実施課題2-2：一般的にいのししを捕獲する際に誘引に使用されるトウモロコシや米糠等を用いたベイト剤について、飼育個体等にセンサーカメラを用いて採食の有無や採食の際の量および頻度等の観察を行い、国内のいのししの嗜好性を評価する（令和2～4年度）。

実施課題2-3：課題2-1で試作した素材に共立製薬株式会社より提供されたワクチン原液あるいは生ウイルスを含まない原液（代替液）を抱合し、それらを抱合した素材の安定性に加えワクチンの安定性および漏出性を評価する（令和2年度）。前年度と異なる材料から作製した素材について、素材の安定性に加えてワクチンの安定性および漏出性を評価する（令和3年度）。令和3年度までにワクチン抱合材の試作を終えたことから、最終年度は小課題2-2および小課題3に向けた試作品を供給する役割を担当した。

（ウ）研究結果

実施課題2-1：

米糠を主原料としたベイト剤素材の試作品を作製した。玄米（品種：こしひかり）を歩留まり90%で精米して米糠を作製し、米糠25gに水15mLの割合で混合した後、所定の形状（3cm×3cm×0.8cm）に成型した。その後、180℃および200℃で15、20、25分間加熱することにより、ベイト剤の試作を行い、試作物の物性を測定した。また、硬化油脂を用いて凝固させる成形方法について検討した。所定の割合で硬化パーム油脂にバターを配合し、100℃に加熱した後に攪拌した。これに米糠を加えて混合し、冷却・凝固することによりベイト剤素材の試作を行った。作製したベイト剤素材を5℃、15℃、25℃および35℃に保存し、品温が十分に安定した後に物性の測定を行った。また、試作した素材について、5℃で2カ月間保存し、カビの発生の有無を確認することにより、保存性を評価した。

各種の加熱条件により作製した素材の物性を測定した結果、加熱温度が高く、加熱時間が長いほど硬度が大きくなることが示された（図2-1-1）。野外に散布することを想定した場合、降雨等による吸湿で素材強度が低下していくことも懸念されるため、初期強度は高い方が望ましいと考え、加熱時間は 25 分間とした。ベイト剤素材の試作条件を決めた後、4 cm 四方の角形および直径4 cm の丸形の成形用金型を作製し、これらを用いてベイト剤素材の候補を試作した。また、油脂を用いて凝固させることにより作製した素材では、硬化パーム油脂の濃度が高くなるにつれて、品温が低くなるにしたがって、ベイト剤素材の硬度は高くなった。硬化パーム油脂の濃度を20 %および30 %とした場合、35 °Cの環境においても十分に形状を保つことが可能であり、夏季の高温環境に曝されても溶けることなく機能を発揮できると推測される。したがって、硬化油脂を用いてベイト剤を製造する方法を採用する場合、現段階では硬化パーム油脂の濃度を20-30 %とすることが適していると考えている。

また、食品素材(トウモロコシ蛋白質(ゼインおよびグルテンミール)や小麦粉など)から成型品の試作品を作製した。試作物のDSC(示差走査熱量)分析を行った。試料容器に約6.0 mgの試作物および純水を測定容器に入れた。サンプルシーラーで密閉後、DSCで測定を行った。室温(約25 °C)から230 °Cに加温し、2 °C/minでリファレンスにはアルミナを用いた。また、試作物をポリエチレン製袋で簡易包装した上で20 °Cで保存し、保存性の評価を行った。さらに、射出成型機により、グルテンミール(トウモロコシ蛋白質が主成分)の試作物を成型した。相溶化剤を使用せずに、生分解性樹脂(PBS; ポリブチレンサクシネート)にグルテンミールの割合0~50(w/w)%で変化させて成型した。

試作した素材についてDSCで分析した結果、50 °Cから-70 °Cで、素材の未糊化が認められたが、成型品自体は150 °Cまで安定であった。また、水添加ベイト剤は1ヶ月(20 °C)の保存で、カビが発生した。しかしながら油添加のみまたは水・油添加ベイト剤は、カビなどは発生せず、形状などは維持していた。さらに、グルテンミール0~50(w/w)%の割合でPBSとの混合し、射出成型した結果、相溶化剤を使用せずに、グルテンミールが粒状または溶解で混合された成型物が作製できた(図2)。また、成型物には、グルテンミール臭が着香していた。

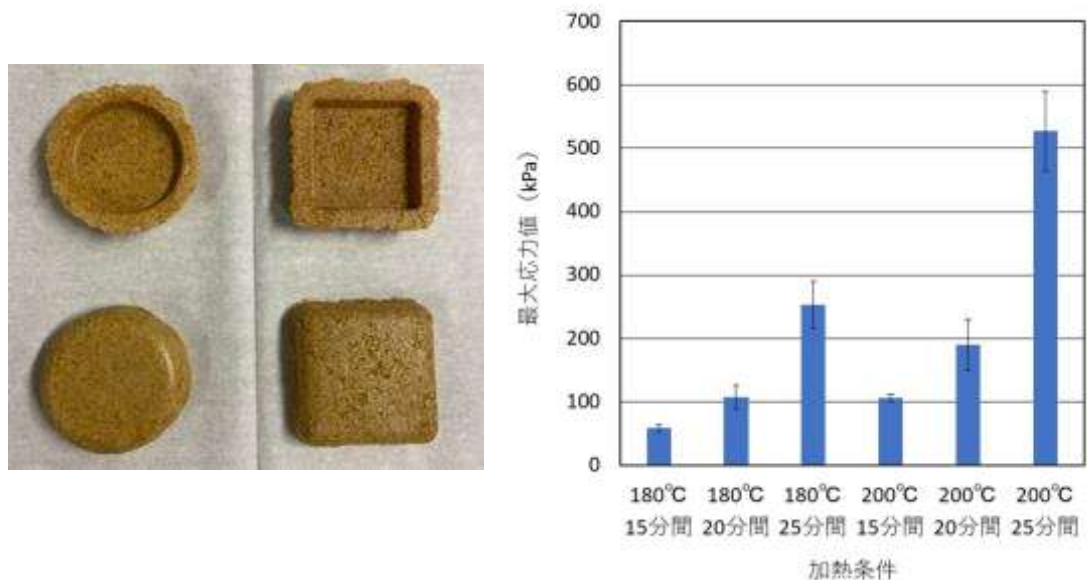


図2-1-1. 米糠から試作した素材の外観（左図）と加熱条件が素材の物性に及ぼす影響（n = 6）（右図）



図2-1-2. グルテンミール添加試作成型物

左図: 左から、グルテンミール添加量0, 10, 20, 30, 40, 50 %

右図: 添加量40%の中空成型物

令和3年度は米糠およびトウモロコシ等を主原料としたベイト剤素材の試作品を作製した。米糠、トウモロコシおよびジャガイモ粉を主原料として、硬化パーム油とバターの混合物を利用して凝固成型させることにより、ベイト剤の試作を行った。加熱成型では、主原料 25 g に水 15 mLの割合で混合した後、所定の形状（3 cm×3 cm×0.8 cm）に成型した。その後、180 °Cおよび 200 °Cで15、20、25分間加熱することにより、ベイト剤の試作を行い、試作物の物性を測定した。また、硬化油脂による凝固成型では、所定の割合で硬化パーム油脂にバターを配合し、100 °Cに加熱した後、これに米糠を加えて攪拌・混合し、冷却・凝固させた。作製したベイト剤素材を 5 °C、

15℃、25℃および35℃に保存し、品温が十分に安定した後に物性の測定を行った。

防かび剤の効果を検討するため、ベイト剤にプロピオン酸ナトリウムまたはソルビン酸カリウムを添加し、水分量を調整した土壌に静置し、かびの繁殖を外観により評価した。また、ベイト剤の冷凍耐性を評価するため、凍結・解凍の前後での物性の比較を行い、冷凍保存の可否について検討した。さらに、ベイト剤の原材料費を調査し、ベイト剤1個あたりのコストの試算を行った。

米糠、トウモロコシ粉およびジャガイモ粉を原料として、加熱成型および油脂を用いた凝固成型によってベイト剤素材の試作を行った。上記の原料に所定の割合で水を加えて攪拌・成型し、180℃または200℃で15-25分間加熱することにより素材を試作した。この加熱条件の範囲では、加熱温度が高いほど、加熱時間が長いほど素材の硬度が大きくなった。米糠では、加熱にともなう変形も少なく成型性も十分と考えられた。一方で、トウモロコシ粉およびジャガイモ粉を同様の方法で加工した場合、素材が脆くなりやすい、もしくは硬度が非常に低くなることが判明し、ベイト剤素材として不適であると判断した。このように、加熱成型の場合には食品原料によって試作素材の物性が大きく異なり、原料に応じて製法を修正する必要がある点が大きなデメリットとして考えられた。一方で、硬化パーム油を用いて凝固成型した場合、使用した食品原料の全てにおいて、十分な強度を有したベイト剤素材を試作することが可能であった。具体的には、硬化パーム油脂とバターを混合して（硬化パーム油脂の濃度は10%、20%および30%に調製）、加熱・攪拌した後に食品原料と混練して冷却することにより作製し、試作素材は35℃の温度下においても形状を維持することが可能であった（図2-1-3）。

野外にベイト剤を散布する場合、多様な環境に曝露されることが想定されるが、試作した素材が多湿土壌に常時置かれると短時間でかびによる劣化が生じることが懸念された。このようなかびによる品質低下を軽減することを目的として、試作素材に保存料としてプロピオン酸ナトリウムまたはソルビン酸カリウムを添加した上で、土壌（水分含量：40%）を入れた容器内に静置した後に密閉し、25℃で保存した。その結果、特にソルビン酸カリウムを4.0 mg/gまたは8.0 mg/gの濃度になるように添加した素材では、添加物不使用の素材と比較して、かびの繁殖を大幅に抑制することが可能であることを明らかとした（図2-1-4）。これまでの知見を整理して、候補素材は「食品素材、油脂（バターおよび硬化パーム油）、保存料（ソルビン酸カリウム）、香料、pH調整剤（クエン酸等）」で構成することを想定している。製造後のベイト剤は冷凍保存されることも想定されるため、素材の冷凍耐性を評価した。試作した素材を-20℃で24時間の凍結処理を行った後、25℃で解凍し、凍結処理の有無が素材の物性に及ぼす影響を調べた。試作した素材の物性について、凍結前と凍結解凍後で比較したところ、硬度に有意な差は認めなかった（ $p > 0.05$ ）（図2-1-5）。

実用化を見据えた場合、ベイト剤を大量に生産していく必要があるため、生産量を増加させた条件でベイト剤の試作を行った。小規模試験として、米糠および硬化パーム油等の原料素材の総量を1 kg（ベイト剤125個に相当）に設定し、原料を調整した後、50℃に温調した攪拌機で10分間混練し、成形することにより試作を行った。試作した素材の物性を測定した結果、35℃においても十分な硬度を維持することが可能であった（図2-1-6）。また、このようなスケールでの生産において、実務上の支障は認知できなかった。ベイト剤の原価を見積もったところ、1 gあたりの価格は米糠で約0.03円（一般社団法人全国肥料商連合会の統計情報より）、硬化パーム油で約0.8円（一般小

売価格を参考）、バターで約2.2円（農林水産省食品価格動向調査より）であり、一個あたりのベイト剤の原材料は約6.9円となった。なお、ベイト剤の添加物として、ソルビン酸カリウムおよびpH調整剤を使用することも選択肢として想定されるが、その原料コストは非常に小さかったため、ここでは試算に含めていない。

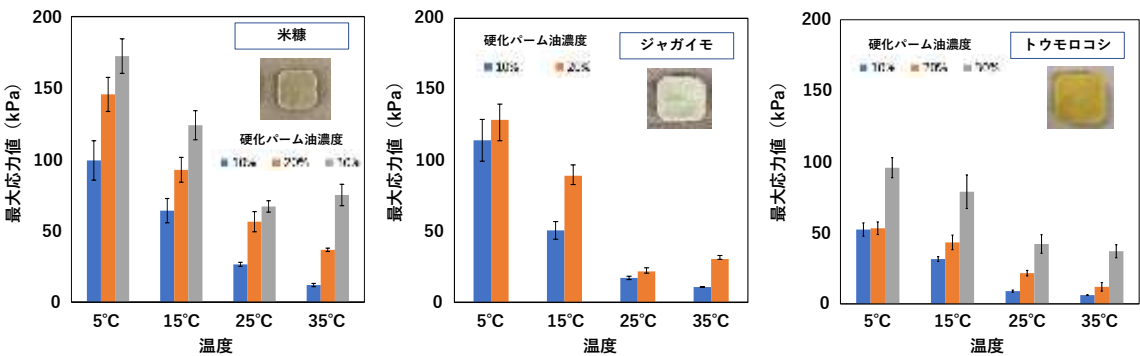


図2-1-3 各種の主原料から試作したベイト剤素材の物性

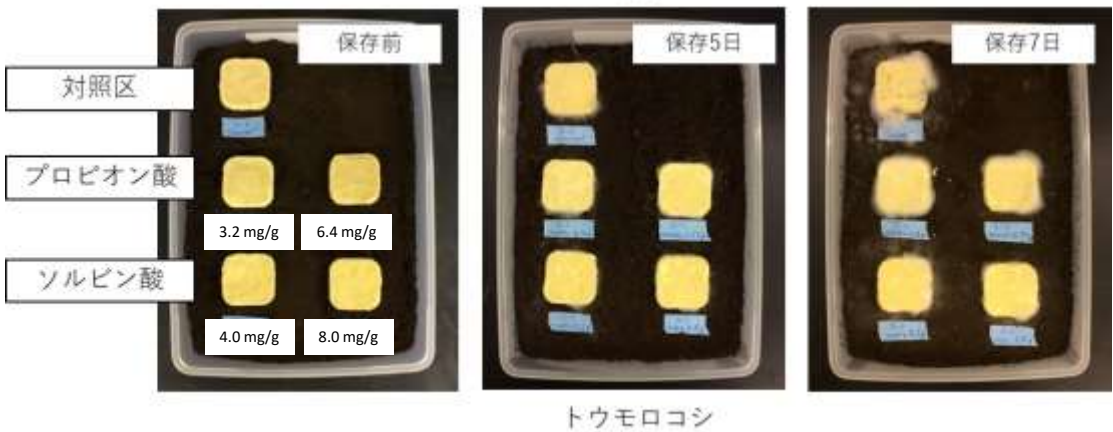


図2-1-4 保存料の添加によるかびの抑制効果

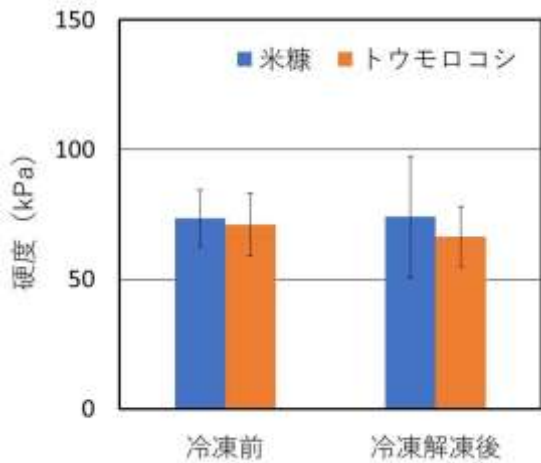


図2-1-5 凍結前後の素材の物性

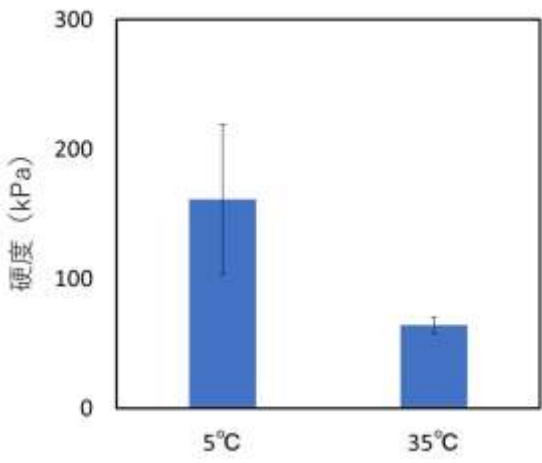


図2-1-6 試作した素材の物性
(使用原料：ベイト剤125個相当の重量)

加えて、食品素材から中空成型物の試作品も作成した。まずはPBSのみでカプセル材を作製した。その後、CGMを10%ずつ添加し、CGM:PBS=1:9のCGM10%からCGM:PBS=7:3のCGM70%(図2-1-7)まで作製することができた。CGMの配合割合が増えるにつれて型に生地をうまく流し込むことができずに失敗することが目立ったためCGM70%までが限界であると判断した。CGMの配合率が上がるとともに色は白色から黄色、黄色から黄土色のように変化し、香りも少しずつ強くなっていた。硬さはどのカプセル材も非常に硬かった。



図2-1-7 CGM70%のカプセル材
a:射出成型後, b:外観, c:カプセル化

(エ) 研究成果の活用における留意点

ベイト剤の野外散布の実証試験を実施して、大きさについて検討が必要と考えられる。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

令和3年度までに米糠、トウモロコシおよびじゃがいもを主原料としたベイト剤の試作を行った。研究期間全体について、2種類以上のベイト剤を試作することを目標としており、前倒しで目標を達成した。研究を着実に進めており、特段の問題点は見当たらない。