

# 日生研たより

第67巻 第3号(通巻620号) 2021年(令和3年)7月

## 挨拶・巻頭言

点と点

.....杉浦勝明(2)

## レビュー

アフリカ豚熱ワクチン開発の現状と課題

.....舩甚賢太郎(3)

魚類感染症の季節変化:

水温と性成熟が及ぼす魚類の  
免疫応答への影響

.....河島奈悠(12)

## 記録

学会発表演題.....(17)

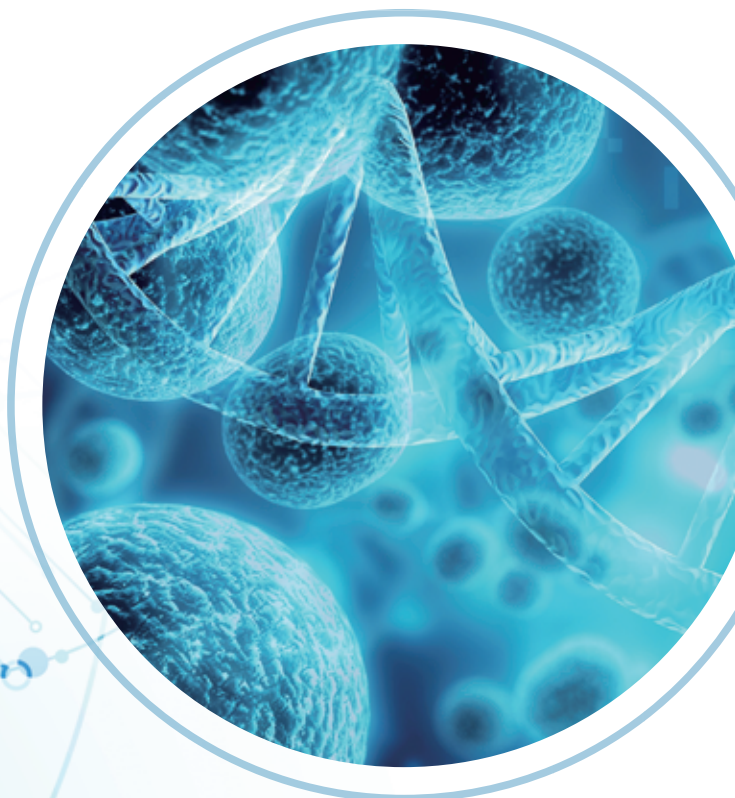
## おしらせ

笹川千尋所長“瑞宝中綬章”受章

.....(18)

研修者・見学者受け入れ状況

.....(18)



## 点と点

杉浦勝明

六十の手習いでチェスを始めた。最初のうちは目先の餌や敵に気を取られて、駒を無造作に動かしてしまい、意味も分からないうちに足元をすくわれ、うんざりしていたが、最近は2、3手先を見込んで駒を動かせるようになってきた。そして最も重要なのは大切な駒でも失うことを恐れないことだと気づいた。

確かにかの有名なオペラゲームの教訓も同じだ。米国人チェスプレイヤーのポール・モーフィーが、1858年パリのオペラ座の舞台袖で、2人がかりで挑んできた貴族を相手に、潔く駒を捨てていく様子は、今見てもすがすがしい。クイーンを犠牲にしてチェックメイトに追い込む最後の一手はあまりにも鮮やかで美しい。しかし、さらに注目すべきは、相手のキングを迎え撃つビショップを、モーフィーが試合の序盤に仕組んでいたことだ。

初心者のチェスでも、序盤に動かした駒が意外な形で役に立つことがある。場合によっては失敗したと思った一手が、終盤を救ってくれる。まさに人生の醍醐味である。スティーブ・ジョブズがスタンフォードの卒業生に向けたはなむけの挨拶で、バラバラだと思っていた点と点も振り返ったときにはつながるものであると言っていたのと似ている。

試合終盤に入った私としては、もうそろそろ点と点をつなげて、納得のいくラストに持ち込みたいと思っているところである。振り返るとやはり後悔も否めないが、ここにきて気づくのは、チェス盤は実は自分の人生だけで成り立っているわけではないということだ。我々はいつだって一人で試合をしているわけではないからだ。

4月に松山英樹がマスターズを制したのは日本人として非常に感慨深い出来事だった。彼自身の強靱な精神力と血のにじむような努力の結果であることは言うまでもないが、彼の前には85年間挑戦し続けてきた日本人選手たちがいた。松山があこがれの選手として何度となく名を挙げているタイガー・ウッズがいた。東北震災直後にマスターズに初挑戦した19歳の松山の背中を押したのは被災した人たちの応援の言葉だった。

我々の多くはポール・モーフィーのようなスマートな試合はできないし、松山英樹やタイガー・ウッズにはなりえない。しかし、チェス盤で胸を張るキングは、常に形を変え、場所を変え、何度だって我々の前に現れる。私自身は、若かりし頃に想像したのとはまったく違う道を今歩んでいる。挫折を恐れる若者たちに伝えたいのは、たとえ挫折しても自分の何気ない日常が、どこかでキングを打ち取る一手につながる可能性は尽きないということだ。私は50年前の大阪万博で片言の英語につきあってくれた米国人老夫妻や、高校の熱心な英語教師の影響で海外文化に興味をもった。25年前ニュージーランド赴任中に政府の役人たちの疫学的な思考に触れる機会があったからこそ、新たな獣医学の世界に魅了され、今の道につながっていった。道の途中では多くの若者との出会いがあり、中には私自身は夢にも思わなかった成功を遂げている者もいる。

自分の小さな言動が巡り巡って遠くにそびえる100年に一回の奇跡につながっていると信じていることができれば、人生も捨てたものではない。

(常務理事)

## アフリカ豚熱ワクチン開発の現状と課題

舩 甚 賢 太 郎 (農研機構 動物衛生研究部門  
越境性感染症研究領域 アフリカ豚熱ユニット)

### はじめに

アフリカ豚熱 (African swine fever : ASF) は、アフリカ豚熱ウイルス (ASFV) により引き起こされる発熱及び出血性病変を主徴とする豚疾病で、その致死率はほぼ 100% に達する。その名が示すようにアフリカ常在の疾病であるが、2007 年にコーカサス地方の黒海沿岸の国ジョージアで突如として ASF が摘発され、ロシアおよび欧州にも拡散した。2018 年には、中国でアジア圏初となる ASF が発生し、中国国内で急速に拡散するとともに、隣国の韓国・モンゴルおよび東南アジア諸国でも発生が確認され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認められない現状において、もっとも注意すべき疾病である。この ASF のまん延の理由の一つに未だ有効かつ安全なワクチンが開発・実用化されていないことが挙げられる。本病の拡散をコントロールするためにもワクチン開発とその実用化が重要な課題となっている。本稿では、ASF の概説とともに、ASF ワクチン開発研究の現状と課題について紹介する。

### 1. アフリカ豚熱

アフリカ豚熱 (African swine fever : ASF) は、アフリカ豚熱ウイルス (ASFV) の感染によって引き起こされるウイルス性の疾病である。宿主動物は豚、イノシシで、豚は品種、日齢、性別に関わらず高い感受性を示す。ASF の臨床症状は多岐にわたり、甚急性型、急性型、亜急性型、慢性型および不顕性型の 5 つの型が報告されている [32]。急性型はもっとも認められる臨床症状で、42°C 前後の持続的な高熱、食欲不振、元気消失、末期には呼吸困難を呈し、発症から 7 日前後で死亡する。その致死率はほぼ

100% に達する。母豚では妊娠時期に関係なく流産を認めるのも本病の特徴である。感染豚の解剖時肉眼病変として、脾臓の腫大及び黒色化、腎臓及び内臓リンパ節の出血性病変が認められる。流行株の多くは、この急性型の臨床症状を示す [38]。感染した豚ではウイルスを中和する抗体が作られないまま致死的な転帰をとるため、感染豚及び感染が疑われる豚の早期摘発と淘汰が唯一のまん延防止策となっている。

### 2. アフリカ豚熱ウイルス

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 200 nm 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 170–190 kbp で、170 以上の遺伝子が発現することで、宿主である豚およ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、増殖する [10]。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、現在までに、24 種の遺伝子型 (I ~ XXIV 型) に区別されている。

ASFV は、適度な蛋白質濃度が保たれた環境中では長期間安定で、血液中では室温で 18 ヶ月間、37°C では 1 ヶ月間感染力を保持し、また腐敗した血液中でも 4 ヶ月間感染力を失わないことが確認されている。ASFV に汚染された豚肉及び豚肉加工品中での生存期間は、冷蔵であれば、少なくとも 4 ヶ月間、非加熱のハムやソーセージでは 3 ~ 6 ヶ月間生存する。一方、ASFV は 70°C、30 分間の熱処理で不活化されることが確認されている [33]。



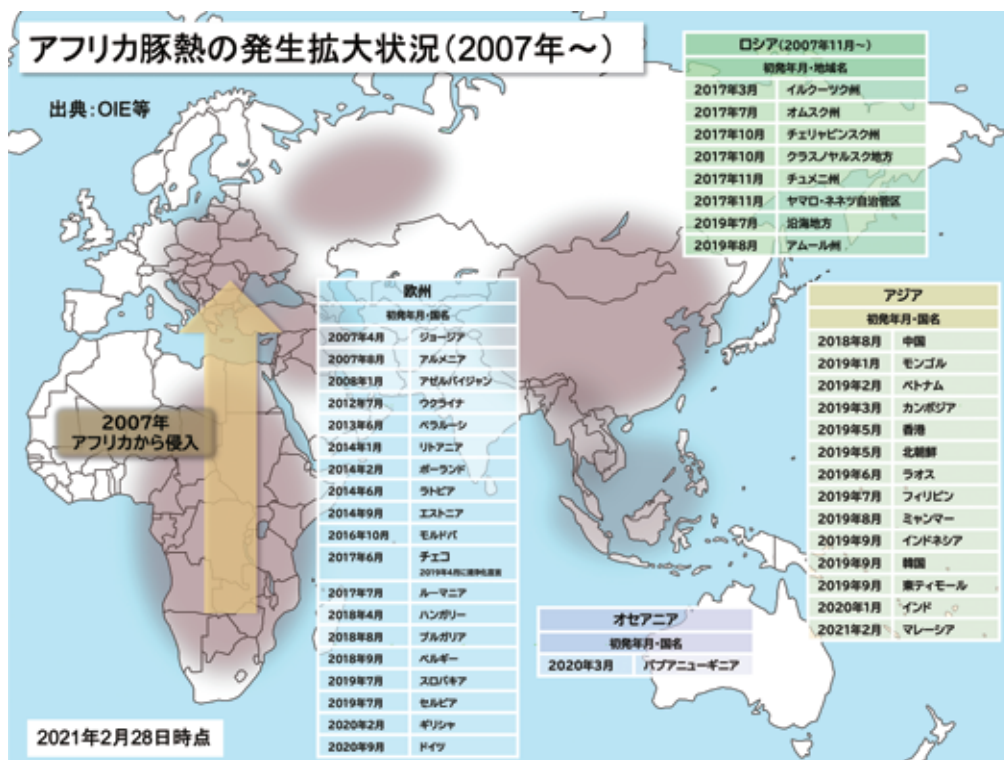


図1 2007年以降のASFの発生状況

2007年4月にアフリカから南コーカサス地方のジョージアに侵入したASFVは、ロシア、欧州諸国、そしてアジア諸国に侵入・拡散した。現在も発生は続いており、感染国のさらなる拡大が懸念されている。(農林水産省ホームページ [36] より引用、一部改変)

### 3. ASFの発生状況

#### 1) ヨーロッパ大陸での発生

本病は、その名が示すようにアフリカが起源の疾病であるが、アフリカ以外の地域でも発生が報告されており、1957年にはアフリカからの航空機内で提供されたウイルスに汚染された機内食の残渣を豚に給餌したことが原因で、ポルトガルにおいて欧州初となるASFが確認され、やがてイベリア半島全域にまん延して多大な経済損失をもたらした。その後、西欧に拡散し、フランス、イタリア、オランダなどで散発的な発生が報告されている。1970年代以降には、スペイン及びポルトガルからの航空機内で提供された機内食の残渣を豚に給餌したことで、ドミニカ共和国及びブラジルに伝播し、中南米で甚大な損害をもたらした [31]。1995年にポルトガル及びスペインから、30年以上におよぶ懸命な取組により本病が撲滅され、欧州ではイタリアのサルディニア島のみで散発発生する状況が継続していた。

2007年4月に南コーカサス地方のジョージアにASFが発生し、欧州への再侵入が確認された。こ

のウイルスは、高熱、食欲不振、元気消失を主徴とし、発症から7日前後ではほぼ100%が死亡する急性型の臨床症状を引き起こすウイルス株で、遺伝子解析の結果、南東アフリカ（モザンビーク、マダガスカル、ザンビア）で流行するウイルスと遺伝子型（II型）が一致した。この発生におけるウイルスの侵入経路として、アフリカからの船舶内で提供されたASFVに汚染された豚肉または豚肉加工品残渣の豚への給餌が考えられている。航空機か船舶の違いはあるが、50年前にASFVが欧州に初めて侵入した時とほぼ同様の経緯でアフリカからウイルスが持ち込まれたことになる。欧州での発生はその後コーカサス地方全域にまん延し、次いでロシアを含む欧州19カ国に浸潤し、2021年4月現在も終息に至っていない（図1） [29, 34, 36]。

#### 2) アジアでのASFの発生

欧州での発生とその急速な広がり、アジア諸国の養豚への脅威となっていたが、その懸念は遂に現実となり、2018年には世界最大の養豚国である中国でアジア圏初となるASFの発生が確認された。その後、本病は急速に中国内で拡散し、発生から僅

か8ヶ月の間に中国全土に発生が確認されている。中国でのASFのまん延は近隣諸国にも飛び火し、モンゴル、ベトナムを皮切りに、島国のフィリピン及び東ティモールでもASFの発生が確認されている。中国の初発例から約2年半という僅かな期間にアジア14カ国にASFは浸潤し、欧州同様に現在も終息に至っていない(図1)[11, 36]。

これまでに日本ではASFの発生はないが、2018年10月には渡航外国人の携帯品として国内の空港で収去された豚肉加工品からASFV遺伝子が検出され、2019年4月には旅客手荷物から見つかった加熱不十分な豚肉加工品2検体から感染性を保持したウイルスが分離された[35]。その後も同様に加熱不十分な豚肉加工品からASFVは分離されており、昨今のコロナ禍で国際的に移動が規制されているにも関わらず、2020年に2件のASFV陽性検体が摘発されている[37]。この事実は、海外でまん延する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唆している。

#### 4. ASF ワクチン

現在までにASFに効果的な治療薬は知られておらず、また実用に十分に足りるワクチンについても開発されていない。このことが、本病のコントロールを難しくさせ、本病のまん延要因の1つとなっている。先に述べたようにASFV感染豚の体内においてウイルスを中和する抗体は誘導されない。一方、ASFV感染耐過豚または弱毒ASFV株を感染させた豚に、接種した株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、何らかの免疫機構が関与していることが推測される。ASFVに対する免疫誘導が存在するこの事実はワクチン開発の可能性を強く示唆する。1980年以降、ASFワクチン開発に向けて様々な取組がなされてきたが、不活化ワクチン、DNAワクチン、サブユニットワクチン等では、これまでに期待される防御効果は得られていない。一定の効果が確認されているのは弱毒生ワクチンのみ

であり、現時点でもっとも有望なワクチン候補として考えられている。

#### 5. 弱毒 ASFV 生ワクチン

1957年から1995年まで続いた、スペイン、ポルトガルでのASFの発生を受けて、野外発生弱毒ASFV株または異種動物細胞への馴化過程で生じた突然変異により弱毒化した細胞馴化弱毒ASFV株について、攻撃試験に基づく感染防御効果の評価が行われている。ポルトガルで分離された野外発生弱毒株NH/P68株(遺伝子型:I型)またはOUR/T88/3株(I型)を接種された豚は、同時期の同じ地域で分離された強毒株(L60株、OUR/T88/1株)、またアフリカで分離された遺伝的に近縁なASFV株(Beni97/1株)の感染を防御する[5, 13, 16]。また、アフリカミドリザルの腎臓由来不死化細胞(Vero細胞)で連続継代することで弱毒化された細胞馴化弱毒株E75株を接種された豚は、親株であるE75株(強毒株)の感染を発熱や臨床症状を示さず100%防御する[15]。その一方、野外発生弱毒株OUR/T88/3株は、遺伝的に異なる強毒株Malawi株(VIII型)の感染を防ぐことはできず、また興味深いことに、近縁の強毒株Lisbon57株(I型)に対しても防御効果を示さない[5]。遺伝的に近縁な株であっても防御免疫応答を誘導しないこの現象は、細胞馴化弱毒株E75株を接種した豚にも同様に認められ、遺伝的に近縁なBA71株(I型)で攻撃された豚は全頭ASFを発症する[15]。このことから、弱毒生ウイルスによる防御効果は、非常に限定的で株特異的であると考えられた。近年、NH/P68株が、流行株Armenia07株(II型)の感染を防御することが報告され[12]、そのワクチン利用が期待されたが、死亡、発熱、関節炎や皮膚の腫瘍などの副作用、またウイルス毒性の復帰など安全面で多くの問題が解消できず、実用化には至っていない。

#### 6. 遺伝子組換え生ワクチン

弱毒ASFV株は、ある一定の防御効果を豚に与えるが、ワクチンとして使用するには、安全性や有効

性の面でさらなる改善が必須である。近年、ASFVの増殖複製、宿主病原性および宿主領域に關与する遺伝子(群)が遺伝子組換えASFVの性状解析または次世代シーケンサーによるゲノム解析から少しずつ特定され、これらの情報を基盤に野外発生または細胞馴化弱毒ASFV株よりも安全でかつ効果に優れた遺伝子組換え弱毒ASFV株(遺伝子改変技術により標的遺伝子を欠損させることで人為的に弱毒化されたASFV)の研究開発と攻撃試験に基づくワクチン候補株の探索が進められている。これまでに報告されている遺伝子組換え弱毒ASFV株の性状と防御効果を下記にまとめる。

### 6-1. 遺伝子組換え弱毒ASFV株と防御効果

#### 1) DP71L 欠損株

DP71L (NL) はASFV株間を越えて高度に保存された遺伝子で、単純ヘルペスの神経ウイルス毒性因子と類似した配列を有することが知られている。強毒株E70株(I型)よりNL遺伝子を欠損させたE70/43株を接種された豚には、一過性の発熱を伴うものの特段の臨床症状は認められない。親株である強毒株E70株(同種)を用いた攻撃試験では、防御効果が確認されている[30]。

#### 2) K196R 欠損株

K196Rは、DNA合成に關与する酵素チミジンキナーゼ(TK)をコードする遺伝子である。本遺伝子は培養細胞(in vitro)でのウイルス増殖に關与し、ウイルス産生を低下させる。宿主に一過性の発熱と死亡(4頭中1頭)は認められるが、強毒株Malawi株よりK196R(TK)を欠損させると弱毒化(Malawi/Vero/TK-株)する。強毒株Malawi/Vero/TK+株(親株)を用いた攻撃試験において、Malawi/Vero/TK-株を接種された豚は発熱と接種部位に腫瘍が認められるが、その感染を防御する[20]。一方、流行株Georgia2007/1株(ASFV-G:II型)よりTK遺伝子を欠損させたASFV-G/V-ΔTK株は、弱毒化するが防御効果は認められず、親株で攻撃された全ての豚にASFの発症が確認されている[28]。

#### 3) A238L、A224L、EP153R、A276R 欠損株

A238Lは、宿主自然免疫に重要なI型インターフェロン(IFN)の誘導に關与する転写因子NFκBを制御する因子を、A224Lは宿主細胞のアポトーシスを

抑制する因子を、EP153Rは宿主免疫細胞のMHC-I型抗原提示を制御する因子を、またA276Rは宿主のI型IFNを制御する因子をそれぞれコードする遺伝子として知られている。野外発生弱毒株NH/P68株(I型)に認められる発熱、皮膚組織の壊死、関節の腫れ等の慢性型の症状を改善するため、NH/P68株より上記の遺伝子をそれぞれ欠損させたNH/P68ΔA238L株、NH/P68ΔA224L株、NH/P68ΔEP153R株、NH/P68ΔA276R株の遺伝子組換えASFV株が作成されている。これらの株を接種された豚には軽度の慢性型の症状が確認され、副作用を完全に取り除くことには至っていない。一方で、攻撃試験では近縁の強毒株L60株(I型)の感染を防御することが明らかとなっている[12]。

#### 4) B119L (9GL) 欠損株

B119L (9GL) は、酵母菌の代謝や細胞増殖に關与するERV1遺伝子に類似し、ポックスウイルス科ワクシニアウイルスにも類似の遺伝子が存在する。Malawi株よりB119L (9GL)を欠損させたMALΔ9GL株は、in vitroでのウイルス増殖が著しく低下することが明らかとなっている。MALΔ9GL株を接種された豚には、一過性の発熱が認められるがその他の症状は認められない。親株の強毒株Malawi株(I型)を用いた攻撃試験では、MALΔ9GL株は優れた防御効果を示し、ASFに感染した豚は確認されていない。しかしながら、低ドーズでMALΔ9GL株を接種された豚では、攻撃株由来のウイルス血症が長期的に認められている[17]。また、B119L (9GL) 欠損株は、ASFV-G株(II型)でも作出されている。ASFV-G-Δ9GL株を低ドーズ( $10^2$ HAD<sub>50</sub>および $10^3$ HAD<sub>50</sub>:血球吸着反応に基づき算出されたウイルス力価)で豚に接種すると副作用は認められないが、高ドーズ( $10^4$ HAD<sub>50</sub>)にて接種するとASFを発症する。親株ASFV-G株を用いた攻撃試験では、ASFV-G-Δ9GL株を $10^3$ HAD<sub>50</sub>接種した群では、ASF発症豚は認められず、高い防御効果が得られたが、 $10^2$ HAD<sub>50</sub>の接種群ではASFを発症する豚が認められている[23]。

#### 5) MGF 欠損株

Multigene Family (MGF) は、ASFVの感染宿主領域、宿主免疫機構からの防御および豚への病原性



に關与が知られる遺伝子群である。強毒株 Benin97/1 株 (I 型) から MGF を欠損させた Benin  $\Delta$  MGF 株を豚に接種すると、一過性の発熱を伴うがその他の臨床症状は認められない。Benin  $\Delta$  MGF 株を接種した豚は、親株 Benin97/1 株の攻撃を防御する [26]。強毒株 ASFV-G 株 (II 型) から MGF を欠損させた ASFV-G- $\Delta$  MGF 株を豚に接種すると、発熱もなく特段の臨床症状も観察されず、Benin  $\Delta$  MGF 株同様に弱毒化する。親株 ASFV-G 株による攻撃試験において、ASFV-G- $\Delta$  MGF 株を接種された豚は一過性の発熱を伴うが全頭の生存が確認されている。しかしながら、その一方で、攻撃試験後 21 日目以降も ASFV-G 株 (攻撃株) は排除されることなく体内での残存が確認されている [21]。また、MGF 欠損株は、中国で分離された流行 ASFV 株 HLJ/18 株 (II 型) でも作成されており、HLJ/18-6GD ( $\Delta$  MGF) 株は ASFV-G- $\Delta$  MGF 株と同様に親株への防御効果が確認されている。しかしながら、その後の病原性復帰試験により、HLJ/18-6GD 株は豚で連続継代すると 5 継代目にて病原性は復帰し、ASF を発症させることが明らかとなっている [9]。

#### 6) EP402R (CD2) 欠損株

EP402R は、ASFV に特徴的な血球吸着に關与する細胞膜貫通型蛋白質 CD2v をコードする遺伝子である。強毒株 BA71 株から EP402R 遺伝子を欠損させた BA71  $\Delta$  CD2 株を豚に接種すると、一過性の発熱は認められるが、ASF を発症することはない。BA71  $\Delta$  CD2 株を高ドーズ ( $10^4$  および  $10^6$  PFU<sub>50</sub> : プラークアッセイに基づいて算出されたウイルス力価) で接種された豚は、親株 BA71 株 (I 型) だけでなく、近縁株 E75 株 (I 型) および異種株 ASFV-G 株 (II 型) に対してもその感染を防御する。一方、低ドーズ ( $10^3$  PFU<sub>50</sub>) で BA71  $\Delta$  CD2 株を接種された豚では、その防御効果が認められず ASF を発症する。また、BA71 株や E75 株で攻撃された豚には検出されないが、ASFV-G 株で攻撃された感染防御個体には、攻撃株由来のウイルス血症と体外へのウイルス排出が認められている [19]。遺伝子型 II 型の HLJ/18 株についても CD2 欠損株は作出されているが、BA71  $\Delta$  CD2 株とは異なり、HLJ/18 株より CD2 遺伝子を欠損させても弱毒化されず、

HLJ/18-CD2v-del 株を接種された豚の 50-80% に ASF の発症が確認されている [9]。加えて、ASFV-G の CD2 欠損株として作出された ASFV-G- $\Delta$  8DR 株でも接種された豚の全頭が ASF を発症し、CD2 遺伝子欠損による弱毒化は認められていない [6]。

#### 7) DP71L (NL)/DP96L (UK) 欠損株

野外発生弱毒株 OUR/T88/3 株は、近縁株 OUR/T88/1 株に対して 100% の防御効果を示すが、強い副作用も認められている。副作用の排除を目的として、DP71L (NL) 遺伝子に加え、豚への病原性に關与が知られていた DP96L (UK) 遺伝子の 2 つの遺伝子を欠損させた OUR/T88/3  $\Delta$  DP2 株が作出されている。しかしながら、予想に反して、OUR/T88/3  $\Delta$  DP2 株が接種された豚の半数に關節の腫れが観察されている。また、近縁株 OUR/T88/31 株による攻撃試験では、33% の豚が ASF を発症し、OUR/T88/3 株と比較して防御効果の低下が認められている [1]。

#### 8) B119L (9GL)/DP96L (UK) 欠損株

遺伝子組換え弱毒株 ASFV-G- $\Delta$  9GL 株から DP96L (UK) も欠損させた ASFV-G- $\Delta$  9GL/ $\Delta$  UK 株が作出されている。ASFV-G- $\Delta$  9GL/ $\Delta$  UK 株を高ドーズで接種された豚に副作用は認められず、UK 遺伝子を欠損させることにより、さらなる弱毒化が達成された。しかしながら、親株 ASFV-G 株を用いた攻撃試験では、ASFV-G- $\Delta$  9GL/ $\Delta$  UK 株を  $10^2$  HAD<sub>50</sub> および  $10^4$  HAD<sub>50</sub> のドーズで接種された豚群で、それぞれ 9 頭中 5 頭、15 頭中に 1 頭の ASF 発症個体が認められている [24]。

#### 9) B119L (9GL) /MGF 欠損株

ASFV-G- $\Delta$  9GL 株から MGF を欠損させた ASFV-G- $\Delta$  9GL/ $\Delta$  MGF 株も作出されている。ASFV-G- $\Delta$  9GL/ $\Delta$  MGF 株を接種された豚には、一過性の発熱も含め全く症状は認められず、副作用の完全な排除が達成された。しかしながら、親株 ASFV-G 株を用いた攻撃試験において、ASFV-G- $\Delta$  9GL/ $\Delta$  MGF 株が接種されたドーズに関わらず全ての個体が ASF を発症し、その防御効果は認められていない [22]。

#### 10) MGF/EP402R 欠損株

MGF と EP402R (CD2v) を欠損させた HLJ/18-7GD 株を接種した豚に副作用は認められていない。強毒株 HLJ/18 株 (親株) を用いた攻撃試験では、

100%の防御効果を示している。また、病原性復帰試験において、継代5代目までにHLJ/18-7GD株に病原性の復帰は認められていない [9]。

#### 11) DP148R 欠損株

DP148R 遺伝子は、DP148R 遺伝子欠損 ASFV 株の性状解析から、*in vitro* でのウイルス増殖に直接関与しないが、豚での病原性に関与する遺伝子であることが明らかになった。DP148R を欠損させた Benin  $\Delta$  DP148R 株を接種された豚には、一過性の発熱が認められるもののその他の副作用は認められていない。親株 Benin97/1 株 (I 型) による攻撃試験では、すべての個体が生存し、100%の防御効果が認められている [25]。一方、HLJ/18 株 (II 型) から DP148R を欠損させて作出された HLJ/18-DP148R-del 株を接種された豚は、全頭 ASF の発症が確認されている [9]。

#### 12) I177L 欠損株

I177L 遺伝子を欠損させた ASFV-G- $\Delta$ I177L 株は、*in vitro* でのウイルス増殖が親株と比較して 100-1000 倍低下すること、また豚への病原性も減衰することから、I177L 遺伝子は *in vitro* でのウイルス増殖と豚での病原性決定に関与する遺伝子として位置づけられている。ASFV-G- $\Delta$ I177L 株は、高ドーズ ( $10^6$ HAD<sub>50</sub>) で接種しても、一過性の発熱を伴うが ASF を発症しないことが確認されている。また、親株 ASFV-G 株 (II 型) を用いた攻撃試験では、低ドーズ ( $10^2$ HAD<sub>50</sub>) でもその感染を防御することが明らかにされている [7]。

### 7. 遺伝子組換え弱毒 ASFV 株に基づくワクチン開発の問題と課題

遺伝子組換え弱毒 ASFV 株を基盤としたワクチン開発の研究が進むことで、野外発生弱毒 ASFV 株で認められる強い副作用を制御できることが分かってきた。その一方で、ASF ワクチン開発の難しさもみえてきた。遺伝子組換え弱毒 ASFV 株の研究成果から明らかになった問題や課題についてまとめる。

#### 1) ASFV 株の多様性

TK 遺伝子を欠損させた Malawi/Vero/TK- 株は防御効果が認められるが、一方、ASFV-G/V- $\Delta$ TK 株は弱毒化するが防御効果は認められない。NL 遺

伝子を欠損させた E70/43 株は病原性が減衰し、また親株の攻撃に対して感染を防御する。一方、Malawi 株および Pretoriuskop/96/4 株のそれぞれから NL 遺伝子を欠損させても弱毒化されず、ASF を発症することが報告されている [2]。同様に、BA71 株からの CD2 遺伝子の欠損は弱毒化、さらには防御効果をもたらすのに対し、HLJ/18 株および ASFV-G 株から CD2 遺伝子を欠損させても弱毒化は認められない。このように、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を誘導できない事例がある。この理由については明らかにされてはいないが、これらは ASFV の遺伝的背景の多様性に起因し、ASFV は株間で異なる感染メカニズムおよびウイルス-宿主間での相互作用を利用して、感染・増殖を成立させているのかもしれない。ASFV 株間での詳細な性状比較解析が、効果的な弱毒生ワクチンの開発に求められている。

#### 2) 遺伝子欠損と効果の相関性

野外発生弱毒株 OUR/T88/3 株から NL 遺伝子と UK 遺伝子の二つの遺伝子を欠損させた OUR/T88/3  $\Delta$  DP2 株は、OUR/T88/3 株の副作用を完全には抑制できず、また防御効果の低下が認められる。また、ASFV-G- $\Delta$ 9GL 株で認められる副作用を排除するために作出された ASFV-G- $\Delta$ 9GL/UK 株および ASFV-G- $\Delta$ 9GL/MGF 株は、副作用は改善されたが、著しい防御効果の低下が認められている。病原性に関与する遺伝子を複数欠損させることは、副作用の抑制をもたらすが、同時に防御効果の低下に繋がる傾向にある。一方、HLJ/18-7GD ( $\Delta$ MGF/ $\Delta$ CD2) 株は、親株を完全に防御するだけでなく、その病原性の復帰も確認されていない。このことは、欠損させる遺伝子の機能情報の把握と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、現在までに機能が明らかとなっている遺伝子は限定的で、安全性と有効性を両立したワクチン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) 遺伝子組換え弱毒ウイルス株と接種用量

ASFV-G- $\Delta$ 9GL 株は、 $10^3$ HAD<sub>50</sub> で接種すると副



作用もなく、親株での攻撃を防御する。ところが、高ドーズ ( $10^4\text{HAD}_{50}$ ) で接種すると ASF を発症し、また低ドーズ ( $10^2\text{HAD}_{50}$ ) で接種すると ASF を発症することはないが、攻撃試験において ASFV の感染が確認されている。また、BA71 $\Delta$ CD2 株は、 $10^4$  または  $10^6\text{PFU}_{50}$  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 ( $10^3\text{PFU}_{50}$ ) では ASF を発症する。このように接種量の違いで病原性および防御効果が左右されることから、安全な用量と毒性のある用量、さらには防御効果のある・なしの用量の差が、ASFV については非常に狭いようにみえる。ASF ワクチンとその実用化には独自の評価法および基準を厳しく制定する必要があるだろう。

#### 4) ウイルスの残存と排出

ASFV-G- $\Delta$ MGF 株は、親株に対する防御効果を豚に享受する。一方、攻撃試験 28 日後においても ASFV-G 株 (攻撃株) が排除されることなく接種豚から検出されている。また、BA71 $\Delta$ CD 株 (I 型) は、異種株 (ASFV-G 株: II 型) に対して 100% の防御効果を示した唯一の遺伝子組換え弱毒ウイルス株であるが、感染防御豚からは攻撃株 (ASFV-G 株) 由来のウイルス血症と体外へのウイルス排出が長期的に認められている。おとり試験等による排出ウイルスの伝播および感染性については検討されていないが、ウイルス残存と体外排出は安全性の面で危惧される問題となっている。

#### 5) 交差防御効果

これまでに報告されている遺伝子組換え弱毒 ASFV 株を用いた交差防御試験の成績は、NH/P68 $\Delta$ 224L 株、NH/P68 $\Delta$ 238L 株および BA71 $\Delta$ CD 株 (全株 I 型) の 3 株のみである。遺伝子型 II 型の ASFV 株 (異種) を用いた攻撃試験での生存率は、それぞれ 40% (NH/P68 $\Delta$ 224L 株)、50% (NH/P68 $\Delta$ 238L 株) および 100% (BA71 $\Delta$ CD 株) と効果にばらつきはあるが、感染防御が成立している。ただし、交差防御効果試験に使用されたこれらの遺伝子組換え弱毒 ASFV 株には副作用や攻撃 ASFV 株の長期的な体内残存などが認められている。安全性を満たし、かつ交差防御効果のある遺伝子組換え ASFV 株の作出が目指すべき課題の 1 つとなっている。

#### 6) 病原性の復帰

HLJ/18-6GD 株 ( $\Delta$ MGF) は、副作用もなく親株に対して防御効果を示すものの、豚で連続継代されることにより、その病原性は復帰する。この問題を解決するには、病原性復帰のメカニズムの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、新たな手法や発想に基づく課題解決が求められている。

#### 7) 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 株は限られてい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幅した自然発生弱毒株 NH/P68 株を接種された豚は、ASF の慢性型の症状 (発熱、皮膚の壊死、関節の腫れ) が認められるものの異種株 Armenia07 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 株は、Arm07 株に対する防御効果を豚に享受できず、全頭 ASF を発症する。このことから、ワクチン株の作出には、宿主由来細胞の利用が有効だと考えられる。しかしながら、豚由来の初代培養細胞は、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に向いておらず、細胞採取用の動物が予期せぬ病原体に感染している可能性が否定できない。培養条件依存的に弱毒 ASFV 株の防御効果は変化すること、また安全かつ安定的にワクチンを製造するためにも、豚由来の不死化細胞株の樹立が重要な課題となっている。

#### 8) 防御免疫機構

これまでに ASFV を中和する抗体の存在を証明する報告はない。弱毒 ASFV 株によってもたら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について、インターフェロン- $\gamma$  の上昇、ASFV に特異的に反応する CD8<sup>+</sup> T 細胞の増殖活性や抗体の上昇 [14, 24, 26, 27] 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 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強く求められている。

## 8. おわりに

近年、安全性の面で生ワクチンより優れる不活化ワクチンについて、免疫抗原の調製、アジュバントおよび免疫スケジュールを徹底的に見直し、再評価が行われているが、防御効果を得られた報告はない[4, 8]。弱毒 ASFV 生ワクチンの開発を極めて複雑にさせている要因の1つとして、遺伝的背景の違いによる ASFV 株間での性状の違いがある。ワクチン株として高い汎用性を有し、安全かつ効果的な遺伝子組換え弱毒 ASFV 株を作出するためには、ASFV 株依存的ではなく、防御効果を抑制することなく、かつ安全性を最大化する宿主病原性遺伝子（群）の特定が重要な課題となっている。加えて、ワクチン開発にとって特に危惧される副作用を制御するためにもウイルス-宿主相互作用の根底にあるメカニズムを理解する必要がある。興味深いことに、宿主に防御免疫を誘導した遺伝子組換え弱毒 ASFV 株の多くは、接種豚から長期的に検出される傾向にある。しかしながら、弱毒 ASFV の宿主標的細胞または組織での持続的な感染が宿主免疫応答にどのように関与しているのか、また、その重要性について不明のままである。

我々は、本稿執筆中に、ASFV に高感受性の不死化豚腎マクロファージ (IPKM) 細胞株を見出し、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に成功した [18]。IPKM 細胞は、豚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、ASF の発症および免疫応答メカニズムの解明、ワクチンの開発などに大きく貢献する。また、有効なワクチン株が開発された場合には、生体由来の病原体が混入する心配のない安定した ASF ワクチン製剤の製造にも本細胞株は有用だと考えている。現在、我々は IPKM 細胞を基盤に ASFV の生物学的性状解析に基づく、安全かつ効果的な ASF ワクチンの開発を目指し、研究を進めている。

著者は開示すべき利益相反はない。

## 引用文献

- Abrams, C. C., Goatley, L., Fishbourne, E., Chapman, D., Cooke, L., Oura, C. A., Netherton, C. L., Takamatsu, H. H. and Dixon, L. K. 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.
- Afonso, C. L., Zsak, L., Carrillo, C., Borca, M. V. and Rock, D. L. 1998. African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence. *J. Gen. Virol.* **79** : 2543–2547.
- Alonso, C., Borca, M., Dixon, L., Revilla, Y., Rodriguez, F. and Escribano, J. M. 2018. ICTV virus taxonomy profile : Asfarviridae. *J. Gen. Virol.* **99** : 613–614.
- Blome, S., Gabriel, C. and Beer, M. 2014. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine*. **32** : 3879–3882.
- Boinas, F. S., Hutchings, G. H., Dixon, L. K. and Wilkinson, P. J. 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.
- Borca, M. V., O'Donnell, V., Holinka, L. G., Risatti, G. R., Ramirez-Medina, E., Vuono, E. A., Shi, J., Pruitt, S., Rai, A., Silva, E., Velazquez-Salinas, L. and Gladue, D. P. 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.
- Borca, M. V., Ramirez-Medina, E., Silva, E., Vuono, E., Rai, A., Pruitt, S., Holinka, L. G., Velazquez-Salinas, L., Zhu, J. and Gladue, D. P. 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.
- Cadenas-Fernández, E., Sánchez-Vizcaino, J. M., van den Born, E., Kosowska, A., van Kilsdonk, E., Fernández-Pacheco, P., Gallardo, C., Arias, M. and Barasona, J. A. 2021. High doses of inactivated African swine fever virus are safe, but do not confer protection against a virulent challenge. *Vaccines*. **9** : 242.
- Chen, W., Zhao, D., He, X., Liu, R., Wang, Z., Zhang, X., Li, F., Shan, D., Chen, H., Zhang, J., Wang, L., Wen, Z., Wang, X., Guan, Y., Liu, J. and Bu, Z. 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.
- Dixon, L. K., Chapman, D. A. G., Netherton, C. L. and Upton, C. 2013. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res.* **173** : 3–14.
- Food and Agriculture Organization ASF situation in Asia & Pacific update. [http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/ASF/situation\\_update.html](http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/ASF/situation_update.html).
- Gallardo, C., Sánchez, E. G., Pérez-Núñez, D., Nogal, M., de León, P., Carrascosa, Á. L., Nieto, R., Soler, A., Arias, M. L. and Revilla, Y. 2018. African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses. *Vaccine*. **36** : 2694–2704.
- King, K., Chapman, D., Argilagué, J. M., Fishbourne, E., Hutet, E., Cariolet, R., Hutchings, G., Oura, C. A. L., Netherton, C. L., Moffat, K., Taylor, G., Le Potier, M. F., Dixon, L. K. and Takamatsu, H. H. 2011. Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of

- African swine fever virus by experimental immunisation. *Vaccine*. **29** : 4593–4600.
14. Lacasta, A., Ballester, M., Monteagudo, P. L., Rodriguez, J. M., Salas, M. L., Accensi, F., Pina-Pedrero, S., Bensaid, A., Argilagué, J., Lopez-Soria, S., Hutet, E., Le Potier, M. F. and Rodriguez, F. 2014. Expression library immunization can confer protection against lethal challenge with African swine fever virus. *J. Virol.* **88** : 13322–13332.
  15. Lacasta, A., Monteagudo, P. L., Jiménez-Marín, Á., Accensi, F., Ballester, M., Argilagué, J., Galindo-Cardiel, I., Segalés, J., Salas, M. L., Domínguez, J., Moreno, Á., Garrido, J. J. and Rodríguez, F. 2015. Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in viral pathogenesis and immune protection. *Vet. Res.* **46** : 1–16.
  16. Leitão, A., Cartaxeiro, C., Coelho, R., Cruz, B., Parkhouse, R. M. E., Portugal, F. C., Vigário, J. D. and Martins, C. L. V. 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.
  17. Lewis, T., Zsak, L., Burrage, T. G., Lu, Z., Kutish, G. F., Neilan, J. G. and Rock, D. L. 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.
  18. Masujin, K., Kitamura, T., Kameyama, K., Okadera, K., Nishi, T., Takenouchi, T., Kitani, H. and Kokuho, T. 2021. An immortalized porcine macrophage cell line competent for the isolation of African swine fever virus. *Sci. Rep.* **11** : 4759.
  19. Monteagudo, P. L., Lacasta, A., López, E., Bosch, L., Collado, J., Pina-Pedrero, S., Correa-Fiz, F., Accensi, F., Navas, M. J., Vidal, E., Bustos, M. J., Rodríguez, J. M., Gallei, A., Nikolin, V., Salas, M. L. and Rodríguez, F. 2017. BA71 Δ CD2 : a new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities. *J. Virol.* **91** : 1–17.
  20. Moore, D. M., Zsak, L., Neilan, J. G., Lu, Z. and Rock, D. L. 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.
  21. O'Donnell, V., Holinka, L. G., Gladue, D. P., Sanford, B., Krug, P. W., Lu, X., Arzt, J., Reese, B., Carrillo, C., Risatti, G. R. and Borca, M. V. 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.
  22. O'Donnell, V., Holinka, L. G., Sanford, B., Krug, P. W., Carlson, J., Pacheco, J. M., Reese, B., Risatti, G. R., Gladue, D. P. and Borca, M. V. 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.
  23. O'Donnell, V., Holinka, L. G., Krug, P. W., Gladue, D. P., Carlson, J., Sanford, B., Alfano, M., Kramer, E., Lu, Z., Arzt, J., Reese, B., Carrillo, C., Risatti, G. R. and Borca, M. V. 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.
  24. O'Donnell, V., Risatti, G. R., Holinka, L. G., Krug, P. W., Carlson, J., Velazquez-Salinas, L., Azzinaro, P. A., Gladue, D. P. and Borca, M. V. 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.
  25. Reis, A. L., Goatley, L. C., Jabbar, T., Sanchez-Cordon, P. J., Netherton, C. L., Chapman, D. G. and Dixon, L. K. 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.* **JVI. 01428–17**.
  26. Reis, A. L., Abrams, C. C., Goatley, L. C., Netherton, C., Chapman, D. G., Sanchez-Cordon, P. and Dixon, L. K. 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.
  27. Sánchez-Cordón, P. J., Jabbar, T., Berrezaie, M., Chapman, D., Reis, A., Sastre, P., Rueda, P., Goatley, L. and Dixon, L. K. 2018. Evaluation of protection induced by immunisation of domestic pigs with deletion mutant African swine fever virus Benin Δ MGF by different doses and routes. *Vaccine*. **36** : 707–715.
  28. Sanford, B., Holinka, L. G., O'Donnell, V., Krug, P. W., Carlson, J., Alfano, M., Carrillo, C., Wu, P., Lowe, A., Risatti, G. R., Gladue, D. P. and Borca, M. V. 2016. Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. *Virus Res.* **213** : 165–171.
  29. World Organization for Animal Health World Animal Health Information Database. [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/diseasehome](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/diseasehome).
  30. Zsak, L., Lu, Z., Kutish, G. F., Neilan, J. G. and Rock, D. L. 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.
  31. 小澤義博 2014. アフリカ豚コレラの歴史とリスク分析. 獣医学雑誌. **18** : 72–76.
  32. 村上洋介訳 FAO Animal Health Manual No. 11; アフリカ豚コレラ (ASF) の防疫要領策定マニュアル. <http://yk8.sakura.ne.jp/ADC-UG/PDF/files/FAO-AHM11-ASF>
  33. 村上洋介訳 FAO Animal Health Manual No. 9; アフリカ豚コレラ (ASF) の知識: 野外応用マニュアル. <http://yk8.sakura.ne.jp/ADC-UG/PDF/files/FAO-AHM09-ASF>
  34. 舩甚賢太郎, 亀山健一郎, 山田学, 山川睦 2018. ロシア及び東欧諸国におけるアフリカ豚コレラ (ASF) の発生とその現状について. 日本豚病研究会会報. **72** : 1–7.
  35. 舩甚賢太郎, 山添麗子, 亀山健一郎, 藤澤希, 小林芳史, 岩田啓, 仙波裕信, 山田学, 遠藤明仁, 國保健浩, 柳澤成江, 山川睦 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.
  36. 農林水産省 消費・安全局 動物衛生課 アフリカ豚熱 (ASF) について. <https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/asf.html>.
  37. 農林水産省動物検疫所 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](https://www.maff.go.jp/aqs/topix/pdf/asf_pcrpositive_89_jpn.pdf).
  38. 農業・食品産業総合研究機構 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>.



# 魚類感染症の季節変化： 水温と性成熟が及ぼす魚類の免疫応答への影響

河島 奈悠

## はじめに

感染症の病態発現には、病原体の種類、感染力、組織親和性及び病原性といった病原体側の要因だけでなく、宿主側の組織別の感受性や自然免疫・獲得免疫といった抵抗力などの要因が密接に関わっており、「宿主・寄生体間の相互作用 (host-parasite relationship)」のバランスにより様々に顕在化する。毎年、世界各地の天然水域及び養殖場において、魚類に数多くの疾病発生が報告されているが [1, 2]、それらの発生が主に病原体側の要因によるものであるか、それとも宿主側の要因によるものであるかを明らかにすることは、それぞれの感染症の予防・治療戦略にとって重要な課題である。

魚類感染症の特徴として、季節性のある疾病が多いことが挙げられる。季節的な魚病の発生には、宿主、つまり魚側の免疫機能の変動が大きく関わっているといわれており、その変動要因には、表 1 に示したように外的要因、内的要因及び飼育条件による要因が挙げられる [3]。これらの中でも外的要因である水温、水質及び光周期、並びに内的要因の性成熟は、季節変化によってもたらされる。そこで本稿では、水温と性成熟の外的と内的の 2 つの環境要因に焦点を当て、これらが魚類の免疫応答に与える影響について述べる。

## 1. 水温の影響

魚類は変温動物であり、体温は生育水温に依存する。一般的に、生理的に許容される範囲であれば、高水温ほど代謝機能が増進し、それに伴い免疫誘導も迅速かつその応答性が強くなり、その逆に低水温では代謝機能が減退し、免疫誘導も遅く、その応答性は弱まるといわれている [4]。特に低水温側は、魚種ごとに免疫が働くために適した限界水温が存在する。それは臨界温度 (critical temperature) と呼ばれ、臨界温度よりも低い水温では免疫は誘導されない。臨界温度はその魚類が自然界に生息する環境に依存しており、冷水性の魚種は温水性の魚種よりも低い水温でも免疫誘導される傾向がある。例えば、温水性魚であるキンギョ (*Carassius auratus*) に 10℃、15℃、20℃及び 25℃の飼育下で牛血清アルブミン (BSA) を抗原として筋肉内投与すると、10℃飼育群では BSA 感作ヒツジ赤血球に対する凝集抗体及びアガロースゲルを用いた二元免疫拡散法 (ouchterlony 法) による沈降抗体のいずれも応答を認めなかったが、15℃飼育群では凝集抗体価の上昇がみられ、20℃及び 25℃の高水温飼育群では両者の抗体価の上昇が確認でき、さらに 15℃から 25℃になるに従って抗体応答の最大値に達する期間が短かった [5]。また、冷水性魚であるニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) にホルマリで不活化したレッドマウス病の病原菌 (*Yersinia ruckeri*) を 5℃、15℃及び 25℃の水温下で腹腔内接種すると、高水温飼育群の方が強い抗体応答が示され

表 1 魚類の免疫機能に影響をおよぼす諸要因

要因	要因例
外的要因	水温、水質、光周期、汚染物質等
内的要因	性成熟、変態、加齢、遺伝等
飼育条件による要因	ストレス (飼育密度、順位、なわばり、ハンドリング)、薬剤、餌等

引用文献 [3] より改変

たものの5℃飼育群でも抗体応答が認められた [6]。低水温によってマクロファージや樹状細胞の様な抗原提示細胞並びにBリンパ球の機能は抑制されないが、ヘルパーTリンパ球の細胞膜の流動性の変化やTリンパ球由来の成長因子の合成が抑制されることが、獲得免疫応答が弱まる原因として示唆されている [7]。このように、獲得免疫応答は魚種の生育水温に影響されることが明らかとなっている。

獲得免疫と同様に、自然免疫応答も水温により影響を受けることが報告されている。前述したニジマスの *Y. ruckeri* 不活化菌体接種試験においては、脾臓における IL-1 $\beta$ 、INF- $\gamma$  及び IL-10 といったサイトカイン遺伝子の発現が高水温でより早く、発現量が高いことが示されている [6]。

水温変化によって獲得免疫と自然免疫の制御及びバランスに変化が起きることが知られている。例えば、ベニザケ (*Oncorhynchus nerka*) では、8℃で飼育された魚の免疫応答は12℃で飼育された魚と比較して、頭腎中の貪食細胞の存在率や血中補体活性が高くなる。一方で、抗原として注射投与した細菌性腎臓病原菌 (*Renibacterium salmoninarum*) の57kDa タンパク質 (r-p57 protein) に対する抗体価は低いことから、低水温では免疫機能が獲得免疫応答よりも自然免疫応答に依存していることが明らかになっている [8]。また、冬期にテンチ (*Tinca tinca*) の血清のウサギ赤血球に対する溶血活性が高くなること [9] や、アメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) を低水温に馴致すると、頭腎中の貪食細胞の貪食率は低下するが、他の好中性顆粒球及びマクロファージ食作用増加に伴う呼吸バーストが増強されて過酸化水素や活性酸素種の産生をもたらし、殺菌能力を補うこと [10] も報告されている。

一方、罹患時の水温により症状が異なる疾病も報告されている。コイ科魚類で発生する眠り病の病原体コイ浮腫症ウイルス (carp edema virus, CEV) は、世界中でその発生が報告されており [11]、水温により異なる臨床症状を示す。20℃を超える高水温では CEV 感染により鰓弁の癒着、棍棒化及び体表の海綿状化が見られ、高い死亡率を示す。一方で、8℃から15℃程度の低水温において魚は遊泳不活発になり横臥が続くものの、高い死亡率は示さなかった

[12, 13]。CEV 感染時の症状の違いについて解明はされていないが、水温による魚体内のウイルス増殖及び免疫応答の変動が関与していることが疑われる。

以上のように、季節による水温変化が魚の免疫応答及び疾病の発症に影響を与えることが認められる。これに加えて至適生育温度範囲内であっても、急激な水温の変化や上限に近い高水温は魚にストレスを与え、魚の免疫機能を低下させる。魚類の感染症を引き起こす病原体には、魚体の免疫機能が低下したときに増殖する条件性病原体が多く、一時的なストレスによりいわゆる日和見感染を引き起こすことがあるため、水温の細かなモニタリングは魚類を扱ううえで非常に重要である。特に、野外の養殖池で飼育される魚は、屋内での養殖よりも気温・水温管理が難しく直射日光の影響も受けるにもかかわらず逃げ場がないため、大きなストレスにさらされることが多い。その他にも、いけすの交換等、魚の移動・輸送時には温度変化等のストレスが生じることがあるため、注意を要する。

養魚場において感染症予防のためにワクチンを投与する際、水温や接種に伴うストレスが魚の獲得免疫応答に影響を与えることをよく念頭に置く必要がある。例えば、ウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis, VNN) に対するワクチン「オーシャンテクト VNN」(日生研株式会社) の添付書類には使用上の注意点として、「マハタにおいては約20℃~27℃、クエにおいては約21℃~27℃の時に使用すること」と表示されている。この表示は、ワクチンの有効性を担保できる範囲を示したものであるが、低水温時に免疫応答が不十分で予定された効果が得られない可能性があることや、逆に高水温時には、温度ストレスで予期せぬ免疫応答を招く場合があることを配慮したものである。魚類の場合、ワクチンの安全な使用と十分な効果を得るために、使用上の注意点にある水温の範囲に従って接種することは重要である。

## 2. 性成熟の影響

魚類においてはその生活環中の性成熟時期も、免疫応答に影響する要因の1つであると考えられている。魚類の繁殖行動は、季節と密接な関連性を示し、

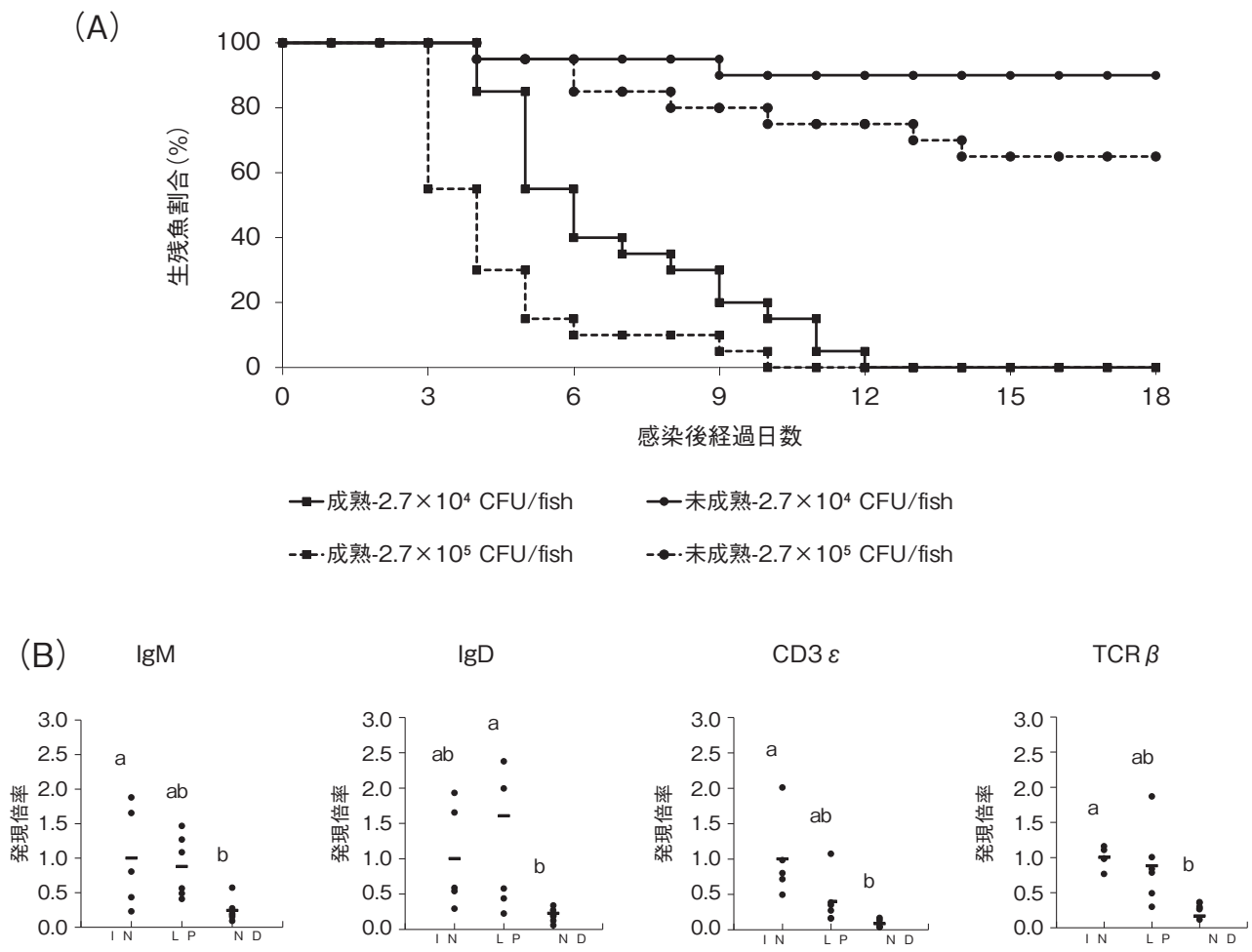


図1 アユにおける抗病性と免疫機能性に対する性成熟の影響

(A) 冷水病病原菌 (*Flavobacterium psychrophilum*) の攻撃菌数と感染試験における成熟アユと未成熟アユの生存率。(B) 成熟アユと未成熟アユの免疫関連遺伝子の発現解析。IN ( ; Initial), 試験群分け直前の未成熟魚。LP ( ; Long photoperiod), 群分け後、電照による長日条件飼育による未成熟魚。ND ( ; Natural day-length), 群分け後、自然日長条件飼育による性成熟魚。—は接種群の平均値を示す。一元配置分散分析 (one-way ANOVA) 及び平均値の多重比較 (Ryan post-hoc test) による統計解析を実施 ( $p < 0.05$ )。引用文献 [17] より抜粋・改変

稚魚にとって最も好ましい環境で過ごすことができる時期に行われる。そのため、多くの魚類は水温や光周期等の環境の物理的変化を感知し、ホルモンなどのシグナル伝達物質の分泌により、最適な時期に性成熟を開始する。例えば、アユ (*Plecoglossus altivelis*) は夏至を過ぎた短日条件になると、性成熟を開始する [14]。マツカワ (*Verasper moseri*) は冬季に低水温を経験することで、2月から3月にかけて、成熟した精子及び卵を得ること [15] が報告されている。

一般的に、魚類は性成熟期に免疫機能が低下するといわれている。シロサケ (*Oncorhynchus keta*) やサクラマス (*Oncorhynchus masou*) 等は、産卵期が近づくと体表にカビ (水生菌類) が付着しやすくなり、雌雄とも産卵後に間もなく死亡することが知られている [3]。また、アユでは性成熟に伴い白血球

の貪食率や血清の殺菌活性の低下が示されている [16]。さらに、成熟アユは未成熟アユと比較して、冷水病の病原菌 (*Flavobacterium psychrophilum*) に対する感受性が増し、死亡する個体割合が高くなる (図 1A)。その原因として、成熟アユでは免疫グロブリン IgM 及び IgD 遺伝子の発現レベル、並びに T 細胞の表面マーカーである CD3ε 及び T 細胞受容体 TCRβ 遺伝子の発現レベルが低下すること (図 1B)、及び B 細胞などのリンパ球の割合が低下することが示されており、それは魚の月齢よりも生活環境中の性成熟による影響が大きいことが明らかにされている [17]。このように、性成熟は魚の自然免疫・獲得免疫の両方に影響を及ぼし、性成熟期の疾病発生に影響すると考えられる。

以上のように性成熟と繁殖が魚の免疫応答に影響



するものとして、Mary は消費エネルギーの増大及びホルモンによる身体変化作用を挙げている [18]。例えば消費エネルギーについて、カタクチイワシ (*Engraulis encrasicolus*) やアユでは、生殖腺重量指数 (生殖腺重量(g)/魚体重(g)×100: 生殖腺の発達具合を指数で表したもの) が 20 近くになり、摂餌から得たエネルギーの約 19% が卵形成に配分されると算出されている [19]。このように生殖腺に偏ったエネルギー消費割合が魚類の特徴であり、これにより相対的に免疫系に配分されるエネルギーが減少し抗病性の低下を引き起こすとされ、養魚場で留意する点とされている。

魚類におけるホルモンと免疫機能の変化については、1951 年に Rasquin がコイ (*Cyprinus carpio*) の下垂体抽出物及び哺乳類の副腎皮質刺激ホルモンをカラシン (*Astyanax mexicanus*) に投与し、胸腺と脾臓における組織の変化及び白血球の増減を初めて報告した [20]。それ以降、ストレスや性成熟に関連する内分泌系物質と免疫系制御について多くの魚種で研究されている [21]。例えば、一定水温で飼育したニジマスでは、産卵期に血中 IgM 量の顕著な減少がみられ、真菌などに感染しやすくなる。このような現象は、副腎皮質ホルモンのコルチゾールや、性ステロイドホルモンであるエストラジオール 17β 及び 11-ケトテストステロンによる影響が強いことが報告されている [22-24]。一方で、カサゴ (*Sebastes marmoratus*) の雌では未成熟個体よりも成熟個体の方がヒツジ赤血球に対する抗体応答が低いものの、エストラジオール 17β の投与による抗体産生への影響が観察されなかったことから、性ステロイドホルモンと液性免疫の間に相関関係はないとされている。また、同試験において、雌の産卵期における液性免疫応答、胸腺重量及び胸腺リンパ球数は雄の性成熟期よりも有意に減少しており、性成熟による免疫系に、性差も影響することが示唆されている [25]。

性成熟魚の免疫機能が低下することは、種苗生産の現場において留意すべき重要な点である。健全な個体であっても、性成熟とともに抗病性が低下した場合、感染症の罹患リスクが高くなる可能性がある。加えて、以前に感染症に罹患し薬剤等で治療した場

合でも、体内で病原体の保菌が続いていると、性成熟に伴い再度発症することも考えられる。この場合、良質な種苗生産のために選抜された貴重な親魚を失うだけでなく、生まれてくる仔魚への感染のおそれもある。魚類では 1 尾の雌が産む卵の数が多いためか、垂直伝播が起こる確率は低いとされている。しかしながら、孵化した仔魚は、通常、高密度の集団で飼育されるため水平伝播が起こりやすく、大きな被害を生ずることがある。従って、採卵親魚の健康状態 (病原体保有の有無や既往歴) の把握をはじめ、飼育用水や施設の消毒を実施するなどの防疫対策は、日頃から細心の注意が払われる必要がある。

## おわりに

魚類の感染症の発症は季節変動によって多くの影響を受けるが、本稿ではその一端に触れたに過ぎない。魚の免疫機能に影響する要因は、水温ストレスと性成熟以外にも数多く報告されており、天然水域及び養殖現場では、複数の要因が一度に影響することも多々ある。近年は養殖魚種の多様化が進んでおり、各魚種についての病原体と免疫に関する研究は、さらなる発展が望まれている。幅広い魚種についてのデータを要因ごとに集積することで、疾病の予防及び疾病発生時の速やかな原因究明と対策に対応できるだろう。地道な基礎研究の積み重ねが水産業界の発展につながることを期待している。

## 引用文献

1. Assefa, A. and Abunna, F. 2018. Maintenance of fish health in aquaculture : review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Vet. Med. Int.* : 10 pages.
2. 中西照幸, 松浦雄太. 2016. 魚類疾病の現状と課題. 日獣会誌. **69** : 27-35.
3. 中西照幸. 2009. 魚類の免疫機構. pp. 1-15. 「水産用ワクチンハンドブック (中西照幸, 乙武充 編)」。恒星社厚生. 東京.
4. Elis, A. E. 1982. Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates. pp. 1-2. In : *Microbial Diseases of Fish* (R. J. Robert. Ed.),

- Academic Press, London.
5. 布田博敏, 鳥屋尾耕, 佐藤克明, 原彰彦. 1993. 牛血清アルブミンで免疫したキンギョからの免疫グロブリンの精製. *水産増殖*. **41** : 195-202.
  6. Raida, M. K., Buchmann, K. 2007. Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout following *Yersinia ruckeri* vaccination. *Dis Aquat Organ*. **77** : 41-52.
  7. Yada, T. and Nakanishi, T. 2002. Interaction between endocrine and immune systems in fish. pp. 35-92. In : International Review of Cytology—A Survey of Cell Biology, vol. 220, Academic Press, San Diego.
  8. Alcorn, S. W., Murray, A. L. and Pascho, R. J. 2002. Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish Shellfish Immunol*. **12** : 303-334.
  9. Collazos, M. E., Barriga, C. and Ortega, E. 1994. Optimum conditions for the activation of the alternative complement pathway of a cyprinid fish (*Tinca tinca* L.). Seasonal variations in the titres. *Fish shellfish Immunol*. **4** : 499-506.
  10. Dexiang, C. and Ainsworth, A. J. 1991. Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). II. Adaptation of anterior kidney phagocytes to 10°C. *Comp Biochem Physiol*. **100A** : 913-918.
  11. Divya, P., Vertika, B., Kirty, S., Jyotirmaya, M. and Pramoda Kumar, S. 2009. A review of current understanding on carp edema virus (CEV) : A threatful entity in disguise. *Int J Fish Aquat Stud*. **7** : 87-93.
  12. Radosavljevic, V., Adamek, M., Milicevic, V., Maksimovic-Zoric, J. and Steinhagen, D. 2018. Occurrence of two novel viral pathogens (CEV and CyHV-2) affecting Serbian cyprinid aquaculture and ichthyofauna. *J Fish Dis* **41** : 851-854.
  13. 瀬野龍一郎. 2003. ウイルス性コイ浮腫症の病理学. 東京海洋大学研究報告. **17**.
  14. 白石芳一, 武田達也. 1961. アユの成熟に及ぼす光周期の影響. 淡水区水産研究所研究報告. **11** : 69-81.
  15. 萱場隆昭, 杉本卓, 佐藤敦一, 尾崎雄一, 足立伸次, 高丸禮好, 山内皓平. 2000. 水温操作によるマツカワ雌雄の性成熟の同調. 北水試研報. **58** : 9-16.
  16. Minami, S., Suzuki, K., Watanabe, S., Sano, M. and Kato, G. 2018. Maturation-associated changes in the non-specific immune response against *Flavobacterium psychrophilum* in Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish shellfish Immunol*. **76** : 167-173.
  17. Kawashima, N., Minami, S., Suzuki, K., Watanabe, S., Sano, M. and Kato, G. 2021. Changes in resistance against bacterial cold-water disease and in leukocyte composition along with sexual maturation in Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol*. **55** : 132-141.
  18. Mary, F. T. 1997. Natural changes in the immune system of fish. pp. 255-282. In : The Fish Immune system : Organism, Pathogen, and Environment (Iwama, G and Nakanishi, T. eds.), Academic Press, New York.
  19. Politikos, D. V. Triantafyllou, G., Petihakis, G., Tsiaras, K., Somarakis, S., Ito, S. and Megrey, B. A. 2001. Application of a bioenergetics growth model for European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) linked with a lower trophic level ecosystem model. *Hydrobiologia* **670** : 141-163.
  20. Rasquin, P. 1951. Effects of carp pituitary and mammalian ACTH on the endocrine and lymphoid systems of the teleost *Astyanax mexicanus*. *J Exp Zool*. **117** : 317-348.
  21. 矢田崇. 2001. 魚類における免疫-内分泌研究の展開/GHとPRLを中心として. 日本比較内分泌学会ニュース. **103** : 27-31.
  22. Suzuki, Y., Otaka, T., Sato, S., Hou, Y. Y. and Aida, K. 1997. Reproduction related immunoglobulin changes in rainbow trout. *Fish Physiol. Biochem*. **17** : 415-421.
  23. Hou, Y. Y., Suzuki, Y., and Aida, K. 1999. Effects of steroid hormones on immunoglobulin M (IgM) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem*. **20** : 155-162.
  24. Hou, Y. Y., Suzuki, Y., and Aida, K. 1999. Changes in immunoglobulin producing cells in response to gonadal maturation in rainbow trout. *Ficheries Sci*. **65** : 844-849.
  25. Hou, Y. Y., Suzuki, Y., and Aida, K. 1999. Effects of steroids on the antibody producing activity of lymphocytes in rainbow trout. *Ficheries Sci*. **65** : 850-855. (研究員)

## 学会発表演題 (2020年4月～2021年3月)

## ▶ 第163回日本獣医学会学術集会

期 日：2020年9月14日～2020年9月30日

開催地：Web開催

発表演題：近年の国内で分離した豚丹毒菌の血清型、SpaA遺伝子型および病原性に関する解析

○森元美紗子<sup>1</sup>、加藤篤<sup>1,2</sup>、児島広枝<sup>1</sup>、赤池佑太<sup>1</sup>、野上琴絵<sup>1</sup>、笹川千尋<sup>1</sup>、長井伸也<sup>1</sup>、  
TOHO<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>日生研、<sup>2</sup>バイオメディカルサイエンス研究会)

発表演題：莢膜抗原およびO抗原生合成遺伝子座へのISApl1挿入は豚莢膜肺炎菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) の血清型別不能の一因となる

TOHO<sup>1</sup>、手島香保<sup>1</sup>、○昆道葉<sup>1</sup>、安田早織<sup>1</sup>、赤池佑太<sup>1</sup>、児島広枝<sup>1</sup>、佐藤哲朗<sup>1</sup>、小池郁子<sup>2</sup>、  
渋谷一元<sup>1</sup>、長井伸也<sup>1</sup>、笹川千尋<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>日生研、<sup>2</sup>エス・エム・シー株式会社)

発表演題：獣医病理学会研修会出題標本No. 1254. ニワトリの腸管 (一般財団法人日本生物科学研究所)

○小野浩輝、張国宏、古澤貴章、渋谷一元 (日生研)



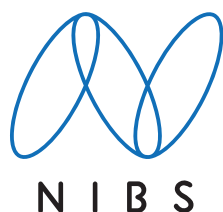
## おしらせ

## 笹川千尋所長 “瑞宝中綬章” 受章

令和3年春の叙勲におきまして、弊所の笹川千尋所長（東京大学名誉教授）が教育研究功勞により瑞宝中綬章を受章いたしました。謹んでご報告申し上げます。

## 研修者・見学者受け入れ状況（2020年4月から2021年3月）

来所日・期間		所属機関・人数		研修・見学内容
2020年	9月14日～9月18日	伊藤忠飼料株式会社研究所 職員	2名	技術習得
	10月12日	東京大学大学院農学生命科学研究科 学生	2名	施設見学
	12月3日	日野市立日野第二中学校 生徒	1名	企業インタビュー



## —— テーマは「生命の連鎖」 ——

生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士による揮毫です。

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(年4回発行)  
 (通巻620号) 令和3年6月25日印刷 令和3年7月1日発行(第67巻第3号)  
 発行所 一般財団法人日本生物科学研究所  
 〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1  
 TEL: 0428(33)1520(経営企画部) FAX: 0428(31)6166  
 URL: <http://nibs.lin.gr.jp/>  
 発行人 土屋耕太郎

編集室 委員/古澤貴章(委員長)、古賀早織、高橋真理  
 事務/経営企画部  
 印刷所 株式会社 精興社  
 (無断転載を禁ず)