

令和 5 年 4 月 20 日

令和 4 年度 共同研究報告書

研究代表者： 深井 克彦

1. 研究課題名	日本語表記：口蹄疫ウイルス感受性細胞の樹立 英語表記：Establishment of susceptible cell line to foot-and-mouth disease virus			
2. 研究期間	令和 4 年 4 月 1 日 ~ 令和 5 年 3 月 31 日			
3. 共同研究者	氏 名	機 関 ・ 所 属 部 署 名		職 名
	深井 克彦	農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門		海外病グループ長
4. 研究目的	<p>口蹄疫ウイルスが牛に感染し、最初に感染・増殖する部位は軟口蓋や咽頭等の呼吸器系組織である。しかし一般に、口蹄疫ウイルスの分離に用いられている株化細胞は腎臓や舌等、呼吸器系以外の組織である。そのため、呼吸器系組織由来の株化細胞が樹立され、口蹄疫ウイルスへの感受性が確認できれば、その細胞は新たな診断および解析ツールとなる可能性が高い。そこで本課題では、宮崎大学の産業動物防疫リサーチセンターおよび農学部獣医微生物学研究室にて樹立された牛の呼吸器系上皮細胞を用いて、その細胞の口蹄疫ウイルスに対する感受性を検証する。また、呼吸器系上皮細胞を不活化して株化細胞にすることにより、より安定した研究ツールとしての応用を目指す。</p>			
5. 研究内容・成果	<p>牛気道上皮初代培養細胞における口蹄疫ウイルス感染性の確認 Putu らが樹立した黒毛和牛の気道器官(喉頭、気道、肺)の上皮細胞(Putu ES et al., 2019. 岡林責任著者)に、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との試料提供契約に基づく口蹄疫ウイルスを用いた感染実験を行った。その際には、口蹄疫ウイルスは血清型 0 (India 2001e) 0/TAI/315/2016, TCID₅₀ 10⁸相当を使用した。感染 24 時間に顕微鏡下で観察し、CPE の誘導性、間接蛍光抗体法によるウイルス抗原の確認、PCR によるウイルス遺伝子の検出を行った。その結果、喉頭、気道上皮細胞に口蹄疫ウイルスが感染することを確認したが、肺由来細胞には口蹄疫ウイルスは感染しなかった(図 1)。口蹄疫ウイルスの受容体として知られている細胞表面分子インテグリン分子 $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 6$ の mRNA を測定したところ、口蹄疫ウイルスが感染した喉頭および気道由来細胞には受容体 mRNA が確認できたが、肺由来細胞では確認できなかった。喉頭由来細胞、気道由来細胞の上清中に放出されたウイルス力価を、LFBK 細胞、ZZ-</p> <div style="text-align: right;"> <p>図1 口蹄疫ウイルスが感染した牛呼吸器上皮細胞</p> </div> <div style="text-align: right;"> <p>図2 牛呼吸器上皮細胞における口蹄疫ウイルスの増殖性</p> </div>			

R127 細胞、喉頭由来細胞、気道由来細胞を用いて測定した。これらの細胞における高いウイルス増殖性を確認した（図 2）。

牛の気道由来上皮細胞において、口蹄疫ウイルスの受容体依存的に口蹄疫ウイルスが感染することが確認できた。これらの牛気道由来上皮細胞における口蹄疫ウイルスは一般的に口蹄疫ウイルス増殖に用いられる LFBK 細胞に匹敵する増殖性を見せた。これらの結果より、本研究にて使用した牛気道由来上皮細胞が、口蹄疫ウイルスの気道からの侵入機序解明のための有用なツールとなることが示唆された。

（参考となる資料を添付してください。）

※ 必要に応じて、枠を広げて記載してください。

6. 成果となる論文・学会発表等

（※参考となる資料を添付してください。）

研究会発表

Establishment of bovine respiratory epithelial cells (bREC) model for Foot and Mouths Disease Virus. Amonrat Choornasard, Katsuhiko Fukai, Tamaki Okabayashi.

4th Scientific Meeting and workshop on foot-and-mouth disease between Regional Reference Laboratory for Foot-and-Mouth disease in Southeast Asia and Kodaira Research Station, National Institute of Animal Health, NARO

(2023 年 2 月 6 日 東京)

7. 産業動物防疫リサーチセンターへ訪問した回数

氏名	職名等	国籍	訪問回数・合計日数	訪問時期
深井 克彦	海外病グループ長	日本	2回・5日	7月・3月

8. 利用した設備・施設等 ※必要に応じ様式の追加・削除可。

施設

室名	動物種	飼育数	期間
BSL 3 施設			
獣医棟 P 2 動物実験室			
教育棟 P 2 動物実験室			

設備・機器類

(I) 獣医棟 3 階

部屋名	機器名	使用した延日数	
P 2 実験室	V301	フローサイトメーター (ライテクノロジーズジャパン)	
		マイクロプレートリーダー (BioRad)	
		マイクロプレート洗浄装置 (Thermo WellWash)	
		NanoDrop 分光光度計 (Thermo ND-1000)	
		冷却遠心機 (KUBOTA 7780)	
		冷却遠心機 (Thermo)	
		卓上型冷却遠心機 (HITACHI)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		ハイブリオープン (タイテック)	
		オートクレーブ (平山製作所 HG-50)	
		自動核酸抽出装置 (magLead 12gC)	
	V304	ヒートブロック (アステック)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		卓上遠心機 (HITACHI)	
		MALDI Biotyper (BRUKER)	
	V308	アイソレーター (マウス/ラット用) (Tokiwa T-BCC-Micro-M25)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		オートクレーブ (トミー精工、LSX-700)	
	V310	アイソレーター (マウス/ラット用) (Tokiwa T-BCC-Micro-M25)	
		オートクレーブ (HIRAYAMA HV-110)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
	V313	安全キャビネット (AIRTEC)	
	V314	デジタルカメラ付蛍光顕微鏡 (OLYMPUS DP74-SET-A)	3
		CO ₂ インキュベーター (ASTEC SCI-165D/APC)	3
		倒立位相差顕微鏡 (OLYMPUS CKX41)	3
		安全キャビネット (AIRTEC)	3
		オートクレーブ (平山製作所 HG-50)	3
卓上遠心機 (KUBOTA 5520)		3	
V319	卓上冷却遠心機 (eppendorf 5415R)		
	CO ₂ インキュベーター (Thermo F370)		
	安全キャビネット (AIRTEC)		
	倒立蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000)		

遺伝子 実験室	V323	位相差顕微鏡 (OLYMPUS CK2)	
		超遠心機 (HITACHI CP80WX)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		スイングローター付遠心機 (HIRASAWA TE-HER)	
		インキュベーター (SANYO MIR-153)	
		卓上冷却遠心機 (Eppendorf 5415R)	
		紫外・可視分光光度計 (GE Healthcare GeneQuant100)	
	ヒートブロック (アステック)		
	V303	ゲル・メンブラン撮影装置 (BioRad)	
		PCR 装置 (BioRad, Applied Biosystems)	
		多標識測定用プレートリーダー (ワラック社)	
		リアルタイム濁度測定装置 (テラメックス LoopampEXIA)	
		リアルタイム PCR 装置 (ABI, Quant Studio 3)	
		デジタル PCR (日本バイオラッド)	
V306	卓上遠心機 (HITACHI CT6E)		
	卓上冷却遠心機 (HITACHI CT15RE)		
V307	細菌検査用ホモジナイザー (オルガノ EXNIZER400)		
	シーケンサー (ABI3130, SeqStudio)		
試薬 調製室	V305	pH メーター (HORIBA)	
		デシケーター (ASONE)	
病理標本 作製室	V316	パラフィン包埋ブロック作製装置 (SAKURA)	
		手動回転式マイクロトーム (Leica MR2235)	
		密閉式自動固定包埋装置 (SAKURA)	
		卓上型ドラフト (明光メディカル)	
洗浄室	V318	超純水製造装置 (Milli-Q Advantage)	
		オートクレーブ (TOMY SX-500)	
		全自動洗浄機 (Miele PG858)	
滅菌室	V322	オートクレーブ (TOMY、平山製作所)	
		高純水製造装置 (Merck)	
		全自動血球計数器 (日本光電工業)	
微生物 保存室	V324	液体窒素保存容器 (太陽日酸株, アステック)	
		超低温槽 (Thermo REVCO TSX400G)	

(II) 獣医寄生虫病学研究

部屋名	機器名	使用した延日数
獣医寄生虫病学研究室	H212 核酸抽出自動化装置 (QIAcubr)	

(III) 産業動物教育研究センター

部屋名	機器名	使用した延日数
大中動物検査実験室	大中動物検査実験室	
	全身麻酔装置	
	埋込式回転診療台	
中動物陽圧実験室	手術台、无影灯 (2機)、麻酔装置、生体情報モニター、X線投下装置 (Cアーム)	

	一式	
MRI 室	3T MRI、MRI 用生体情報モニター、MRI 用麻酔装置一式	
	MRI オペレーター	
P2 検査実験室	アイソレーター	
	安全キャビネット	
	オートクレーブ	
器具・薬品庫	ウサギ飼育用ケージ	
滅菌リネン庫	高圧蒸気滅菌装置	
	カートリッジ式酸化エチレンガス滅菌器	
動物飼育	動物飼育費	
	飼育管理員	

その他の装置・データ等

分類	名称	使用した延日数
データベース		
バイオリソース		
データ・文献		
装置		