【様式３】

令和６年　４月　29 日

令和５年度　共同研究報告書

研究代表者：氏家誠

１.研究課題名	日本語表記：感染性牛下痢症制御に向けた腸管指向性牛トロウイルスベクターの開発 英語表記：Development of enterotropic bovine torovirus vector for control of infectious bovine diarrhea.		
２.研究期間	令和 5年 4月 1日 ～ 令和 6年 3月 31日		
３.共同研究者	氏　　名	機関・所属部署名	職　名
	鈴木亨	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	上級研究員

４．研究目的

牛の下痢症は、ウイルス・細菌・寄生虫などの感染性要因によるものが多く、その経済損失は甚大である。しかしながら、現行の不活化ワクチンの効果は限定的であり、特に腸管に抗原を輸送し腸管免疫を活性化することが困難である。牛コロナウイルス(BCoV)及び牛トロウイルス(BToV)は下痢原生ウイルスで、特に BCoV は牛の感染性下痢症の 3 大要因の１つとなっている。一方、BToV は国内外に蔓延しほとんどの個体が感染歴を持つが、その病原性は極めて低い。そこで本研究では、BToV のリバースジェネティクス法を用いて、病原性の極めて低い BToV を骨格とした**「腸管指向性弱毒ウイルスベクター」**の開発を行う。この基盤的研究として、当該年度は BCoV の抗原を組み込んだ組換え BToV を作製し、その培養細胞における特性評価を行う。最終的には、作製した組換え BToV を牛に接種し、腸管での増殖能や外来抗原の発現量、抗体誘導能を測定し、ワクチン評価を行う。

５．研究内容・成果

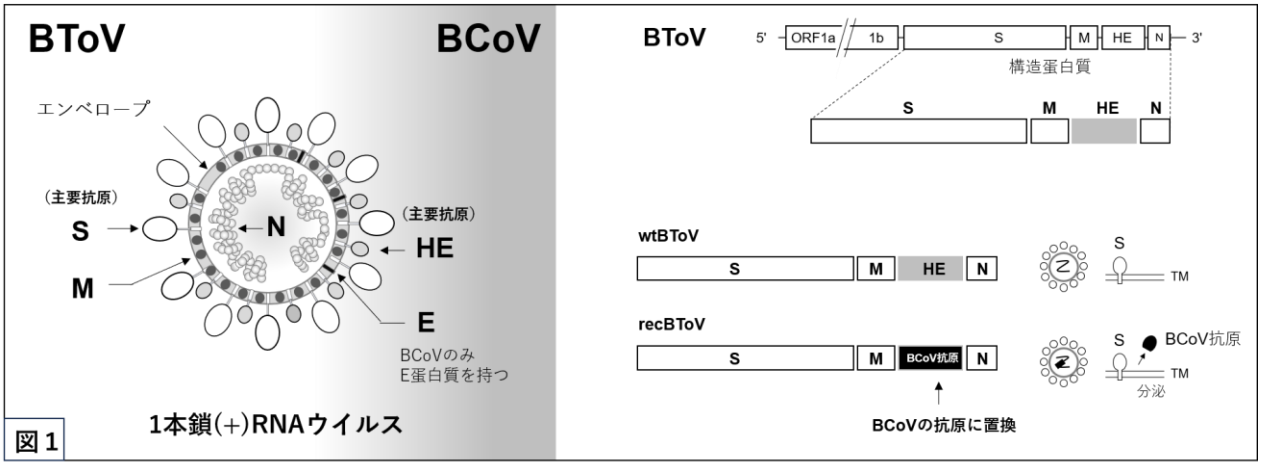

図１

牛トロウイルス（BToV）及び牛コロナウイルス（BCoV）はエンベロープ膜をもつ一本鎖(+)鎖 RNA ウイルスで、粒子構造およびゲノム構造がよく似ている（図１）。このうち BToV の HE 遺伝子は培養細胞での増殖に必須ではないため、この領域に外来遺伝子を導入することが可能である。本研究では、BToV の HE 遺伝子を BCoV の主要抗原に置換し、感染するとこれらの抗原を分泌する組

換えBToVの作製とその特性評価を行った（図1）。

BToVのHE遺伝子をBCoVのS1(S蛋白質のS1サブユニットで抗原決定基を多数含む)、S^{NTD}(S1サブユニット内のN末端領域で抗原決定基を含む)、HE遺伝子、M遺伝子に置換した組換えBToVを作製した。このうち、S1、HE、M遺伝子に置換した組換えBToVは回収することが出来なかった。一方、S^{NTD}に置換した組換えBToV（BToV-1aおよび1b)は回収可能であった。細胞増殖能や外来抗原発現能を測定した所、野生株と同等の増殖能を持ち、外来抗原(BCoV-S^{NTD})の発現も確認できた(図2)。今後は、本研究で作製したこの組換えBToVを用いて牛の感染実験を行い、腸管での増殖能や外来抗原の発現量、抗体誘導能を測定し、ワクチン評価を行う予定である。

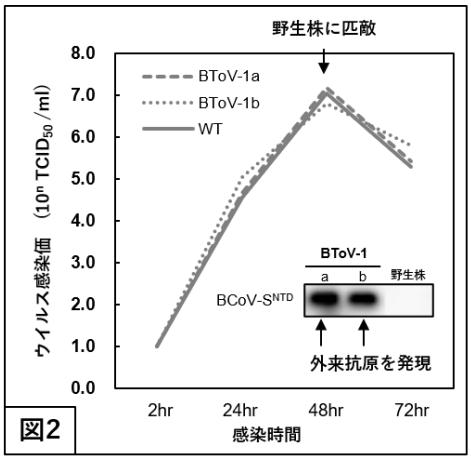

図2

※ 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

Ujike M, Suzuki T.(2024) Progress of research on coronaviruses and toroviruses in large domestic animals using reverse genetics systems. Vet J. 2024 Apr 17;305:106122.

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
(例)	氏家誠	准教授	日本	1回・3日	令和6年2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
BSL３施設			
獣医棟 Ｐ２動物実験室			
教育棟 Ｐ２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
Ｐ２ 実験室	V301	フローサイトメーター（ﾗｲﾌﾃｸﾉﾛｼﾞｰｽﾞｼﾞｬﾊﾟﾝ）	
		マイクロプレートリーダー(BioRad, Thermo)	
		マイクロプレート洗浄装置（Thermo WellWash）	
		NanoDrop 分光光度計(Thermo ND-1000)	2
		冷却遠心機(KUBOTA 7780)	2
		冷却遠心機(Thermo)	
		卓上型冷却遠心機（HITACHI）	
		安全キャビネット(AIRTEC)	
		ハイブリオーブン(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)	2
	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	蛍光顕微鏡（ライフテクノロジーズジャパン. EVOS）	
		CO_2インキュベーター（ASTEC SCI-165D/APC）	
		倒立位相差顕微鏡(OLYMPUS CKX41)	
		安全キャビネット(AIRTEC)	
		オートクレーブ(平山製作所 HG-50)	
		卓上遠心機(KUBOTA 5520)	
		卓上冷却遠心機(eppendorf 5415R)	
	V319	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)	

			位相差顕微鏡(OLYMPUS CK2)	
			超遠心機(HITACHI CP80WX)	
		V323	安全キャビネット(AIRTEC)	
			多本架冷却遠心機(KUBOTA AX-311)	
			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)	
	遺伝子実験室	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, 5)	
			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)	
			シークエンサー (SeqStudio, Spectrum Compact)	2
	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)	
			手動回転式ミクロトーム(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㈱,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、無影灯 (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		