

令和8年4月30日

令和7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：AG129マウスを用いた牛トロウイルス感染小動物モデルの開発 英語表記：Development of a small animal model of bovine torovirus infection using AG129 mice.		
2. 研究期間	令和7年4月1日～令和8年3月31日		
3. 共同研究者	氏名	機関・所属部署名	職名
	目堅博久	宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンター	准教授
4. 研究目的			
<p>牛の感染性下痢は、幼弱な個体では重症化や死に至り、成獣においても乳量減少や発育不良を引き起こすため経済損失が甚大となる。代表者はこの対策のため、牛トロウイルス（BToV）を利用したワクチンベクターの開発を行ってきた。BToVはトバニウイルス科トロウイルス属に属す腸管指向性の下痢原性ウイルスであるが、その病原性が極めて低いという特徴を持つ。このため、低病原性のBToVに高病原性の下痢原性病原体（例えば牛コロナウイルス[BCoV]など）の抗原遺伝子を組み込むことで、様々な感染性下痢に対する「腸管指向性弱毒生ワクチンベクター」として応用が可能となる。</p> <p>代表者は既にBCoV抗原を組み込んだ組換えBToVワクチンを作製し培養細胞での特性評価を行い増殖性・抗原発現量などにおいて良好な結果を得ている。一方、作製した組換えワクチンの更なる評価には生体を用いた感染実験が必須であるが、大型動物である牛を用いた感染実験は、実験可能な施設が限られるうえに多額の費用を伴うなど、大きな困難を伴う。実際、代表者はBToV野外株を用いた牛への感染予備実験を行うだけで莫大な労力と費用を要している。このため、より簡便で安価なワクチン評価を行うためBToV感染小動物モデルの確立が必要である。</p> <p>代表者らは、正常マウスにBToV野外株を接種し感染モデルの確立を試みたが、成功には至らなかった。そこで本研究では、様々なウイルスに対して感受性が向上したAG129マウスを使用し、BToV感染小動物モデルの確立を試みる。</p> <p>AG129マウスはインターフェロン$\alpha/\beta/\gamma$受容体をノックアウトしたマウスである。各種ウイルス（例えば日本脳炎ウイルスやデング熱ウイルス、黄熱ウイルス、ジカ熱ウイルス、エンテロウイルス、SFTSウイルス）は、正常マウスに接種しても、感染が成立しにくく症状も示さない。しかし、AG129マウスに接種すると、ウイルスが効率よく増殖して病原性を示すようになる。代表者らは、AG129マウスが正常マウスと比較して、よりBToVに感染しやすい可能性が高いと考え、AG129マウスを使ったBToV感染小動物モデルの確立を試みる。トロウイルスは、主に牛・豚・馬トロウイルスが知られており、いずれも宿主が大型動物である事から感染実験が困難である。従って、BToV感染小動物モデルの確立は、今後のトロウイルスの病態解析やワクチン開発において極めて有用な感染モデルとなることが期待される。</p>			

5. 研究内容・成果

試験1 (感染実験)

BToV-Aichi 株を 1.2×10^6 TCID₅₀/ml に調整し、マウス(1群6頭)の腹腔および胃内に 200 μ l ずつ投与した。経時的に体重を測定し、糞便の採取および、感染5日と10日目に採血した。また、感染21日目に全採血し、各種臓器(心臓、脾臓、肝臓、肺、腸、胃)を採取した。これら血液および臓器から RNA を抽出し、感染の有無を qRT-PCR 法で確認した。また、血液から血清を分離し、中和試験で抗 BToV 抗体の有無を調べた。感染3日目に腹腔投与群は0日目と比較して96.9%、胃内投与群は97.9%に体重が減少した。しかし、BToV 遺伝子および抗 BToV 抗体は検出されなかった。

試験2 (馴化株の作成)

試験1で採取した臓器から乳剤を作成し、AG129 マウス(1群3頭)の腹腔および胃内に投与した。感染5日と10日目に採血し、感染21日目に全採血し、各種臓器(心臓、脾臓、肝臓、肺、腸、胃)を採取した。しかし全ての材料から BToV 遺伝子および抗 BToV 抗体は検出されなかった。

上記の結果から、BToV 感染小動物モデルの確立は想定以上に困難であり、BToV が高い宿主特異性を有することが明らかとなった。近年、小動物であるヤマネ(Dormouse)からトロウイルス様の全長ゲノム配列(DToV)が同定されており、これはトロウイルスとして初めて小動物を宿主とする例である。今後は、BToV の S 遺伝子を DToV 由来 S 遺伝子に置換した BToV-DToV キメラ組換えウイルスを作製し、小動物における感染性の評価を行うことで、BToV 感染小動物モデルの確立を引き続き目指したい。(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。)

該当無し

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
氏家 誠	准教授	日本	1回・4日(合計4日)	令和7年9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
ABSL 3 施設	マウス	18 頭	2025 年 7 月 28 日 ～ 2025 年 10 月 10 日
ABSL 2 施設			
ABSL 2 施設 (鳥類)			

設備・機器類

(I) 獣医棟 5 階、フロンティア科学総合センター2・4 階

機器名	使用した延日数
MALDI Biotyper (BRUKER)	
フローサイトメーター (ライフテクノロジーズジャパン)	
デジタル PCR (日本バイオラッド)	
キャピラリーシークエンサー (SeqStudio, Spectrum Compact)	
ナノポアシークエンサー (GridION)	
リアルタイム PCR 装置(Quant Studio 3,5)	4 日
ポータブルリアルタイム PCR 装置 (PicoGene)	
リアルタイム濁度測定装置(テラメックス LoopampEXIA)	
ゲル・メンブラン撮影装置 (ChemiDog touch)	
PCR 装置 (BioRad, Applied Biosystems)	
自動核酸抽出装置 (magLead 12gC)	4 日
NanoDrop 分光光度計(Thermo ND-1000)	
マルチプレートリーダー(ThermoFisher Varioscanner)	
マイクロプレート洗浄装置 (Thermo WellWash)	
細菌検査用ホモジナイザー(オルガノ EXNIZER400)	
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 等)	
オートクレーブ(トミー精工 LSX-500, 平山製作所 HG-50)	
蛍光顕微鏡 (EVOS M7000, KEYENCE BZ-9000)	
倒立位相差顕微鏡 (OLYMPUS CKX41)	
位相差顕微鏡 (OLYMPUS CK2)	
超遠心機 (HITACHI CP80WX)	
冷却遠心機 (KUBOTA, Thermo)	
卓上遠心機 (HITACHI, KUBOTA, eppendorf)	
インキュベーター (SANYO MIR-153, LTE-510)	
CO ₂ インキュベーター (ASTECS CI-165D/APC, ThermoF370)	
超純水製造装置 (Milli-Q Advantage)	

(II) 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（鳥類用）	
	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		