

牛受精卵移植技術を利用した牛白血病ウイルス伝播防止に関する研究

鹿島悠幹¹⁾・本谷綾香²⁾・根本聡実・足立憲隆・白谷浩之

1) 現：茨城県県北家畜保健衛生所, 2) 現：茨城県県西食肉衛生検査所

Study on the propagative prevention of bovine leukemia virus using the cattle embryo transfer technology

Yuki KASHIMA・Ayaka MOTOYA・Satomi NEMOTO・Noritaka ADACHI・Hiroyuki SHIRATANI

要 約

牛白血病ウイルス (BLV) 感染牛の受精卵, 子宮灌流液等の BLV 遺伝子量の調査および垂直感染防除実験によって受精卵移植における BLV 感染リスクを明らかにし総合的な清浄化対策を検討した。

BLV 遺伝子検査陽性牛の子宮灌流液を段階希釈し rPCR の検出限界を調査したところ, 100 倍以上の希釈では BLV 遺伝子は検出されなかった。BLV 感染牛の鼻汁から BLV 遺伝子が検出された。BLV 感染牛由来の受精卵から BLV 遺伝子は検出されなかった。乳汁からは, 検査した全ての BLV 感染牛から BLV 遺伝子が検出された。BLV 感染牛で使用した器具の調査では, 頸管拡張棒, 直検手袋から BLV 遺伝子が検出された。粘液除去棒, バルーンカテーテル, ウォーターカップから BLV 遺伝子は検出されなかった。

垂直感染防除実験では, 分娩のあった 2 頭の BLV 感染牛で, 親子を隔離飼育し, 代用乳で哺育したところ産子から BLV 遺伝子は検出されなかった。

キーワード：牛白血病, 受精卵, 子宮灌流液, 受精卵移植

緒 言

牛白血病は我が国の牛の監視伝染病のうち発生数が最も多い疾病であり, 農林水産省の家畜衛生統計によれば, 平成 23 および 24 年は, それぞれ 1,765 件, および 2,090 件の牛白血病牛が摘発されている¹⁾。

牛白血病のうち牛白血病ウイルス (BLV) により引き起こされる地方病性白血病 (EBL) は, 血液を介して伝播することがわかっている。BLV の伝播は主に水平伝播により感染拡大する。この伝播の役割を持つのが吸血昆虫, 特にアブによる伝播が挙げられる²⁾。

しかし, 近年, BLV 感染乳牛への黒毛和種の受精卵移植時に, BLV に感染し子牛が生産される可能性が指摘され, 垂直感染についても無視することができない。受精卵移植は, 既に BLV に感染している優良血統の黒毛和種の子牛を非感染牛として生産できる利点があり, この技術を活用した BLV 清浄化方法の確立が求められている。

茨城県内においても, BLV の感染拡大が進んでいると考えられる。当研究室では, 農家所有の高能力和牛からの受精卵採取を実施しており, これらの農家には, BLV 清浄化を積極的に取り組んでいる農家が多い。そこで, 受精卵移植による優良子牛の増産と BL

V 清浄化の確立が求められている。

本研究では, BLV 感染牛の鼻汁, 唾液, 糞便, 乳汁や採卵時の器具等, および受精卵と子宮灌流液の BLV 遺伝子量の調査を実施した。また, 垂直感染防除実験によって, 受精卵移植技術における BLV 感染リスクを明らかにし総合的な清浄化対策を検討した。

材料および方法

遺伝子抽出は, 検体ごとに後述の方法で実施し, 抽出された遺伝子は, 直接試験に用いるか, 濃度を TE (pH8.0) 遺伝子工学研究用 (和光純薬) を用いて 20ng/ μ l に調整し, 試験に使用した。

調整後の遺伝子の BLV 遺伝子量を BLV のプロウイルスをターゲットとして, リアルタイム PCR 検査 (rPCR) により測定した。試薬には, ウシ白血病ウイルス検出用 Probe/Primer/Positive control CY415 (タカラバイオ株式会社) および Cycleave PCR Reaction Mix SP CY510 (タカラバイオ株式会社) を用いて, 定法により実施した。

1 飼養牛の感染状態の把握

当センター飼養の黒毛和種全頭で, 牛白血病 ELISA キット (JNC 株式会社) を用いて定法により, B

BLV抗体の保有状況を調査した。さらに、BLV抗体保有の感染牛のELISA値とrPCRによるBLV遺伝子量を比較した。

検査後、BLV感染牛群は、非感染牛群から3m30cm以上離れた状態で飼育した。

分離飼育から2年半後に再度ELISAを実施し、感染拡大の有無を調査した。

2 体液からの排出状況の把握

rPCRでBLV遺伝子が検出されたBLV感染牛の鼻汁、唾液、糞便を採取し、NucleoSpin Forensic Filters (MACHEREY-NAGEL)を用いて遺伝子を抽出し、rPCRによりBLV遺伝子量を測定し、ウイルスの排出状況を調べた。

また、BLVに感染している当センター飼養の黒毛和種3頭、および農家で飼養されているホルスタイン種3頭の採卵時に採取した子宮灌流液を希釈し、rPCRにより検出限界となる希釈濃度を調査した。

さらに、受精卵についてもNucleoSpin Tissue XSを用いて遺伝子を抽出し、rPCR法によりBLV遺伝子量を測定した。

乳汁については、分娩後0日~3日、7日および1か月後に搾乳を行い、Milk 遺伝子 Preservation and Isolation Kit (Norgen Biotec)により遺伝子を抽出した後、rPCRを用いてBLV遺伝子量を測定した。

3 器具等の汚染状況の把握

感染牛に使用した頸管拡張棒、粘液除去棒、ブルーシールド、直検手袋、および感染牛が使用していたウォーターカップで拭き取りを行い、その検体からNucleoSpin Tissue XSを用いて遺伝子を抽出し、rPCRを用いてBLV遺伝子量を測定した。

4 垂直感染防除実験

垂直感染防除試験として、BLV感染牛の分娩後、すみやかに親子を分離し、代用乳による哺乳で飼育した。その後、定期的の子牛のrPCRを行い、垂直感染の有無を調査した。

結 果

1 牛の感染状態の把握

ELISAでは、5頭が陽性となった。ELISA陽性牛5頭のrPCRを実施したところ、4頭からBLV遺伝子を検出したが、1頭からは検出されなかった(表1)。

分離飼育から2年半で、新たなBLV感染牛は、認められなかった。

表1 ELISA値とrPCRの結果の比較

牛	ELISA値	BLV遺伝子量 (copies/ μ l)
黒A	3.293	2.359
黒B	3.549	1160.9
黒C	2.601	18.485
黒D	3.028	3.9703
黒E	3.689	—

2 体液からの排出状況の把握

4頭のBLV感染牛の糞便および唾液からは、BLV遺伝子は検出されなかった。1頭の鼻汁からBLV遺伝子が検出された。また、黒Aの受精卵からBLV遺伝子は検出されなかった(表2)。

当センター飼養の黒毛和種3頭および野外採卵で採取したホルスタイン種3頭の子宮灌流液を検査した結果、黒毛和種1頭、ホルスタイン種3頭の子宮灌流液からBLV遺伝子を検出した。また、子宮灌流液を段階希釈することで、BLV遺伝子は検出されなくなった(表3)。

乳汁については、BLV感染牛3頭で検査を行ったところ、全ての牛で分娩後1か月までの乳汁で、BLV遺伝子が検出された(表4)。

表2 体液および受精卵のBLV遺伝子量

牛	鼻汁		唾液	糞便	受精卵
	直接	希釈			
黒A	—	NT	—	—	—
黒B	—	NT	—	—	NT
黒C	—	0.127	—	—	NT
黒D	—	NT	—	—	NT

NT : 未実施

表3 子宮灌流液のBLV遺伝子量 (copies/ μ l)

牛	白血球増多症	出血	希釈倍率						
			10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
黒A	なし	少	—	—	—	—	—	—	—
黒B	なし	なし	0.145	—	—	—	—	—	—
黒C	なし	なし	—	—	—	—	—	—	—
牦a	あり	少	3.831	—	—	—	—	—	—
牦b	あり	少	13.24	—	—	—	—	—	—
牦c	あり	少	0.664	0.331	—	—	—	—	—

表4 乳汁のBLV遺伝子量 (copies/ μ l)

牛	分娩後日数					
	0	1	2	3	7	30
黒A	0.093	—	—	—	—	—
黒B	NT	—	0.311	—	0.701	0.086
黒C	0.173	—	0.418	0.134	—	1.658

NT：未実施

3 器具等の汚染状況の把握

BLV感染牛3頭のうち1頭で頸管拡張棒からrPCRによりBLV遺伝子が検出され、粘液除去棒およびバルーンカテーテルからはBLV遺伝子は検出されなかった。また、BLV感染牛4頭のうち3頭で直検手袋からBLV遺伝子が検出された。(表5)

BLV感染牛用ストール3カ所のウォーターカップからは、BLV遺伝子はいずれも検出されなかった。

表5 採卵・飼養関連資材のBLV遺伝子量

牛	(copies/ μ l)			
	頸管拡張棒	粘液除去棒	バルーンカテーテル	直検手袋
黒A	—	—	—	0.244
黒B	0.086	—	—	0.637
黒C	—	—	—	—
黒D	NT	NT	NT	0.124

NT：未実施

4 垂直感染防除実験

BLV感染牛2頭が分娩した子牛を隔離飼育および代用乳による哺乳を行った結果、rPCRにより子牛からBLV遺伝子は検出されなかった(表6)。

表6 感染牛親子のrPCR (copies/ μ l)

牛	分娩後期間					
	0日	7日	1か月	2か月	6か月	9か月
黒A	—	—	0.96	0.44	NT	NT
黒Aの子	—	—	—	—	NT	—
黒B	579.79	1007.08	596.56	738.83	NT	NT
黒Bの子	—	—	—	—	—	NT

NT：未実施

考 察

飼養牛の感染状況では、まず、ELISAとrPCRを比較することで、ELISAは、定性的な抗体検査であり、ELISA値が高いことが、高い遺伝子量を保有する感染牛ではないことがわかった。また、2年半の分離飼育後、調査により当センターでは3m30cm以上離される現在の分離飼育の方法は有効だということが示された。

体液からの排出状況では、子宮灌流液からは試験した6頭のうち4頭でBLV遺伝子が検出されたが、100倍以上に希釈することで、何れの検体からもrPCRでは、BLV遺伝子が検出されなくなった。受精卵移植時には、ストロー内に充填される保存液により相当分希釈されることとなる。さらに、卵子には、BLVは感染しないとされており^{2, 3)}、受精卵移植における感染リスクは低いと考えられる。

乳汁については、1か月までのBLV感染牛の乳汁でBLV遺伝子が検出された。これは乳汁中に含まれる感染リンパ球によるものと推察される。黒毛和種は、乳用種よりも長い期間母牛に子牛を付けておくことがあるが、このことは、乳汁からの感染リスクを高めることになると考えられる。しかし、BLV感染牛の初乳を接種した子牛では、移行抗体としてBLV抗体を得ることで感染が認められない例も多い。また、BLV非感染牛の産子や移行抗体が消失した時期の子牛が、感染牛の乳汁を含むバルク乳を接種した際の感染リスクが高いとの報告もあることから⁵⁾、「非感染牛の初乳を飲んだ子牛にはプール乳を与えない」、「感染牛の初乳は、加熱処理または凍結処理後に与える」、「これらの処理ができないときは、初乳製剤を与える」、「感染牛の産子は、なるべく早く母乳から離す」などの対策が重要といえる。

器具等の汚染状況では、採卵・飼養関連資材については、頸管拡張棒と直検手袋においてBLV遺伝子が検出されたが、双方とも使い回しが可能な器具であることから、頸管拡張棒については必ず洗浄・滅菌を行

い、直検手袋においては1頭ごとに交換することが必要である。

垂直感染防除実験では、BLV感染牛から分娩した子牛について親子分離および代用乳で飼育したことでBLV遺伝子は検出されず、今回の実験による親子分離では、垂直感染は認められなかった。しかし、BLV感染牛における子宮内感染や産道感染が認められた例も報告されていることから⁵⁾、感染牛の産子については、BLVの検査を行うことが望ましいと考えられる。

参考文献

- 1) 小林創太ら, 2016, 日本の牛白血病摘発牛に関する記述疫学, 第47回獣疫学学術集会講演要旨集, 24-25
- 2) 村上賢二, 2009, 地方病性白血病の我が国における現状とその対策について, 山口獣医学雑誌, 36, 5-30
- 3) 大橋比奈子ら, 2011, 食肉衛生検査における乳用牛を対象とした牛白血病ウイルス(BLV)保有状況調査および卵巣組織からのBLV遺伝子の検出, 獣医畜産新報, 64(7), 569-573, 文永堂出版
- 4) 市村有理ら, 2009, 牛白血病ウイルス浸潤状況調査と清浄化対策の推進, 平成21年度新潟県家畜保健衛生所業績発表会集録, 27-29
- 5) 今内覚, 2015, 牛白血病最新の知見と対策について, 動薬研究, 71, 1-11