

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月27日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26850203

研究課題名（和文）感染牛の初乳中抗体を活用した牛白血病ウイルス感染予防薬の開発

研究課題名（英文）in vitro evaluation of protective ability to bovine leukemia virus (BLV) infection of colostrum anti-BLV antibody of infected cattle

研究代表者

小西 美佐子 (Konishi, Misako)

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

研究者番号：20355168

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：牛白血病ウイルス（BLV）感染牛の初乳中抗BLV抗体（初乳抗体）を活用した、新生子牛のBLV感染予防薬の開発に資するため、初乳抗体のウイルス感染抑制能をin vitroで検証することを試みた。初乳を用いた抗体価測定法を確立し、分娩後日数による抗体価の変動や、血中抗体価および血中ウイルス遺伝子量との関係などについて検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、国内で発生数が増加し続けている牛白血病の主原因である牛白血病ウイルス（BLV）の感染予防対策に資するため、初乳中の移行抗体によるBLV感染防御機構の解明を目指した。本研究により、BLV感染牛の初乳から得た乳清には、高いBLV感染防御能を有する移行抗体が含まれることが判明した。乳清には、BLV感染細胞が含まれないため、高力価の移行抗体を含む初乳乳清を新生子牛に給与することで、感染の危険性なく子牛に抗BLV抗体を付与できる可能性がある。今後、さらに検証を重ねることで、初乳乳清を活用したBLV感染予防法が開発されることが期待される。

研究成果の概要（英文）： The aim of this study is in vitro evaluation of the protective ability to bovine leukemia virus (BLV) infection of colostrum antibody of BLV infected cattle. We measured anti-BLV antibody titer contained in colostrum/milk of BLV infected cattle using syncytium-induction inhibition assay. The fluctuation of the colostrum antibody titer during the lactation period was investigated. Furthermore, we investigated the association between colostrum antibody titer and antibody titer in serum, and proviral load in peripheral blood.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：牛白血病ウイルス 初乳抗体 感染阻止

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国における牛白血病の現状

牛白血病ウイルス (BLV) 感染によって引き起こされる地方病性牛白血病 (EBL) は、牛の悪性腫瘍 (リンパ腫) である。近年、EBL の発生数は年々増加しており、畜産農家に大きな経済的損害を与えている。我々は 2009-2011 年に全国調査を実施し、BLV の感染率が 1980 年に比べ大幅に増加しており、ウイルスが全国に浸潤していることを明らかにした (村上ら、2013)。EBL には発症予防薬も治療法もないため、EBL の確実な防疫手段は BLV 感染牛の淘汰/隔離となるが、感染率の高い我が国では実施困難である。したがって、多くの農場では感染牛を同居させたまま、ウイルス伝播防除対策を実施することで非感染の後継牛を確保し、農場内の感染率低下を目指す方法が採られている。前述の全国調査の結果、乳牛では生後 6 ヶ月以上 1 歳未満の子牛の 20% がすでに感染していることが分かった (村上ら、2013)。幼若牛が BLV に感染すると、年齢が低いうちに EBL を発症する可能性があるだけでなく、他の子牛の感染源となるため、農場内の感染率上昇の原因にもなる。従って、幼若牛の BLV 感染を阻止することは、EBL 発症防止ならびに、BLV 感染率低下につながるため、非常に重要な EBL 防疫対策と考えられる。

(2) BLV 感染対策における感染牛の初乳が果たす役割

BLV の伝播経路は、感染牛の血液や乳汁を介した水平伝播ならびに胎内感染や産道感染による垂直伝播である。過去の研究では、感染牛の初乳/乳汁には、感染能を有する BLV 感染リンパ球が含まれており、感染牛の初乳を摂取することで子牛が BLV に感染することが報告されている (Romeo ら、1983、Chung ら、1986)。一方で、感染牛の初乳に含まれる移行抗体により、子牛の BLV 感染防御が可能であるとする報告もある (Ferrera ら、1981、Lassauzet ら、1989)。これらの研究により、感染牛の初乳は子牛の感染源であると同時に、感染防御に重要な抗体の摂取源という二面性をもつことが明らかとなった。しかし、既報はすべて *in vivo* の研究であり、初乳中抗 BLV 抗体 (初乳抗体) による BLV の感染防御機構や、感染防御可能なウイルス量などの検証は行われていない。*in vitro* の実験によってこれらを明らかにすることにより、初乳中抗 BLV 抗体 (初乳抗体) を新生子牛の「BLV 予防薬」として活用できる可能性がある。

2. 研究の目的

BLV 感染牛の初乳を活用した新たな BLV 感染予防薬開発に資するため、初乳抗体の BLV 感染防御能を *in vitro* で明らかにする。具体的には、初乳抗体による BLV の感染防御機構や、量的検証を可能とする定量検査法

を確立する。確立した定量法を用いて、分娩後日数による抗体価の変動や、血中抗体価および血中ウイルス遺伝子量との関係などについて検証する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* での初乳抗体の BLV 感染防御能評価

初乳抗体の BLV 感染防御機構を *in vitro* で解明するため、シンシウム形成阻害試験 (SIIA) を用いて初乳抗体の検出を試みた。SIIA の検査材料には、BLV 感染牛および非感染牛の初乳から脂肪層および体細胞を除去した乳清を用いた。得られた乳清は、SIIA 実施にあたり、56 で 30 分加熱処理し、補体活性を非働化させた。96 ウェルプレートに乳清、BLV 持続感染細胞 (FLK-BLV) (2×10^5 cells/ml) および市販のウサギ補体 (10 倍希釈) を各 25 μ l/well 加え、37 で 1 時間反応させた後、BLV 感受性細胞 (CC81) (1×10^6 cells/ml) 25 μ l/well を加え、37 で 2 日間共培養した。培養後に細胞をギムザ染色し、BLV 感染によって形成されるシンシウムの有無を確認した。シンシウムが 1 個以上観察されたものは抗体陰性、全く観察されなかったものを抗体陽性とした。

(2) 初乳抗体価の経時的変化

BLV 感染牛 6 頭および非感染牛 4 頭について、分娩日から乾乳まで定期的に乳汁を採取した。また、これらの牛から、分娩予定 1 ヶ月前および分娩 1 ヶ月後から乾乳まで定期的に血液を採取した。乳清および血清は 2 ~ 1024 倍まで 2 倍階段希釈し、SIIA を用いて抗体価を測定した。また、乳中体細胞数および末梢血リンパ球数を測定した後、体細胞および末梢血白血球 (WBC) より DNA を抽出し、BLV の Tax 遺伝子を標的としたプロンプ・プライマーセットを用いたリアルタイム PCR 法により、それぞれのプロウイルス遺伝子量 (PVL) を測定した。

(3) 初乳抗体価と血中抗体価および血中ウイルス量の関連性

BLV 感染牛 27 頭について、分娩後 1 日目の初乳を採取し、抗体価および体細胞中 PVL (mPVL) を測定した。また、各牛の血液を採取し、血中抗体価および血中 PVL (wPVL) を測定した。測定結果を用い、乳汁と血液の PVL および抗体価をマン・ホイットニーの U 検定により比較した。また、ピアソンの積率相関分析を用いて初乳および血中抗体価と wPVL、ならびに血中抗体価と初乳抗体価の相関性の有無を検証した。

4. 研究成果

(1) 初乳抗体による BLV 感染防御機構

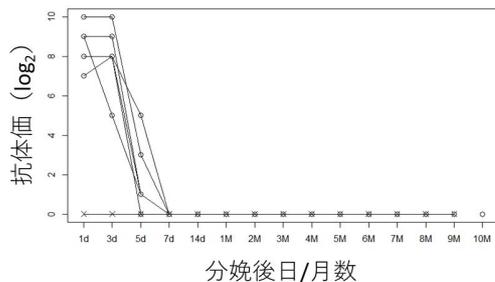
SIIA において、感染牛の初乳乳清と反応させた FLK-BLV と共培養した CC81 ではシンシウム形成が認められなかったことから、初乳抗体により FLK-BLV による Cell-to-cell 感染能が消失すること、ならびに初乳抗体に

よる BLV 感染防御機構は、血清と同じく補体依存性細胞傷害活性であることが示された。これまで初乳抗体の BLV 感染防御機能を *in vitro* で検証した研究はなく、BLV 感染牛の初乳は、子牛の BLV 感染源として多くが廃棄されてきたが、本研究により初めて初乳抗体の感染防御機構を解明できた。また、本研究では乳清を SIIA の検査材料とした。これにより、無処理の乳汁を用いた場合に認められる非特異的な反応、ならびにコンタミネーションがおこらず、結果判定が容易となっただけでなく、乳清のみで BLV 感染防御が可能であることが示された。乳清には BLV の感染源である感染 B リンパ球が含まれないため、子牛に BLV 感染牛の初乳乳清を投与することで、感染の危険性なく子牛に抗 BLV 抗体を付与することが可能であることが示唆された。また、SIIA では抗体の有無だけでなく、感染防御能を抗体価として測定可能であるため、感染牛の初乳抗体による感染防御能を個別に評価できるようになった。

(2) 初乳抗体価の経時的変化

定期的に採取した乳汁及び血液中の抗体価の変化を図 1 に示す。感染牛の初乳抗体価は、分娩後 5 日目から急速に低下し、7 日目以降は SIIA 陰性となった (図 1a)。一方、感染牛の血中抗体価は分娩前後で大きな変化はなく、全て陽性であった (図 1b)。牛の乳汁中 IgG 量は、分娩後急速に低下していくことが知られている (Korhonen ら、2000)。SIIA の結果から、乳中の抗 BLV 抗体価も分娩後の時間経過とともに低下することが明らかとなり、新生子牛の BLV 感染防御における初乳抗体の重要性が示された。

(a) 初乳/常乳中抗体価



(b) 血中抗体価

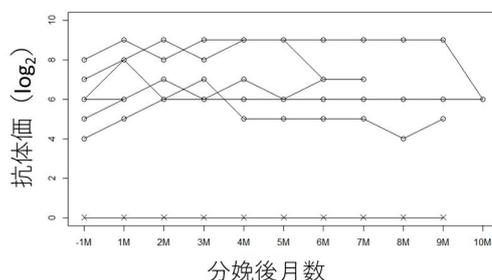


図1 乳汁/血液中抗体価の経時的変化

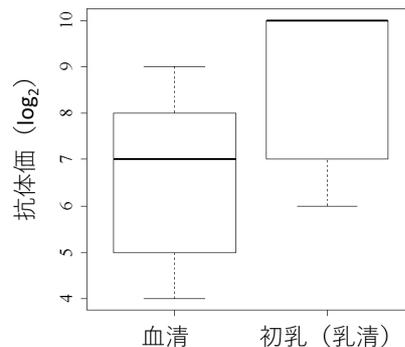
一方、体細胞数は感染の有無にかかわら

ず、分娩後 1-3 日目にピークを示し、14 日目以降はほぼ全頭が 1×10^6 cells/ml 以下であった。mPVL は分娩後 7 日目までは低値 (1.2 ~ 87.5 copies/10 ngDNA) ながら検出されたが、14 日目以降は殆どの感染牛で検出限界以下となった。mPVL は体細胞中の感染 B リンパ球の数を反映するため、mPVL の低下は体細胞数の低下に伴って起きたものと考えられる。また、乳汁中の移行抗体や WBC は、子牛の腸管を介して血中に移行するが、これらの成分に対する腸管の吸収能は、生後 48 時間以内に消失するとされている (Chase ら、2008)。分娩後 7 日目以降の常乳における低 mPVL ならびに子牛の腸管の吸収能の経時的低下から、BLV 感染牛の常乳は、母子感染における主要な感染源ではない可能性が示唆された。しかし、常乳中の PVL には個体差があるため、常乳を介した BLV 感染リスクについては、更に検証が必要である。一方、経時的に大きく変動した乳汁中の体細胞数や mPVL とは対照的に、末梢血リンパ球数および wPVL は採材期間中大きな変動はなかった。また、非感染牛の SIIA およびリアルタイム PCR の結果は全て陰性であった。

(3) 初乳抗体価と血中抗体価および血中ウイルス量の関連性

27 頭の BLV 感染牛の抗体価は、初乳で 64-1024 倍 (平均 644.7 倍)、血清で 16-512 倍 (平均 134.5 倍) であり、統計学的解析の結果、初乳抗体価は血中抗体価より有意に高いことが示された ($p < 0.05$) (図 2a)。牛では、分娩前になると乳腺上皮細胞から血中

(a) 抗体価



(b) PVL

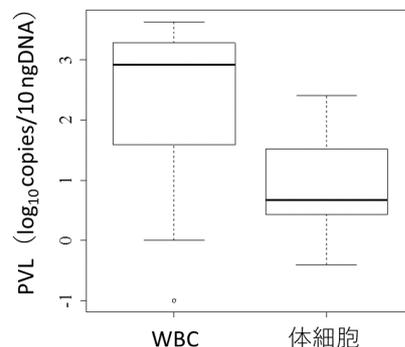


図2 初乳および血液における抗体価と PVL 比較

IgG が選択的に吸収されるため、初乳中 IgG1 量が血中の 5-10 倍高くなることが知られているが (Korhonen ら、2000、Gapper ら、2007) 本研究により抗 BLV 抗体も初乳中へ選択的に移行することが示された。

一方、PVL の比較では、mPVL が 0-254.6 copies/10 ngDNA (平均 21.6 copies/10 ngDNA)、wPVL が 0.1-4363.3 copies/10 ngDNA(平均 1166.1 copies/10 ngDNA)と、wPVL が mPVL よりも有意に高かった ($p < 0.05$) (図 2b)。牛の WBC におけるリンパ球の割合は 50%以下であるのに対し、初乳中体細胞におけるリンパ球の割合は 22-25%と低い (Chase ら、2008、Kim ら、2016)。したがって、wPVL と mPVL の差は、それぞれにおける BLV の標的細胞である B リンパ球の割合の差を反映しているものと考えられる。

図 3 に wPVL および血中抗体価と初乳抗体価の散布図を示す。wPVL と血中抗体価、初乳抗体価 (図 3a) および mPVL 間にはそれぞれ有意な相関が認められた (相関係数 $[r]$ は血中抗体価 ; 0.69、初乳抗体価 ; 0.59、mPVL ; 0.53、いずれも $p < 0.05$)。しかし、初乳抗体価と血中抗体価には有意な相関は認められなかった ($r^2 = 0.37$, $p = 0.06$)。また初乳抗体価と mPVL にも有意な相関は認められなかった ($r = 0.57$, $p = 0.06$) (図 3b)。

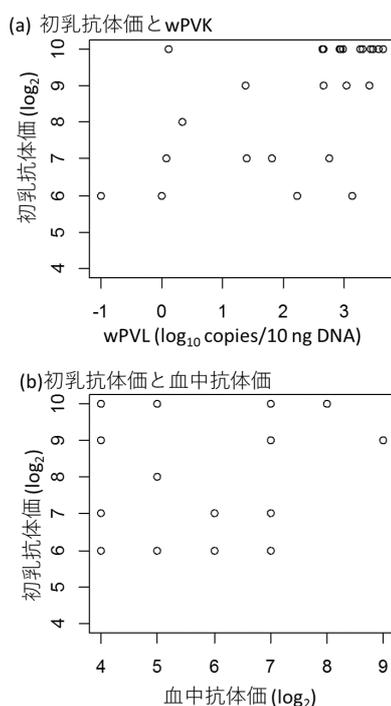


図3初乳抗体価とwPVLならびに血中抗体価との関連性

血中抗体価とウイルス量の関連性については既報でも示唆されている (Kono ら、1982、Gutierrez ら、2015) が、本研究により新たに wPVL と初乳抗体価の相関性が示された。感染牛の初乳乳清を子牛の「BLV 感染予防薬」として活用する場合、初乳抗体価の高い

牛を「ドナー牛」として選ぶことが重要となる。本研究により、wPVL が高い個体は初乳抗体価が高い傾向があることが示されたことから、wPVL を初乳抗体価の指標とすることで、分娩前にドナー牛を選抜できる可能性が示唆された。一方、血中抗体価と初乳抗体価に有意な相関性が認められなかったことから、血中抗体価は初乳抗体価の指標とならないと考えられる。検査対象牛には、血中抗体価が低いにも関わらず初乳抗体価は高い個体もいた。これは、初乳には血中から IgG が選択的に蓄積されるため、血中抗体価が低い牛でも初乳中では IgG が濃縮され、初乳抗体価が高くなったものと考えられる。

BLV 感染牛の初乳乳清を BLV 感染予防薬として活用するためには、更に抗体価が既知の初乳乳清と PVL が既知の感染 B リンパ球を用いた in vivo の検証実験が必要となる。また、経口投与した初乳抗体がどの程度子牛の血中に移行するかについても検討する必要がある。本研究で確立した初乳抗体価測定法を活用することで、in vivo における初乳抗体の BLV 感染防御能をより具体的に検証することが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Konishi M, Ishizaki H, Kameyama K, Murakami K, Yamamoto T., The effectiveness of colostrum antibodies for preventing bovine leukemia virus (BLV) infection in vitro, BMC Veterinary Research, 14, 2018 (査読有り) <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1724-5>

〔学会発表〕(計 2 件)

小西美佐子、石崎宏、中野美和、芳賀聡、小林創太、亀山健一郎、澤井美和、平田玲子、若本裕晶、大崎慎人 他、市販血清用キットを応用した乳汁エライザ法による抗牛白血病ウイルス抗体検査の実用化に向けた試み、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017

石崎宏、小西美佐子、中野美和、芳賀聡、小林創太、亀山健一郎、澤井美和、平田玲子、若本裕晶、大崎慎人、個体乳とバルク乳を用いた抗牛白血病ウイルス抗体検出キットの可能性、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 美佐子 (Konishi, Misako)

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
研究者番号 : 20355168

(2) 研究協力者

石崎 宏 (Ishizaki, Hiroshi)

山本 健久 (Yamamoto, Takehisa)