

ブタの精液と疾病伝搬について

鈴木 千 恵 (動物衛生研究所 病態研究領域)

Suzuki, C. (2012) Transmission and Spread of Infectious Disease via Semen

All about SWINE 41, 30-36

近年、ブタの人工授精は宅配を利用した液状精液の利用技術が進み、また経営規模の拡大と一貫経営の増加に伴って、その普及率が高まってきている。人工授精の利用は、家畜改良の促進や優良遺伝子の導入、種豚維持管理費の軽減化・省力化に加えて、交配を介した感染症の蔓延予防に貢献できるが、生殖器感染症が混入した精液が流通すると、短期間に広範囲にわたり疾病が広がる可能性が考えられる。ヒトにおいて性感染症の成立に精液中の human immunodeficiency virus (HIV) や human herpes virus (HHV) が関与していることは周知の事実であるが、ブタにおいても豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS: porcine reproductive and respiratory syndrome) やオーエスキー病 (Aujeszky's disease)、豚コレラ (classical swine fever) 等が精液から伝搬することが知られている。ここでは、ブタに限らず、病原体を運ぶ媒体である精漿の機能、感染症と免疫に関する知見に加え、ブタ精液中の PRRS ウイルス除去法について若干の検討を行ったので、その概要を報告する。

精漿の機能

精漿中には、多くの物質が含まれているがその作用は不明なものが多い。これまでに明らかに

されている作用としては、1) 精子の輸送、2) 膣からの逆流防止、3) 精子運動抑制による受精時のエネルギー貯蓄、4) 受精能獲得の可逆的抑制、5) 酸性膣内 pH の緩衝、6) 活性酸素のスカベンジャー、7) 免疫修飾があげられる¹⁾。中でも、免疫系に対する作用に関しては未だ解明されていない点も多いが、精漿には T 細胞や B 細胞の増殖²⁾・活性抑制³⁾、好中球・マクロファージの食能抑制⁴⁾、natural killer (NK) 細胞や cytotoxic T (Tc) 細胞の細胞傷害抑制⁵⁾ 作用が確認されている。一方で、子宮内膜への精漿暴露により一過性の炎症が生じるが、この現象は精液中の病原体に対する防御や雌側の妊娠準備態勢を整える免疫機構の調整に関与する⁶⁾ といわれている。以下に、精漿中における代表的な免疫修飾物質について簡単に示す。

精漿中に高濃度に存在する主要な免疫修飾物質には transforming growth factor (TGF)- β や prostaglandin (PG) があげられる。TGF- β は、マウス交配後における子宮内炎症反応の主要なトリガーとして同定された⁷⁾。マウス精漿中の TGF- β 濃度は非常に高く、血清の約 5 倍 (約 70 ng/ml) と報告されている⁸⁾。精漿中の TGF- β 合成はテストステロン依存性で、去勢後には顕著に低下するが、外因性テストステロン投与によ

り若干の回復が認められる⁸⁾。ブタ精漿中にも高濃度の TGF- β が存在するが、雌生殖器において免疫反応調節に関与するか否かについては明らかにされていない⁶⁾。TGF- β は接着因子の発現調節、炎症部位の免疫細胞のリクルートや活性化等に関与する。TGF- β のマウス子宮内投与により、炎症性サイトカインの一つである granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 産生が誘導され、子宮内膜への白血球のリクルートが惹起される⁷⁾。精漿中には好中球遊走因子である interleukin (IL)-8 も豊富に存在し、TGF- β と共に子宮内膜上皮に作用することで、IL-1 β や IL-6, leukemia inhibitory factor (LIF) 遺伝子の発現が誘導される⁹⁾。精漿中のもう一つの主要な免疫抑制物質である PG は、ヒト精漿中では 19-hydroxy PGE として豊富に存在し、ヒト子宮頸部培養細胞を用いた移植試験では、19-hydroxy PGE が IL-8 の発現促進、あるいは抗炎症物質の一つである分泌型白血球プロテアーゼインヒビターの発現抑制に関与する¹⁰⁾ ことが示されている。また PGE は、NK 細胞活性やリンパ球増殖の抑制、白血球のサイトカイン分泌¹¹⁾ や、インターロイキン IL-10 産生の促進と IL-12 産生の抑制にも関与し、妊娠維持に有利な免疫環境を誘導する¹²⁾。精漿中には、細胞増殖に関わる成長因子やタンパク合成の促進・転写因子として作用するポリアミン (スペルミン、スペルミジン) も高濃度に存在する¹³⁾。ポリアミンは、胚の着床、子宮内膜の脱落膜化、胎盤形成等に関与し¹⁴⁾、末梢血単核球の tumor necrosis factor, IL-1, macrophage inflammatory protein -1 α , β 産生を抑制する¹⁵⁾ など、免疫抑制効果も認められる。一方で、ポリアミンはアミノキシダーゼによって分解され、過

酸化水素と細胞毒性が高いアクロレインが生成される¹⁶⁾。ウイルス検査法の一つにウイルス分離法があるが、精液からのウイルス分離は難しいとされている。ウイルス分離法では、ウイルスを増やすために培養細胞が必要となるが、細胞培養に用いる培地中には高濃度のアミノキシダーゼが含まれるウシ胎仔血清が添加されている。そのため、精液中のスペルミンあるいはスペルミジンといったポリアミンは、ウシ胎仔血清中のアミノキシダーゼにより分解され最終的にアクロレインに変換されるために、ウイルスを増殖させるための細胞培養が困難となる¹⁷⁾。このようなことから、精液からのウイルス分離は非常に難しいとされている。

子宮内免疫と精液による感染症

妊娠と免疫：妊娠時の免疫について簡単にスライドに示した (図 1)。母体にとって胎仔・胎盤は免疫学的に半異物であるが、妊娠を継続させるためには母体の子宮内の免疫担当細胞がバランスよく胎仔・胎盤抗原を認識することが必要である¹⁸⁾。免疫反応はヘルパー T 細胞の 2 つの分化、つまり Th1 細胞・Th2 細胞への分化に伴うサイトカインバランスの上に成立しており、各々の細胞が放出するサイトカインは、Th1 あるいは Th2 サイトカインと総称される。Th1 サイトカインには、IL-2, IL-12, interferon- γ があげられ、これらは胎盤絨毛細胞発育の阻害、胎仔の発育障害、子宮収縮、NK 細胞活性化に作用し、流産を誘引する。一方で、Th2 サイトカインには IL-4, IL-10, TGF- β があげられ、抗炎症、抗細胞障害、NK 細胞活性抑制作用を発揮し、妊娠しやすい環境を整える。すなわち、精液に曝された子宮内では免疫

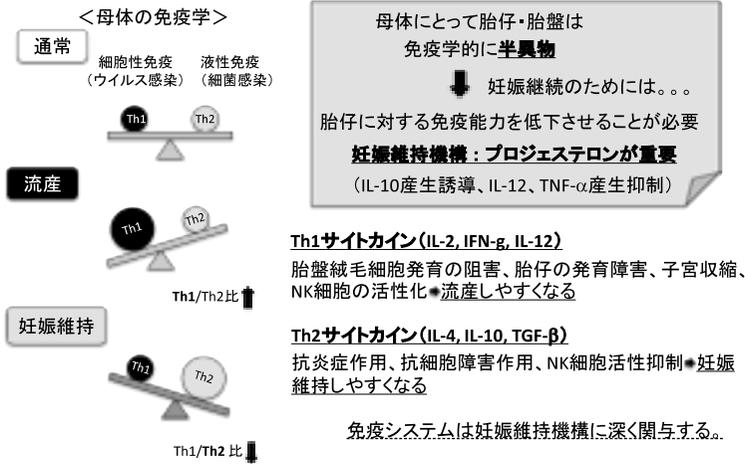


図1 妊娠中の免疫の変化
Th1/Th2 バランスと妊娠維持

- 性感染症の成立に大きく関与
- Human immunodeficiency virus (HIV) : Kuno et al., 1985
- Human herpes virus (HHV) : Turner et al., 1990
- Human papilloma virus (HPV)

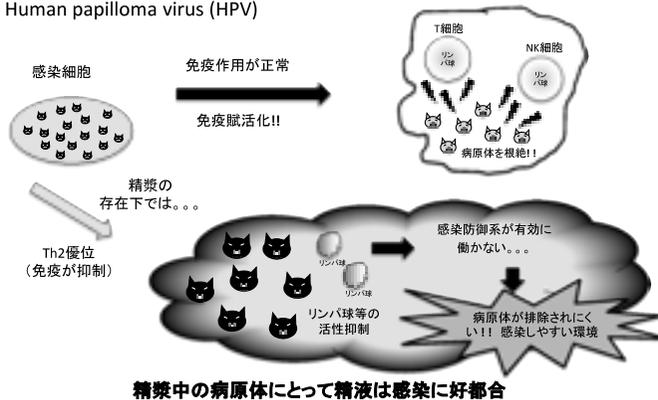


図2 精漿の免疫抑制作用と感染症

が抑制され、妊娠継続に有利な Th2 優位となる。通常、ウイルス感染した細胞は、免疫システムが正常に作用している場合は免疫が賦活化され、T細胞やNK細胞により攻撃・排除される。しかし、精漿には免疫抑制作用が存在し、精漿暴露後の子宮内は Th2 優位となるため、精漿により持

ち込まれたウイルスに対しては感染防御系が有効に働かず、子宮内は病原体が感染しやすい環境になってしまう¹⁹⁾。ヒトにおいては、この精漿の免疫抑制作用が、HIV²⁰⁾ や HHV²¹⁾ 等の性感染症の成立に深く関与することが明らかとなっている(図2)。ブタにおいても、精液からの疾病伝搬

に同様の機構が関与している可能性が考えられる。

ブタ精液から検出されるウイルス²²⁾

以下に、ブタ精液から検出される代表的なウイルスについていくつかあげておく。

オーエスキーウイルス：神経や扁桃、呼吸器官の他に、生殖器でもウイルスが増殖する。雄への鼻腔内感染実験では、精巣の変性や異常精子数の一過性の増加が認められる。また、自然あるいは実験感染後、尿、包皮膜や精液からもウイルスDNAが排出される。精液へのウイルスDNAの排出は、臨床症状や精液性状の悪化とは関係ないとされているが、ブタでは潜伏感染が成立するため注意が必要である。妊娠豚に感染した場合はほとんど無症状に経過するが、胎仔には死流産が認められる。

豚サーコウイルス：自然あるいは実験感染後、血清中に抗体が存在していても精液中にウイルスDNAが検出される。感染実験では、ウイルス摂取後5～47日間は精液からウイルスDNAが検出されることが確認されている。ウイルスは精漿だけでなく、精子あるいは非精子分画中にも検出されることが多い。このウイルスは、感染豚から断続的に排出される可能性があり、精液が重要な感染経路となることが考えられる。ただし、精液中に感染力を持つウイルスが存在するか否かについては、未だ不明である。

豚コレラウイルス：感染実験では感染後53日後までウイルスが精液中に検出されることが報告されている。ウイルス混入精液を人工授精した母豚では胚死滅が認められ、また胎仔からウイルスが分離されることも確認されている。日本を含め、

多くの国で清浄化に成功し、本病は海外伝染病に準ずる扱いとなっているが、輸入精液やイノシシ等の野外動物が感染源となる可能性が考えられるので今後も注意が必要である。

豚パルボウイルス：産次数の低い母豚に感染すると異常産が好発し、胚死滅、胎仔のミイラ化、流産等が誘発される。雄豚あるいは雌豚への感染後には臨床症状がほとんど観察されない。精液中へのウイルスの排出は発症急性期にみられる。

豚エンテロウイルス：このウイルスは、雄性生殖器から分離される。しかし、ウイルスが混入した精液を人工受精しても受胎率には影響がなかったとの報告がある。

PRRS ウイルス：鼻汁、唾液、尿、糞便、精液からウイルスが排泄される。このウイルスは、ウイルス血症がおさまっていても、あるいは中和抗体が存在していても、精液中にウイルスが排出される可能性が高い。感染実験では、感染後2～92日の範囲で精液中にウイルスが排出されることが報告されているが、この排出期間は、個体差あるいは用いたウイルス株などにより大きく影響される。生ワクチン接種後においても精液にウイルスが排出される。感染後に精子の運動性低下や先体あるいは形態異常精子の増加が認められるが、精液性状は個体差によるものも多いので、一概に精液性状の低下がPRRSウイルス感染によるものとは断言できない。雄豚に感染した場合、食欲不振、沈うつ、発熱および発咳等が認められることもあるが、ほとんどの場合、不顕性の経過をとるため、精液へのウイルス排出時期の推測は困難である。従って、適切かつ衛生的に管理された清浄な精液を使用することが重要である。

PRRS ウイルス混入豚精液からのウイルス除去法の検討

ブタにおいて精液が伝搬する疾病の1つとしてPRRSがあげられるが、これは死流産等の繁殖障害と子豚の呼吸器症状肺炎を主徴とし、養豚産業に多大な被害を与える疾病である。本疾病の原因となるウイルスの主要な農場への侵入経路は、導入豚に加えて精液であることが確認されている。最近の報告によれば、日本におけるPRRSの経済損失は約283億円にのぼるとも言われている²³⁾。海外におけるPRRS感染の約20%が精液によるとの報告もあることから、PRRS感染を防ぐためには適切に管理された清浄な精液を人工授精に用いることが重要である。一方ヒトでは、HIV感染者の精液からパーコール(PC)分離法を用いてウイルス分離する方法が用いられている。そこで今回、PC密度勾配法を用いて、ブタ精液中からの効率的なPRRSウイルス除去法について若干の

検討を行ったので紹介する。

【方法】市販のPRRS生ワクチンをPBSで50,000 TCID₅₀/mlに希釈し、ウイルスストック液とした。実験1として、3頭の雄豚(精子濃度：A； 9.1×10^8 /ml, B； 7.0×10^8 /ml, C； 2.1×10^8 /ml)の精液を1：1にモデナ液で希釈し、ウイルスを25, 250, 2500 TCID₅₀/ml (25群, 250群, 2500群)となるように精液に添加後、各々の精液サンプルを50/80%あるいは45/90%のPCに重層(50/80%区, 45/90%区)し、500Gで30分遠心後、上層, 中間層, 沈殿精子層を採取し、各層のウイルスRNAをリアルタイムRT-PCR法で定量した。また沈殿精子層の精子数を測定した。実験2として、3頭の雄豚の精液を実験1と同様に希釈・ウイルス添加し、各々の精液サンプルを50/80% PCに重層し、500あるいは800G(500G区, 800G区)で30分遠心後、実験1と同様の処置・解析を行った(図3)。**【結果】**実験

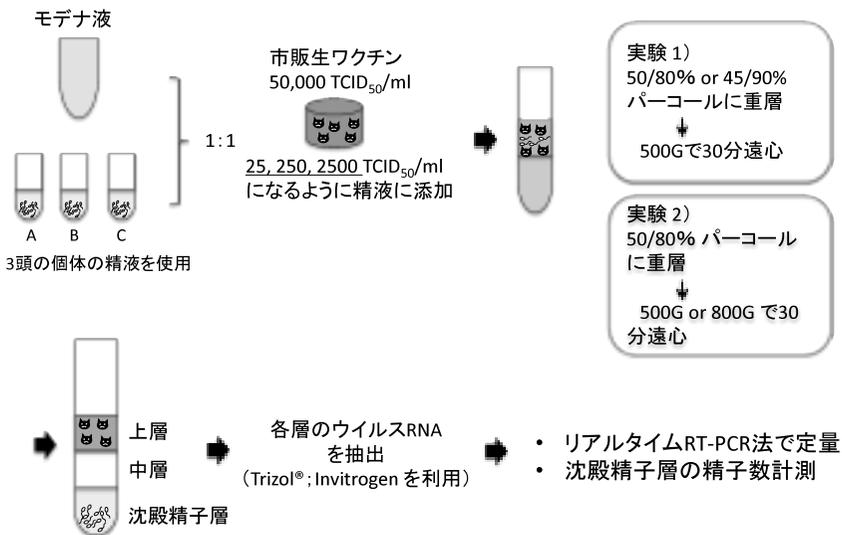


図3 PRRS ウイルス混入豚精液からのウイルス除去法の検討

1及び2で得られたほぼ全ての上層で、ウイルス RNA が検出された。実験1では、50/80%区で2,500群の一部の精液の中間層あるいは沈殿精子層に、45/90%区で2,500群の一部の精液の沈殿精子層にウイルス RNA が検出された(表1)。実験2では、500G区で25群の精液の中間層に、また800G区の25群及び2,500群のそれぞれ一部の精液の中間層にウイルス RNA が検出されたが、両処置区の沈殿精子層でウイルス RNA は検出感度以下であった(表2)。精子回収率は、実験1では50/80%区で、実験2では800G区で高かった(表1, 2)。回収精子の運動性はいずれも良好であった。以上より、50/80% PC 密度勾配を用いた800G・30分遠心操作で、PRRS ウイルス混入精液から効率よくウイルスを除去できる可能性が考えられたが、回収された精子数は非常に少なかった。近年、ヒト精液における新たなウイルス除去技術として、中空糸を用いた方法が開発されている²⁴⁾。この方法は、HIVが精子よりもはるかに小さいことを利用したもので、目の細かいふい(中空糸)を通すことでHIVだけが精液か

ら除去され、運動性の良好な精子をほぼ100%の回収率で得ることができる。本法はPC分離法よりも簡単で、かつ多くの精子が回収可能となることから、豚のそれへの高い有望性が示唆される。しかしながら、人と豚の精液性状は異なり、また一回につき30～50億の精子が必要となるブタの人工授精への応用には、灌流液や中空糸の特性、あるいは濾過圧等の種々の検討が必要である。ウイルスフリーと考えられる健康個体からの精液採取は当然のこととしても、アウトプットで厳格にウイルスを除去する過程を実現することにより農場 HACCP が確立するものと考えられる。

おわりに

今後、人工授精技術はさらに普及すると予測され、「精液を介する感染症」は、一度侵入を許してしまうと、多大な被害と清浄化のための大変な苦勞が強いられることになる。これらを防ぐためには、導入豚のみならず、精液に関しても厳重な検査体制と衛生管理を実施することが必要と考えられる。

表1 異なる PC 濃度を用いての重層パーコール法を用いた精液中からの RNA 除去法の検討
—沈殿精子層のウイルス RNA の検出—

個体	ウイルス濃度 (TCID ₅₀ /ml)	80/50	90/45
		(TCID ₅₀ /ml) [精子回収率]	(TCID ₅₀ /ml) [精子回収率]
A	2500	— [9.4%]	0.008 [4.8%]
	250	— [8.1%]	— [4.4%]
	25	— [7.4%]	— [4.7%]
B	2500	— [12.3%]	— [7.5%]
	250	— [18.6%]	— [7.1%]
	25	— [30.1%]	— [15.0%]
C	2500	0.003 [1.4%]	0.003 [0.4%]
	250	— [1.3%]	— [0.9%]
	25	— [2.6%]	— [0.6%]

表2 異なる PC 遠心分離速度を用いての重層パーコール法を用いた精液中からの RNA 除去法の検討
—沈殿精子層のウイルス RNA の検出—

個体	ウイルス濃度 (TCID ₅₀ /ml)	500G	800G5
		(TCID ₅₀ /ml) [精子回収率]	(TCID ₅₀ /ml) [精子回収率]
A	2500	— [14.5%]	— [21.2%]
	250	— [10.9%]	— [16.2%]
	25	— [8.3%]	— [16.5%]
B	2500	— [13.0%]	— [26.1%]
	250	— [20.9%]	— [22.5%]
	25	— [20.6%]	— [20.3%]
C	2500	— [1.9%]	— [3.9%]
	250	— [2.4%]	— [5.1%]
	25	— [3.1%]	— [3.6%]

「PRRS ウイルス混入豚精液からのウイルス除去法の検討」については、旗影会の助成金を受けて実施したものです。

- 1) 藤井ら. (2006) 青森臨産婦誌, 21: 16-31.
- 2) Peterson BH et al. (1980) J Lab Clin Med 96: 582-591.
- 3) Stites DP et al. (1975) 253: 727-729.
- 4) Troedsson MHT et al. (2005) Anim Reprod Sci 89: 171-186.
- 5) Vellely PJ et al. (1988) Immunology 63: 451-456.
- 6) Robertson SA. J Anim Sci (2007) 85: E36-E44.
- 7) Tremellem KP et al. Bio Reprod (1998) 58: 1217-1225.
- 8) Robertson SA et al. J Reprod Immunol (2002) 57: 109.
- 9) Gutsche S et al. Mol Hum Reprod (2003) 9: 785-791.
- 10) Denison FC et al. Am J Obstet Gynecol (1999) 180: 614-620.
- 11) Pettipher ER. Prostaglandins (1998) 2024-2027.
- 12) Kelly RW. Hum Reprod (1997) 12: 2200-2207.
- 13) Curry MC et al. Eur J Cell Biol (1980) 21: 180-182.
- 14) Lefevre PL et al. Endocr Rev (2011) 32: 694-712.
- 15) Zhang BM et al. J Exp Med (1997) 185: 1759-1768.
- 16) Kimes BW et al. Biochim Biophys Acta (1971) 228: 223-234.
- 17) Webber MM et al. Cell Biol Int Rep (1980) 4: 185-193.
- 18) Munoz-Suano A et al. Immunol Rev (2011) 241: 20-38.
- 19) James K et al. Immunol Today (1984) 5: 357-363.
- 20) kuno et al. Proc Natl Acad Sci USA (1986) 83: 3487-3490.
- 21) Turner et al. Gynecol Oncol (1990) 37: 60-65.
- 22) Maes D et al. Theriogenology (2008) 70: 1337-1345.
- 23) 山根ら. 日獣会誌 (2010) 63: 413-416.
- 24) 南川ら. 日産婦誌 (2011) 63: 693.