

# 沖縄アグー豚精液からのウイルス除去法の検討

伊佐常暢 普照恭多 平良祥 審晶 片桐慶人

## I 要 約

沖縄アグー豚(以下、アグーという)精液からのウイルス除去を目的に、中空糸膜透過処理およびパーコール遠心分離処理がアグー精液活力に及ぼす影響について検討した。またそれぞれの方法で処理した精液を PCR 検査し、ウイルス除去が可能かどうか検討したところ以下のとおりであった。

1. 豚液状精液を中空糸膜透過処理後、精液活力を検査した結果 80.3%であり、処理前より活力が 12.1 ポイント低下した。
2. 豚液状精液をパーコール遠心分離処理後、精液活力を検査した結果 60.3%であり、処理前より活力が 32.1 ポイント低下した。
3. PRRS ウイルスを添加した豚液状精液をそれぞれ中空糸膜透過処理、パーコール遠心分離処理を行い、PCR 検査を実施した結果、どちらも陽性反応を示しウイルス除去効果を確認することはできなかった。

## II 緒 言

アグーは、沖縄県内でのみ飼養されている貴重な豚であり、ブランド化を推進している<sup>1)</sup>。しかし、過去に著しく数を減らし復元の過程でも小集団で維持されてきたことから、遺伝的多様性が少なく<sup>2)</sup>特定家畜伝染病の侵入による防疫措置などで絶滅する危険性がある。このため遺伝的多様性を維持していくためにも農家間での遺伝子交流が求められているが、PRRS ウイルスの伝搬が懸念されることもあり、実施されていないのが現状である。

そのため、アグー豚液状精液から PRRS ウイルスを除去する技術の確立が必要である。現状西洋種においてはパーコールを用いたウイルス除去に関する検討報告はあるが<sup>3)</sup>、アグーにおいては報告されていない。また血液中の HIV ウイルス除去法として、中空糸膜による方法も検討されている<sup>4)</sup>。そこで本研究ではアグー豚精液からのウイルス除去を目的に、中空糸膜透過処理およびパーコール遠心分離処理が精液活力に及ぼす影響について検討した。またそれぞれの除去方法で処理した精液を PCR 検査し、ウイルス除去が可能かどうか検討したので報告する。

## III 材料および方法

### 1. 試験方法

#### 1) 供試精液

供試精液は畜産研究センターにて飼養しているアグー雄から採取した精液を、38°Cで加温した精液希釈液(HIRO SWINE B液)で2倍希釈し、精子運動率を精子運動解析装置(SMAS;Sperm Motility Analysis System, DITECT, 東京)で解析後、試験に供試した。

#### 2) 中空糸膜透過処理

中空糸膜透過処理の概要を図1に示した。希釈した精液を中空糸膜モジュール(SPECTRUM, 直径0.7mm, 細孔径0.65μm, 有効長41.5cm, 表面積30cm<sup>2</sup>)を用いて透過処理し、精子運動率を調査した。アグー精液を左のシリンジに入れ、プランジャーを押し下げて右シリンジに精液を押し出す。1番右のシリンジに精子が濃縮され、透過成分は右から2番目のシリンジに集まる。処理作業は1回のみ実施した。

#### 3) パーコール遠心分離処理

パーコール遠心分離処理の概要を図2に示した。パーコール液(GE Healthcare Percoll™ PLUS)と精液希釈液を1:1の割合で希釈して50%パーコール液を作製した。その後15mlのプラスチック遠沈管に50%パーコール液を5ml入れ、その上に希釈した豚液状精液5mlをパーコール液と混ざらないように積

層する。その後 800 g で 30 分間遠心し、最下層に沈殿した精子の運動率を調査した。

#### 4) PCR 検査

PRRS ウイルスを添加した精液中中空糸膜透過処理およびパーコール遠心分離処理を行った精液を、それぞれ PCR 検査した。また、検査手法は Kono ら<sup>5)</sup>の方法を用いて行った。RT-PCR のプライマーは PRRSV21 5' -GTACATTCTGGCCCTGCC-3' と PRRSV26 5' -GCCCTAATTGAATAGGTGAC-3' で使用キットは QIAGEN One Step RT-PCR Kit (QIAGEN. Cat. 210210, 210212, 210215) RNaseOUT recombinant (RNase inhibitor) (Invitrogen. Cat. 10777-019) を用いた。RT 反応を 50°C 30 分, 95°C 15 分で行い、続いて 1 サイクル 94°C 30 秒, 56°C 30 秒, 72°C 40 秒として、35 サイクルした後 72°C で 7 分の条件で PCR 反応を行った。Nested PCR のプライマーは北米型 No. 22/Forward TCGTTCGGCGTCCCGCTCC と No. 24/Reverse TTGACGACAGACACAATTGC で使用キットは Go Taq green master mix を用いた。PCR 反応を 95°C 5 分, 続いて 1 サイクル 94°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 30 秒として、25 サイクルした後 72°C で 7 分の条件で PCR 反応を行った。

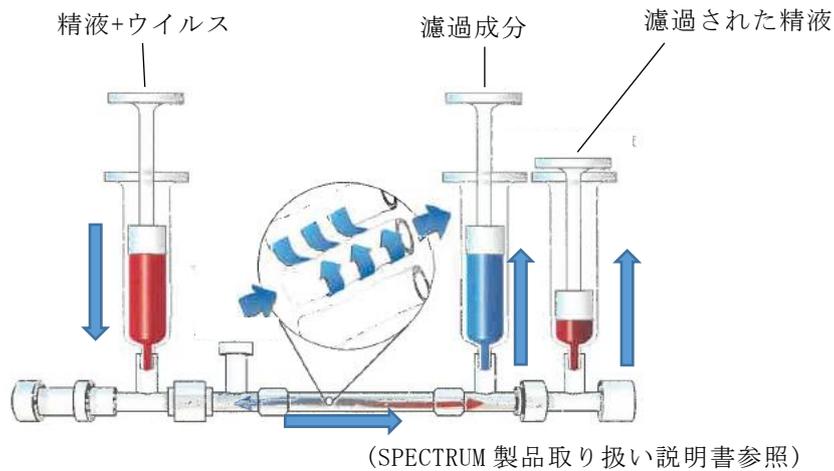


図1 中空糸膜透過処理の概要

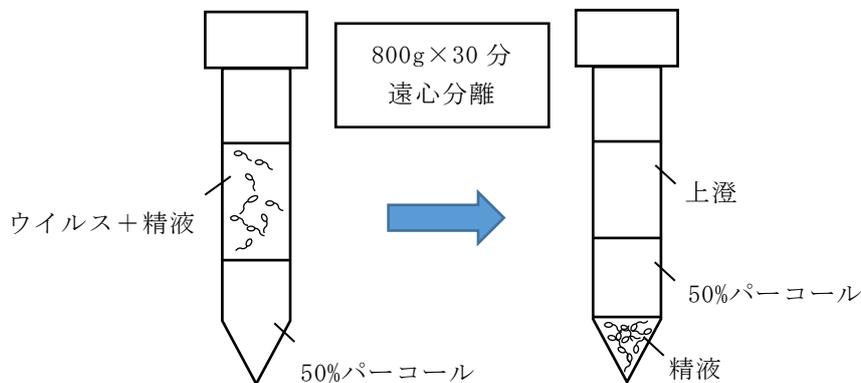


図2 パーコール遠心分離処理の概要

## IV 結果および考察

処理前後の精子運動率を表 1 に示した。精子運動率は、処理前の 92.4% と比べて中空糸膜処理後では平均 80.3% まで低下した。これは中空糸膜処理時に圧力がかかり、精子にダメージを与えられたことが原因と推察された。パーコール処理後の精子運動率は処理前の 92.4% と比べて平均 60.3% まで低下した。

**表1 精子運動率**

処理前	中空糸膜処理	パーコール処理
92.4%	80.3%	60.3%

PCR 検査の結果を表 2 に示した。中空糸膜処理, パーコール処理どちらも陽性反応を示した。本試験では中空糸膜透過処理, パーコール遠心分離処理ともに PRRS フリーにはできなかった。鈴木ら<sup>3)</sup>は西洋種におけるパーコール処理では, PRRS ウイルスフリーにはできなかったとしており, 本試験でも同様な結果となった。

**表2 PCR検査結果**

精液	精液+ウイルス	中空糸膜処理	パーコール処理
-	+	+	+

注) -:陰性, +:陽性

アグーの遺伝的交流を推進するには, 確実に PRRS ウイルスフリーの遺伝子源を保存する技術・手法の確立が必要となる。しかし, 精液の活力を維持しつつ, 確実にウイルスフリーとする技術の確立はハードルが高い事が考えられる。断続的な隔離検査などによる生体での導入体制の検討が今後必要である。

## VI 引用文献

- 1) 沖縄県アグーブランド豚推進協議会ホームページ (<https://okinawa-agu.com/>)
- 2) 當眞嗣平・親泊元治・翁長桃子・嘉数良子・野中克治 (2015) 近交係数増加が沖縄アグー豚の繁殖成績に及ぼす影響, 沖縄畜研セ研報, **53**, 25-28
- 3) 鈴木千恵 (2012) ブタの精液と疾病伝搬について, 日本 SPF 豚研究会 **41**, 30-36
- 4) 横木正信 (1999) セルロース中空糸膜におけるウイルス分離, 繊維学会誌, **55**(10), 338-342
- 5) Yoji KONO, Toru KANNO, Misugu SHIMIZU, Shunji YAMADA, Seiichi OHASHI, Machiko NAKAMINE, Junsuke SHIRAI, (1996) Nested PCR for Detection and Typing of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Virus in pigs, *The journal of veterinary medical science*, **58**, issue 10, 941-946.