

令和5年4月30日

## 令和4年度 共同研究報告書

研究代表者： 萩原 克郎

1. 研究課題名	日本語表記：北海道におけるBL抵抗性個体の調査と牛群管理 英語表記：Survey of BL-resistant cattle and the herd management in Hokkaido		
2. 研究期間	令和4年4月1日～令和5年3月31日		
3. 共同研究者	氏名	機関・所属部署名	職名
	萩原 克郎	酪農学園大学・獣医学群	教授
	蒔田 浩平	酪農学園大学・獣医学群	教授
	安藤 達哉	酪農学園大学・獣医学群	准教授
	岡林 環樹	宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンター	教授
	関口 敏	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 北海道で飼育されている乳牛は、約85万頭におよび他府県へ毎月2500-4000頭移動している。その内、畜産が盛んな九州向けの北海道由来乳牛は1割以上移動していることから、家畜衛生対策において北海道と九州は関連性が深い。牛伝染性リンパ腫（BL）の発生は、年4000頭以上にも及びBLV感染牛は全国の牛の3割を超えることが報告されている。本研究では、北海道の牛群を中心にBL抵抗性遺伝子保有牛の調査を通して、宮崎県の繁殖黒毛和種の知見と比較し、BL抵抗性牛群管理改善に向けて基礎知見を検討した。			
5. 研究内容・成果 <b>概要：</b> 北海道の乳牛459頭、群馬県の乳牛30頭と宮崎県の繁殖黒毛和種38頭を対象に、BL抵抗性遺伝子検出を試み、各牛群の抵抗性遺伝子保有牛を比較し、その結果をもとに農場における牛群管理システムの課題を整理した。 <b>材料と方法：</b> 1、乳牛（北海道：5戸、群馬県：1戸）と黒毛和種繁殖牛（宮崎県）の1戸についてサンプリングと調査をした。 2、牛の末梢血からDNAをQIAamp DNA Blood Mini Kitを用いて抽出し、BoLA-DRB3 exon-2領域を増幅するプライマーを用いて、semi-nested PCRで目的遺伝子を増幅した。このPCR産物に対して、制限酵素BstY Iで切断後2%アガロースゲル電気泳動にて、バンドパターンによりBoLA-DRB3*009:02 alleleの保有を確認した。 3、黒毛和種牛の血液サンプルについては、宮崎大学・関口准教授の研究グループにより解析され、BoLA-DRB3*009:02/ BoLA-DRB3*016:01保有の有無を確認した。 4、上記牛のBL抵抗性遺伝子保有状況を検査・確認 5、宮崎県の黒毛和種における抵抗性遺伝子保有状況 6、北海道ほB農場牛群におけるBL抵抗性遺伝子保有状況に基づいた父型家系の分析検討			

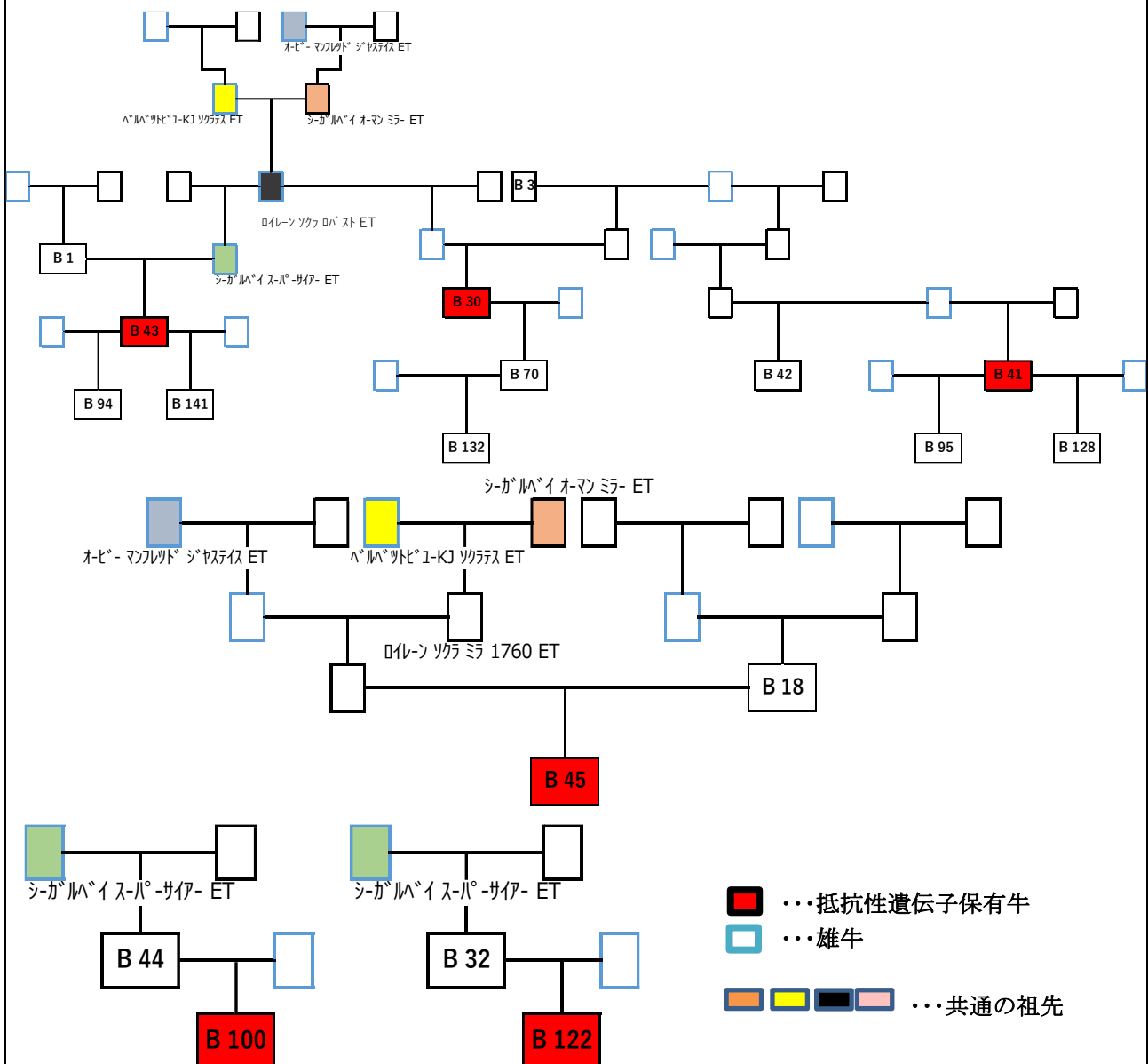
**結果：**

サンプルは、ホルスタイン牛（北海道 4 5 9 頭・群馬 30 頭）、宮崎県・繁殖黒毛和種 3 8 頭の合計 527 頭について解析をした。

本調査対象牛の中で BoLA-DRB3\*009:02 保有牛（ホルスタイン）は、14 頭確認され 15.6%(14/489)であった。また、その allele 保有牛を飼養している農家は、3 戸（A, B, E）であった（Table 1）。Table 1 に記載した農家 A は、高泌乳牛群を飼養し平均乳量 1300kg/頭/年以上で 20000kg 産乳する牛も使用されている。B 農場は、120 頭の飼養規模で平均乳量が 9700kg/頭/年、C 農場は、A と同様高泌乳牛を 200 頭規模で飼養し、一貫生産し外部からの牛の導入は無い。D 農場は、搾乳 150 頭で総数 300 頭規模で、平均乳量は 9250kg/頭/年である。E 農場は、北海道内の市場で購入した子牛を飼育している農場で、複数の農場由来の牛で牛群構成されている。A, B, C 牛群は、農場にて一貫生産され、雌牛の外部導入は無く血縁関係は精液からの遺伝子導入が唯一である。

ホルスタインで BoLA-DRB3\*009:02 allele について、検出された農家が限定されたことから、一貫生産された群構成と導入精液の系統に依存していることが推察された。この結果を受けて、農家 B が比較的多く BL 抵抗性遺伝子が確認されたことから、遺伝子保有牛の父型家系を調査した（Fig. 1）。

**Figure 1. Paternal lineage with BL-resistant Allele**



父型家系調査の結果から、シーガルベイスーパーサイアーET が共有して関係している事が確認された。この種雄牛の子孫に BL 抵抗性遺伝子保有牛がどの程度存在するのか、他の農場に調査を広げ関係性を検証したい。一方で、外部個体導入の無い一貫生産農場では、BL 抵抗性遺伝子を保有する個体が存在しない為、既存の牛群構成を変更することは困難であり、BLV の感染防御に傾注する必要がある。ちなみに C 農場は、その対策として初乳を加熱処理するパスチャライザーを設置し、BLV をはじめ垂直感染する疾病防御に取り組んで BLV の陽性個体数の低減効果が期待されている。

**Table 1. Sample size and Frequency of BoLA-DRB3\*009:02 allele in Cows**

Farm	Total	BoLA-DRB3*009:02		Frequency (%)
		allele		
		+	-	
A	206	3	203	1.46
B	139	9	130	6.47
C	88	0	88	0.00
D	30	0	30	0.00
E	26	2	24	7.69
M*	38	6	32	15.8
Total	527	20	507	3.8

\* Japanese Black (JB) cattle from Miyazaki

本調査では、宮崎県の繁殖黒毛和種について調査できた。この牛群は、BL 抵抗性遺伝子保有牛は 6 頭確認され、15.8%(6/38)となった。宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター（関口准教授）との共同研究により、Table 2 に示した様に BoLA-DRB3\*009:02 allele に対し、BL 感受性を示す DRB3\*016:01 遺伝子保有牛が 36.8%(14/38) 存在した。今後の牛群管理にこの知見を利用して、牛群に抵抗性保有牛の割合を増やす可能性が期待される。今後の改善に向けて、この農場主と管理獣医師と協議していきたい。

**Table 2. BoLA-DRB3\*009:02 allele in M farm**

Allele type	Pos. Nos.	Rate
DRB3*016:01	14	36.8 (14/38)
<b>DRB3*009:02</b>	6	15.8 (6/38)

まとめ： 北海道を中心とするホルスタイン乳牛を調べたところ、BL 抵抗性遺伝子保有牛は少なく、存在しない農場も 2 戸確認された。他の個体を導入しない一貫生産農場では、外部遺伝子が種雄牛に依存する事から、BL 抵抗性遺伝子保有牛から父親家系を調べたところ種雄牛シーガルベイスーパーサイアーET が共通要因として推察された。BL 抵抗性遺伝子とこの子孫に遺伝しているのかは、今後の確認が必要である。

宮崎県の繁殖黒毛和種牛群は、ホルスタインよりも効率に BL 抵抗性遺伝子保有牛が存在した事から、この家系の調査を進め、牛群構成の改善を管理獣医師と検討していきたい。

北海道の高泌乳牛を使用している農家は、独自のファミリーを維持し、外部個体を入れずに一貫生産している背景から、BL 抵抗性遺伝子を導入して牛群改良が困難な事例があることが確認され、牛群の感染防御対策に重きを置くことと合わせて、多様な対策が必要であることが示唆された。

※ 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。)

第 165 回日本獣医学会 司祭シンポジウム 2022 年 9 月  
 8 大学コンソ活動紹介 BL オンライン実習・酪農学園大学での取り組み事例紹介  
 萩原克郎、安藤達哉、蒔田浩平

7. 産業動物防疫リサーチセンターへ訪問した回数

(例)	氏 名	職名等	国 籍	訪問回数・合計日数	訪 問 時 期
	萩原 克郎	教授	日本	1 回・2 日	8 月
藤森 撰	学生	日本	1 回・2 日	8 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

施設名	動物種	飼育数	期間
BSL 3 施設			
獣医棟 P 2 動物実験室			
教育棟 P 2 動物実験室			

設備・機器類

(I) 獣医棟 3 階

部屋名	機器名	使用した延日数	
P 2 実験室	V301	フローサイトメーター (ライテクノロジー・ズ・ジャパン)	
		マイクロプレートリーダー (BioRad)	
		マイクロプレート洗浄装置 (Thermo WellWash)	
		NanoDrop 分光光度計 (Thermo ND-1000)	
		冷却遠心機 (KUBOTA 7780)	
		冷却遠心機 (Thermo)	
		卓上型冷却遠心機 (HITACHI)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		ハイブリオープン (タイテック)	
		オートクレーブ (平山製作所 HG-50)	
		自動核酸抽出装置 (magLead 12gC)	
	V304	ヒートブロック (アステック)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		卓上遠心機 (HITACHI)	
		MALDI Biotyper (BRUKER)	
	V308	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)	
		オートクレーブ (トミー精工、LSX-700)	
	V310	アイソレーター (マウス/ラット用) (Tokiwa T-BCC-Micro-M25)	
		オートクレーブ (HIRAYAMA HV-110)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
	V313	安全キャビネット (AIRTEC)	
	V314	デジタルカメラ付蛍光顕微鏡 (OLYMPUS DP74-SET-A)	
		CO <sub>2</sub> インキュベーター (ASTECS SCI-165D/APC)	
		倒立位相差顕微鏡 (OLYMPUS CKX41)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		オートクレーブ (平山製作所 HG-50)	
		卓上遠心機 (KUBOTA 5520)	
	V319	卓上冷却遠心機 (Eppendorf 5415R)	
		CO <sub>2</sub> インキュベーター (Thermo F370)	
安全キャビネット (AIRTEC)			
倒立蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000)			

			位相差顕微鏡 (OLYMPUS CK2)	
			超遠心機 (HITACHI CP80WX)	
	V323		安全キャビネット (AIRTEC)	
			スイングローター付遠心機 (HIRASAWA TE-HER)	
			インキュベーター (SANYO MIR-153)	
			卓上冷却遠心機 (ependorf 5415R)	
			紫外・可視分光光度計 (GE Healthcare GeneQuant100)	
			ヒートブロック (アステック)	
遺伝子 実験室	V303		ゲル・メンブラン撮影装置 (BioRad)	
			PCR 装置 (BioRad, Applied Biosystems)	
			多標識測定用プレートリーダー (ワラック社)	
			リアルタイム濁度測定装置 (テラメックス LoopampEXIA)	
			リアルタイム PCR 装置 (ABI, Quant Studio 3)	
			デジタル PCR (日本バイオラッド)	
	V306		卓上遠心機 (HITACHI CT6E)	
			卓上冷却遠心機 (HITACHI CT15RE)	
	V307		細菌検査用ホモジナイザー (オルガノ EXNIZER400)	
			シークエンサー (ABI3130, SeqStudio)	
試薬 調製室	V305		pH メーター (HORIBA)	
			デシケーター (ASONE)	
病理標本 作製室	V316		パラフィン包埋ブロック作製装置 (SAKURA)	
			手動回転式マイクロトーム (Leica MR2235)	
			密閉式自動固定包埋装置 (SAKURA)	
			卓上型ドラフト (明光メディカル)	
洗浄室	V318		超純水製造装置 (Milli-Q Advantage)	
			オートクレーブ (TOMY SX-500)	
			全自動洗浄機 (Miele PG858)	
滅菌室	V322		オートクレーブ (TOMY、平山製作所)	
			高純水製造装置 (Merck)	
			全自動血球計数器 (日本光電工業)	
微生物 保存室	V324		液体窒素保存容器 (太陽日酸株, アステック)	
			超低温槽 (Thermo REVC0 TSX400G)	

(II) 獣医寄生虫病学研究

部 屋 名		機 器 名	使用した延日数
獣医寄生虫病学研究室	H212	核酸抽出自動化装置 (QIAcubr)	

## (Ⅲ) 産業動物伝染病防疫学研究室

教員院生学 生実験室	V516	オートクレーブ(平山製作所 HV-50LB)	2日
		安全キャビネット(AIRTEC BHC-100011A)	3日
		卓上遠心機(LMS MCF-2360)	3日
		卓上ボルテックスミキサー(MyLab SLV-6)	3日

## (Ⅳ) 産学・地域連携センター

JA 宮崎経済 連宮崎オフ イス	共同研 究スペ ース	Droplet Reader (BIO-RAD QX 200™)	3日
		Automated Droplet Generator (BIO-RAD)	3日
		PCR Plate Sealer (BIO-RAD PX1™)	3日
		サーマルサイクラー (BIO-RAD C1000 Touch™)	3日
		卓上プレート遠心機 (TOMY PS-020)	3日
		卓上遠心機 (AS ONE HSC-96A)	3日
		卓上ボルテックスミキサー (Lab Companion VM-96A )	3日
		安全キャビネット (AIRTECH K3800-2009 )	3日

## (Ⅴ) 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	
	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		