

5 牛鼻炎Aウイルス検出を目的としたリアルタイムPCR系の比較検討

中央家畜保健衛生所

○小泉 舜史郎

1 はじめに

牛鼻炎Aウイルス (Bovine rhinitis A virus 以下BRAV) はピコルナウイルス科アフトウイルス属のウイルスで、経済的な損害が甚大な牛呼吸器病症候群 (BRDC) の発症に関与するとされている¹⁾。しかし、BRAVに関する詳細な調査研究は行われておらず、スクリーニングPCR系も確立されていない¹⁾。そこで、より迅速に正確な病性鑑定結果を得るため、文献として確認できた2つのPCR系の感度及び特異度を比較検討することで、スクリーニングPCR検査に適用可能かを確認した。

2 検討を行うPCR系について

既報のHauseらの系(A系)²⁾、Kishimotoらの系(B系)³⁾について検討を行った。両系ともに5'ヌクレアーゼ法を用いたリアルタイムPCR系である。A系のプローブのクエンチャーは原著ではIowa Blackであり、購入できるメーカーが限られていたことから、TAMRAに変更して検討を実施した。プライマー及びプローブの配列は図1に示したとおりである。

2つのPCR系について

A系 *Hause et al. , 2015*

フォワードプライマー: 5'-CTT TTC GGT GTG ATT GGC AG-3'

リバースプライマー: 5'-GAA ATC TAT CAG GGC AGG TCT G-3'

プローブ: 5'-FAM-CGG CAG TCC AGG TCC AGT GT- **TAMRA** -3'

B系 *Kishimoto et al. , 2017*

フォワードプライマー: 5'-CAC CTG AAC TAT GGA CTT GG -3'

リバースプライマー: 5'-CAC GGC CTC AAT CAT CTG-3'

プローブ: 5'-FAM-GAC GTG GAC TGG CAC CAG TTT GC-TAMRA-3'

- ともに5'-ヌクレアーゼ法による
- A系のクエンチャーはIowa BlackからTAMRAに変更

図1 プライマー及びプローブ配列

3 使用機器、試薬、反応条件及び反応液について

上記については図2に示した通りである。

材料と方法: 機器、試薬、反応条件、反応液

機器



7500 Fast System (Applied Biosystems)

試薬



TaqMan® RNA-to-Ct™ 1-step Kit
(Applied Biosystems)

反応条件

逆転写	48°C	15min	}	40cycle
酵素活性化	95°C	10min		
解離	95°C	15sec		
アニール、伸長	60°C	1min		

反応液

TaqMan®RT-PCR Mix (2x)	5µL
フォワードプライマー (10µM)	0.05~0.9µL
リバースプライマー(10µM)	0.05~0.9µL
プローブ(10µM)	0.05~0.25µL
TaqMan®RT Enzyme Mix (40x)	0.25µL
RNase-free H ₂ O	up to 10µL
鋳型RNA/DNA	0.5µL

図2 使用機器、試薬、反応条件、反応液

4 材料と方法

(1) 至適プライマー濃度の検討

フォワード及びリバースプライマーをそれぞれ3種類の濃度(最終濃度 50、300、900nM)で組み合わせ、プライマー濃度が異なる9種類の反応液を作成した。これらの反応液を用いて、BRAVに分類されるSd-1株の培養上清から抽出したRNAを鋳型としてリアルタイムPCRを実施し、各反応液のCt値を比較することで至適プライマー濃度を決定した。

(2) 至適プローブ濃度の検討

プローブ濃度が異なる5種類(最終濃度 50、100、150、200、250nM)の反応液を作成し、Sd-1株から抽出したRNAを鋳型としてPCRを実施し、各反応液のCt値を比較することで至適プローブ濃度を決定した。この検討は4の(1)で決定した至適プライマー濃度の下で実施した。

(3) 検出限界の比較

図3のとおり希釈したSd-1株の培養上清(力価はMDBK細胞で測定)からRNAを抽出し、それを鋳型にリアルタイムPCRを実施し、検出限界を比較した。PCRは4の(1)、(2)で決定した至適プライマー濃度及び至適プローブ濃度の下で実施した。

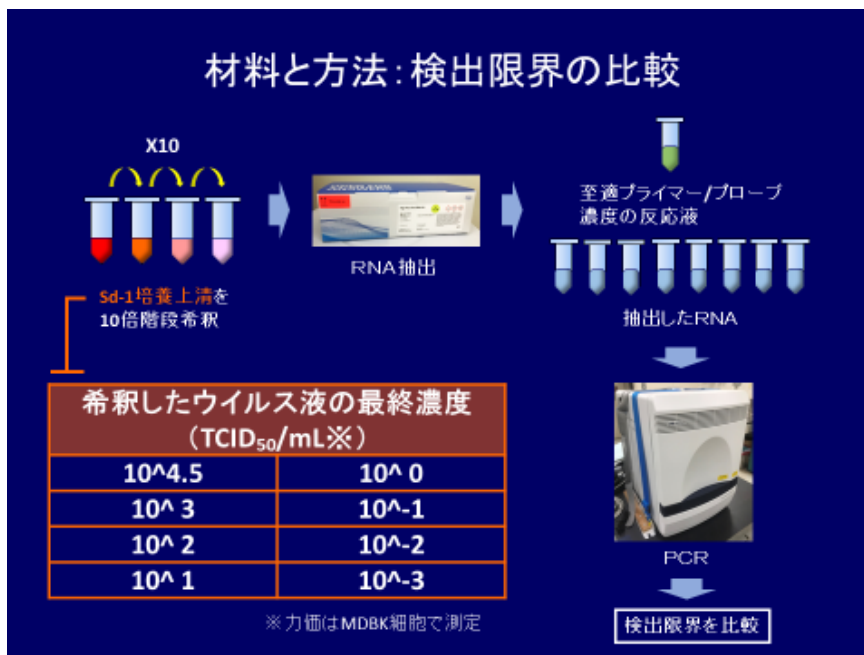


図3 検出限界の比較

(4) BRDC 関連ウイルス PCR

7種類のBRDC関連ウイルス(牛アデノウイルス、牛コロナウイルス、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛パラインフルエンザウイルス3型、牛RSウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルスI型、牛ウイルス性下痢ウイルスII型)のDNA又はRNAを用いてリアルタイムPCRを実施、非特異反応の有無を確認した。用いたウイルスの株名については図4に示したとおりである。



図4 BRDC 関連ウイルス PCR

(5) BRAV 陽性サンプル PCR

今回の2つの系とは別の系のプライマーを用いた PCR で、BRAV 遺伝子陽性が確認されている、2019年の3月に採材された鼻腔スワブ4検体及び2018年の4月に採材された肺1検体の10%乳剤から抽出したRNAを鋳型にPCRを実施し、両系でも検出可能か確認した。なお、鼻腔スワブ4検体(No. 1~4)は同じ牛群、肺1検体はこれとは別の牛群から採取した検体である。

5 結果

(1) 至適プライマー濃度の検討

A系ではフォワード及びリバースプライマーの最終濃度がともに900nMの時にCt値が最小になり、B系ではフォワードプライマーの最終濃度が900nM、リバースプライマーの最終濃度が300nMの時にCt値が最小になったため、それぞれこの濃度をプライマー至適濃度とした。

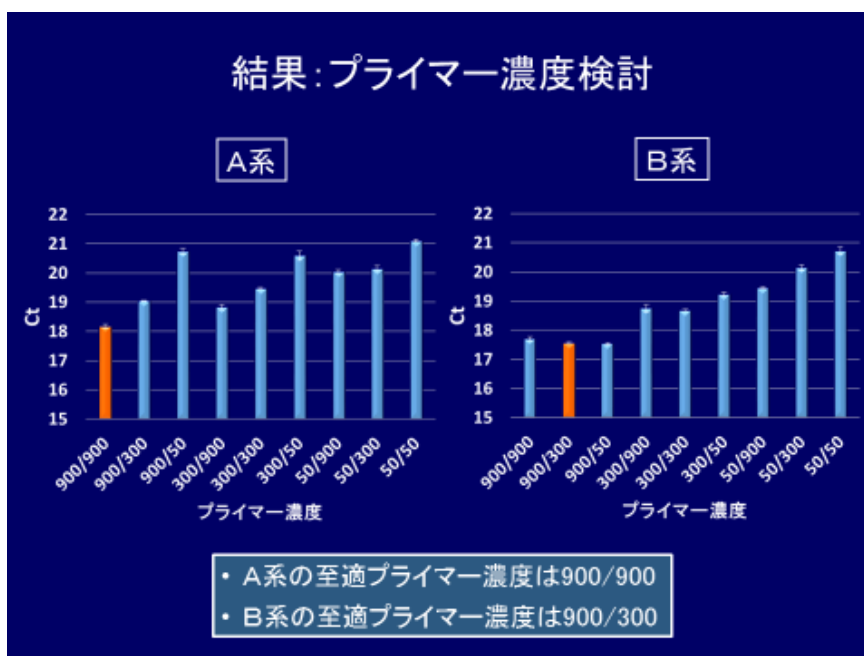


図5 プライマー濃度検討結果

(2) 至適プローブ濃度の検討

A系、B系ともにプローブの最終濃度が250nMの時にCt値が最小になったため、この濃度を至適プローブ濃度とした。

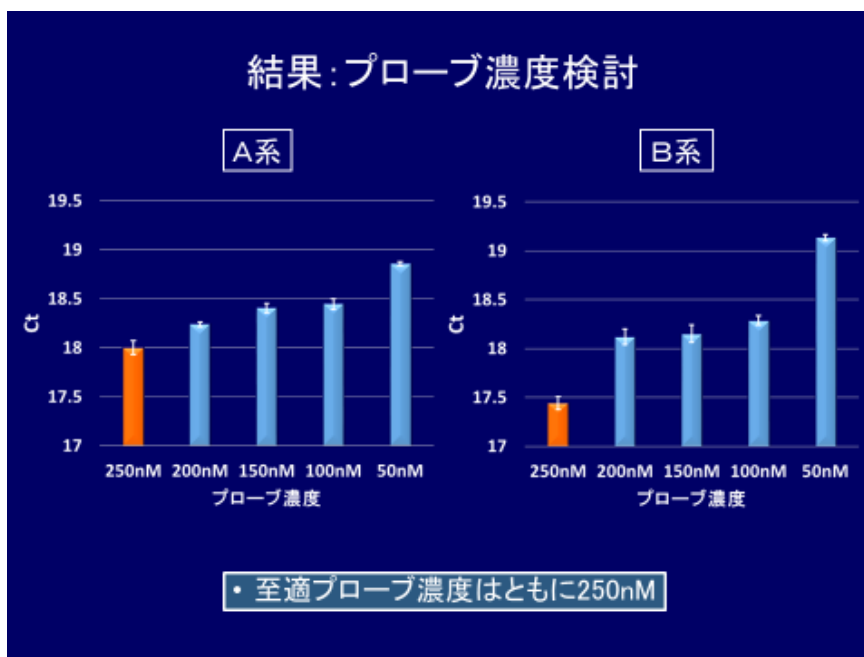


図6 プローブ濃度検討結果

(3) 検出限界の比較

A系では 10^3 TCID₅₀/mL のウイルス液から抽出した検体まで検出された。B系では 10^{-1} TCID₅₀/mL のウイルス液から抽出した検体まで検出された。



図7 検出限界の比較

(4) BRDC 関連ウイルス PCR

A系、B系ともに、すべての検体が検出限界未滿であり、非特異反応は認められなかった。

(5) BRAV 陽性サンプル PCR

A系では鼻腔スワブ2、肺1で遺伝子が検出された。B系では全て検出限界未滿であった。

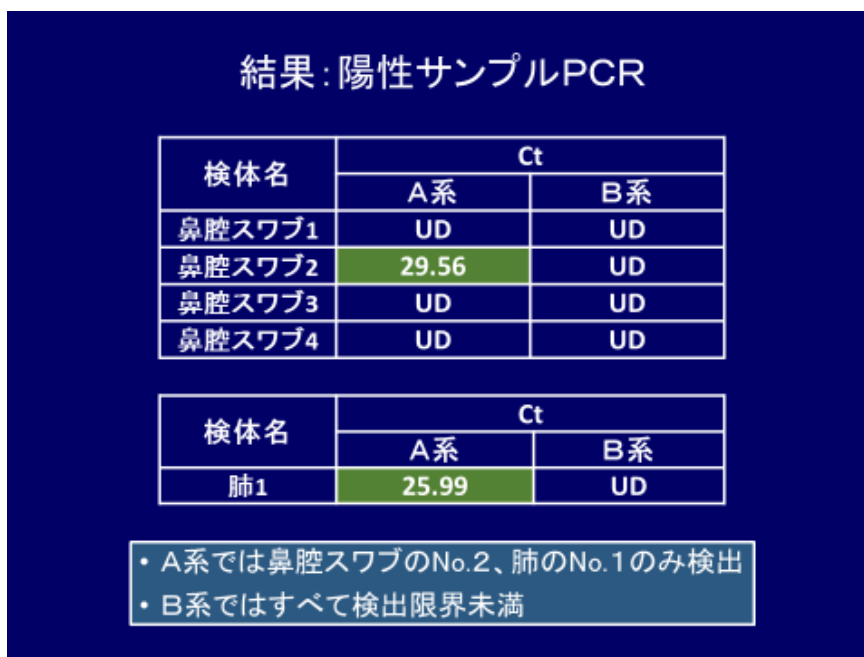


図8 BRAV 陽性サンプルPCR

6 考察とまとめ

(1) 感度について

A系は 10^7 TCID₅₀/mLの検体を検出できなかったことから、MDBK細胞での分離よりも感度が低いと考えられた。一方、B系では 10^{-1} TCID₅₀/mLが検出限界であったことから、MDBK細胞での分離よりも感度が高いと考えられた。これらから、B系の方が、スクリーニングPCRに適していると考えられた。しかし、BRAV陽性サンプルを用いたPCRでは、A系が5検体中2検体陽性であったのに対し、B系は全検体陰性となり、感度が逆転した。このことから、B系をスクリーニング検査に用いた場合、すり抜けが起こる可能性があるかと判明した。

(2) 特異度について

両系ともBRDC関連ウイルスに対する非特異反応は確認されず、特異度の面で差は見られなかった。

(3) まとめ

前述した考察と総合すると、A系、B系ともスクリーニング検査に用いるには感度の面で課題があると判明した。

また、感度の逆転が起こった原因としてBRAVの遺伝子変異が考えられた。国内におけるBRVに関する調査研究は長らく実施されておらず、近年日本で分離された株のゲノム情報は十分集積されていない。分与や購入で手に入れられる株も1960~80年代に分離された株であり、今回検討に用いたSd-1も1962年に分離された株⁴⁾である。このような理由からプライマーの設計も数十年前の株のゲノム情報を参考に行わざるを得ないのが現状であり、古い情報をもとに設計したプライマーでは現在流行している変異が進んだウイルスの遺伝子を検出できないのではないかと考えられた。

今回の検討結果を受け、追加試験として1972年に分離されたM-17株⁵⁾及び1984年に分離された

H-1 株⁶⁾、2016 年度から 2018 年度に採材された野外陽性検体について、B 系を用いて PCR を実施したところ、分離年代の古い M-17 株及び H-1 株は検出可能であったが、野外陽性検体は全検体陰性となった。この結果から も遺伝子の変異が示唆された。

7 今後

今回の検討結果から、スクリーニング PCR 系を確立するためには、野外の BRAV を収集し、ゲノム情報を集積することが必要であると考えられた。その情報をもとに、特に保存された遺伝子領域をターゲットにしたプライマーを設計し、より多くの BRAV を検出できる系を樹立することを目指す。

8 謝辞

今回の検討を行うにあたり、助言、ご指導頂いた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越境性感染症研究領域口蹄疫ユニットの深井克彦先生、森岡一樹先生、西達也先生に深謝いたします。

9 参考文献

- 1) 農林水産省消費・安全局監修：病性鑑定マニュアル第 4 版, 2016
- 2) Ben M. Hause *et al.*: Bovine Rhinitis Viruses Are Common in U.S. Cattle with Bovine Respiratory Disease, PLoS ONE. 10(3), 2015
- 3) Kishimoto M *et al.*: Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex, J. Vet. Med. Sci. 79(3): 517-523, 2017
- 4) Bögel K: Bohm H. Ein rhinovirus des rindes. Zentralbl Bakteriolog Orig. 193: 2-14, 1962
- 5) Shimizu Y *et al.*: Isolation of a bovine rhinovirus from calves with respiratory disease, Natl Inst Anim Health Q. 14: 35-41, 1974
- 6) Yamashita H *et al.*: Isolation of a new serotype of bovine rhinovirus from cattle. Arch Virol. 83: 113-16, 1984