

8 牛鼻炎 A ウイルスを標的とした新規コンベンショナル PCR 系の設計及び検討

中央家畜保健衛生所

○小泉 舜史郎

1 背景と目的

牛鼻炎 A ウイルス (BRAV) は、エンベロープを持たない球形の一本鎖 RNA ウイルスであり、口蹄疫ウイルス、馬鼻炎 A ウイルス、牛鼻炎 B ウイルスと同じピコルナウイルス科アフトウイルス属に分類される。また、BRAV はその抗原性から BRAV1 並びに BRAV2 の 2 つの血清型に分類される。BRAV は 1962 年に鼻炎を呈した子牛からはじめて分離されて以来¹⁾、呼吸器症状を引き起こす病原体として注目を浴び、1968 年から 85 年にかけてイギリス、日本、イタリア、アメリカなど、各国で分離報告がなされるなど活発な研究がなされていた。しかし、ウイルス性状について調査が進められるにつれ、健康牛からも分離されるなど病原性が比較的低いことが判明したため徐々に研究が下火となり、1980 年代以降 BRAV に関する報告がほとんどなくなっていた^{2), 3) 4), 5)}。

時代は進み 2010 年代に入り、次世代シーケンサーが多くの研究分野で活用されはじめ、検査項目に縛られない網羅的な解析が可能となった。牛呼吸器病症候群 (BRDC) 研究の分野においても次世代シーケンサーを活用した病原体保有状況調査が行われるようになり、その結果 BRDC 発症牛の方が健康牛よりも優位に BRAV を保有していることが判明した。これを契機に BRAV は BRDC 発症への関与が示唆される病原体として再注目を集めるようになった^{6), 7)}。

このような背景から、BRDC を疑う事例の病性鑑定において、BRAV を改めて検査パネルに組み込み、詳細に調査することが求められるようになってきている。しかし、BRAV 研究が数十年間停滞していたため、診断手法も大きな進歩がなく、BRAV を標的とする標準的な PCR 系は存在していない。そこで、既報の PCR 系^{8), 9)} について感度及び特異度の検討を行ったところ、近年の野外株 (流行株) を検出できない事例が複数認められた¹⁰⁾。その原因として流行株のゲノム情報不足が考えられたため、今回は PCR 系の改良を目的として、①流行株のゲノム情報の更新、② 更新ゲノム情報をもとにした新規プライマーの設計、③新規プライマーを用いた新規 PCR 系の感度・特異度検討を行った。

2 材料と方法

(1) 試薬及び機器

プライマー設計には Primer-BLAST¹¹⁾ を用いた。また、核酸抽出には High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche diagnostics) を用いた。RT-PCR には Super Script III One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen) 及び T100TM (BIORAD) を用いた。リアルタイム PCR には TaqMan RNA-to-Ct 1step Kit (Applied Bio Systems) 及び Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Bio Systems) を用いた。

(2) ゲノム情報の更新

既にゲノムデータベース¹²⁾に登録されている 8 種類の BRAV ゲノム情報を参考に、3d 遺伝子領域を標的としたシーケンス用プライマーを 3 種設計した。これらのプライマーを用いて、平成 29～令和元年度に呼吸器症状を呈した牛から採取した鼻腔スワブまたは肺乳剤(病鑑検体)計 47 検体から抽出した核酸を鋳型に RT-PCR を実施した。さらに、RT-PCR で特異的な遺伝子増幅が認められた場合は、ダイレクトシーケンスにより得られた PCR 産物の塩基配列を決定した。ダイレクトシーケンスは農研機構動物衛生研究部門に実施を依頼した。

(3) 新規プライマー設計

既存のゲノム情報及び(1)の結果を参考に、特に保存性の高い遺伝子領域を検索し、その領域を標的とした新規プライマーを作成した(表 1)。

表 1 新規プライマー

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer 6550-6570	ATGATTGAGGCCGTGTTCTCG	21	60.74	52.38	4	2
Reverse primer 6801-6782	GTCGTCCCATAAGCAACCA	20	60.04	55	2	0
Product length						252

(4) 新規 PCR 系の感度・特異度検討

新規プライマーを用いた PCR 系(新規系)により、ウイルス力価(TCID₅₀)が判明している BRAV2 株(M-17、H-1)から抽出した核酸の希釈列を鋳型に RT-PCR を実施し、検出限界を検討した。サンプル数はそれぞれの力価につき 3 つとし(Triplicate)、そのうち 1 つでも遺伝子増幅が認められればその力価を検出可能とした。また、BRDC 関連ウイルス(表 2)培養上清から抽出した核酸を鋳型に RT-PCR を実施し、非特異反応の有無を確認した。さらに病鑑検体から抽出した核酸を鋳型に RT-PCR を実施し流行株の検出率を既報の 2 系と比較した。PCR 試薬の組成及び反応条件は図 1 に示したとおり。

表 2 BRDC 関連ウイルス

ウイルス名	略称	株名
牛アデノウイルス	BAdV	袋井
牛伝染性鼻気管炎ウイルス	BHV1	758
牛コロナウイルス	BCV	Mebus
RSウイルス	RSV	MNK7
牛パラインフルエンザウイルス 3 型	PIV3	BN-1
牛ウイルス性下痢ウイルス I 型	BVDV I	Nose
牛ウイルス性下痢ウイルス II 型	BVDV II	KZ-91CP
D型インフルエンザウイルス	FluD	D/bovine/Yamagata/10710/2016

新規PCR系		既報PCR系	
抽出キット: High Pure Viral Nucleic Acid Kit(Roche)		抽出キット: High Pure Viral Nucleic Acid Kit(Roche)	
PCR試薬: Super Script III One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen)		PCR試薬: TaqMan RNA-to-Ct 1step Kit(Applied Bio Systems)	
PCR試薬組成(1検体分)		PCR試薬組成(1検体分)	
Sterile purified water	3.7 μ l	Sterile purified water	0.7or1.3 μ l
2 \times Reaction Mix	5 μ l	TaqMan RT-PCR Mix(2x)	5 μ l
Forward Primer (10 μ M)	0.2 μ l	Forward Primer (10 μ M)	0.9 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	0.2 μ l	Reverse Primer (10 μ M)	0.9or0.3 μ l
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	0.4 μ l	Probe(10 μ M)	0.25 μ l
Template	0.5 μ l	TaqMan RT-Enzyme Mix(40x)	0.25 μ l
Total	10 μ l	Template	2 μ l
PCR条件		PCR条件	
55 $^{\circ}$ C	30 min	48 $^{\circ}$ C	15 min
94 $^{\circ}$ C	2 min	95 $^{\circ}$ C	10 min
94 $^{\circ}$ C	15 sec	95 $^{\circ}$ C	15 sec
60 $^{\circ}$ C	30 sec	68 $^{\circ}$ C	1 min
68 $^{\circ}$ C	16 sec	40cycle	
68 $^{\circ}$ C	5 min		
4 $^{\circ}$ C	∞		

図 1 PCR 試薬組成及び反応条件

3 結果

(1) ゲノム情報の更新

シーケンス用プライマーを用いたダイレクトシーケンスにより、計 16 種類、9 株の BRAV に類似した塩基配列が決定された(図 2)。

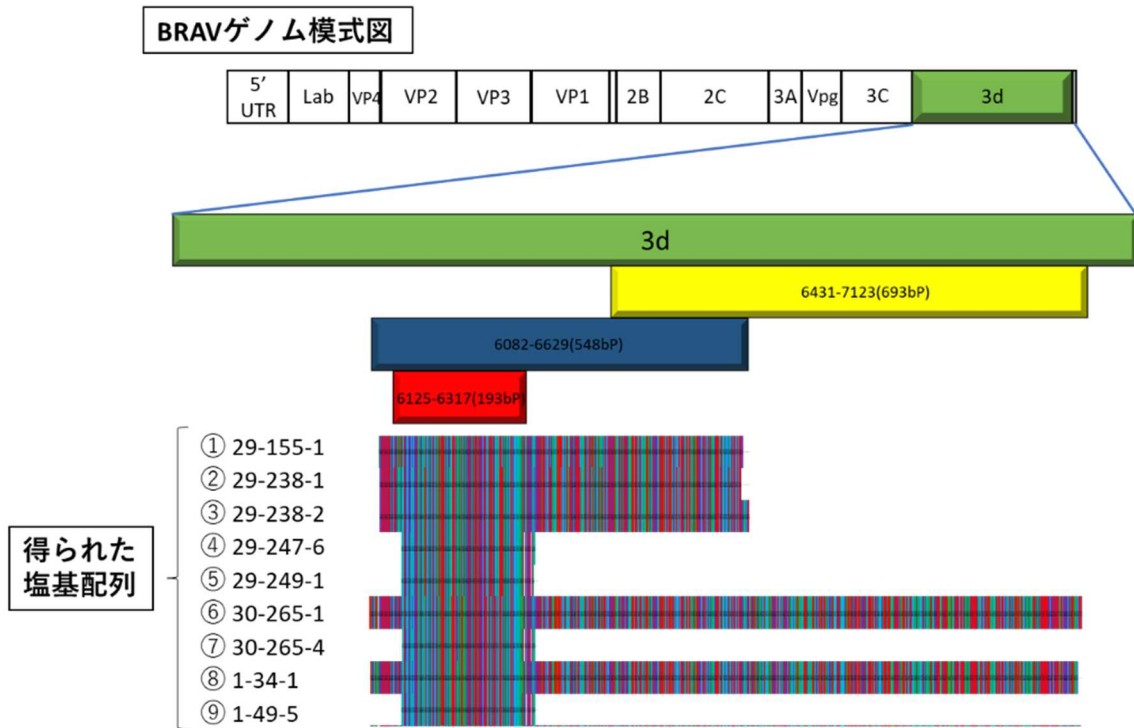


図 2 流行株の塩基配列

(2) 新規プライマー設計

3d 遺伝子領域のうち、特に保存性が高い領域を標的としたプライマーを作成した(図 3)。

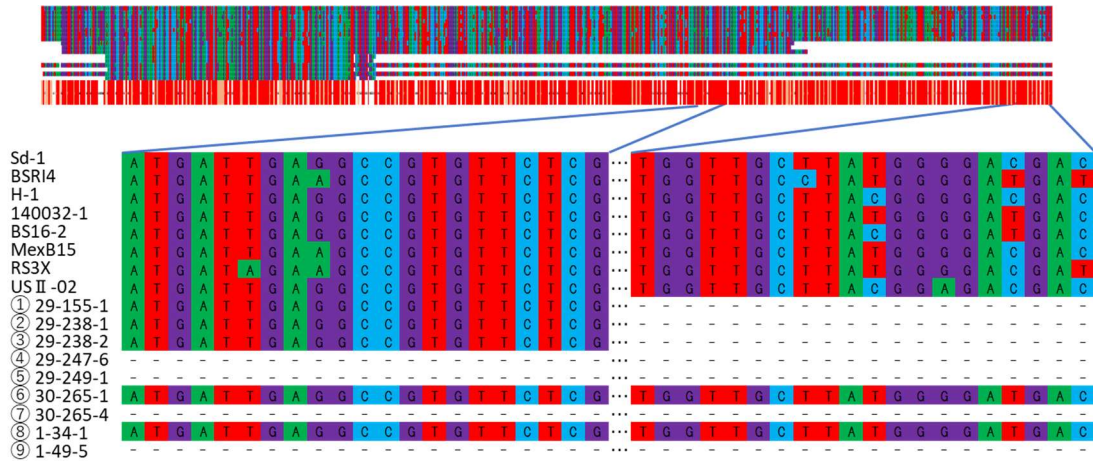


図 3 プライマー標的部位；最上段が BRAV の塩基配列を並列したもので、直下の赤い帯が特に保存性が高い領域を示す。最下段が各株のプライマー標的部位を拡大した図。

(3) 新規 PCR 系の感度・特異度検討

新規系の検出限界は M-17 で $2 \times 10^{-5} \text{TCID}_{50}$ 、H-1 で $2 \times 10^{-6} \text{TCID}_{50}$ であった (図 4)。

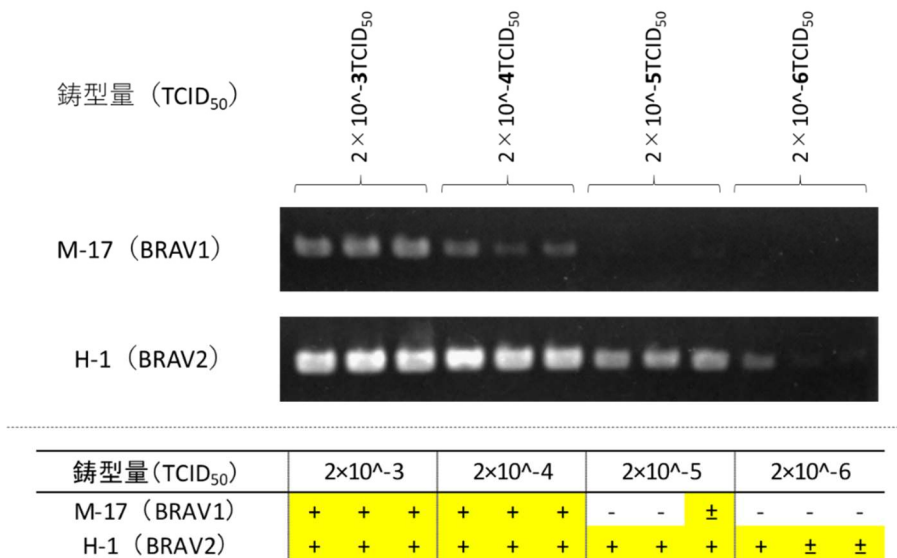


図 4 検出限界検討

また、BRDC 関連ウイルスへの非特異反応は確認されなかった (図 5)。

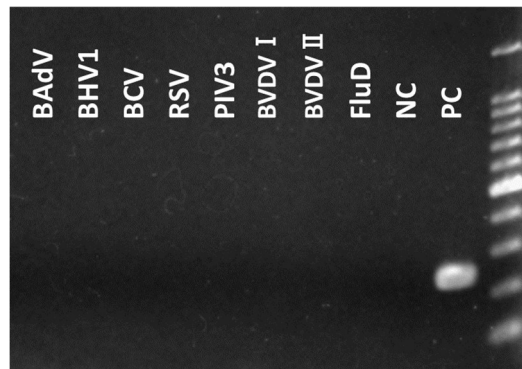


図 5 特異度検討

流行株は、新規系で 6 事例 11 検体、Hause らの系で 3 事例 3 検体検出され、Kishimoto らの系では検出されなかった (図 6)。

年度-病鑑番号-個体番号	新規系	Hause <i>et al.</i>	Kishimoto <i>et al.</i>
29-155-1	+	22.61	UD
29-238-1	+	UD	UD
29-238-2	+	UD	UD
29-247-6	+	UD	UD
29-249-1	+	UD	UD
29-249-3	+	UD	UD
30-265-1	+	UD	UD
30-265-2	+	23.05	UD
30-265-3	+	UD	UD
30-265-4	+	UD	UD
1-34-1	+	23.84	UD

図 6 流行株検出率比較

4 考察

今回、新規系は既報の系よりも多くの流行株の検出が可能であり、ウイルス分離以上の感度 (ITCID₅₀) を有していたことから、ゲノム情報の更新により高感度 PCR 系を新たに構築できたと考えられた。また、高い感度を有することから、病性鑑定の際のスクリーニング検査に適用可能であると考えられた。従来の抗原検査はウイルス分離が主流であり¹³⁾、結果判明まで数日から数週間を要したが、新規系をスクリーニング検査に活用した場合、結果判明までの時間を最短 4 時間まで短縮することが可能となった。また、従前は抗原検査陰性となっていた事例についても、PCR により抗原の存在が証明できる可能性があり、病性鑑定の精度向上が期待された (図 7)。

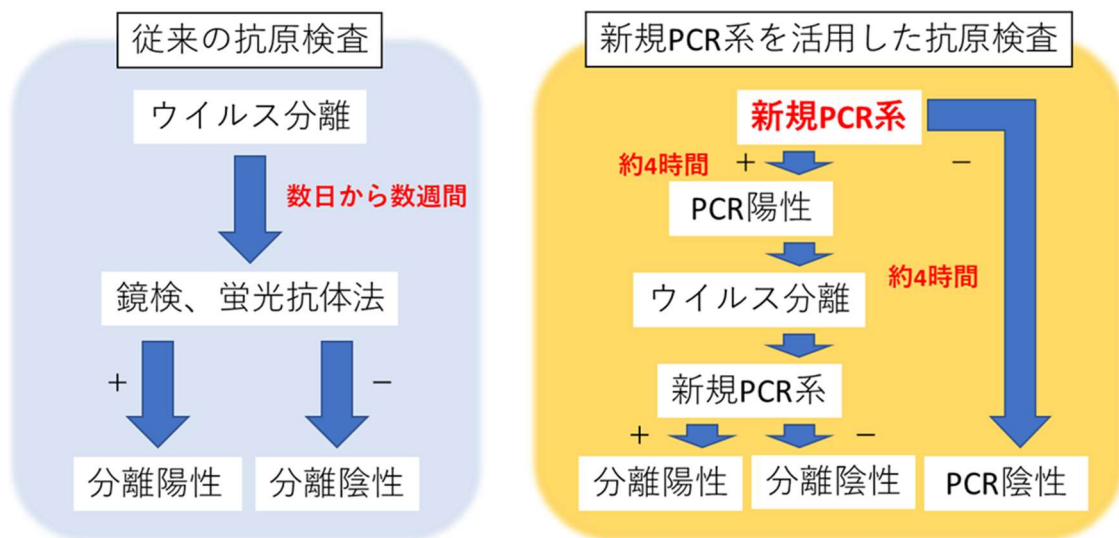


図 7 スクリーニング検査に新規系を活用した場合の検査フロー

さらに、従前はウイルス分離の判定を鏡検または蛍光抗体法で実施していたが¹³⁾、鏡検では細胞変性効果 (CPE) を起こさない株を検出できない、蛍光抗体法では BRAV に特異的な抗体を準備する手間がかかる等の問題があった。しかし、この新規系をウイルス分離の判定に活用した場合、これらの問題を解決でき、病性鑑定の精度向上と効率化が期待された(図 8)。

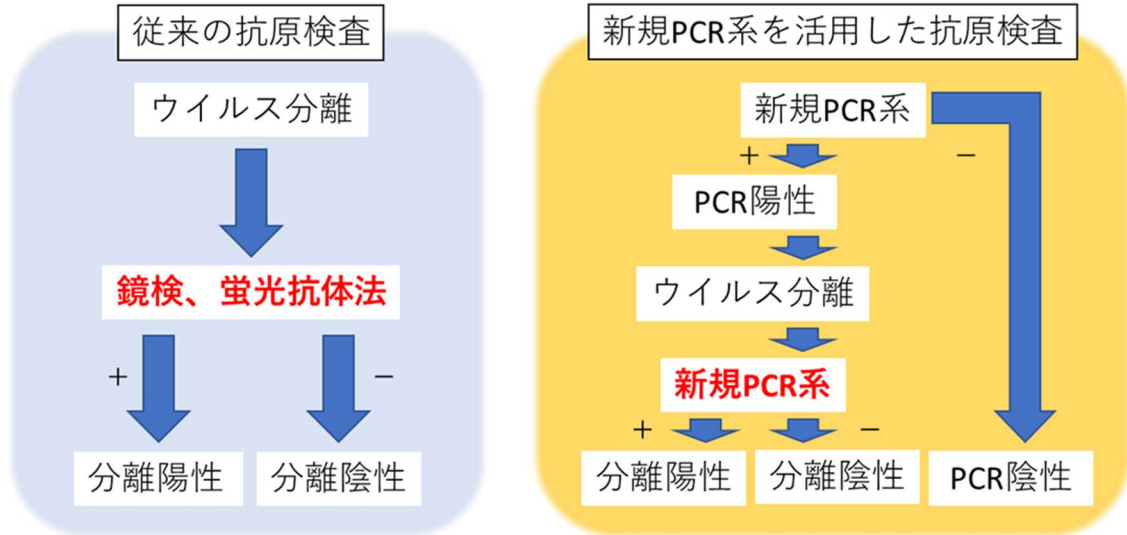


図 8 ウイルス分離の判定に新規系を活用した場合の検査フロー

5 今後

今回、ゲノム情報を更新することでよりユニバーサルなプライマーを作成することに成功した。このことから、研究が下火となっていた 1980~2010 年代の数十年間に BRAV のゲノムが多様化していることが改めて示唆された。これに伴い病原性、抗原性も変化している可能性があるため、今後は新規系を活用してウイルスの分離を進め、ウイルス性状の解析を行っていき、BRAV が BRDC 発症にどのように関与しているかを調査していく必要があると考える。

6 謝辞

今回の実験を行うにあたり、助言ご指導いただいた農研機構動物衛生研究部門越境性感染症研究領域 口蹄疫ユニット深井克彦先生、森岡一樹先生、西達也先生、加藤友子先生に深謝いたします。

7 参考文献

- 1: Bögel K, Bohm H. Ein rhinovirus des rindes. Zentralbl Bakteriolog Orig. 1962
- 2: Ide PR, Darbyshire JH. Rhinoviruses of bovine origin. Br Vet J. 1969; 125: 7-8.
- 3: Mohanty SB, Lillie MG. Isolation of a bovine rhinovirus. Proc Soc Exp Biol Med. 1968; 128: 850-852.
- 4: Persechi A. Isolation and characterization of rhinoviruses from calves. Acta Med Vet. 1974; 20: 333-358.
- 5: Shimizu Y, Narita M, Murase N. Isolation of a bovine rhinovirus from calves

with respiratory disease. Natl Inst Anim Health Q. 1974; 14: 35-41.

6: Zhang M, Hill JE, Fernando C, Alexander TW, Timsit E, van der Meer F, et al. Respiratory viruses identified in western Canadian beef cattle by metagenomic sequencing and their association with bovine respiratory disease. Transbound Emerg Dis. 2019; 66:1379-86.

7: Ng TFF, Kondov NO, Deng X, Van Eenennaam A, Neiberghs HL, Delwart E. A metagenomics and case-control study to identify viruses associated with bovine respiratory disease. J Virol. 2015; 89:5340-9.

8: Hause BM, Collin EA, Anderson J, Hesse RA, Anderson G. Bovine rhinitis viruses are common in U.S. cattle with bovine respiratory disease. PLoS ONE. 2015; 10:1-12.

9: 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. 2017; 79(3): 517-523,

10: 埼玉県調査研究成績報告書(家畜保健衛生業績発表集録)第 61 報(令和 元 年度)

11: Primer-BLAST; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

12: National Center for Biotechnology Information; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

13: 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