

10 マルチプレックスリアルタイム PCR を活用した

牛呼吸器病ウイルス遺伝子検査の効率化

東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所

○ 齋藤 豪 林 敏展
奈良 史子 木村 祐介
加藤 直子 佐藤 尚人
森山 泰穂 渡部 巖

1 背景

牛呼吸器病症候群（以下、BRDC）は、ウイルス、細菌、飼養環境など複数の要因が絡み合い発症する¹⁾。このため、臨床症状から原因を特定することが難しく、発生後の治療や予防のためには検査による病原体の迅速な特定が重要となる。また、牛に呼吸器病を引き起こすウイルスは非常に種類が多く、従来から広く知られているウイルスに加え、近年では牛トロウイルス（以下、BToV）やD型インフルエンザウイルス（以下、IDV）等も牛呼吸器病への関与が指摘されている²⁾。

現在、当所における牛呼吸器病ウイルスの遺伝子検査は、牛ウイルス性下痢ウイルス（以下、BVDV）、牛RSウイルス（以下、BRSV）、牛伝染性鼻気管炎ウイルス（以下、IBRV）、牛アデノウイルス（以下、BAdV）、牛コロナウイルス（以下、BCV）、牛パラインフルエンザ3型ウイルス（以下、BPIV3）の6種類のウイルスを標的として個別にPCR（以下、従来法）

を実施している。上記のように、BRDCの治療や対策をするには、迅速な病原体の特定が重要となるが、従来法ではPCR反応、泳動、染色、判定を6種類それぞれについて実施し、ウイルスによってはPCR反応に加え、逆転写反応を行う必要があるため、非常に時間がかかる。

そこで今回、既報³⁾の牛呼吸器病ウイルスを同時に検出する、マルチプレックスリアルタイムPCR（以下mrPCR法）について実用化を検討したので、その概要について報告する。

2 mrPCR法

mrPCR法は図1に示すように、1検体につき4種類ずつのプライマー、プローブセットを、2セット反応させることで8種類のウイルスについて一度に検出する。今回対象としたウイルスは、従来法で対象とした6種類にBToV、IDVを加えた8種類とした。

また、リアルタイムPCR法であるため泳動、染色の必要が無く、陽性となったウイルスの

遺伝子量についてある程度推察することができる。

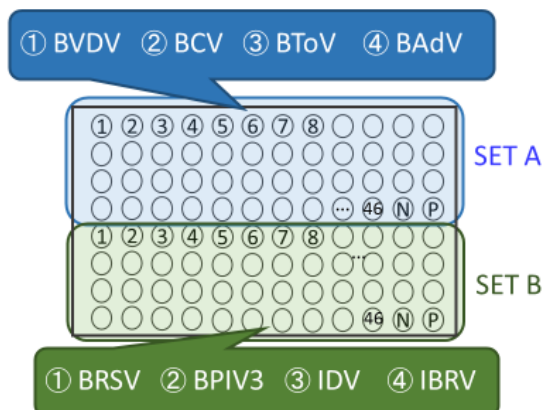


図1 mrPCR法の模式図

3 材料と方法

(1) 材料

ア 陽性対照

BVDV、BRSV、IBRV、BAdV、BCV、BPIV3、BToV についての力価が確認されているウイルス液を用いた。

イ 野外材料

過去に牛呼吸器病についての病性鑑定依頼のあった材料 77 検体（鼻腔スワブ 74 検体、肺 3 検体）について用いた。

ウ PCR 試薬

従来法では OneStepRT-PCR kit(QIAGEN)、HotStarTaq Plus Master Mix kit(QIAGEN) を、mrPCR 法では QuantiNova pathogen +IC Kit(QIAGEN) を用いた。

エ PCR 機器

従来法では AppliedBiosystems Proflex PCR System(ABI) を、mrPCR 法では AppliedBiosystems 7500 RealTimePCR System(ABI) を用いた。

オ プローブ

mrPCR 法に用いたプローブの詳細は表 1 に示すとおりで、今回使用した PCR 試薬・

機器に適したリポーター・クエンチャーをターゲットごとに選択して用いた。

表 1 プローブ詳細

Target	Reporter/Quencher	Reference
BVDV	CY5 / BHQ-3	OIE manual ⁴⁾
BCV	TAMRA / BHQ-2	Kishimoto, M ら ⁵⁾
BToV	JOE / BHQ-1	Tsuchiaka, S ら ⁶⁾
BAdV	FAM / BHQ-1	Wong, K ら ⁷⁾
BRSV	FAM / BHQ-1	Boxus, M ら ⁸⁾
BPIV3	VIC / NFQ-MGB	Horwood, P ら ⁹⁾
IDV	TAMRA / BHQ-2	Kishimoto, M ら ⁵⁾
IBRV	CY5 / BHQ-3	Wernike, K ら ¹⁰⁾

(2) 方法

ア 検出限界の比較

各ウイルスの陽性対照の 10 倍階段希釈系列を作成し、それぞれ従来法と mrPCR 法の検出限界を比較した。

イ 検査結果の比較

過去に牛呼吸器病の病性鑑定依頼があった材料について、従来法と mrPCR 法の結果を比較した。

また、ウイルス分離検査と mrPCR 法の結果の関連性、抗体検査と mrPCR 法の結果の関連性について調べた。

ウ 検査時間・費用の比較

従来法と mrPCR 法の 1 検体あたりの検査時間・費用を比較した。

4 結果

(1) 検出限界の比較

陽性対照ウイルスの元々の力価と各ウイルスの検出限界については表 2 のとおりで、BToV、BAdV では従来法が mrPCR 法より

10 倍低い力価まで検出され、BRSV では mrPCR 法が従来法より 100 倍低い力価まで検出された。

また、他のウイルスでは両法の検出限界に差は見られず、各ウイルスで少なくとも 10^3 TCID₅₀/ml まで検出された。

表 2 検出限界の比較

陽性対照ウイルス	力価 (TCID ₅₀ /ml)	検出限界 (TCID ₅₀ /ml)	
		従来法	mrPCR法
BVDV	10 ⁶	10 ²	10 ²
BCV	10 ⁶	10 ⁰	10 ⁰
BToV	10 ⁶	10 ¹	10 ²
BAdV	10 ⁸	10 ²	10 ³
BRSV	10 ⁴	10 ¹	10 ⁻¹
BPIV3	10 ⁷	10 ¹	10 ¹
IBRV	10 ⁷	10 ³	10 ³

(2) 検査結果の比較

ア 病性鑑定材料の比較

表 3 に病性鑑定依頼材料 77 検体について従来法、mrPCR 法のいずれかの方法で検出されたウイルスの陽性検体数を示した。

従来法で検出された検体については、すべて mrPCR 法で検出されており、mrPCR のみで検出されたのは BVDV、BCV については 1 検体、BRSV については 14 検体だった。

さらに従来法で対象としていなかった IDV についても mrPCR 法で 16 検体検出された。また、同一の検体から複数のウイルスの遺伝子が同時に検出される検体もあった。

表 3 病性鑑定材料の比較

ウイルス	従来法 (検体)	mrPCR法 (検体)	
		全体	mrPCR法のみ
BVDV	3	4	1
BCV	14	15	1
BRSV	20	34	14
IDV	NT	16	16
合計	37	69	32

イ ウイルス分離検査と mrPCR 法の関連性

図 2 は mrPCR 法で陽性となった検体の Ct 値についての分散を示しており、そこにウイルス分離でも陽性となった検体についてプロットした。

このグラフから、ウイルス分離陽性検体は Ct 値が低くウイルスの遺伝子量が多い傾向にあった。

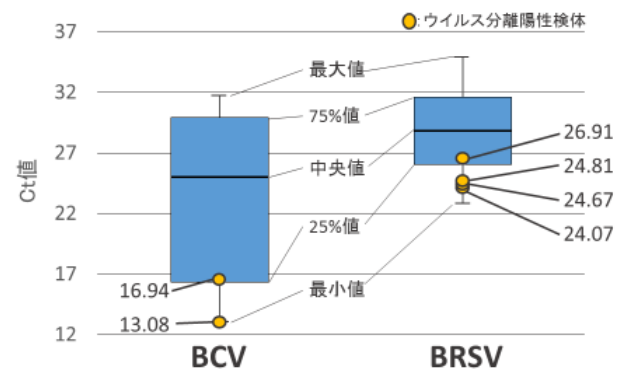


図 2 Ct 値についての四分位範囲

ウ 抗体検査と mrPCR 法の関連性

図 3 は BCV に対する抗体価および Ct 値についての散布図を示しており、近似曲線の R² から相関性は、ほぼみられなかった。

図 4 は BRSV に対する抗体価および Ct 値についての散布図を示しており、近似曲線の R² から相関性が示唆され、高い抗体価を示す固体では Ct 値が高く、BRSV の遺伝子量が低い傾向が見られた。

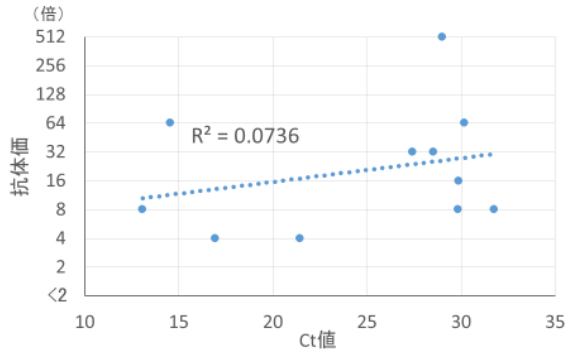


図3 BCVに対する抗体価及びCt値

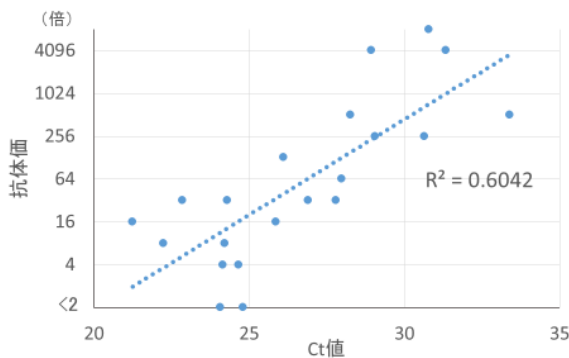


図4 BRSVに対する抗体価及びCt値

エ 検査時間・費用の比較

図5に示すように、1検体あたりの検査時間では従来法が1010分、mrPCRは73分であった。また、1検体あたりの費用では、従来法が2388円、mrPCR法は738円であった。

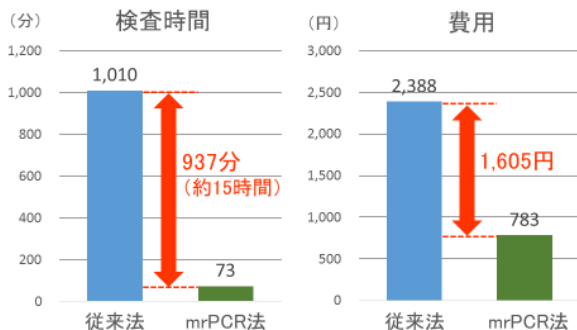


図5 検査時間・費用の比較

5 まとめ・考察

mrPCR法は、従来法で対象外のウイルスも検出可能で、従来法より迅速で安価であったことから、迅速かつ低コストで広範囲に検出可能な方法であると考えられた。

また、mrPCR法の検出限界は、BRDCにおいて発症に大きく関わると言われるBRSVについて、従来法より100倍低い力価まで検出され、各ウイルスについて両法で少なくとも 10^3 TCID₅₀/mlまで検出された。さらに従来法でウイルスが検出されない検体において、mrPCR法で検出された検体もあったことから、mrPCR法は牛呼吸器病ウイルス検査に実用可能であると考えられた。

また、ウイルス分離陽性の検体はCt値が低い傾向が見られ、BRSVに対する抗体価とCt値に相関性がみられたことからCt値とウイルス分離結果、抗体価の関連性が示唆された。

以上から今後もmrPCR法を用いてデータを積み重ね、効率的に牛呼吸器病のウイルス遺伝子検査を実施しながら病性鑑定業務を推進していく所存である。

参考文献

- 1) 牛病学 (第三版) 300-303
- 2) 家畜診療 (65巻6号) :新しいウシ呼吸器病の原因ウイルス-D型インフルエンザウイルス, 347-357(2018)
- 3) 五嶋ら : 牛の呼吸器病関連ウイルスを検出するマルチプレックスリアルタイムRT-PCRの検討, 平成30年度獣医学術東北地区学会(2018)
- 4) OIE manual (2015)
- 5) Kishimoto, Mら : 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)

- 6) Tsuchiaka, S ẽ : Development of a novel detection system for microbes from bovine diarrhea by real-time PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 78: 383-389 (2016)
- 7) Wong, K ẽ : Quantitative PCR assays to survey the bovine adenovirus levels in environmental samples. *J. Appl. Microbiol.* 109: 605-612 (2010)
- 8) Boxus, M ẽ : Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol. Methods* 125: 125-13 (2005)
- 9) Horwood, P ẽ : Multiplex real-time RT-PCR detection of three viruses associated with the bovine respiratory disease complex. *J. Virol. Methods* 171: 360-363 (2011)
- 10) Wernike, K ẽ : Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the rapid detection and differentiation of wild-type and glycoprotein E-deleted vaccine strains of Bovine herpesvirus type 1. *J. Virol. Methods* 174: 77-84. (2011)