

10 牛B群ロタウイルスに関する成牛下痢症マルチプレックス

RT-PCR法の再検討

中央家畜保健衛生所

○曾田 泰史、 多勢 景人

熊谷家畜保健衛生所

福田 昌治

I はじめに

ロタウイルスはレオウイルス科ロタウイルス属に分類され、ヒトや動物の下痢症の一要因として知られている。本ウイルスは、内殻蛋白質VP6の抗原性及び遺伝学的差異によりA～Gの7群に分類され、牛ではA～C群の3群が検出されている¹⁾。このうち、牛B群ロタウイルス(RVB)は、日本国内では、血便を伴わない一過性の下痢及び乳量減少を主徴とする搾乳牛の下痢症(牛RVB病)の報告が散見される²⁻⁷⁾。RVBについては培養細胞を用いた分離例の報告はなく、検出法としてRT-PCR法が報告されている^{3, 8, 9)}。上述の牛RVB病国内発生事例では、Chinsangaramらによって報告されたRT-PCR法⁸⁾、または福田らによって報告された成牛下痢症関連5種ウイルス遺伝子マルチプレックスRT-PCR法(マルチPCR)⁹⁾によってRVBが検出されている。本県においても、牛RVBの検出に際してはマルチPCRを実施している。

平成24年10月から平成25年5月にかけて、県内で4件(事例1～4)の牛RVB病が発生した。そのうち、3件(事例1～3)はマルチPCRで検出することができず、主にシーケンス解析に用いられるRVB-VP7遺伝子全長プライマーを使用したシングルPCR³⁾により検出された。このシングルPCRは、通常の病性鑑定では実施していないため、事例1～3の牛RVB病は検出されなかった可能性がある。今回、事例1～3から検出されたRVB株がマルチPCRで検出できなかった原因の究明及びマルチPCRの改良を試みたので、その概要を報告する。

II 材料と方法

1 材料

事例1～3に加え、マルチPCRで検出することができた事例4を比較のために検査に供した。事例1～4の発症牛糞便23検体(事例1:5検体、事例2:7検体、事例3:6検体、事例4:5検体)を抗生物質添加Eagle's MEM(日水製薬(株))を用いて10%糞便乳剤とした。続いて3500rpmで5分間遠心し、上清からHigh Pure Viral RNA Kit(Roche)を用いてRNAを抽出して検体とした。

2 方法

(1) 遺伝子解析

マルチ PCR とシングル PCR は、共に VP7 遺伝子を標的遺伝子としているが、プライマー領域が異なる(表 1)。マルチ PCR は牛 RVB の検出においては、Chinsangaram らによって報告されたプライマー⁸⁾を採用している。外殻蛋白遺伝子である VP7 遺伝子は変異が多いと考えられ、マルチ PCR のプライマー(9B3/9B4)領域に変異が起り検出できなかつたことが疑われた。このことを確認するため、VP7 遺伝子の遺伝子解析を実施した。遺伝子解析は事例 1~4 から検出された RVB 株の VP7 遺伝子について、既報の牛 RVB 国内検出株との比較を行い、相同性解析と分子系統樹解析を実施した。特に、プライマー領域の変異に注目して塩基配列を確認した。なお、検査は(独)動物衛生研究所に依頼して行った。

表 1: RVB RT-PCR のプライマー詳細

	プライマー	標的遺伝子	位置 ※	配列(5'-3')	増幅サイズ (bp)	出典
マルチPCR	9B3	VP7	171-191	CAGTAACTCTATCCTTTTACC	281	Chinsangaramら (1994)
	9B4		433-451	CGTATCGCAATACAATCCG		
シングルPCR	U21	VP7	1-21	GGAATAATCAGAGATGGCGTT	794	Tsunemitsuら (1999)
	L19		797-815	GGGTTTTTTTATTGGCTTC		

※ Nemuro株 VP7遺伝子(Accession No.AB016818)の塩基番号に基づく

(2) RT-PCR キットの変更

当初の検査ではマルチ PCR の実施にあたり A 社キットを使用した。今回、検出感度が異なると考えられる B 社キットを使用してマルチ PCR を実施、RVB 検出感度を比較した。ならびに、B 社キットを使用したマルチ PCR による事例 1~4 の再検査を実施した。

検出感度の比較は、福田らの報告³⁾と同様に、1ml あたりの RNA コピー数を調整した RNA 溶液を 10 倍階段希釈して行った。今回は、 10^8 copies/ml の RVB RNA 溶液を RNA Free Water で 10 倍階段希釈し、 10^2 copies/ml までの RVB RNA 溶液を調整、A 社及び B 社の RT-PCR キットを用いてマルチ PCR を実施した。

また、B 社キットを使用するにあたり、B 社キットの至適条件を考慮し、マルチ PCR の PCR 条件を変更した。まず、 50°C 30 分の逆転写反応後、 95°C で 15 分加熱した。その後、 94°C 45 秒、 55°C 45 秒、 72°C 60 秒のサイクルを 35 回繰り返し、さらに 72°C で 10 分反応させた後、 4°C で維持した。その他の条件は福田らの報告³⁾に従った

(3) 牛 RVB 試作プライマーの新規設計

牛 RVB を検出するための試作プライマーを新規設計し、マルチ PCR で事例 1~4 の再検査を実施した。試作プライマーは VP7 遺伝子を標的とし、国内外の既報牛 RVB 株 VP7 遺伝子内において塩基置換が 0~1 塩基であり、保存性の高い領域の配列を基に設計した。試作プライマー(461F/757R)の詳細は表 2 に示す。なお、RT-PCR キットは B 社キットを使用した。

表2: RVB 試作プライマーの詳細

プライマー	標的遺伝子	位置 ※	配列 (5'-3')	増幅サイズ (bp)
フォワードプライマー	461F	VP7	GGTACATATTTTCCATTGTC	297
リバースプライマー	757R		TTATGCTCGTGGCTCAAAG	

※ Nemuro株 VP7遺伝子(Accession No.AB016818)に基づく

III 成績

1 遺伝子解析

同一事例から検出されたRVBの塩基配列は全て一致した。事例1~4から検出されたRVB株をそれぞれSAI-1~4とした。

(1) 相同性解析・分子系統樹解析 (表3・図1)

SAI-1~4は過去の牛RVB国内検出株と同様に、クラスターはG3に分類された。SAI-1~4間の相同性は完全には一致せず、93.4~99.7%であった。SAI-1~3間の相同性が96.9~99.7%と高く、SAI-4とSAI-1~3との相同性は93.4~93.8%であった。過去のRVB国内検出株と比較すると、SAI-1~3はN-2 2012株との相同性が高く、96.8~100.0%を示した。特にSAI-2とN-2 2012株は完全に一致した。逆に、SAI-1~3とN-2 2012以外の国内検出株との相同性は93.1~94.6%に留まった。SAI-4はN-2 2012以外の国内分離株との相同性が高く、95.7~99.6%を示し、N-2 2012との相同性は93.4%であった。

表3: VP7 遺伝子の相同性解析 (ヌクレオチド)

	SAI-2	SAI-3	SAI-4	Nemuro	F 2013	I 2012	K 2013	N-1 2012	N-2 2012
SAI-1	96.9	97.2	93.4	93.9	93.1	93.6	93.3	93.5	96.8
SAI-2	-	99.7	93.5	94.3	93.2	93.8	93.4	93.6	100.0
SAI-3	-	-	93.8	94.6	93.5	94.0	93.7	94.0	99.7
SAI-4	-	-	-	95.7	98.2	98.5	98.0	99.6	93.4

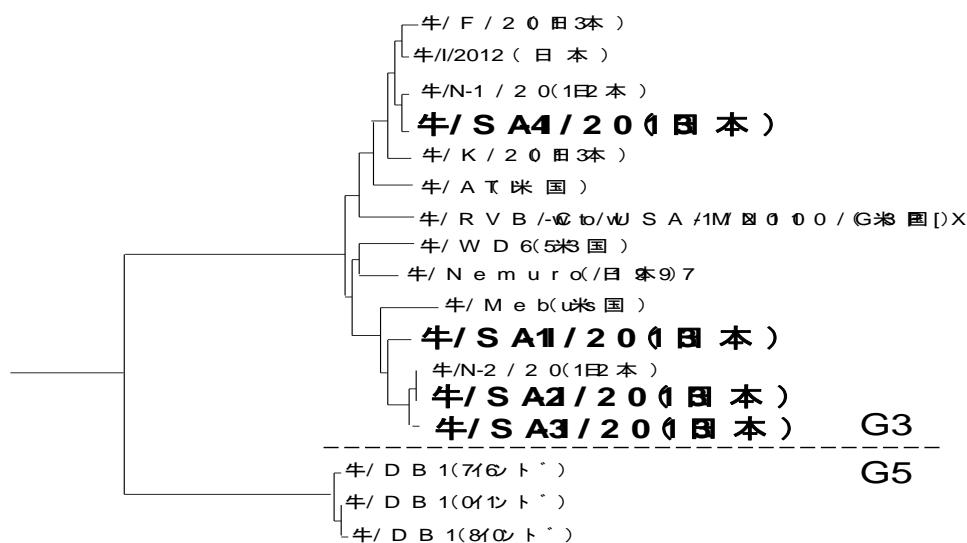


図1: RVB-VP7 遺伝子塩基配列に基づく分子系統樹

(2) マルチPCRプライマー領域の塩基置換(表4)

フォワードプライマー(9B3)領域21塩基中には、SAI-1では4塩基、SAI-2及び3では3塩基の置換が認められた。SAI-1~3の塩基置換は特に3'末端側に置換箇所が多く認められた。SAI-4の塩基置換は1塩基であった。リバースプライマー(9B4)領域の保存性は高く、19塩基中にSAI-4で1つの塩基置換がみられたのみで、SAI-1~3に塩基置換はなかった。

表4: プライマー(9B3/9B4)領域の塩基配列

	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191
9B3	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	C	T	T	T	T	A	C	C
Nemuro	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	C	T	T	T	T	A	C	C
I 2012	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	T	T	T	T	T	A	C	C
F 2013	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	T	T	T	T	T	A	C	C
K 2013	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	T	T	T	T	T	A	C	C
N-1 2012	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	T	T	T	T	T	A	C	C
SAI-4	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	T	T	T	T	T	A	C	C
SAI-1	C	A	G	T	G	A	C	T	A	T	A	T	C	C	T	T	C	T	A	T	C
SAI-2	C	A	G	T	G	A	C	T	C	T	A	T	C	C	T	T	C	T	A	T	C
SAI-3	C	A	G	T	G	A	C	T	C	T	A	T	C	C	T	T	C	T	A	T	C
N-2 2012	C	A	G	T	G	A	C	T	C	T	A	T	C	C	T	T	C	T	A	T	C

	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451
9B4	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	T	A	C	G
Nemuro	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	T	G	A	T	A	C	G
I 2012	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	C	A	C	G
F 2013	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	C	A	C	G
K 2013	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	C	A	C	G
N-1 2012	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	C	A	C	G
SAI-4	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	C	A	C	G
SAI-1	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	T	A	C	G
SAI-2	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	T	A	C	G
SAI-3	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	T	A	C	G
N-2 2012	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	T	A	C	G

2 RT-PCRキットの変更

(1) RT-PCRキットの感度比較(図2)

A社キットでは 10^7 copies/mlまで明瞭な陽性反応が、 10^6 copies/mlで弱い陽性反応が認められた。B社キットでは 10^5 copies/mlまで強い陽性反応が認められた。この成績から、マルチPCRによるRVB特異遺伝子の検出において、B社キットがA社キットに比較して10~100倍感度

が高いことが示された。

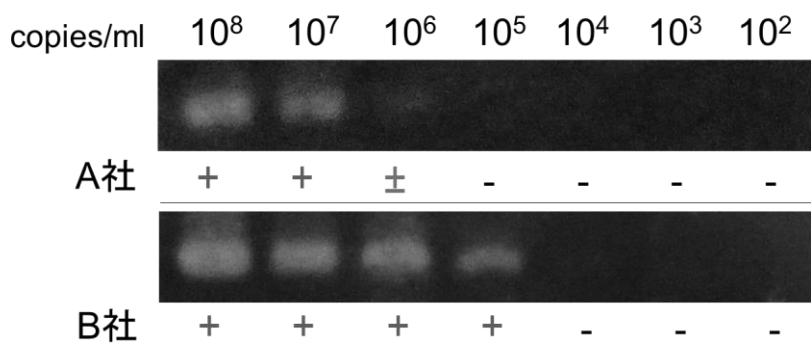


図2：A社及びB社キットを使用したマルチPCRの感度比較

(2) B社キットを使用したSAI-1～4の再検査(図3)

感度が高いことが示されたB社キットを用いることにより、SAI-2及び3はマルチPCRで陽性反応が得られた。しかし、SAI-1は検出することができなかった。

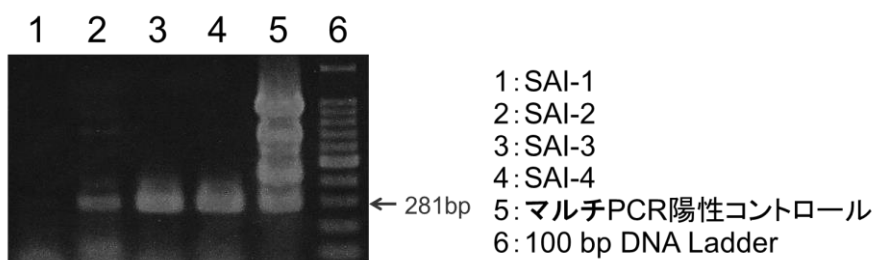


図3：B社キットを用いたSAI-1～4の再検査結果

3 RVB 試作プライマー(461F/757R)を使用したSAI-1～4の再検査(図4)

試作プライマーを用いることにより、検出できなかったSAI-1を検出することが可能となった。また、SAI-2～4及びマルチPCR陽性コントロールはいずれも陽性反応が認められた。しかし、SAI-2、3において、500 bp付近にこれまでは認められなかった非特異的反応と考えられる陽性反応がみられた。また、マルチPCR陽性コントロールのC群ロタウイルスの陽性反応が弱くなった。

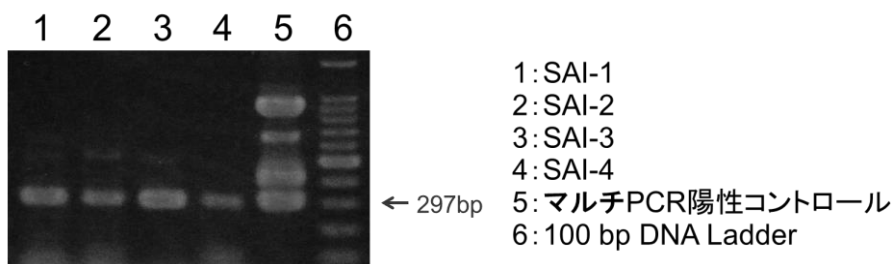


図4：試作プライマーを使用したマルチPCRによるSAI-1～4の再検査結果

V まとめと考察

以上の検査成績から、SAI-1～3 がマルチ PCR で検出できなかった原因として、まず、プライマー領域の塩基置換の影響が考えられた。遺伝子解析の結果、SAI-1～3 ではフォワードプライマー領域に多くの塩基置換があることがわかった。特に、PCR 反応の開始に重要な 3' 末端側に多くの置換がみられたことから、これらの変異がマルチ PCR の RVB 特異遺伝子検出感度を大幅に低下させたことが推察された。また、PCR キットがマルチ PCR の検出感度に大きな影響を与えることも判明した。B 社キットはマルチ PCR による RVB 特異遺伝子検出において 10～100 倍高い感度を示し、A 社キットでは検出できなかった SAI-2、3 を検出することが可能となった。検査プロトコール、検査を行う環境、手技によって最適な試薬やキットは異なると考えられるので、今後、マルチ PCR に関して、より感度が高いキットを選択する必要があると考えられた。

今回検出された SAI-1～4 は、VP7 遺伝子の解析により、いずれも過去の RVB 国内検出株と同様にクラスターは G3 に分類された。これまでに確認された RVB 国内検出株は相同性が高く、その中で比較的遺伝的差異が大きい株は N-2 2012 株のみであった⁷⁾。しかし、本県で検出された SAI-1～3 も牛 RVB 国内検出株とは遺伝的差異が比較的大きく、N-2 2012 株と高い相同性を示した。系統樹解析においても、同一クラスターではあるが、N-2 2012 株と同様に他の牛 RVB 国内検出株とは遺伝的差異が大きいことが確認された。特に、SAI-1 はこれまで国内で主に使用されてきたプライマーで検出できないことが示された。VP7 は外殻蛋白遺伝子であり、変異が起こる可能性が高いと考えられる。今後、さらに塩基置換が多い株が出現する可能性がある。そのような RVB 株に備え、現在使用しているプライマーよりも保存性が高く、スクリーニングに適した領域を標的とするプライマーを設計することが求められる。本報告でも試作プライマー (461F/757R) を設計し、マルチ PCR を試行した。これにより SAI-1 も検出することができたものの、非特異反応がみられるなど、マルチ PCR での使用については、さらに検討が必要と考えられた。しかし、本プライマーは、シングル PCR においては問題ないと考えられたので、当面、RVB 病の可能性が否定出来ない事例においては、マルチ PCR と並行して、本プライマー或いは VP7 遺伝子全長プライマー³⁾ によるシングル PCR を実施することを考慮しなければならない。今後、さらにスクリーニングに適したプライマーを選定或いは設計し、PCR 条件の最適化のための検証試験を行い、マルチ PCR を改良する必要がある。

謝辞

RVB 遺伝子解析を実施していただいた独立行政法人動物衛生研究所ウイルス・疫学研究領域 鈴木 享主任研究員を始め、関係者の方々に深謝します。

引用文献

- 1) Estes M. K. and Kapikian A. Z. : Rotaviruses. In: Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B. and Straus S. E, [eds] Fields Virology, 5th edn., pp. 1917-1974 Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia (2009)
- 2) Hayashi M., Nagai M., Hayakawa Y., Takeuchi K. and Tsunemitsu H. : Outbreak of diarrhea

- and milk drop in cows infected with bovine group B rotavirus, *Vet. Rec.* 15, 331-332 (2001)
- 3) Tsunemitsu H. Morita D., Takaku H., Nishimori T., Imai K. and Saif L. J. : First detection of bovine group B rotavirus in Japan and sequence of its VP7 gene, *Arch. Virol.* 144, 805-815 (1999)
 - 4) 葛城 肅仁, 仲村 和典, 生水 誠一, 宮地 利江, 武田 佳絵, 朝倉 裕樹, 恒光 裕 : 下痢、乳量減少及び食欲不振が認められた搾乳牛の牛B群ロタウイルス感染, *日獣会誌*, 59, 254-258 (2006)
 - 5) 福田 昌治, 荒井 理恵, 河津 理子, 吉田 輝美, 安里 誠, 田口 清明, 田中 哲也, 小山 香 : 牛B群ロタウイルスが関与した搾乳牛下痢症の集団発生, 平成21年度埼玉県家畜保健衛生業績発表会抄録 (2009)
 - 6) 宮本 博幸, 林 健 : 牛B群ロタウイルスによる搾乳牛集団下痢事例, *家畜衛生週報*, No. 3074 2009 10 19, 322-325 (2009)
 - 7) 村山 和範, 会田 恒彦, 田中 健介, 篠川 有理, 福留 静, 樋口 良平, 中田 稔 : 県内で初確認されたB群及びC群ロタウイルスによる牛ロタウイルス病, 平成24年度新潟県家畜保健衛生業績発表会抄録 (2012)
 - 8) Chinsangaram J., Akita G. Y. and Osburn B. I. : Detection of bovine group B rotaviruses in feces by polymerase chain reaction, *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 302-307 (1994)
 - 9) Fukuda M., Tsunemitsu H. : Development and application of one-step multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of five diarrheal viruses in adult cattle, *Arch Virol.* 157(6), 1063-1069 (2012)