

11 牛コロナウイルスに対するリアルタイム PCR 法の有用性の検討

中央家畜保健衛生所

佐藤 朋美・井上 大輔

牛コロナウイルス病は、下痢や呼吸器症状を主徴とし、特に搾乳牛では、泌乳量の減少を招き多大な経済被害を及ぼす¹⁾ため、家畜衛生上、重要な疾病である。本県においては、近年、ほぼ毎年のように発生が認められており(図-1)、早期に対策を採るために迅速で精度の高い検査法が求められている。

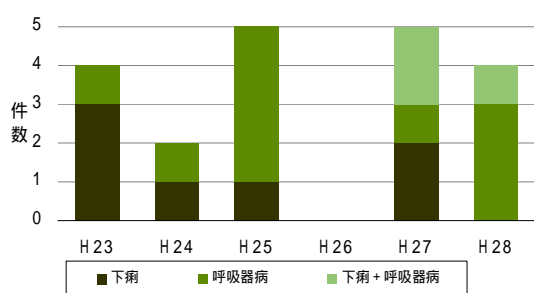


図-1 県内の発生状況

これまで本病の抗原検査法として、ウイルス分離とコンベンショナル PCR 法(cPCR)が用いられてきたが、近年、海外では SYBR 法によるリアルタイム PCR 法(rPCR)²⁾が開発され、感度、特異性が高く、簡便でコンタミネーションのリスクも低い等の利点が報告されており、本検査法の導入が期待されている。しかしながら、国内での rPCR 応用例の報告例がないことや、遺伝子定量に必要な RNA スタンドの入手が困難であることなどから、今回、BCV 県内浸潤株に対する rPCR の有用性および BCV 標準株抽出 RNA のスタンダードとしての利用可否について検討した。

1 材料・方法

(1) 検出感度の比較

国内標準株である BCV Kakegawa 株を牛胎子

血清非添加イーグル MEM 培地(MM)を用い $10^4 \sim 10^3$ TCID₅₀/ml の 10 倍階段希釈し、各希釈液を材料に rPCR と cPCR による BCV 遺伝子の検出を行い、検出限界を比較した。

RNA 抽出は市販キット(High Pure Viral nucleic acid Kit、Roche)を使用し、逆転写(RT)は、市販キット(High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit、Thermo Fisher Scientific)を用い、25 10分、37 120分、85 5分で実施した。rPCR は、Haitham らのプライマー²⁾、市販キット(QuantiTect SYBR Green PCR Kits、Qiagen)を用い、ABI7500(Thermo Fisher Scientific)を使用し、95 15分の後、94 15秒、55 30秒、72 30秒を 45 サイクルにより遺伝子の増幅を行い、95 15秒、50 60秒、95 15秒で解離曲線分析を行った。cPCR は、Tsunemitsu らのプライマー³⁾、市販キット(PrimeScript One step RT-PCR Kit Ver.2、TaKaRa)を用い、50 30分、94 2分の後、94 30秒、63 30秒、72 1分を 35 サイクル、72 7分により遺伝子の増幅を行った。増幅産物は、2.0%アガロースゲルを用いて電気泳動を 30 分実施し、407bp の位置に遺伝子の増幅産物であるバンドが確認された場合を陽性と判定した。

(2) 病性鑑定材料等に対する有用性の検証

平成 14~28 年に分離された BCV12 株について rPCR を実施した。また、平成 27~28 年に牛コロナウイルス病と診断された 8 症例 54 検体(鼻腔スワブ 41 検体、糞便 13 検体)について rPCR を実施し、その成績と cPCR 並びにウイルス分離成績との一致率を統計学的手法(カップ係数)により評価した。加えて、解離曲線分析により rPCR で陽性となった検体の解離温度(T_m値)を調べた。

(3) 糞便添加による遺伝子量測定への影響

糞便が遺伝子量測定に及ぼす影響をみるために、10%(v/v)糞便を添加したMMを希釈液として(1)と同様に標準株を10倍階段希釈し、各希釈液からのrPCRによる遺伝子量を測定した。

(4) 検査費用および所要時間の比較

rPCRとcPCRの1検体あたりの費用および所要時間を算出し、両者を比較した。

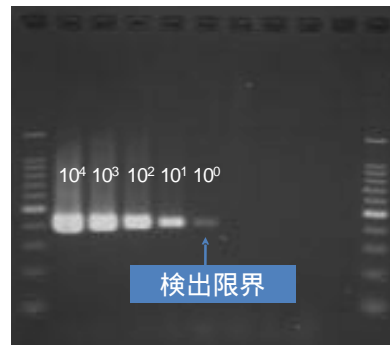


図 - 4 cPCR;電気泳動像

2 結果

(1) 検出感度の比較

rPCRでは、 10^{-1} TCID₅₀/mlまで明瞭な遺伝子の増幅が認められた。 10^{-2} TCID₅₀/mlについては、弱い増幅が認められたものの(図-2)、解離曲線分析で、他の検体と異なるTm値を示したことから、非特異反応と判定された(図-3)。

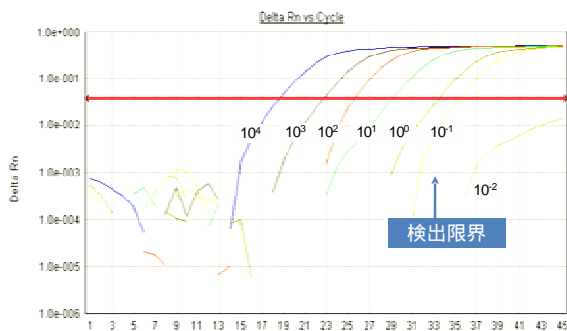


図 - 2 rPCRの増幅曲線

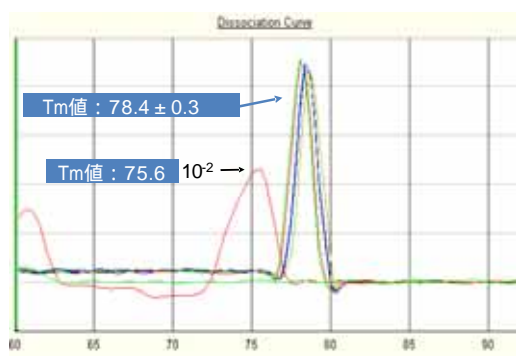


図 - 3 rPCRの解離曲線分析

一方、cPCRでは 10^0 TCID₅₀/mlまで遺伝子の増幅産物が認められた(図-4)。なお、rPCRの増幅曲線から検量線を作製したところ、 R^2 は0.992と高く良好であった(図-5)。

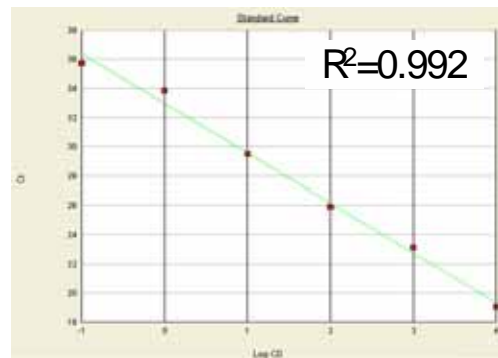


図 - 5 rPCR;検量線の作製

(2) 病性鑑定材料等に対する有用性の検証

県内分離株に対するrPCR

試験に供した全ての分離株からBCV遺伝子が検出された(表-1)。

表 - 1 県内分離株に対する有用性

分離年度	農場	品種	症状	材料	rPCR
H14	A	Hol	下痢	糞便	+
H15	B	Hol	下痢	糞便	+
H17	C	Hol	下痢	糞便	+
H27	D	JB	呼吸器病	鼻腔スワブ	+
H27	E	Hol	下痢	糞便	+
H27	F	JB	下痢	糞便	+
H27	G	Hol	下痢	糞便	+
H27	G	Hol	下痢	糞便	+
H28	H	JB	呼吸器病	鼻腔スワブ	+
H28	I	F1	下痢、呼吸器病	糞便	+
H28	I	F1	下痢、呼吸器病	糞便	+
H28	J	JB	呼吸器病	鼻腔スワブ	+

rPCRの結果の信頼性にかかる評価

供試した54検体のうちrPCRによるBCV遺伝子検出は34検体であり、cPCRによる検出が33検体であった。なお、ウイルスが分離されたのは25検体であった。rPCRとcPCRの検出度は、ほぼ一致し、カッパ係数0.96と高い一致率を示した(表-2)。rPCRとウイルス分離との検出度の比較においても、rPCRでの検出率が高く、

カッパ係数は 0.60 と中等度の一致率を示した (表 - 3)。

表 - 2 rPCRとcPCRによる病性鑑定材料からのBCV検出状況

rPCR vs cPCR		rPCR	
		陽性	陰性
cPCR	陽性	33	0
	陰性	1	20

表 - 3 rPCRとウイルス分離による病性鑑定材料からのBCV検出状況

rPCR vs ウイルス分離		rPCR	
		陽性	陰性
分離	陽性	24	1
	陰性	10	19

今回、供試した県内浸潤株の Tm 値は、78.0 ~ 79.4 であり、糞便 11 検体、鼻腔スワブ 19 検体、分離株 6 検体が既報²⁾の範囲 (78.35 ± 0.26) に収まらなかった。(表 - 4)。

表 - 4 各材料のTm値

Tm 値 ()	検体数		
	糞便	鼻腔スワブ	県内分離株
78.62 ~ 79.4	0	1	0
78.09 ~ 78.61 (78.35 ± 0.26)	1	3	6
78.0 ~ 78.10	11	18	6

(3) 糞便添加による遺伝子量測定への影響

糞便を添加した希釈液中の遺伝子量は全体的に低く計測される傾向が認められ、10 倍希釈では有意に低いと判定された (図 - 6)。

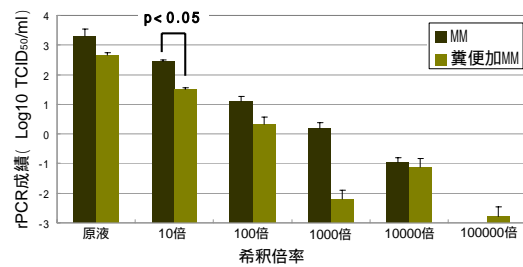


図 - 6 糞便の有無による遺伝子量への影響

(4) 検査費用および所要時間の比較

rPCR が 308.5 円/検体、約 3 時間半、cPCR が 352 円/検体、約 2 時間半であった (表 - 5)。

表 - 5 検査費用と所要時間

検査費用 (円/検体)

	rPCR	cPCR
RT	171.0	352.0
PCR	137.5	352.0
計	308.5	352.0

所要時間 (RT ~ 判定)

rPCR	206分
cPCR	154分

3 まとめおよび考察

rPCR および cPCR の検出限界から、rPCR は cPCR よりも感度が 10 倍高いことが確認された。標準株抽出 RNA を用いて高い相関のある検量線が見られたことから、当該 RNA は定量用のスタンダードとして利用可能であると考えられた。また、病性鑑定材料を用いた検証においては、rPCR、cPCR、ウイルス分離の順で検出率が高く、カッパ係数による一致率から、rPCR と cPCR の信頼性は同等と評価された。ランニングコストは、rPCR が cPCR よりも安価であった。以上を総合して、rPCR は牛コロナウイルス病の診断法として有用と考えられた。

rPCR における陽性の判定基準である Tm 値については、既報²⁾の範囲に収まらない検体が多数認められたことから、今後、症例数を積み重ね、その判定基準について検討する必要がある。

検査所要時間の比較では、rPCR の方が cPCR

よりも長時間を要したが、これは、rPCR の RT にかかる時間が長いことに加え、PCR 反応にかかるサイクル数が多いことが主な要因であり、今後、検査試薬や条件を検討し、時間短縮を図りたい。

BCV は健康牛の糞便から長期に渡って検出されたとの報告^{1、4)}があり、ウイルスを長期間排泄する持続感染牛の存在が疑われている。今回、rPCR による BCV の抗原検索においてウイルス分離や cPCR に比べ検出感度が高く、遺伝子量の測定も可能であることが確認されたことから、本 rPCR を用い感染、発症、持続感染と言ったステージごとの生体からのウイルス排泄量が想定することができれば、農場内での的確な衛生対策の一助ともなると考える。しかしながら、検査材料中に糞便があれば遺伝子量が低く計測される傾向がみられたことから、今後、rPCR の反応阻害物質の存在や RNA 抽出効率等について更なる検討を行い、これら課題を解決し、発症牛や持続感染牛のウイルス排泄量を調査したいと考える。

参考文献

- 1) 菅野 徹：牛コロナウイルス感染症とその予防対策；家畜診療 60 巻 8 号
- 2) Amer HM, et al. : Development of a SYBR Green based real-time RT-PCR assay for detection and quantification of bovine coronavirus ; Molecular and Cellular probes 25 (2011) 101-107
- 3) Tsunemitsu H, et al. : Experimental inoculation of adult cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. ; Arch Virol (1999) 144. 167-175
- 4) 首藤 洋三、滝澤 亮：牛コロナウイルス株と臨床症状の関連およびウイルス常在化に関する考察；大分県業績発表集録（平成 23 年度）