

5. 県他機関との協力および家保での適正技術 (appropriate technology:AT) で希少ウイルス (Mammalian orthoreovirus /bovine) の診断法を開発した事例

宇佐家畜保健衛生所、大分家畜保健衛生所¹⁾

○ (病鑑) 長岡 健朗、病鑑 中出 圭祐¹⁾、病鑑 人見 徹¹⁾

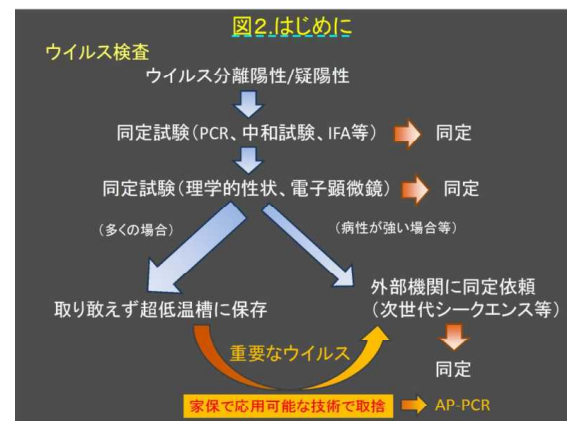
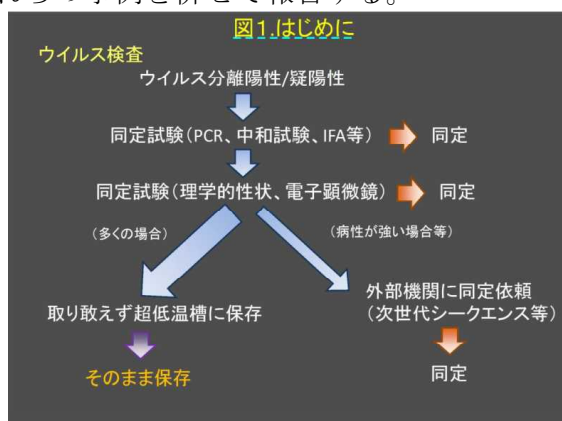
【はじめに】家畜衛生保健所でのウイルス検査において、ウイルスが分離された場合、まず、蛍光抗体やイムノクロマトといった市販の検査試薬や既知のウイルスに対するプライマー・抗血清等を用いた中和試験・PCR といった方法でウイルスの同定を試みる。それで同定されない場合は、理学的性状試験や電子顕微鏡による形態の観察等による更なる同定の試みも行うが、それでも同定に行き着かない場合は、それが病性が強いといった理由で特に同定が必要な場合を除くと、検体は取り敢えず超低温層に保管され、日々の多忙に紛れてそのままになりがちである。いっぽう、近年では次世代シーケンサーのような最先端技術も開発されており、そのような技術を用いれば、そのようなウイルスの同定は困難ではないものと思われる。しかし、同定不能のウイルスすべてを次世代シーケンサーで解析するということは現実的ではない。

今回、牛の糞便から細胞を用いて分離したが同定不能であったウイルスについて、家保でも応用可能な技術である AP-PCR (Arbitrarily Priming-PCR) 法を用いて検査したところ、それが世界的にも報告例が少ないウシのオルソレオウイルスであることが示唆されたため、

外部機関に全塩基配列の解析を依頼したところ、それが Mammalian orthoreovirus/bovine (以下ウシ・オルソレオウイルス) である同定された (図 1、図 2)。

さらに、解析された全塩基配列からウシ・オルソレオウイルスの診断法を開発した。

また、その AP-PCR 法の実施においては県他機関との協力が大きな役割を果たした。それらの事例を併せて報告する。



【AP-PCR 法】AP-PCR 法では、対象遺伝子に特異的なプライマーを用いる通常の PCR 法と異なり、任意のプライマーを非特異的に反応させ、PCR を行う。今回、我々は、3'末端の配列を変えた 8 種のプライマーを用いて、効率的に AP-PCR 法を行い、その生成物の遺伝子配列を解析することにより未知の RNA ウイルスを同定する方法を開発、応用した。

図3には通常の PCR 反応と AP-PCR 反応の違いを示した。通常の PCR 反応ではプライマーが目的遺伝子上の相補的な配列と特異的にアニーリングし伸長反応が開始する。一方、AP-PCR 法では低温等、非特異反応が起きやすい条件下で不完全なアニーリングおこし、そこから伸長反応を開始させる。一旦伸長した生成物は、その 5' 末端がプライマーと置き換わっているので、その次からは特異的にアニーリングし増幅する。ただし、AP-PCR 法ではプライマーは特異性を担保しないのでそれが何の遺伝子であるかについては、生成物のシーケンス解析等が必要となる。

図4には AP-PCR 法による具体的手順として、第1段階として行う前処理法の概要を示した。AP-PCR 法では、特異的に遺伝子を増幅するわけではないため、目的ウイルス以外の遺伝子なるべく排除する必要がある。そこで、RNase や DNase といった核酸分解酵素を用いて、ウイルス遺伝子以外の核酸の除去を行った。今回行った AP-PCR 法では RNA ウイルスの同定を目的としているため、まず、RNase を用いてウイルス外の RNA の除去を行った。次に市販キットを用いて RNA を抽出した後に DNase により DNA を除去、残されたウイルス由来の RNA を供試材料として AP-PCR 法による増幅を行った。

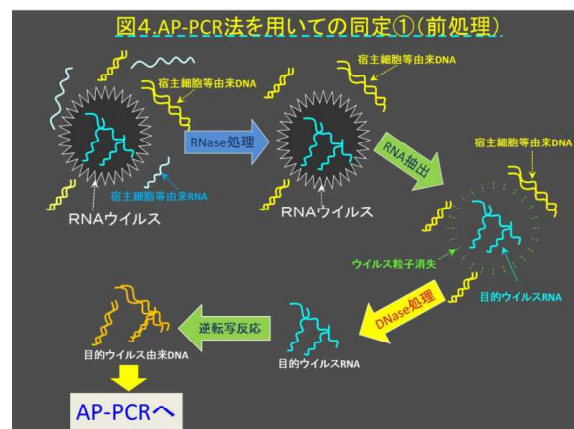
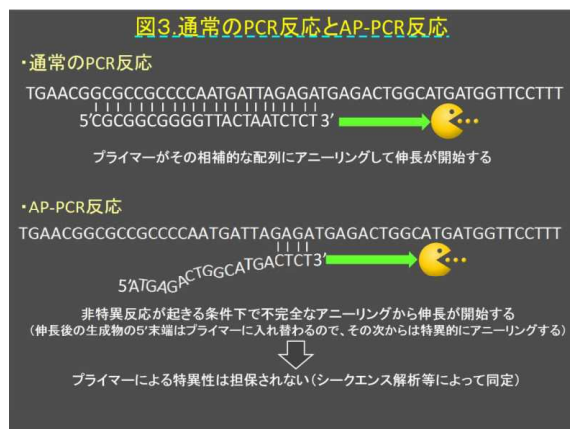


図5に今回、逆転写反応、第1 PCR 反応、第2 PCR 反応およびシーケンス反応に使用したプライマーを示した。いずれも Desmarais ら¹⁾によるもので、フォワードプライマーは-40USP リバースプライマーは DALPR を基本としており、第2 PCR 反応では-40USPAP-PCR の 3' 末端に異なった配列の2～4塩基を加えた8種のプライマーを用いている。第2 PCR 反応の PCR 産物をシーケンス解析するが、これらの産物はすべてには-40USP の配列が含まれるので、すべての産物は-40USP をプライマーとしてシーケンスを行うことができる。

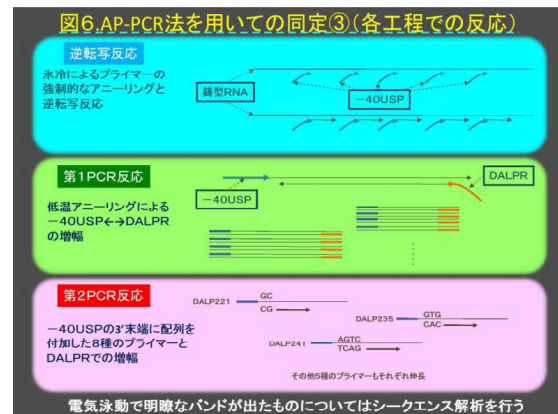
図6に逆転写反応から第2 PCR 反応までの詳細を図示した。

逆転写反応では、氷冷により強制的に-40USP を結合させ、このプライマーを5' 末端に持つc DNAを作成する。次に第1 PCR 反応では低温アニーリングで非特異反応を起きやすくして、-40USP と DALPR で挟まれた断片を多数作成する。第2 PCR 反応では-40USP の 3' 末端に異なった塩基配列を加えた8種のプライマーとリバースプライマーで PCR 反応を行い、それぞれにマッチした遺伝子断片のみを増幅する。増幅した PCR 産物は電気泳動を行い、明瞭なバンドを生じたものについてはシーケンス解析に供した。

図5.AP-PCR法を用いての同定②(プライマー)

	プライマー名	配列	
逆転写反応	フォワード	-40USP	GTTTCCCAGTCACGAC
第1PCR反応	フォワード	-40USP	GTTTCCCAGTCACGAC
	リバース	DALPR	TTTCACACAGGAAACAGTATGAC
第2PCR反応 (選択増幅)	フォワード	DALP221	GTTTCCCAGTCACGAC GC
		DALP231	GTTTCCCAGTCACGAC AGC
		DALP232	GTTTCCCAGTCACGAC GAC
		DALP233	GTTTCCCAGTCACGAC ACG
		DALP234	GTTTCCCAGTCACGAC CAG
		DALP235	GTTTCCCAGTCACGAC CAC
		DALP241	GTTTCCCAGTCACGAC TCAG
		DALP242	GTTTCCCAGTCACGAC CTAG
リバース	DALPR	TTTCACACAGGAAACAGTATGAC	
シーケンス反応	フォワード	-40USP	GTTTCCCAGTCACGAC

(E.Desmarais et al 1998) らによる



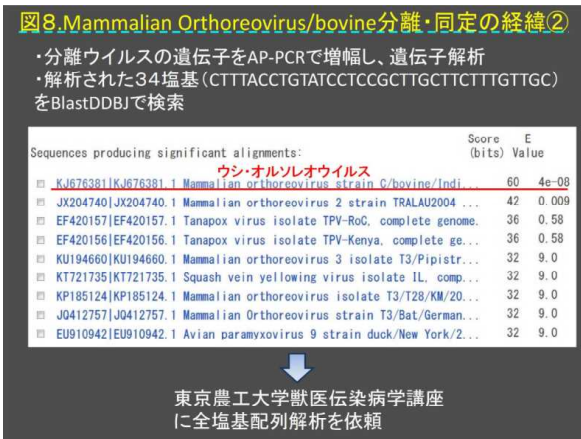
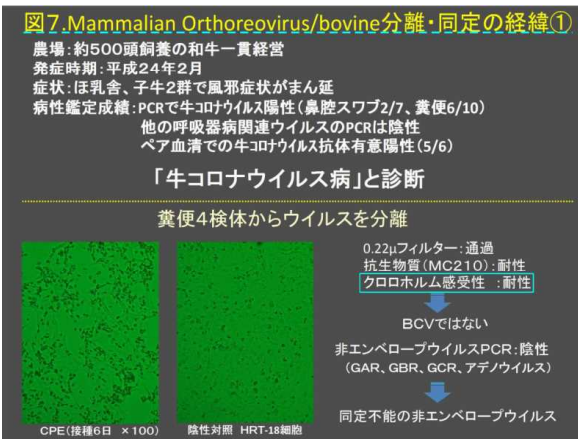
【県他機関との協力】今回、シーケンス解析はすべて県衛生環境研究センター（以下衛環研）で行った。平成26年度から大分家畜保健衛生所では、年度当初に衛環研に機器使用依頼書を提出し、遺伝子解析装置や透過型電子顕微鏡といった機器の使用が可能となるようにした。

遺伝子解析の際は、家保で行える工程は家保で行う、日程を調整し衛環研がシーケンサーを使用する時に同時に解析する、シーケンサーの消耗品の一部も家保で負担するといった取り決めを行っている。このような取り決めにより遺伝子解析が手軽に気兼ねなく利用できる環境ができた。

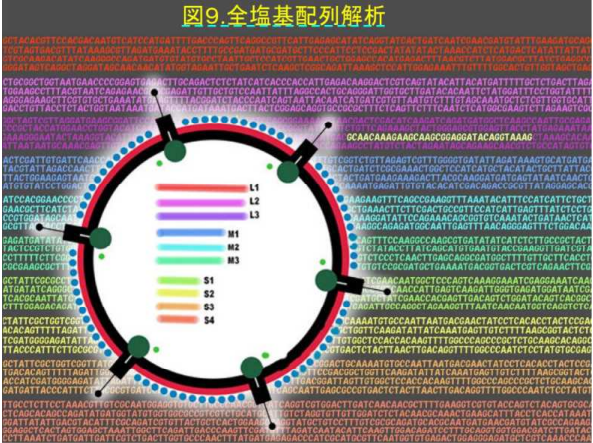
AP-PCR法では非特異的に反応が進むため、目的以外の遺伝子が増幅されることも多く、目的の遺伝子の解析を得るためにはある程度の検体数を解析するがある。そのため、このような手軽に遺伝子解析ができる環境は特に重要であると考えられた。

【ウイルスの由来・同定】

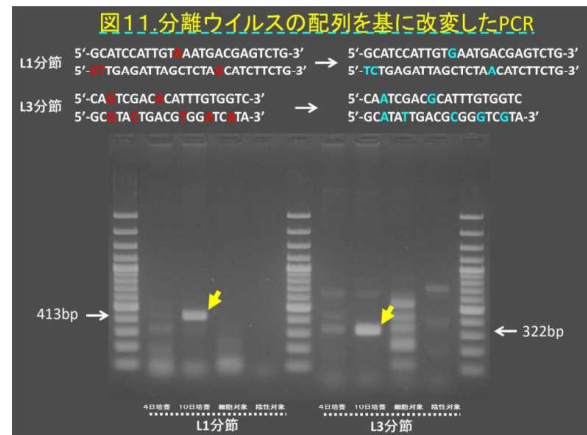
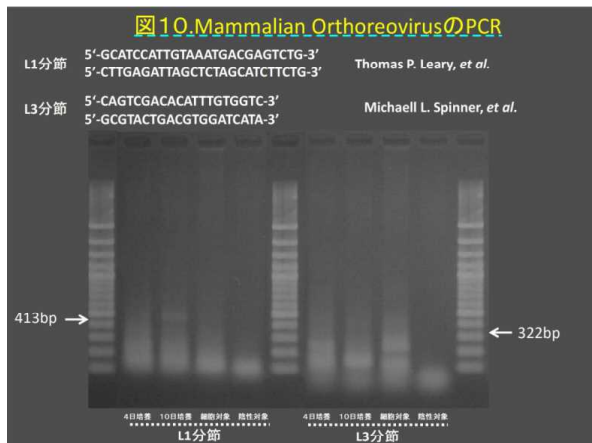
今回、ウシ・オルソレオウイルスが分離されたのは、平成24年2月に風邪症状を呈した子牛の症例で、当初の病性鑑定では糞便および鼻腔スワブのPCR検査やペア血清による抗体検査の成績から牛コロナウイルス病と診断されていた。しかし、その時の検査ではウイルスが分離が行われていなかったため保存されていた糞便材料で改めてウイルス分離を試みたところ、HRT-18細胞で写真のようなCPE示すウイルスが分離された(図7)。このウイルスはクロロホルム耐性であり、エンベロープが無く、牛コロナウイルスとは異なるウイルスであると考えられた。そこで、牛の糞便から分離されることのある非エンベロープウイルスとして、GAR、GBR、GCR およびアデノウイルス (Atadenovirus および Mastadenovirus) についてPCR法による検査を行ったがすべて陰性だった。そこで、そのウイルスの遺伝子をAP-PCR法で増幅し遺伝子解析したところ、34塩基が解析された(図9)。それをblastで検索したところウシ・オルソレオウイルスであることが示唆されたため、東京農工大学に全塩基配列の解析を依頼したところウシ・オルソレオウイルスであると同定された。



オルソレオウイルスの遺伝子は図9に示してあるように、L1-3、M1-3 及び S1-4 の 10本に分節している。今回の解析では、23768 全塩基が解析された。その一部を図9の背景に、分節毎に色分けして示したが、これらのうち、AP-PCR 法で解析されたのは黄色い文字で示したわずか34 塩基だった。しかし、その34 塩基が次に続くという大きな意味があった。



【Mammalian orthoreovirus/bovine 診断法の開発】ほ乳類のレオウイルス (Mammalian reovirus) の L1 遺伝子²⁾ および L3 遺伝子³⁾ に対する既知の PCR 法で今回の分離ウイルスの遺伝子増幅を試みたが増幅が見られなかった (図 10)。このウイルスの遺伝子の、それらプライマーとの結合部位を、今回得られた全塩基配列を用いて比較したところ、赤字で示したところで不一致が見られた。そこで、このウイルスに合わせて青字で示したような修正を行ったところ L1 遺伝子および L3 遺伝子とも良好な増幅が見られた (図 11)。



また、本ウイルスは HRT 細胞で良好な CPE を発現するので中和試験での抗体検査も可能である。

これらの検査手技により、今後、ウイルス検査や抗体検査が行われることにより、ウシ・オルソレオウイルスの実態が解明されると期待される。

【考察】 Mammalian orthoreovirus/bovine については文献等の情報もごく限られ、その病原性や浸潤状況はほとんど知られていない。ヒトにおいては 2007 年の高病原性鳥インフルエンザ感染症と類似した症例の報告例もあり、ウシでも認識されていない被害があることも考えられる。今回、診断法が開発されたことから、今後の調査の進展が期待される。

今回、Mammalian orthoreovirus/bovine の同定に至るには県内他機関（衛環研）との協力が大いに貢献した。今後もこのような協力関係の進展が望まれる。

次世代シーケンサーのような先端機器があれば未知ウイルスの同定は困難ではないと思われるが、それをすべての同定困難ウイルスに応用するのは現実的ではない。今回用いた AP-PCR 法はその橋渡しとしての役割を果たした。これは、家畜保健衛生所における適正技術（appropriate technology:AT）と位置づけできる。

家畜保健衛生所には家畜保健衛生所で必要な AT がある。このような AT の開発は、家畜保健衛生所の大きな責務のひとつであると考えられる。

【謝辞】 今回の調査において、ウシ・オルソレオウイルスの全塩基配列をしてくださった東京農工大学 特任准教授、現、石川県立大学教授 長井 誠先生に謝意を表します。

【参考文献】

1) Direct amplification of length polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species. E. Desmarais *et al.*, 1458–1465 Nucleic Acids Research, 1998, Vol. 26, No. 6

2) Detection of Mammalian Reovirus RNA by Using Reverse Transcription-PCR: Sequence Diversity within the 3-Encoding L1 Gene. Thomas P. Leary *et al.*, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2002, p. 1368–1375

3) Detection and Identification of Mammalian Reoviruses in Surface Water by Combined Cell Culture and Reverse Transcription-PCR. MICHAEL L. SPINNER *et al.*, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, July 2001, p. 3016–3020