

19 牛呼吸器病・下痢症関連ウイルス迅速検出のためのマルチプレックスダイレクトリアルタイム RT-PCR 法の検証

石狩家畜保健衛生所

○羽田 浩昭 尾宇江 康啓

はじめに

牛の呼吸器病・下痢症に関連するウイルス検出のため、当所では従来、各病原体について個別にコンベンショナル RT-PCR (cPCR) を用いた病性鑑定を実施してきたが、対象ウイルスが多岐に及ぶことから、網羅的に実施するためには膨大な時間が必要であった。しかし、岩手県五嶋らが設計した「牛呼吸器病及び下痢症に関連する病原体を検出するマルチプレックスリアルタイム RT-PCR (既報)」[1]により、12種のウイルスを同時検出(4plex×3unit)することが可能となり、大幅な迅速化・コストダウンが可能となった。

一方、SARS-CoV-2の遺伝子検出において、遺伝子抽出作業を行わず、検体を直接テンプレートとするダイレクトリアルタイム RT-PCR 試薬を用いた手法が簡便であるとの報告がある[2,3]が、当該試薬をマルチプレックス検出に用いた報告は無い。

今回、既報を基に更なる迅速化・コストダウンを図るため、上記の2手法を組み合わせたマルチプレックスダイレクトリアルタイム RT-PCR (MDr) を種々のウイルスについて検証した。

I MDr の構築と検証

1 材料と方法

検出対象は牛 RS ウイルス (BRSV)、牛コロナウイルス (BCoV)、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、D 型インフルエンザウイルス (IDV)、牛伝染性鼻気管炎ウイルス (IBRV)、牛鼻炎 A/ B ウイルス (BRAV、BRBV)、牛トロウイルス (BToV)、牛 A~C 群ロタウイルス (GAR、GBR、GCR) とした。

MDr の試薬は PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix (タカラバイオ、滋賀) を、比較のため実施した cPCR には PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (タカラバイオ、滋賀)、既報には TaqPath 1-Step Multiplex Master Mix (Thermo Fisher Scientific、アメリカ) をそれぞれ用いた。

MDr のプライマー・プローブセットは基本的に既報のものを使用した。BToV と GAR は MDr でバックグラウンドの影響を確認したため、2 次クエンチャー (Integrated DNA Technologies、アメリカ) で修飾したプローブを使用した。IDV 及び IBRV は MDr で著しく PCR 効率が低かったため、IDV は Hause ら[4]、IBRV は Abri1 ら[5]の設計したものへ変更した。また、既報で検証されていない BRAV、BRBV は Kishimoto ら[6]の設計したものを使用した。設計したマルチプレックス検出系及び各標識蛍光色素の対応を表 1 に示す。比較の

表 1 マルチプレックス検出系及び標識蛍光色素

標識 蛍光色素	Well 1	Well 2	Well 3
FAM	BRSV	IDV	BToV
HEX	—	IBRV	GAR
TexasRed	BCoV	BRAV	GBR
CY5	BVDV	BRBV	GCR

ための cPCR には当所で従来使用されていたプライマーセットを使用した。各プライマー・プローブセットの引用文献番号の対応を表 2 に示す。

各リアルタイム PCR は LightCycler96 (Roche Diagnostics、ドイツ) を用いて反応及び解析を実施した。

検証には各ウイルス標準株または野外株より QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen、ドイツ) を用いて抽出した核酸を段階希釈したものを用い、検出感度、検査時間及び検査コストを比較した。

(1) 臨床検体を用いた MDr の予備試験

BCoV を含む鼻腔スワブ乳剤及び糞便乳剤各 5 検体について、検体を直接テンプレートとした MDr を実施し、抽出核酸を用いた場合と比較した。

(2) MDr における熱抽出条件の検討

MDr の試薬は熱抽出と RT-PCR がワンステップで実施可能であることから、各ロタウイルス検出に必要な 2 本鎖 RNA の解離が可能となる熱抽出条件を検討した。条件は、①90℃3 分、②90℃3 分+98℃30 秒の 2 種で実施し、前処理として 98℃5 分処理を実施したものを基準として検出感度が低下しないものを良とした。

(3) MDr におけるマルチプレックス検出の検証

MDr において、プライマー・プローブセットを 1 種類のみ含む場合（個別検出）と、3~4 種類含む場合（マルチプレックス検出）の検出感度を比較した。

(4) MDr と他の検査系の感度比較

MDr と cPCR 及び既報について検出感度を比較した。

(5) MDr と他の検査系の時間・コスト比較

MDr と cPCR 及び既報について、1 検体 4 種病原体あたりの検査時間、作業時間、検査コストを比較した。コスト計算の対象は、プライマー・プローブセット、遺伝子抽出試薬、PCR 試薬とした。

2 結果

(1) 臨床検体を用いた MDr の予備試験

鼻腔スワブ乳剤の Ct 値は抽出核酸と比較し-0.2~1 の範囲であった。糞便乳剤は 0.3~5.4 の範囲で低下した。

(2) MDr における熱抽出条件の検討

前処理を実施した場合と比較して、①では検出感度が 100~1,000 倍低下したが、②では同等であった。このことから、以降の熱抽出は②の条件で実施した。

(3) MDr におけるマルチプレックス検出の検証

マルチプレックス検出と個別検出で検出感度に差は認められなかった。

(4) MDr と他の検査系の感度比較

各検査系での検出限界は表 3 のとおり。MDr は既報とほぼ同等の検出感度で、cPCR とは全ての項目で検出感度が同等以上であった。

(5) MDr と他の検査系の時間・コスト比較

1 検体 4 種病原体検出にかかる検査時間は MDr : 65 分、既報 : 95 分、cPCR : 265 分、作業時間は MDr : 5 分、既報 : 35 分、cPCR : 55 分、検査コストは MDr : 235 円/検体、既報 : 819 円/検体、cPCR : 1,160 円/検体であった。

表 2 各プライマー・プローブセットの引用文献番号の対応

	引用文献番号		
	MDr	既報	cPCR
BRSV	[7]	[7]	[11]
BCoV	[6]	[6]	[12]
BVDV	[8]	[8]	[13]
IDV	[4]	[6]	[14]
IBRV	[5]	[9]	未発表
BRAV	[6]	[6]	未発表
BRBV	[6]	[6]	未発表
BToV	[10]	[10]	[15]
GAR	[10]	[10]	[15]
GBR	[10]	[10]	[15]
GCR	[10]	[10]	[15]

表 3 各検査系の検出限界

	力価 (logTCID ₅₀ /ml)	検出限界希釈 (log)		
		MDr	既報	cPCR
BRSV	5	-5	-6	-5
BCoV	7	-8	-8	-7
BVDV	7	-5	-5	-4
IDV	6	-6	-6	-4
IBRV	8	-5	-5	-3
BRAV	3	-6	-6	-4
BRBV	不明	-5	-5	-4
BToV	6	-5	-5	-3
GAR	4	-7	-5	-4
GBR	不明	-3	-3	-2
GCR	不明	-4	-3	-3

※各項目で最も感度の高い検査系を網掛で示した

表 4 野外検体の検査結果

鼻腔スワブ乳剤			
既報			
		陽性	陰性
MDr	陽性	106	0
	陰性	14	10

糞便乳剤			
既報			
		陽性	陰性
MDr	陽性	99	0
	陰性	12	16

II 野外検体を用いた検証

1 材料及び方法

平成 26 年～令和 2 年度に採材され、検査終了後-80℃で保管している病性鑑定材料のうち、対象ウイルスを含む鼻腔スワブ乳剤 130 検体及び糞便乳剤 127 検体を直接プレートとして MDr を実施した。各乳剤は核酸抽出を行い、抽出核酸をプレートとして既報を実施し、MDr と既報の判定一致率を検証した。

既報のみ陽性となった検体は、既報での Ct 値や付随する検体情報から MDr で陰性となった要因について検討した。反応阻害が疑われた場合には、蒸留水で検体を希釈し再試験を実施した。

2 結果

各検体の検査結果は表 4 に示す。既報との陽性判定一致率は鼻腔スワブ乳剤で 88.3%、糞便乳剤では 89.1%であった。

MDr のみ陰性の検体の既報での平均 Ct 値は鼻腔スワブ乳剤 (n=14) で 37.6、糞便乳剤 (n=12) は 31.3 で、糞便乳剤は全て 1 カ月齢以下の子牛由来で色調から乳成分を含むと推察された。以上より糞便乳剤は反応阻害が疑われたため、蒸留水で検体を希釈し再度 MDr を実施した。その結果、10 倍希釈糞便乳剤で 12 検体中 10 検体を検出可能であった。希釈しても MDr では検出出来なかった糞便乳剤の既報での Ct 値は 33.9 以上であった。

III まとめと考察

今回構築した MDr は既報を簡易的にした手法だが、検出感度比較の結果、抽出核酸を用いた場合は既報と同等であり、従来実施していた cPCR より全ての項目で高感度であった。

臨床検体を用いた予備試験の結果、鼻腔スワブは反応阻害が殆ど無く、直接プレートとしても抽出核酸と同等の感度が得られると考えられたが、糞便乳剤は検体によっては強い反応阻害が起こることから、感度及び定量性には注意が必要であると考えられた。

MDr の熱抽出条件を検討した結果、煩雑な前処理が必要なロタウイルスを前処理不要で検出することができた。一般的に RT 反応に用いる酵素は耐熱性が無く、本法のようなワンステップ検出は行われていないことから、画期的な手法であると考えられた。

既報は cPCR より迅速かつ低コストで検査可能との報告[16]があるが、今回比較し

た結果、MDr はさらに大幅な時間短縮とコスト削減が可能であった。

野外検体を用いた検証試験では、鼻腔スワブ乳剤、糞便乳剤ともに 9 割程度の検体を検出可能であり、簡便な手法としては良好な成績であると考えられた。反応阻害の影響が予想された糞便乳剤でも多くが検出可能であったのは、陽性検体の Ct 値の多くは 20 以下（データ示さず）でウイルス量が非常に多く、反応阻害の影響を上回るためと考えられた。

一方、約 1 割の野外検体は MDr では検出出来なかった。鼻腔スワブは検体中のウイルス量が少ないことが原因と考えられたが、糞便乳剤はウイルスを多く含む検体でも検出出来なかった。これら糞便乳剤は全て 1 カ月齢未満の子牛由来であり、色調から乳成分による反応阻害が疑われた。これらの反応阻害の強い検体でも、一定以上のウイルスを含む検体であれば、10 倍希釈することで反応阻害が弱まり検出可能であった。

以上の成績から、MDr は、哺乳牛の糞便等の反応阻害の強い検体には検体の希釈が必要であるが、ウイルス検出に十分な感度と迅速・経済性を兼ね備える有用な手法と考えられる。

北海道の家畜保健衛生所には、令和 3 年 11 月現在 14 箇所中 12 箇所にリアルタイム PCR 機器が配備されており、試薬類を整備することで MDr が実施可能である。簡便な本法を用いれば、イムノクロマト法等の簡易検査キットに匹敵する迅速検査体制が、より安価に多種のウイルスに対し整備可能となることから、今後の活用を期待する。

稿を終えるにあたり、MDr にご助言戴いた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 鈴木 亨先生、岩手県中央家畜保健衛生所 五嶋祐介先生、並びに、野外検体の提供を戴いた北海道各家畜保健衛生所の皆様に深謝いたします。

引用文献

- [1] Goto Y, Yaegashi H, Fukunari K, Suzuki T : Design of a multiplex quantitative reverse transcription-PCR system to simultaneously detect 16 pathogens associated with bovine respiratory and enteric diseases, *J Appl Microbiol*, 129, 832-847(2020)
- [2] Lübke N, Senff T, Scherger S, Hauka S, Andree M, Adams O : Extraction-free SARS-CoV-2 detection by rapid RT-qPCR universal for all primary respiratory materials, *J Clin Virol*, 130, 104579(2020)
- [3] Visseaux B, Collin G, Houhou-Fidouh N, Hingrat Q L, Ferré VM, Damond F, Ichou H, Descamps D, Charpentier C : Evaluation of three extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR assays: A feasible alternative approach with low technical requirements, *J Virol Methods*, 291, 114086(2021)
- [4] Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, Wang D, Nelson EA, Lib F : Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family, *mBio*, 5(2), e00031-14(2014)
- [5] Abril C, Engels M, Liman A, Hilbe M, Albini S, Franchini M, Suter M, Ackermann M : Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice, *J. Virol.* 78, 3644-3653(2004)
- [6] Kishimoto M, Tsuchiaka, S., Rahpaya SS, Hasebe A, Otsu K, Sugimura S, Kobayashi S, Komatsu N, Nagai M, Omatsu T, Naoi Y, Sano K, Okazaki-Terahima S, Oba M, Katayama Y, Sato R, Asa T, Mizutani T : Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex, *J Vet Med Sci*, 79, 517-523(2017)
- [7] Boxus M, Letellier C, Kerkhofs P : Real time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus, *J Virol Methods*, 125, 125-130(2005)
- [8] Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H, Beer M : A universal heterologous int

- ernal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses, *J. Virol. Methods*, 136, 200–209(2006)
- [9] Wernike K, Hoffmann B, Kalthoff D, König P, Beer M : 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)
- [10] Tsuchiaka S, Masuda T, Sugimura S, Kobayashi S, Komatsu N, Nagai M, Otsu T, Furuya T, Oba M, Katayama Y, Kanda S, Yokoyama T, Mizutani T : Development of a novel detection system for microbes from bovine diarrhea by real-time PCR, *J Vet Med Sci*, 78, 383-389(2016)
- [11] Vilček Š, Elvander M, Ballagi-pordány A, Belák S : Development of Nested PCR Assays for Detection of Bovine Respiratory Syncytial Virus in Clinical Samples, *J Clin Microbiol*, 32, 2225-2231(1994)
- [12] Tsunemitsu H, Smith DR, Saif LJ : Experimental inoculation of adult cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR, *Arch Virol*, 144, 167-175(1999)
- [13] Vilček Š, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ : Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, *Arch Virol*, 136, 309-323(1994)
- [14] 早川 潤、上垣華穂、増子朋美、小林和美、高橋弘康 : 北海道内で初めて呼吸器病発症牛から分離された D 型インフルエンザウイルス、第 67 回北海道家畜保健衛生業績発表会集録(2019)
- [15] Fukuda M, Kuga K, Miyazaki A, Suzuki T, Tasei K, Aita T, Mase M, Sugiyama 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, 1063-1069(2012)
- [16] 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 : 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、平成 30 年度青森県家畜保健衛生業績発表会集録 (2018)