

国内で分離されたオルソブニヤウイルスを検出するための RT-PCR法の改良

加藤友子¹⁾, 松本春菜²⁾, 平島宣昌³⁾, 白藤浩明⁴⁾, 山川 睦⁵⁾, 梁瀬 徹^{4)*}

(平成 24 年 8 月 31 日 受付)

Improvement of RT-PCR assay for detection of orthobunyaviruses isolated in Japan

Tomoko KATO¹⁾, Haruna MATSUMOTO²⁾, Yoshimasa HIRASHIMA³⁾, Hiroaki SHIRAFUJI⁴⁾,
Makoto YAMAKAWA⁵⁾ & Tohru YANASE⁴⁾

ブニヤウイルス科オルソブニヤウイルス属のアカバネウイルス (AKAV) やアイノウイルス (AINOV), ピートンウイルス (PEAV) による牛の流産, 死産, 早産, 先天異常子の出産といった異常産が日本ではたびたび流行し, 甚大な経済被害をもたらしている。さらに近年では, これまで国内で確認されていなかったオルソブニヤウイルス属のシャモンダウイルス (SHAV) やサシュベリウイルス (SATV) が相次いで分離され, これらのウイルスの関与が疑われる牛の異常産の発生も報告されている。そのため, 我々は既報をもとに, SHAV, SATV を含む国内で分離されたオルソブニヤウイルスを検出する RT-PCR 法の改良を行い, その有用性を検証した。国内外で分離された AKAV 15 株, AINOV 4 株, PEAV 5 株, SHAV 3 株, SATV 4 株の培養上清から抽出したウイルス RNA を用いて検証実験を行ったところ, すべての株で特異遺伝子が検出された。検出感度はウイルス株によって差がみられたが, ウイルス感染価 10-1,000 TCID₅₀/ml 程度から検出可能であったことから, これらのオルソブニヤウイルスの検出に有用であることが確認された。

緒言

ブニヤウイルス科オルソブニヤウイルス属のウイルス (以下オルソブニヤウイルス) は, 蚊やヌカカなどの吸血昆虫によって媒介されるアルボウイルスで, 人や動物に疾病を引き起こす様々なウイルスを含んでいる。我が国では, オルソブニヤウイルス属のアカバネウイルス (AKAV) とアイノウイルス (AINOV) による牛の異常産 (流産, 早産, 死産および子牛の先天異常) が繰り返し発生しており, 流行の度に甚大な経済被害をもたらしているほか, 1990 年代後半からはピートンウイルス (PEAV) の関与が疑われる牛の異常産の発生も報告されている^{5,7)}。また, 2006 年と 2011 年には, AKAV の生後感染による牛の脳脊髄炎の大規模な流行がみられるなど, 従来とは異なる病態を示す変異株の侵入も認められている^{2,5)}。さらに近年, これまで日本で確認されて

- 1) 農研機構 動物衛生研究所 動物疾病対策センター
- 2) 宮崎県宮崎家畜保健衛生所
- 3) 鹿児島県中央家畜保健衛生所
- 4) 農研機構 動物衛生研究所 温暖地疾病研究領域
- 5) 農研機構 動物衛生研究所 ウイルス・疫学研究領域

- 1) Center for Animal Disease Control and Prevention, National Institute of Animal Health
- 2) Miyazaki Livestock Hygiene Service Center
- 3) Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center
- 4) Subtropical Disease Research Division, National Institute of Animal Health
- 5) Viral Disease and Epidemiology Research Division, National Institute of Animal Health

* Corresponding author: Tohru YANASE
Subtropical Disease Research Division, National Institute of Animal Health, 2702 Chuzan-cho, Kagoshima 891-0105, JAPAN
Tel: 099-268-2078
Fax: 099-268-3088
E-mail: tyanase@affrc.go.jp

表1. RT-PCR に供試したウイルス株

ウイルス	株名	遺伝子型	由来	分離年	分離地	アクセッション番号
AKAV	OBE-1*	II	ウシ胎子	1974	岡山	AB000851
	Iriki*	I	ウシ小脳	1984	鹿児島	AB000863
	KM-1/Br/06	I	ウシ大脳	2006	熊本	AB426271
	KM-2/Br/06	I	ウシ大脳	2006	熊本	AB426272
	YG-1/Br/07	I	ウシ大脳	2007	山口	
	FI-1/Br/08	II	ウシ大脳	2008	福井	
	KSB-5/C/08	II	ウシヌカカ	2008	鹿児島	
	TT-1/E/08	II	ウシ血球	2008	鳥取	
	NG-1/P/08	II	ウシ血漿	2008	新潟	
	OS-1/Pl/08	II	ウシ胎盤	2008	大阪	
	OY-1/P/08	II	ウシ血漿	2008	岡山	
	ON-1/E/10	I	ウシ血球	2010	沖縄	
	HG-1/P/10	II	ウシ血漿	2010	兵庫	
	OY-1/Ne/11	I	ウシ神経	2011	岡山	
	TS-1/Ce/11	I	ウシ小脳	2011	徳島	
AINOV	JaNAr28*		コガタアカイエカ	1964	長崎	M22011
	ON-2/B/88		ウシ血液	1988	沖縄	AB334168
	KS-1/P/98		ウシ血漿	1998	鹿児島	AB334178
	SG-2/E/02		ウシ血球	2002	佐賀	AB334180
PEAV	CSIRO110*		オーストラリアヌカカ	1976	オーストラリア	AY048678
	OYE-56-8		ウシ血液	1987	沖縄	AB542962
	NS-3/P/99		ウシ血漿	1999	長崎	AY048680
	ON-1/P/05		ウシ血漿	2005	沖縄	AB542964
	KSB-1/P/06*		ウシ血漿	2006	鹿児島	AB542965
SHAV	An5550*		ウシ血液	1965	ナイジェリア	AB362404
	KSB-6/C/02*		ヌカカ (種不明)	2002	鹿児島	AB183278
	ON-3/P/07		ウシ血漿	2007	沖縄	AB698470
SATV	OY-1/P/99		ウシ血漿	1999	岡山	AB125371
	ON-1/P/06		ウシ血漿	2006	沖縄	AB698467
	OI-1/P/07		ウシ血漿	2007	大分	
	KSB-2/C/08*		ウシヌカカ	2008	鹿児島	AB698469

* : 検出感度の比較に用いたウイルス株

いなかったオルソブニヤウイルス属のシャモンダウイルス (SHAV) やサシュペリウイルス (SATV) が相次いで分離され、牛の異常産との関連が示唆されている^{3,7,9,11)}。2011年には欧州で、SHAV と SATV の遺伝子再集合体と考えられるシュマレンベルクウイルスが出現し、牛や山羊、めん羊に異常産の大規模な流行を引き起こすなど、家畜衛生分野でのオルソブニヤウイルスの重要度は世界的にも高まりつつある^{1,8,10)}。

国内では、牛に疾病を引き起こすアルボウイルスの浸潤状況を把握するために、おとり牛やヌカカなどからのウイルス分離が試みられてきた。しかし、オルソブニヤ

ウイルス属以外にも、レオウイルス科オルビウイルス属や、ラプトウイルス科エフェメロウイルス属の多様な種類のアルボウイルスが分離されるため、ウイルスの検出と同定には複数の検査法を組み合わせるなど、多大な労力と時間が必要とされている。2004年には Ohashi et al.⁴⁾により、AKAV および AINOV、PEAV に加えて牛に疾病を引き起こす主要なオルビウイルス (チュウザンウイルス、イバラキウイルス、ブルータングウイルス) を同時に検出するマルチプレックス RT-PCR 法が開発され、これらのウイルスを迅速かつ簡便に検出することが可能になった。しかし、この方法では SHAV および SATV の

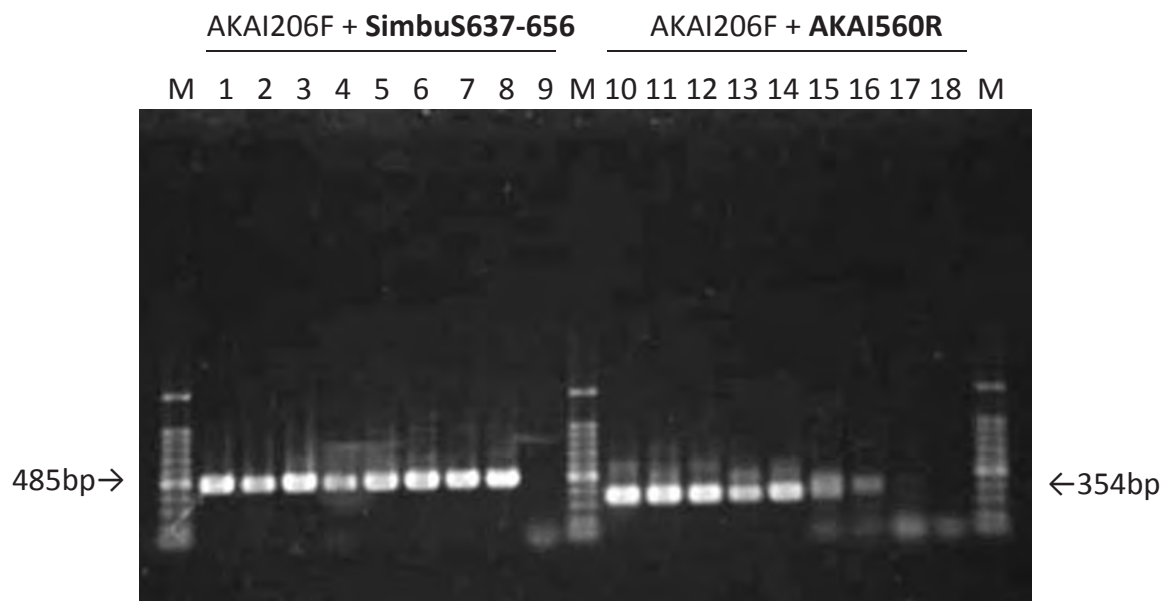


図1. AKAV および AINOV, PEAV, SHAV, SATV の代表株の新規および既報のプライマーセットを用いた RT-PCR による検出

AKAI206F と SimbuS637-656 (レーン 1 から 9, 増幅産物 485bp), AKAI206F と AKAI560R (レーン 10 から 18, 増幅産物 354bp) のプライマーセットを使用した。レーン 1 および 10: AKAV OBE-1 株, レーン 2 および 11: AKAV Iriki 株, レーン 3 および 12: AINOV JaNAr28 株, レーン 4 および 13: PEAV KSB-1/P/06 株, レーン 5 および 14: PEAV CSIRO110 株, レーン 6 および 15: SHAV KSB-6/C/02 株, レーン 7 および 16: SHAV An5550 株, レーン 8 および 17: SATV KSB-2/C/08 株, レーン 9 および 18: 陰性対照, レーン M: 100bp DNA ラダー

検出は困難であったことから、遺伝子検査法の改良が必要であると考えられた。本研究では、オルソブニヤウイルスの S RNA 分節を標的とした新規のプライマーセットを作成し、国内で分離されたオルソブニヤウイルスの RT-PCR による検出を試みるとともに、既報のプライマーセットとの感度の比較を行い、その有用性を検証した。

材料および方法

ウイルス株は、国内および国外分離株を含む AKAV 15 株, AINOV 4 株, PEAV 5 株, SHAV 3 株, SATV 4 株の計 31 株を用いた (表 1)。ウイルスの増殖は HmLu-1 および BHK-21 細胞を用いて行い、培養上清中のウイルスの感染価は 96 ウェルマイクロタイタープレートを使用して定法に従い測定した。ウイルス RNA は Viral RNA Purification kit (Roche Diagnostics) を用いて、培養上清 200 μ l から抽出し、50 μ l の DEPC 処理水に溶解した。RT-PCR には、上流側プライマーとして AKAI206F (5'-CACAACCAAGTGTCTCGATCTTA-3')⁴⁾ を、下流側プライマーとして、国内で分離されたオルソブニヤ

ウイルスの S RNA 分節の間で高い相同性を示した領域の塩基配列を基に設計した SimbuS637-656 (5'-GAGAATCCAGATTTAGCCCA-3')を用いた。また、これらの新規プライマーセットと、既報の下流側プライマー AKAI560R (5'-AAGTTGACATCCATTCATC-3')を使用したプライマーセット⁴⁾との間で感度の比較を行った。その際、検出感度の比較のため、S RNA 分節の塩基配列の違いや分離年、分離場所に基づき、各ウイルスの代表株、計 8 株を選択し、感染価を測定した培養上清の 10 倍階段希釈液から抽出した RNA を RT-PCR のテンプレートとして用いた。RT-PCR は、Titan One Tube RT-PCR kit (Roche Diagnostics) を使用して、添付のプロトコルに従って実施した。反応条件は、逆転写反応 50°C 30 分、熱変成 94°C 2 分の後、94°C 30 秒 → 55°C 30 秒 → 68°C 45 秒のステップを 10 サイクル、さらに 94°C 30 秒 → 55°C 30 秒 → 68°C 45 秒* (*1 サイクルごとに 5 秒ずつ追加) のステップを 25 サイクル、最後に 68°C 7 分の加温とした。反応液は、1% TAE アガロースゲルを用いた電気泳動に供し、エチジウムブロマイド染色を行って UV 光下で観察した。

表2. 新規および既報のプライマーセットを用いた RT-PCR による検出感度の比較, 並びにプライマーと結合部位の塩基対のミスマッチ数

ウイルス株	感染価 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	検出可能な希釈倍率		塩基対のミスマッチ数		
		新規	既報	AKAI206F	SimbuS637-656	AKAI560R
AKAV OBE-1	6.3	6	5		1	
AKAV Iriki	6.8	3	5		2	1
AINOV JaNAr28	6.9	6	4	1	1	
PEAV KSB-1/P/06	6.8	3	4	2	3	1
PEAV CSIRO110	6.4	4	4	1	1	
SHAV KSB-6/C/02	7.0	6	1			6
SHAV An5550	6.5	5	1			6
SATV KSB-2/C/08	6.9	6	—			6

—: 検出されず。

結 果

図1に各ウイルスの代表株8株を用いて行った, 新規のプライマーセット (AKAI206F と SimbuS637-656) と既報のプライマーセット (AKAI206F と AKAI560R) による RT-PCR の結果を示す。新規のプライマーセットでは, 供試したすべてのウイルス株で 485bp の増幅産物が確認された。一方, 既報のプライマーセットを用いた場合, AKAV と AINOV では 354bp の増幅産物が明瞭に確認されたのに対して, SHAV ではバンドが不鮮明であり, SATV では全く増幅産物が検出されなかった。次に, 同じ株を用いて行った, 新規と既報の各プライマーセットの検出感度を比較した結果を表2に示す。新規のプライマーセットを用いた RT-PCR では, AKAV OBE-1 株および AINOV, SHAV, SATV のそれぞれの株が 10 TCID₅₀/ml 程度から検出され, 既報のプライマーセットを用いた場合よりも高感度であった。特に SHAV および SATV は, 既報のプライマーセットではほぼ検出不可能だったが, 新規プライマーセットでは 10,000 倍以上の感度で検出された。一方, PEAV CSIRO110 株はいずれのプライマーセットでもほぼ同等の感度で検出され, 100 TCID₅₀/ml 程度の感染価があれば検出可能であることが示された。しかし, AKAV Iriki 株と PEAV KSB-1/P/06 株は, 新規のプライマーセットでは検出限界が感染価 1,000 TCID₅₀/ml 程度であり, 既報のプライマーセットの方が 10-100 倍程度高い感度を示した。また, 図1で供試したウイルス株に加えて, 国内で分離された AKAV 13 株, AINOV 3 株, PEAV 3 株, SATV 3 株, SHAV 1 株でも, 新規のプライマーセットを使用した RT-PCR により, 485bp の増幅産物が特異的に検出された (図2)。

考 察

新規プライマーセットを用いた RT-PCR により, これまで検出が困難であった SHAV や SATV を含めたオルソブニヤウイルス国内分離株の検出が可能になった。本法と, RT-PCR 増幅産物の塩基配列の解析や, 既報の AKAV および AINOV, PEAV を個別に検出する RT-PCR⁶⁾などを組み合わせることにより, ウイルス種の迅速な同定が可能になると考えられる。

検出感度の比較において, 新規のプライマーセットを使用した場合, 1/10 から 1/100 程度の感度の低下がみられた AKAV Iriki 株と PEAV KSB-1/P/06 株では, SimbuS637-656 と S RNA 分節上の結合部位にそれぞれ2 および 3 塩基対のミスマッチが認められた (表2)。これらの塩基対のミスマッチは, AKAV では Iriki 株と同じ遺伝子型 I に分類されるすべての株に, また, PEAV ではすべての国内分離株に認められたが, 混合プライマーの使用などによりミスマッチによる感度の低下を解消できると考えられる。また, 新規プライマーセットとの結合部位は, シュマレンベルクウイルスを含む国内未分離のオルソブニヤウイルスの間でも高い相同性が保持されている¹⁾ことから, これらのウイルスの検出の可否についても, 今後, 検討する必要があると思われる。

参考文献

- Hoffmann, B., Scheuch, M., Höper, D., et al.: Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 469-472 (2012).
- Kono, R., Hirata, M., Kaji, M., et al.: Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus in southern Japan. *BMC Vet. Res.* 4, 20 (2008).

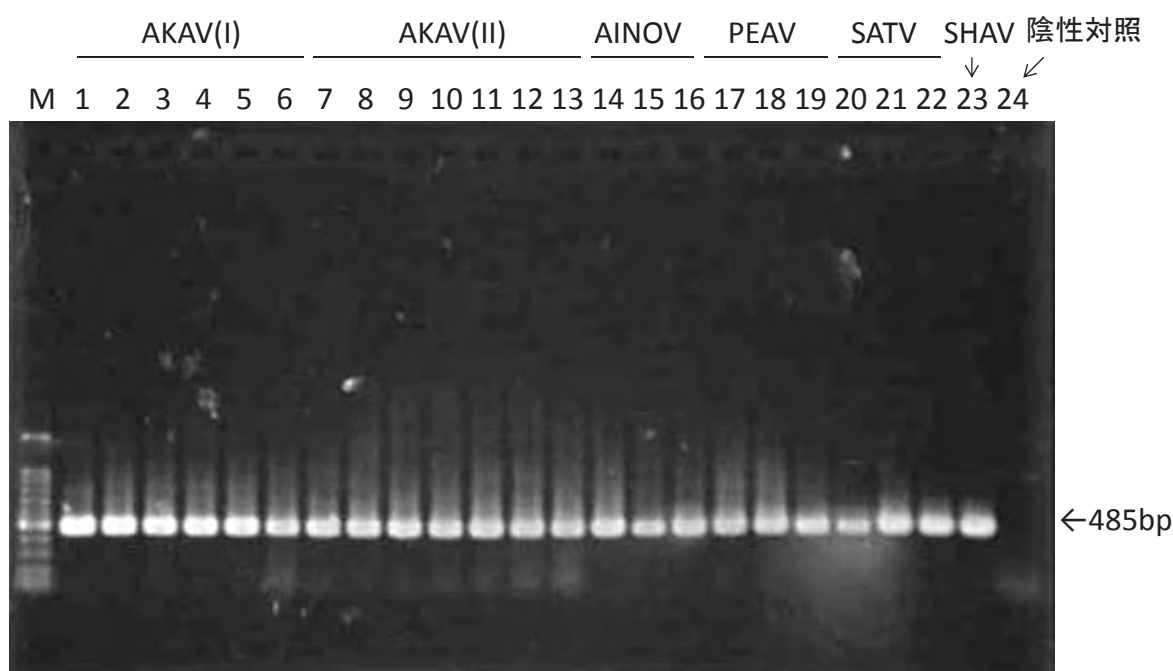


図2. オルソブニヤウイルス国内分離株の新規のプライマーセットを用いた RT-PCR による検出
 レーン1から6: AKAV 遺伝子型 I (1: KM-1/Br/06, 2: KM-2/Br/06, 3: YG-1/Br/07, 4: ON-1/
 E/10, 5: OY-1/Ne/11, 6: TS-1/Ce/11), レーン7から13: AKAV 遺伝子型 II (7: FI-1/Br/08,
 8: KSB-5/C/08, 9: TT-1/E/08, 10: NG-1/P/08, 11: OS-1/Pl/08, 12: OY-1/P/08, 13: HG-1/
 P/10), レーン14から16: AINOV (14: ON-2/B/88, 15: KS-1/P/98, 16: SG-2/E/02), レーン
 17から19: PEAV (17: OYE-56-8, 18: NS-3/P/99, 19: ON-1/P/05), レーン20から22: SATV
 (20: OY-1/P/99, 21: ON-1/P/06, 22: OI-1/P/07), レーン23: SHAV ON-3/P/07, レーン24:
 陰性対照, レーン M: 100bp DNA ラダー

- 3) 九州・山口・沖縄各県病理担当者, 動物衛生研究所:
第12回九州・山口・沖縄病理事例研修会(九州支所
- 2008)における症例. 動物衛生研究所研究報告.
116, 51-59 (2009).
- 4) Ohashi, S., Yoshida, K., Yanase, T., et al.: Simultaneous
detection of bovine arboviruses using single-tube
multiplex reverse transcription-polymerase chain
reaction. J. Virol. Methods. 120, 79-85 (2004).
- 5) 山川 睦, 筒井俊之: アカバネ病の最近の流行動向と
対策. 家畜診療. 59, 395-401 (2012).
- 6) 山川 睦: 牛異常産関連オルソブニヤウイルスの遺伝
子を検出するマルチプレックス RT-PCR 法について.
家畜衛生週報. 3189, 47-48 (2012).
- 7) 梁瀬 徹: ヌカカが媒介する家畜のアルボウイルス.
衛生動物. 60, 195-212 (2009).
- 8) 梁瀬 徹: 欧州におけるシュマレンベルクウイルス感
染症の流行. 獣疫学雑誌. 16, 76-77 (2012).
- 9) Yanase, T., Fukutomi, T., Yoshida, K., et al.: The
emergence in Japan of Sathuperi virus, a tropical
Simbu serogroup virus of the genus *Orthobunyavirus*.
Arch. Virol. 149, 1007-1013 (2004).
- 10) Yanase, T., Kato, T., Aizawa, M., et al.: Genetic
reassortment between Sathuperi and Shamonda
viruses of the genus *Orthobunyavirus* in nature:
implications for their genetic relationship to
Schmallenberg virus. Arch. Virol. 157, 1611-1616
(2012).
- 11) Yanase, T., Maeda, K., Kato, T., et al.: The resurgence
of Shamonda virus, an African Simbu group virus
of the genus *Orthobunyavirus*, in Japan. Arch. Virol.
150, 361-369 (2005).

Summary

Improvement of RT-PCR assay for detection of orthobunyaviruses isolated in Japan.

Tomoko KATO¹⁾, Haruna MATSUMOTO²⁾, Yoshimasa HIRASHIMA³⁾, Hiroaki SHIRAFUJI⁴⁾,
Makoto YAMAKAWA⁵⁾ & Tohru YANASE⁴⁾

Akabane virus (AKAV), Aino virus (AINOV) and Peaton virus (PEAV) of the family *Bunyaviridae*, the genus *Orthobunyavirus* have been confirmed as etiological agents of bovine abnormal deliveries, such as abortion, stillbirth, premature birth and calf deformities. The outbreaks caused by these viruses have been observed in Japan and severely affected Japanese livestock industry. Furthermore, Shamonda virus (SHAV) and Sathuperi virus (SATV) of the genus *Orthobunyavirus* have been isolated repeatedly in recent years in Japan, and are suspected causes of bovine abnormal deliveries. In this study, we have developed a new RT-PCR assay for easy and rapid detection of the above mentioned 5 orthobunyaviruses. All of 15 AKAV, 4 AINOV, 5 PEAV, 3 SHAV and 4 SATV isolates were detected by the technique. The detection sensitivity was different in each isolates and was ranging from 10 to 1,000 TCID₅₀/ml. These data indicate that our RT-PCR assay with the single primer set is useful for the detection of orthobunyaviruses which have been isolated in Japan.