研究情報

牛異常産関連オルソブニヤウイルス検出用マルチプレックス RT-PCR の開発

YAMAKAWA Makoto
ウイルス・疫学研究領域　領域長補佐　山川　睦

牛に異常産を起こす主要なアルボウイルスとしてブニヤウイルス科オルソブニヤウイルス属のアカバネおよびアイノウイルスが知られています。近年、アカバネウイルスの流行が全国に頻発する傾向にあることに加え、2006 年および 2011 年に多発したアカバネウイルス生後感染による脳脊髄炎や、オルソブニヤウイルス属のピートンウイルスが関与したと思われる牛異常産も西日本で報告されています。このようなアルボウイルスの流行状況の変化に的確に対応するためには、流行株の性状を絶えず把握し、検査法を改良してその精度を高めていく必要があります。現在、牛異常産関連オルソブニヤウイルスの遺伝子検査は、S RNA 分節の塩基配列を基に作製された共通プライマー（Forward：5'- CAC AAC CAA GTG TCG ATC TTA -3'、Reverse：5'- GAG AAT CCA GAT TTA GCC CA -3'）を用いた RT-PCR（451 塩基を増幅）で行われていますが（図ー A)、アカバネ、アイノあるいはピートンウイルスの種を特定するためには、PCR 産物の塩基配列を解読する必要があります。この煩雑さを解消するために、これら 3 種のウイルスをより簡便かつ迅速に判別できるマルチプレックス RT-PCR を開発しました。

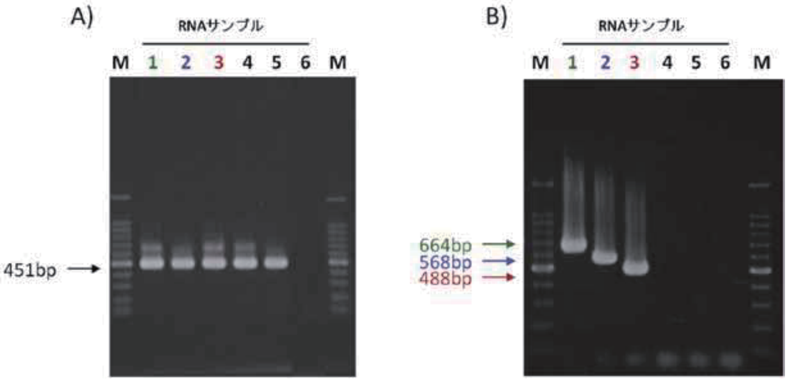
1959 年から現在までに動物衛生研究所温暖地疾病研究領域（九州支所）を中心に分離・収集された多数の株の遺伝子データを基に、各ウイルスを特異に検出するプライマーを設計し、有用性を検証しました。標的遺伝子は中和抗原 Gc をコードする M RNA 分節であり、種特異プライマーの塩基配列は下記のとおりです。

1) アカバネウイルス（AKAV）; 増幅サイズ : 664 塩基対
AKAVM-F: 5'-AAG CAA GAG GAA TGC AGC TCT ACA-3'
AKAVM-R: 5'-CTG TTT TGA GGA GTC GAA TAG ACC-3'

2) アイノウイルス（AINOV）; 増幅サイズ : 568 塩基対
AINOVM-F: 5'-TGC TAT AGC CCC TTC ATA CAT TGG-3'
AINOVM-R: 5'-TGG CAT GTT TGC AGT GGT TAC AGT-3'

3) ピートンウイルス（PEAV）; 増幅サイズ : 488 塩基対
PEAVM-F: 5'-CCT TCC ATA CGC CAT TTA GGT GA-3'
PEAVM-R: 5'-TGC TCA TCA CAT TCA GAT GA-3'

このマルチプレックス RT-PCR は、遺伝子検査を実施している家畜病性鑑定施設に速やかに導入することが可能です。実施に当たっては、検査材料から市販の核酸抽出キットにより調整した核酸、これら 3 種のプライマーセットおよびワンステップ RT-PCR キットを用いて反応液を作製し、反応を行います。操作上の留意点は、①アニーリング温度を 55℃に設定すること、②通常の RT-PCR よりプライマー 2 セット（4 プライマー）分だけ反応液に加える超純水の量を減らすこと、の 2 つです。この 2 点以外は使用するキットの反応条件に合わせれば問題ありません。



図．牛異常産関連オルソブニヤウイルス遺伝子の検出
A) 共通プライマーを用いた RT-PCR
種に関係なく同一サイズの遺伝子（S RNA 分節）が増幅される。
B) 種特異プライマーを用いたマルチプレックス RT-PCR
アカバネ、アイノおよびピートンウイルスそれぞれの特異遺伝子（ M RNA 分節）が増幅される。
M．分子量マーカー（ 100bp ladder ）
1．アカバネウイルス　2．アイノウイルス　3．ピートンウイルス
4および5．その他のオルソブニヤウイルス　6．陰性対照

マルチプレックス RT-PCR の結果、アカバネウイルスの場合には 664 塩基対、アイノウイルスの場合には 568 塩基対、ピートンウイルスの場合には 488 塩基対の特異遺伝子が検出されます。交差反応等による非特異的な遺伝子増幅は認められないので、アガロースゲル電気泳動によって増幅遺伝子のサイズを確認するだけでどのウイルスであるか同定することが可能です（図ー B)。本法は、2011 年に中四国地方を中心に脳脊髄炎が流行した際に診断法の一つとして使用され、原因であるアカバネウイルスの同定に貢献しました。今後も迅速同定法としての活用が期待されるところです。