

# 研究情報

## 牛パピローマウイルスを効率的に検出する PCR 法の開発

HATAMA Shinichi

寒地酪農衛生研究領域 主任研究員 畠間 真一

### はじめに

牛パピローマウイルス (BPV) は、牛乳頭腫症の原因ウイルスです。牛乳頭腫症とは、牛の体表皮膚や粘膜に腫瘍ができる病気で、全国的に発生しています。本病の適切な治療および予防対策を実施するには、正確に診断する必要があり、そのためには臨床症状や病理組織像の観察だけでなく、原因ウイルスの遺伝子解析を行うことが重要です。しかし、従来行われてきた PCR 法では、乳頭腫病変からウイルスを検出できないケースがしばしば認められました。

### PCR法開発の経緯

これまで世界標準として最も一般的に行われてきた PCR 法は、FAP59/FAP64 や MY09/MY11 というプライマーセットを用いた方法です。前者は人の体表皮膚の腫瘍から、後者は人の粘膜の腫瘍からそれぞれヒトパピローマウイルス (HPV) を検出するために開発

されたプライマーです。両者は家畜や実験動物、野生動物からそれぞれの動物に固有のパピローマウイルス (PV) を検出する際にも有用であることがわかり、PV のユニバーサルプライマーとして広く使われるようになりました。しかし、本来 HPV 検出用として開発されたプライマーであることから、どうしても BPV の検出に適さないケースが生じます。特に最近 BPV の遺伝学的多様性が明らかになるにつれ、BPV 検出専用のプライマーの必要性が高まってきました。

### 新たに開発したPCR法

私たちは、BPV ゲノムの主要外殻たんぱく質コード領域 (L1 領域) をターゲットとした新たな PCR プライマーを設計し、これを用いることで効率の良い BPV 検出法の確立を試みました。プライマーの配列と特徴は、表 1 に示したとおりです。subAup/subAdw はデルタ ( $\delta$ )-PV 属 (BPV-1、2) およびイプシロ

表 1. プライマーとその配列および特徴

プライマー	配列	増幅産物	標的
subAup	CCAGAYTAYYTMAAAATGGC	443 bp	$\delta$ -PV, $\epsilon$ -PV
subAdw	ATAAMKGCTAGCTTATATTC		
subBup	TWYAATAGGCCCTTTGGAT	590 bp	$\xi$ -PV
subBdw	TTMCGCCTACGCTTTGGCGC		

### 反応液の調整：

鋳型 DNA	1 $\mu$ l
10 × Ex Taq バッファー	2 $\mu$ l
dNTP	1.6 $\mu$ l
プライマー (0.01 $\mu$ M)	各 1 $\mu$ l
Takara Ex Taq	0.1 $\mu$ l (0.5U)
dH <sub>2</sub> O	13.3 $\mu$ l
合計	20 $\mu$ l

### PCR 反応：

94℃、1 分	↓
94℃、45 秒	
55℃、30 秒	35 サイクル
72℃、1 分	
↓	
72℃、1 分	

図 1. PCR 反応条件

ン ( $\epsilon$ )-PV 属 (BPV-5、8) を、subBup/subBdw はグザイ ( $\xi$ )-PV 属 (BPV-3、4、6、9、10) を検出するためのプライマーです。これらプライマーセットによって、BPV-7 (属が未定) を除く全ての既知 BPV が検出できるように理論上設計されています。PCR の反応条件は、図 1 に記載した通りです。

### PCR法の実際

実際に乳頭腫病変から BPV の検出を行ったところ、10 種類の既知 BPV の内、少なくとも BPV-1 ~ 6、BPV-9、10 を検出できることが確認されました (図 2)。BPV-7 と BPV-8 に関しては、これらウイルスが予め感染した乳頭腫病変を入手できなかったため、検出できるかどうかの確認試験を行っていません。

また本 PCR によって増幅された DNA の塩基配列を決定し、データベースに登録済の配列と相同性検索をすることで、検出された BPV の遺伝子型を推測することが可能です。この方法によって得られた結果と、FAP59/FAP64 プライマーによる PCR およびその後の遺伝子解析によって得られた結果とを比較すると、常に一致することが確かめられました。したがって本法は、従来行われていた PCR 法と同様に遺伝子型別診断に利用可能であり、さらに従来法では検出困難であった遺伝子型を検出できる可能性があります。

### PCR法の応用例

国内の牛乳頭腫症発生事例から 167 検体の乳頭腫病変を採取し、本法を用いて遺伝子型別診断しました。その結果、既知 BPV 以外に 3 種類のさらなる新型ウイルスの候補 (BPV/JPN-NIAH1、2、3) が見つかり

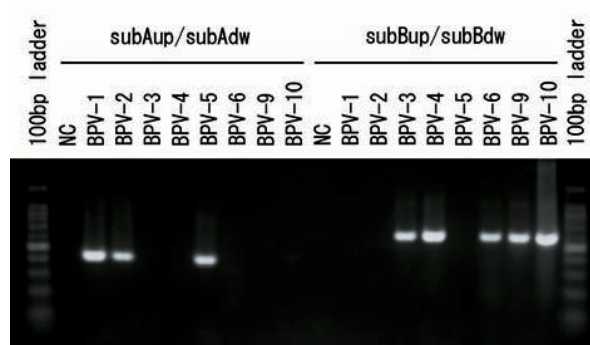


図 2. PCR 解析の結果

subAup/subAdw によって、 $\delta$ -PV 属 (BPV-1、2) と  $\epsilon$ -PV 属 (BPV-5) が検出される。subBup/subBdw によって、 $\xi$ -PV 属 (BPV-3、4、6、9、10) が検出される。NC: 陰性コントロール

ました。この内 BPV/JPN-NIAH1 に関しては、全ゲノム塩基配列の決定に成功し、 $\xi$ -PV 属の新型ウイルスであることがわかったため、その後 BPV-11 と名付けました。このように本 PCR 法は、新型 BPV を検出し、同定する手法としても非常に有用です。

### おわりに

本研究では、BPV を牛乳頭腫症病変から効率的に検出する PCR 法を開発しました。本法を、家畜の疾病診断や研究のために役立てて頂ければ幸いです。

掲載誌 1) Hatama S. et al., Arch. Virol. 156, 2011, 1281-1285., 2) Hatama S., Springer Index of Viruses 2nd edition Vol. 3, 2011, 1089-1092.

この研究内容は農研機構ホームページでもご覧いただけます。  
[http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/niah/2011/170e1\\_01\\_31.html](http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/niah/2011/170e1_01_31.html)