

8 Nested rPCR を利用した地方病性牛白血病検査法の検討

○竹内美穂 磯田加奈子

要 約

牛白血病ウイルス (BLV) の遺伝子検査では、一般に Nested 法によるコンベンショナル PCR (Nested PCR) と定量的遺伝子検査 (qPCR) が用いられている。Nested PCR は qPCR と比較して安価、高感度である一方、検査に時間や手間がかかる。また、多量に増幅された PCR 産物を直接取り扱うことによる検査室の汚染が危惧される。今回、検査の効率化と DNA 汚染低減のため、Nested PCR の 2nd コンベンショナル PCR を、インターカレーター法によるリアルタイム PCR で代替した検査方法 (Nested rPCR) について検討した。qPCR、Nested PCR 及び Nested rPCR の検査成績を比較したところ、Nested PCR と Nested rPCR の成績は一致した。Nested PCR 及び Nested rPCR の検出感度は qPCR より高く、qPCR で陰性であった検体も検出可能であった。Nested rPCR は電気泳動が不要であることから、検査時間が Nested PCR より約 1 時間短縮された。また、PCR プレートの蓋をあけずに判定できるため DNA 汚染も低減され、検査経費も Nested PCR と変わらないことから、地方病性牛白血病の診断法として有用と考えられる。さらに、Nested rPCR は反応条件等の検討により、PRRS や牛 RS ウイルス病等の疾病検査でも利用でき、幅広い応用が可能と考えられる。

地方病性牛白血病 (EBL) の原因である牛白血病ウイルス (BLV) を検出する遺伝子検査には、一般的に定性的遺伝子検査である Nested PCR と、BLV 遺伝子量が定量可能なリアルタイム PCR (Quantitative PCR, qPCR) の 2 つが実施されている。この 2 つの遺伝子検査のうち、Nested PCR は高感度、低コストで実施可能だが、2 回のコンベンショナル PCR と電気泳動により、検査に時間や手間がかかるというデメリットがある。また、2 回のコンベンショナル PCR により増幅された多量の DNA は PCR チューブの蓋をあける事で周囲に拡散し、検査室を汚染する危険性がある。DNA に汚染された検査室や電気泳動槽が原因となり、電気泳動時に目的の増幅産物以外のバンドが検出されるなど、他の検査へのコンタミネーションが危惧される。

そこで、人のヘルペスウイルス感染症等の検査で利用されている Nested PCR-リアルタ

イム PCR 法¹⁾を参考にし、検査の効率化と DNA 汚染低減のため、Nested PCR の 2nd コンベンショナル PCR をインターカレーター法によるリアルタイム PCR で代替する方法 (Nested rPCR) について検討した (図 1)。

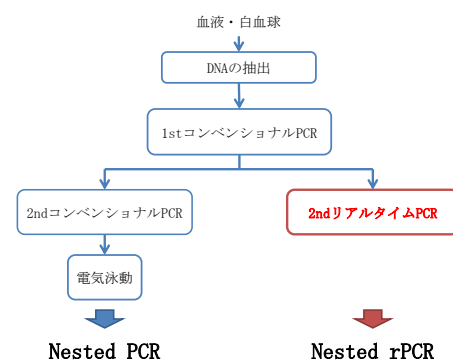


図 1 Nested PCRとNested rPCRの検査法の比較

さらに、Nested rPCR の他の疾病診断への応用として、当家畜保健衛生所において検査頻度の高い、牛アデノウイルス (BAV)、牛 RS

ウイルス(BRSV)、牛パラインフルエンザウイルス3型(BPIV3)、genotype2(北米型)の豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(PRRSV)の4種について、Nested PCR と Neseed rPCR を比較検討した。

材料及び方法

材料: 2012年9月から2016年11月までに採材した、ELISA検査で抗体陽性となった48頭、陰性となった12頭の牛の血液又はバフィーコートから抽出したDNAを検体とした。遺伝子の抽出は、市販の抽出キット(DNeasy Blood & Tissue Kit、(株)キアゲン、東京)を用いた。

Nested rPCR の検討: env 遺伝子を標的とした Fencher ら²⁾による Nested PCR のうち、2nd コンベンショナル PCR をインターカレーター法によるリアルタイム PCR キット (TB Green Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) タカラバイオ(株)、東京)を用いた方法で実施した。本方法では、Nested PCR と同配列のプライマーを使用し、1stPCR産物をテンプレートとした。また、目的増幅産物とプライマーダイマーのような短い増幅産物を区別するため、融解曲線分析を実施して Tm 値を測定した。その後、2nd リアルタイム PCR 産物の電気泳動を実施した。

さらに、プライマーダイマーや 1st PCR プライマーの影響を確認するため、次の2つの方法により検討した。まず、Nested rPCR 陽性となった15検体について、2nd リアルタイム PCR のキットを、プライマーダイマーを低減するキット (TB GreenTM Premix DimerEraserTM (Perfect Real Time)、タカラバイオ(株)、東京)に変更して検査成績を比較した。次に、Nested rPCR 陽性となった1検体について、PCR 産物精製キット (QIAquick PCR Purification Kit(株)キアゲン、東京)を用

いて精製した後、サンプル希釈液 (EASY Dilution (for Real Time PCR) タカラバイオ(株)、東京)で10倍階段希釈したものをテンプレートとした2ndリアルタイムPCRを実施した。

BLV 遺伝子検出 PCR の比較試験: tax 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR キット (Cycleave PCR Reaction Mix SP 及びウシ白血病ウイルス検出用 Probe/Primer/Positive control、タカラバイオ(株)、東京)を用いた qPCR、市販の PCR キット (SapphireAmp[®] Fast PCR Master Mix、タカラバイオ(株)、東京)を用いた NestedPCR 及び Nested rPCR の3つの BLV 遺伝子検査法について比較した。

Nested rPCR の他疾病診断への応用: BAV、BRSV、BPIV3 及 genotype 2 (北米型) の PRRSV の4種のウイルスについて、それぞれ Kirisawa ら³⁾、Kanno ら⁴⁾、Maluquer ら⁵⁾ 及び Valarcher ら⁶⁾の方法より、Nested PCR と Neseed rPCR の検査成績を比較した。各ウイルスの検査で用いた標的遺伝子と使用キットは表1に示すとおりである。

表1 4種のウイルスの標的遺伝子及びPCRキット

ウイルス	標的遺伝子	PCRキット		引用文献著者
		Nested PCR	Nested rPCR	
BAV	Hexon	1st	A	Kirisawa R. et al. ³⁾
		2nd	B	
BRSV	G protein	1st	C	Kanno T. et al. ⁴⁾
		2nd	B	
BPIV 3	P gene	1st	C	Maluquer de Motes C. et al. ⁵⁾
		2nd	B	
北米型 PRRSV	ORF6-7	1st	C	Valarcher JF. et al. ⁶⁾
		2nd	B	

A: SapphireAmp[®] Fast PCR Master Mix, タカラバイオ(株), 東京
 B: TB GreenTM Premix Ex Taq[®] II (Tli RNaseH Plus), タカラバイオ(株), 東京
 C: QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, (株)キアゲン, 東京

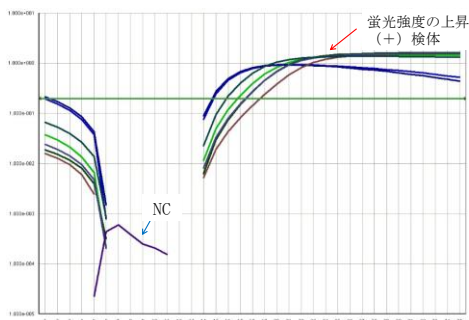
BAV は袋井株 (7型) から抽出した DNA、BPIV3 はワクチン株から抽出した RNA、BRSV は当所で実施した遺伝子検査で検出した野外材料の RNA、北米型の PRRSV は標準株である EDRD1 株から抽出した RNA を材料とした。

Nested rPCR では、各ウイルスについて融解曲線分析を実施して Tm 値を測定し、2nd リ

アルタイム PCR 産物の電気泳動を実施した。さらに、1stPCR 産物をサンプル希釈液で 10 倍階段希釈したものをテンプレートとして 2nd PCR を実施し、Nested PCR と Nested rPCR の検出限界を比較した。

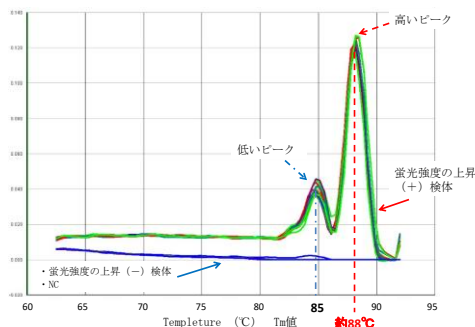
結 果

Nested rPCR の検討：ELISA 検査陽性検体について Nested rPCR を実施したところ、蛍光強度の上昇が確認され、ネガティブコントロール (H₂O) では上昇は確認されなかった (図 2)。融解曲線分析では二峰性のピークが確認され、ELISA 陽性検体において T_m 値 88.0°C 前後の高いピークの増幅と、85°C 付近の低いピークの増幅が確認された。ELISA 陰性検体及びネガティブコントロールでは T_m 値は 65.4°C ~ 67.0°C となった (図 3)。また、2nd リアルタイム PCR 産物の電気泳動を実施したところ、Nested PCR と同等サイズ (約 440bp) のシングルバンドが確認された (図 4)。



※ NC : ネガティブコントロール

図 2 Nested rPCRの増幅曲線



※ NC : ネガティブコントロール

図 3 Nested rPCRの融解曲線分析

さらに、2nd リアルタイム PCR のキットをプライマーダイマーを低減するキットに変更したところ、15 検体中 13 検体で蛍光強度の上昇が確認されなかった。融解曲線分析においてもキット変更前と同様に T_m 値 88.0°C 前後のピークと 85°C 付近の小さなピークが確認された。また、1stPCR 産物を精製後、10 倍階段希釈をして 2nd リアルタイム PCR を実施したところ、すべての希釈段階の融解曲線分析において T_m 値 88.0°C 前後のピークと 85°C 付近の小さなピークが確認された。

BLV 遺伝子検出 PCR の比較試験：ELISA 検査陰性 12 検体については、qPCR、Nested PCR 及び Nested rPCR のすべての方法において BLV 遺伝子は検出されなかった。

ELISA 検査陽性検体では、従来法の Nested PCR と代替法の Nested rPCR の結果は一致し、ELISA 検査陽性 48 検体中 41 検体で BLV 遺伝子が検出された。一方 qPCR では、ELISA 検査

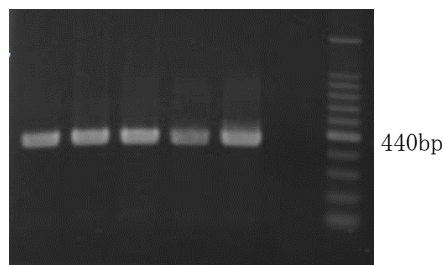
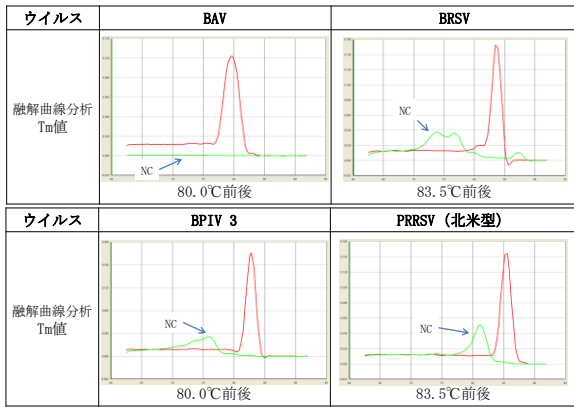


図 4 2ndリアルタイムPCR産物の電気泳動

表 2 BLV遺伝子検出PCR比較試験の成績

区分	Nested PCR/Nested rPCR		計
	+	-	
qPCR	+	0	35
	-	7	13
計	41	7	48

※ ELISA検査で抗体陽性48検体の結果



※ NC: ネガティブコントロール

図5 4種のウイルスの融解曲線分析

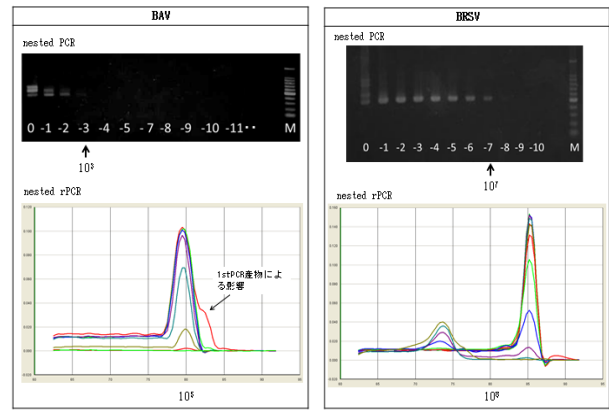


図6 Nested PCR と Nested rPCR の検出限界の比較 (BAV・BRSV)

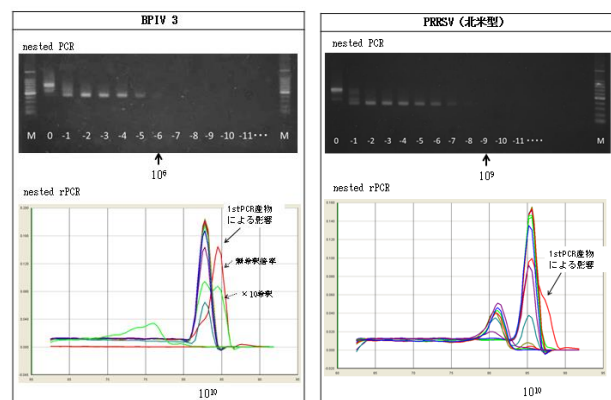


図7 Nested PCR と Nested rPCR の検出限界の比較 (BPIV3・PRRSV)

陽性 48 検体中 35 検体で蛍光強度の上昇が確認されたが、残る 13 検体では確認されなかった。qPCR で蛍光強度の上昇が認められなかった 13 検体のうち、6 検体は Nested PCR 及び Nested rPCR の両方で BLV 遺伝子が検出された (表 2)。

Nested rPCR の他疾病診断への応用: BAV、BRSV、BPIV3 及び北米型の PRRSV の 4 種のウイルスすべてにおいて、蛍光強度が上昇した。融解曲線分析においても 4 種のウイルスすべてに、単峰性のピークが確認された。BAV 以外のウイルスについては、ネガティブコントロールで目的増幅産物のピークよりも低域温度の低いピークが確認された (図 5)。

さらに、Nested PCR 及び Nested rPCR の検出感度を比較したところ、4 種のウイルスすべてについて、Nested PCR より Nested rPCR の方が高い希釈倍率で各ウイルス遺伝子を検出することができた。一方、融解曲線分析において、BPIV3 では無希釈倍率で 1stPCR 産物のピーク、10 倍希釈倍率で二峰性のピークが検出された。BAV 及び北米型の PRRSV では、無希釈倍率で肩がでるようなピークが検出された。これらのピークは希釈倍率を上げていくと消失した (図 6 図 7)。

考 察

BLV 遺伝子を検出する Nested rPCR では、融解曲線分析で高いピークと低いピークの二峰性ピークが確認されたが、2nd リアルタイム PCR 産物の電気泳動で Nested PCR と同サイズの単一バンドが確認されたことから、検査として問題なく利用できると思われた。また、2つの方法による検討結果から、低いピークはプライマーダイマーや 1stPCR プライマーの影響である可能性は低く、増幅断片の GC 含量の偏りによって融解曲線分析の際に一気に解離しなかったためと推察した。なお、2nd リアルタイム PCR のキットを、プライマーダイマーを低減するキットに変更すると、検出感度が低下するため本検査で使用するには不適なキットと判断した。

表3 BLV遺伝子検査の比較

項目	qPCR	Nested PCR	Nested rPCR
BLV遺伝子 検出感度	qPCR <	Nested PCR ≧	Nested rPCR
定量・定性	定量	定性	定性
1 検体あたり 検査費用 (DNA抽出費用を除く)	約1200円	約300円	約300円
検査時間 (DNA抽出時間を除く)	約1.5時間	3~4時間	約2.5時間
DNA汚染度	低	高	中
検査の難易度	易	中	中

Nested rPCR の BLV 遺伝子検出感度は、qPCR で検出できない検体も検出可能であることから qPCR よりも高く、Nested PCR と同程度であることがわかった。また、Nested rPCR は Nested PCR と同程度の検査費用で実施でき、電気泳動が不要であるため検査時間が約 1 時間短縮された。また、PCR プレーートの蓋をあけずに判定できるため DNA 汚染の低減も期待でき、高感度な Nested PCR と同様に EBL の検査法として有用と考えられる (表 3)。

Nested rPCR の応用として、BAV、BRSV、BPIV3、北米型の PRRSV の 4 種について検討したところ、全ての検体で蛍光強度が上昇し、融解曲線分析において単峰性のピークが確認された。なお、ネガティブコントロールにおいて目的増幅産物のピークよりも低域温度で低いピークが確認されたが、これはプライマーダイマーによるものと考えられる。

さらに、Nested PCR と Nested rPCR の検出限界について比較検討した結果、4 種のウイルスすべてにおいて、従来法の Nested PCR よりも Nested rPCR は高感度であった。このことから、本方法は従来法の Nested PCR の代替法として利用可能と思われる。一方、1stPCR 産物の量が多すぎると、融解曲線分析において正しいピークが得られないことがあることから、そのような場合は 1stPCR 産物を 10 倍から 100 倍に希釈する必要がある。

また、BAV、BRSV、BPIV3 の 3 種のウイルス

については、PCR を同一条件、同一プレートで実施することができることから、牛呼吸器病の検査を同時に実施できるというメリットもあり、検査の効率化、迅速化に有用な方法と思われる。

引用文献

- 1) 生田 剛史, 中村 均 : Nested PCR-リアルタイム PCR 法による小児混合唾液中 HSV-1 の検出, 小児菌科学雑誌, 42, 615-622 (2004)
- 2) Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert, Geue L, Albrecht C, Kurg A, Beier D, Marquardt O, Ebner D : Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle, Virology, 237, 261-269 (1997)
- 3) Maluquer de MC, et al. Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecalcontamination. Appl Environ Microbiol 70. 1448-1454 (2004)
- 4) Valarcher J, et al. Evolution of bovine respiratory syncytial virus. J Virol, 74. 10714-10728 (2000)
- 5) Kirisawa R, et al. Detection of bovine parainfluenza virus type 3, bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea mucosal disease virus infections by polymerase chain reactions. J Rakuno Gakuen Univ 19. 225-237 (1994)
- 6) Kono Y, et al. Nested PCR for Detection and Typing of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Virus in Pigs. J Vet Med Sci 58. 941-946 (1996)