

PCR-RFLP 法による牛パピローマウイルス遺伝子型の 簡易鑑別法の開発及び野外における実施例

鵜飼典佳[†] 瀬戸隆弘 土屋貴幸 赤松裕久 齋藤美英

静岡県畜産技術研究所 (〒418-0108 富士宮市猪之頭1945)

(2013年4月11日受付・2013年6月17日受理)

要 約

牛パピローマウイルス (BPV) の遺伝子型の、従来のダイレクトシーケンス法より簡便で安価なPCR-RFLP法による鑑別法を新たに構築し、その有用性について、野外検体を用いて従来法と比較検証した。静岡県東部のある放牧場で飼養されている、牛乳頭腫症のホルスタイン種雌未経産牛26頭から92検体を採取し、従来法及びPCR-RFLP法を用いてBPVの遺伝子型鑑別を実施した。その結果、PCR-RFLP法でBPV6 (56/92)、BPV9 (19/92) 及びBPV10 (7/92) が検出された。従来法で鑑別できた検体の、PCR-RFLP法と従来法の結果は100%一致していた。以上のことから、今回開発したPCR-RFLP法は従来法に替わるBPVの簡易的な遺伝子型鑑別法として有用であることが示唆された。——キーワード：牛パピローマウイルス (BPV)、PCR-RFLP。

----- 日獣会誌 66, 617~620 (2013)

牛乳頭腫症は牛パピローマウイルス (BPV: bovine papillomavirus) が牛の体表皮膚や粘膜に感染し、感染部位に腫瘍性病変 (乳頭腫) を形成する疾病である [1]。

BPVは主要外殻蛋白質をコードする遺伝子であるL1領域の塩基配列に基づく系統樹解析において、現在BPV1からBPV13までの13種類の遺伝子型が報告されている [2-6]。BPVは遺伝子型によって、感染部位の親和性、腫瘍形成の有無及び形成される腫瘍の悪性度等が異なることが知られており [1, 7]、このうちBPV1, 2, 5, 6及び9は乳頭皮膚に形成される乳頭腫の原因ウイルスである [2, 7-9]。特に、BPV6及び9は、北海道及び東北地方の放牧施設において集団発生し、多数の牛が搾乳困難となった事例が報告されている [8, 9]。さらに、BPV9は乳頭全面を被覆する難治性腫瘍の形成に関与していることが知られている [7]。また、BPVは遺伝子型によって感染経路が異なる可能性があることが報告されており [9]、遺伝子型により治療成績も異なるため [9]、BPVの遺伝子型を正確に鑑別することは牛乳頭腫症を防除する上で重要な情報となる。

従来、BPV各遺伝子型の同定にはウイルス遺伝子の

シーケンスによる塩基配列の同定が用いられてきたが、1検体あたりのコストが高価で多検体のスクリーニングには適していなかった。また、シーケンサーを所有していない家畜保健衛生所等の診断現場では実施自体が困難であった。そこで、比較的安価かつ簡便なスクリーニング法として、PCR-制限酵素断片長多型 (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を用いた広範囲のBPV遺伝子型鑑別法を考案した。

静岡県においても、牛乳頭腫症は発生しているが、どの遺伝子型のBPVが流行しているかは明らかにされていない。そこで、静岡県東部のA公共育成放牧場において、今回考案したPCR-RFLP法による、当該牧場に浸潤しているBPV遺伝子型の疫学調査を試験的に行い、従来法による同定成績と比較することで、その有用性の検証を行うこととした。

材料及び方法

供試材料：静岡県東部地域のA公共育成放牧場で放牧飼養されているホルスタイン種未経産牛雌 (17~24カ月齢) 39頭のうち、2012年10~12月にかけて牛乳頭腫症を確認した26頭44乳頭から92検体を用手により

[†] 連絡責任者(現所属)：鵜飼典佳 (静岡県経済産業部農林業局畜産課)

〒420-8601 静岡市葵区追手町9-6

☎054-221-2743 FAX 054-273-1123

E-mail: chikusan@pref.shizuoka.lg.jp

採取した。検体ごとにディスポーザブルのグローブを交換し、採取した検体は使用するまで -80°C で保管した。検体を乳鉢中で10%乳剤となるように10mM Tris-EDTA緩衝液(pH8.0)と混和し、乳棒ですり潰したのち、その乳剤300 μl をDNA抽出に用いた。乳剤作製の際に用いる乳鉢及び乳棒は、オートクレーブで 121°C 、30分高圧蒸気滅菌したものを用いた。DNA抽出には市販のキット(MasterPure™ DNA Purification Kit for Blood Version II, エア・ブラウン株, 東京)を用いて定法通り行った。

PCR反応: Hatamaら [3, 8] が作製したBPV1, 2及び5を標的とするプライマーセット subAup (5'-CCAGAYTAYTMAAAATGGC-3')/subAdw (5'-ATAAMKGCTAGCTTATATTC-3') 並びにBPV3, 4, 6, 9, 10及び11を標的とするsubBup (5'-TWYAATAGGCCCTTTTGGAT-3')/subBdw (5'-TTMCGCCTACGCTTTGGCGC-3')をPCR反応に使用した。反応に使用するマイクロチップは、オートクレーブで 121°C 、30分の高圧蒸気滅菌を行い、PCRチューブはDNase/RNaseフリーの製品を使用した。抽出したDNA 1 μl に10 \times Ex taq buffer 5 μl , dNTP mixture 4 μl , Takara Ex Taq HS 1.25 U (タカラバイオ株, 滋賀), 各プライマー0.5 μM (最終濃度)及び滅菌蒸留水を加え、50 μl 容量とした。PCR反応は 94°C 1分間の後、 94°C 45秒間、 55°C 30秒間、 72°C 1分間を35サイクル行い、最後に 72°C 1分間反応を行った。

ダイレクトシーケンス法によるBPVの鑑別: 前述の方法で得られたPCR産物は市販のキット(FastGene Gel/PCR Extraction Kit, 日本ジェネティクス株, 東京)を用いて目的のバンドを抽出及び精製し、ダイレクトシーケンス法に供した。シーケンスプライマーは上述のプライマーセットを用いた。塩基配列を決定した検体を対象にして、GenBankデータベースでBlast検索を行い、対応するBPVと比較解析を行った。

PCR-RFLP法: 上述のプライマーセットが標的とするPCR増幅領域について、GenBankデータベースに登録されている各BPVの遺伝子配列(表)を基に、BPV1からBPV11までの制限酵素切断部位を検索した。見出された各BPVに特異的な制限酵素切断部位の候補の中から、制限酵素としての切断能が高くかつ切断後の各断片がエチジウムブロマイド染色後に明瞭に識別できる切断部位を持つ酵素としてAfa Iを選択し、PCR-RFLP法に用いた。BPV1からBPV11までのPCR産物のAfa Iによって切断されると予測される遺伝子断片のサイズを表に示す。上述のPCR反応により得られたPCR産物6 μl に10 \times T buffer (タカラバイオ株, 滋賀) 2 μl , 0.1% BSA 2 μl , Afa I制限酵素(タカラバイオ株, 滋賀) 10U及び滅菌蒸留水を加え、20 μl 容量とし、 37°C

表 制限酵素Afa Iにより推定される切断パターン

プライマーセット	標的BPV	GenBank ID	増幅部位(5'-3')	断片長(bp)
subAup/dw	BPV1	X02346	6,289-6,725	110,327
	BPV2	M20219	6,282-6,718	437
	BPV5	AF457465	6,243-6,676	61,149,224
subBup/dw	BPV3	AF486184	6,266-6,867	9,90,181,322
	BPV4	X05817	6,517-7,109	29,90,474
	BPV6	AJ620208	6,541-7,130	157,186,247
	BPV9	AB331650	6,558-7,147	90,247,253
	BPV10	AB331651	6,406-6,995	590
	BPV11	AB543507	6,501-7,093	90,503

で1時間反応させた。反応液20 μl を3%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドを用いてトランスイルミネーター上で可視化し、増幅産物の切断パターンから判定を行った。PCR-RFLP法により得られたBPVのタイピング結果をダイレクトシーケンス法の結果と比較し、一致率を算出した。

成 績

ダイレクトシーケンス法によるA放牧場におけるBPVの分布: 採取した92検体のうち、乳頭を被覆する難治性乳頭腫の病態を示したものは1検体で、残り91検体は発症初期の小型腫瘤を採取し、治療を施したため、病態の区別はつかなかった。PCR法で期待した増幅産物が得られたのは84検体であった。この84検体に対しBlast検索を実施したところ、BPV6, 9または10のいずれかの遺伝子型とほぼ100%一致した。このうち、BPV6は56検体(66.7%)、BPV9は19検体(22.6%)及びBPV10は7検体(8.3%)であった。難治性の病態を示した1例からはBPV9が検出された。また、2検体(2.4%)については二重の波形が観察され、BPVの同定には至らなかった。

PCR-RFLP法と従来法の比較: ダイレクトシーケンス法で用いた84検体に対してPCR-RFLP法を実施した。その結果、BPV6が58検体(69.1%)、BPV9が19検体(22.6%)及びBPV10が7検体(8.3%)であった(図)。

ダイレクトシーケンス法により鑑別された検体の、PCR-RFLP法で鑑別されたBPV遺伝子型との一致率は今回検出されたすべての遺伝子型で100%であった。また、ダイレクトシーケンス法でBPVの同定に至らなかった2検体については、PCR-RFLP法ではBPV6と判定された。

考 察

今回考案したPCR-RFLP法のBPV遺伝子型鑑別結果と、従来のダイレクトシーケンス法の結果を比較した

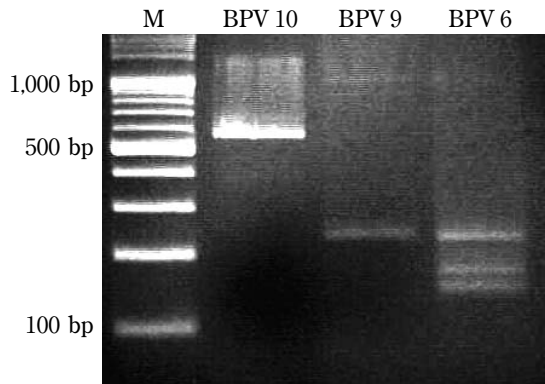


図 Afa I による PCR-RFLP 法の 1 例
 BPV10 : 590bp
 BPV9 : 247bp 及び 253bp
 BPV6 : 157bp, 186bp 及び 247bp
 M : DNA Marker

ところ、ダイレクトシーケンス法で BPV 遺伝子型を鑑別できた検体については、ダイレクトシーケンス法の鑑別結果と PCR-RFLP 法のそれが 100% 一致していた。このことから、今回構築した PCR-RFLP 法はダイレクトシーケンス法の代替法として十分な精度を持つことが示唆された。しかし、ダイレクトシーケンス法で判定できなかった 2 検体は PCR-RFLP 法で BPV6 と鑑別されるという結果となった。これら 2 検体の波形データは 2 種類の波形が確認できるものであった。Hatama ら [3] は 2 種類または 3 種類の BPV が混合感染した腫瘍性病変を報告している。以上のことから、ダイレクトシーケンス法で鑑別できなかった 2 検体には BPV6 を含む複数の BPV が感染しており、BPV6 遺伝子が量的に他の BPV より多いため、PCR-RFLP 法では単独のバンドパターンとして検出されている可能性が示唆された。複数の BPV の感染を疑うケースでは PCR 産物をクローニングすることで感染ウイルスを特定することができるが、カルタヘナ法に定められている遺伝子組み換え実験の申請を行う必要があるため、家畜保健衛生所等で実施することが難しいという問題がある。今後は混合感染を疑う腫瘍性病変の PCR-RFLP 法のパターンについて、さらなる検証が必要であると考えられた。

今回開発した PCR-RFLP 法は理論上 BPV1, 2, 3, 5, 6, 9 及び 10 を鑑別可能であるが、BPV4 及び 11 については制限酵素切断後のバンドパターンが重複することが予測されている。このような検体については、各 BPV を異なるパターンで切断する制限酵素を新たに選択し、再度 PCR-RFLP 法を行うことで鑑別は可能になると考えられる。しかし、今回の野外調査で検出された BPV は BPV6, 9 及び 10 のみであり、他の遺伝子型に対する有用性を確認できておらず、今後さらにデータを蓄積するとともに、検証していく必要がある。さらに、

近年新たに BPV13 が同定されたことから [6]、まだ未発見の BPV が多く存在すると思われる。加えて、パピローマウイルスゲノムの変異率は $0.73 \sim 1.20 \times 10^{-8}$ bp/年 [10] と非常に安定しているものの、株間の差異によって、想定外のバンドパターンを検出する可能性も否定できない。以上のことから、制限酵素の切断パターンが想定外のものであった検体及び PCR 産物が切断されなかった検体に対して、選択的に塩基配列の解読を行い、得たデータを蓄積及び検証することで本 PCR-RFLP 法の改善に努める必要がある。

今回の調査に用いた各検査法のコストを試算したところ、ダイレクトシーケンス法は 1 検体あたり 200 円（外注の場合さらに高価）程度であったのに対し、PCR-RFLP 法は 70 円程度と安価であった。PCR-RFLP 法はサーマルサイクラーを有する家畜保健衛生所等で利用可能であり、シーケンサーを必要としないため、広域の疫学調査を実施する際に、従来法より優れていると考えられる。

A 公共育成放牧場で流行する牛乳頭腫症の BPV の分布を調査したところ、BPV6, 9 及び 10 が検出された。BPV9 はこれまで北海道及び東北地方で発生が報告されていたが [5, 9]、今回、静岡県においても新たに存在が確認された。関東以南で BPV9 が検出された報告は本県が初めてであり、北海道及び東北以外の地域においても BPV9 が浸潤している可能性が示唆された。

以上のことから、今回構築した PCR-RFLP 法は、広域にわたる BPV の疫学調査を行う上で、従来法と同等の精度で、より安価に遺伝子型鑑別を実施できる可能性が示唆された。ただし、今回の野外調査で検出されなかった遺伝子型に対する有用性の確認や、複合感染に対する知見等、解決すべき課題は多い。今後はこれらの問題を解決し、本 PCR-RFLP 法の適応範囲及び精度の向上を行っていく予定である。

引用文献

- [1] Campo MS : Animal models of papillomavirus pathogenesis, *Virus Res*, 89, 249-261 (2002)
- [2] Giuseppe B, Franco R : Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle, *Vet Res*, 39, 1-19 (2008)
- [3] Hatama S, Ishihara R, Ueda Y, Kanno T, Uchida I : Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers, *Arch Virol*, 156, 1281-1285 (2011)
- [4] Zhu W, Dong J, Shimizu E, Hatama S, Kadota K, Goto Y, Haga T : Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma, *Arch Virol*, 157, 85-91 (2012)
- [5] Hatama S, Nobumoto K, Kanno T : Genomic and phy-

- logenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10, *J Gen Virol*, 89, 158-163 (2008)
- [6] Lunardi M, Alfieri AA, Otonel RA, de Alcântara BK, Rodrigues WB, de Miranda AB, Alfieri AF : Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus, *Vet Microbiol*, 162, 207-213 (2013)
- [7] Hatama S, Nishida T, Kadota K, Uchida I, Kanno T : Bovine papillomavirus type 9 induces epithelial papillomas on the teat skin of heifers, *Vet Microbiol*, 136, 347-351 (2009)
- [8] Maeda Y, Shibahara T, Wada Y, Kadota K, Kanno T, Uchida I, Hatama S : An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs, *Vet Microbiol*, 121, 242-248 (2007)
- [9] 長内利佳, 日野正浩, 高野泰司, 小寺 文, 建入茂樹, 横山亮一, 佐々木和夫 : 放牧牛に集団発生した新型パピローマウイルスによる牛乳頭腫症と偽牛痘の混合感染例, *獣畜新報*, 61, 841-844 (2008)
- [10] Tachezy R, Duson G, Rector A, Jenson AB, Sundberg JP, Van Ranst M : Cloning and genomic characterization of *Felis domesticus* papillomavirus type 1, *Virology*, 301, 313-321 (2002)

Development of BPV-Genotyping by PCR-RFLP and a Practical Example of that Method

Noriyoshi UKAI[†], Takahiro SETO, Takayuki TSUCHIYA, Hirohisa AKAMATSU and Yoshihide SAITO

* *Shizuoka Prefectural Research Institute of Animal Industry, 1945 Inokashira, Fujinomiya, 418-0108, Japan*

SUMMARY

A practical polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) to identify bovine papillomavirus (BPV) genotypes was developed and was compared to the conventional method (CM). Bovine papillomas were collected from dairy heifers in a grazing facility in Shizuoka. The CM detected BPV9 (19/92), BPV6 (56/92) and BPV10 (7/92) and all positive samples could be identified by PCR-RFLP. These results suggested that PCR-RFLP is a useful method for identifying BPV genotypes.

—Key words : bovine papillomavirus (BPV), PCR-RFLP.

[†] *Correspondence to (Present address) : Noriyoshi UKAI (Shizuoka Prefecture Economy and Industry Department Stock Farming Division)*

9-6 Otemachi, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8601, Japan

TEL 054-221-2743 FAX 054-273-1123 E-mail : chikusan@pref.shizuoka.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 617 ~ 620 (2013)