

PRDV (Penaeid rod-shaped DNA virus) のPCR検査におけるDNA抽出法の改良

筑紫 康博
(研究部)

Improvement on DNA Extraction in PRDV Diagnosis by PCR

Yasuhiro CHIKUSHI
(Division of Research)

全国の種苗生産機関及び研究機関では、クルマエビ類の急性ウイルス血症 (PAV) の診断のためにPCRによる検査¹⁾が行われている。その際、DNAの抽出には、主にISOGEN (日本ジーン社製) を用いた方法 (以下「ISOGEN法」と記す。) を標準としており、その他にQIAamp Blood Kit (QIAGEN社) が実際の検査に用いられている²⁾。これらの抽出には高価な試薬や器具を使用する必要があり、経済的に大きな負担となっている。このため、これらに代わるようなDNA抽出ができる方法を開発するための検討を行い、一定の成果を得た。

また、ISOGEN法と新たに考案した抽出方法をクルマエビの部位別に比較することによって、最適なサンプル量、種苗生産と中間育成時の稚エビ検査に適した部位、部位ごとの抽出率の違い等DNA抽出時に留意すべき事項、更には新たな抽出方法に適した検査部位が明らかとなったので報告する。

材料及び方法

1 抽出法の検討

(1)ISOGEN法との比較

DNA抽出用のサンプルは、筋注によるPRDV実験感染個体1個体の、頭胸部のみを殻、脚を取り除き、氷温下で乳鉢によって磨砕したもの (以下「病エビ頭胸部肉」と記す。) を用いた。新たに考案した抽出法 (以下「SDS-PCI処理法」と記す。) のプロトコールは図1、ISOGEN法のプロトコールは図2の方法とした。病エビ頭胸部肉20mgからISOGEN法及びSDS-PCI処理法によってDNAを抽出し、滅菌蒸留水100 μ lに溶解し、鋳型DNA液とした。これらの10倍階段希釈した液について蛍光プローブPCR法³⁾でのPCR検査を行い、陽性の判定を行った。

(2)SDS-PCI処理法の改良

SDS-PCI処理法におけるPCR反応を阻害する物質を除去するため、病エビ頭胸部肉50mgから下記の方法によってDNAを抽出し、同様に階段希釈液のPCRを行った。また必要に応じ鋳型DNA液の泳動を行い、抽出物を確認した。

1)RNaseによる処理

SDS-PCI処理法により抽出したDNAを緩衝液500 μ lに溶解し、RNase Aを10 μ l添加した。これを恒温器内でサンプルチューブごと穏やかに攪拌しながら37 $^{\circ}$ Cで1時間20分の処理を行った。その後SDS-PCI処理法のプロトコールと同様のPCI処理を行いDNAを抽出した。

2)粗遠心処理

病エビ頭胸部肉に緩衝液500 μ lを加えホモジナイズ後、12000 $\times g$ または3000 $\times g$ 4 $^{\circ}$ C 10分間の遠心後、上澄を採取し、その上澄からプロトコールに従ってDNAを抽出した。

3)SDS (sodium dodecyl sulfate) 溶液の濃度

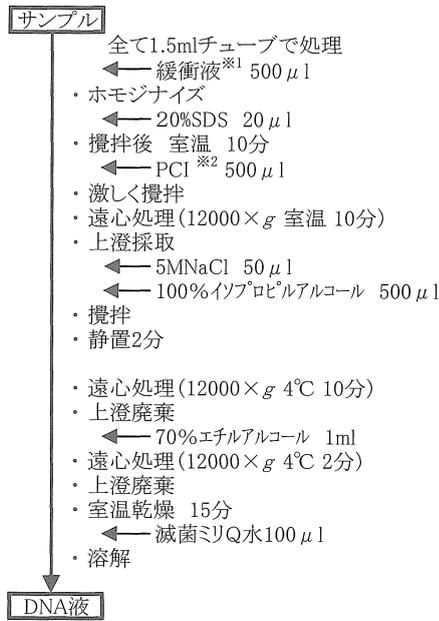
SDS溶液の濃度を0, 0.01, 0.05, 1, 5, 20%として同様にDNAを抽出した。

4)NaIによる処理

NaI溶液 (60w/v) 50 μ lまたは100 μ lをPCI処理後に採取した上澄に添加後、55 $^{\circ}$ Cで15分処理した後に、プロトコールに従ってアルコール沈殿を行い、DNAを抽出した。

5)アルコール沈殿時の溶媒と塩の検討

アルコール沈殿処理をイソプロピルアルコール500 μ lのみ及びエチルアルコール500 μ lのみで塩を添加せずに行った。



※1 150mM NaCl
10mM Tris-HCl(pH8.0)
10mM EDTA

※2 PCI phenol:chloroform:isoamylalcohol
25 : 24 : 1

図1 SDS-PCI法のプロトコール

(3) サンプル量による影響の検討

DNA抽出用のサンプルは、病エビ頭胸肉 5mgに、PRDV無感染の健康個体 1 個体の殻、脚を取り除いた全身を氷温下で乳鉢によって磨砕したもの（以下「健康エビ肉」と記す。）を加える量をそれぞれ 0, 45, 95, 145mgとし、全量を 5, 50, 100, 150mgとした。ISOGEN法, SDS-PCI処理法それぞれの方法でDNAを抽出し、同様に鋳型DNA液の階段希釈液についてPCR検査を行った。

2 サンプル部位別の抽出

DNA抽出用のサンプルは、筋注によるPRDV実験感染個体 1 個体の中腸腺、頭胸部内部のクチクラ、前記 2 部位以外の頭胸部、胸脚、皮下組織等を完全に取り除いた筋肉、血リンパとした。中腸腺、頭胸部内部のクチクラ、前記 2 部位以外の頭胸部、胸脚、筋肉はそれぞれ氷温下で乳鉢にて磨砕したもの 5, 50, 100mgとし、ISOGEN法, SDS-PCI処理法それぞれの抽出法によりDNAを抽出した。血リンパのサンプル量は500 µlとし、同じ実験感染個体から採取したものをそのまま用いた。血リンパのISOGEN法での抽出は、12000 x g 4 °C 10分後の沈殿から行った。SDS-PCI処理法での抽出は、12000 x g 4 °C 10分後の上澄及び沈殿のそれぞれからと遠心処理をし

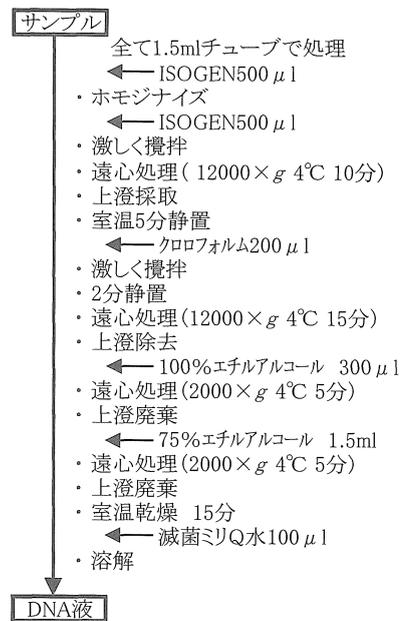


図2 ISOGEN法のプロトコール

表1 各抽出別のPCR検査結果

希釈倍率	ISOGEN	SDS-PCI
10 ⁰	+	-
10 ¹	+	±
10 ²	+	+
10 ³	+	+
10 ⁴	-	+
10 ⁵		+
10 ⁶		+
10 ⁷		±
10 ⁸		-

※ サンプル量: 20mg
±: 陽性, 陰性両方の結果が出たもの

ないものの3種のサンプルについて行った。これらも同様に鋳型DNA液の階段希釈液についてPCR検査を行った。

結 果

1 抽出法の検討

(1) ISOGEN法との比較

各抽出法別の階段希釈DNA液のPCR結果を表 1 に示した。

SDS-PCI処理法は、ISOGEN法よりも10³高い希釈倍率まで陽性であった。SDS-PCI処理法の抽出原液及び10倍希釈液では陰性となった。

表2 SDS-PCI処理法の改良検討結果

希釈倍率	ISOGEN	SDS-PCI		
		無処理	RNase処理	粗遠心処理
10 ⁰	+	-	-	+
10 ¹	+	-	±	+
10 ²	-	+	+	+
10 ³		+	+	+
10 ⁴		+	+	+
10 ⁵		+	+	+
10 ⁶		+	+	+
10 ⁷		-	-	-

※ サンプル量:20mg
±:陽性,陰性両方の結果が出たもの

表3 各抽出法, サンプル量ごとのPCR検査結果

希釈倍率	ISOGEN				SDS-PCI(粗遠心処理)			
	5mg	50mg	100mg	150mg	5mg	50mg	100mg	150mg
10 ⁰	+	+	+	-	+	-	-	-
10 ¹	+	+	+	+	+	-	-	-
10 ²	-	+	+	+	+	+	+	-
10 ³		+	+	+	+	+	+	+
10 ⁴		+	+	+	+	+	+	+
10 ⁵		+	-	-	-	+	-	-
10 ⁶		-				-		

(2)SDS-PCI処理法の改良

検討結果を表2に示し,抽出液の泳動像を図3に示した.

RNaseによる処理, SDS濃度, NaIによる処理, アルコール沈殿時の溶媒と塩の検討のいずれの方法によっても,抽出原液のPCR検査結果が陰性になる現象を防止することはできなかった.しかし,粗遠心処理の結果のみは抽出原液においても陽性となった.また,いずれの処理においても,感度に差異は見られなかった.

泳動像については,ISOGEN法ではバンドは全く見られなかったが,SDS-PCI処理法ではDNAのバンド及びRNAと考えられるスミアが見られた.RNase処理によってスミアはかなり取り除かれた.

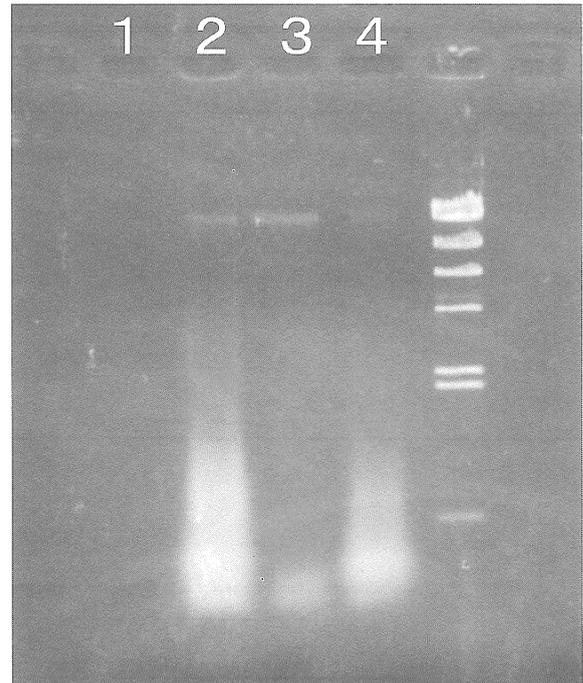
(3)サンプル量による影響の検討

各抽出法, サンプル量ごとの階段希釈DNA液のPCR結果を表3に示した.

病エビ頭胸肉5mgのサンプルはSDS-PCI処理法がISOGEN法よりも10³高い感度となったが,健康エビ肉を増量したものは,両抽出法とも差がなかった.SDS-PCI処理法のサンプル量50mg以上の抽出原液,10倍希釈液とISOGEN法の150mgの抽出原液のPCR検査結果は陰性となった.

2 サンプル部位別の抽出

各抽出法による頭胸部内の各部位別の階段希釈DNA



1 ISOGEN
2 SDS-PCI
3 SDS-PCI 後 RNase 処理
4 3000×g 4℃ 10分遠心後上澄を SDS-PCI

図3 各抽出液の泳動像

液のPCR検査結果を表4に示した.頭胸部内の部位ではSDS-PCI処理法が検出感度が高い傾向が見られ,サンプル量5mgではISOGEN法に感度の極端な低下が見られた.中腸腺,クチクラではISOGEN法でも100mgで抽出原液が陰性となった.

胸脚及び筋肉の結果を表5に示した.胸脚,筋肉では両者に感度の差はなく,筋肉ではSDS-PCI処理法も抽出原液の陰性化はなかった.筋肉もISOGEN法のサンプル量5mgで感度の極端な低下が見られたが,胸脚には見られなかった.両抽出法とも50mgと100mgでは感度の差はほとんど見られなかった.

血リンパの結果を表6に示した.血リンパはSDS-PCI処理法がISOGEN法よりも感度が高く,遠沈処理なしのサンプルは他の部位と比較して最も感度が高かった.また,SDS-PCI処理法でも抽出原液は陽性となった.

表4 各抽出法による頭胸部各部位別のPCR 検査結果

希釈倍率	中腸腺						頭胸部クチクラ						左記以外の頭胸部					
	ISOGEN			SDS-PCI			ISOGEN			SDS-PCI			ISOGEN			SDS-PCI		
	5mg	50mg	100mg	5mg	50mg	100mg	5mg	50mg	100mg	5mg	50mg	100mg	5mg	50mg	100mg	5mg	50mg	100mg
10 ⁰	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
10 ¹	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
10 ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
10 ³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
10 ⁴	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
10 ⁵		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
10 ⁶		-	-	-	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
10 ⁷					-	-		+	+	-	+	+		+	+	-	+	+
10 ⁸								-	+		+	+		-	-		-	-
10 ⁹									-		+	-						
10 ¹⁰											-							

表5 各抽出法による部位別のPCR 検査結果

希釈倍率	胸脚						筋肉					
	ISOGEN			SDS-PCI			ISOGEN			SDS-PCI		
	5mg	50mg	100mg	5mg	50mg	100mg	5mg	50mg	100mg	5mg	50mg	100mg
10 ⁰	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ³	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
10 ⁴	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
10 ⁵	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
10 ⁶	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
10 ⁷	-	+	+	-	+	+		+	+	-	+	+
10 ⁸		-	-		-	-		-	-		-	-
10 ⁹												
10 ¹⁰												

表6 各抽出法による血リンパのPCR 検査結果

希釈倍率	ISOGEN	SDS-PCI		
		遠沈処理なし	遠沈沈殿	遠沈上澄
10 ⁰	+	+	+	+
10 ¹	+	+	+	+
10 ²	+	+	+	+
10 ³	+	+	+	+
10 ⁴	+	+	+	+
10 ⁵	+	+	+	+
10 ⁶	-	+	+	+
10 ⁷	-	+	+	-
10 ⁸		+	-	
10 ⁹		+		
10 ¹⁰		+		
10 ¹¹		-		

表7 ISOGEN法とSDS-PCI処理法の比較

抽出法	検討項目	頭胸部全体	中腸腺	頭胸部のクチクラ	左記2種以外の頭胸部	胸脚	筋肉	血リンパ
ISOGEN法	検出感度	低	低	低	同じ	同じ	同じ	低
	擬陰性の発生 サンプル量少での感度低下	なし 大	多い場合あり 大	多い場合あり 大	なし 大	なし 小	なし 大	なし -
SDS-PCI処理法	検出感度	高	高	高	同じ	同じ	同じ	高
	擬陰性の発生 サンプル量少での感度低下	あり 小	あり 小	あり 小	あり 小	あり 小	なし 小	なし -

考 察

1 抽出法の検討

一般的にDNAの抽出には、ProteaseKやSDSによって組織を溶解した後に、フェノール抽出等で回収した水相をアルコール沈殿を行いDNAを回収するという方法が用いられており、常法に従うと1日以上時間が掛かる。これを実際の検査作業に応用できるよう簡略化した手順がSDS-PCI処理法である。検出感度はISOGEN法よりも優れているが、様々な検討にもかかわらずクルマエビ組織からの抽出原液のPCR結果が陰性となる現象（擬陰性）の解決には至らなかった。

ISOGEN法においてもサンプル量が多い場合や部位によっては同様の現象が見られた。

また、ISOGEN法では病エビ頭胸肉に健康エビ肉を増量した場合には、感度の増加が見られた。これらのことから、クルマエビの組織中にISOGEN法によるDNAの抽出を阻害する物質及びPCR反応を阻害する物質が存在しており、それらの分布量は部位ごとに異なっていることが考えられる。

DNA抽出液の泳動像から、SDS-PCI処理法は、DNAの抽出効率もISOGEN法よりも優れているが、RNA等のその他の水溶性物質の混入も多いことが予想された。

PCR反応を阻害している原因としては、クルマエビのゲノムDNAの混入による反応系中のDNA過剰、水溶性タンパク質、多糖類等によるPCR反応の阻害の単一または複合的な作用が考えられる。ISOGEN法では明らかにクルマエビのゲノムDNAの抽出は十分にされており、また、作業時に除去されるRNA層の中に水溶性タンパク質等の水溶性物質があり、これらの除去ができるためPCR反応の阻害がおきにくいと推察した。

RNAの混入の影響については、RNase処理をしたものとの差は認められなかった。これらのDNA以外のPCR反応阻害物質は、フェノール抽出の繰り返しや

DNA精製用のカラム等で精製することで取り除くことはできるであろうが、そのために感度が低下したり、作業時間が大幅に増加することが予想されるため現実的ではない。よってそれぞれの抽出法に適した検査部位を特定する必要がある。

2 部位別の抽出

部位別抽出法別の比較結果を表7に示した。

各抽出法ともサンプル量50、100mgの間の感度の差は見られず、また、部位によっては100mgでもISOGEN法で抽出原液が陰性となる現象が見られた。また、5mgでは感度の低下が見られたことから、最適なサンプル量は約50mgと考えられた。

種苗生産時、中間育成時の稚エビの検査では従来、頭胸部全体または頭胸部内部が検査部位として用いられてきた。しかし、頭胸部は、ISOGEN法では極端な感度の低下が起こることがあり検査には適していないことが判明した。

胸脚は、PCR反応の阻害もなくサンプル量が少なくとも感度の低下が起らず、安定した検査結果が出る部位である。種苗生産用の親クルマエビを部位別に検査した結果⁴⁾にもその傾向が現れており、この部位を検査することの有効性が改めて確認できた。

血リンパをSDS-PCI処理法で遠心処理をせずに検査した場合の感度は全ての部位の中で最も高かったが、PCI処理後の上澄液の回収が極めて困難であり、実際に行うときには試薬等の量を増やしスケールアップすることが必要となるため、経費がかさむこととなり大量の検体の検査には適さない。また、疾病の進行度合いによって部位ごとの検出感度は異なってくるものと考えられるが、発病段階によるウイルス粒子の分布の変化は明らかにされており、血リンパ1検体のサンプル量を増やすことによって必ずしも感度の高い検査ができるとは言えない。このためにはPRDVの発病の機構等を十分に把握する必要がある。

以上の結果から、血リンパ及び筋肉の検査には、ISOGEN法と比較して、信頼性が高く、経済的（1/8～

1/10) であり、同等の迅速性があるSDS-PCI処理法が有効である。稚エビの検査にはISOGEN法で、頭胸部を避けるか、胸脚を検査に用いることが適当である。

PCRによる検査結果は、検査部位やサンプル量によって大きな影響を受けることが明らかとなった。今回の試験によって得られた留意事項を十分考慮に入れた上でPRDVの検査を行う必要がある。

要 約

- 1 PRDVのPCR検査におけるDNA抽出においては、現在標準として行われているISOGEN法よりも感度が高く、安価に抽出できる新たな方法（SDS-PCI処理法）を検討した。
- 2 ISOGEN法とSDS-PCI処理法をクルマエビの部位別に比較することによって、DNA抽出時の留意事項（サンプル量、種苗生産時と中間育成時の検査部位、部位ごとの抽出率の違い）とSDS-PCI処理法に適した検査部位等の検討を行った。
- 3 血リンパ及び筋肉の検査には、安価で（ISOGENの約1/8～1/10）信頼性が高いSDS-PCI処理法が有効である。

4 種苗生産、中間育成時の検査には、頭胸部を避けるかまたは胸脚をISOGEN法によって行うことが適当である。

5 サンプル量はISOGEN法、SDS-PCI処理法いずれも50mgが適当である。

参考文献

- 1) 木村武志, 山野恵祐, 中野平二, 桃山和夫, 平岡三登里, 井上潔: PCR法によるPRDVの検出. 魚病研究, 31 (2), 93-98 (1996).
- 2) 岡本俊治, 三宅佳亮, 松村貴晴: PAV検査におけるPCR診断に関する手法等の改良に関する研究. 社団法人日本水産資源保護協会 平成9年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 110-115 (1998)
- 3) 筑紫康博, 岩淵光伸, 白石日出人: 蛍光プローブPCR法 (TaqManシステム法) によるPRDVの検出. 福岡水海技セ研報, 9, 39-42 (1999).
- 4) 筑紫康博, 岩淵光伸, 行武 敦: 親クルマエビの効率的なPRDV検査部位. 福岡水海技セ研報, 10, 41-43 (2000).