

## クルマエビ PAV ウイルスのアルカリ熱抽出法による

### DNA 抽出の検討

照屋清之介・\*寺本沙也加

\*沖縄県海洋深層水研究所非常勤職員

#### 1. 目的

クルマエビの急性ウイルス血症 (penaeid acute viremia: PAV) は、ニマウイルス科の Whispovirus 属に分類されるウイルスにより引き起こされる疾病であり、1993 年以降、西日本のクルマエビ養殖生産地を中心に大きな被害を及ぼした (中野、2005)。沖縄県においても過去には大きな被害を及ぼしたが、平成 14 年以降、沖縄県車海老漁業協同組合海洋深層水種苗供給センターから PAV ウイルスフリーの種苗を沖縄県内の養殖場に供給できるようになり、県内における PAV の被害は縮小された。

近年、その海洋深層水種苗供給センターで系統管理している母エビの近交弱勢の影響が示唆されており、遺伝的に異なる新たな親エビの供給が必要とされている。しかし、県外エビを持ち込むことは、同時に PAV ウイルスを持ち込む恐れが生じてしまう。そこで、親エビを入手先の現地で DNA 抽出を行い、PCR 検査を行うことを目標として技術開発を行っている。

PAV 検査において、PCR 法や nested-PCR 法、リアルタイム PCR 法といった遺伝子増幅手法については様々な検討がなされているが (佐藤、2014)、DNA 抽出法についてはフェノール・クロロホルム法やアルカリ熱抽出法、市販のキットを用いた方法など、様々な方法があるが比較検討された例は少ない。国際獣疫事務局 (OIE) の PAV 検査マニュアルでは、CTAB 溶液を用いたフェノール・クロロホルム抽出を掲載するとともに、市販の DNA 抽出キットが使用可能なことが紹介されている (OIE、2017)。木村ほか (1996) では、CTAB 溶液を用いないフェノール・クロロホルム抽出法を用いており、Kono et al. (2004) では PAV ウイルスを単離後に熱抽出法でウイルスの DNA 抽出を行っている。このように、様々な手法で DNA 抽出が行われている。

アルカリ熱抽出法は、水酸化ナトリウムで

加熱溶解を行い、トリス HCl を加える安価で容易な DNA 抽出手法である。大竹ほか (2017) では、牛白血病ウイルスの PCR 検査に用いる DNA 抽出法の比較検証を行っている。5つの手法 (カラム法、磁性粒子法、凝集分配法、アルカリ熱抽出法、BC 熱抽出法) を比較しており、DNA 収量としてはカラム法が良いが、コストと作業時間を要してしまう。対照的に、アルカリ熱抽出法と BC 熱抽出法は、コストと作業時間を下げることはできるものの、どちらも DNA の収量が低く、アルカリ熱抽出法では定性検査 (PCR) で偽陰性が生じてしまい、定量検査 (リアルタイム PCR) にも不向きであることが報告されている。

今回、安価で容易で迅速な手法であるアルカリ熱抽出法による DNA 抽出物が、クルマエビの PAV ウイルス検査に供することが可能であるかの検討を行った。

#### 2. 材料および方法

材料となる PAV 陽性コントロール用クルマエビは、水産海洋技術センターから譲っていただいたサンプルを使用した。抽出法の比較を行うサンプルは、県外エビ導入のため三重県から購入した天然クルマエビ (サンプルナンバー E9~E49) を 40 個体用いた。DNA 抽出部位は遊泳脚を用い、ペッスルを用いて肉片をホモジナイズしてから抽出作業を行った。

DNA 抽出の方法の比較は、①CTAB 溶液を用いたフェノール・クロロホルム抽出と②アルカリ熱抽出法による 2 手法により DNA 抽出を行い、陽性検出数の比較を行った。CTAB 溶液を用いたフェノール・クロロホルム抽出は、OIE (2017) の手法を参考に行った。アルカリ熱抽出法は、西尾ほか (2015) の手法を参考に行った。

PCR 反応は、KOD FX Neo (TOYOBO 社) を用いて行い、試薬、プライマーの量は、添付のマニュアルに従って実験した。PCR に用いるプライマーや反応条件は、OIE (2017)

に記載されている推奨手法を参考に行った。プライマリストを表 1、PCR 反応条件を表 2 に記した。陽性コントロールのサンプルを同時に泳動し、同じ位置に増幅が確認されたサンプルを陽性と判断した。増副産物のバンドが、陽性コントロールと異なる位置に増幅が確認された場合 (目的外のバンド) や不明瞭 (スメア状) となったサンプルに関しては、陽性と判断しなかった。

### 3. 結果

CTAB 溶液を用いたフェノール・クロロホルム抽出および、アルカリ熱抽出法のどちらの DNA 抽出法で行った DNA サンプルからも PCR による陽性が確認された (表 3)。陽性と判断されたサンプル数は、フェノール・クロロホルム抽出法では 20 サンプルであり、アルカリ熱抽出法では 10 サンプルとなった。両方の手法で陽性が検出されたのは 7 サンプル、どちらかの方法で陽性が検出された合計陽性サンプル数は 22 サンプルとなった。アルカリ熱抽出法よりも、フェノール・クロロホルム抽出法の方が陽性検出数が多いことがわかった。

DNA 抽出 (約 20 サンプル) の作業に要した時間は、フェノール・クロロホルム抽出法が 2 時間 30 分程度、アルカリ熱抽出法は 30 分程度であった。

### 4. 考察

クルマエビの PAV 検査において用いられることが可能か確認されていないアルカリ熱抽出法による DNA 抽出を行い、PCR による PAV の陽性が検出可能であることがわかった。しかし、陽性検出数は、フェノール・クロロホルム抽出法の方が 20 サンプルとなり多く検出でき、アルカリ熱抽出法では 10 サンプルしか検出できなかった。合計陽性数 (22 サンプル) に占めるアルカリ熱抽出法 (10 サンプル) の検出率は 45.5% となった。これは、陽性サンプルのうち、約半数は陽性として検出され、残りの半数は陽性として検出できなかったこと (偽陰性) を示す。このため、アルカリ熱抽出法は、安価で容易で迅速ではあるが、PAV の検査を行う上では、実用面で問題があることがわかった。逆に、アルカリ熱抽出法では陽性が検出され、フェノール・クロロホルム法で陽性が検出されなかったサンプルも、3 サンプル (E10、E11、E44) 見つかった。合計陽性数 22 サンプルに占める割合は 13.6% となり、約 1 割を陽性として見逃してしまう

ことになる。フェノール・クロロホルム抽出法のみで、より確実に PAV の陽性を判断することが難しいことが今回示唆された。

アルカリ熱抽出法は、CTAB 溶液を用いたフェノール・クロロホルム抽出に比べて劇物であるフェノールを使わない分安全であり、短時間で作業も単純に行うことができる。そのため、研究所外 (クルマエビ養殖場や県外の親エビ導入を行う現地等) においても DNA 抽出が可能である。ただし、CTAB 溶液は糖類を除く働きをしていることから、CTAB 溶液を用いないアルカリ熱抽出法では DNA の収量が低下したり、純度が低い可能性が挙げられる。実際に、牛白血病ウイルス検査に用いる DNA 抽出法の比較結果から、アルカリ熱抽出法は、他の抽出手法に比べて DNA の収量が低いことが報告されている (大竹ほか、2017)。今回の結果もアルカリ熱抽出法が実用的に PAV 検査に用いることは厳しいことがわかった。コストと作業時間を必要とするものの、安全で純度の高い DNA を得ることができ、研究所外 (親エビ導入の現地) にて DNA 抽出が行えるカラム法を用いた手法の検討が必要である。

### 5. 今後の課題

- 1) フェノール・クロロホルム抽出法を用いても約 1 割の陽性を見逃してしまう可能性があることが示唆されたため、複数の手法を用いた検査体制の構築が必要である。
- 2) カラム法による PAV 検出感度の確認と比較が必要である。
- 3) 現地検査手法として検討していたアルカリ熱抽出法が実用面で問題があることがわかったため、カラム法の陽性検出感度に問題がなければ、カラム法を用いた現地検査手法の開発が必要である。

### 6. 要約

- 1) PAV 検査を行う際の DNA 抽出の 2 手法 (フェノール・クロロホルム抽出法、アルカリ熱抽出法) の陽性検出数の比較を行った。
- 2) アルカリ熱抽出は、安価で容易で迅速ではあるが、陽性検出率は 45.5% と低く、約半数は陽性を見逃してしまうため、PAV の検査を行う上では実用面で問題があることがわかった。

7. 参考文献

- 木村武志・山野恵祐・中野平二・桃山和夫・平岡三登里・井上潔（1996）PCR 法による PRDV の検出．魚病研究，31(2)，93-98.
- Kono T., Savan R., Sakai M., and Itami T. (2004) Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, 115(1), 59-65.
- 中野平二（2005）クルマエビの急性ウイルス血症．日本水産学会誌，71(4)，639-644.
- 西尾智裕・大塚佳代子・小田みどり・杉山寛治・工藤 由起子（2015）魚介類からの腸炎ビブリオ検出における遺伝子検出法の検討．感染症学雑誌，89(4)，445-451.
- OIE (World Organisation for Animal Health) (2017) Infection with white spot syndrome virus, In *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, OIE, Paris.
- 大竹祥紘・米山州二・中村真弓・井上恭一（2017）牛白血病ウイルス遺伝子検査における DNA 抽出法の比較検証．栃木県家畜保健衛生業績発表会集録，59，34-41.
- 佐藤純（2014）第 4 節 PAV 防除対策．In. 奥村卓二・水藤勝喜（編），クルマエビ類の成熟・産卵と採卵技術．愛知県水産業振興基金，111-128.

表 1. 検査に用いたプライマーリスト

方法名	プライマー名	塩基配列	ステップ数	参照論文等
①OIE法	146F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG	1 回目	OIE, 2017
	146R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA	1 回目	OIE, 2017
	146F2	GTAAGTCCCCCTCCATCTCCA	2 回目	OIE, 2017
	146R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT	2 回目	OIE, 2017

表 2. PCR の反応条件。℃は温度を示し、分は反応時間を示す。

方法名	ステップ数	サイクル反応前		熱変性		アニーリング		伸張反応		サイクル反応後		参照論文等
		℃	分	℃	分	℃	分	℃	分	℃	分	
OIE法	1回目	94.0	3:00	94.0	1:00	55.0	1:00	72.0	2:00	72.0	5:00	OIE, 2017
	2回目	94.0	3:00	94.0	1:00	55.0	1:00	72.0	2:00	72.0	5:00	OIE, 2017

表 3. アルカリ熱抽出法とフェノール・クロホルム抽出法による PAV の PCR 検査の結果。E から始まる番号はサンプル名。+は陽性コントロールと同じ位置にバンドが確認された結果を示す。

方法名	ステップ数	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28		
フェノール・クロホルム抽出法	1st PCR																					+	
	2nd PCR	+			+												+					+	+
アルカリ熱抽出法	1st PCR					+																	+
	2nd PCR		+		+	+																	
方法名	ステップ数	E29	E30	E31	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E41	E42	E43	E44	E45	E46	E47	E48		
フェノール・クロホルム抽出法	1st PCR												+										
	2nd PCR	+			+	+		+	+		+	+	+	+	+					+	+	+	
アルカリ熱抽出法	1st PCR				+								+										
	2nd PCR		+		+																+		