

コイヘルペスウイルス (KHV) の PCR 検査における 非特異的増幅と Taq ポリメラーゼの影響

吉岡 武志
(研究部)

KHV の初動診断法である改良 SphI-5法において、養殖魚の健康診断時にやや薄い陽性バンド (以下、擬陽性バンド) がみられることがある。このバンドの多くは確定診断法である KHV 9/5 法では陰性となる。その原因について、擬陽性バンドの塩基配列を解読した結果、この増幅は非特異的なものであること、塩基数184bp で陽性バンドの190bp と差がなく電気泳動では区別が難しいことが明らかとなった。また、非特異的な増幅が起こる原因として、擬陽性バンドの塩基配列と改良 SphI-5F, R プライマーセットが類似配列であったことが考えられた。この塩基配列は Zebrafish の DNA と類似していたことから、魚類特有の DNA が増幅しているものと考えられた。一方、改良 Sph I-5 法において陽性対照であるプラスミドの positive control が増幅せず、KHV 罹患コイの DNA では増幅がみられたケースがあった。その原因について検討した結果、Taq ポリメラーゼ (DNA 合成酵素) の種類によって PCR 反応に差があることが明らかになった。検査時の対処法として、Taq ポリメラーゼをはじめとする PCR 用試薬や機器、器具類について、KHV 検査実績のあるものを選択していく必要があると考えられた。

キーワード：コイヘルペス, KHV, PCR, 非特異的, 擬陽性

コイヘルペスウイルス (KHV) 病は、コイ *Cyprinus carpio* のみに発生する疾病として、1998年にイスラエルと米国で初めて確認された¹⁾。日本では2003年に初認され²⁾、その後急速に全国へ拡大した。福岡県では、まん延防止策として、養殖コイの KHV 健康診断を行っている。KHV 健康診断では、KHV SphI-5 法³⁾ を改変した改良 SphI-5 法⁴⁾ (以下、改良 Sph 法) による PCR 検査を実施している。改良 Sph 法は、へい死が発生した際の KHV の初動診断や養殖コイの健康診断として各都道府県等で広く用いられている。この KHV 健康診断において、まれにやや薄い陽性バンドがみられることがある。このバンドは、目視で異常がなく活発に泳いでいるコイでまれにみられるが、死亡魚ではみられない。また、その多くは確定診断の PCR 法として採用されている KHV9/5 法⁵⁾ (以下、9/5 法) で陰性となる。このようなバンドは非特異的な増幅であると考えられる。しかし、増幅サイズが陽性バンドの位置にみられることから、初動診断で陽性とされる可能性もある。特に養殖コイの健康診断の場合については風評被害等の心配もあることから、初動診断においても慎重に診断する必要がある。検査精度向上のため、この擬陽性バンドの塩基配列を解読し、KHV によるものか、あるいは非特異的な増幅によるものか調べ、その増幅原因や増幅した DNA の由来

について検討した。

一方、改良 Sph 法による検査で、陽性対照であるプラスミドの positive control が増幅せず、KHV 罹患コイの DNA では増幅がみられたケースがあった。PCR 検査で陽性サンプルの増幅がみられないことは、誤診断につながりかねない重要な問題である。PCR の結果には、試薬や機器・器具類が影響を及ぼすこともある⁶⁾ ことから、このようなトラブルについてはその都度原因を解明し、対処していくことが PCR 検査精度向上に不可欠である。そこで、positive control が増幅されなかった原因について試薬類のチェックを行った結果、Taq ポリメラーゼの種類によって Sph 法による PCR 反応に差があることが明らかになったため、報告する。

方 法

1. 擬陽性バンドの解明

擬陽性バンドの塩基配列を確認するため、図1に示した290bp 付近の擬陽性ゲル部分を切り取り、DNA を取り出した。さらに CENTRI-SEP (Applied Biosystems 社製) によって DNA を精製した。その後、ジェネティックアナライザー 310 (パーキンエルマー) により塩基配列を調べた。また、非特異的な増幅を起こす原因として、

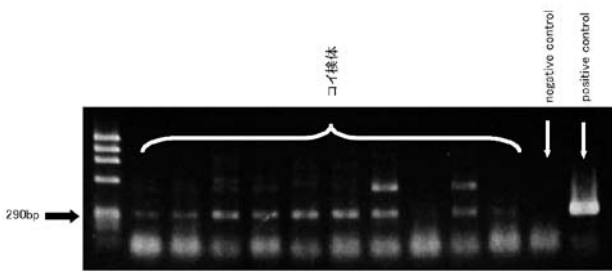


図1 改良 Sph 法による擬陽性バンド (290bp 付近) の電気泳動結果

Sph 法の F, R プライマーセットとの塩基配列の類似が考えられたため、両者の塩基配列について比較した。さらに、増幅された塩基配列が KHV によるものか、あるいはそれ以外によるものかを調べるため、得られた塩基配列結果を DDBJ/EMBL/GenBank 国際塩基配列データベース (以下、DNA データベース) により検索した。検索法は、未知の塩基配列と既知の塩基配列データベースとを比較検索する BLASTN プログラムで行った。

なお、使用した擬陽性バンドは、養殖コイの KHV 健康診断において、改良 Sph 法で擬陽性、9/5 法で陰性となった検体を用いた。検体は、サンプリングまで池で活発に泳いでおり、目視で異常がみられないコイであった。サンプリング後は検体を凍結することなく、DNA 抽出作業までの3時間程度、冷蔵保存した。DNA の抽出には、粘液を取り除いた鰓10mg を用いた。その後、DNeasy TissueKit (QIAGEN) により鰓の DNA を抽出した。抽出法は同キットのプロトコールに従った。

改良 Sph 法の PCR や電気泳動の手技については、特定疾病診断マニュアル⁷⁾ に従い、次のように行った。

- (1) PCR テンプレートとして、擬陽性バンドの DNA 抽出液を用いた。Taq ポリメラーゼには、Takara baio 社製 EX Taq HS を使用した。PCR は、94℃ で30秒間、63℃ で30秒間、72℃ で30秒間を40サイクル、最後に72℃ で7分間行った。
- (2) PCR 終了後、増幅産物を2%のアガロースゲルで電気泳動した。
- (3) 臭化エチジウムで20分間染色後、トランスイルミネーターにより分子量290bp のバンドの有無を観察した。

なお、改良 Sph 法プライマーの塩基配列および増幅産物サイズは次のとおりである。

改良 SphI-5F : 5'-GACACCACATCTGCAAGGAG-3'
 改良 SphI-5R : 5'-GACACATGTTACAATGGTTCGC-3'
 増幅産物サイズ : 290bp

```

1  GACACCACATCTGCAAGGAGGGCTACTACAGAGACATGTCTAAGCCATCTCTCACAGA 60
61  AAGGCTGCAAAGGTATGAAGGGTACTGAATCTAAACACCATGGGCAAAAGAGCGACTG 120
121 GGTTTGGTTTTAAGGGCCACAGTCTGCAACTTATCACTTGACACTTCTTAGGAAAGCA 180
181 GAAAACGCCACGGCTAAGTGATTAGCTGGCTTTTCTACACAGAATTCACAGTACCAC 240
241 AAAGGAACCAATTAGATAAACCGGCGACCATTGTAACATGTGTG 284
    
```

図2 擬陽性バンドの塩基配列

改良 SphI-5F GACACC-ACATCTGCAAGGAG
 擬陽性バンド C.....
 改良 SphI-5R GACACATGTTACAATGGTTCGC
 擬陽性バンド

図3 改良 Sph I-5F, R プライマーセットと擬陽性バンドにおける塩基配列の比較

2. Taq ポリメラーゼの影響

PCR における Taq ポリメラーゼの影響を確認するため、Hot Start Version タイプ 2 種類と Hot Start Version タイプではないもの 1 種類について比較した。Hot Start Version タイプでは Takara baio 社製 EX Taq HS および A 社製 Taq を、また Hot Start Version タイプではないものとして Takara baio 社製 EX Taq を用いた。PCR のテンプレートには、陽性サンプルとして KHV 罹患コイの DNA 抽出液 2 検体 (検体 a, 検体 b) とプラスミドの positive control を、陰性として negative control を設定し、各々の Taq ポリメラーゼで PCR を行った。PCR 終了後は 2% アガロースゲルで電気泳動を行い、臭化エチジウムで20分間染色後、トランスイルミネーターにより陽性バンドの有無を観察した。

なお、PCR については、改良 Sph 法および 9/5 法で行い、それぞれの結果について比較した。

9/5 法プライマーの塩基配列および増幅産物サイズは次のとおりである。

KHV9/5-F : 5'-GACGACGCCGAGACCTTGTG-3'
 KHV9/5-R : 5'-CACAAGTTCAGTCTGTTCTCAAC-3'
 増幅産物サイズ : 484bp

結 果

1. 擬陽性バンドの解明

擬陽性バンドの塩基配列結果を図2に示す。塩基数は284bpで、改良 Sph 法の増幅産物サイズである290bpと6塩基の違いであった。

また、擬陽性バンドと改良 SphI-5F, R プライマーセットとの塩基配列比較結果を図3に示す。改良 SphI-5F については、ギャップが1塩基みられた。その他の塩基配列はすべて一致した (一致率95%)。改良 SphI-5R では、

```

12  CTGCAAGGAGGGCTACTACAGAGACATGTCTAAGCCCATCTCTCAGAGAAAGGCTGCAA  71
    .....A.....T.....C.....C.....
72  AGGTATGAAGGGTACTGAATCTAACACCATGGGCAAAAAGAGCG—ACTGGGTTTGGTT  129
    .....A.....A.....G.....GC.....A.....C.....G.....TG.....CA.....C
130  TTAAGGCCACACAGTCTGCAACTTATCACTTGAC  163
    ...T·AC.....A.....

```

図4 擬陽性バンドと Zebrafish の DNA 塩基配列との比較

(上段：擬陽性バンド，下段：Zebrafish DNA)
 (数値：図2で示した擬陽性バンドの塩基配列番号)

21塩基全て一致した(一致率100%)。

DNA データベースによる検索結果を図4に示す。擬陽性バンドの塩基配列は Zebrafish の DNA 塩基配列との間で最も相関性が高かった。スコアは125bits、期待値は 5×10^{-25} であった。また、塩基配列の一致率は85%で、154塩基中132塩基で一致した。ギャップは152塩基中2塩基(1%)であった。一方、SphI-5法³⁾によるKHV塩基配列(Koi herpesvirus clone SphI-5)との比較では、プライマーに当たる部分についてのみ一致した。スコアは42.1bitsで、期待値は5.2であった。

2. Taq ポリメラーゼの影響

Sph法による電気泳動結果を図5に示す。EX Taq HSおよびEX Taqでは、全ての陽性サンプルで290bpの濃い陽性バンドが確認された。一方、A社製については、検体a, bで290bpにやや薄い陽性バンドがみられたものの、プラスミドでは確認されなかった。

また、9/5法による電気泳動結果を図6に示す。9/5法では、Taqポリメラーゼによる影響はみられず、全ての陽性サンプルで484bpに濃い陽性バンドが確認された。

考 察

BLASTN検索の結果、擬陽性バンドと Zebrafish との比較ではスコア125bits、期待値 5×10^{-25} 、Koi herpesvirus clone SphI-5ではスコア42.1bits、期待値1.2であった。スコアについては値が高いほど相関性が高く、期待値は値が低い(0に近づく)ほど相関性が高いことから、擬陽性バンドはKHVによるものではなく、魚特有のDNAが非特異的に増幅しているものと考えられた。非特異的な増幅の原因として、一般的にPCR反応試薬調整中のコンタミネーションやプライマーデザインの問題、アニーリングの温度、DNAポリメラーゼの種類の影響、Mgイオン濃度による影響⁸⁾等が考えられる。また、プライマーとの類似配列によるミスプライミング



図5 改良 Sph 法による Taq ポリメラーゼ別の電気泳動結果

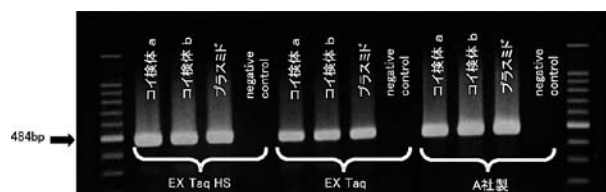


図6 9/5法による Taq ポリメラーゼ別の電気泳動結果

のため、標的配列の増幅とともに非特異的な増幅が起こることがしばしばある⁶⁾。今回の非特異的な増幅原因は、Sph法のプライマーセットと擬陽性バンドの塩基配列が高い類似性を示したことから、プライマーとの類似配列によるミスプライミングによるものと考えられた。

また、この非特異的な増幅バンドは284bpであることから、電気泳動結果では陽性バンドの290bpとの区別が付きにくいことがわかった。

改良 Sph 法は、都道府県が行う初動診断や養殖コイの健康診断に広く利用されている。290bp付近の非特異的増幅は、初動診断での誤診断も十分あり得る。特に養殖魚の場合は誤った風評被害が発生しないよう診断には十分注意しなければならない。また、9/5法では非特異的増幅は一般に少ないといわれており、本県の検査実績においても擬陽性バンドの確認例はない。Sph法により養殖コイの診断で陽性が疑われた場合は、9/5法も併せて行ったうえで初動診断の判定を行うことが望ましいと思われた。

また、改良 Sph 法での非特異的増幅の回避策として、(独)水産総合研究センター養殖研究所において、各都道府県等の検査機関で一般的に使用されているプライマー最終濃度 $1\mu\text{M}$ を $0.2 \sim 0.5\mu\text{M}$ に下げることが推奨している。今後、各都道府県等の検査において、最適なプライマー濃度検証が必要と思われる。

一方、Taqポリメラーゼの影響については、Sph法において、A社製 Taqポリメラーゼでプラスミドの増幅が確認できなかった。また、KHV罹患コイの陽性検体に対しても Takara 社製に比べて増幅バンドが薄かった。原因として、PCRでは酵素の種類によって増幅効率が低かったり、増幅できないことがある⁸⁾ことから、

酵素の特性によるものと考えられた。対策として、特に Sph 法においては、Taq ポリメラーゼをはじめとする PCR 用試薬や機器、器具類について、KHV 検査実績のあるものを選択していく必要があると考えられた。

また、PCR 検査のトラブルや対処法の検討については、コンタミネーションや試薬、機器・器具類のチェックなど大きな労力と時間を要する。今後、検査精度向上のため、各都道府県等でみられた PCR 検査のトラブルや対処法等について、情報の共有化や蓄積が望まれる。

文 献

- 1) Hedrick, R.P. *et al.* : A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp, *J.Aquat.Animal Health*, 12, 44-57 (2000).
- 2) Sano, M. *et al.* : First Detection of Koi Herpesvirus in Cultured Common Carp *Cyprinus carpio* in Japan, *Fish Pathol.*, 39, 165-167 (2004).
- 3) Gray W.L. *et al.* : Detection of Koi Herpesvirus DNA in tissues of infected fish, *J. Fish Dis.*, 25, 171-178 (2002).
- 4) Yuasa, K. *et al.* : Improvement of a PCR Method with the Sph I-5 Primer Set for the Detection of Koi Herpesvirus (KHV), *Fish Pathol.*, 40, 37-39 (2005).
- 5) Gilad, O. *et al.* : Initial Characteristics of Koi Herpesvirus and Development of a Polymerase Chain Reaction Assay to Detect the Virus in Koi, *Cyprinus Carpio* Koi, *Dis. Aquat. Org.*, 48, 101-108 (2002).
- 6) 中山広樹：バイオ実験イラストレイテッド3+, 秀潤社, 23 (1999).
- 7) 特定疾病診断マニュアル, (社) 日本水産資源保護協会, 11-19 (2008).
- 8) 大藤道衛:バイオ実験超基本, 洋土社, 174-175, (2001).