

リアルタイムPCR法によるコイヘルペスウイルスの検出

永 井 崇 裕

Detection of koi herpesvirus by real-time PCR

Takahiro NAGAI

コイヘルペスウイルス病は、コイヘルペスウイルス (Koi herpesvirus : KHV¹⁾, Cyprinid herpesvirus 3: CyHV-3²⁾) を原因とする致死性の高い感染症であり、1998年にイスラエルとアメリカのニシキゴイ *Cyprinus carpio koi*での発生例が世界で最初に報告された¹⁾。その後、疾病の分布域が拡大しヨーロッパやアジア各国に広がったが、これにはニシキゴイの世界的流通が関与していると考えられている³⁾。

日本におけるコイヘルペスウイルス (KHV) 病の発生は、2003年10月末に茨城県の霞ヶ浦の養殖マゴイ *C. carpio carpio*で初めて確認された⁴⁾。しかし、同年の5月末には岡山県の河川でKHV病が発生していたことが、霞ヶ浦で発生が確認されてからの冷凍試料の検査により明らかにされている³⁾。その後、霞ヶ浦産のマゴイの流通が原因と考えられる感染の拡大が多くの都道府県で確認され³⁾、さらにニシキゴイの国内流通も関与して全国に広がった。一方、広島県では、2005年5月に個人が飼育していたニシキゴイにおいて初めて確認され、2005年には9件、2006年には4件、また2007年には5件の発生が確認されており、その範囲は個人所有のニシキゴイから河川の天然マゴイにまで及んでいる (表1)。

KHV病の診断においては、培養細胞を用いたウイルスの分離が困難なことから、PCR法やLAMP法によるウイルス遺伝子の検出が行われている³⁾。KHV病は持続的養殖生産確保法で特定疾病に指定されていることから、特定疾病等対策ガイドライン (農林水産省消費・安全局) が策定され、その中に検査方法が定められている。その一次検査ではGrayら⁵⁾の方法を一部改良したYuasaら⁶⁾によるPCR法、または吉野ら⁷⁾によるLAMP法が用いられている。また、二次検査 (確定診断) はYuasaら⁶⁾によるPCR法とGiladら⁸⁾のPCR法を併

用して行うこととなっている。

最近、定量が可能で、かつ迅速でコンタミネーションが生じにくいリアルタイムPCR法が病原体の検査において用いられるようになってきた*。リアルタイムPCR法には、PCR用のプライマーとは別の部位に結合する蛍光標識プローブを用いるプローブ法と、PCR用のプライマーと二本鎖DNAに結合するSYBR Green Iを用いたインターカレーター法があるが、インターカレーター法はプローブ法と比較して簡便で安価な反応系の構築が可能である。本研究では、KHV病の診断に応用するために、

表1 広島県におけるコイヘルペスウイルス (KHV) 病の発生状況

最初の発見日	発生場所	コイの種類
2005年	5月14日 愛好家 (ため池)	ニシキゴイ
	5月17日 愛好家	ニシキゴイ
	5月19日 愛好家	ニシキゴイ
	5月23日 愛好家 (ため池)	ニシキゴイ
	5月24日 愛好家	ニシキゴイ
	6月10日 生産業者 (ため池)	ニシキゴイ
	6月15日 愛好家 (ため池)	ニシキゴイ
	10月6日 生産業者	ニシキゴイ
	11月4日 芦田川水系	マゴイ
2006年	5月6日 芦田川水系	マゴイ
	6月9日 愛好家	ニシキゴイ
	6月13日 黒瀬川	マゴイ
	7月3日 愛好家 (ため池)	ニシキゴイ
2007年	1月31日 生産業者	ニシキゴイ
	6月22日 愛好家	ニシキゴイ
	7月7日 生産業者	ニシキゴイ
	7月26日 江の川水系	マゴイ、ニシキゴイ
	11月13日 生産業者	ニシキゴイ

* リアルタイムPCR実験のススメ, タカラバイオ (<http://www.takara-bio.co.jp/prt/index.htm>)

インターカレーター法によるリアルタイムPCR法の開発を行った。

材料と方法

供試魚

実験には、広島県内で採取したKHV病で死亡したニシキゴイ（死亡魚：体重2－3kg）を用いた。また、同じ水槽で飼育されていたKHVに感染していると考えられたニシキゴイ（感染魚）も用いた。全ての試料は実験に用いるまで-20℃で保存した。

DNAの抽出

組織からのDNAの抽出にはQuickGene DNA tissue kit S（富士フィルム）を用いた。10mgの組織に対して50μLのTE（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0）を加え、ペッスルで磨砕した。得られた磨砕液20μLに対して180μLの組織溶解液（MDT）および20μLのProteinase K（EDT）を添加し、55℃で10分間処理し組織を溶解させた。さらに180μLの溶解液（LDT）を添加し70℃で10分間処理した。最後に240μLのエタノールを添加後、キット付属のカラムに全量を注入し、QuickGene-800（富士フィルム）を用いてDNA溶液100μLを抽出した。

PCR法

反応は10μLの系で行い、プライマーには*Sph* I-5Fおよび*Sph* I-5R⁶⁾（2 pmol）を用い、耐熱性DNAポリメラーゼにはGoTaq DNA Polymease（Promega）（0.25u）を用いた。1μLの抽出DNAをPCR反応液に添加し、94℃で30秒反応させた後、94℃・30秒、63℃・30秒、72℃・30秒を1サイクルとして40サイクル反応させ、最後に72℃で7分間反応させた（PC880, アステック）。PCR産物は1.5%アガロースゲル-TAE（400mM Tris-酢酸, 1mM EDTA pH 8.0）で電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色した。

リアルタイムPCRに用いる標準試料の作成

Sph I-5Fおよび*Sph* I-5R⁶⁾で増幅したPCR産物を組み込んだプラスミドDNA（Target clone, 東洋紡）を、リアルタイムPCRの標準試料として用いた。PCR産物はMiniElute PCR purification kit（Qiagen）で精製してから、TAクローニング法でプラスミドpTA2に組み込み、*Escherichia coli* DH5 *a*（Competent cells, タカラバイオ）に形質転換させた。*E. coli*からのプラスミドDNAの抽出

はMini-prep法で行い、Nano-drop（スクラム）を用いてDNA濃度の測定を行い、DNA1μgで1000 bp当たり 8.6×10^{10} コピーとしてプラスミドDNAのコピー数を計算した。得られた組み替えプラスミドはpTA-KHV1と呼ぶこととした。

リアルタイムPCR法

リアルタイムPCRにおける反応およびモニタリングはLineGene（BioFlux）で行った。PCR反応は5μLのSYBR Green realtime PCR master mix（東洋紡）および2 pmolの*Sph* I-5F, *Sph* I-5R⁶⁾プライマーから成る10μLの系で行った。1μLの抽出DNAを反応液に添加し、95℃・1分間処理後、94℃・15秒、63℃・15秒、72℃・30秒を45サイクル繰り返した。最後に95℃・2分間で処理してから、80℃から95℃まで0.5℃間隔で温度を上昇させる融解曲線分析を行った。PCR増幅産物がある一定濃度に達したときのサイクル数（Threshold cycle : Ct値）は、装置付属のソフトウェア（Fluorescent quantitative detection system）を用いて2nd Derivative法で算出し、標的DNAの定量を行った。

PCR法とリアルタイムPCR法の感度比較

標準試料であるプラスミドDNA（pTA-KHV1）の1/10希釈列を作成し、PCR法とリアルタイムPCR法における検出感度の比較を行った。

臓器におけるウイルス遺伝子量の比較

鰓の部位間の比較：死亡魚および感染魚4尾ずつを用い、鰓弓から鰓弁の先端に向かい内側、中央および外側の3部位に分け、ウイルス遺伝子の定量を行った。

臓器間の比較：死亡魚5尾から鰓、鰭、腎臓、心臓および脳をそれぞれ採取し、ウイルス遺伝子の定量を行った。試料間のウイルス遺伝子量の差は、分散分析（ANOVA）および多重比較（Bonferroni検定）によって検討し、 $P < 0.05$ を有意な差と見なした。

試料の腐敗によるウイルス遺伝子量の減少

死亡魚および感染魚それぞれ3尾の鰓を解剖用ハサミで細断し、複数の1.5mLチューブに収容してから、20℃でインキュベートした。3, 7, 10, 14および21日後にチューブを取り出し、ウイルス遺伝子の定量を行った。

結 果

リアルタイムPCR法

標準試料として作成したpTA-KHV1の塩基数は、組み込んだPCR産物が290 bp、pTA2が2981 bpであることから3271 bpとなった。従って、pTA-KHV1はDNA 1 μ g 当たり 2.8×10^{11} コピーであると計算された。pTA-KHV1を反応系当たり29から29,000コピー含むようにリアルタイムPCRを行った結果、正確な定量性が得られた(図1)。

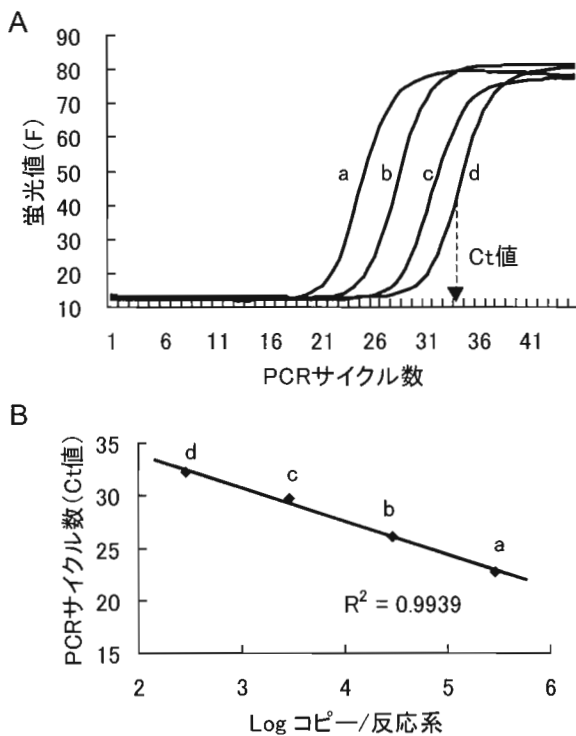


図1 リアルタイムPCR法におけるKHV遺伝子定量性の検討

A: PCRサイクル数と蛍光値の関係, B: DNAコピー数 (pTA-KHV1) とCt値の関係。aはpTA-KHV1 が29,000コピー/反応系で以下1/10希釈列 (b, c, d) とした。

PCR法とリアルタイムPCR法との検出感度の比較

PCR法とリアルタイムPCR法で得られたPCR産物の電気泳動像を図2に示した。反応系当たり2.9コピーでリアルタイムPCR法では明らかな陽性反応が見られたが、PCR法では非常に薄いバンドとなった。

鰓におけるKHV遺伝子の分布量

鰓部分毎におけるウイルス遺伝子量を図3に示した。鰓弁先端から鰓弓に近づくにつれウイルス遺伝子量が減少する傾向が見られた。死亡魚では4尾とも全ての部位



図2 PCR法とリアルタイムPCR法におけるKHV遺伝子検出感度の比較

A: リアルタイムPCR法, B: PCR法, M: DNAマーカー (ϕ X174 *Hae* III digest), 1: 29,000コピー/反応系 (pTA-KHV1), 2: 2,900コピー, 3: 290コピー, 4: 29コピー, 5: 2.9コピー, 6: 0.29コピー, 7: 0.029コピー, 8: 0.0029コピー, 9: 陰性対照。

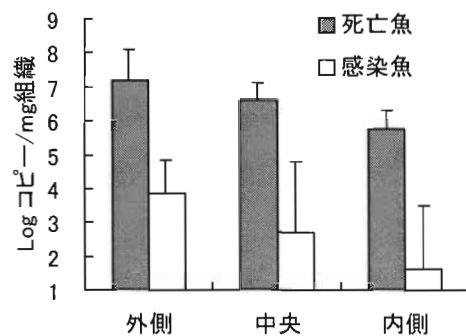


図3 鰓弁におけるKHV遺伝子分布量

鰓弁先端から鰓弓に向かい、外側、中央、内側とした。(平均値 $\pm$ 標準偏差, N = 4)

から検出され、感染魚では外側は4尾、中央では3尾、また内側では2尾から検出された。また、死亡魚と比較して感染魚のウイルス遺伝子量は明らかに少なかった。

各臓器におけるKHV遺伝子の分布量

各臓器におけるウイルス遺伝子量を図4に示した。鰓におけるウイルス遺伝子量が鰓、心臓および脳に比べて有意に多かった。また、鰓、鰓、腎臓および心臓では全ての個体からウイルス遺伝子が検出されたが、脳では5尾中3尾からのみ検出された。

試料の腐敗によるKHV遺伝子の減少

3日後の試料では腐敗臭が確認され、7日後には液状となった。感染魚では10日後には検出限界以下になったものの、死亡魚では21日後でも組織1 mg当たり 10^5 コピー以上のKHV遺伝子が検出された(図5)。

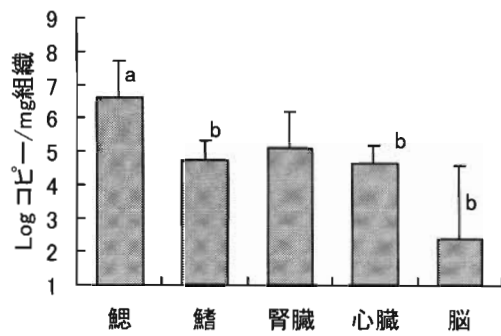


図4 KHV病によって死亡したコイの各臓器におけるKHV遺伝子分布量

異符号間に有意な差 (平均値±標準偏差, N = 5)

考 察

リアルタイムPCR法ではPCRによる増幅状況をリアルタイムでモニタリングし解析することができ、従来のPCR法では困難であった標的DNAの正確な定量を行うことが可能である。また、電気泳動による増幅産物確認の必要がないことから、迅速な結果の確認が可能となり、また増幅産物の飛散が原因となるコンタミネーション（キャリーオーバー）が生じにくい利点がある。このことから、魚類の病原体の検出・定量においても用いられるようになってきた^{9, 10, 11)}。また、得られた増幅産物について融解曲線解析を行うことで、擬陽性か否かの判断が可能となる。KHV遺伝子を検出するリアルタイムPCR法は蛍光標識プローブを用いた方法が既に報告されているが¹²⁾、インターカレート法によるリアルタイムPCRについては報告されていない。従って、本研究ではインターカレート法によるリアルタイムPCR法についての検討を、診断ガイドラインで定められたSph I-5FおよびSph I-5Rプライマーを用いて行った。最初に、PCR産物を組み込んだプラスミドDNAで標準試料を作成しKHV遺伝子の定量性についての検討を行った結果、正確な定量性が得られることが明らかになった。次に、希釈DNAを用いた従来のPCR法との検出感度の比較を行った結果、従来のPCR法より約10倍高い感度が得られた。これは、リアルタイムPCR法の反応サイクル数が従来のPCR法よりも5サイクル多いことと、SYBR Green IIによるDNAの検出感度が、従来のPCR産物の可視化に用

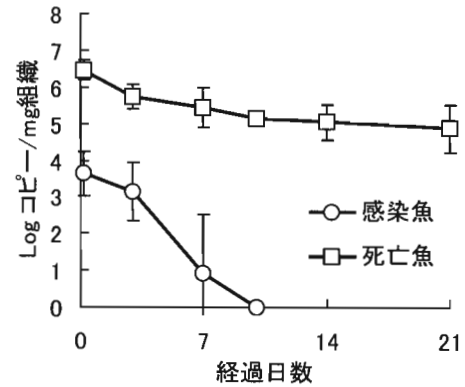


図5 腐敗した鰓からのKHV遺伝子の検出

細断した鰓をチューブに入れ20℃でインキュベートし、数日おきにKHV遺伝子量の定量を行った。(平均値±標準偏差, N = 3)

いてきたエチジウムプロマイドよりも25-100倍高いこと*によると考えられた。

次に、構築されたリアルタイムPCR法により各種試料のKHV遺伝子の定量を行った。最初に、鰓におけるウイルス遺伝子の分布状況について検討した結果、鰓先端部のウイルス遺伝子量が鰓弓に近い部分よりも多かった。通常、KHV検査に用いる部位は鰓先端部であるので、現状の方法ではウイルス遺伝子量が最も多い部分を検査していることが明らかになった。また、鰓先端部のウイルス遺伝子量が多いことから、コイを生かしたまま鰓から採材する検査（バイオプシー）も可能であると考えられた。また、コイの臓器毎のウイルス遺伝子量の検討を行った結果、鰓のウイルス遺伝子量が他の臓器よりも多いことが明らかになった。このことは、鰓がKHVの主要標的臓器と考えられている知見¹⁾と一致していた。また、死亡魚の鰓組織1 mgあたりに $10^6 \sim 10^7$ コピー程度のウイルス遺伝子が存在することも明らかになった。

天然域で死亡したコイが採取され、診断のために持ち込まれる場合は腐敗していることが多いが、腐敗がかなり進行している状態でもKHV陽性となる事例が多い。従って、腐敗試料中におけるウイルス遺伝子の減少過程についての検討を行った結果、ウイルス遺伝子量が多い死亡魚では20℃で21日間保存しても約1/100にしか減少しないことが明らかになった。21日後の試料は液化のため組織が確認されなかったことから、腐敗がかなり進行しているものと考えられた。実験では、試料をチューブに入れてから20℃で保存していることから、水中へのウ

* SYBR Green I説明書、タカラバイオ

イルス遺伝子の拡散は考えられない。実際は腐敗とともに水中に拡散していくことから、この実験よりも検出可能期間は短いと考えられるが、コイが水に浸っていない状態では相当長期間ウイルス遺伝子が試料に残存すると考えられる。一方、20℃の河川水中ではKHVは細胞に対する感染性を3日で失うことが明らかにされていることから¹³⁾、これらの腐敗試料中のKHVは感染性を消失していると考えられた。

本研究ではリアルタイムPCR法によるKHV遺伝子の検出系の検討を行った結果、正確な定量性が得られ、検出感度の向上も確認された。また、途中経過の観察が可能なことと、電気泳動が不要なことから従来のPCR法よりも明らかに迅速な診断が可能となった。リアルタイムPCR法は診断ガイドラインで定められた診断法ではないが、従来のPCR法と併用することでより迅速で正確なKHV病の診断が可能になると考えられる。

引用文献

- 1) Hedrick, R. P., O. Gilad, S. Yun, J. V. Spangenberg, G. D. Marty, R. W. Nordhausen, M. J. Kebus, H. Bercovier and A. Eldar (2000) : A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of a common carp. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 44-57.
- 2) Waltzek, T., G. O. Kelly, D. M. Stone, K. Way, L. Hanson, H. Fukuda, I. Hirono, T. Aoki, A. J. Davison and R. P. Hedrick (2005) : Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae*. *J. Gen. Virol.*, **86**, 1659-1667.
- 3) 飯田貴次 (2007) : コイヘルペスウイルス病. 海洋と生物, **171**, 309-315.
- 4) Sano, M., T. Ito, J. Kurita, T. Yanai, N. Watanabe, S. Miwa and T. Iida (2004) : First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol.*, **39**, 165-167.
- 5) Gray, W. L., L. Mullis, S. E. LaPatra, J. M. Groff and A. Goodwin (2002) : Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J. Fish Dis.*, **25**, 171-178.
- 6) Yuasa, K., M. Sano, J. Kurita, T. Ito and T. Iida (2005) : Improvement of a PCR method with the *Sph* I-5 primer set for the detection of koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.*, **40**, 37-39.
- 7) 吉野 学・渡 一・小島 禎・池戸正成 (2006) : LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法によるコイヘルペスウイルスの高感度迅速検出. 魚病研究, **41**, 19-27.
- 8) Gilad, O., S. Yun, K. B. Andree, M. A. Adkison, A. Zlotkin, H. Bercovier, A. Eldar and R. P. Hedrick (2002) : 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.
- 9) Overturf, K., S. LaPatra and M. Powell (2001) : Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids. *J. Fish Dis.*, **24**, 325-333.
- 10) Powell, M., K. Overturf, C. Hogge and K. Johnson (2005) : Detection of *Renibacterium salmoninarum* in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), using quantitative PCR. *J. Fish Dis.*, **28**, 615-622.
- 11) Valle, L. D., V. Toffolo, M. Lamprecht, C. Maltese, G. Bovo, P. Belvedere and L. Colombo (2005) : Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. *Vet. Microbiol.*, **110**, 167-179.
- 12) Gilad, O., S. Yun, F. J. Zagmutt-Vergara, C. M. Leutenegger, H. Bercovier, R. P. Hedrick (2004) : Concentrations of a koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 179-187.
- 13) Shimizu, T., N. Yoshida, H. Kasai and M. Yoshimizu (2006) : Survival of koi herpesvirus (KHV) in environmental water. *Fish Pathol.*, **41**, 153-157.