

### 3) コイヘルペスウイルス(KHV)PCR 検査における検出率の比較 (プライマーおよび PCR 条件の検討)

山本充孝・菅原和宏

#### 【目的】

コイのヘルペスウイルス病 (KHV) は本年度 2003 年 10 月に初めて我が国で発生が確認され、感染の拡大防止を目的に PCR 検査が実施されている。その検査体制は各県水産試験場で一次検査を行い、陽性検体を養殖研究所が二次検査で確定することとしている。本病における対応は、現在のところ全国に蔓延していないと考えられることから、検査を確実にし陽性コイを処分して蔓延防止を図ることが重要と考えられる。

そこで、本試験では検査に持ち込まれたコイを用いて同一個体において種々の方法で PCR 検査を実施し検出率を比較した。

#### 【方法】

**供試魚：**供試魚には 2003 年 11～12 月に天然水域で斃死したコイおよび県内各所で飼育・蓄養されていた 0.2～9.6kg のコイ 90 尾を用いた。なお、供試魚は鰓を採取して使用するまで 105℃ で保管した。

#### PCR 検査：

①DNA 抽出：コイの鰓弁を 5～10mg 採取し、粘液等を除いた後、Qiagen の DNA 抽出キットである Dneasy を用いて取扱い説明書どおり DNA 抽出を行った。

②PCR 条件：以下の条件は (社) 日本水産資源保護協会発行の特定疾病診断マニュアルに準じて行った。すなわち、20  $\mu$  L の PCR 反応液 [TaKaRa Ex taq 0.5U; 1×PCR buffer; 200  $\mu$  M dNTP, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1  $\mu$  M プライマー, テンプレート DNA 1  $\mu$  L] を調製し、サーマルサイクラー (Applied Biosystems, CA, USA) ABI Gene Amp PCR System 9700 を使用して遺伝子増幅を行った。プライマーには KHV Sph- I F、KHV Sph- I R および KHV 9/5F、KHV 9/5R の 2 種類を用いた (表 1)。増幅条件は図 1 に示すとおり、Sph- I プライマーを用いた場合は Sph- I (マニュアル) およびサイクル数を増やした Sph- I 40 サイクルの 2 種類で、9/5 プライマーは 9/5 (マニュアル) 1 種類の計 3 つの条件で PCR を行い、陽性率を比較した。

最後に 1.0%アガロース電気泳動後、臭化エチジウム染色して Sph- I プライマーでは 290bp、9/5 プライマーでは 484bp の標的 DNA 断片の増幅を確認した。なお、ポジティブコントロールは Sph- I 用、9/5 用の何れも養殖研究所から分与を受けたものを用いた。

#### 【結果】

PCR 検査結果を表 2. に示した。検査を行った 90 検体のうち、陽性検体数は Sph- I (マニュアル) では 10 検体、Sph- I 40 サイクルでは 15 検体、9/5 (マニュアル) では 10 検体となった。陽性検体数は Sph- I 40 サイクルで最も多く、また Sph- I 40 サイクルで陰性となり、他の 2 条件で陽性となった検体は認められなかった。このことから、サイクル数を 40 回に増やした Sph- I 40 サイクルによる KHV 検査が現行法よりも検出感度が高いと思われる。また、PCR の反応時間においても、現行法が約 3.5 時間かかるのに対して Sph- I 40 サイクル約 2 時間と時間も短縮された。

今後は nested PCR 等も含めた、より好感度の検出法の検討およびキャリアー・感染耐過となった際の標的部位の検討が必要と思われる。

表 1. コイのヘルペスウイルスに特異的なプライマーの塩基配列

Primer name	Sequence	塩基数
KHV Sph I -5F	5' -GACACCACATCTGCAAGGAG-3'	20
KHV Sph I -5R	5' -GACACATGTTACAATGGTGGC-3'	21
KHV 9/5F	5' -GACGACGCCGGAGACCTTGTG-3'	21
KHV 9/5R	5' -CACAAGTTCAGTCTGTTCCCTCAAC-3'	23

表 2. KHV 検査陽性となった検体における 3 条件の PCR 結果の比較

コイの種類	検体数	SPH- I マニュアル	SPH- I 40 サイクル	9/5 マニュアル	サンプルの状態
錦鯉	1	-	+	-	腐敗
		+	+	+	
		-	-	-	
		+	+	+	
		-	-	-	
		+	+	+	
マゴイ	11	+	+	+	腐敗
		+	+	+	
		+	+	+	
		+	+	+	
		-	-	-	
		+	+	+	
		+	+	+	
マゴイ	1	+	+	-	腐敗
マゴイ	1	-	+	-	腐敗
マゴイ	1	-	+	+	腐敗
マゴイ	1	-	+	-	腐敗
マゴイ	1	-	+	-	新鮮
錦鯉	1	+	+	+	新鮮
陽性数 計		10	15	10	
検査数 計		90	90	90	