

アサリパーキンサスのPCR検査手法の改良について

中津川 俊雄

Improvement of a PCR detection method for *Perkinsus olseni* isolated from Manila clam ,
Ruditapes philippinarum

Toshio Nakatsugawa

The agent of perkinsosis on the clam *Ruditapes philippinarum* in Japan was identified as *Perkinsus olseni* (Protozoa Apicomplexa) on sequencing of the ITS region. The author detected *Perkinsus* sp. on the clam by *P. olseni* and *P. marinus*-specific polymerase chain reaction (PCR) and a fluid thioglycollate medium technique (FTM). It was considered that PCR was less effective than FTM in the investigation of *Perkinsus* sp. infection.

The author compared two PCR methods. An ordinary PCR reaction mixture was used in the first PCR method. The second PCR (ADP PCR) was conducted using a PCR reaction mixture to which Ampdirect Plus (Shimadzu) was added. ADP PCR showed a better detection sensitivity for *Perkinsus* sp. than ordinary PCR and was equal to FTM.

キーワード：アサリパーキンサス原虫，PCR検査，FTM培養，検査精度

Perkinsus olseni は、オーストラリアのアカアワビ *Haliotis ruber* に寄生する病害種として記載された (Lester, Davis, 1981)。しかし、その後の分子生物学的研究 (NTS領域の塩基配列解析) により、ポルトガルのヨーロッパアサリ *Ruditapes decussatus* の寄生体として記載された *P. atlanticus* と同一種とされた (Murrell *et al.*, 2002)。その結果、*P. olseni* の宿主範囲は上記2種のほか、マルアワビ *H. cyclobates*、ミツウネアワビ *H. scalaris*、ウスヒラアワビ *H. laevigata*、アサリ *R. philippinarum* の計6種とされた (良永, 2004)。さらに、OIE (国際獣疫事務局: Office International des Epizooties) の Aquatic Animal Health Code 2005 の中では、宿主としてヌノメオオハナガイ *Austrovenus stutchburyi* が加えられ、計7種を挙げている。

Hamaguchi *et al.* (1998) は、熊本県産および広島県産のアサリにおけるパーキンサス原虫の存在を初めて報告し、それらのr-RNAの5.8Sを含むITS領域の塩基配列から、*P. olseni* かその近縁種であるとした。その後、アサリのパーキンサス原虫は日本国内に広く分布していることが報告された (浜口ら, 2002) が、日本のアサリに寄生する種は未確定であった。OIEの Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2006) では、パーキンサス原虫の種の同定方法にはITS領域の塩基配列解析が推奨されている。Park *et al.* (2005) は、韓国内のアサリの大量死の原因であるパーキンサス原虫について、ITS領域の塩基配列の解析により *P. olseni* であると結論付けた。また、良永 (2006) も、同様にITS領域の塩基配列解析によって日本国内のアサリに寄生するパーキンサス原虫を、*P. olseni* と同定

した。良永の報告の中では、Goggin (1994) が、*P. olseni*、*P. marinus* および *P. atlanticus* 等由来の異なる5種のパーキンサス原虫のITS領域を比較するために設計したプライマーが使用された。

著者は、アサリにおけるパーキンサス寄生を検査する機会を得、良永 (2006) の使用したPCR法および通常のFTM (Fluid thioglycollate medium) による培養法で検出を試みた。しかし、PCR法での検出精度が低く、培養法によってパーキンサス寄生の有無を調べる方が効率的であることを確認した。但し、培養法には、種の同定ができず、さらに7~10日間の培養期間を要するという短所がある。したがって、短時間で検出可能なPCR法の検出精度を高める必要があると考えられた。

従来のPCR法の検出精度が低い原因の一つとして、アサリ組織中に酵素反応を阻害する物質が多くあることが考えられた。そこで、著者は、酵素反応阻害物質の作用を抑制するとされる Ampdirect Plus (Shimadzu) を利用するPCR法を検討したところ、その有効性が確認されたので報告する。

材料および方法

2005年12月に購入した伊勢湾産アサリ18個体 (殻長 28.8~37.0mm) について、個体ごとに片側の鰓を採材して、FTM (BBL) に投入し、18で培養した。10日間培養後、鰓を取り出し、ルゴール液で染色した。黒青色~黒紫色に染まった原虫の前遊走子嚢を実体顕微鏡下で計数し、寄生数に応じて寄生強度を5段階 (- : 寄生0 ; + : 20虫体以下 ; 2+ : 21~50虫体 ;

Table 1 Oligonucleotide primers used for PCR test of *P. olseni*

| Primer | Nucleotide sequence (5' -3') |
|--------|------------------------------|
| F | CGTAGGTGAACC TGCGGAAG GATC |
| R | TATGCTTAAA TTCAGCGGGT |

Table 2 Components of the PCR mixture for PCR test-

| | | |
|---------------------------------------|------|----|
| Taq polymerase (TaKaRa Extaq HS) | 0.1 | μL |
| F-Primer | 0.2 | |
| R-Primer | 0.2 | |
| 10 × PCR buffer (TaKaRa Extaq buffer) | 2 | |
| d-NTPs (TaKaRa) | 1.6 | |
| 10% Tween 20 | 2 | |
| Deionized distilled water | 12.9 | |
| DNA template | 1 | |
| Total | 20 | μL |

3+ : 51 ~ 200虫体 ; 4+ : 201虫体以上) に分類した。

Goggin (1994) の示したPCR法を参考に、r-RNAの5.8Sを含むITS領域の塩基配列の増幅を目的としたPCR法で検査(以下PCR検査- という)を実施した。検査対象は5段階それぞれの寄生強度を示すアサリ6個体(但し、寄生強度4+は2個体)の鰓とした。培養に供していない片側の鰓組織30~40 mgを採材し、酵素処理後、市販のDNA抽出キット(QIAamp DNA Mini Kit : QIAGEN)を用いてDNAを抽出し、供試テンプレートとした。供試したPCRプライマーはTable 1のとおりであった。PCR反応液の組成はTable 2に示した。PCR条件は、最初の熱変性を95 5分間とし、94 1分間、57 30秒間、72 1.5分間を31サイクル、最後の1サイクルの延伸では72 7分間とした。PCRにはサーマルサイクラー(PC-320 : ASTEC)を用い、アガロースゲル電気泳動で増幅産物の確認を行った。なお、No.2(寄生強度4+)の鰓のPCR増幅産物の希釈液(TE buffer, pH8.0で10⁴希釈)を陽性対照とした。

PCR反応液として Ampdirect Plus (Shimadzu)(以下、ADPという)を添加した反応液(以下、ADP反応液という)を使用し、上述のPCR法で検査を実施した。検査対象は18個体すべてのアサリの鰓とし、PCR陽性となったアサリについては、鰓以外の斧足筋肉、外套膜および消化器官を検査対象とし、部位別に採材して

PCR検査(以下PCR検査- という)を行った。PCR陰性となったアサリ6個体のうち3個体についても、斧足筋肉、外套膜および消化器官を検査対象とした。DNA抽出、PCR条件および増幅産物の確認は上記と同様に行った。なお、ADP反応液の組成はTable 3のとおりとした。

結 果

培養検査およびPCR検査の結果をTable 4に示した。FTMによる培養検査の寄生強度は、- が6個体、+ (寄生数20虫体以下/片側の鰓)が6個体、2+ (寄生数21~50虫体)が2個体、3+ (寄生数51~200虫体)が2個体および4+ (201虫体以上)が2個体であった。寄生率は67%となった。

PCR検査- およびPCR検査- の結果の一部(泳動像)をFig. 1に示したが、培養検査で2+ (No.5)、+ (No.7)および- (No.13)の3個体はPCR検査- では陰性となり、PCR検査- ではNo.13のみ陰性となった。培養検査で3+であったNo.4はいずれのPCR検査でも陽性となった。また、PCR検査- に供した6個体中、4+ (No.1, 2)の2個体は陽性であった。

PCR検査- のうち鰓における結果では、培養検査で+の6個体(No.7~12)中2個体(No.9, 12)が陰性、培養検査で-の6個体(No.13~18)中1個体(No.18)

Table 3 Components of the Ampdirect Plus PCR mixture for PCR test- II

| | | |
|----------------------------------|-----|----|
| Taq polymerase (TaKaRa Extaq HS) | 0.1 | μL |
| F-Primer | 0.2 | |
| R-Primer | 0.2 | |
| 2 × Ampdirect Plus (Shimadzu) | 10 | |
| 10% Tween 20 | 2 | |
| Deionized distilled water | 6.5 | |
| DNA template | 1 | |
| Total | 20 | μL |

Table 4 Results of the culture test by FTM and diagnosis by PCR of *Perkinsus* infection of Manila clam

| Sample No. | Shell length mm | Infection frequency derived from FTM culture ¹ | PCR test - ⁷ | | PCR test - ¹⁰ | | |
|------------|-----------------|---|-------------------------|------|--------------------------|--------|-----------------|
| | | | Gill | Gill | Foot | Mantle | Digestive gland |
| 1 | 34.7 | 4+ ² | + ⁸ | + | - | + | + |
| 2 | 34.2 | 4+ | + | + | + | + | + |
| 3 | 30.5 | 3+ ³ | | + | + | + | - |
| 4 | 33.7 | 3+ | + | + | - | - | - |
| 5 | 34.9 | 2+ ⁴ | - ⁹ | + | + | + | + |
| 6 | 33.5 | 2+ | | + | + | + | + |
| 7 | 32.2 | + ⁵ | - | + | - | - | - |
| 8 | 30.5 | + | | + | - | + | + |
| 9 | 29.6 | + | | - | - | - | - |
| 10 | 30.9 | + | | + | - | + | - |
| 11 | 30.7 | + | | + | - | - | - |
| 12 | 37.0 | + | | - | - | - | - |
| 13 | 30.2 | - ⁶ | - | - | NT ¹¹ | NT | NT |
| 14 | 33.6 | - | | - | - | - | - |
| 15 | 29.6 | - | | - | NT | NT | NT |
| 16 | 31.5 | - | | - | - | - | - |
| 17 | 28.8 | - | | - | NT | NT | NT |
| 18 | 29.3 | - | | + | - | - | - |

Mean shell length±standard deviation=32.0 ± 3.96mm

- 1 One side of the gill was incubated in fluid thioglycollate medium (FTM) at 18 °C in the dark for 10 days. The incubated gill was stained with 20% Lugol's iodine solution and observed for the detection of prezoosporangia under a microscope.
- 2 4+ : Positive; parasite number was more than 201/one side of gill.
- 3 3+ : Positive; parasite number was 51-200/one side of gill.
- 4 2+ : Positive; parasite number was 21-50/one side of gill.
- 5 + : Positive; parasite number was less than 20/one side of gill.
- 6 - : Negative detection.
- 7 Approximately 30-40mg of gill pieces were removed from each clam, and genomic DNA was isolated by the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). PCR was performed in a total volume of 20 µ L of ordinary PCR reaction mixture. Six samples were tested.
- 8 + : Positive on PCR test.
- 9 - : Negative on PCR test.
- 10 Approximately 30-40mg of gill pieces were removed from each clam, and genomic DNA was isolated by the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). PCR was performed in a total volume of 20 µ L of PCR reaction mixture added with Ampdirect Plus(Shimadzu).
- 11 NT : Not tested with ADP PCR.

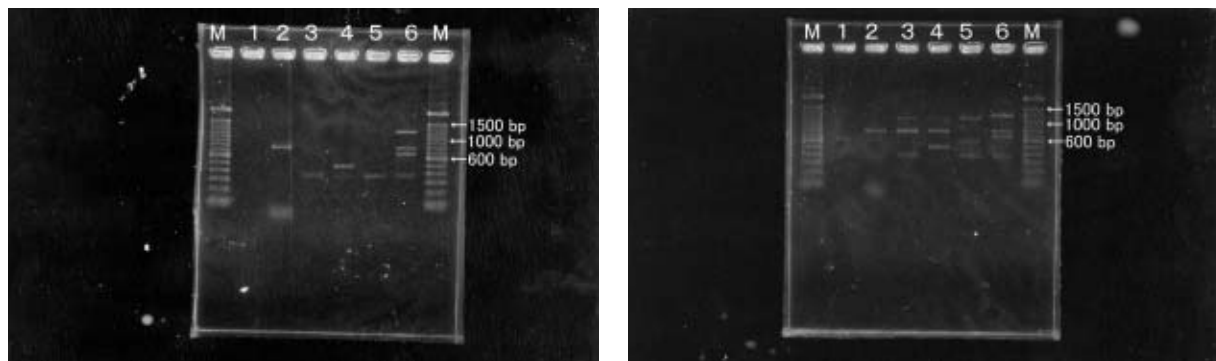


Fig. 1 Profiles of PCR-amplified DNA fragments from the gills of infected clams . Left : PCR-amplified DNA fragments . Right : ADP PCR-amplified DNA fragments . Lane M : DNA marker ; lane 1 : negative control ; lane 2 : positive control ; lane 3 : sample No.5 (FTM 2+) ; lane 4 : sample No.7 (FTM +) ; lane 5 : sample No.13 (FTM -) ; lane 6 : sample No.4 (FTM 3+) .

が陽性となり、寄生率は61%で、培養検査結果と差異がみられた。鰓以外の部位別では、外套膜の結果が鰓の結果とかなりよく一致したが、斧足あるいは消化器官では一致しない事例が多かった。

考 察

鰓を供試するFTMによる培養検査は、一般的なパーキンサス原虫の前遊走子嚢の検出に適しており、今回の寄生強度分類のように、ある程度定量的な検出が

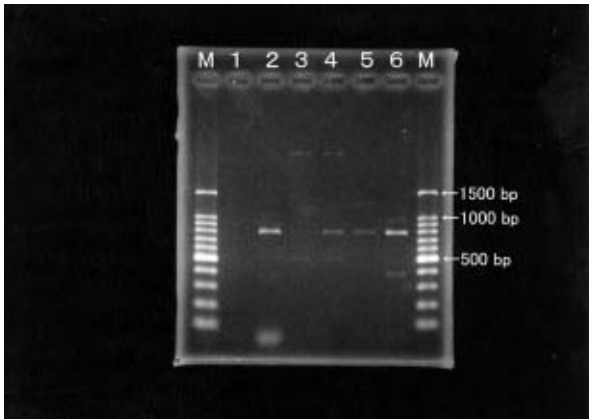


Fig. 2 Profile of PCR-amplified DNA fragments from an infected clam .

Lane M : DNA marker (TaKaRa 100 bp DNA marker) ; lane 1 : negative control ; lane 2 : positive control ; lane 3 : foot of sample No.1 (FTM 4+) ; lane 4 : mantle of No.1 ; lane 5 : digestive gland of No.1 ; lane 6 : gill of No.1 .

可能であった。しかし、ルゴール染色で黒青色～黒紫色に染まった寄生体が *Perkinsus olseni* の前遊走子嚢であるかどうかの確認はできない難点があるうえ、培養期間が7～10日間と長いという短所がある。また、前遊走子嚢が集まって塊状になっている場合には、正確な計数は困難であった。

Goggin (1994) の示したPCR法 (PCR検査-) では、Table 4およびFig. 1のように、前遊走子嚢の寄生強度が3+および4+で検出可能であったが、それ以下では検出できなかった。DNA抽出に供する組織の採材量が30～40 mgと非常に少ないため、前遊走子嚢数が少ない場合にはうまく検出できない危険性がある。しかし、同一のDNA抽出液を用いたADP反応液によるPCR法 (PCR検査-) では、寄生強度+および2+でも検出可能であった。ADPのマニュアルによれば、ADPは動植物の組織中に多量に存在するタンパク質や糖等の酵素反応を阻害する物質の作用を抑制する働きがあるとされる。今回のPCR検査- とにおける検査精度の差異は、このことをある程度立証したものと判断される。したがって、ADPを利用するPCR検査は検出率の向上に役立つと考えられた。

部位別のPCR検査結果からは、鰓 外套膜 消化器官 斧足の順に検出率が低下しており、鰓を検査対象とすることが最良であると思われた。No.1の斧足、外套膜および消化器官由来の増幅産物のアガロースゲル電気泳動の結果をFig. 2に示したが、標的とする785 bp以外に複数のバンド (非特異的な反応) がゲル上に形成された。他のサンプルでも類似した非特異的な反応がみられた。供試するテンプレートを10倍あるいは100倍希釈しても同様であった。これは、パーキンサス原虫の前遊走子嚢をアサリ組織から単離せずにDNA抽出したため、組織由来のDNAが混入したこと

が原因かもしれない。また、今回供試したプライマーに設計上の問題がなかったか、今後検証する必要がある。

鰓の培養検査における寄生強度が+で、PCR陰性となった6個体中2個体の前遊走子嚢数は3虫体および1虫体と非常に少数であり、培養に供しなかった他方の鰓でのパーキンサスの寄生がなければPCRでの陽性反応はみられないこととなる。また、採材量が少ないため、パーキンサス寄生数が非常に少ない鰓では採材部位に *P. olseni* が寄生していないこともあり、PCR検査では陰性となる可能性もある。更に、培養検査に用いたFTMでは殆どのパーキンサス属の栄養体が前遊走子嚢に成長して大型化するとされており (但し、*P. qugwadi* を除く)、*P. olseni* 以外のパーキンサス原虫であっても検出してしまふ。今回のPCR検査に供したプライマーは *P. olseni*、*P. atlanticus* および *P. marinus* の比較のための設計であり、これら以外の未同定のパーキンサス原虫では陽性反応がみられない可能性もある。したがって、培養検査結果とPCR検査結果が一致しない場合もわずかながらありえると考えられた。

一方、寄生強度が-で、PCR陽性となった事例が6個体中1個体であったが、ルゴール染色した鰓を実体顕微鏡で観察する際に、見落としのあった可能性や培養に供した鰓に寄生がなかった可能性が想定される。培養法では、肉眼観察を伴うため検査精度には限界がある。

上述のように、アサリの鰓を対象としたADP反応液によるPCR法は、DNA抽出や採材における問題はあつものの、パーキンサス原虫の迅速で、且つ確実な検出法と言えよう。他の二枚貝類やアワビ類におけるパーキンサス原虫の寄生の有無を確認する場合、FTMでの培養法は実施する必要がある。しかし、鰓を対象とせず、筋肉組織を対象とせざるをえない場合には、実体顕微鏡下での観察には、困難を伴い、時間を要する。ADP反応液によるPCR法を利用すれば、検査に要する時間が短縮されるだけでなく、検査精度が改善され、検出率の向上をもたらすものと期待される。*P. olseni* は、アワビ類にも寄生するとされるため、ADPがそのPCR検査に使えるか今後検討する必要がある。

文 献

- Goggin C.L . 1994 . Variation in the two internal transcribed spacers and 5.8S ribosomal RNA from five isolates of the marine parasite *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa), *Mol. Biochem. Parasitol.* , 65 : 179-182 .
- Hamaguchi M., Suzuki N. , Usuki H. , Ishioka H. 1998 . *Perkinsus* protozoan infection in short-necked clam *Tapes (=Ruditapes) philippinarum* in Japan .

- Fish Pathol.* , 33 : 473-480 .
- 浜口昌巳 , 佐々木美穂 , 薄 浩則 . 2002 . 日本国内におけるアサリ *Ruditapes philippinarum* の *Perkinsus* 原虫の感染状況 . 日本ベントス学会誌 , 57 : 168-176 .
- Lester R.J.G. , Davis G.H.G. 1981 . A new *Perkinsus* species (Apicomplexa , Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber* . *J. Invertebr. Pathol.* , 37 : 181-187 .
- Murrell A. , Kleeman S.N. , Barker S.C. , Lester R.J.G. 2002 . Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester & Davis,1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo,1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus* . *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* , 22 : 258-265 .
- Office International des Epizooties . 2005 . Aquatic Animal Health Code , Chapter 3.1.9 , Infection with *Perkinsus olseni* : 123-125 .
- Office International des Epizooties . 2006 . Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals , Chapter 2.2.7 , Perkinsosis : 335-342 .
- Park K.-Il , Park J. , Lee J. , Choi K. 2005 . Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp. isolated from Manila clams *Ruditapes philippinarum* . *Dis. Aquat. Org.* , 66 : 255-263 .
- 良永知義 . 2004 . 貝類の原虫病 , 「魚介類の感染症・寄生虫病」(若林久嗣・室賀清邦編) : 320-329 . 恒星社厚生閣 , 東京 .
- 良永知義 . 2006 . 二枚貝類の寄生虫症に関する研究 , 平成17年度養殖衛生管理技術開発研究報告書 : 167-180 . 日本水産資源保護協会 .