

# *Cryptocaryon irritans* (海産白点虫) の迅速かつ定量的検出法の確立

江口 充・谷口亮人・大西宏幸

(環境グループ)

近畿大学大学院農学研究科

海産白点虫は、閉鎖性の高い養殖場水域で養殖魚に感染し、白点病を引き起こす最も危険な寄生性繊毛虫の一種である。近畿大学白浜水産研究所養殖生簀でも、白点病は頻繁に起こっており、莫大な経済的損失をこうむっている。

白点病感染後の有効な治療方法はなく、魚の持つ自然治癒能力に頼るのみである。海洋養殖における白点病予防対策は、生簀網を海産白点虫のいない、あるいは少ない場所に移動させるのみで、その移動させる場所は漁業者の経験による場所が大きい。そのため、養殖場現場からは、海産白点虫がどこに、どれくらい存在するのかを正確に知る方法が強く求められている。

海産白点虫のライフサイクルは、感染体であるセロント、離脱体であるトロホント、休眠体であるトモントから主に成る (Colori, 1985)。トモント1細胞から、多いときで1000細胞ものセロントが放出されることもあるため (Diglesi and Adlard, 1997)、トモント数をあらかじめ把握しておくことが、将来的な白点病感染予防のためにも非常に有効となる。

本研究では、白点病予防の第一段階として、養殖場における海産白点虫の分布を明らかにするために、定量PCR法を用いて、海産白点虫トモントを迅速かつ定量的に検出する方法を開発することを目的とした。

## 材料と方法

DNA データバンクに既に登録されている海産白点虫塩基配列 (rDNA 中の internal transcribed spacer: ITS 領域) を用い、ABI prism primer express 3.0 を用いて特異的プライマー複数種類を設計した。候補プライマーを、プライマーダイマー形成の有無や、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) データベースを用いた BLAST 検索を行い、最も特異性の高いプライマーを選抜した。

本プライマーの有効性は、海産白点虫培養株複数株を用いて従来の PCR で確認した。培養株は、近畿大学水産養殖種苗センターにて飼育されているマダイより分離した株を、本研究室においてマダイで継代培養した株を用いた。MO BIO UltraClean Soil DNA Isolation Kit を用いて白点虫分離株トモント 400 個から DNA を抽出した。PCR 反応は 25  $\mu$ L 容量で、2.5  $\mu$ L 10 $\times$ KOD Buffer、2.5  $\mu$ L dNTPs (200  $\mu$ M)、1  $\mu$ L primers (200 nM)、0.1  $\mu$ L KOD Dash (2.5 units/ $\mu$ L)、1  $\mu$ L 鋳型 DNA で、初期変性 95 $^{\circ}$ C $\cdot$ 5 分、(94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30 秒、60 $^{\circ}$ C $\cdot$ 20 秒、74 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1 分)  $\times$  35 サイクル、74 $^{\circ}$ C $\cdot$ 5 分の伸長反応で行った。PCR 増幅後、3%アガロースゲルで 100 V $\cdot$ 50 分間電気泳動を行い、海産白点虫に特異的な 120 bp のバンドの有無を確認した。確認後、塩基配列解析を行った。

海産白点虫培養株 DNA は上記と同じ方法で抽出し、3 連で行った。定量 PCR 反応は、Applied Biosystems 7300 リアルタイム PCR システムを用い、20  $\mu$ L 容量で、10  $\mu$ L 2  $\times$  Power SYBR PCR

Master Mix、1  $\mu$ L primers (200 nM)、1  $\mu$ L 鋳型 DNA、初期変性 95°C・10 分、(94°C・15 秒、60°C・

1 分) x 40 サイクルで行い、その後、融解曲線分析ステップを加えた。

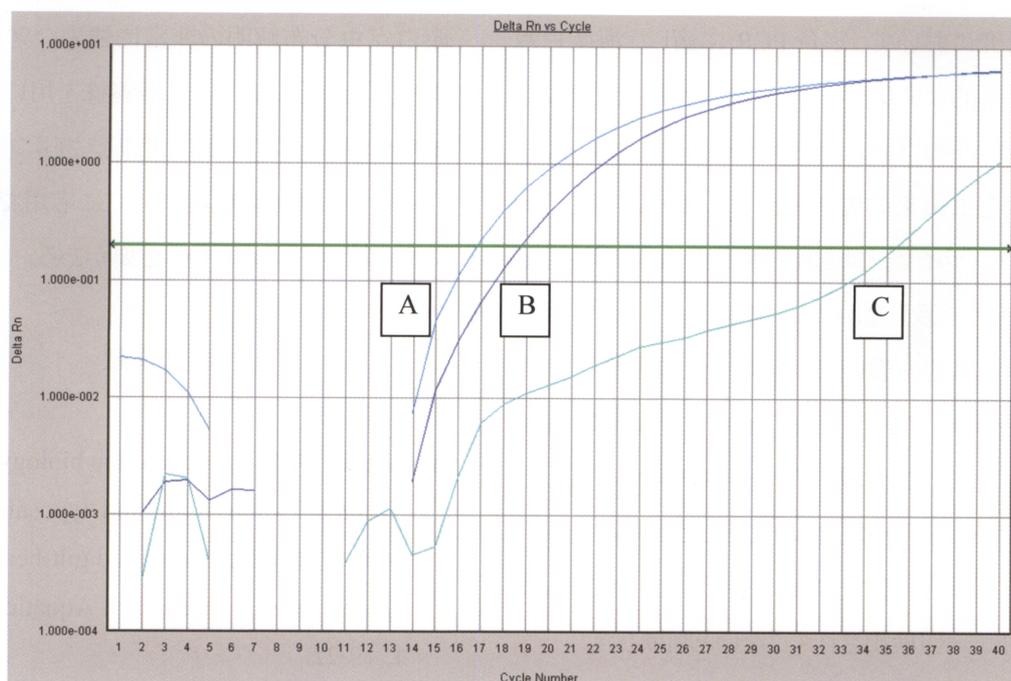


Fig. 1 定量 PCR の結果 (増幅曲線)。A, B: トモント 4 細胞に相当する鋳型 DNA、C: ネガティブコントロール

## 結果

海産白点虫に最も特異性の高いプライマーセットとして、CI-120f フォワードプライマー (21 mers): 5'-TGG CTC CCA TAA CGA TGA AGA-3'、CI-120r リバースプライマー (20 mers): 5'-AAC ATG CCG TTG GGA TAT CC-3' を選抜した。本プライマーセットで、およそ 120 bp の大きさの DNA 断片が得られ、 $T_m$  値は 81°C となる

CI-120f フォワードプライマーは海産白点虫の rDNA ITS 領域に 100% 一致したが、珪質鞭毛藻類ディクチオカ属、絨毛虫ストロンビディウム属とも 100% 一致した。CI-120r リバースプライマーも海産白点虫の rDNA ITS 領域に 100% 一致したが、ナシア属細菌やヒトゲノムとも 80% (16/20 mers) 一致した。

白点虫培養株を用いた従来の PCR 法による確認において、目標となる 120 bp の DNA 増幅産物が得られた。その塩基配列を決定後、データベース検索を行ったところ、既存の海産白点虫と高い相同性を示した (data not shown)。

定量 PCR においても、目標となる海産白点虫 DNA 断片が得られ、融解曲線分析の結果、81°C 付近にピークを示した。しかしながら、わずかながらネガティブコントロールにおいても増幅産物が確認された (Fig. 1)。

## 考察

これまでの研究では、淡水産白点虫においてのみ定量 PCR 法による検出・定量の試みがなされてきた (Jousson *et al.*, 2005)。しかし、淡水産白点虫は、海産白点虫とは遺伝的にも全く異なる

*Ichthyophthirius multifiliis* を病原微生物としているため (Digglesi and Adlard, 1997)、そのまま応用することはできない。

本研究において、定量 PCR に適した海産白点虫に特異的なプライマーセットを設計した。本プライマーセットのフォワードプライマー CI-120f では他の繊毛虫由来の塩基配列とも 100% 一致したが、リバースプライマーはこれら繊毛虫由来の塩基配列とは全く一致しなかった。逆に、リバースプライマーで 4 塩基の違いで一致した他の生物由来の塩基配列は、フォワードプライマーでは全く一致しなかった。このことより、フォワードプライマーとリバースプライマーの組み合わせることが有効であり、このセットを用いることで他の生物由来の DNA 塩基配列は一切検出されてこないと判断した。

定量 PCR の結果、ネガティブコントロールからもわずかに増幅産物が得られたが、その Ct 値は 35.5 であった (Fig. 1)。これに対し、鋳型 DNA の Ct 値は 18.8 であったことから、現場レベルで十分応用可能な範囲であることが推測された。本研究で用いた鋳型 DNA 量は、海産白点虫トモント 4 細胞に相当する。本研究では、未だ検量線までは作成していないが、かなりの検出感度で海産白点虫を検出できることが期待される。

本研究で開発した手法を用いると、最短 2 時間

で試料採取から海産白点虫を検出することができる。本研究の意図する定量 PCR 法は多検体試料処理に長けているため、養殖場現場における海産白点虫分布解明の非常に強力なツールになり得る。今後、海産白点虫培養株を用いることで、rDNA コピー数の正確な把握、さらに検量線の作成を行い、養殖場現場にすぐに応用できるレベルにまで精度を高めていく必要がある。

## 参考文献

- A. Colori (1985) Aspects of the biology of *Cryptocaryon irritans*, and hyposalinity as a control measure in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata*, Diseases of Aquatic Organisms, 1, 19-22.
- O. Jousson, C. Pretti, D. Di Bello, A.M. Congnetti-Varriale (2005) Non-invasive detection and quantification of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* by real-time PCR, Diseases of Aquatic Organisms, 65, 251-255.
- B.K. Digglesi, R.D. Adlard (1997) Intraspecific variation in *Cryptocaryon irritans*, The Journal of Eukaryotic Microbiology, 44, 25-32.