

ポリメラーゼ連鎖反応によるカイコ核多角体病ウイルス検出 技術の簡易化(2)

誌名	埼玉県蚕業試験場研究報告
ISSN	03889084
著者	野口, 洋子
巻/号	67号
掲載ページ	p. 8-11
発行年月	1995年12月

ポリメラーゼ連鎖反応によるカイコ核多角体病ウイルス 検出技術の簡易化

(2) 市販の試薬によるDNA抽出法の検討

野口洋子

Youko Noguchi: An improved method for PCR based detection of nuclear polyhedrosis virus in *Bombyx mori* (2) Direct DNA extraction by GeneReleaser™ from blood and impure samples

本県においては核多角体病蚕の発生が慢性的にみられ(野口・小林, 1990), 規模拡大や多回育化における蚕作不安定の主要因となっている。現在推進されている超多回育養蚕においては, 稚蚕飼育期間の延長等から, 病原汚染の危険性が増すことは避けられないが, 蚕作の安定を図るためには, 病原に汚染されていない稚蚕を供給することが不可欠であり, 稚蚕共同飼育における核多角体病蚕混入の有無を診断するための技術開発が早急に求められている。

蚕病の診断技術については, 伝染性軟化病の全国的な流行を背景に開発が進められ, 血清学的な手法による個体レベルの早期診断技術が確立された(井上・鮎沢, 1971; 関島ら, 1974; 清水, 1982)。筆者は, カイコ核多角体病ウイルス(BmNPV)感染を集団として診断するため, 多量の蚕体や残沙に混入したごく微量のBmNPVを検出する技術の開発を検討した。その結果, ポリメラーゼ連鎖反応(PCR法; polymerase chain reaction)により, 蚕糞・蚕沙を含めた20,000頭の蚕に核多角体病発病蚕を1頭混入した場合でも, BmNPVを検出することが可能となった(野口ら, 1994, 1995)。本報では, 集団検査技術として実用化するため, 市販の試薬を利用したDNA抽出操作の簡易化について検

討した。

材料と方法

1. 供試ウイルス

BmNPVは埼玉県内の農家で発生した病蚕中の1頭より採取して増殖させたもので, 多角体液を高濃度で塗布した桑葉を摂食させて得た病蚕を実験に供した。

2. アルカリ液による多角体の溶解

IARTOU *et al.* (1985)の方法に準じ, アルカリ液(0.2M Na₂CO₃, 0.2M NaCl, 20mM EDTA; pH10.8)により多角体を溶解した。

3. 試料の調製

体液からウイルスDNAを検出する場合は, 5齢起蚕時に高濃度多角体液を桑葉に塗布して摂食させて得た感染蚕を, 致死するまで毎日3頭ずつ取り出して体液を採取し, -80°Cで保存して試験に供した。

飼育残沙の一部と蚕体を供試してBmNPVを検出する場合は, 前報(野口ら, 1994)において調製し, 保存した試料を用いた。これは, 人工飼料で飼育した10,000から20,000頭の3齢起蚕に2齢末期の核多角体病発病蚕を1, 2または5頭混入させ, 飼育

第1表 GeneReleaser™により核多角体病感染蚕体液から抽出したウイルスDNAの検出

ウイルス接種 後日数	体液希釈倍数(倍)							
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
6日	-	++	++	++	+	+	±	-
4	++	++	++	++	+	±	-	-
2	++	++	++	+	±	-	-	-
1	(±)	±	(±)	-	-	-	-	-
非接種	-	-	-	-	-	-	-	-

感染体液の採取: 経時的に5頭解剖して体液を採取し, -70°Cに保存, 体液-GeneReleaser™-PCR反応液総量: 5-40-70μℓ
++: 明瞭な太いバンド, +: 明瞭なバンド, ±: 不明瞭なバンド, (±): 非常に不明瞭なバンド (PCR産物の量を示す)。

残沙を一部含めたものをよく磨砕し、8倍量のアルカリ液を加え、1時間室温に放置して多角体を溶解した。20ml程度を採取し、3,000rpmで10分間遠心分離して得た上清及び、これに最終濃度で1%量のラウリル酸ナトリウム(SDS)及び10 μ g/mlのプロティナーゼK(トリチラキウム属製;和光純薬)を加えて55°Cで1時間処理したものに、前報(野口ら, 1995)のDNA抽出法により酢酸カリウム処理とエタノール沈澱処理を1回行った簡易抽出DNAをそれぞれ-80°Cで保存したものである。

また、人工飼料で1, 2齢期間を飼育した残沙1g当たり多角体を10²から10⁶個混入して、これに16倍量のアルカリ液を加えて30分室温に放置後、良く攪拌して一部を採取した。3,000rpmで10分間遠心分離した上清から直接GeneReleaser™でDNAを抽出したものと、上記の簡易抽出DNAに更に1回のエタノール沈澱処理を行ったものについて、PCRの感度を比較した。

4. 細胞溶解試薬によるDNAの抽出

試料に細胞溶解試薬(GeneReleaser™;Bioventure, Inc.;フナコシ)を重ねて、これにミネラルオイルを重ねた。これを製品のプロトコールにしたがって、温度制御装置のプログラムを65°C30秒→8°C

30秒→65°C90秒→97°C180秒→8°C60秒→65°C180秒→97°C60秒→65°C60秒→80°C120秒に設定し、所定の変温処理をした後、PCRの反応液を重ねてPCRを行った。

5. プライマーの設計及びPCR

プライマーはBmNPVのポリヘドリン遺伝子の塩基配列(IATROU et. al., 1985)に基づいて作成したNP3及びNP4(野口ら, 1994)を供した。

PCR反応溶液は、上記のようにして得たDNA溶液を蒸留水で所定の倍数に希釈したものを5 μ l、デオキシリボヌクレオチド3リン酸(Pharmacia-LKB Biotech.Inc., Piscataway, NJ, USA)4種を各0.2mM、プライマーを各0.5 μ M含み、これにTaqポリメラーゼ(和光純薬)を3.0ユニット加えて合計を30 μ lとした。GeneReleaser™及び抽出DNAの量を変える場合は蒸留水の量で調整を行い、各成分を総量に応じて比例配分した。

PCRは94°C1分間→50°C1分間→72°C2分間の温度周期を30回反復した。温度制御装置はザイモリアクター(アトー株式会社)を使用した。PCR産物のうち15 μ lを2%アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色してDNAのバンドを観察した。

第2表 GeneReleaser™によるDNA抽出の際の試料の希釈倍数とPCRの感度

NP蚕混 ^{a)}	1-20-50 ^{b)}			5-20-50			
	1	10	20 ^{c)}	10	20	40	80
5/10,000	-	++	+	-	+	+	+
1/10,000	-	+	±	-	±	±	±
2/10,000	-	±	-	-	-	(±)	-
0/10,000	-	-	-	-	-	-	-

NP蚕混 ^{a)}	2-40-100			5-40-100				10-40-100		
	5	10	20	1	10	20	40	20	40	80
5/10,000	±	+	+	-	+	++	+	±	+	±
1/10,000	-	±	±	-	+	+	±	±	±	±
2/10,000	-	±	(±)	-	+	+	(±)	(±)	(±)	(±)
0/10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a) 核多角体病蚕/正常蚕(飼育残沙を含む)、b) 鋳型DNA-GeneReleaser™-PCR反応液を含めた総量(μ l)、c) 鋳型DNAの希釈倍数
++~(±): 第1表に同じ。

結果と考察

1. 細胞溶解試薬による体液からのウイルスDNAの抽出

5 齢起蚕にカイコNPVを経口接種し、経時的に体液を採取して -80°C に保存したものを蒸留水で10倍階段希釈した。これをPCR用の $500\mu\text{l}$ チューブに $5\mu\text{l}$ 採り、GeneReleaser™を $20\mu\text{l}$ 重層して所定の変温処理を行い、DNAの抽出を行った。引き続きPCR反応液を重層して、アニーリング温度 50°C 、反復回数30回でPCRを行った結果を第1表に示した。ウイルス接種後2日では、体液を 10^{-3} 倍に希釈してもウイルスDNAの明瞭なバンドが観察できた。外観からも病徴の観察される5日後の白濁した体液では、 10^{-6} に希釈した体液からでも検出が可能であったが、体液を希釈しないままではPCR産物が得られず、阻害物質が生成していると考えられた。

2. 細胞溶解試薬による夾雑物に混入した試料からのウイルスDNAの抽出

人工飼料で飼育した残沙を含めた蚕体を磨砕後、

第3表 飼育残沙に混入した多角体の検出
a. DNA精製; GeneReleaser™

多角体 ^{a)} 濃度	希 釈 倍 数 ^{b)}				
	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
10^6	-	++	±	(±)	-
10^5	-	+	±	-	-
10^4	-	±	-	-	-
10^3	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-

a) 残沙1g当り個数、b) アルカリ処理試料を蒸留水で希釈、試料-GeneReleaser™-PCR反応液総量; 5-40-70 μl 。

b. DNA精製; 酢酸カリウム法

多角体 ^{a)} 濃度	希 釈 倍 数 ^{b)}					
	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
10^6	-	++	++	+	±	-
10^5	-	++	+	(±)	-	-
10^4	-	++	+	-	-	-
10^3	-	(±)	(±)	-	-	-
10^2	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-

a) 残沙1g当り個数、b) 抽出DNAを蒸留水で希釈
++~(±): 第1表に同じ。

アルカリ液を加えて多角体を溶解し、 -80°C で保存した試料を供試した結果は以下のとおりである。

試料を1から80倍まで希釈してPCR用のマイクロチューブに採り、これに20または $40\mu\text{l}$ のGeneReleaser™を重層して、所定の変温処理を終了後、PCR反応液を重層してそのままPCRを行った。結果は第2表に示したように、20倍希釈した試料 $5\mu\text{l}$ にGeneReleaser™を $40\mu\text{l}$ 、総量 $100\mu\text{l}$ でPCRを行った場合に最も明瞭なバンドが観察された。

同様に、人工飼料育残沙に多角体を混入し、アルカリ処理した試料を蒸留水で希釈して $5\mu\text{l}$ 採り、これにGeneReleaser™を $40\mu\text{l}$ 重層して、総量 $70\mu\text{l}$ でPCRを行った。これと酢酸カリウム処理とエタノール沈澱処理を2回行って得たDNAを鋳型にした結果とを比較した。第3表に示したようにGeneReleaser™による抽出法では、感度が1/100近く低下した。

次に、20,000頭の蚕に核多角体病蚕を1頭混入し、酢酸カリウム処理とエタノール沈澱処理を1回行った簡易抽出DNAを希釈して鋳型DNAとし、GeneReleaser™の量とPCR反応液の総量を変えて比較を行った。試料に含まれる夾雑物やDNA量に対するGeneReleaser™の必要量の比率によって増幅DNAの量が左右されると考えられるが、第4表に示したように、簡易精製したDNAを鋳型にすれば、希釈無しでPCR産物が効率よく得られた。反応液の総量については泳動に使用するのに十分な量が得られれば良いと判断された。しかし、この方法ではGeneReleaser™のコストがかかることと、抽出操作が煩雑になることから適用場面は限られると考えられる。

第4表 GeneReleaser™及びPCR反応液の総量とPCR産物の比較

処 理 量 ^{a)}	DNAの希釈倍数(倍)			
	1	5	10	50
1-10-30	++	+	±	-
5-10-30	++	+	+	±
5-20-40	++	+	+	±
5-30-60	++	++	+	±
5-40-70	++	++	++	±
5-40-100	++	++	++	±

a) : 鋳型DNA-GeneReleaser™-PCR反応液総量、鋳型DNAは簡易精製。
++~(±): 第1表に同じ。

PCR法を実用的な検出法にするためには、夾雑物の多い大量の試料からウイルスDNAを抽出する場合に、PCRを阻害する物質を除去し、簡易にDNAを抽出できる方法としなければならない。すでに、酢酸カリウム処理とエタノール沈澱処理及びその過程での塩酸処理を組み合わせ、簡易にDNA抽出ができることを報告している(野口ら, 1995)。今回は、GeneReleaser™を集団的な検査におけるDNA抽出に利用する方法を検討したが、有効な結果を得ることができなかった。一方、体液から検出する方法としては非常に有効で、また感染2日目から検出可能であった。この方法によれば、農家における遅眠蚕の体液を1滴採取すれば殺さずに早期診断ができ、遅蚕の廃棄等による伝染防止対策が可能である。GeneReleaser™によりDNAを抽出する方法は、非常に簡易で試料の汚染が起きにくいという利点があるので、利用法についてはさらに検討を行う必要がある。

摘 要

PCR法による高感度な核多角体病ウイルスの検出法を検討しているが、試料からのDNA抽出法の簡易化を行うため、市販の細胞溶解試薬(Gene-Releaser™:フナコシ)の利用法を検討した。病蚕体液では、同試薬を重層し、所定の変温処理後PCR反応液を重層してPCRを行うという簡易な操作で、ウイルスDNAを高感度で検出できた。しかし、夾雑物を多く含む試料では、感度が低下するため有効な結果が得られなかった。

文 献

- IATROU,K., ITO,K. and WITKIEWICZ,H.(1985): Polyhedrin gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, J. Virol., 54, 436-445.
- 井上元・鮎沢千尋(1971): 蛍光抗体法による家蚕ウイルス性軟化病の診断に関する研究, 蚕試報, 25, 21-40.
- 野口洋子・小林公幸(1990): 上簇以降における病蚕の発生実態調査. (1)蚕病発生の実態調査と蚕品種による発生量の比較. 埼玉蚕試研報, 63, 31-35.
- 野口洋子・小林公幸(1990): 上簇以降における病蚕の発生実態調査. (1)蚕病発生の実態調査と蚕品種による発生量の比較. 埼玉蚕試研報, 63, 31-35.
- 野口洋子・小林正彦・嶋田透(1994): ポリメラーゼ連鎖反応による飼育残沙を含めた大量試料からの核多角体病蚕の検出, 日蚕雑, 63, 399-406.
- 野口洋子・小林正彦・嶋田透(1995): ポリメラーゼ連鎖反応によるカイコ核多角体病ウイルスの検出技術の簡易化, 日蚕雑, 64,
- 関島安隆・河野威雄・小野恵子(1974): 電気浸透法(Electrosyneresis)によるウイルス性軟化病の診断に関する研究, 埼玉蚕試研報, 46,64-73.
- 清水進(1982): カイコ軟化病ウイルスの enzyme-linked immunosorbent assay による検出, 日蚕雑, 51,370-373.