

## アニサキス亜科線虫の鑑別診断における Multiplex-PCR法の検討

梅原 梓里<sup>1</sup>, 川上 泰<sup>1</sup>, 荒木 潤<sup>2</sup>, 内田 明彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>麻布大学・医動物, <sup>2</sup>(財)目黒寄生虫館

### 1. はじめに

アニサキス亜科線虫(以下アニサキス)は海洋性の寄生線虫であり, 幼虫は多種の魚介類に寄生する。ヒトがこれらの海産魚やイカを生食すると, 幼虫は生きたまま摂取され, アニサキス症の病原となる。魚介類を生食する習慣を持つ日本ではアニサキス症の発生は非常に多く, 年間2000-3000例になると見られている。また, 最近では食品衛生法施行規則の一部改正に伴い, アニサキスも食中毒原因物質として例示されるようになり, アニサキスによる食中毒が疑われた場合は, 保健所への届け出が必要となった。そのため, 患者から摘出した虫体の迅速な同定が必要である。

近年, アニサキス症の原因虫として最も一般的な種である *Anisakis simplex* は, *A. simplex sensu stricto*, *A. pegreffii* および *A. simplex* C の同胞種3種に分離された。そのため, 本種は *A. simplex complex* (複合種) として種を見直す考えが広まってきている。このうち, 日本近海においては *A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* が分布しており, 同種に形態学的な差異はないため, アイソザイム法またはPCR-RFLP法によって鑑別されている。

今回演者らは, アニサキス属線虫の *A. simplex complex* (*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii*) と *A. physeteris* のほか, 3種の近縁線虫 *Contracaecum osculatum*, *Hysterothylacium aduncum* および *Pseudoterranova decipiens* の迅速な鑑別を目的とし, Multiplex-PCR法の適用を試みた。

### 2. 材料と方法

<実験1: 塩基配列の決定> 18s-28s rRNA 遺伝子の塩基配列を決定するため, *A. simplex* s. str., *A. pegreffii*, *A. physeteris*, *C. osculatum*, *H. aduncum* および *P. decipiens* のゲノムDNAを鋳型に universal primer を用いてPCRを行った。PCR産物の塩基配列は, 産物をpGEM-T EASY vector (Promega) にT/Aクローニングし, Big Dye terminator cycle sequencing kit (ABI) を用いて決定した。

<実験2: Multiplex PCR法の検討> *A. simplex complex* (*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii*), *A. physeteris*, *C. osculatum*, *H. aduncum* および *P. decipiens* については, 塩基配列の配列比較から, 各種に特異的な塩基配列部分にハイブリダイズする primer を設計した。また同胞種である *A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* の鑑別には, 両種間でSNP(1塩基多型)が検出されたことから, SNP部位付近に人為的に塩基置換を導入した2種類のSNP判別マーカー(AP1とAP2)を設計し, 検討した。Multiplex-PCR法で用いる primer の塩基配列, 増幅産物のサイズ, 特異性をまとめてTable 1に表示した。まず, 1検体について各々に特異的なForward primer とユニバーサルなReverse primer を加えたPCR mixture を調整し, 従来のPCR法により設計した primer の特異性を確認した。その後, Multiplex PCR法では, 6種のForward primer と1種のReverse primer をPCR mixture に加え, multiplex PCRの条件を検討した。

Table 1 Sources of primer pairs examined in the present study

	Sequences of each primer	Product size(bp)	specificity
AP-1	GAG CAG CAG CTT AAG GCA GAG GC (Forward)	650	<i>A. pegreffii</i>
AP-2	GAG CAG CAG CTT AAG GCA GAT GC (Forward)	650	<i>A. pegreffii</i>
AniF	GAC ATT GTT ATT TCA TTG TAT GTG TTG AAA ATG (Forward)	590	<i>A. simplex</i> s. str. <i>A. pegreffii</i>
PhyF	GGC TGG TTG ATG AAC TGT TG (Forward)	130	<i>A. physeteris</i>
ConF	TGA TAT GCT TGA AAG GCA GG (Forward)	780	<i>C. osculatum</i>
HysF	GCC TTC CAT ATG CGC GTA TA (Forward)	970	<i>H. aduncum</i>
PsF	CGA GTA CTT TTT ATG GTC GTG AAG T (Forward)	350	<i>P. decipiens</i>
Primer B	GCC GGA TCC GAA TCC TGG TTA GTT TCT TTT CCT (Reverse)		

### 3. 結果及び考察

PCRを行った結果、約1.4 kbpのPCR産物が得られた。これらの塩基配列を決定し、各種間で比較した結果、スペーサー領域の配列に種特異性が見いだされたため、その配列に基づいて primer を設計した。一方、同胞種である *A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* では、1395 塩基中で2箇所の塩基置換を検出したが、1393 塩基は同一の配列であった。そこで、これら SNP を判別する Forward primer を検討した結果、同胞種の鑑別には3'末端から2塩基隣まで塩基置換を導入した AP2 primer を用いた際に良好な結果が得られた。

各種は、従来のPCR法と Multiplex PCR 法において、それぞれ期待されるサイズの増幅産物が得られた。同胞種の鑑別のために設計した AP2 primer は、*A. pegreffii* のみに特異的に反応し、*A. pegreffii* では590 bp と650 bp に増幅産物が認められたが、*A. simplex* s. str. では590 bp のバンドのみ検出された。また、*A. physeteris* では130 bp、*C. osculatum* では780 bp、*H. aduncum* では970 bp、*P. decipiens* では350 bp で増幅産物が確認された (Fig. 1)。PCR 法によるアニサキス亜科線虫の鑑別診断法はこれまでいくつか報告されているが、その中でPCR-RFLP法は

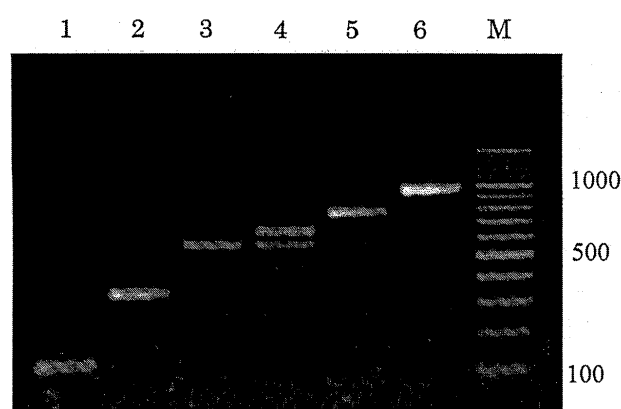


Fig. 1 Multiplex PCR analysis of nematodes of the subfamily Anisakinae. Multiplex PCR was performed with the six genetic markers. Samples of genomic DNA from *A. physeteris* (lane 1), *P. decipiens* (lane 2), *A. simplex* s. str. (lane 3), *A. pegreffii* (lane 4), *C. osculatum* (lane 5) and *H. aduncum* (lane 6).

PCR産物を制限酵素で切断し、その電気泳動パターンで鑑別するために、複数の操作を行わねばならない。一方、今回適用した Multiplex PCR 法では、6種の Forward primer とユニバーサルな Reverse primer を用いてPCRを行なうことで、鑑別が可能である。以上の点から、アニサキス亜科線虫を迅速に鑑別するための方法として、Multiplex-PCR法は有用であると考えられた。