

6

線虫類の長期保管に向けた固定・保存液の検討 (3か月、6か月、1年保管の結果)

石黒 健太郎

1. はじめに

本研究は、昨年度の石黒（2021）に引き続き「線虫類の長期保管に向けた固定・保存液の検討」を継続に行った。昨年度の研究では、70%エタノール、5%中性ホルマリン、5% DESS 保存液（Melissa *et al.*, 2006）に線虫類を浸漬し、常温（20℃）と冷蔵（4℃）の暗所で1日および1か月保管した試料について分析・解析結果を報告した。本稿では、その後3か月、6か月、1年保管した試料の結果が得られたので報告する。

2. 試料と方法

試料は昨年度採集し、各条件下で保管していた個体からDNAを抽出した。抽出したDNAを用いて、PCRにより核DNAの18SrRNA領域の一部を増幅した。得られたDNA産物は2%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った後、UVを照射して増幅の有無（バンドの有無）を確認した。固定・保存液による形態への影響も昨年度同様に、実体顕微鏡下で確認した。

3. 結果

3.1 形態の保存性について

70%エタノールに浸漬した試料は、保存期間および環境条件に限らず形態が収縮し観察が困難であった。5%ホルマリンに浸漬した試料は、形態の変化はみられなかった。また、5% DESS 保存液に浸漬した試料は、体表面に結晶が発生し分析時には十分な洗浄が必要であった（表1、2）。

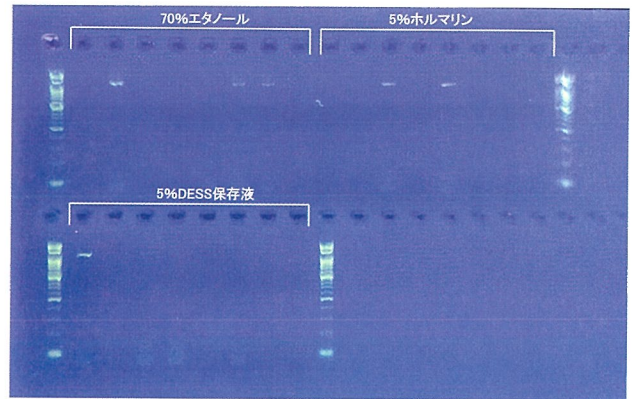


図1 3か月常温保管した試料のDNA増幅結果

70%エタノールの左から5列目、5% DESS 保存液の左から3、4、6列目について、画像では薄いバンドであったが、肉眼で視認可能であった。

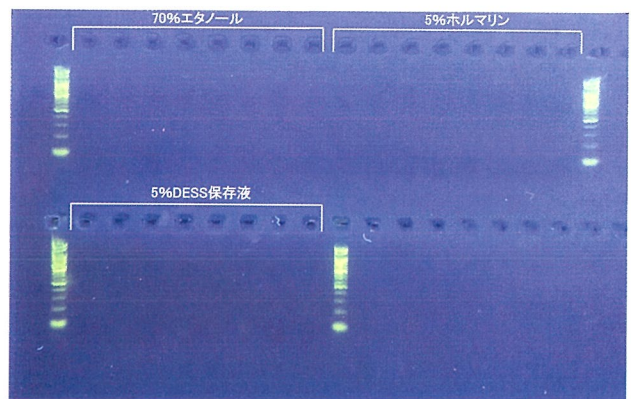


図2 6か月常温保管した試料のDNA増幅結果

70%エタノールの左から4、7列目、5%ホルマリンの左から3、6列目、5% DESS 保存液の左から2、4、6列目について、画像では薄いバンドであったが、肉眼で視認可能であった。

表1 DNA増幅結果（常温）

	3か月間常温保管後増幅数	6か月間常温保管後増幅数	1年間常温保管後増幅数	備考
70%エタノール	4/8	2/8	2/8	形態が収縮し観察が困難
5%中性ホルマリン	2/8	2/8	0/8	形態変化はみられなかった
5%DESS	3/8	3/8	1/8	結晶化が進み分析時に十分な洗浄が必要

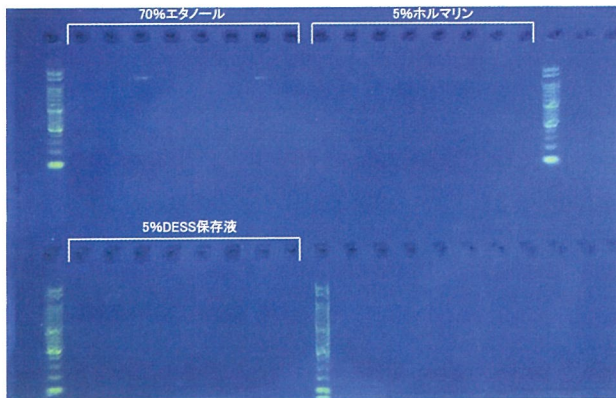


図3 1年常温保管した試料のDNA増幅結果

75% DESS 保存液の左から2列目について、画像では薄いバンドであったが、肉眼で視認可能であった。

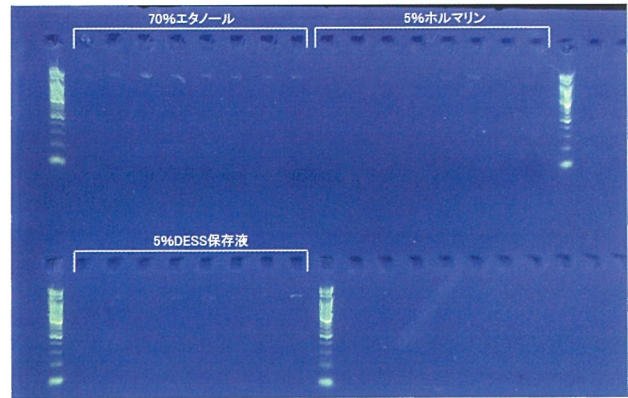


図4 3か月冷蔵保管した試料のDNA増幅結果

5%ホルマリンの左から2、3、4、7列目、5%DESS保存液の左から2、3、7列目について、画像では薄いバンドであったが、肉眼で視認可能であった。

3.2 DNAの保存性について

常温で3か月保管した全試料のDNA増幅数は、常温で1か月保管した結果に比べ半数ほどに減少した。その後も徐々に減少し、1年保管した70%エタノールでは8検体中2検体、5%DESS保存液では8検体中1検体の増幅が認められた。そして、5%中性ホルマリンでは増幅が認められなかった(図1、2、3;表1)。

冷蔵で3か月保管した全試料のDNA増幅数は、冷蔵で1か月保管した結果と明確な差が見られなかった。その後は徐々に減少し、1年保管した70%エタノールでは8検体中4検体、5%中性ホルマリンでは8検体中2検体、5%DESS保存液では8検体中3検体の増幅が認められた(図4、5、6;表2)。

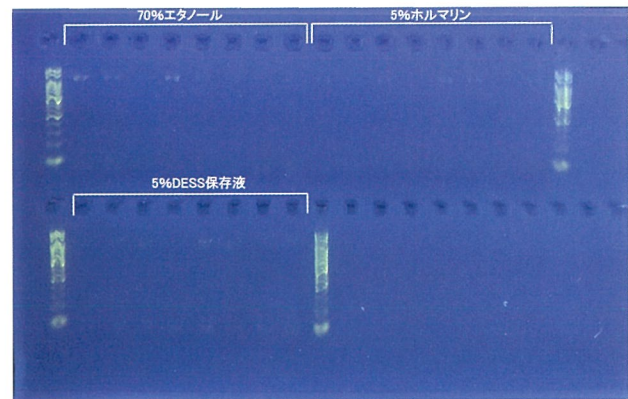


図5 6か月冷蔵保管した試料のDNA増幅結果

5%DESS保存液の左から1、2、3、6、8列目について、画像では薄いバンドであったが、肉眼で視認可能であった。

表2 DNA増幅結果(冷蔵)

	3か月間冷蔵保管後増幅数	6か月間冷蔵保管後増幅数	1年間冷蔵保管後増幅数	備考
70%エタノール	8/8	7/8	4/8	形態が収縮し観察が困難
5%中性ホルマリン	6/8	6/8	2/8	形態変化はみられなかった
5%DESS	7/8	6/8	3/8	結晶化が進み分析時に十分な洗浄が必要

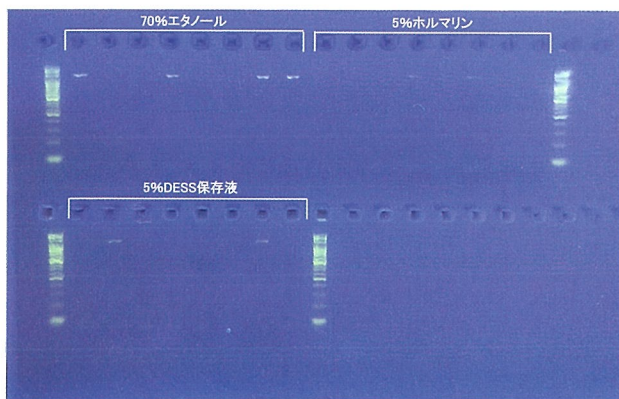


図6 1年間冷蔵保管した試料のDNA増幅結果

4. 考察

本実験の結果から、線虫類のDNA保存環境は冷蔵が適していた。また、常温・冷蔵で1年保管した試料からは、常温保管したホルマリン試料以外からDNAの増幅が認められた。しかし、DNA増幅数は、試料の劣化や固定・保存液の作用により実験開始時の半数ほどに減少したと考えられる。

3種類の固定・保存液中、最も多くDNAが増幅された試料は70%エタノールで固定した試料であった。しかし、昨年度も述べたようにエタノールは個体を脱水させるため、形態観察が困難であった。そのため、形態およびDNA両方の保存にむけ、エタノール濃度の検討が必要であると推察された。

次に多くのDNAが増幅された試料は5%DESS保存液で固定した試料であった。DESS保存液は形態およびDNAを併せて保存することが可能であり、海外などでのエタノールやホルマリンの使用制限がある調査では有効である。しかし、DESSに含まれる塩化ナトリウムが試料に付着するため、保管期間が長くなるにつれ形態観察およびDNA分析が困難になると考えられる。そのため、観察や分析前に十分な洗浄が必要となる。

最もDNAが増幅されなかった試料は5%中性ホルマリンで固定した試料であった。ホルマリンは形態の保持には優れているが、DNAを断片化させるためDNAの保存液には適さないと考えられている(水久保・二井, 2014)。しかし、本実験の結果から冷蔵であれば6か月は断片化が抑えられ、ホルマリン固定試料でもDNA分析が可能であると考えられた。また、ホルマリン固定した他の生物からDNAを抽出した例として、ラットの肝組織(菊池ら, 2005)や珪藻(Shiozaki

et al., 2021) 等が報告されている。

その他の固定・保存液として、Sano *et al.*, (2020) によると、10%中性ルゴール液で固定したカイアシ類からDNAを抽出し、明確な増幅が確認できたと報告されている。ルゴール液は試料を茶褐色に染色してしまうが、チオ硫酸ナトリウムを使用することである程度の脱色が可能であることから形態観察も容易になる。ただし、チオ硫酸ナトリウムがDNA分析試料にどのような作用をするのか検討が必要であるが、今後エタノールやホルマリンに成り代わる固定・保存液として有効であると考えられる。

なお、本実験では、エタノール、ホルマリン、DESSのみを対象に実験を行ったが、今後、より長期保存可能な固定・保存液や、海外への持ち込みが規制されない固定・保存液を検討したいと考えている。

参考文献

- 石黒健太郎. 2021. 線虫類の長期保管に向けた固定・保存液の検討. 株式会社日本海洋生物研究所 2021年報, 15-18.
- 菊池 真・館延 忠・小塚直樹・二宮孝文・小林正裕・堀本佳誉・内田 英二・佐々木公男・辰巳治之・武田秀勝. 2005. ホルマリン固定組織からのDNA抽出法とPCR法による遺伝子解析. 札幌医学雑誌, 74:39-44.
- Melissa, Y., Irma, T. D. L., Ian, W. K., Manuel, M. O., Jenna, M., Mark, B., Larisa, P. and Paul, D. L. 2006. DESS: A versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology*, 8: 367-376.
- 水久保隆之・二井一禎. 2014. 線虫学実験. 京都大学学術出版会, 324pp.
- Sano, M., Makabe, R., Kurosawa, N., Moteki, M. and Odate, T. 2020. Effects of Lugol's iodine on long-term preservation of marine plankton samples for molecular and stable carbon and nitrogen isotope analyses. *Limnology and Oceanography: Method*, 18: 635-643.
- Shiozaki, T., Itoh, F., Hirose, Y., Onodera, J., Kuwata, A. and Harada, N. 2021. A DNA metabarcoding approach for recovering plankton communities from archived samples fixed in formalin. *PLOS ONE*, 16(2): e0245936.