

クロマグロ住血吸虫の検出に用いる LAMP 法の開発

堅田昌英

和歌山県水産試験場

Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification Methods for Detection of the Blood Flukes in Pacific Bluefin Tuna *Thunnus orientalis* (Temminck and Schlegel)

Masahide Katata

Wakayama Prefectural Fishery Experiment Station

緒 言

クロマグロ *Thunnus orientalis* (Temminck and Schlegel) の住血吸虫症は、2000 年以降から大きな問題となっており、大量死を引き起こすことから、クロマグロ養殖において警戒すべき重要な疾病となっている (白樫・小川 2016)。

クロマグロに寄生する住血吸虫は、これまでに *Cardicola forsteri* Cribb, Daintith and Munday, *C. opisthorchis* Ogawa, Ishimaru, Shirakashi, Takami and Grabner および *C. orientalis* Ogawa, Tanaka, Sugihara and Takami の 3 種が確認されている (Ogawa *et al.* 2010, 2011, Shirakashi *et al.* 2016)。本疾病に罹患すると、鰓弁内に多数の虫卵が蓄積し、毛細血管が閉塞されるため、血行障害を起こして酸欠になり、死亡する (白樫・小川 2016)。

本疾病の診断は、虫体観察が困難であるため、鰓弁内の虫卵を検鏡観察して行う (白樫・小川 2016)。種同定には遺伝子解析を用いるが、*C. opisthorchis* および *C. orientalis* に対しては PCR 法が開発されており、虫卵や虫体が確認される前の早期診断が可能である (Sugihara *et al.* 2015)。しかし、検査結果が出るまでに 6 時間程度必要であり、サンプリングした当日に養殖業者へ診断結果を伝えられないのが現状である。

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は、PCR 法と同じく、特異的な DNA 領域を増幅する高感度な手法であるが、増幅効率が高く、短時間で増幅可能であることから (Notomi *et al.* 2000)、PCR 法よりも早く結果が出るため、魚病の迅速診断に応用可能である。

そこで、本研究では、既に PCR 法による検出法が開発されている *C. opisthorchis* および *C. orientalis* について、より迅速で簡便かつ高感度な検出系を確立することを目的に、LAMP 法による検出系の反応条件等について検討を行った。

材料および方法

供試サンプル Sugihara *et al.* (2015) の PCR 法によって *C. opisthorchis* および *C. orientalis* に感染していることを確認したクロマグロ 0 歳魚 1 尾 (和歌山県内の養殖漁場からサンプリング) の鰓か

ら, QIAamp DNA Stool Mini Kit (株式会社キアゲン) を用いて, 添付されている説明書に従って DNA 抽出を行い, LAMP 法に供した. また, *C. opisthorchis* および *C. orientalis* に感染していないクロマグロ 0 歳魚 1 尾 (和歌山県内の養殖漁場からサンプリング) の鰓からも同様に DNA 抽出を行い, 陰性コントロールとした. また, LAMP 法の反応特異性の検討には, 第 4 表に示す各種病原体等の抽出 DNA を用いた. なお, これらも上述した同様の方法で DNA 抽出を行った.

LAMP 法プライマーの設計 LAMP 法のプライマーは, PCR 法 (Sugihara *et al.* 2015) により増幅される領域 (リボゾーマル DNA (rDNA) の internal transcribed spacer 2 (ITS2) 領域 *C. opisthorchis*: GenBank アクセションナンバーHQ324228 増幅サイズ: 285bp, *C. orientalis*: GenBank アクセションナンバーHQ324226 増幅サイズ: 290bp) を標的配列として設計した. また, *C. opisthorchis* および *C. orientalis* それぞれの ITS2 領域の塩基配列について, ClustalW Version 2.1 (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>) を用いてアライメント解析を行い, 標的とした配列が種特異的であることを確認した上で設計した. 更に, クロマグロ同一個体に上記 2 種の原因虫とともにしばしば混合寄生する (Shirakashi *et al.* 2016) *C. forsteri* の ITS2 領域の塩基配列とも同様にアライメント解析による比較を行い, 標的配列が種特異的であることを確認した. LAMP 法による増幅反応を円滑に行うために, LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer V5 (<https://primerexplorer.jp/lampv5/index.html>) を用いて, 各原因虫につき 4 種類ずつのプライマーを設計した (第 1 表).

第 1 表 クロマグロ住血吸虫検出のための LAMP 法プライマー塩基配列

原因虫	プライマー名	塩基配列
<i>C. opisthorchis</i>	OP-F3	TGCATAATATGGAAGTAGTCAAG
	OP-B3	CGACAAACCACATGGAGTA
	OP-FIP	TACACAATTGCAACATGATTGCGACCAGTGTTAATTAATAATGTGGCTC
	OP-BIP	GTGCTCAGGTCGTGGCTTAGAATTGCAGTCGCAACTTG
<i>C. orientalis</i>	OR-F3	TTGTGTATGTGTGTTTTGCA
	OR-B3	AGCATTTAAACCGAATTACAGTA
	OR-FIP	GGTCACATTAGGAAAGAGCCACACGTAGCATGGAATTAGTTGA
	OR-BIP	GAGTGAATTGTGGTAGCGGACCTCAGGCATGATCAAC

LAMP 法の実施 Loopamp® DNA 増幅試薬キット (栄研化学株式会社) に添付されている説明書に従って, 2×Reaction Mix (RM), 今回設計したプライマー, 鎖置換型 DNA 合成酵素 (*Bst* DNA ポリメラーゼ), Loopamp® 蛍光・目視検出試薬 (栄研化学株式会社) およびキット添付の蒸留水を混合し, マスターミックスを作製した. 0.2 ml の Loopamp® 反応チューブ (栄研化学株式会社) を用い, 23 μ l のマスターミックスと抽出 DNA 溶液 2 μ l を入れ, 1 サンプルあたりの最終液量を 25 μ l とした. LAMP 反応は, ブロックインキュベーター BI-516H (株式会社アステック) で行い, 所定時間

経過後、ウォーターバス BM400（ヤマト科学株式会社）で 95℃・2 分間のインキュベートをすることで酵素を失活させ、反応を停止させた。反応終了後、ハンディー紫外線ランプ LUV-6（アズワン株式会社）を用いて、反応チューブ底面より紫外線（波長 365 nm）を照射し、反応チューブ側面より目視で観察して、蛍光の有無を確認した。緑色の蛍光を発すれば陽性、陰性コントロールと同様に蛍光を発しなければ陰性と判定した。

反応条件等の検討 LAMP 法の最適な反応条件を把握するため、反応温度は 56℃から 68℃まで 2℃ずつ変えて検証した。また、反応時間は 10 分から 60 分間まで 10 分間ずつ変えて検討した。

LAMP 法の最適な反応温度および反応時間を把握した後、反応特異性を検証するため、第 4 表に示す各種病原体等の抽出 DNA を LAMP 法に供して、増幅の有無を調べた。また、*C. opisthorchis* および *C. orientalis* について、それぞれ同一の抽出 DNA 溶液を 10⁻⁶ まで 10 倍段階希釈して LAMP 法と PCR 法（Sugihara *et al.* 2015）に供し、検出感度を比較した。

結果および考察

LAMP 法の反応温度および反応時間 LAMP 法の反応温度の検討結果を第 2 表に、反応時間の検討結果を第 3 表に示す。最適な反応温度を検討するために、反応時間を 60 分間に固定して検証した結果、*C. opisthorchis* では 60～66℃、*C. orientalis* では 60～64℃において陽性反応が認められた。反応温度が高過ぎても、低過ぎても陰性であったことから、各原因虫とも、陽性反応が認められた温度帯の中間域に相当する 62℃が反応温度として最適であると考えられた。

次に、最適な反応時間を検討するために、反応温度を 62℃に固定して実験した結果、*C. opisthorchis* および *C. orientalis* とともに 50～60 分間の反応で陽性を示した。50 分間の反応でも陽性であったが、反応時間が短くなると陰性になり、50 分間は陽性の下限時間であることから、より正確を期すために、60 分間の反応時間が最適であると考えられた。

以上の結果から、*C. opisthorchis* および *C. orientalis* とともに、62℃で 60 分間の反応を行えば LAMP 法で確実に検出できることが示された。

第 2 表 LAMP 法の反応温度の検討
(反応時間：60 分間)

反応温度	<i>C. opisthorchis</i>	<i>C. orientalis</i>
56℃	—	—
58℃	—	—
60℃	+	+
62℃	+	+
64℃	+	+
66℃	+	—
68℃	—	—

第 3 表 LAMP 法の反応時間の検討
(反応温度：62℃)

反応時間	<i>C. opisthorchis</i>	<i>C. orientalis</i>
10 分	—	—
20 分	—	—
30 分	—	—
40 分	—	—
50 分	+	+
60 分	+	+

LAMP法の反応特異性 LAMP法の反応特異性の検討結果を第4表に示す。上述した結果を受けて、検討は62℃・60分間の反応条件で行った。*C. opisthorchis* および *C. orientalis* とともに、他の病原体等のDNAに対して交差反応を示さなかった。また、*C. opisthorchis*, *C. orientalis* および *C. forsteri* の間でも交差反応は認められなかった。つまり、本研究で構築したLAMP法は、対象とする原因虫以外のDNAでは陽性反応は見られず、反応特異性が高いことが示された。

第4表 LAMP法の反応特異性の検討(62℃・60分間)

病原体等	<i>C. opisthorchis</i>	<i>C. orientalis</i>
<i>Cardicola opisthorchis</i>	+	-
<i>Cardicola orientalis</i>	-	+
<i>Cardicola forsteri</i>	-	-
<i>Enteromyxum leei</i>	-	-
<i>Enteromyxum fugu</i>	-	-
<i>Sphaerospora fugu</i>	-	-
<i>Kudoa septempunctata</i>	-	-
<i>Kudoa thyrsites</i>	-	-
<i>Kudoa lateolabracis</i>	-	-
<i>Xenohaliotis californiensis</i>	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-
<i>Vibrio anguillarum</i>	-	-
RSIV	-	-
KHV	-	-

LAMP法とPCR法の検出感度比較 LAMP法とPCR法(Sugihara *et al.* 2015)の検出感度比較の結果を第5表および第6表に示す。反応特異性の検討と同様に、LAMP法の反応条件は62℃・60分間とした。*C. opisthorchis* および *C. orientalis* とともにLAMP法の方がPCR法よりも検出感度が高く、両種ともにPCR法の100倍の検出感度を示した。粘液胞子虫性やせ病原因虫を検出するためのLAMP法では、検出感度がPCR法の100~1,000倍であったことが報告されているが(堅田・奥山 2017)、本研究においても、LAMP法がPCR法よりも高感度な検出系であることが示された。

以上の結果から、本研究で確立した*C. opisthorchis* および *C. orientalis* のLAMP法による検出系は、反応特異性および検出感度ともに問題なく、本疾病の迅速な検出・診断法として実用可能であると考えられた。

第 5 表 LAMP 法 (62°C・60 分間) と PCR 法の感度比較 : *C. opisthorchis* 検出

希釈倍率	LAMP 法	PCR 法
10 ⁰	+	+
10 ⁻¹	+	+
10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	+
10 ⁻⁴	+	-
10 ⁻⁵	+	-
10 ⁻⁶	-	-

第 6 表 LAMP 法 (62°C・60 分間) と PCR 法の感度比較 : *C. orientalis* 検出

希釈倍率	LAMP 法	PCR 法
10 ⁰	+	+
10 ⁻¹	+	+
10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	-
10 ⁻⁴	+	-
10 ⁻⁵	-	-
10 ⁻⁶	-	-

LAMP 法は、PCR 法よりも増幅反応を阻害する夾雑物の影響を受けにくいことが分かっている (吉野ら 2006)。また、コイヘルペスウイルスを検出するための LAMP 法では、簡易抽出法で得られた粗精製 DNA 溶液や、コイ *Cyprinus carpio* Linnaeus 組織から抽出した夾雑物を多く含む粗精製 DNA 溶液を鋳型としても問題なく増幅反応が確認されたことが報告されている (吉野ら 2006)。本研究では、DNA 抽出キットを用いて精製された DNA 溶液を反応に供したが、DNA の簡易抽出法を取り入れることで、サンプルの DNA 抽出から結果判定に至るまでの時間をより短縮することができると考えられる。

本疾病の対策として、現在、日本のクロマグロ養殖漁場では、寄生が多い 0~1 歳魚にプラジクアンテル製剤を経口投与することが行われており、死亡被害が大幅に減少している (白樫・小川 2016)。本薬は既に *C. opisthorchis* に対する水産用医薬品 (駆虫薬) として承認されている (農林水産省 2017)。しかし、本薬は魚体内で速やかに代謝されるため、寄生を予防する効果は低く、寄生が起きている時期には定期的な投薬が必要となる (白樫・小川 2016)。クロマグロ稚魚の試験では、駆虫後 4 週間目に新たな虫体が見られ始めたことが報告されている (Shirakashi *et al.* 2012)。本疾病の最も効果的な対処法は、成虫が産卵を始める前、もしくは鰓弁に虫卵が蓄積する以前のわずかに虫卵が認められた時点で即、駆虫することである (白樫・小川 2016)。そのためには寄生を早期に発見し、迅速に対応することが求められるが、鰓弁内の虫卵を検鏡観察する従来からの検査方法だけでは微量の虫卵を見逃してしまう恐れがあり、早期発見という観点からは自ずと限界が出てくる。そこで、高感度な分子生物学的検査手法が重要性を帯びてくるが、本研究で確立した LAMP 法は、PCR 法よりも迅速かつ簡便で、高感度な検出を可能とすることから、本疾病を早期に発見し、速やかに駆虫するという現場での対応において、有力な検査ツールになり得ると考えられる。

本研究で構築した LAMP 法をはじめ、高感度な検出系は、微量な病原体を検出することができるため、養殖漁場への種苗導入前の健康診断には適切な手法である。しかし、魚病検査 (魚病診断) の場合、検出された病原体が、検査対象としている魚介類の主たる死因となっているかどうかを十分に検証しなければならない。そのためには定量解析が必要になってくるが、伝染性皮下造血器壊死症ウイルス (IHNV) の LAMP 法による検出系において、リアルタイム濁度測定装置を用いて LAMP

反応をモニタリングすることによって、定量解析が可能であることが報告されている (Sudhakaran *et al.* 2008). 本研究で確立した LAMP 法は定性的なものであるが、今後は魚病診断への応用を視野に入れて、本疾病の原因虫が定量的に検出できる LAMP 法の検出系を確立していくことが課題である。

摘 要

本研究では、クロマグロ住血吸虫 *C. opisthorchis* および *C. orientalis* を検出するための LAMP 法を開発した。LAMP 法のプライマーは、既に確立されている PCR 法と同様に、リボゾーマル DNA (rDNA) の internal transcribed spacer 2 (ITS2) 領域を標的として設計した。LAMP 法の最適な反応時間および反応温度を検討した結果、各原因虫ともに 62°C で 60 分間の反応を行うことで、確実に検出できることが示された。また、他の病原体等から抽出した DNA との交差反応は見られず、反応特異性が認められた。更に、当該 LAMP 法は、上述した PCR 法の 100 倍の検出感度を示した。本研究で確立した *C. opisthorchis* および *C. orientalis* の LAMP 法による検出系は、反応特異性および検出感度ともに問題なく、本疾病の検出・早期診断法として実用可能であると考えられた。

本研究を進めるにあたり、サンプリングにご協力いただきました養殖現場の方々に感謝申し上げます。

引用文献

- 堅田昌英・奥山芳生. 2017. 粘液胞子虫性やせ病原因虫の検出に用いる LAMP 法の開発. 魚病研究. 52:104-107.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28:e63.
- 農林水産省. 2017. 水産用医薬品の使用について. 30:11.
- Ogawa, K., K. Ishimaru, S. Shirakashi, I. Takami and D. Grabner. 2011. *Cardicola opisthorchis* n. sp. (Trematoda: Aporocotylidae) from the Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel, 1844), cultured in Japan. *Parasitol. Int.* 60:307-312.
- Ogawa, K., S. Tanaka, Y. Sugihara and I. Takami. 2010. A new blood fluke of the genus *Cardicola* (Trematoda: Sanguinicolidae) from Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel, 1844) cultured in Japan. *Parasitol. Int.* 59:44-48.
- Shirakashi, S., M. Andrews, Y. Kishimoto, K. Ishimaru, T. Okada, Y. Sawada and K. Ogawa. 2012. Oral treatment of praziquantel as an effective control measure against blood fluke infection in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture.* 326:15-19.
- 白樫 正・小川和夫. 2016. 海産養殖魚の住血吸虫症. 魚病研究. 51:92-98.
- Shirakashi, S., K. Tani, K. Ishimaru, S.P. Shin, T. Honryo, H. Uchida and K. Ogawa. 2016. Discovery of intermediate hosts for two species of blood flukes *Cardicola orientalis* and *Cardicola forsteri* (Trematoda: Aporocotylidae) infecting Pacific bluefin tuna in Japan. *Parasitol. Int.* 65:128-136.
- Sudhakaran, R., T. Mekata, T. Kono, K. Supamattaya, N. T. H. Linh, M. Sakai and T. Itami. 2008. Rapid detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic

necrosis virus in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* using real-time loop-mediated isothermal amplification. *Fish Pathol.* 43:170-173.

Sugihara, Y., T. Yamada, K. Ogawa, F. Yokoyama, K. Matsukura and K. Kanai. 2015. Occurrence of the bluefin tuna blood fluke *Cardicola opisthorchis* in the intermediate host *Terebella* sp. *Fish Pathol.* 50:105-111.

吉野 学・渡 一・小島 禎・池戸正成. 2006. LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法によるコイヘルペスウイルスの高感度迅速検出. 魚病研究. 41:19-27.