

イセエビ微胞子虫の検出に用いる 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
Ameson iseebi Itoh, Kuboyama, Freeman, Katata, Yamakawa and Yoshinaga
Causing the Microsporidian Disease in Japanese Spiny Lobster *Panulirus japonicus* (Von Siebold)**

Masahide Katata

Wakayama Prefectural Fisheries Experiment Station

緒 言

近年，漁獲されたイセエビ *Panulirus japonicus* (Von Siebold) において，可食部の筋肉が加熱した後のように白濁した個体（図 1）が見られるようになってきた（伊藤ら，2017；Itoh *et al.*，2020）。白濁の原因は，*Ameson* 属に分類される微胞子虫 *Ameson iseebi* Itoh, Kuboyama, Freeman, Katata, Yamakawa and Yoshinaga の寄生によるものであることが明らかになっており（Itoh *et al.*，2020），本疾病は一般的にイセエビ微胞子虫症と呼ばれている。



図 1 イセエビ微胞子虫症（筋肉白濁）

本疾病に感染すると，生存時から筋肉の白濁を肉眼でも確認することができるため，商品価値が喪失する（伊藤ら，2017；Itoh *et al.*，2020）。また，販売できなくなった白濁個体を水揚げ現場等で選別する必要があり，漁業者の作業負担が増大している。

本疾病の推定診断は，上記のとおり，筋肉の白濁を肉眼で確認することで行えるが，軽微な感染は見逃してしまう恐れがある。本疾病に感染したイセエビは，輸送等のストレスに弱く，死亡しや

すいことから、感染の見逃しは輸送途中や陸上水槽での畜養中の死亡に繋がる。そのため、出荷にあたり採捕地や採捕時期等における本疾病の感染の有無を確認する必要がある、迅速・簡便・高感度なモニタリングおよび診断手法が求められる。

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、PCR 法よりも増幅効率が高く、短時間で増幅可能であることから (Notomi *et al.*, 2000)、早く診断結果が出るため、魚病のモニタリングおよび迅速診断に応用可能である。

そこで、本研究では、迅速で簡便かつ高感度なイセエビ微孢子虫 *A. iseebi* の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

1. 供試サンプル

筋肉が白濁し、当該筋肉組織に寄生している *A. iseebi* の胞子を顕微鏡観察で確認した天然イセエビ 1 尾 (和歌山県内の漁場から採捕) の筋肉組織から、QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (株式会社キアゲン製) を用いて、添付されている説明書に従って DNA 抽出を行い、PCR 法および LAMP 法に供した。また、筋肉が白濁しておらず、当該筋肉組織中に *A. iseebi* の胞子が顕微鏡観察で確認されなかった健康な天然イセエビ 1 尾 (和歌山県内の漁場から採捕) の筋肉組織からも同様に 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、表 5 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。

2. PCR 法プライマーの設計

PCR 法のプライマーは、ITS 領域および LSU rRNA 遺伝子領域の一部 (合計 436bp) を標的配列として設計した。PCR 法による増幅反応を円滑に行うために、PCR 法プライマー設計支援ソフトウェア Primer3web version 4.1.0™ (<http://bioinfo.ut.ee/primer3>) を用いて、フォワードプライマーおよびリバースプライマーの 2 種類を設計した (表 1)。

表 1 *A. iseebi* 検出のための PCR 法プライマー塩基配列

原因虫	プライマー名	塩基配列
<i>A. iseebi</i>	IE-F	AGTGGCGAACGAACTGGATA
	IE-R	GCCTTCACCATCCACTACCA

3. PCR 法の実施

TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (タカラバイオ株式会社製) に添付されている説明書に従って、表 1 の各プライマー、TaKaRa Ex Taq HS, 10×Ex Taq Buffer (Mg²⁺ plus), dNTP Mixture および滅菌精製水を混合し、マスターミックスを作製した。0.2 ml のアイビス (R) PCR チューブ (アズワン株式会社製) を使い、23 μl のマスターミックスと抽出 DNA 溶液 2 μl を入れ、1 サンプルあたりの最終液量を 25 μl とした。PCR 反応は、サーマルサイクラー Gene Amp® PCR System 9700 (アプ

ライドバイオシステムズ製)を用いて、94℃で2分間の初期変性の後、94℃で20秒間、55℃で30秒間および72℃で30秒間を35サイクル行い、最後に72℃で5分間の付加伸張反応を行った。得られたPCR産物を1.5%アガロースゲル電気泳動に供し、トランスイルミネーターMupid-Scope(株式会社アドバンスバイオ製)を用いて増幅産物の確認を行った。

4. LAMP 法プライマーの設計

LAMP 法のプライマーは、上記の PCR 法プライマーの設計と同様に、ITS 領域および LSU rRNA 遺伝子領域の一部(合計436bp)を標的配列として設計した。また、同領域の塩基配列について、ClustalW Version 2.1TM (<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。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、4種類のプライマーを設計した(表2)。

表2 A. *iseebi* 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
A. <i>iseebi</i>	IE-F3	AATCCGCAAGGAGATGTT
	IE-B3	GTCTACAATTTACACTTTTGA
	IE-FIP	TCGCCTTGTAAGGGATATCACCAGGCTGCATAGGAAGTCA
	IE-BIP	GGAAAGTAGCCATACTTGGTAGTGGCTATCGGTCTCTTCTTGT

5. LAMP 法の実施

Loopamp® DNA 増幅試薬キット(栄研化学株式会社製)に添付されている説明書に従って、2×Reaction Mix (RM), 表2の各プライマー、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(栄研化学株式会社製)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(栄研化学株式会社製)を用い、23 μl のマスターミックスと抽出 DNA 溶液 2 μl を入れ、1 サンプルあたりの最終液量を 25 μl 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製)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製)で95℃・2分間のインキュベーション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(アズワン株式会社製)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。

6. 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54℃から66℃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、表5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、A. *iseebi* について、

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 法に供し、検出感度を比較した。

結果および考察

1. 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表 3 に、反応時間の検討結果を表 4 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、56～64℃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、陽性反応が認められた温度帯の中間域に相当する 60℃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 60℃に固定して実験した結果、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、60℃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。

表 3 LAMP 法の反応温度の検討
(反応時間：60 分間)

反応温度	<i>A. iseebi</i>
54℃	—
56℃	+
58℃	+
60℃	+
62℃	+
64℃	+
66℃	—

表 4 LAMP 法の反応時間の検討
(反応温度：60℃)

反応時間	<i>A. iseebi</i>
10 分	—
20 分	—
30 分	—
40 分	—
50 分	+
60 分	+

2. LAMP 法の反応特異性

LAMP 法の反応特異性の検討結果を表 5 に示す。上述した結果を受けて、検討は 60℃・60 分間の反応条件で行ったところ、*A. iseebi* の検出系は、他の病原体等の DNA に対して交差反応を示さなかった。つまり、本研究で構築した LAMP 法は、対象とする *A. iseebi* 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。

表 5 LAMP 法の反応特異性の検討 (60°C・60 分間)

病原体	<i>A. iseebi</i>	病原体等	<i>A. iseebi</i>
<i>Ameson iseebi</i>	+	<i>Cardicola opisthorchis</i>	—
<i>Cryptocaryon irritans</i>	—	<i>Cardicola orientalis</i>	—
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	—	<i>Cardicola forsteri</i>	—
<i>Miamiensis avidus</i>	—	<i>Enteromyxum leei</i>	—
<i>Trichodina</i> sp. (ヒラメ寄生)	—	<i>Enteromyxum fugu</i>	—
<i>Trichodina</i> sp. (マダイ寄生)	—	<i>Sphaerospora fugu</i>	—
<i>Amyloodinium ocellatum</i>	—	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	—
<i>Neoheterobothrium hirame</i>	—	<i>Edwardsiella tarda</i>	—
<i>Bivagina tai</i>	—	<i>Vibrio anguillarum</i>	—
<i>Kudoa septempunctata</i>	—	<i>Streptococcus iniae</i>	—
<i>Kudoa thyrsites</i>	—	RSIV	—
<i>Kudoa lateolabracis</i>	—	KHV	—

3. LAMP 法と PCR 法の検出感度比較

LAMP 法と PCR 法の検出感度比較の結果を表 6 に示す。反応特異性の検討と同様に、LAMP 法の反応条件は 60°C・60 分間とした。*A. iseebi* の検出系は、LAMP 法の方が PCR 法よりも検出感度が高く、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、クロマグロ住血吸虫、滑走細菌および海産白点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; 堅田, 2018; 堅田, 2019; 堅田, 2020), 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。

表6 LAMP法(60℃・60分間)とPCR法の
感度比較: *A. iseebi* 検出

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

以上の結果から、本研究で確立した *A. iseebi* 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。

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おり、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。

現在のところ、本疾病に対する治療法は存在しないため、発生が確認されると、感染したイセエビを取り除いて処分するしかない。しかし、肉眼により筋肉の白濁を確認するだけでは軽微な感染を見逃してしまう恐れがある。本疾病に感染したイセエビは、輸送等のストレスに弱く、死亡しやすいため、感染の見逃しは輸送途中や陸上水槽での畜養中の死亡に繋がる。そこで、本疾病の迅速・簡便・高感度なモニタリングおよび診断を行うためには、高感度な分子生物学的検査手法が重要性を帯びてくる。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、本疾病に罹患したイセエビを効率的かつ速やかに確認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、伝染性皮下造血管壊死症ウイルス(IHHNV)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、イセエビ微胞子虫 *A. iseebi* を検出するための LAMP 法を開発した。LAMP 法のプライマーは、ITS 領域および LSU rRNA 遺伝子領域の一部（合計 436bp）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、60°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、PCR 法の 100 倍の検出感度を示した。本研究で確立した *A. iseebi* 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、本疾病のモニタリングおよび迅速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、いせえび刺網漁業者および関係漁業協同組合の方々に感謝申し上げます。

引用文献

- Itoh, N., A. Kuboyama, M. A. Freeman, M. Katata, T. Yamakawa and T. Yoshinaga. 2020. A novel dimorphic microsporidian *Ameson iseebi* sp. nov. infecting muscle of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus*, in western Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 176:107472.
- 伊藤直樹・窪山あずさ・山川卓・良永知義. 2017. 白濁したイセエビ筋肉に寄生する微胞子虫について. 平成 29 年度日本魚病学会秋季大会口頭発表.
- 堅田昌英. 2018. クロマグロ住血吸虫の検出に用いる LAMP 法の開発. 和歌山県農林水産試験研究機関研究報告. 6:131-137.
- 堅田昌英. 2019. 滑走細菌の検出に用いる LAMP 法の開発. 和歌山県農林水産試験研究機関研究報告. 7:193-199.
- 堅田昌英. 2020. 海産白点虫の検出に用いる LAMP 法の開発. 和歌山県農林水産試験研究機関研究報告. 8:105-111.
- 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.
- 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.
- 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.

