

## LAMP 法による魚類病害微生物の 定性的・定量的検出技術の開発

[分類] 研究 [所属名] 水産試験場 増養殖部

[研究期間]

令和3～5年度

[背景とねらい]

近年の海面養殖業での魚病による被害は年間約 8,700 万円と推計されており、魚病被害を抑えるためには、迅速な魚病検査が求められています。そこで、より迅速な魚病検査を行うため、LAMP 法に注目し、本県で被害の多いエドワジエラ症、マダイイリドウイルス病、 $\alpha$  溶血性レンサ球菌症（Ⅱ型）について、定性的検出技術の開発を行いました。また、LAMP 法は高感度のため、魚病の主原因となり得ない微量の病原体遺伝子を検出する可能性があり、正確な魚病検査を行うためには、定量的解析が必要です。そこで、エドワジエラ症、マダイイリドウイルス病、 $\alpha$  溶血性レンサ球菌症（Ⅱ型）、海産白点病について、定量的解析に用いる検量線の作成を行いました。

[研究の成果]

1. エドワジエラ症およびマダイイリドウイルス病では 66°C（図 1、2）、 $\alpha$  溶血性レンサ球菌症（Ⅱ型）では 60°C（図 3）で最も増幅効率が高いことがわかりました。また、今回開発した上記 3 疾病のプライマーは他の 15 種類の魚類病害微生物の遺伝子と交差反応を示さず、特異性が高いと判断されたため、今後、LAMP 法を使用して魚病検査ができるようになりました。
2. エドワジエラ症、マダイイリドウイルス病、 $\alpha$  溶血性レンサ球菌症（Ⅱ型）、海産白点病について、LAMP 法の定量的解析に用いる検量線（DNA 量と増幅過程で生じる副産物が濁度 0.1 に達するまでの時間との関係）を作成したところ、いずれの疾病についても DNA 量が  $10^4 \sim 10^{10}$  copy/ $\mu$ l の間で高い決定係数の検量線が得られました（図 4）。

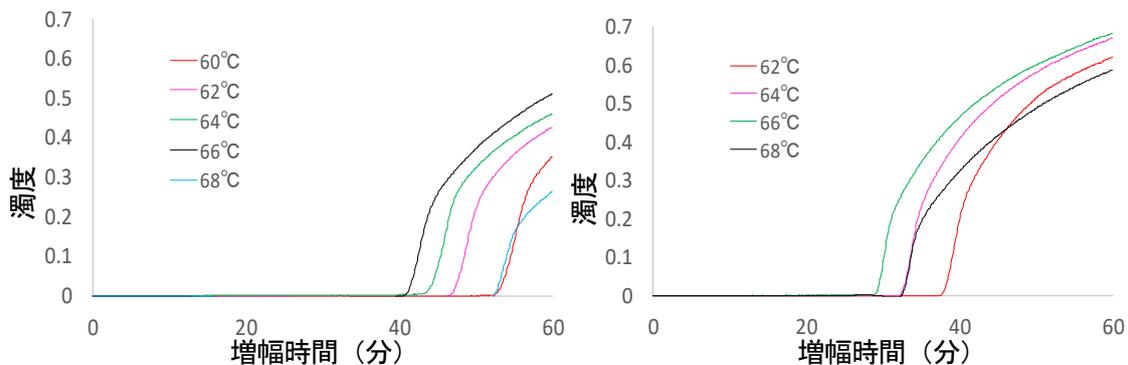


図 1 LAMP 法によるエドワジエラ症  
のリアルタイム濁度測定結果

図 2 LAMP 法によるマダイイリドウイルス病  
のリアルタイム濁度測定結果

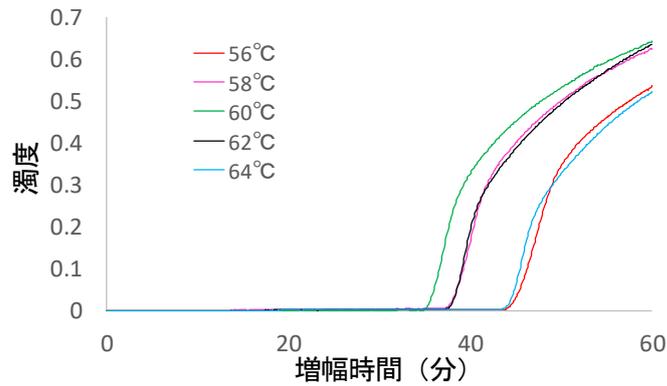


図3 LAMP法による $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症(Ⅱ型)のリアルタイム濁度測定結果

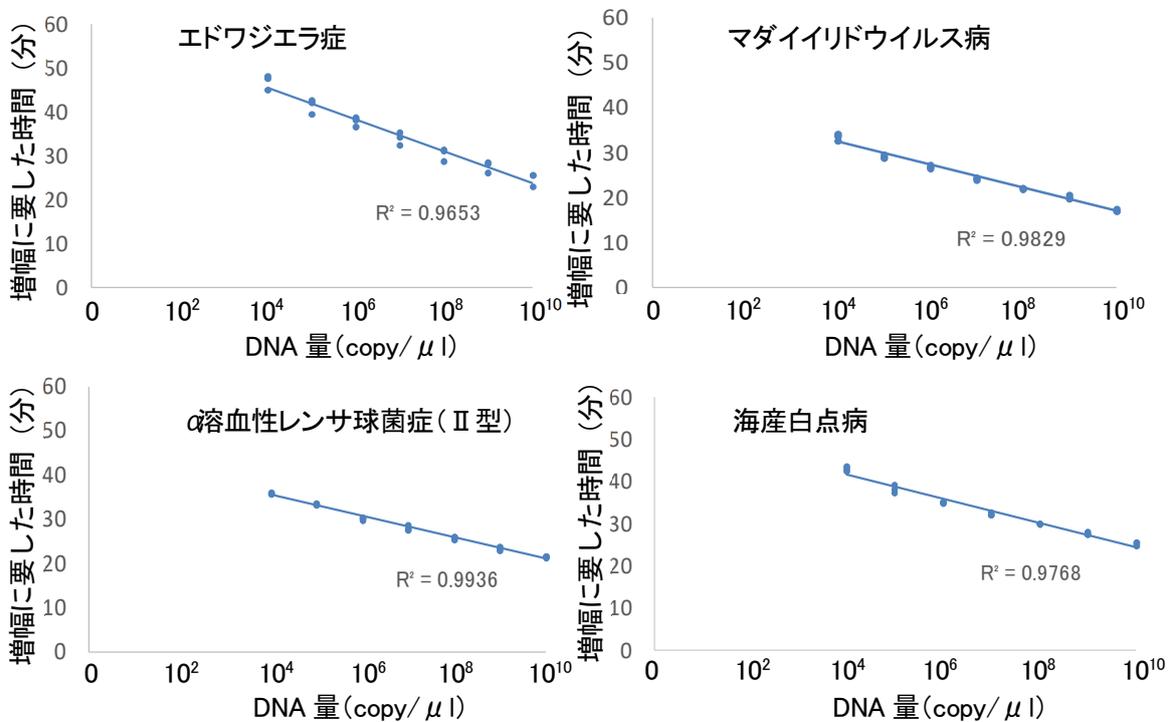


図4 DNA量と増幅過程で生じる副産物が濁度0.1に達するまでの時間との関係

[成果のポイントと活用]

1. 従来、魚病検査に用いていたPCR法では魚病検査に3時間程度要していましたが、LAMP法を使用することで、より迅速な魚病検査の実施が可能になったため、養殖関係者からの魚病検査依頼に対して、より早く結果を報告できるようになりました。
2. 検量線を用いることでDNA量の推定が可能になったので、今後、各魚病に罹患した魚の一定量の組織片から得られるDNA量を推定し、各魚病の主原因となりうるDNA濃度を把握することにより、誤診リスクを減少させ、より正確な魚病検査を目指します。

[その他]

予算区分：県単（農林水産業競争力アップ技術開発事業）問い合わせ先：TEL:0735-62-0940