

農林水産基礎研究

「病害微生物モニタリングのための基礎研究」

堅田昌英（増養殖部）

目 的

現在の養殖業は集約化が進んでおり、養殖魚には多種多様な病気、とりわけ病害微生物による感染症が多発している¹⁾。早急な疾病対策の実施のためには、正確で迅速な魚病診断が必要不可欠であるが、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法をはじめとする分子生物学的手法は、特異性、迅速性および検出感度に優れていることから、魚病診断現場へ応用されている²⁾。

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は、PCR 法を改良した手法で、一定温度で病魚の患部あるいは標的臓器から抽出した遺伝子(核酸)を増幅し、沈殿物の生成あるいは発色により判定する方法である³⁾。LAMP 法は、PCR 法とは異なり、等温で DNA の増幅が可能であるため、高額機器であるサーマルサイクラーを必要としない²⁾。また、4 種類のプライマーを用いるため、PCR 法に比べて特異性に優れている²⁾。更に、DNA の増幅効率が高いことから、反応時間が短く、反応終了後、PCR 法のように電気泳動を行うことなく、反応液の色の変化を肉眼で確認することで結果を判定することができる²⁾。従って、LAMP 法は特異的・迅速・高感度な検出手法であると言える。

現在、和歌山県内の養殖漁場で発生している魚病は多種多様であるが⁴⁾、中でも *Enteromyxum leei* および *Sphaerospora fugu* (= *Leptotheca fugu*) の 2 種類の粘液胞子虫によって引き起こされる粘液胞子虫性やせ病は、本県ではトラフグおよびマダイ養殖で問題となっており、その対策は喫緊の課題である⁵⁾。本疾病に罹患すると、病魚は頭骨が張り出して、眼が落ちくぼむほどの激しい「やせ」症状を示し、やがて死亡する^{6,7)}。本疾病の高感度な検出・診断法としては、既に PCR 法が確立されているが⁸⁾、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。

そこで、本研究では、上記 2 種類の原因虫について、特異的・迅速・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。また、上述した PCR 法⁸⁾と本研究で構築した LAMP 法を用いて、養殖漁場における本疾病原因虫の検出状況調査を行った。

方 法

1. LAMP 法の供試サンプル

本疾病に感染しているトラフグ 0 歳魚(和歌山県内の養殖漁場からサンプリング)の腸管内壁から、Yanagida *et al.* (2005) の方法に従って DNA 抽出を行い、LAMP 法に供した。また、LAMP 法の反応特異性の検討には、表 3 に示す粘液胞子虫や病原微生物等の抽出 DNA を用いた。

2. LAMP 法プライマーの設計

LAMP 法のプライマーは、PCR 法⁸⁾により増幅される領域 (SSU rRNA 遺伝子 *E. leei*: GenBank アクセションナンバー AY520574 増幅サイズ 433bp, *S. fugu* = *L. fugu*: GenBank アクセションナンバー AB195805 増幅サイズ 631bp) を標的配列として設計した。Yanagida *et al.* (2005) の PCR 法は、本疾病の検出・診断法として従来から実績があり、これらの配列は今回の LAMP 法プライマーの設計にあたり、十分な塩基長を有していたため、標的配列として適切であると判断した。また、*E. leei* および *S. fugu* それぞれの SSU rRNA 遺伝子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。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(表1)。

表1 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>E. leei</i>	EL-F3	AAAGTGCTCAATACAAGCG
	EL-B3	GCTTTCGCATTAGTGAGTCT
	EL-FIP	ACCAATCCAAAACCAACACGGACCGCTCGAATGTAGTAGC
	EL-BIP	AAGGGACATTTGAGGGCGTTTTGGTGGGTCTAAGAATTTTCC
<i>S. fugu</i>	SF-F3	AGGTTTAACAGGATTGTTGG
	SF-B3	GGCATAATTTACAGTCGGAAC
	SF-FIP	CGCGGTCAAATATCAATGCCCTGTATAAATCTAATAGGTATCGGT
	SF-BIP	TGCGAAAGCATTTGCCAAGATCTGATCGTCTTCGCTCC

3. 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。0.2mLのLoopamp[®] 反応チューブ(栄研化学株式会社)を用い、23μLのマスターミックスと抽出DNA溶液2μLを入れ、1サンプルあたりの最終液量を25μL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)を用いて、反応チューブ底面より紫外線(波長365nm)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。陽性コントロールと同様に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。

4. 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3に示す粘液胞子虫や病原微生物等の抽出DNAをLAMP法に供して、増幅の有無を調べた。また、各原因虫につき、同一の抽出DNA溶液を10⁻⁹まで10倍段階希釈してLAMP法とPCR法⁸⁾に供し、検出感度を比較した。

5. 本疾病原因虫の検出状況調査

2016年4月から2017年3月にかけて、和歌山県内の養殖漁場から、毎月3~8尾ずつトラフグ1歳魚のサンプリングを実施した。サンプリングしたトラフグの腸管内壁から、Yanagida *et al.* (2005)の方法に従ってDNA抽出を行い、本研究で構築したLAMP法およびPCR法⁸⁾に供して、本疾病原因虫の検出状況を調査した。検査結果は、陽性検体数/検査検体数×100の計算式により、寄生率(%)を算出して示した。

結果及び考察

1. LAMP法の反応温度および反応時間

LAMP法の反応温度および反応時間の検討結果を表2に示す。最適な反応温度を検討するため、反応時間を60分間に固定して検証した結果、*E. leei*では60~64℃、*S. fugu*では58~64℃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℃に固定して検討した結果、*E. leei*および*S. fugu*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、*E. leei* および *S. fugu* ともに、62°C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2 LAMP法の反応温度および反応時間

反応温度	<i>E. leei</i>	<i>S. fugu</i>	反応時間	<i>E. leei</i>	<i>S. fugu</i>
56°C	—	—	10分間	—	—
58°C	—	+	20分間	—	—
60°C	+	+	30分間	—	—
62°C	+	+	40分間	—	—
64°C	+	+	50分間	+	+
66°C	—	—	60分間	+	+

(反応時間：60分間)

(反応温度：62°C)

2. LAMP法の反応特異性

LAMP法の反応特異性の検討結果を表3に示す。上述した結果を受けて、検討は62°C・60分間の反応条件で行った。*E. leei* および *S. fugu* ともに、細菌やウイルスのDNAのみならず、他の粘液胞子虫類のDNAに対しても交差反応を示さなかった。また、*E. leei*、*E. fugu* および *S. fugu* 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。

表3 LAMP法の反応特異性（反応条件：62°C・60分間）

粘液胞子虫・病原微生物	<i>E. leei</i>	<i>S. fugu</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	—	—

3. LAMP法とPCR法の検出感度比較

LAMP法とPCR法⁸⁾の検出感度比較の結果を表4に示す。反応特異性の検討と同様に、LAMP法の反応条件は62°C・60分間とした。*E. leei* および *S. fugu* ともに、LAMP法の方がPCR法よりも検出感度が高く、*E. leei* ではPCR法の1,000倍、*S. fugu* では100倍の検出感度を示した。

以上の結果から、本研究で確立した*E. leei* および *S. fugu* 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。

表4 LAMP法（反応条件：62℃・60分間）とPCR法⁸⁾の検出感度比較

<i>E. leei</i>			<i>S. fugu</i>		
希釈倍率	LAMP法	PCR法	希釈倍率	LAMP法	PCR法
10 ⁰	+	+	10 ⁰	+	+
10 ⁻¹	+	+	10 ⁻¹	+	+
10 ⁻²	+	+	10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	+	10 ⁻³	+	+
10 ⁻⁴	+	+	10 ⁻⁴	+	+
10 ⁻⁵	+	+	10 ⁻⁵	+	+
10 ⁻⁶	+	-	10 ⁻⁶	+	-
10 ⁻⁷	+	-	10 ⁻⁷	+	-
10 ⁻⁸	+	-	10 ⁻⁸	-	-
10 ⁻⁹	-	-	10 ⁻⁹	-	-

4. 本疾病原因虫の検出状況調査

本研究で構築したLAMP法およびPCR法⁸⁾による*E. leei*の検出結果を図1に、*S. fugu*の検出結果を図2に示す。*S. fugu*の検査では両法の結果に差は見られなかったが、2016年10月4日にサンプリングした養殖トラフグの*E. leei*の検査において、PCR法⁸⁾で陰性だったサンプルでLAMP法により陽性を示した個体が認められた。上述したように、LAMP法による*E. leei*の検出率は、PCR法の1,000倍の検出感度を示すため、PCR法で検出限界未達であった*E. leei*のDNAをLAMP法で検出することができたと考えられた。

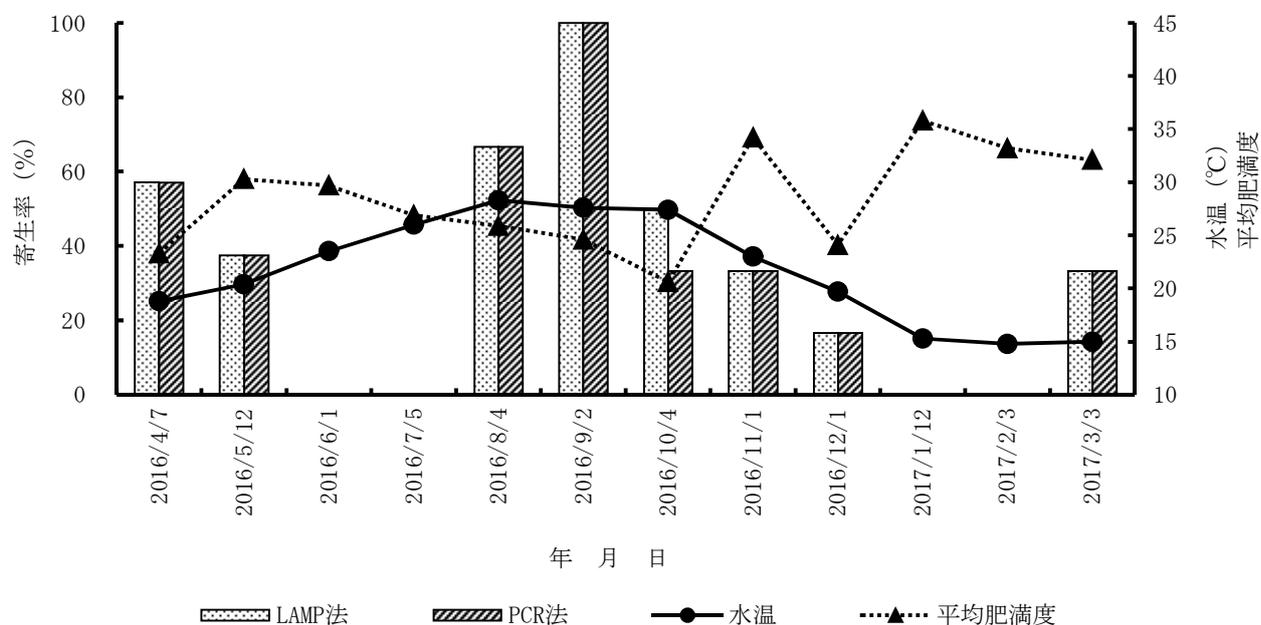


図1 養殖トラフグでのLAMP法およびPCR法による*E. leei*検出状況と水温および平均肥満度

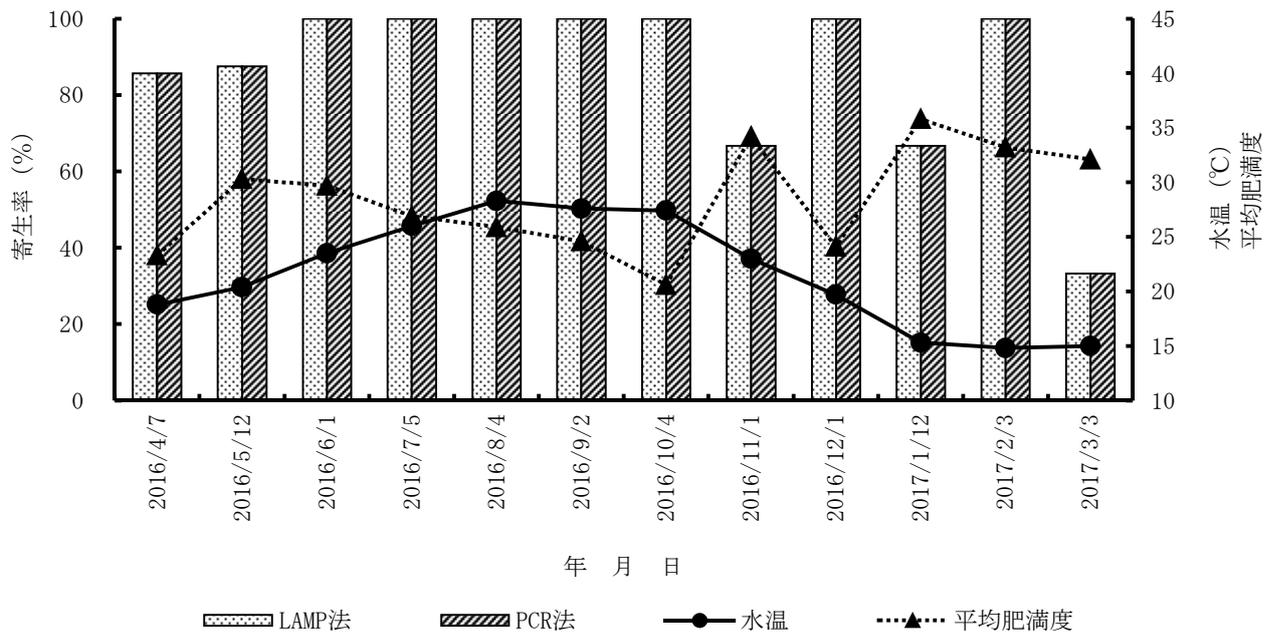


図2 養殖トラフグでの LAMP 法および PCR 法による *S. fugu* 検出状況と水温および平均肥満度

5. LAMP 法の更なる迅速化

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⁹⁾。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⁹⁾。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。

6. LAMP 法による定量化

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、伝染性皮下造血管壊死症ウイルス（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¹⁰⁾。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。

謝 辞

養殖トラフグのサンプリングにご協力いただきました養殖業者の方々にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 江草周三・若林久嗣・室賀清邦（2004）魚介類の感染症・寄生虫病，恒星社厚生閣，東京，5-7.
- 2) 青木宙（2013）魚介類の微生物感染症の治療と予防，恒星社厚生閣，東京，72-85，172-175.
- 3) 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.
- 4) 堅田昌英（2017）水産衛生対策（海面）. 平成 27 年度和歌山県水産試験場事業報告，55-58.

- 5) 堅田昌英・奥山芳生・小久保友義・中西一 (2015) 養殖トラフグとマダイにおける粘液胞子虫性やせ病原因虫の検出状況. 魚病研究, **50**, 127-129.
- 6) Ogawa, K. and H. Yokoyama (2001) Emaciation disease of cultured tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. Suppl.*, **5**, 65-70.
- 7) Tin Tun, K. Ogawa and H. Wakabayashi (2002) Pathological changes induced by three myxosporeans in the intestine of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck and Schlegel). *J. Fish Dis.*, **25**, 63-72.
- 8) Yanagida, T., M. A. Freeman, Y. Nomura, I. Takami, Y. Sugihara, H. Yokoyama and K. Ogawa (2005) Development of a PCR-based method for the detection of enteric myxozoans causing the emaciation disease of cultured tiger puffer. *Fish Pathol.*, **40**, 23-28.
- 9) 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.
- 10) 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.