

農林水産業競争力アップ技術開発事業

「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」

賀集健太

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⁾。早急な疾病対策を実施するためには、正確で迅速な魚病診断が必要不可欠であり、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法をはじめとする分子生物学的手法は、特異性、迅速性及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 法は従来の PCR 法に比べ、特異的・迅速・高感度な検出手法であると言える。

マダイイリドウイルス病 (Red Sea Bream Iridoviral disease:RSIVD) は 1990 年に四国の養殖マダイで初めて確認された疾病であり、2000 年までにスズキ目 28 種、カレイ目 2 種、フグ目 1 種の合計 3 目 31 魚種で発生が確認されている^{4,5,6)}。また、マダイ、スズキ、ブリ、カンパチ、シマアジ、イシダイ、イシガキダイ、ヒラマサ、クロマグロ、イサキ、ヒラメ、トラフグの 12 魚種は発生頻度からみて本疾病に感受性が高いと推察されている⁶⁾。本県でも夏から秋にかけて、マダイやクロマグロ、シマアジ等で頻繁にへい死を引き起こし、養殖業に大きな被害を与えている疾病である。本疾病に感染すると、外部所見として体色の黒化、鰓の褪色および出血が認められ、鰓の顕微鏡観察では小さな褐色点(黒点)が多数観察される。また、解剖すると脾臓の褪色および肥大がみられる⁷⁾。

本疾病の対策として、有効な水産用抗菌剤はなく、ワクチンによる予防が主体である。また、発症後の被害軽減策としては、餌止めが実施されている。この対策を講じる上で重要なことは、できるだけ早期に感染を発見することである。

マダイイリドウイルス (Red Sea Bream Iridovirus:RSIV) の同定・検出法として、*Pst* I 制限酵素によって切断された DNA 断片遺伝子を標的とした PCR 法が開発されている⁸⁾。しかし、検査結果が出るまでに少なくとも 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、迅速で簡便かつ高感度な RSIV 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。

方 法

1. 供試サンプル

Kurita *et al* (1998) の PCR 法によって RSIV に感染していることを確認した、マダイ (和歌山県内の養殖業者からサンプリング) の脾臓組織から、QIAamp 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、LAMP 法に供した。また、LAMP 法の反応特異性の検討には、表 3 に示す各種病原体等の抽出 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 (RSIV の *Pst* I restriction fragment DDBJ アクセスナンバー AB006954 増幅サイズ 959bp) を標的配列として設計した。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™ を用いて、4 種類のプライマーを設計した (表 1)。

表 1 RSIV 検出のための LAMP 法プライマー塩基配列

原因ウイルス	プライマー名	塩基配列
RSIV	RSIV-F3	CGTAGTCGTCATTCCGC
	RSIV-B3	CAGCAGTGAAGTCCTGAAGC
	RSIV-FIP	AGGTGTCTCATGTGAGCTGCCACGTCAAGCAGTGTAGGCG
	RSIV-BIP	CGTGGCATGTGACGGTCTGCAGTGGTGCTGTATGACGGTA

3. 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), 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 (栄研化学株式会社製) 及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。また、陰性コントロールには蒸留水 2 µL を使用した。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 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 62℃ から 70℃ 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及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。

結果及び考察

1. LAMP 法の反応温度及び反応時間

LAMP 法の反応温度及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に、反応時間を 60 分間に固定して検証した結果、64~68℃ 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 66℃ が反応温度として最適である可能性が示された。

次に、最適な反応時間を検討するために、反応温度を 66℃ 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示唆された。

以上の結果から、66℃ で 60 分間の反応を行えば LAMP 法で検出できると考えられた。

表 2 LAMP 法の反応温度及び反応時間の検討

反応温度	LAMP 法	反応時間	LAMP 法
62℃	—	10 分間	—
64℃	+	20 分間	—
66℃	+	30 分間	—
68℃	+	40 分間	—
70℃	—	50 分間	+
		60 分間	+
(反応時間：60 分間)		(反応温度：66℃)	

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 66℃・60 分間の反応条件で行った。RSIV 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 RSIV 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 法の反応特異性の検討（反応条件：66℃・60 分間）

病原体等	LAMP 法	病原体等	LAMP 法
RSIV	+	<i>Nocardia seriolae</i>	—
<i>Edwardsiella anguillarum</i>	—	<i>Ichthyobacterium seriolicida</i>	—
<i>Edwardsiella piscicida</i>	—	PAV	—
<i>Lactococcus garvieae</i> (I 型)	—	KHV	—
<i>Lactococcus garvieae</i> (II 型)	—	<i>Cryptocaryon irritans</i>	—
<i>Lactococcus garvieae</i> (III 型)	—	<i>Sphaerospora fugu</i>	—
<i>Streptococcus iniae</i>	—	<i>Kudoa septempunctata</i>	—
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	—	<i>Ameson iseebi</i>	—

3. 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。

4. 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（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

サンプリングにご協力いただきました県下の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, 188-196.
- 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) 井上潔・山野恵祐・前野幸男・中島員洋・松岡学・和田有二・反町稔 (1992) 養殖マダイのイリドウイルス感染症. 魚病研究, 27, 19-27.
- 5) 松岡学・井上潔・中島員洋 (1996) 1991 年から 1995 年に“マダイイリドウイルス病”が確認された海産養殖魚種. 魚病研究, 31, 233-234.
- 6) 川上秀昌・中島員洋 (2002) 1996 年から 2000 年にマダイイリドウイルス病が確認された海産養殖魚種. 魚病研究, 37, 45-47.
- 7) 畑井喜司雄・小川和夫 (2011) 新魚病図鑑 第 2 版, 緑書房, 東京, 139.
- 8) Jun Kurita, Kazuhiro Nakajima, Ikuo Hirono and Takashi Aoki (1998) Polymerase Chain Reaction(PCR) Amplification of DNA of Red Sea Bream Iridovirus(RSIV). 魚病研究, 33, 17-23.
- 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.