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。

α溶血性を示すレンサ球菌症（*Lactococcus garvieae*）は，1974 年に四国で発見された後，全国のブリ養殖場で高水温期を主として周年見られている [4)]。本疾病に感染すると，外観上では眼球白濁・突出，眼球周辺の出血，鰓蓋内側の発赤，尾鰭基部の膿瘍等が見られる [4)]。内部的特徴は，心外膜炎，腹膜癒着・出血，幽門垂・腸管の発赤・出血などが挙げられる [4)]。また，脳炎が起こると，狂奔遊泳が見られる場合がある [4)]。α溶血性レンサ球菌症にはⅠ型，Ⅱ型及びⅢ型があり，本県ではα溶血性レンサ球菌症（Ⅱ型）による被害が多く，ブリやシマアジ，カワハギを中心に大きな被害を与えている。

本疾病の対策として，ワクチンによる予防やエリスロマイシン，フロルフェニコールなどの水産用医薬品の投与が行われている。また，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。

α溶血性レンサ球菌症（Ⅱ型）の同定・検出法として，*glxR* と *argS* 間の遺伝子を標的とした PCR 法が開発されている [5)]。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α溶血性レンサ球菌症（Ⅱ型）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。

また，過去に反応条件の検討を行った海産白点病 [6)]，エドワジエラ症 [7)]，マダイイリドウイルス病 [8)] 及びα溶血性レンサ球菌症（Ⅱ型）について，DNA 量と反応中に析出する副産物が一定濁度に達するまでの反応時間との関係から定量化に用いる検量線の作成について検討を行った。

方　　法

1. 供試サンプル

Ohbayashi *et al*（2017）の PCR 法によってα溶血性レンサ球菌症（Ⅱ型）であった細菌のコロニーを 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 *Lactococcus garvieae*（Ⅰ～Ⅲ型），*Edwardsiella anguillarum*, *E. piscicida*, *Tenacibaculum maritimum*, *Nocardia seriolae*, *Ichthyobacterium seriolicid*, *Cryptocaryon*

irritans, *Sphaerospora fugu*, *Kudoa septempunctata*, *Ameson iseebi*, マダイイリドウイルス（RSIV），クルマエビ急性ウイルス血症の病原ウイルス（PRDV），コイヘルペスウイルス（KHV）の各種病原体の抽出 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，hypothetical protein（NCBI アクセッションナンバーAP017373 中の NALG_1253 増幅サイズ 666bp）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　α溶血性レンサ球菌症（Ⅱ型）検出のための LAMP 法プライマー塩基配列

原因細菌	プライマー名	塩基配列
Lactococcus garvieae（Ⅱ型）	LG-F3	GCCCAAACCCATCTTTCA
	LG-B3	TTCGTAGTATCGTCGTAGAC
	LG-FIP	TCCCCACATTCTGGATGACAACAAGCATTTGACATACAGTG
	LG-BIP	AACCCTATTCACGTGGCAACTTGAGACATAGCCTTCTGC

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），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， 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。また,陰性コントロールには蒸留水 2μL を使用した。LAMP 反応は，リアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA（栄研化学株式会社製）で行い，濁度の上昇が認められた場合を陽性，濁度の上昇が認められなかった場合を陰性と判定した。

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 64℃まで 2℃ずつ変えて検証した。また，反応時間は 60 分とした。

LAMP 法の最適な反応温度を把握した後，反応特異性を検証するため，表 2 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。

5.定量化に用いる検量線の検討

海産白点病，エドワジエラ症，マダイイリドウイルス病及びα溶血性レンサ球菌症（Ⅱ型）のそれぞれに DNA 濃度既知の標準液から段階希釈系列（10^1～10^{10}copy/μL）を作成した。検討した反応時間・反応温度でリアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA（栄研化学株式会社製）を用いて，各 DNA 濃度ごとに 3 回反応を行い，反応時間を測定した。そこで得られた DNA 量と反応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について検量線の作成を行った。

結果及び考察

1.LAMP 法の反応温度及び反応時間

LAMP 法の反応温度の検討結果を図 1 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℃の全てにおいて陽性反応が認められた。その中で反応時間が早い 60℃が最も増幅効率が高いと考えられたため，60℃が反応温度として最適である可能性が示された。また，60 分間反応すれば，十分に増幅が確認できた。

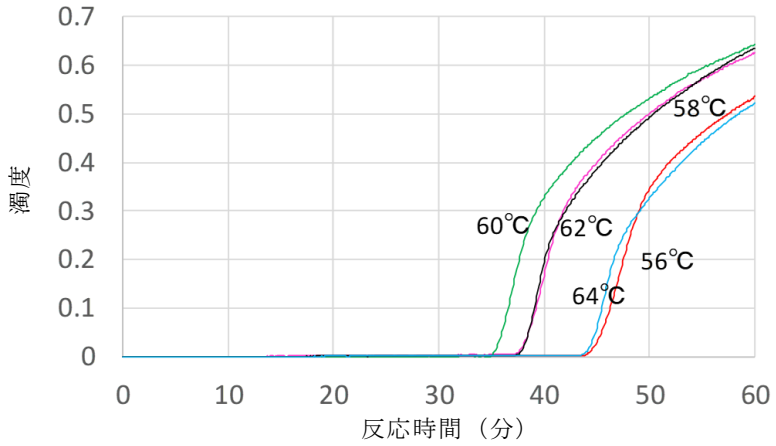


図 1　LAMP 法の反応温度の検討

2. LAMP 法の反応特異性

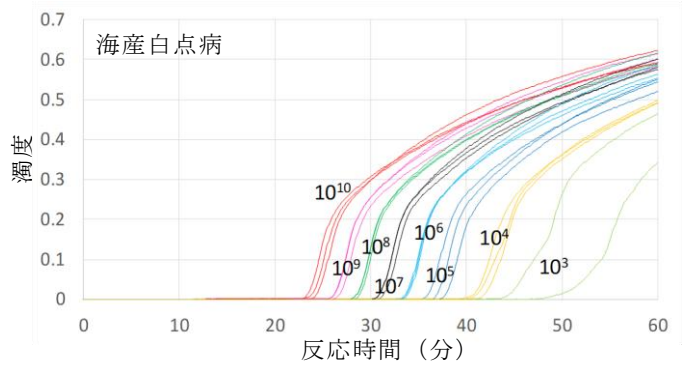
LAMP 法の反応特異性の検討結果を表 2 に示す。上述した結果を受けて，検討は 60℃・60 分間の反応条件で行った。α溶血性レンサ球菌症（Ⅱ型）の検出系は，他の病原体等の DNA に対して交差反応を示さなかった。つまり，本研究で構築した LAMP 法は，対象とするα溶血性レンサ球菌症（Ⅱ型）以外の DNA では陽性反応は見られず，反応特異性が高いことが示された。

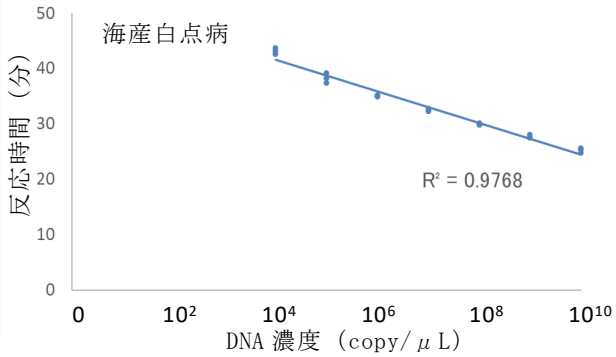
表 2　LAMP 法の反応特異性の検討（反応条件：60℃・60 分間）

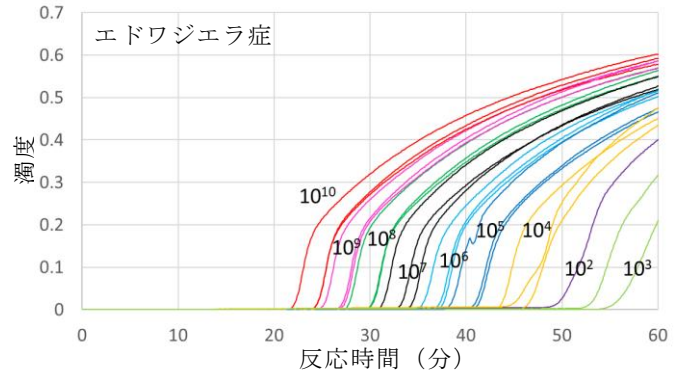
病原体	LAMP 法	病原体	LAMP 法
Lactococcus garvieae（Ⅰ型）	－	*Cryptocaryon irritans*	－
L. garvieae（Ⅱ型）	＋	*Sphaerospora fugu*	－
L. garvieae（Ⅲ型）	－	*Kudoa septempunctata*	－
Edwardsiella anguillarum	－	*Ameson iseebi*	－
E. piscicida	－	RSIV	－
Tenacibaculum maritimum	－	PRDV	－
Nocardia seriolae	－	KHV	－
Ichthyobacterium seriolicid	－		

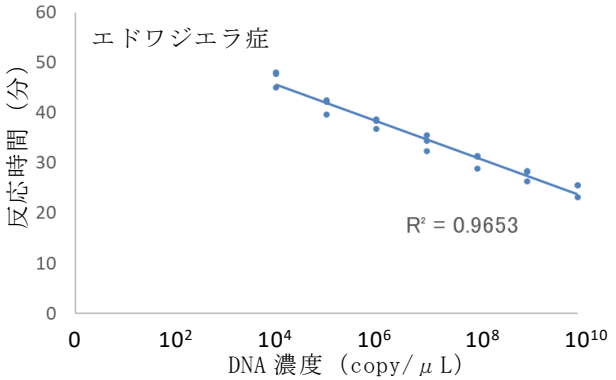
3. 定量化に用いる検量線の検討

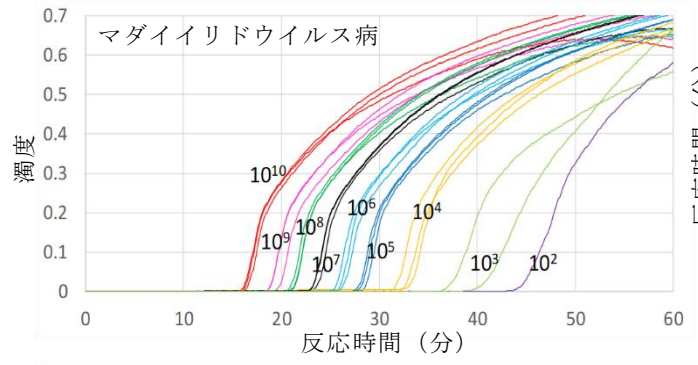
各病原体ごとの反応結果を図 2 に示す。いずれの病原体においても，DNA 濃度が 10^4～10^{10}copy/μL では 3 回とも反応し，反応時間の誤差が少なかったが，DNA 濃度が 10^1～10^3copy/μL では反応しない，或いは反応しても反応時間の誤差が大きかった。反応時間の誤差が少なかった DNA 濃度 10^4～10^{10}copy/μL と反応過程で生じる副産物の濁度が 0.1 に達するまでの反応時間との関係を図 3 に示す。全ての病原体で高い決定係数の検量線が得られたため，DNA 濃度が 10^4～10^{10} copy/μL の範囲であれば，濁度が 0.1 に達するまでの反応時間から DNA 量を推定できることが示唆された。

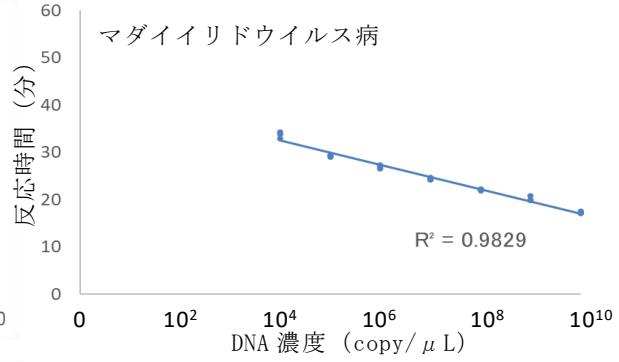


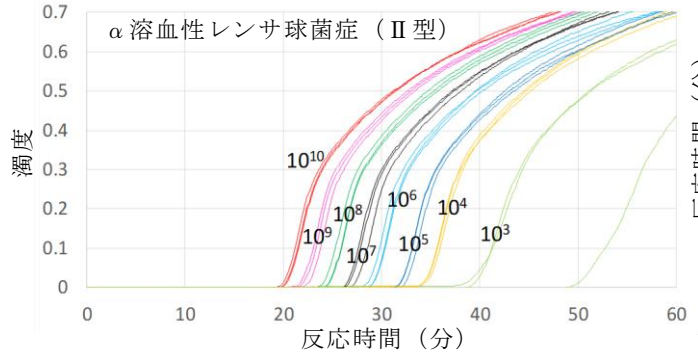












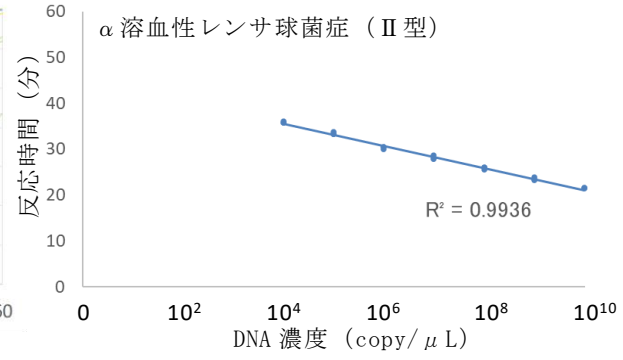


図 2　各病原体における標準液の LAMP 法反応結果

図 3　DNA 濃度と反応過程で生じる副産物の濁度が 0.1 に達するまでの反応時間との関係

4.今後の課題

実際に各病原体の罹患魚から DNA 抽出を行い，本研究で作成した検量線を用いて DNA 濃度を把握することで，各病原体の DNA 濃度と病状やへい死率に関係があるかどうかを確認する必要があると考えられる。

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) 畑井喜司雄・小川和夫（2011）新魚病図鑑 第 2 版，緑書房，東京，144.
5) Ohbayashi, K., D. Oinaka, T. D. Hoai, T. Yoshida and I. Nishiki (2017) PCR-mediated Identification of the Newly Emerging Pathogen Lactococcus garvieae Serotype Ⅱ from *Seriola quinqueradiata* and S.*dumerili*. 魚病研究，52 (1)，46－49.
6) 堅田昌英（2025）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」. 令和元年度和歌山県水産試験場事業報告，70-74.
7) 賀集健太（2025）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」. 令和 3 年度和歌山県水産試験場事業報告，45-48.
8) 賀集健太（2026）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」. 令和 4 年度和歌山県水産試験場事業報告，47-50.