

# 海産白点虫の検出に用いる 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 *Cryptocaryon irritans* Brown Causing the White Spot Disease in Marine Fish

Masahide Katata

Wakayama Prefectural Fisheries Experiment Station

### 緒 言

海産白点病は、繊毛虫の一種である *Cryptocaryon irritans* Brown が海産魚の鰓や皮膚の上皮組織内に寄生することによって引き起こされる (Lom and Dykova, 1992). *C. irritans* は宿主範囲が非常に広く、ほとんど全ての海産硬骨魚類に寄生する (良永, 1998).

本疾病に感染すると、外観症状として体表や鰭に白点が見られるようになるが、虫体の寄生が体表にほとんど認められず、鰓に集中する場合もある (Dickerson and Dawe, 1995; 小川, 2004). *C. irritans* に多数寄生された個体は、鰓や皮膚の上皮層が損傷・剥離し、浸透圧調整および呼吸機能が障害を受けて死亡する (良永, 1998).

従来から、本疾病は水族館、陸上飼育水槽、あるいは観賞魚愛好家の飼育水槽等の閉鎖的な飼育環境で多発するものとされてきた (江草, 1988). しかし、1980 年代になって海産魚の養殖が盛んになるにつれて、*C. irritans* の寄生による養殖魚の大量死が報告されるようになった (Kaige and Miyazaki, 1985).

本疾病の対策として、*C. irritans* の感染環を遮断するために、水槽替えや潮通しの良い海域への養殖生簀の移動が行われている (良永, 1998; 小川, 2004). これらの対策を講じる上で最も重要なことは、できるだけ早期に感染を発見することである (良永, 1998; 小川, 2004). 本疾病の診断は、体表あるいは鰓の患部組織を検鏡して虫体を確認することで行われるが (小川, 2004), *C. irritans* を魚体表面に白点として肉眼で観察できるのは夕刻から早朝の時間帯に限られる (良永, 1998). そのため、本疾病の早期発見は難しく、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.

*C. irritans* の同定・検出法として、rRNA 遺伝子の 18S-ITS1 領域を標的とした PCR 法が開発されている (今城ら, 2016). 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.

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 *C. irritans* 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

今城ら(2016)の PCR 法によって *C. irritans* に感染していることを確認したヒラメ0歳魚1尾(和歌山県内の中間育成場からサンプリング)の鰓患部組織から、QIAamp DNA Stool Mini Kit(株式会社キアゲン)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、今城ら(2016)の PCR 法によって *C. irritans* に感染していないことを確認したヒラメ0歳魚1尾(和歌山県内の中間育成場からサンプリング)の鰓組織からも同様に 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4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. LAMP 法プライマーの設計

LAMP 法のプライマーは、PCR 法(今城ら, 2016)により増幅される領域(*C. irritans* rRNA 遺伝子の 18S-ITS1 領域 GenBank アクセションナンバー KC357673 増幅サイズ 496bp)を標的配列として設計した。また、同遺伝子領域の塩基配列について、ClustalW Version 2.1<sup>TM</sup> (<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<sup>TM</sup> (<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1)。

表1 *C. irritans* 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
<i>C. irritans</i>	CI-F3	AAGTGCAAGTCATCAGCT
	CI-B3	GTTACCTACGGAAACCTT
	CI-FIP	CCGGATCACTCGAAATCGGTAAGTACGTCCTGCC
	CI-BIP	ACCTTCTGGACTGCGCTAACTACGACTTCTCCTTCTCT

### 3. LAMP 法の実施

Loopamp<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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。0.2 ml の Loopamp<sup>®</sup> 反応チューブ(栄研化学株式会社)を用いて、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)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 °C・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 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。

#### 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 59 °C から 67 °C まで 2 °C ずつ変えて検証した。また、反応時間は 10 分間から 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 4 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、*C. irritans* について、同一の抽出 DNA 溶液を 10<sup>6</sup> まで 10 倍段階希釈して LAMP 法と PCR 法 (今城ら, 2016) 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 2 に、反応時間の検討結果を表 3 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、61~65 °C 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 63 °C 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 63 °C 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、63 °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 法の反応温度の検討  
(反応時間：60 分間)

反応温度	<i>C. irritans</i>
59	-
61	+
63	+
65	+
67	-

表 3 LAMP 法の反応時間の検討  
(反応温度：63 °C)

反応時間	<i>C. irritans</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4に示す。前述した結果を受けて、検討は63・60分間の反応条件で行った。*C. irritans*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*C. irritans*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4 LAMP法の反応特異性の検討(63・60分間)

病原体等	<i>C. irritans</i>	病原体等	<i>C. irritans</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>	-	<i>Streptococcus parauberis</i>	-
<i>Kudoa lateolabracis</i>	-	RSIV	-
<i>Cardicola opisthorchis</i>	-	KHV	-

## 3. LAMP法とPCR法の検出感度比較

LAMP法とPCR法(今城ら, 2016)の検出感度比較の結果を表5に示す。反応特異性の検討と同様に、LAMP法の反応条件は63・60分間とした。*C. irritans*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虫、クロマグロ住血吸虫および滑走細菌を検出するための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)、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 5 LAMP 法（63 ・ 60 分間）と PCR 法の  
感度比較： *C. irritans* 検出

希釈倍率	LAMP 法	PCR 法
10 <sup>0</sup>	+	+
10 <sup>-1</sup>	+	+
10 <sup>-2</sup>	+	+
10 <sup>-3</sup>	+	+
10 <sup>-4</sup>	+	-
10 <sup>-5</sup>	+	-
10 <sup>-6</sup>	-	-

以上の結果から，本研究で確立した *C. irritans* 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．

本疾病の対策として，*C. irritans* の感染環を遮断するために，水槽替えや潮通しの良い海域への養殖生簀の移動が行われている（良永，1998；小川，2004）．これらの対策を講じる上で最も重要なことは，できるだけ早期に感染を発見することである（良永，1998；小川，2004）．しかし，*C. irritans* を魚体表面に白点として肉眼で観察できるのは夕刻から早朝の時間帯に限られる（良永，1998）．そのため，本疾病の早期発見は難しく，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．そこで，高感度な分子生物学的検査手法が重要性を帯びてくるが，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，本疾病を早期に発見し，速やかに対策を講じ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，伝染性皮下造血器壊死症ウイルス（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（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、海産白点虫 *C. irritans* を検出するための LAMP 法を開発した。LAMP 法のプライマーは、既に確立されている PCR 法と同様に、rRNA 遺伝子の 18S-ITS1 領域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、63℃ 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、上述した PCR 法の 100 倍の検出感度を示した。本研究で確立した *C. irritans* 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早期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県下のヒラメ中間育成施設の方々に感謝申し上げます。

## 引用文献

- Dickerson, H. W. and D. L. Dawe. 1995. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). pp.181-227. In: P. T. K. Woo (ed.). Fish diseases and disorders. Vol. 1. Protozoan and metazoan infections. CAB International. Wallingford.
- 江草周三.1988. 原虫症 .pp.219-274. 江草周三 編著 .新水産学全集 .17-B. 恒星社厚生閣 .東京 .
- 今城雅之・森光一幸・助田将樹・梅崎拓也・門野真弥・合田 暉・久保栄作・大嶋俊一郎.2016. 高知県野見湾における *Cryptocaryon irritans* の TaqMan リアルタイム PCR 検出と分子系統解析 . 魚病研究 . 51:103-111.
- Kaige, N. and T. Miyazaki. 1985. A histological study of white spot disease in Japanese flounder. *Fish Pathol.* 20:61-64.
- 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・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.
- Lom, J. and I. Dykova. 1992. Protozoan diseases of fishes. p.315. In: Developments in aquaculture and fisheries science. 26. Elsevier. Amsterdam.
- 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.
- 小川和夫.2004. 白点病 (淡水・海水). pp.295-303. 江草周三・若林久嗣・室賀清邦 編著 . 魚介類の感染症・寄生虫病 . 恒星社厚生閣 . 東京 .
- 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.

- 良永知義 . 1998 . 海産白点虫 *Cryptocaryon irritans* の防疫と対策 . pp.73-76 . 月刊 海洋 号外 No.14 総特集 魚類防疫 - 魚病と人間の関わり - . 海洋出版 . 東京 .
- 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 .

