

[年度] 平成 28 年度和歌山県農林水産試験研究成果情報

[成果情報名] LAMP 法による粘液胞子虫性やせ病原因虫の検出

[担当機関名] 水産試験場 増養殖部

[連絡先] 0735-62-0940

[専門分野] 水産

[分類] 研究

[背景・ねらい]

粘液胞子虫性やせ病は、*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。

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、増幅効率が高く、短時間で増幅可能であることから、PCR 法よりも早く結果が出るため、魚病の迅速診断に応用可能である。

そこで本研究では、LAMP 法による上記 2 種類の原因虫の検出系について検討した。

[研究の成果]

1. 反応温度を検討するために、反応時間を 60 分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 (表 1)。
2. 反応時間を検討するために、反応温度を 62℃に固定して実験した結果、*E. leei* および *S. fugu* とともに 50~60 分の反応で陽性を示した (表 2)。

以上の結果から、*E. leei* および *S. fugu* とともに、62℃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。

3. 反応特異性の検討では、*E. leei* および *S. fugu* とともに、対象とする病原体等以外の抽出 DNA には陽性反応を示さず、本研究で構築した LAMP 法の検出系に反応特異性が認められた (表 3)。
4. PCR 法との検出感度の比較では、*E. leei* および *S. fugu* とともに LAMP 法の方が PCR 法よりも検出感度が高く、*E. leei* では PCR 法の 1000 倍、*S. fugu* では 100 倍の検出感度を示した (表 4 および表 5)。

表 1 LAMP 法の反応温度の検討
(反応時間：60 分)

反応温度	<i>E. leei</i>	<i>S. fugu</i>
56℃	—	—
58℃	—	+
60℃	+	+
62℃	+	+
64℃	+	+
66℃	—	—

表 2 LAMP 法の反応時間の検討
(反応温度：62℃)

反応時間	<i>E. leei</i>	<i>S. fugu</i>
10 分	—	—
20 分	—	—
30 分	—	—
40 分	—	—
50 分	+	+
60 分	+	+

表 3 LAMP 法の反応特異性の検討 (62°C・60 分)

病原体等	<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	-	-

表 4 LAMP 法 (62°C・60 分) と PCR 法の感度比較: *E. leei* 検出

希釈倍率	LAMP 法	PCR 法
10 ⁰	+	+
10 ⁻¹	+	+
10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	+
10 ⁻⁴	+	+
10 ⁻⁵	+	+
10 ⁻⁶	+	-
10 ⁻⁷	+	-
10 ⁻⁸	+	-
10 ⁻⁹	-	-

表 5 LAMP 法 (62°C・60 分) と PCR 法の感度比較: *S. fugu* 検出

希釈倍率	LAMP 法	PCR 法
10 ⁰	+	+
10 ⁻¹	+	+
10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	+
10 ⁻⁴	+	+
10 ⁻⁵	+	+
10 ⁻⁶	+	-
10 ⁻⁷	+	-
10 ⁻⁸	-	-
10 ⁻⁹	-	-

[成果のポイントと活用]

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。

今後は、他の病原体についても LAMP 法による検出系を確立していく。また、本研究で確立した検出系は定性的なものであるが、今後は、病原体の定量解析を可能にするために、LAMP 法による定量的な検出系を確立していく予定である。

[その他]

予算区分：県単

研究期間：平成 28 年度

研究担当者：堅田昌英

発表論文等：平成 29 年度日本魚病学会春季大会 口頭発表

日本魚病学会誌『魚病研究』第 52 巻第 2 号