

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

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。

海産白点病は、繊毛虫の一種である *Cryptocaryon irritans* 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⁴⁾。*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⁵⁾。

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、虫体の寄生が体表面にほとんど認められず、鰓に集中する場合もある^{1, 6)}。*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、浸透圧調整及び呼吸機能が障害を受けて死亡する⁵⁾。

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⁷⁾。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⁸⁾。

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^{1, 5)}。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^{1, 5)}。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¹⁾、*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⁵⁾。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及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⁹⁾。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 *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。

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、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 3 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⁹⁾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 2.1TM (<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 V5TM (<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	CCGGATCACTCGAAATCGGTAAGTATTACGTCCTGCC
	CI-BIP	ACCTTCTGGACTGCGCTAACTACGACTTCTCCTTCCTCT

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、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トを行う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 59℃から 67℃まで 2℃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。また、*C. irritans* について、同一の抽出 DNA 溶液を 10⁻⁶ まで 10 倍段階希釈して LAMP 法と PCR 法⁹⁾に供し、検出感度を比較した。

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、61～65℃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℃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℃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℃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 法の反応温度及び反応時間の検討

反応温度	<i>C. irritans</i>	反応時間	<i>C. irritans</i>
59℃	—	10 分間	—
61℃	+	20 分間	—
63℃	+	30 分間	—
65℃	+	40 分間	—
67℃	—	50 分間	+
		60 分間	+

(反応時間：60 分間)

(反応温度：63℃)

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 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 3 LAMP 法の反応特異性の検討（反応条件：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⁹⁾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 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因虫、クロマグロ住血吸虫及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^{10,11,12)}、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。

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、反応特異性及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：63℃・60 分間）と
PCR 法⁹⁾の感度比較： *C. irritans* 検出

希釈倍率	LAMP 法	PCR 法
10 ⁰	+	+
10 ⁻¹	+	+
10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	+
10 ⁻⁴	+	—
10 ⁻⁵	+	—
10 ⁻⁶	—	—

4. 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¹³⁾。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。

5. 海産白点病の対策

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^{1,5)}。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^{1,5)}。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⁵⁾。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及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。

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¹⁴⁾。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ヒラメ中間育成施設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, 295-303.
- 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) Lom, J. and I. Dykova (1992) Protozoan diseases of fishes, *Developments in aquaculture and fisheries science* 26, Elsevier, Amsterdam, 315.
- 5) 良永知義 (1998) 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, 73-76.
- 6) Dickerson, H. W. and D. L. Dawe (1995) *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora), *Fish diseases and disorders Vol. 1 Protozoan and metazoan infections*, CAB International, Wallingford, 181-227.
- 7) 江草周三 (1988) 新水産学全集 17-B, 恒星社厚生閣, 東京, 219-274.
- 8) Kaige, N. and T. Miyazaki (1985) A histological study of white spot disease in Japanese flounder. *Fish Pathol.*, **20**, 61-64.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.