

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」

—LAMP 法によるイセエビ微胞子虫の検出—

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。

近年、漁獲されたイセエビ *Panulirus japonicus* において、可食部の筋肉が加熱した後のように白濁した個体 (図 1) が見られるようになってきた^{4,5)}。白濁の原因は、*Ameson* 属に分類される微胞子虫 *Ameson iseebi* の寄生によるものであることが明らかになっており⁵⁾、本疾病は一般的にイセエビ微胞子虫症と呼ばれている。



図 1 イセエビ微胞子虫症 (筋肉白濁)

本疾病に感染すると、生存時から筋肉の白濁を肉眼でも確認することができるため、商品価値が喪失する^{4,5)}。また、販売できなくなった白濁個体を水揚げ現場等で選別する必要があり、漁業者の作業負担が増大している。

本疾病の推定診断は、上記のとおり、筋肉の白濁を肉眼で確認することで行えるが、軽微な感染は見逃してしまう恐れがある。本疾病に感染したイセエビは、輸送等のストレスに弱く、死亡しやすいことから、感染の見逃しは輸送途中や陸上水槽での畜養中の死亡に繋がる。そのため、出荷にあたり採捕地や採捕時期等における本疾病の感染の有無を確認する必要があり、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、本研究では、迅速で簡便かつ高感度なイセエビ微胞子虫 *A. iseebi* 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

筋肉が白濁し、当該筋肉組織に寄生している *A. iseebi* の胞子を顕微鏡観察で確認した天然イセエビ 1 尾（和歌山県内の漁場から採捕）の筋肉組織から、QIAamp Fast 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、PCR 法及び LAMP 法に供した。また、筋肉が白濁しておらず、当該筋肉組織中に *A. iseebi* の胞子が顕微鏡観察で確認されなかった健康な天然イセエビ 1 尾（和歌山県内の漁場から採捕）の筋肉組織からも同様に 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. PCR 法プライマーの設計

PCR 法のプライマーは、ITS 領域及び LSU rRNA 遺伝子領域の一部（合計 436bp）を標的配列として設計した。PCR 法による増幅反応を円滑に行うために、PCR 法プライマー設計支援ソフトウェア Primer3web version 4.1.0™（<http://bioinfo.ut.ee/primer3>）を用いて、フォワードプライマー及びリバースプライマーの 2 種類を設計した（表 1）。

表 1 *A. iseebi* 検出のための PCR 法プライマー塩基配列

原因虫	プライマー名	塩基配列
<i>A. iseebi</i>	IE-F	AGTGGCGAACGAACTGGATA
	IE-R	GCCTTCACCATCCACTACCA

3. PCR 法の実施

TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version（タカラバイオ株式会社製）に添付されている説明書に従って、表 1 の各プライマー、*TaKaRa Ex Taq* HS、10×*Ex Taq* Buffer (Mg²⁺ plus)、dNTP Mixture 及び滅菌精製水を混合し、マスターミックスを作製した。0.2 ml のアイビス (R) PCR チューブ（アズワン株式会社製）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。PCR 反応は、サーマルサイクラー Gene Amp® PCR System 9700（アプライドバイオシステムズ製）を用いて、94℃で 2 分間の初期変性の後、94℃で 20 秒間、55℃で 30 秒間及び 72℃で 30 秒間を 35 サイクル行い、最後に 72℃で 5 分間の付加伸張反応を行った。得られた PCR 産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動に供し、トランスイルミネーター Mupid-Scope（株式会社アドバンスバイオ製）を用いて増幅産物の確認を行った。

4. LAMP 法プライマーの設計

LAMP 法のプライマーは、上記の PCR 法プライマーの設計と同様に、ITS 領域及び LSU rRNA 遺伝子領域の一部（合計 436bp）を標的配列として設計した。また、同領域の塩基配列について、ClustalW Version 2.1™（<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™（<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 2）。

表2 *A. iseebi* 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>A. iseebi</i>	IE-F3	AATCCGCAAGGAGATGTT
	IE-B3	GTCTACAATTTACACTTTTCGA
	IE-FIP	TCGCCTTGTAAGGGATATCACCAGGCTGCATAGGAAGTCA
	IE-BIP	GGAAAGTAGCCATACTTGGTAGTGGCTATCGGTCTCTTGT

5. 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), 表2の各プライマー, 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。0.2 ml の Loopamp[®]反応チューブ(栄研化学株式会社製)を用い, 23 μ l のマスターミックスと抽出 DNA 溶液 2 μ l を入れ, 1 サンプルあたりの最終液量を 25 μ l 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°C・2 分間のインキュベート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 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。

6. 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 54°Cから 66°Cまで 2°C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, *A. iseebi*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, 56~64°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 60°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 60°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, 60°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 3 LAMP 法の反応温度及び反応時間の検討

反応温度	<i>A. iseebi</i>	反応時間	<i>A. iseebi</i>
54℃	—	10 分間	—
56℃	+	20 分間	—
58℃	+	30 分間	—
60℃	+	40 分間	—
62℃	+	50 分間	+
64℃	+	60 分間	+
66℃	—		

(反応時間：60 分間) (反応温度：60℃)

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。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ところ、*A. iseebi* 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 *A. iseebi* 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 (反応条件：60℃・60 分間)

病原体	<i>A. iseebi</i>	病原体等	<i>A. iseebi</i>
<i>Ameson iseebi</i>	+	<i>Cardicola opisthorchis</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>	—	RSIV	—
<i>Kudoa lateolabracis</i>	—	KHV	—

3. LAMP 法と PCR 法の検出感度比較

LAMP 法と PCR 法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 60℃・60 分間とした。*A. iseebi* 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、滑走細菌及び海産白点虫を検出するための 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^{6,7,8,9)}、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 *A. iseebi* 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5 LAMP法（反応条件：60℃・60分間）と
PCR法の感度比較：A. *iseebi* 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¹⁰⁾。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. イセエビ微孢子虫症の対策

現在のところ、本疾病に対する治療法は存在しないため、発生が確認されると、感染したイセエビを取り除いて処分するしかない。しかし、肉眼により筋肉の白濁を確認するだけでは軽微な感染を見逃してしまう恐れがある。本疾病に感染したイセエビは、輸送等のストレスに弱く、死亡しやすいため、感染の見逃しは輸送途中や陸上水槽での畜養中の死亡に繋がる。そのため、本疾病の迅速・簡便・高感度なモニタリング及び診断を行うためには、高感度な分子生物学的検査手法が重要性を帯びてくる。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、本疾病に罹患したイセエビを効率的かつ速やかに確認す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、伝染性皮下造血管壊死症ウイルス（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¹¹⁾。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、いせえび刺網漁業者及び関係漁業協同組合の方々に感謝申し上げます。

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.
- 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) 伊藤直樹・窪山あずさ・山川卓・良永知義 (2017) 白濁したイセエビ筋肉に寄生する微孢子虫について. 平成 29 年度日本魚病学会秋季大会口頭発表.
- 5) Itoh, N., A. Kuboyama, M. A. Freeman, M. Katata, T. Yamakawa and T. Yoshinaga (2020) A novel dimorphic microsporidian *Ameson iseebi* sp. nov. infecting muscle of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus*, in western Japan. *J. Invertebr. Pathol.* **176**:107472.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 堅田昌英 (2020) 海産白点虫の検出に用いる LAMP 法の開発. 和歌山県農林水産試験研究機関研究報告. **8**:105-111.
- 10) 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.
- 11) 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.