

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) を增幅し、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 の增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 の增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。

エドワジエラ症は腸内細菌科のグラム陰性で運動性通性嫌気性の短桿菌, *Edwardsiella ictaluri*, *E. anguillarum* および *E. piscicida* によって引き起こされる細菌病である⁴⁾。マダイのエドワジエラ症の原因菌は *E. anguillarum* であり、本症は魚齢に関係なく 8~11 月頃に発生し、病状の進行は 2~3 歳魚では比較的慢性的であるが、累積死亡数で見ると被害が大きくなる⁵⁾。本県においても 2020 年 8~9 月にかけて、4 万尾を超える大量への死が起こるなど、マダイ養殖において重要な疾病である。本疾病に感染すると、頭部、尾柄部などの体表に膿瘍が形成され、腹部膨満を呈する。また、脾臓や腎臓は腫大し、多数の結節様の少白斑が形成される⁵⁾。

本疾病的対策として、ホスホマイシンカルシウムを有効成分とする水産用抗菌剤の投薬⁶⁾、過密飼育や過食を避ける⁴⁾ことが挙げられる。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。本疾病的診断は、病原菌を分離・同定することで行われるが、菌分離には 24 時間の培養が必要である¹⁾。そのため、本疾病的早期発見には迅速・簡便・高感度な診断手法が求められる。

E. anguillarum の同定・検出法として、DNA 遺伝子の線毛遺伝子を標的とした PCR 法が開発されている⁷⁾。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 *E. anguillarum* 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

Griffin *et al* (2014) の PCR 法によって *E. anguillarum* に感染していることを確認したマダイ（和歌山県内の養殖業者からサンプリング）の腎臓組織から、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、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。

2. LAMP 法プライマーの設計

LAMP 法のプライマーは、PCR 法⁷⁾により増幅される領域 (*E. anguillarum* の線毛遺伝子 GenBank アクセシジョンナンバー AB469975 増幅サイズ 849bp) 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 *E. anguillarum* 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>E. anguillarum</i>	EA-F3	GCGTTAACAGCGCCTCT
	EA-B3	GCTCTATACGCACGCTTGCA
	EA-FIP	ACCCGATCAAAGAAAAGGCCGGGTCTGCGGGCGGATGA
	EA-BIP	CGCGGAGCCCGTGGCTAAAGGGGTATTCCGCTAGGGTA

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，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。また、陰性コントロールには蒸留水 2 μL を使用した。LAMP 反応は、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 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 62°C から 70°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。

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，64～68°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 66°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 66°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，66°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 法の反応温度及び反応時間の検討

反応温度	LAMP 法	反応時間	LAMP 法
62°C	—	10 分間	—
64°C	+	20 分間	—
66°C	+	30 分間	—
68°C	+	40 分間	—
70°C	—	50 分間	+
		60 分間	+

(反応時間 : 60 分間)

(反応温度 : 66°C)

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 66°C・60 分間の反応条件で行った。*E. anguillarum* 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 *E. anguillarum* 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 : 66°C・60 分間)

病原体等	LAMP 法	病原体等	LAMP 法
<i>Edwardsiella anguillarum</i>	+	<i>Ichthyobacterium seriolicida</i>	—
<i>Edwardsiella piscicida</i>	—	RSIV	—
<i>Lactococcus garvieae</i> (I 型)	—	PAV	—
<i>Lactococcus garvieae</i> (II 型)	—	KHV	—
<i>Lactococcus garvieae</i> (III 型)	—	<i>Cryptocaryon irritans</i>	—
<i>Streptococcus iniae</i>	—	<i>Sphaerospora fugu</i>	—
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	—	<i>Kudoa septempunctata</i>	—
<i>Nocardia seriolae</i>	—	<i>Ameson iseobi</i>	—

3. LAMP 法の更なる迅速化

LAMP 法は、PCR 法よりも增幅反応を阻害する夾雑物の影響を受けにくいう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增幅反応が確認されたことが報告されている⁸⁾。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。

4. 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充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、伝染性皮下造血器壊死症ウイルス (IHHNV) 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⁹⁾。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) 和田新平 (2024) 魚病学 第2版, 緑書房, 東京, 107-109.
- 5) 畑井喜司雄 (2022) 新魚病図鑑 第3版 (小川和夫, 佐野元彦, 横山博, 倉田修監修), 緑書房, 東京, 185.
- 6) 農林水産省 (2024) 水産用医薬品について, 28.
- 7) Matt J. Griffin, Cynthia Ware1, Sylvie M. Quiniou, James M. Steadman, Patricia S. Gaunt, Lester H. Khoo, Esteban Soto (2014) *Edwardsiella piscicida* identified in the southeastern USA by *gyrB* sequence, species-specific and repetitive sequence-mediated PCR, DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS, Vol. 108, 23-35.
- 8) 吉野 学・渡 一・小島 穎・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.
- 9) 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.