

LAMP法によるコイ鰓からのコイヘルペスウイルス検出の評価

降幡 充・小川 滋・細江 昭

Evaluation of a loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of Koi herpesvirus (KHV) from gills of carp

Mitsuru Furihata, Shigeru Ogawa, Akira Hosoe

コイヘルペスウイルス (KHV) 病は2003年10月に国内で初めて霞ヶ浦の養殖コイ (*Cyprinus carpio*) で確認されて以来¹⁾、全国各地から発生が報告され、致死性の高い疾病であることから産業的に大きな問題となっている。KHV 病の一次診断は特定疾病等対策ガイドラインの病性鑑定指針に基づき PCR を用いた Gray *et al.*²⁾ の遺伝子増幅法により行われていた。しかし、非特異的増幅産物が生じること、また、遺伝子増幅及びその増幅産物のゲル電気泳動に費やす時間が長いといった問題点が指摘され、さらに、プライマー配列に1カ所誤りがあったことから現在は Gray *et al.* の方法を改良した Yuasa *et al.*³⁾ の方法が採用されている。最近、検出感度が PCR と同等以上で迅速性に優れた Loop mediated isothermal amplification (LAMP) 法による KHV 遺伝子検出法が実用化された⁴⁾。LAMP 法による KHV 遺伝子検出法が KHV 病の初動診断に利用できるか PCR と比較して評価した。

材料と方法

供試魚

長野県内において KHV 病が疑われた河川湖沼のマゴイ、一般家庭の池または養殖場で飼育されたマゴイ及びニシキゴイのうち2004年6月から2005年の11月までに死亡あるいは瀕死状態の139検体 (2004年:93検体、2005年:46検体) を供試し、鰓組織から KHV の検出を行った。

PCR 条件

約10mgの鰓組織から Puregene Cell and Tissue Kit (Gentra Systems 社) により DNA の抽出を行い、50~500 μ L の Dnase-Rnase-free 滅菌水に溶解し、鋳型 DNA 溶液 (0.5 μ L) として使用した。2004年の93検体は特定疾病等対策ガイドラインの病性鑑定指針に基づき、Gray *et al.* の Sph 1-5 プライマーセット (F: 5'-GACACCACATCTGCAAGGAG-3', R: 5'-GACACATGTTACAATGGTGGC-3') を用い、PCR 反応液の全量を20 μ L とし、ポリメラーゼには Takara Ex Taq Hot Start Version (Takara) を利用した。反応条件は、変性を94°C 1分間、アニーリングを55°C 2分間、伸長反応を72°C 3分間とし、増幅サイクル数は30サイクルとして行い、その反応産物5~10 μ L を6%ポリアクリルアミドゲル

(Tefco 社) で電気泳動し、遺伝子断片 (290bp) の増幅を確認した。2005年の46検体は Yuasa *et al.* の改良 Sph 1-5 プライマーセット (F: 5'-GACACCACATCTGCAAGGAG-3', R: 5'-GACACA-TGTTACAATGGTGGC-3') 及び反応条件 (変性:94°C30秒、アニーリング:63°C30秒、伸長反応:72°C30秒、増幅サイクル数:40サイクル) で行った。PCR と LAMP 法の結果が一致しなかった検体は、Gray *et al.* の方法及び Yuasa *et al.* の方法による PCR により再度検出を行うとともに、Gilad *et al.*⁵⁾ の9/5 プライマーセット及び反応条件による PCR も行った。

LAMP 条件

LAMP 法は、Loopamp プライマーセット KHV (栄研化学) 及び Loopamp DNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用いて行った。前述の PCR で用いた鋳型 DNA 溶液 (5 μ L) を95°C で5間加熱処理後、急冷し、次いで説明書に従い調製した反応液20 μ L に添加し、リアルタイム濁度測定装置 (LA-200、テラメックス社) により65°C、5時間反応させ、LAMP 反応の副産物であるピロリン酸マグネシウムの析出による濁度の上昇を確認した。

結果と考察

LAMP 法及び Gray *et al.* の PCR の結果は93検体中陽性が53検体、陰性が36検体で一致したが、4検体で異なった。また、LAMP 法及び Yuasa *et al.* の PCR の結果は46検体全て一致した (Table 1)。結果の異なった4検体について再検査したところ、LAMP 法及び Yuasa *et al.* の PCR の結果は全て陽性で一致したが、Gray *et al.* 及び Gilad *et al.* の PCR の結果はそれぞれ4及び3検体が陰性であった (Table 2)。

特定疾病等対策ガイドラインの病性鑑定指針は、2004年10月12日から Gray *et al.* の PCR に代えて非特異的反応が少ない上により検出感度が高く、全反応時間が半減した Yuasa *et al.* の PCR を採用している。今回供試した検体の場合も Yuasa *et al.* の PCR は Gray *et al.* の PCR で陰性と判定された4検体から KHV 遺伝子を検出し、これを裏付ける結果であった。LAMP 法の Loopamp KHV プライマー領域は Gilad *et al.* の9/5領域を標的遺伝子としているが、LAMP 法は Yuasa *et al.* の PCR と結果が全て一致し、同等の特異性と検出能をもつことが確認できた。さ

らに、Yuasa *et al.* の PCR は反応時間が半減されたとはいえ、PCR と電気泳動による増幅産物の確認に最低3時間程度を要する。LAMP 法は1時間以内に結果を判定でき、迅速性により優れていた。これらのことから、LAMP 法はKHV 病の診断における一次診断に利用できると考えられる。

要約

1. コイヘルペスウイルス (KHV) 病の迅速診断法として LAMP 法について評価した。
2. KHV 病が疑われるコイの鰓 139 検体を供試し、LAMP 法及び Gray *et al.* の PCR を行った結果、135 検体の判定は一致したが、4 検体が異なった。PCR で陰性と判定された 4 検体を検出感度の高い Yuasa *et al.* の PCR で再検査したところ、LAMP 法と同じ陽性と判定された。
3. LAMP 法は1時間以内に判定でき、迅速性により優れていた。よって、LAMP 法はKHV 病の診断における一次診断に利用できると考えられる。

文献

- 1) Sano, M., T. Ito, J. Kurita, T. Yanai, N. Watanabe, S. Miwa and T. Iida (2004): First Detection of Koi Herpesvirus in Cultured Common Carp *Cyprinus carpio* in Japan, *Fish Pathol.*, 39, 165-167.
- 2) Gray W. L., L. Mullis, S. E. LaPatra, J.M. Groff and A. Goodwin (2002): Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish, *J. Fish. Dis.*, 25, 171-178.
- 3) Yuasa K., M. Sano, J. Kurita, T. Ito and T. Iida (2005): Improvement of a PCR Method with the Sph I-5 Primer Set for the Detection of Koi Herpesvirus (KHV), *Fish Pathol.*, 40, 37-39.
- 4) 吉野 学・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.
- 5) Gilad O., S. Yun, K. B. Andree, M. A. Adkison, A. Zlotkin, H. Bercovier, A. Eldar and R. P. Hedrick (2002): Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*, *Dis. Aqua. Org.*, 48, 101-108.

Table 1. Comparative results of LAMP and PCR for samples from gills of moribund or dead carp with suspected KHV disease

		PCR				total
		Gray <i>et al.</i>		Yuasa <i>et al.</i>		
		+	-	+	-	
LAMP	+	53	4	21	0	78
	-	0	36	0	25	61
total		53	40	21	25	139

+: positive, -: negative

Table 2. Redetection of KHV by LAMP and PCR from gills of carp

LAMP	No. of fish positive / examined		
	PCR		
	Gray <i>et al.</i>	Yuasa <i>et al.</i>	Gilad <i>et al.</i>
4/4	0/4	4/4	1/4