

通し番号	5234
------	------

分類番号	R06-95-33-08
------	--------------

短時間かつ安価で行えるアユ異型細胞性鰓病の診断	
<p>[要約] 新たな簡易DNA 熱抽出法を用いたアユ異型細胞性鰓病のPCR診断を検討したところ、従来の市販抽出キットを用いた手法と比べて、同等の検出感度と検出率を示すうえ、短時間かつ安価で行えることが明らかとなったことから、今後、魚病診断の現場においての普及が見込まれる。</p>	
神奈川県水産技術センター内水面試験場	連絡先042-763-2007

[背景・ねらい]

Plecoglossus altivelis Poxvirus-like virus (以下、PaPV) は、アユの異型細胞性鰓病の原因ウイルスであり、全国のアユ養殖場で大きな損失を引き起こしており、本県でも2008年に確認されている。本病の診断にはPCR 検査法が利用されており、本県においても同検査を行い、陽性であった場合には、本病の診断・治療マニュアルに従い、直ちに塩水浴による治療が行われている。しかし、従来の市販抽出キットを用いたサンプル調整法はコストと時間を要するため、多数の病魚を検査する生産現場では簡易かつ安価な迅速診断技術が望まれてきた。そこで、簡易DNA 熱抽出法について、作業時間、コストおよび検出感度を市販抽出キットと比較するとともに魚病診断の有効性を明らかにする。

[成果の内容・特徴]

- 1 簡易DNA 熱抽出法は病魚の鰓を採取し、5%のキレックス (Chelex100) を添加した蒸留水とともにマイクロチューブに入れ、加熱処理のみで抽出を行うので、市販抽出キットによるサンプルの溶解や遠心分離を繰り返す等の検査工程が省ける。作業時間と1検体当たりのコストは、簡易DNA熱抽出法が15分、2.5円で、市販抽出キットが90分、900円で、簡易DNA熱抽出法は短時間かつ安価で実施できる。
- 2 市販抽出キットとPaPVの検出感度を比較すると、いずれのサンプルも 10^4 倍希釈までPCR 産物が確認され、本手法は市販抽出キットと同等のPaPV 検出感度が得られる (図1)。
- 3 魚病検査のため当场に持ち込まれた病魚について、本手法を用いてPCR 検査したところ、すべての39検体においてPaPVが検出されたことから魚病診断に有用である(表1)。

[成果の活用面・留意点]

- 1 本手法で用いたキレックスはアユ疾病に関する防疫指針において冷水病の診断に用いられていることから、アユの疾病検査を実施する試験研究機関には常備されているものと思われ、新たな試薬等を購入することなく安価でDNA抽出を行うことができる。
- 2 本手法はDNA抽出作業が簡便で素早く行えることから、迅速診断が求められる生産現場では有用な手法であると考えられ、今後、魚病診断の現場での普及が見込まれる。

[具体的データ]

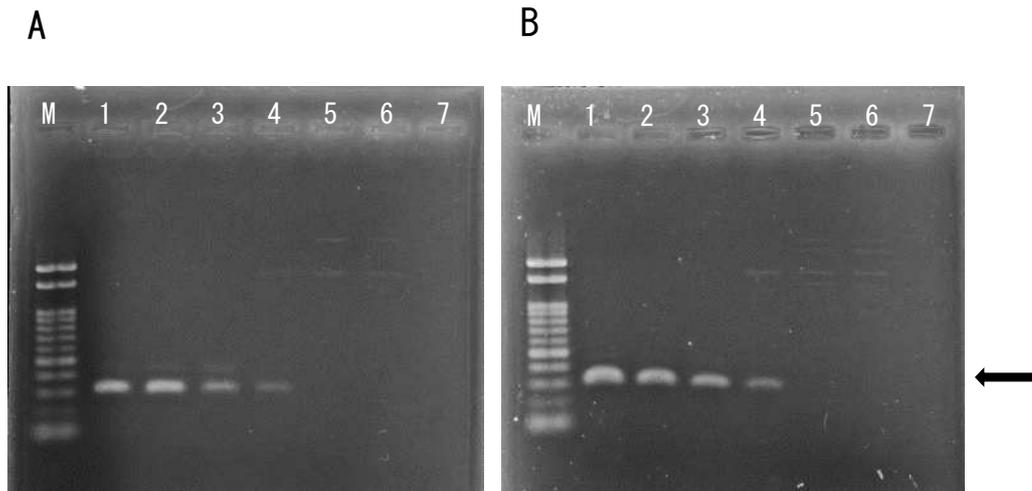


図1 熱抽出法と市販キットにより得た DNA を用いた PCR 結果の比較.

図は病魚 1 尾の結果を示す. 矢印: PaPV 由来 PCR 産物 (302 bp).

A: 熱抽出法. B: 市販キット. M: 100bp DNA Ladder. 1: 10^1 倍希釈 DNA. 2: 10^2 倍希釈 DNA. 3: 10^3 倍希釈 DNA. 4: 10^4 倍希釈 DNA. 5: 10^5 倍希釈 DNA. 6: 健康なアユ DNA (10^1 倍希釈). 7: DW.

表1 供試アユの情報

検査群	検査日	平均体重 (g)	死亡率* (%)	検査魚の状態	PaPV (陽性尾数/検査尾数)
1	2024.06.28	11.4	5.0	瀕死	10/10
2	2024.06.28	26.8	0.8	瀕死	10/10
3	2024.07.05	41.6	50.0	瀕死	5/5
4	2024.08.05	47.2	52.6	瀕死	7/7
5	2024.08.16	68.5	50.0	瀕死	7/7

* 飼育開始日から検査日までの検査対象水槽における累積死亡率

[資料名] 魚病研究60巻1号

[研究課題名] 簡易的なDNA 熱抽出法を利用したPCR によるアユ異型細胞性鰓病原因ウイルスの検出

[研究期間] 2024(令和6)年度

[研究者担当名] 相川 英明

[協力・分担関係]