

ミクロの技術で魚病を診断 - 「DNAチップ」を使って迅速・正確にー

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2024-07-19
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 大迫, 典久
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2010343

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



ミクロの技術で魚病を診断

－「DNAチップ」を使って迅速・正確に－

大迫 典久（養殖研究所 札幌魚病診断・研修センター）

1. はじめに

近ごろ話題になったコイのヘルペスウイルス病のように、魚も人間と同じように病気にかかります。病気の原因も寄生虫、細菌、ウイルス、その他栄養や環境に由来するものなど様々で、魚の種類によっても病気は異なります。いま魚介類の養殖は盛んに行われており、特に最近では養殖対象種の増加に伴い、病気の発生件数およびその種類が増えて問題となっています。魚病による被害の推定額は、年間100億円を超えています。今後、養殖業がさらに発展し、また消費者に安全で安心な養殖魚を提供していくためには魚介類の病気対策が重要です。病気が出た場合は出来るだけ早い段階でその病気を迅速かつ正確に診断して、病気の種類に応じて適切に対処することが最も重要です。そのため、様々な魚種の多種類の病気に対応する診断法の開発が望まれています。

2. 魚の病気の診断法

従来の一般的な魚の病気の診断方法では、まず体表に出血や潰瘍があるかどうかや寄生虫が付いていないかなどを観察し、ついで、病気の原因となる細菌やウイルスを検出するため、病

原体を培養します。細菌の培養には寒天を使った培地を、ウイルスの培養には魚類の細胞を使います。病原体の培養では、十分に増殖して観察可能になるまでには早くても丸一日かかります。さらに培養された病原体が何であるかを判別するためには、病原体の性状を調べる様々な検査を行う必要があるため、結局、判定結果がでるまでには数日かかっていました。簡便な診断方法としては、病原体に対する抗体がその病原体に結合することを利用した凝集法や蛍光抗体法があります。これらの方法は、簡便で迅速に判定できる点で優れた方法ですが、抗体が何らかの理由で病原体以外の物と反応してしまって、病原体との反応と区別が難しい場合や、病原体が少ない場合は検出できないといった感度の問題があります。

これらの問題を解決するため、新しい診断手法としてポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）法が用いられるようになりました。これは病原体のDNAを酵素を用いて増幅し、それを検出するという方法です。このPCR法は、従来法に較べ非常に正確かつ高感度で判定でき、非常に有効な方法ですが、一度に一種類の病原体しか検出できません。病気の診断では、普通

その原因がわからないわけですから、いろいろな病原体を調べる必要があり、その結果いく通りものPCRを繰り返し行う必要がでてきます。そこで、一度に多くの病原体を検出する方法として、DNAチップによる診断法を開発しました。

3. 「DNAチップ」とは？

それでは「DNAチップ」とは、いったいどういうものでしょうか。DNAチップは、この言葉のとおり、小さな基板（チップ）の上にDNAを貼り付けたもので、整然としかも数多く配列させていることから、マイクロアレイ（アレイは配列の意味）とも呼ばれています。この診断方法の原理は以下のようなものです（図1）。まず、病原体に特徴的なDNAを基板（ナイロン膜やスライドガラスなど）上に貼り付けます。様々な病原体のDNAを小さなスポット状に整然と貼り

付けることで、たくさんの病原体の情報をのせたDNAチップができます。一方、病魚の診断用試料（病原体が含まれている組織や臓器など）からDNAを取り出し、それらのDNAに標識をつけておきます（このときはDNAは二本鎖）。そしてこれらの標識したDNAを一本鎖にして、作製したDNAチップ上に貼り付けてあるDNAと混ぜ合わせます。DNAは通常二本鎖で出来ており、それぞれの鎖のDNA配列が相補的な相手と結合する性質があることから、試料中の病原体のDNAに相補的なDNAがチップ上に貼り付けてあった場合には、そこで結合して二本鎖を形成し、結果としてチップにくっつくことになります。試料から抽出したDNAはあらかじめ標識してありますので、それがチップ上のDNAと結合すると、結局、チップ上のスポットが標識されることになります。一枚のチップ上に調べたい病原体の

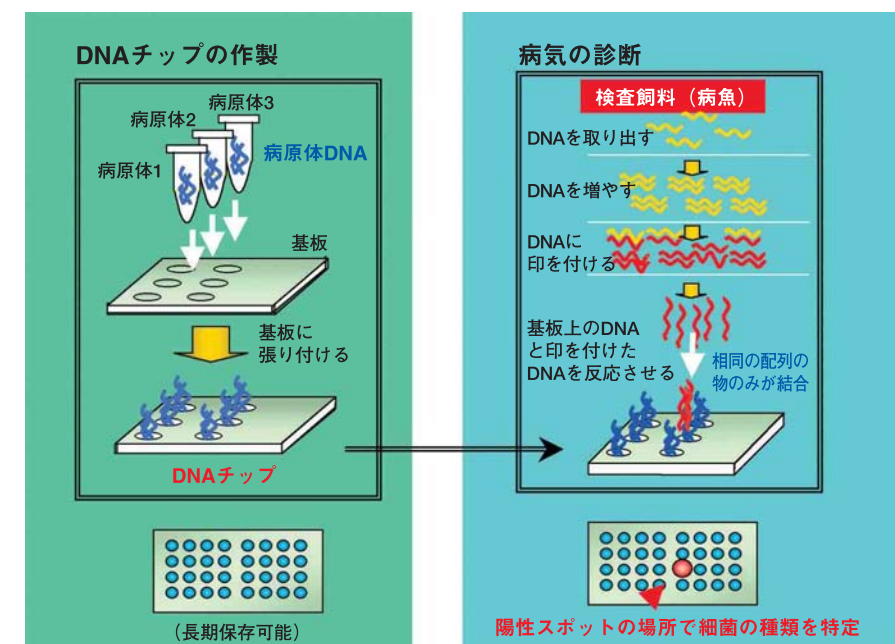


図1 魚介類疾病診断用DNAチップによる検出原理

DNAを全てスポットしておけば、目的の病原体が試料中にあるといずれかのスポットが標識されますので、そのチップに貼り付けたDNAのスポットの位置を病原体名の配列表と照らし合わせれば、この病気が何かわかるというわけです。

4. 魚病診断用のDNAチップ

現在までに養殖魚介類で発生している病気のうち、診断がつきにくい細菌とウイルスを検出するDNAチップをそれぞれ作製しました。実用化に向けた低コスト化のために、DNAを貼り付ける基板をナイロン膜とし、手動のスポッター（DNAを基板に貼付ける器具）を用いました（図2）。まず、病原細菌による疾病の診断用チップとしては魚介類の主要な病原細菌などの35種類の細菌のDNAをスポットしたチップ、及び病原細菌の中でも特に同属の種類が多いために判定が難

しいビブリオ属の病原細菌のDNAを19種類スポットしたチップを作製しました（図3）。一方、主要なウイルス病については海産魚の病原ウイルス10種類、淡水魚のウイルス8種類、（その内両者に共通のウイルス3種類を含む）の合計15種類の病原ウイルスを検出するDNAチップを作製しました（図4）。これらのDNAチップを用いることにより、一度に多くの病原体についての検査が可能になるとともに、従来の培地を用いた培養による病原菌の検出に比べて診断までの時間が大幅に短縮され、検出感度も上がり、養殖魚介類の現在知られているほとんどの病原細菌による病気と主要な病原ウイルスによる病気について迅速かつ正確に診断できるようになりました。これらのDNAチップはすでに県の水産試験場などの実際の魚病診断現場で試され、有用性が実証されています（図5）。

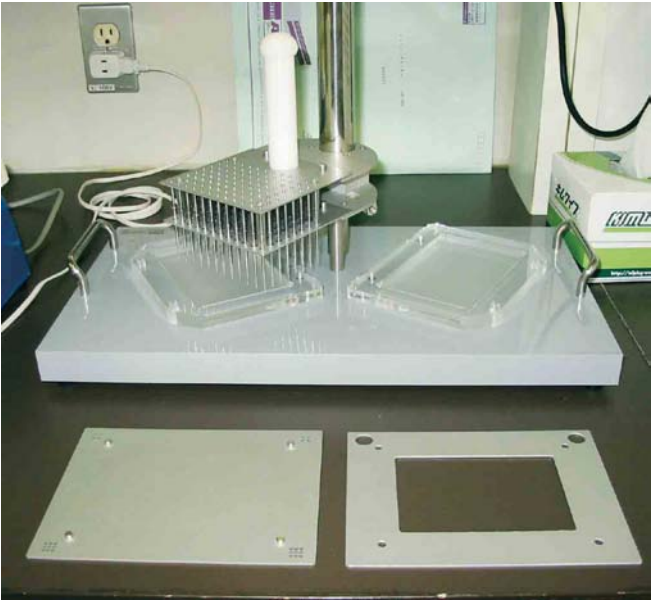


図2 魚介類疾病診断用DNAチップの作製のためのスポッター
手前の鉄板にナイロン膜を挟み、スポッター（奥の台座上）の針をDNAがはいった96穴のマイクロプレート中に浸してから膜に押し付け、DNAをスポットする。

5. おわりに

DNAチップが普及し、養殖現場に近い所で魚介類の病気が迅速で正確に診断できるようになれば、疾病の早期発見、早期治療が可能となり、病気の蔓延が防止できます。そして、消費者への安全・安心な養殖生産物の提供につながると

ともに、魚介類の養殖業の安定経営にも貢献できるものと考えています。なお、養殖魚介類の病気は現在でも増え続けています。今後は新しい疾病に対応していく必要があるとともに、より使い易いようにDNAチップに改良を加えていき、魚病の診断現場での普及を目指していきます。

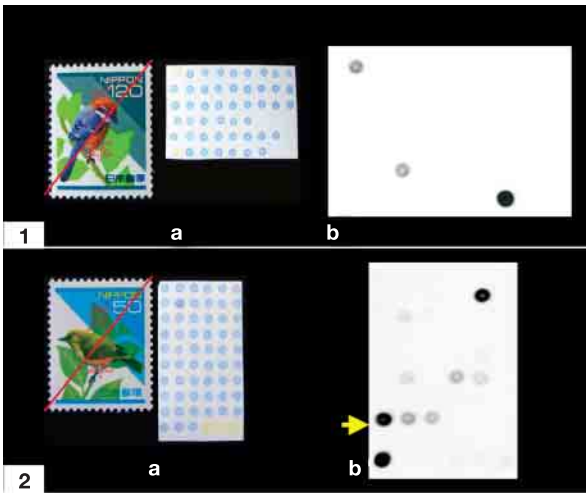


図3 作製した魚類病原細菌検出用DNAチップ
1：一般魚病細菌の検出に用いるチップ
2：ビブリオ属の細菌検出に用いるチップ
1、2ともにaは作製したチップ（わかりやすくするためDNAのスポットを青く染色）、bは検出した事例、強く黒色を示すスポットが陽性。陽性スポットに対応する菌種が検出された病原体。
ただし、ビブリオの検出には横並びの3スポットが陽性であることが必要（矢印）。



図5 作製したDNAチップの使用法のマニュアルの例
作製したDNAチップ（病原細菌検出用、ビブリオ属細菌検出用、病原ウイルス検出用）について、それぞれ使用法についてのマニュアルを作製し、診断現場での普及を図っている。



図4 作製した魚類病原ウイルス検出用DNAチップ
aは作製したチップ（わかりやすくするためDNAのスポットを青く染色）、bは検出した事例、強く黒色を示すスポットが陽性で、検出には横並びの3スポットが陽性であることが必要。