

農林水産省戦略的プロジェクト研究推進事業
「国内主要養殖魚の重要疾病のリスク管理技術の開発」
成果普及資料

マダイの夏季腎腫大症と冬季貧血症 (いずれも仮称) 診断マニュアル

水産研究・教育機構 水産技術研究所 養殖部門 病理部

愛媛県農林水産研究所 水産研究センター

令和6年3月

目次

1. 本プロトコル中に記載した検査法（核酸抽出と結果の判定法）に関して.....	3
2. 夏季腎腫大症	4
3. 冬季貧血症.....	8

はじめに

本プロトコルでは、養殖マダイで見られる不明病、夏季腎腫大症と冬季貧血症の症状を解説すると同時に、主因と考えられるウイルスに対する診断 PCR 法を紹介する。なお、現時点ではウイルスの分離は行われておらず、そのため、コッホの原則も満たしていない。本プロトコル中のウイルスは病魚からメタトランスクリプトーム解析により優占的に検出されたが、主因ではない可能性も十分にある。また、夏季腎腫大症に関しては病魚から複数のウイルスが検出される場合も有るため、診断結果の解釈には注意を要する。

1. 本プロトコル中に記載した検査法（核酸抽出と結果の判定法）に関して

本プロトコルに記載する病原体検出法は、全て PCR 法を使用している。検出する対象が RNA ウィルスである場合においても、cDNA 合成後、同様に PCR 法を行う。核酸抽出に使用するキットは特に指定しないが、以下に代表的なキットのプロトコルを記載する（キアゲン社の QIAamp DNA Mini Kit、フナコシ社の Quick-DNA/RNA Pathogen Kit）。なお、水産技術研究所病理部診断グループでは、DNA の抽出には Maxwell 16（プロメガ）、RNA の抽出には Quick-DNA/RNA Pathogen Kit（フナコシ社）を主に使用しているが、状況や目的によっては異なるキットを使用することもある。PCR 法および RT-PCR 法での結果の判定は、予想されるサイズにおける DNA 増幅断片の有無で行う。一方、定量 PCR 法ではシグナルの増幅が確認できれば陽性となる。

QIAamp DNA Mini Kit（キアゲン社）を使用したゲノム DNA 抽出の簡易プロトコル

1. マダイ腎臓組織（約 15 mg）を、ATL Buffer（180 μ L）と Proteinase K（20 μ L）の混合液に加える。
2. 組織が完全に溶解するまで 56°C でインキュベーションを行う。
3. AL Buffer（200 μ L）を加え、混合する。
4. エタノール（100%、200 μ L）を加え、混合する。
5. 液を QIAamp Mini Spin Column に添加後、遠心する（8,000 rpm で 1 分間）。濾液は廃棄する。
6. Buffer AW1 で洗浄（500 μ L、8,000 rpm で 1 分間遠心、濾液は廃棄）
7. Buffer AW2 で洗浄（500 μ L、8,000 rpm で 1 分間遠心、濾液は廃棄）
8. EB Buffer で溶出（200 μ L、8,000 rpm で 1 分間遠心、濾液を回収）

Quick-DNA/RNA Pathogen Kit と DNA/RNA Shield（フナコシ社）を使用した RNA 抽出の簡易プロトコル

1. マダイ腎臓組織（10 mg）を、DNA/RNA Shield（400 μ L）中でホモジナイズする。
2. Pathogen DNA/RNA Buffer（800 μ L）を、組織の入った DNA/RNA Shield（400 μ L）に加える。

3. Zymo-Spin IICR Column に上記 Step 2 の混合液を加え、遠心する (8,000 rpm で1分間遠心、濾液は廃棄)。
4. Pathogen DNA/RNA Wash Buffer で洗浄する (500 μ L、8,000 rpm で1分間遠心、濾液は廃棄)。これを計2回行う。
5. エタノールで洗浄する (100%、500 μ L、8,000 rpm で1分間遠心、濾液は廃棄)。
6. ZymoBIOMICS DNase/RNase-Free Water で溶出 (25 μ L、8,000 rpm で1分間遠心、濾液を回収)

2. 夏季腎腫大症

6月から10月の高水温期に見られる。特徴的な症状としては腎臓の肥大が挙げられる (図1)。腎臓の肥大に加え、体表での出血や内臓での褪色 (例: エラでの貧血) が見られる場合もある (図2)。発症サイズは主に100g以下である。日間死亡率は高い時は0.3%程度で、斃死は3-4週間ほど継続する場合がある。これまでに夏季腎腫大症を呈する病魚からは4種類のウイルスが検出されている (H30年型夏アドマウイルス、R4型夏アドマウイルス、R4型パルボウイルス、R4型ハンタウイルス)。異なる種類のアドマウイルスが検出されており、混乱を避けるためにウイルス名には検出年を含めている。アドマウイルスとパルボウイルスはDNAウイルスであるが、ハンタウイルスはRNAウイルスである。そのため、ハンタウイルスの検出には逆転写反応を要する。

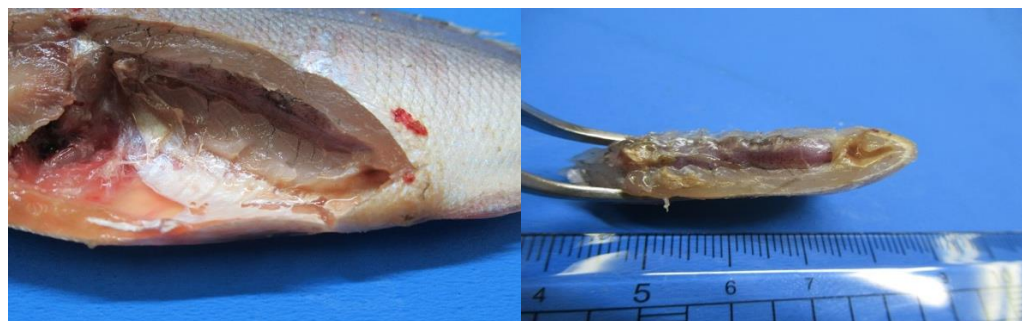


図1. 夏季腎腫大症を呈するマダイ稚魚 (原川翔伍氏 提供)

病魚 (写真左) の腎臓部位を切り出すと、腎臓が肥大していることが見てとれる (写真右)



図2. 夏季腎腫大症を呈するマダイ稚魚で見られた、体表での出血（写真左）と鰓での褪色（写真右）（原川翔伍氏 提供）

夏季腎腫大症：H30年型夏アドマウウイルス検出のためのPCR法

プライマー配列

Primer name	Sequene (5' → 3')
MSAV F	CACATCAGTTTCCCACACCAGC
MSAV R	AGACACATAGTTGCGGGCTTCT

Target: ~220 bp

反応条件

94°C	2 min	} 35 cycles
94°C	20 sec	
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	1 min	

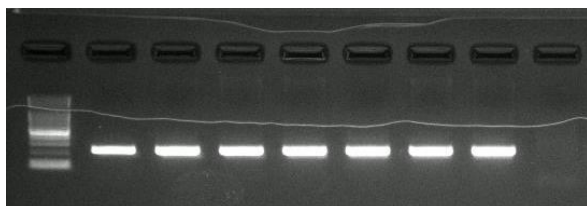
反応液の調製法

Reagent	Volume
2X Master Mix ^a	10.0 μL
Primer Fw (10 μM)	0.5 μL ^b
Primer Rv (10 μM)	0.5 μL ^b
H ₂ O	8.0 μL
gDNA	1.0 μL

^a GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega, M7422)

^b Final concentration of each primer: 0.25 μM

検査結果の例



マーカー（一番目のレーン）にはニッポンジーン Gene Ladder 100 (Cat#: 316-06951)を使用

夏季腎腫大症：R4 年型夏アトマウイルス検出のための PCR 法

プライマー配列

Primer name	Sequene (5' → 3')
108_RS-Madai-Virus-F13	ACAGAGCTACGTCAATGAGC
109_RS-Madai-Virus-R13	CACATTACGATAGACATGTC

Target: ~480 bp

反応条件

95°C 2 min
95°C 30 sec
55°C 30 sec
72°C 60 sec
72°C 5 min

} 40 cycles

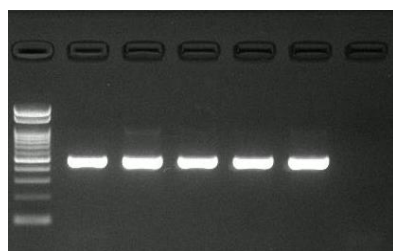
反応液の調製法

Reagent	Volume
2X Master Mix ^a	10.0 μL
Primer Fw (10 μM)	0.5 μL ^b
Primer Rv (10 μM)	0.5 μL ^b
H ₂ O	7.0 μL
gDNA	2.0 μL

^a GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega, M7422)

^b Final concentration of each primer: 0.25 μM

検査結果の例



マーカー（一番目のレーン）にはニッポンジーン Gene Ladder 100 (Cat#: 316-06951)を使用

夏季腎腫大症：R4 型パルボウイルス検出のための PCR 法

プライマー配列

Primer name	Sequene (5' → 3')
104_RS-Madai-Virus-F11	CTCCATTCTAGGTACTAGC

Target: ~600 bp

反応条件

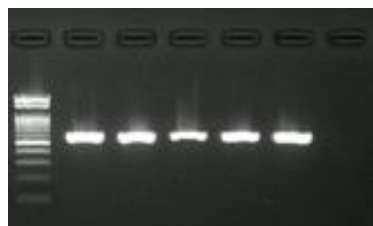
95°C	2 min	} 40 cycles
95°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	60 sec	
72°C	5 min	

反応液の調製法

Reagent	Volume
2X Master Mix ^a	10.0 μL
Primer Fw (10 μM)	0.5 μL ^b
Primer Rv (10 μM)	0.5 μL ^b
H ₂ O	7.0 μL
gDNA	2.0 μL

^a GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega, M7422)^b Final concentration of each primer: 0.25 μM

検査結果の例



マーカー（一番目のレーン）にはニッポンジーン Gene Ladder 100 (Cat#: 316-06951)を使用

夏季腎腫大症：R4型ハンタウイルス検出のためのPCR法

ハンタウイルスはRNAウイルスである。そのため、検体からRNAを抽出し、逆転写反応を行う必要がある。本検査では核酸抽出に Quick-DNA/RNA Pathogen Kit (ZYMO RESEARCH, Cat# R1042)、逆転写反応に ReverTraAce (TOYOBO, Cat# TRT-101)を使用した。

プライマー配列

Primer name	Sequence (5' → 3')
94_RS-Madai-Virus-F6	CCTAGATGGGATGGATATGG
95_RS-Madai-Virus-R6	TGTCTGTCACATCGTTCCAC

Target: ~380 bp

反応条件

95°C 2 min
 95°C 30 sec
 55°C 30 sec
 72°C 60 sec
 72°C 5 min

} 40 cycles

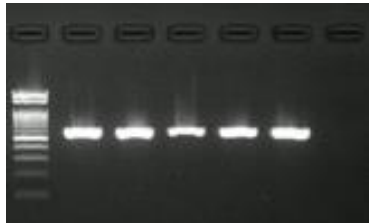
反応液の調製法

Reagent	Volume
2X Master Mix ^a	10.0 μL
Primer Fw (10 μM)	0.5 μL ^b
Primer Rv (10 μM)	0.5 μL ^b
H ₂ O	7.0 μL
gDNA	2.0 μL

^a GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega, M7422)

^b Final concentration of each primer: 0.25 μM

検査結果の例



マーカー（一番目のレーン）にはニッポンジーン Gene Ladder 100 (Cat#: 316-06951)を使用

3. 冬季貧血症

2月から3月の低水温期（12～14℃）に見られる疾病である。症状としては鰓の白化（貧血）、腸管内の液体貯留、体表のスレが挙げられる（図3）。発症サイズは主に200～400gである。日間死亡率が0.3%に至ることもあり、数週間にわたり斃死が継続する。なお、2019年以降は同様の症状を示す大量斃死は確認されていない。これまでに病魚からは1種類のウイルスが検出されている（冬アダムウイルス）。アダムウイルスはDNAウイルスであるため、PCR検査にはゲノムDNAを用いる。



図3. 冬季貧血症を呈するマダイ (原川翔伍氏 提供)
 病魚では鰓の白化 (貧血、上段写真左) や腸管内における液体の貯留 (上段写真右、矢印)、体表 (下段) のスレが見られる。

冬季貧血症：冬アドマウイルス検出のための定量 PCR 法

冬季貧血症 (冬アドマウイルス) の検査には定量 PCR 法を用いた。その方法を以下に記載する。

プローブとプライマー配列

Primer name	Sequene (5' → 3')
MWAVFq	GCGTAACCAGCGAGCAGTTT
MWAVRq	GCATGATCCCTCGGAGACAT
MWAVPq*	TGGCCCCACCTACACGTCTCTGATACC

Target: ~110 bp

* プローブには、FAM (5')および BHQ1 (3')で標識されているものを使用した。

反応液の調製法

Probe Primer Mix

Reagent	Volume
Primer Fw (10 μ M)	400 μ L
Primer Rv (10 μ M)	400 μ L
Probe (100 μ M)	10 μ L
H ₂ O	190 μ L

Reaction Mix

Reagent	Volume
2X Master Mix ^a	12.5 μ L
Probe-Primer Mix	2.5 μ L ^b
H ₂ O	5.0 μ L
DNA	5.0 μ L

^a FirstStart Essential DNA Probes Master (Roche, 06402682001)

^b Final concentration of probe and each primer: 100 nM and 400 nM

反応条件

95°C 1 min
95°C 10 sec
60°C 30 sec) 40 cycles