

伝染性腭臓壊死症
病原体: RNAウイルス
伝染性腭臓壊死症原因ウイルス (IPNV)
ビルナウイルス科、アクアビルナウイルス属 類似ウイルス: YTAV, VDV
宿主: サケ科魚類

区分	手法名 (文献)	プライマー		反応温度条件	増幅 産物	備考	推奨度
		名称	配列 (5'-3')				
RT-PCR	III/V (1st-RT-PCR) I/II (2nd-PCR) Lopez-Lastra et al., (1994)	III	CGG AAA TAC GAC ATC CAG AGC	94℃6分→(92℃1分, 55℃2分, 72℃3分)×40サイクル→72℃5分	657	原報のRT-PCRは2ステップ法で行う。VP領域を増幅し、検出限界は1pgウイルスRNA量である。	—
		V	GCG GTC TGC TGG TTG AGC TGG		263	III/Vのnested PCR	—
		I	CCA ACT GGG TTT GAC AAG CC				
		II	GTC TCA TTG ACG GGT TCG GC				
	Pr D1/Pr D2 Blake et al., 1995	Pr D1	AAA GCC ATA GCC GCC CAT GAA C	(94℃30秒, 58℃30秒, 72℃1分)×35サイクル	174	原報は2ステップ法。NSからVP3領域を増幅。検出限界は1-10 TCID ₅₀ /mL。	—
		Pr D2	TCT CAT CAG CTG GCC CAG GTA C				
	Pr D Wang et al., 1997	Pr D プライマーセット	CGG AAA TAC GAC ATC CAG AGC	42℃50分→95℃5分→ (94℃1分, 55℃1分, 72℃1分30秒)×35サイクル→72℃7分	274	原報はワンステップ法。VP2領域を増幅する。検出限界は15fgウイルスRNA量。	—
			TGG CTC CGT TCA TGG ACT GG		524	原報はワンステップ法。VP2領域を増幅する。検出限界は15pgウイルスRNA量。	—
	Pr F Wang et al., 1997	Pr Fプライマーセット	GCC GAC ATC GTC AAC TCC AC				
			GAC AGG ATC ATC TTG GCA TA				
	P1/P2 (1st-RT-PCR) P3/P4 (2nd-PCR) Suzuki et al., (1997)	P1	AGA GAT CAC TGA CTT CAC AAG TGA C	(95℃1分, 48℃1分, 72℃1分)×30サイクル	359	原報は2ステップ法。Segment Aを増幅。検出限界は1pgウイルスRNA量である。本法は海水魚に感染するアクアビルナウイルスも検出できる。	—
		P2	TGT GCA CCA CAG GAA AGA TGA CTC		168	P1/P2のnested PCR。VP2/NS結合部を増幅する。検出限界は1fgウイルスRNA量である。本法は海水魚に感染するアクアビルナウイルスも検出できる。	—
		P3	CAA CAC TCT TCC CCA TG				
		P4	AGA ACC TCC CAG TGT CT				
	DIAIPNF/DIAIPNR Taksdal et al., (2001)	DIAIPNF	ATC TGC GGT GTA GAC ATC AAA G	94℃5分→(95℃30秒, 55℃15秒, 72℃30秒)×40サイクル→72℃7分	224	原報は2ステップ法。NSからVP3領域を増幅する。ウイルス分離法よりも感度が良い。	—
		DIAIPNR	TGC AGT TCC TCG TCC ATC CC				
	DIAIPNF/DIAIPNR Kerr et al., (2006)	DIAIPNF	ATC TGC GGT GTA GAC ATC AAA G	(94℃1分, 60℃1分, 72℃1分)×35サイクル→72℃7分	224	原報は2ステップ法。45サイクルでは非特異的バンドがでやすい。Taksdal et al., (2001)の変法。	—
		DIAIPNR	TGC AGT TCC TCG TCC ATC CC				
	DIAIPNF/DIAIPNR (1st-RT-PCR) IPNNESTF/IPNNESTR (2nd-PCR) Ahmadi et al., (2013)	DIAIPNF	ATC TGC GGT GTA GAC ATC AAA G	94℃2.5分→(94℃50秒, 60℃45秒, 72℃50秒)×35サイクル→72℃5分	224	原報は2ステップ法。Taksdal et al., (2001)の変法。	—
		DIAIPNR	TGC AGT TCC TCG TCC ATC CC				
		IPNNESTF	GAC ATC AAA GCA ATC GCA GCC C	94℃2.5分→(94℃50秒, 55℃45秒, 72℃50秒)×35サイクル→72℃5分	164	DIAIPNF/DIAIPNRのnested-PCR。Firstと比べると、アニーリング温度が異なる。	—
		IPNNESTR	AGG TAC TTG ATC CTC TTG TTG G				
	DIAIPNF/DIAIPNR Soliman et al., (2009)	DIAIPNF	ATC TGC GGT GTA GAC ATC AAA G	50℃1時間→94℃5分→ (95℃30秒, 55℃15秒, 72℃30秒)×40サイクル→72℃5分	224	原報はワンステップ法。Taksdal et al., (2001)の変法。検出限界は1pgウイルスRNA量(ウイルス1.6x105粒子数に相当)である。本論文ではRT-LAMP法も開発しており、検出限界は0.001fg(ウイルス粒子1.6粒子)である。	—
		DIAIPNR	TGC AGT TCC TCG TCC ATC CC				
	I/II Yoshinaka et al.,(1998)	I	CCA ACT GGG TTT GAC AAG CC	(94℃30秒, 44℃30秒, 72℃1分)×40サイクル	263	Lopez-lastra et al., (1994)のIPNV特異プライマーI/II (VP2領域)およびIHNVの特異プライマーを用いて、1チューブでIPNVとIHNVを同時に検出できる(Multiplex RT-PCR)。	—
		II	GTC TCA TTG ACG GGT TCG GC				

伝染性腭臓壊死症 続

RT-PCR	WB1/WB2 Williams et al.,(1999)	WB1	CCG CAA CTT ACT TGA GAT CCA TTA TGC	94℃4分→(94℃30秒, 60℃30秒, 72℃1分30秒)×40サイクル→72℃10分	206	原報のRT-PCRは2ステップ法で行う。IPNV特異プライマーWB1/WB2(VP2領域)およびIHNV, VHSVそれぞれの特異プライマーを用いて、1チューブで3種類のウイルスを同時に検出できる(Multiplex RT-PCR)。	☆
		WB2	CGT CTG GTT CAG ATT CCA CCT GTA GTG				
リアルタイムRT-PCR	SYBR 1916F/1999R Bowers et al.,(2008)	1916F	AGG AGA TGA CAT GTG CTA CAC CG	95℃10分→(95℃10秒, 60℃60秒)×40サイクル	84	原報は2ステップ法で行う。SYBR® Green (iQ SYBR® Green Supermix)を使用する。検出限界はウイルスRNA量0.01fg(ウイルスゲノム10コピー)である。	—
		1999R	CCA GCG AAT ATT TTC TCC ACC A				
	TaqMan IPNVSP McBeath et al.,(2007)	IPNVSP-F	GCC AAG ATG ACC CAG TCC AT	50℃2分→95℃10分→(95℃15秒, 60℃1分)×45サイクル(サイクル毎に蛍光を検出)	66	原報は2ステップ法で行う。VP領域を標的とする。TaqMan® (Applied Biosystems)を使用する。	—
		IPNVSP Probe	6FAM- CCG ACC GAG AAC AT -MGB				
		IPNVSP-R	TGA CAG CTT GAC CCT GGT GAT				
	TaqMan VP2 Ellis et al.,(2010)	VP2-F	GCC TAC CCC CCG TTC CT	50℃2分→95℃10分→(95℃15秒, 60℃1分)×45サイクル(サイクル毎に蛍光を検出)	66	原報は2ステップ法で行う。VP領域を標的とする。TaqMan® (Applied Biosystem)を使用する。	—
		VP2 Probe	6FAM-CGA CAG GAG CCC TCA C -MGB				
		VP2-R	CCC GTC ACT GTT GTT GAG TTG A				
	Sp8 Calleja et al.,(2012)	Sp8-F #8 Probe Sp8-R	CTG AAC GGG ACG CTC AAC	60℃3分→95℃30秒→(95℃15秒, 60℃1分, 72℃10秒)×45サイクル→40℃10秒(サイクル毎に蛍光を検出)	情報無	IPNVの40株を材料とし、TaqManを用いて、血清型SpIに属する株とWB1に属する株のそれぞれの検出系を確立している。LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes (Roche Diagnostics)を用いて、ワンステップで定量RT-PCRを実施する。	—
			GAA GGC AG				
			TCA GGC TCT CCA CCT CAG AC				
	WB117 Calleja et al.,(2012)	WB117-F #117 Probe WB117-R	GCG GTT CGA CTT CAT TCT ACA	60℃3分→95℃30秒→(95℃15秒, 60℃1分, 72℃10秒)×45サイクル→40℃10秒(サイクル毎に蛍光を検出)	情報無		
			CTT GGG CT				
			GAG CTT GTC ACG GAG ACC AC				
	VP1 Tapia et al., (2015)	VP1F Probe VP1 VP1R	GTT GAT MMA STA CAC CGG AG	48℃10分→95℃10分→(95℃15秒, 59℃45秒)×40サイクル(サイクル毎に蛍光を検出)	152	原報はワンステップで定量RT-PCRを実施する。AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems)を用いて、segment BのVP1を標的として検出する。	—
			56FAM-TACATAGGC-ZEN-AAAACCAAAGGAGACAC-IABkFQ				
AGG TCH CKT ATG AAG GAG TC							
qRT-PCR 2 Tapia et al., (2015)	WB1 WB2	CCG CAAC TTA CTT GAG ATC CAT TAT GC	50℃5分→95℃3分→(95℃5秒, 60℃10秒)×40サイクル、70-95℃で分析する。	206	qRT-PCR 2とqRT-PCR 3はsegment AのVP2を標的とし、2× Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix (Stratagene)を用いて、検出する。	—	
		CGT CTG GTT CAG ATT CCA CCT GTA GTG					
qRT-PCR 3 Tapia et al., (2015)	VP2F VP2R	TCCAAC TACGAGCTGATCCC		164			—
		GTCCTCTCCTTG TACTCCTC					

注)RT-PCRで使用する推奨プライマーを、DIAIPNF/DIAIPNRからWB1/WB2に変更した(2026年6月)。

伝染性膵臓壊死症 文献

Ahmadi, N., Oryan, A., Akhlaghi, M. and Hosseini, A. (2013) Tissue distribution of infectious pancreatic necrosis virus serotype Sp in naturally infected cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): an immunohistochemical and nested-PCR study. J. Fish Dis., 36, 629–637.

Blake, S. L., Schill, W. B., McAllister, P. E., Lee, M., Singer, J. T. and Nicholson, B.L. (1995) Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. J. Clin. Microbiol., 33, 835–839.

Bowers, R. M., Lapatra, S. E. and Dhar, A. K. (2008) Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. J. Virol. Methods, 147, 226–234.

Calleja, F., Godoy, M. G., Cárcamo, J. G., Bandín, I. and others (2012) Use of reverse transcription-real time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) assays with universal probe library (UPL) probes for the detection and genotyping of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated in Chile. J. Virol. Methods, 183, 80–85.

Ellis, A. E., Cavaco, A., Petrie, A., Lockhart, K., Snow, M. and Collet, B. (2010) Histology, immunocytochemistry and qRT-PCR analysis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., postsmolts following infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). J. Fish Dis., 33, 787–863.

Kerr, C. R. C. and Cunningham, C. O. (2006) Moving molecular diagnostics from laboratory to clinical application: a case study using infectious pancreatic necrosis virus serotype A. Lett. Appl. Microbiol., 43, 98–104.

Lopez-Lastra, M., Gonzales, M., Jashes, M. and Sandino, A. M. (1994) A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reaction (PCR). J. Fish Dis., 17, 269–282.

McBeath, A. J. A., Snow, M., Secombes, C. J., Ellis, A. E. and Collet, B. (2007) Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. Fish Shellfish Immunol., 22, 230–241.

Soliman, H., Midtlyng, P. J. and EL-matbouli, M. (2009) Sensitive and rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus by reverse transcription loop mediated isothermal amplification. J. Virol. Methods, 158, 77–83.

Suzuki, S., Hosono, N. and Kusuda, R. (1997) Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription- and nested PCR. J. Mar. Biotechnol., 5, 205–209.

Tapia, D., Eissler, Y., Torres, P., Jorquera, E., Espinoza, J. C. and Kuznar, J. (2015) Detection and phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. Dis. Aquat. Org., 116, 173–184.

Taksdal, T., Dannevig, B. H. and Rimstad, E. (2001) Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 21, 214–219.

Wang, W.S., Wi, Y. L. and Lee, J. S. (1997) Single-tube, non-interrupted reverse transcription PCR for detection of infectious pancreatic necrosis virus. Dis. Aquat. Org., 28, 229–233.

Williams, K., Blake, S., Sweeney, A., Singer, J. T. and Nicholson, B. L. (1999) Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. J. Clin. Microbiol. 37, 4139–4141.

Yoshinaka, T., Yoshimizu, M. and Ezura, Y. (1998) Simultaneous detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). Fish. Sci., 64, 650–651.