

(別添)

ヒラメに寄生した *Kudoa septempunctata* の検査方法について

平成 28 年 6 月

農林水産省 消費・安全局

畜水産安全管理課

## 目 次

I	はじめに	1
II	試料の採取方法	1
III	検査方法	2
III-1	(1) 検鏡検査法	3
1.	検鏡検査に必要な器具類	3
2.	試料の採取	4
3.	試料の塗抹	5
4.	固定と染色	6
5.	洗浄	7
6.	検鏡	7
7.	結果の判定	8
III-2	(2) 検鏡検査法（生検法）	10
1.	検鏡検査（生検法）に必要な器具類	10
2.	試料の採取	10
3.	試料の作成	12
4.	検鏡	13
5.	結果の判定	13
III-3	(3) PCR 検査法	14
1.	PCR検査に必要な器具類	14
2.	試料の採取	15
1)	稚魚からの採取	15
2)	成魚からの採取	18
3)	DNAの抽出	19
3.	PCR検査	21
1)	クドアのPCR法による検査手順	21
2)	<i>k. thyrsites</i> （クドア・シルシテス）のPCR法による検査手順	24
3)	<i>K. lateolabracis</i> （クドア・ラテオラブラシス）のPCR法による 検査手順	25
4.	結果の判定	26
IV	寄生が確認された場合の取扱い	27
	参考文献	28

## 参考資料

- ① *Kudoa septempunctata* とは…………… 29
- ② 「養殖ヒラメに寄生する新種のクドア属粘液胞子虫による食中毒の防止技術の開発」の概要…………… 30
- ③ レギュラトリーサイエンス新技術開発事業「寄生虫（クドア・セプテンプンクタータ）に対するリスク管理に必要な技術開発」の概要…………… 31
- ④ ヒラメからの *Kudoa septempunctata* 検査法（厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部監視安全課長通知（平成 28 年 4 月 27 日付け生食監発 0427 第 3 号別添））…………… 33

## I はじめに

養殖ヒラメに寄生した新種の粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata*（以下「クドア」という。）が原因とされる食中毒を防止するため、クドアが寄生したヒラメを養殖場から流通させないことを目的として、①養殖場にクドアが寄生した種苗を持ち込まない、②クドアが寄生したヒラメを養殖場から出荷しないため、以下の検査を確実に実施して下さい。

## II 試料の採取方法

本検査方法は、ヒラメ種苗生産施設や養殖場（以下「養殖場等」という。）で生産・飼育されているヒラメの稚魚及び成魚を対象とします。

ヒラメにクドアが寄生しているかどうかを判別するためには、筋肉組織の一部を採取して検査を行う必要があります。検査は、種苗や成魚を出荷する前に、種苗導入時の来歴（導入先や導入時期、サイズ、導入時のクドア検査等）や飼育方法（取水方式及びろ過装置、飼育形態、敷砂の有無、使用餌料等）が同じ群毎に、無作為に30尾以上を抽出して行って下さい。

クドアが寄生してもヒラメの外観、肉質、行動等は変化しません。したがって、検査を行う際には、必ず群の中から無作為に選んで下さい。飼育の途上で選別などの理由により複数の来歴の群を混合している場合には、群全体の寄生率が低くなる可能性があるため、検査尾数を30尾よりも多くする必要があります。検査魚の抽出方法など検査の具体的な計画を検討する際には、必ず都道府県庁又は水産試験場等の指導を受けて下さい。

### 検査に必要な尾数

養殖ヒラメは活魚での出荷が前提とされているため、全個体からの組織採取が困難です。また、養殖場等では数千尾～数万尾の魚が同一の飼育水槽で飼育されており、個々の魚を区別するのは困難です。このため、養殖場等におけるクドアの寄生の確認は、飼育群毎に統計的な基準に従って一定尾数を取り出して検査する標本検査を行う必要があります。

平成23年度に実施した「養殖ヒラメに寄生する新種のクドア属粘液胞子虫による食中毒の防止技術の開発」の調査の中で、クドアの寄生が確認された事例における飼育群毎の感染率は平均44%、最も低い事例では10%でした。国際獣疫事務局（OIE）の水生動物衛生規約（the Aquatic Animal Health Code）では、寄生率を10%と仮定した場合、飼育群の陰性を信頼限界95%で証明するために必要な検査尾数は、500尾の飼育ロットで28尾以上、1,000尾～100,000尾の飼育ロットで29尾以上が必要とされていることから、検査に必要な尾数を30尾以上としました。

### Ⅲ 検査方法

クドアの寄生の有無を定性的に把握するためには、以下の検査を実施して下さい。

- (1) 検鏡検査法 ヒラメの筋肉組織の塗抹標本を、レフレルメチレンブルー染色し、光学顕微鏡でクドアの粘液胞子の有無を観察する（うち、生検法はヒラメを生かしたまま検査する方法）。
- (2) PCR 検査法 種特異的なプライマーを用いた PCR 検査により、クドアの遺伝子の有無を定性的に確認する。
- (3) 厚生労働省通知「ヒラメからの *Kudoa septempunctata* 検査法」（平成 28 年 4 月 27 日付け生食監発 0427 第 3 号別添）で定めるスクリーニング法（リアルタイム PCR 法、イムノクロマトグラフィー法、LAMP 法）（参考資料④、33 ページ参照）

なお、クドアの寄生状況を定量的に把握する場合には、厚生労働省通知「ヒラメからの *Kudoa septempunctata* 検査法」の顕微鏡検査法（参考資料④、33 ページ参照）を実施して下さい。

#### 検査方法について

本稿では、クドアの検査方法について、(1) 検鏡検査法(生検法を含む)と(2) PCR 検査法を併記しています。検鏡検査法は、食中毒の原因と考えられている粘液胞子を目視により検査する方法で、技術的に簡易で光学顕微鏡の他に特別な検査機器を必要としない、1 検体当たりの検査コストが低いという利点があります。一方、PCR 検査法は、クドアの粘液胞子以外のステージ(栄養体や放線胞子)や少量の胞子も検出できる反面、専用の機器等の整備や検査技術の習得が必要で、1 検体当たりのコストが比較的高額です。

なお、ヒラメ種苗の検査を行う場合には、まだヒラメ稚魚の体内で粘液胞子が形成されていない可能性があるため、検鏡検査法ではなく、栄養体等の粘液胞子以外のステージのクドアも検出できる PCR 検査法を使用して下さい。

また、検鏡検査法や PCR 法と比べ、多くの検体を効率的に検査できる検出法も報告されています(Jeon et al., 2014; Sugita-Konishi et al., 2015)。ヒラメの出荷に際しクドアの胞子数が確実に食品衛生法の規制値よりも低い検体を判別するためのスクリーニング法として、養殖場に稚魚を導入する際の検査法あるいはヒラメ種苗の放流前の検査法として導入することができます。新たな方法を導入する場合には、出荷に際してのスクリーニング法では規制値よりも確実に低いと判定できる感度、稚魚の検査法では PCR 法と同等以上の検出感度が必要です。スクリーニング方法を導入する際には、その方法の感度などを他の検査法の結果との比較や複数の試験機関などで確認した上で使用して下さい。

### Ⅲ－（１） 検鏡検査法

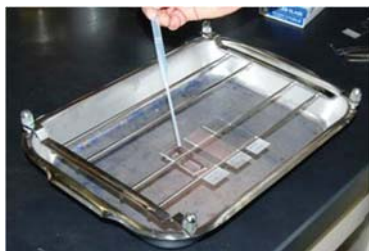
検鏡検査法は、食中毒の原因とされているクドアの粘液胞子を染色して検鏡することにより直接的に確認する方法です。

#### 1. 検鏡検査に必要な器具類

- a スライドガラス（汎用品で可）
- b カバーガラス（汎用品で可）
- c レフレルメチレンブルー染色液（市販品）  
（自作する場合は下欄参照）
- d 99.5%エタノール（市販品）
- e 実験用手袋
- f 綿棒（汎用品で可）
- g ピンセット
- h スポイト
- i 染色用バット（食品トレイでも代用可能）
- j 光学顕微鏡（200倍以上が観察できるもの）



写真1 検鏡に必要な器具類（a～h）



食品トレイと箸で代用

写真2 染色用バットと代用の食品トレイ（i）



写真3 光学顕微鏡（j）

#### レフレルメチレンブルー染色液作製方法

- ① メチレンブルー原液  
メチレンブルー1.4gを95%エタノール100mLに溶解する。  
電子レンジ等で加熱すると早く溶ける。引火に注意すること。
- ② レフレルメチレンブルー液  
メチレンブルー原液 30mL、1%水酸化カリウム溶液 1mL、蒸留水 100mLを混合。  
密封して37°Cに1ヶ月間以上おき、熟成させてから使用する（常温で保存可）。

## 2. 試料の採取

検査個体に既に延髄や尾柄部切断等による筋肉の切開部がある場合は、その切開部位から乾いたままの綿棒の先端を全て筋肉中に差し込み、10回程度綿棒を回転させ、細胞を採取する。切開部位がない場合は、新たにメスで筋肉に切れ込みを入れる。1個体からどこか1カ所を採取すれば良い（写真4～11）。



写真4 有眼側の切断部位

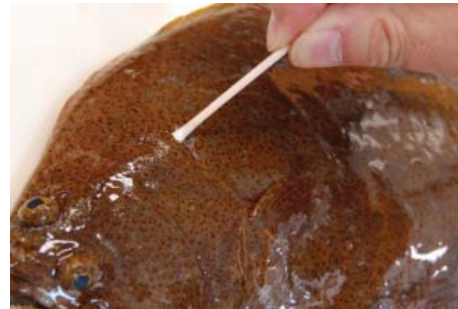


写真5 同左 組織の採取



写真6 無眼側の切断



写真7 無眼側の切断部位



写真8 無眼側組織の採取



写真9 尾柄部の切断



写真10 尾柄部の組織採取



写真11 組織を採取した綿棒

### 3. 試料の塗抹

綿棒をスライドガラス表面に円を描くように擦り付けて、採取した細胞を1円玉大の範囲に塗抹する。綿棒自体も親指と人差し指で回転させ、綿棒の全面を塗抹する(写真12~14)。筋肉や脂肪などの組織片が目に見えてスライドガラスに塗布されると、観察の妨げになるので注意する。

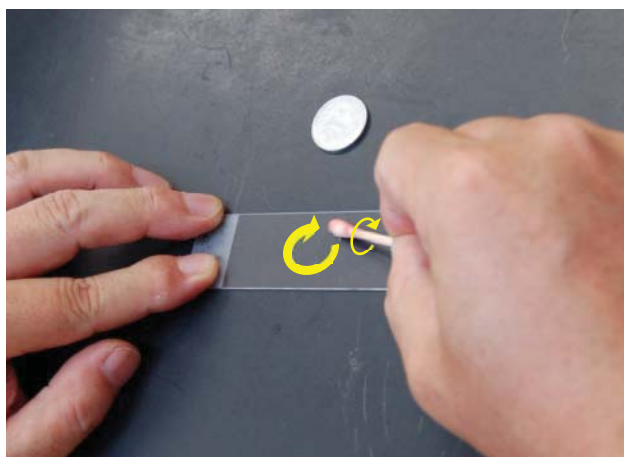


写真12 採取した組織をスライドガラスに塗抹

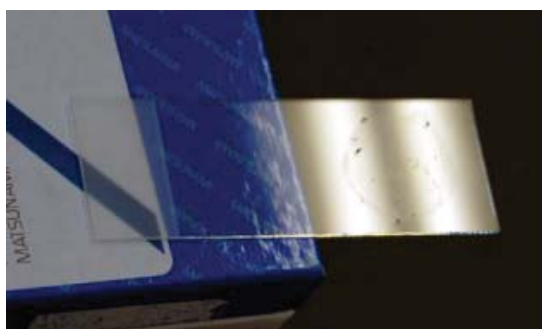


写真13 塗抹したスライドガラス

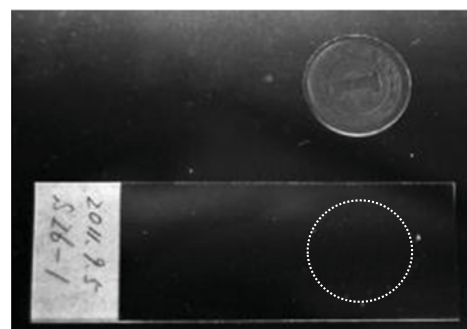


写真14 塗抹面の大きさ

ドライヤーの冷風、送風機、うちわ等を用いて、塗抹部が完全に乾くまでスライドガラスを風乾する。ドライヤーを用いる場合は、温風や熱風は使用しないように注意する(写真15)。



写真15 塗抹面の風乾



#### 4. 固定と染色

染色バットに風乾したスライドグラスを並べ、99.5%エタノールでスライドグラス全面を覆い、塗抹標本を1～2分間固定する（写真16、17）。エタノールを載せて1～2分静置したのち、スライドグラスを傾けてエタノールを捨てる（写真18）。染色バットが無い場合は、食品トレイを良く洗浄し、割り箸を並べたもので代用できる（写真19）。

レフレルメチレンブルー染色液をスライドグラスに載せて2分間染色する（写真20、21）。

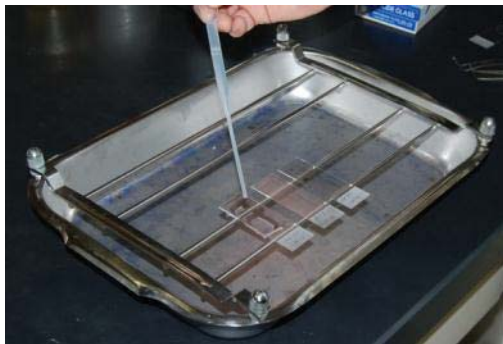


写真16 エタノール固定



写真17 同 左



写真18 エタノールを捨てる



写真19 食品トレイと箸で代用したところ

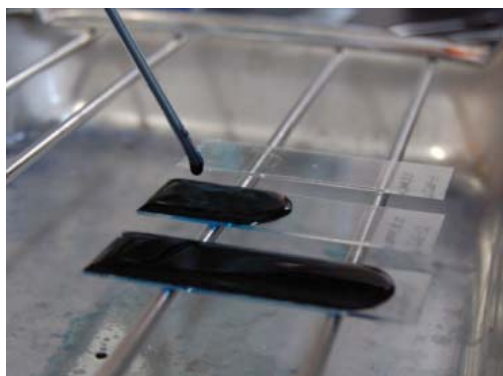


写真20 レフレルメチレンブルーで染色

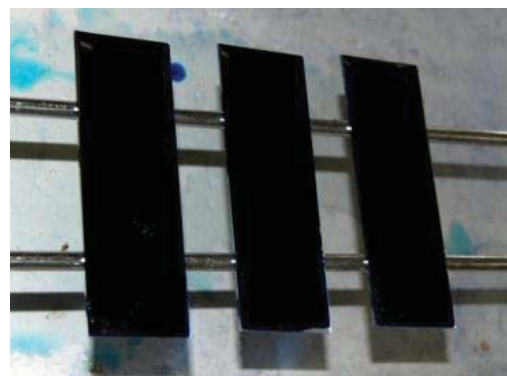


写真21 同 左

## 5. 洗浄



写真 22 スライドガラスの洗浄  
(洗い始め)

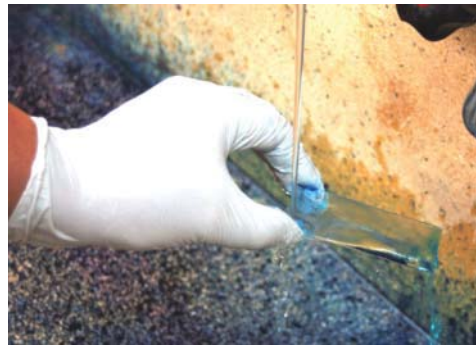


写真 23 スライドガラスの洗浄  
(洗い終り)

標本を流さないようにスライドガラスの塗抹していない方の端から静かに水道水をかけて染色液を浮かすようにして流し、その後スライドガラスの裏面から十分水洗する（写真 22～24）。



写真 24 裏面から洗浄

## 6. 検鏡

風乾後（塗抹面以外は紙タオル等で水道水を拭き取っても構わない）、塗抹面に水道水を1滴垂らし、カバーガラスを載せて顕微鏡（200倍以上）で塗抹部の全面を観察する（写真 25～29）。カバーガラスを載せるときに、気泡が入らないように注意する（風乾せずに、染色液を洗ったままの濡れた状態でカバーガラスをかけても良い）。検鏡する際には、写真 29 のように、ジグザグに塗抹面を観察する。

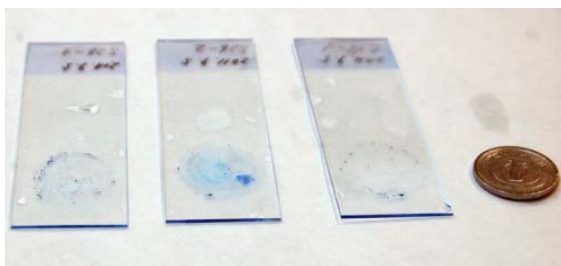


写真 25 水洗後のスライドガラス

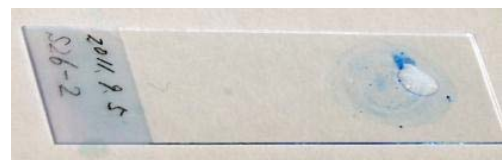


写真 26 塗抹面に水道水を滴下



写真 27 カバーガラスを載せたところ

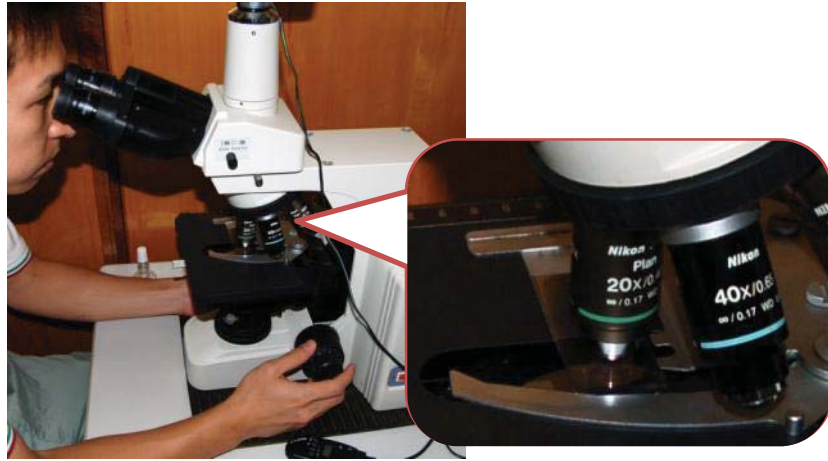


写真 28 検鏡の様子

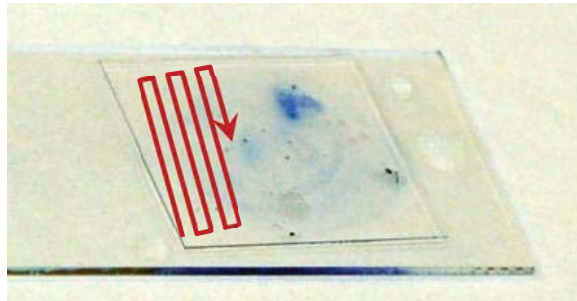


写真 29 検鏡するには塗抹面をジグザグに観察する

## 7. 結果の判定

結果の判定は写真 30 のように、極嚢（きょくのう：花弁のようなもの）が 5～7 個の孢子（写真矢印）が、1 個でも見つければ陽性と判断できる。

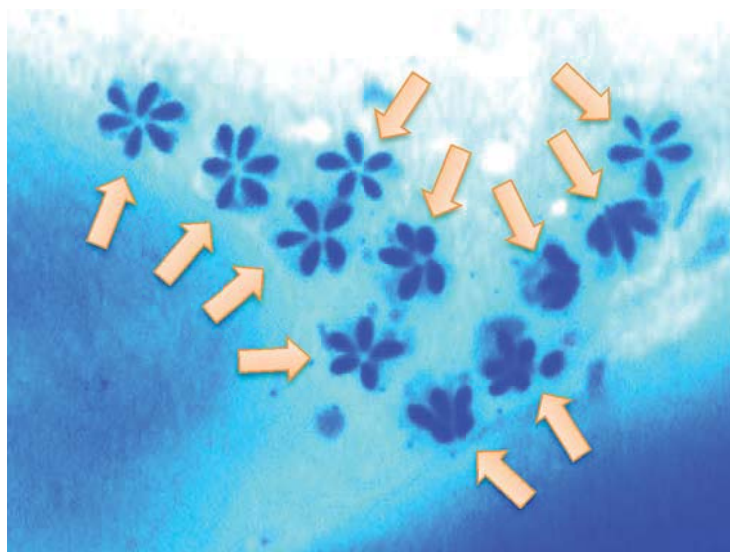


写真 30 クドアの粘液孢子

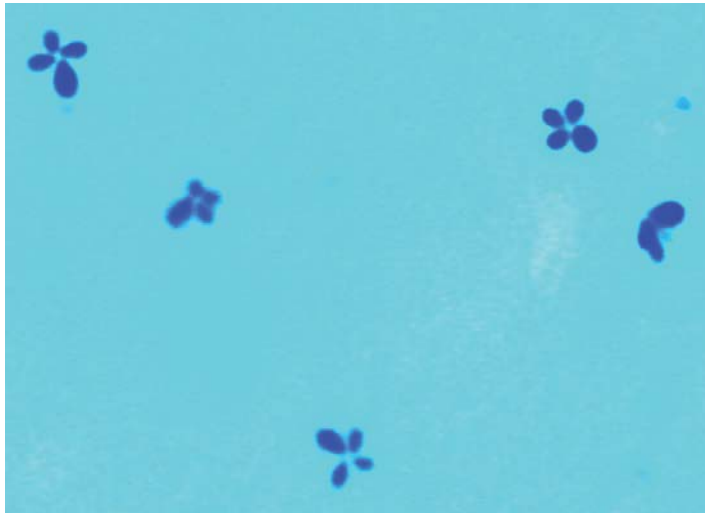


写真 31 極嚢が4個の場合

クドアは陰性。但し、ジェリーミート化の原因となる *Kudoa* 属の粘液胞子虫の *K. thyrsites* 等の寄生が疑われるので、PCR 検査法による再検査について都道府県の水産試験場等に相談する。

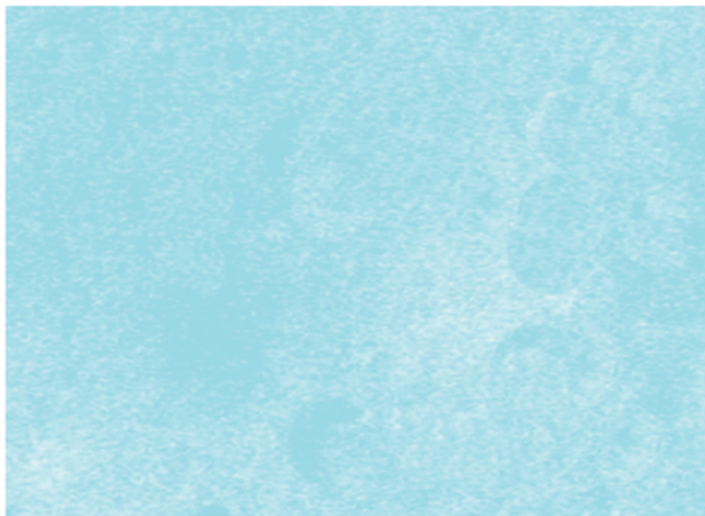


写真 32 全くクドアがない場合

この例では何も映っていないが、実際にはヒラメの細胞の核や破片が塗抹されて見えることも多い。しかしクドアは写真 31、32 のように、必ず花びらのようにくっきりと見えるため、簡単に識別できる。

### Ⅲ－（２） 検鏡検査法（生検法）

生検法(井上ら, 2016) は、ヒラメを活かしたまま注射針で筋肉を採取し染色することで、食中毒の原因とされているクドアの粘液胞子を検鏡により検出する方法です。

#### 1. 生検法に必要な器具類

- a スライドガラス（汎用品で可）
- b カバーガラス（汎用品で可）
- c レフレルメチレンブルー染色液（市販品）  
（自作する場合 3 ページ参照）
- d 注射針  
（14G；株トップ，商品コード 03806 等）
- e 注射筒（注射針が装着可能なもの；50 先、  
50mL など）
- f マイクロチューブ（汎用品で可）
- g 実験用手袋
- h ピンセット
- i スポイト
- j 光学顕微鏡（200 倍以上が観察できるもの）
- k 99.5%エタノール（市販品）

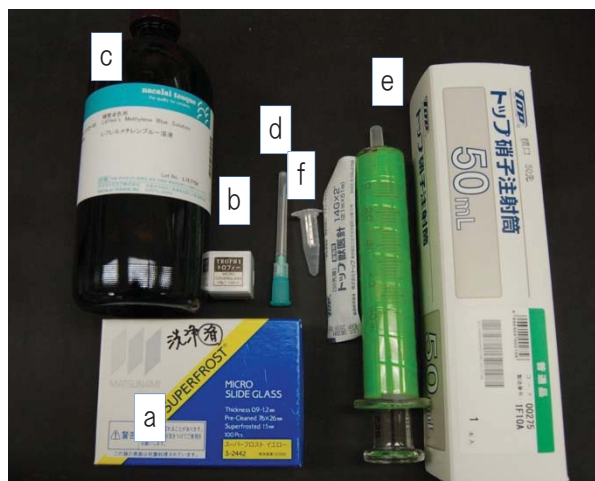


写真1 検鏡に必要な器具類（a～f）

#### 2. 試料の採取

必要に応じて、検査個体をオイゲノール<sup>(注)</sup>で麻酔を施し、作業台の上に乗せ検査個体の眼をタオルなどで覆い暴れないように注意し押さえる（暴れると筋肉採取ができない）。筋肉の採取は注射針を用い、以下の方法等で行う。

##### ①尾柄部の有眼側筋肉を水平に貫通させ採取する方法

尾柄部の腹側から背中側に向けて注射針を貫通させる（写真2）。

##### ②尾柄部の筋肉を垂直に貫通させ採取する方法

尾柄部の有眼側から無眼側へ脊椎骨を避け垂直に注射針を貫通させる（写真3）。この方法で採取する場合は、検査個体を厚みのあるスポンジマットなどの上に乗せ注射針が作業台に刺さらないように注意すること。

##### ③体側部背部の筋肉を水平に貫通させ採取する方法

体側部背部の腹緒側から背緒側方向に注射針を貫通させる（写真4）。

何れの方法においても貫通前に注射筒のピストン部（プランジャー）は抜いておき、貫通させ、検査個体から針の付いた注射筒を抜き取ったのち、プランジャーを注射筒

に差し込み、その空気圧で注射針内の筋肉片をマイクロチューブに吹き出し採取する（写真5）。1個体から3箇所以上採取（総採取筋肉量 50mg 以上）すると、検査漏れのリスクを下げられる。筋肉の採取には、身の厚い部分あるいは水平方向に長めに穿刺すると筋肉量を確保できる。なお、通常、筋肉の採取部位では内出血が起こるので、商品価値を低下させないような部位から採取することが望ましい。

注）オイゲノールは薬浴後、7日間の休薬期間が必要であるので出荷に際して注意が必要。

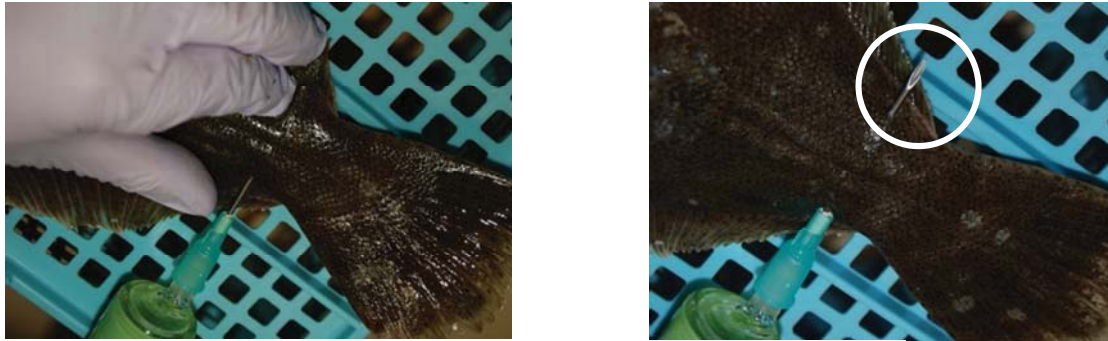


写真2 有眼側尾柄部からの筋肉採取（水平方向）



写真3 有眼側尾柄部からの筋肉採取（垂直方向）



写真4 体側部背部からの筋肉採取

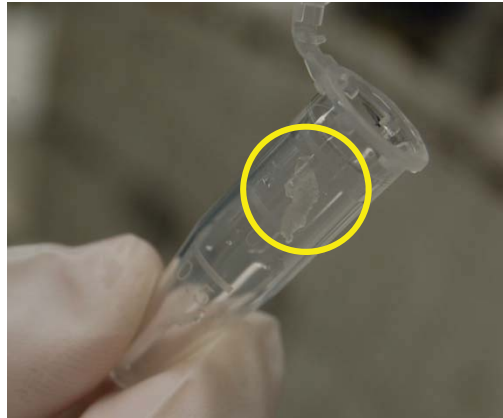


写真5 採取された筋肉片

### 3. 試料の作製

採取した筋肉片をスライドグラス上に取り出す。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）あるいはレフレルメチレンブルー染色液を一滴（ $10\mu\text{L}$ 程度）筋肉片上に滴下し、すぐにカバーグラスで圧片する。筋肉片の厚みがあるため、密着させるためにピンセットなどで、じわじわと押さえるように、しっかりと密着させてゆく（A：写真6～9、B：写真10～12）。

A：プレパラートの作製（PBSを用いる場合）

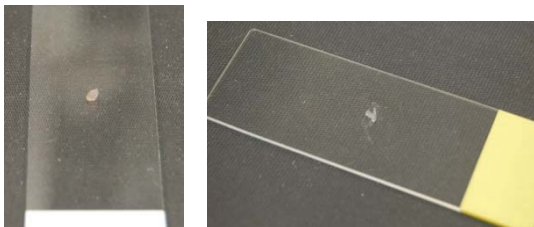


写真6 筋肉片をスライドグラスに乗せる

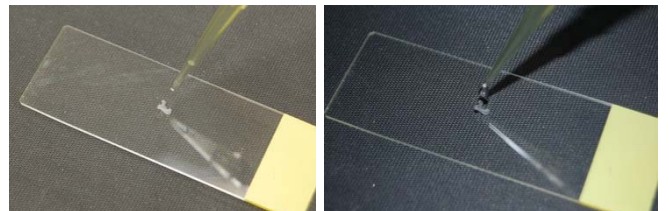


写真7 PBSを1滴滴下する

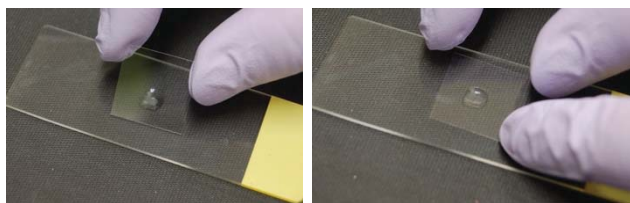


写真8 カバーグラスをかける

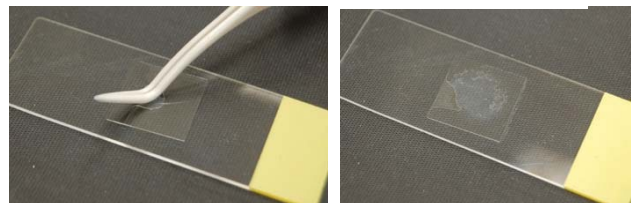


写真9 カバーグラスを密着させる

B: プレパラートの作製 (レフレルメチレンブルー染色液を用いる)

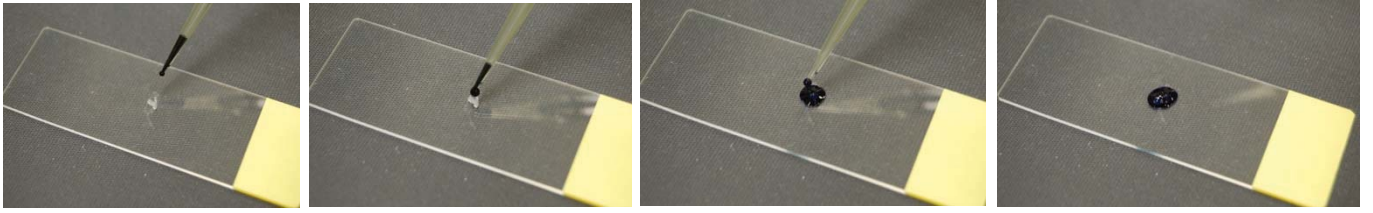


写真10 レフレルメチレンブルー染色液を一滴滴下する

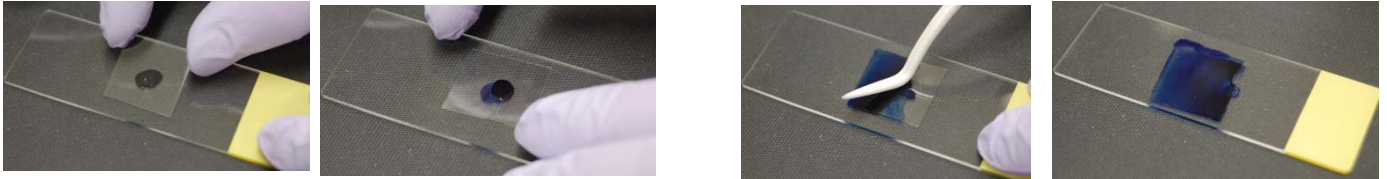


写真11 カバーガラスをかける

写真12 カバーガラスを密着させる

4. 検鏡 (7 ページ参照)

5. 結果の判定 (8 ページ参照)