

Ⅲ－（３）PCR 検査法

PCR 検査法は、クドアの遺伝子の有無を検査する方法で、粘液胞子を形成する前のクドアも検査することができます。

但し、PCR 検査では、キャリーオーバーによる擬陽性反応が起き易いことから、PCR の実施にあたっては、フィルターチップの使用、実験台や器具などの定期的な DNA 除去剤（DNA AWAY など）による清掃、さらには電気泳動を行う部屋と核酸抽出や PCR 試薬を調製する部屋の隔離などの対策を講じる必要がありますので注意して下さい。

また、検査に使用した試料は、再検査等で再び使用することが予想されますので、必ず-20℃以下で冷凍保存してください。

1. PCR 検査に必要な器具類

- a 解剖器具（ハサミ、ピンセット）
- b ホモジナイザー、バイオマッシャー等の破砕機
- c ヘマトクリット毛細管（1.5φ×75mm、ヘパリン処理済）
- d 滅菌スパーテル
- e 核酸抽出試薬（QIAamp DNA Mini Kit; QIAGEN）
- f アルコール（70%以上）
- g マイクロチューブ
- h マイクロチューブ用遠心機
- i プライマー
- j PCR 試薬
- k サーマルサイクラー
- l ローディングバッファー
- m アガロースゲル
- n 電気泳動バッファー
- o 臭化エチジウムゲル染色液
- p 電気泳動装置
- q ゲル撮影装置



写真1 マイクロチューブ (g) とホモジナイザー (b)、ヘマトクリット毛細管 (c)



写真2 核酸抽出試薬 (e)



写真3 マイクロチューブ用遠心機 (h)



写真4 サーマルサイクラー (k)



写真5 電気泳動装置 (p)

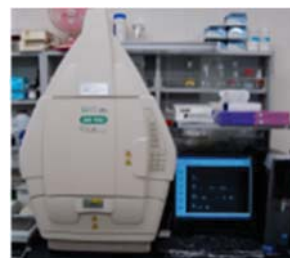


写真6 ゲル撮影装置 (q)

2. 試料の採取

1) 稚魚からの採取

クドアがヒラメのどの部位から寄生するのかは明らかになっていません。しかし、クドアは、感染海域の海水でヒラメ稚魚を飼育すると、2週間以降には、心臓、血液や筋肉においてPCRにより遺伝子が検出されます。一方、顕微鏡による観察では、2ヶ月後に初めてクドアの粘液胞子が検出されたため、感染していたとしても月日の経過していないと考えられる稚魚の検査はPCRにより行う必要があります。検査を行う際には、上記のことを考慮し、心臓、血液あるいは筋肉の何れかを採取してください。筋肉では、筋肉組織の一部を取り出すのではなく以下の手順により体全体を磨砕する方法で試料を採取してください。

① 筋肉組織の採取法

ペーパータオル等で体表面の粘液や汚れをぬぐった後、腹腔を含む頭部とそれ以外の尾部に2分する（写真7）。粘液胞子の主な寄生部位は筋肉なので、尾部（写真矢印）を5尾ずつプールして解剖用はさみでできるだけ細かく切断した後（写真8）、乳鉢・乳棒を用いてさらに磨砕し（写真9）、その一部を以下の検査に用いる（写真10）。30尾を検査する場合には、6検体が作製されることになる。頭部は再検査のために冷凍保存する。

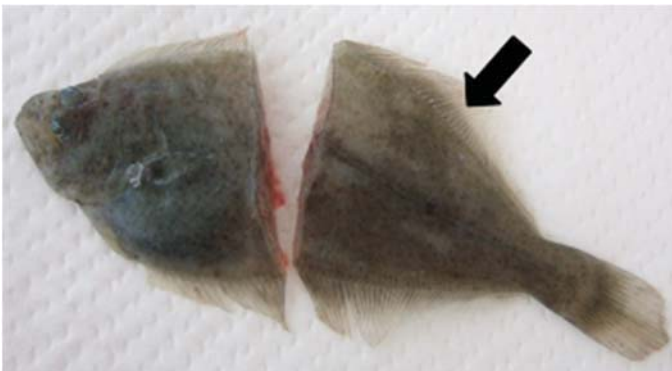


写真7 ヒラメ稚魚を腹腔よりも後ろで切断



写真8 解剖用ハサミで細断

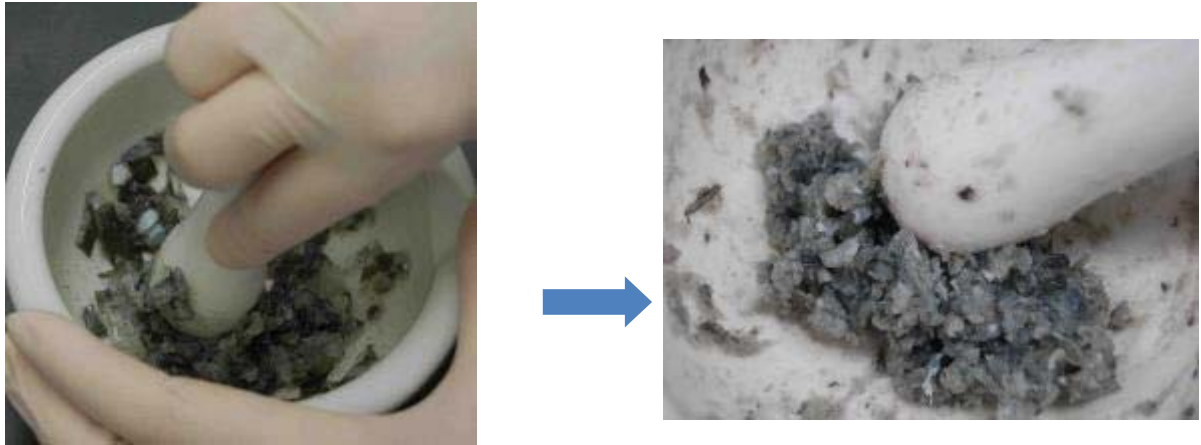


写真9 乳鉢で磨碎

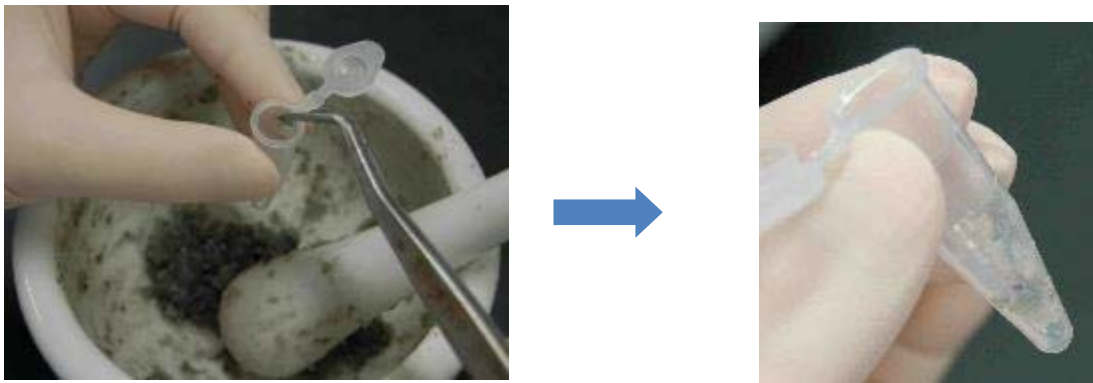


写真10 試料の一部をマイクロチューブに採取

② 血液の採取法

腹腔より後方の尾部を切断し、尾動脈あるいは尾静脈からヘマトクリット毛細管あるいはピペットなどを用いて採血し、約1mLのアルコールが入ったマイクロチューブに入れる。5尾ずつプールし遠心（10,000rpm、2分）後、上清を除きDNA抽出に用いる（写真11、12）。30尾を検査する場合には、6検体が作製されることになる。



写真11 血液の採取

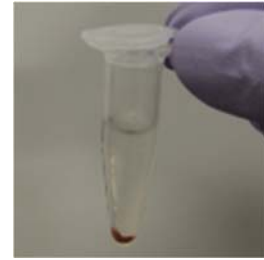
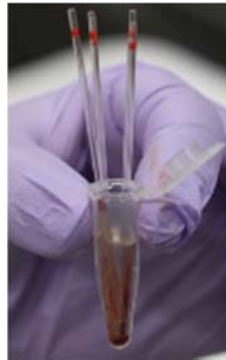


写真12 血液をマイクロチューブに採取し遠心

③ 心臓の採取法

有眼側の鰓蓋下部を解剖用はさみで切断し囲心腔を露出させた後、手で下顎を持ち、ピンセットで肛門部を押さえる。下顎を頭部方向へ引っ張り、頭部と腹部の間を大きく広げることで囲心腔から心臓を取り出し、拍動する心臓を確認する。ピンセットと解剖用はさみで心臓を切り取る（写真13、14）。心臓は大きさに合わせて5尾ずつプールしマイクロチューブまたは乳鉢にいれる。マイクロチューブのサンプル量は1チューブ当たり約25mgまでとし、DNA抽出に用いる。（写真15）。乳鉢では、解剖用はさみでできるだけ細かく切断し、その一部約25mgをDNA抽出に用いる（筋肉組織の採取法（15ページ）参照）。30尾を検査する場合には、6検体が作製されることになる。



写真13 下顎を切断し囲心腔（円内）の位置を確認



写真14 心臓（円内）の摘出



写真15 マイクロチューブに心臓を入れる

④ DNA 抽出

1 検体当たり約 25mg 程度の検査組織（血液、心臓、筋肉）を滅菌スパーテル等で採取し、QIAGEN 社の QIAamp DNA Mini Kit を用いて、次ページの手順に従って DNA を抽出する。残りの検体は冷凍保存する。

2) 成魚からの採取

- ① ヒラメ成魚の胸鰭先端部上方の側線上の筋肉を、1尾につき1g程度採取する。更にその中から滅菌スパーテルで1杯分（約25mg程度）を採取しマイクロチューブに移す。筋肉の残りは凍結保存する。
- ② バイオマッシャーやホモジナイザー（アシスト、フナコシ等で販売）等で、検体をすり潰した（バイオマッシャーの場合、手で20回程度）後（写真16）、マイクロチューブ用遠心機を用い、12,000rpmで1分間遠心し、沈渣全てを回収する。

- ③ 回収した沈渣を検体とし、QIAGEN 社の QIAamp DNA Mini Kit を用いて、以下の手順に従って DNA を抽出する。



写真16 ホモジナイザーでの磨砕処理

3) DNA の抽出

(キアゲン社 QIAamp DNA Mini Kit 手順書「組織からの DNA 精製」の項に準じる。)

- ① 全ての遠心操作は室温（15～25℃）で行なう。作業を始める前に、ウォーターバスまたはヒートブロックあるいはインキュベーターを2個用意し、一つを56℃に、もう一つを70℃に加熱しておく。
- ② 25mgの組織を80 μLのPBSの入った1.5mLマイクロチューブに添加する。ホモジナイザー等を用いてサンプルをホモジナイズする。100μLのBuffer ATLと20 μLのProteinase Kを添加する。
- ③ ボルテックスミキサーで攪拌し、組織が完全に溶解するまで56℃でインキュベートする（おおよそ1時間）。時々ボルテックスミキサーで攪拌し溶解を促す。
- ④ 1.5mLマイクロチューブを数秒間スピンドウンする。
- ⑤ 200 μLのBuffer ALをサンプルに添加後、15秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、70℃で10分間インキュベートする。1.5mLマイクロチューブを数秒間スピンドウンする。
- ⑥ エタノール（96～100%）200μLをサンプルに添加し、15秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、1.5mLマイクロチューブを数秒間スピンドウンする。
- ⑦ ステップ6の混合液全量を2 mLコレクションチューブのセットされたQIAamp Mini Spin Columnにカラムの縁を濡らさないように注意して入れる。蓋を閉めて6,000 x g（8,000rpm）で1分間遠心分離する。QIAamp Mini Spin Columnを新しい2mlコレクションチューブに移し、ろ液の入っているコレクションチューブは

捨てる。

- ⑧ 500 μ LのBuffer AW1を添加する。蓋を閉めて6,000 x g (8,000rpm) で1分間遠心分離する。QIAamp Mini Spin Columnを新しい2 mL コレクションチューブに移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。
- ⑨ 500 μ LのBuffer AW2を添加する。蓋を閉めて20,000 x g (14,000rpm) で3分間遠心分離する。
- ⑩ QIAamp Mini Spin Columnを新しい2 mLのコレクションチューブにのせ、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。20,000 x g (14,000rpm) で1分間遠心操作を行なう。
- ⑪ QIAamp Mini Spin Columnを新しい1.5mLマイクロチューブ（別途準備）に移し、200 μ LのBuffer AEを加える。室温（15~25 $^{\circ}$ C）で1分間インキュベート後、6,000 x g (8,000rpm) で1分間遠心分離する。
- ⑫ その溶液をPCR サンプルとする。

3. PCR 検査

クドアの寄生の有無を確認するための PCR 検査法は、クドアの 18S rDNA を検出する方法と *Kudoa* 属の複数の粘液胞子虫を識別して検出するために設計された 28S rDNA を検出する Grabner et al. (2012) の方法が開発されている。28S rDNA を検出する方法では、種特異的なプライマーを用いることにより、食中毒の原因とされるクドア以外にも *Kudoa* 属の粘液胞子虫でジェリーミートの原因となる *K. thyrssites* 及び *K. lateolabracis* の検査を行うことができる。これらの種特異的なプライマーは、*K. yasunagai*、*K. thyrssites* (ヒラメ由来)、*K. lateolabracis* (ヒラメ由来)、*K. shiomitsui*、*Kudoa* sp.、*Myxobolus murakamii*、*Henneguya* sp.、*Myxidium* sp.、*Sphaerospora* sp. を用いて特異性が確認されている。

1) クドアのPCR法による検査手順

検査方法は、18S rDNAを検出するPCR法（下記A法）または28S rDNAを検出する Grabner et al. (2012) のPCR法（下記B法）を用いる。天然ヒラメを用いた疫学調査において、A法とB法で検出感度に差は認められていない。しかし、A法では、*K. minithyrssites*に近縁な種を検出することがあり、クロスチェック等が必要な場合にはB法を実施すること。PCR反応は、下記の通りそれぞれのPCRプライマーの配列、反応液組成及び反応プログラムに従い行う。



写真17 PCR反応液の調製

A 法 : 18S rDNA 増幅用プライマーによる PCR 法

- ① PCR プライマーには表 1 を用い、表 2 の通り調製した PCR 反応液に、前述で抽出したサンプルの DNA (鋳型 DNA) を加える (写真 17)。
- ② 表 3 のプログラムにより、サーマルサイクラーを用い PCR 反応を行う。

表 1 PCRプライマーの配列

プライマー名	配列 (5'-3')
Ksept18S-436	agaaataccggagtggaccgtaaaatg
Ksept18S-768r	gttccatgctataaacattcaagcgttcg
PCR産物のサイズ	333塩基対

表 2 PCR反応液の組成

組成	添加量 (μL)
鋳型DNA	1.0
プライマー (10 pmol/ μL)	各0.4 (終濃度0.2 μM)
10×PCR緩衝液	2.0
TaqDNAポリメラーゼ (5 units/ μL)	0.1
dNTP (2.5 mM each)	1.6
精製水	14.5
反応液量	20 μL

表 3 PCR反応プログラム

反応温度	反応時間
95°C	4分
95°C	30秒
60°C	30秒
72°C	30秒
72°C	5分

} 40サイクル

B 法 : 28S rDNA 増幅用プライマーによる PCR 法

- ① PCR プライマーには表 4 を用い、表 5 の通り調製した PCR 反応液に、前述で抽出したサンプルの DNA (鋳型 DNA) を加える。
- ② 表 6 のプログラムにより、サーマルサイクラーを用い PCR 反応を行う。

表 4 PCRプライマーの配列

プライマー名	配列 (5' -3')
KSf	gtgtgtgatcagacttgatatg
KSr	aagccaaaactgctggccattt
PCR産物のサイズ	356塩基対

表 5 PCR反応液の組成

組成	添加量 (μL)
鋳型DNA	1.0
プライマー (10 pmol/ μL)	各0.8 (終濃度0.4 μM)
10×PCR緩衝液	2.0
TaqDNAポリメラーゼ (5 units/ μL)	0.1
dNTP (2.5 mM each)	1.6
精製水	13.7
反応液量	20 μL

表 6 PCR反応プログラム

反応温度	反応時間
95°C	4分
95°C	35秒
55°C	30秒
72°C	30秒
72°C	5分

} 35サイクル

2) *K. thyrsites* (クドア・シルシテス) の PCR 法による検査手順

PCR 反応の手順と電気泳動による判定は、前述のクドアの PCR 法と同様に行う。PCR プライマーの配列、反応液の組成及び反応プログラムは表 7～9 の通り。

表 7 PCRプライマーの配列

プライマー名	配列 (5' -3')
KTOf	gtgtgtgactggatagagttga
KTOr	ccccaagttaatttgттаатca
PCR産物のサイズ	260塩基対

表 8 PCR反応液の組成

組成	添加量 (μL)
鋳型DNA	1.0
プライマー (10 pmol/ μL)	各0.8 (終濃度0.4 μM)
10×PCR緩衝液	2.0
TaqDNAポリメラーゼ (5 units/ μL)	0.1
dNTP (2.5 mM each)	1.6
精製水	13.7
反応液量	20 μL

表 9 PCR反応プログラム

反応温度	反応時間
95°C	4分
95°C	35秒
55°C	30秒
72°C	30秒
	} 35サイクル
72°C	5分

3) *K. lateolabracis* (クドア・ラテオラブラシス) の PCR 法による検査手順

PCR 反応の手順と電気泳動による判定は、前述のクドアの PCR 法と同様に行う。
PCR プライマーの配列、反応液の組成及び反応プログラムは表 10~12 の通り。

表10 PCRプライマーの配列

プライマー名	配列 (5'-3')
KLf	actggatagtgagtggtgtcga
KLr	ccaaatacgaataacttggtgt
PCR産物のサイズ	401塩基対

表11 PCR反応液の組成

組成	添加量 (μ L)
鋳型DNA	1.0
プライマー (10pmol/ μ L)	各0.8 (終濃度0.4 μ M)
10×PCR緩衝液	2.0
TaqDNAポリメラーゼ (5units/ μ L)	0.1
dNTP (2.5 mM each)	1.6
精製水	13.7
反応液量	20 μ L

表12 PCR反応プログラム

反応温度	反応時間
95°C	4分
95°C	35秒
55°C	30秒
72°C	30秒
72°C	5分

} 35サイクル

4. 結果の判定

PCR 反応終了後、ローディングバッファー（50%グリセリン、0.02%ブロモフェノールブルー、1%SDS を含むもの等）を加え、予め作製しておいたアガロースゲル（0.5×TBE で調製した 1.5%の中電気浸透アガロース等）を用い電気泳動装置にて 100V で 20 分間程度 電気泳動を行う（添加した色素マーカの移動度を目安に泳動時間を適宜調整する）（写真 18）。

その際、分子量マーカ（ ϕ X174 *Hae*III digest 等）、陽性対照及び陰性対照を同時に泳動する。陽性対照、陰性対照のバンドを確認することで、泳動が適切に行われたかどうかを確認することができる。

泳動後、アガロースゲルを臭化エチジウム等で染色し、トランスイルミネーターで写真撮影を行って、PCR 増幅産物の有無を判定する。陽性対照と同じ位置に増幅バンドが確認された場合に、陽性と判定する（写真 19）。

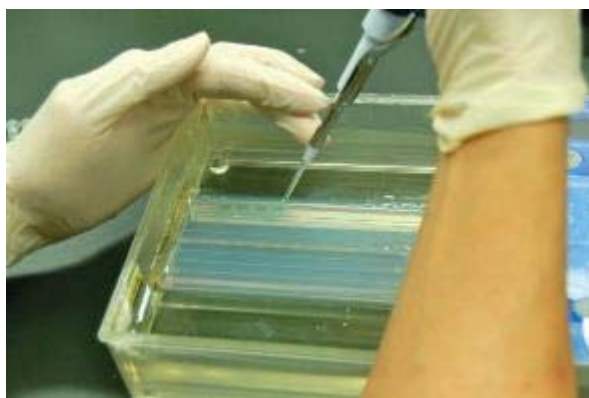


写真 18 PCR 反応液とローディングバッファーを混合したサンプルを電気泳動ゲルへ添加する

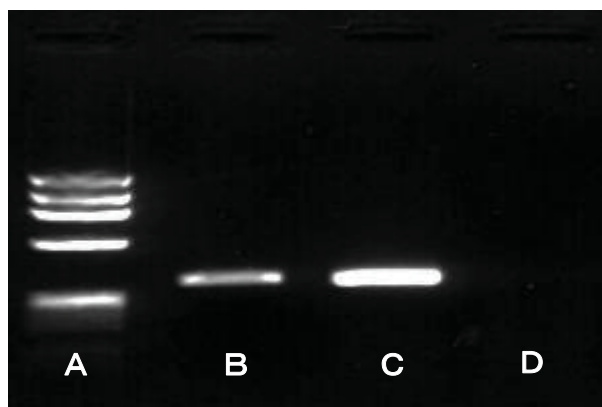


写真 19 電気泳動で検出されたクドア rDNA の増幅産物
A：分子量マーカ、B：陽性対照、
C：試料（陽性と判定）、D：陰性対照

IV 寄生が確認された場合の取扱い

検査によりクドアの寄生が確認された場合には、寄生魚が含まれている飼育群の全ての魚について、活魚、生鮮品での出荷を自粛し、速やかに都道府県庁又は水産試験場等に連絡してください。

なお、検査の方法等に関する問合せは、都道府県の水産試験場等、または、下記宛てにお願いします。

国立研究開発法人 水産研究・教育機構増養殖研究所魚病研究センター上浦庁舎
感染制御グループ

住 所：大分県佐伯市上浦大字津井浦

T e l：0 9 7 2 - 3 2 - 2 1 2 5

F a x：0 9 7 2 - 3 2 - 2 2 9 3

参考文献

○文献等

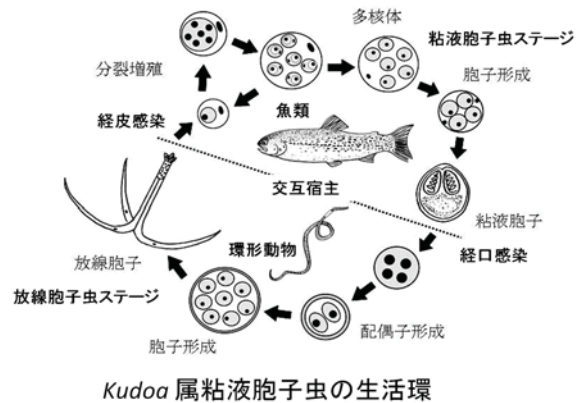
- ・ Grabner D. S. , Yokoyama H, Shirakashi S, Kinami R. (2012), Diagnostic PCR assays to detect and differentiate *Kudoa septempunctata*, *K. thyrsites* and *K. lateolabracis* (Myxozoa, Multivalvulida) in muscle tissue of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 338–341, 36–40.
- ・ Matsukane. Y et al (2010) , *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea:Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea, *Parasitol Res.* , 107, 865–872
- ・ 横山博 (2004), 魚類に寄生する粘液胞子虫の生活環と起源, 原生動物学雑誌, 第 37 卷

○公表資料等

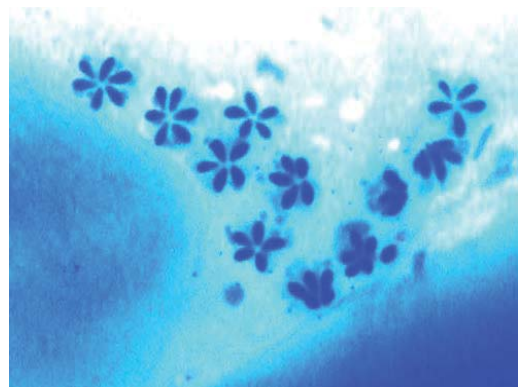
- ・ 食品安全委員会 食品健康影響評価「ヒラメの *Kudoa septempunctata*」 (平成 27 年 11 月 10 日)
<http://www.fsc.go.jp/fscis/evaluationDocument/show/kya201511110862>
- ・ 厚生労働省 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会資料 (平成 24 年 3 月 19 日) <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000025ttw.html>
- ・ 厚生労働省 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒・乳肉水産食品合同部会「生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例についての提言」 (平成 23 年 6 月 8 日)
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000001fz6e-att/2r9852000001fz18.pdf>
- ・ 水産庁増殖推進部栽培養殖課通知「*Kudoa septempunctata* の検鏡検査法(暫定版)について」 (平成 23 年 10 月 26 日 23 水推 631 号)

Kudoa septempunctata とは

Kudoa septempunctata はミクソゾア門多殻目に属する粘液胞子虫類の一種です。粘液胞子虫類は、一般的に魚類と環形動物を交互宿主とする二相性生活環を持ち、魚類では粘液胞子虫ステージを、環形動物では放線胞子虫ステージを取るとされており、*K. septempunctata* も同様の生活環を持つと考えられています。



K. septempunctata の粘液胞子は、上面観で幅 11~13 μm、側面観で 8~9 μm の扁平な形状で、胞子内に花弁状に 5~7 個の極囊を持つことを特徴としており、ヒラメの筋肉細胞内に寄生することが確認されていますが、他の粘液胞子虫と異なり筋肉内でシストを形成しないため、肉眼での発見は困難です。



K. septempunctata の粘液胞子
(写真提供：大分県)

また、粘液胞子虫類の魚類への寄生は、放線胞子の経皮感染によるとされており、*K. septempunctata* も同様と考えられています

が、生態や生活環は解明されていない点が多く、ヒラメへの寄生経路はまだ明らかになっていません。なお、粘液胞子虫類の人間への寄生は報告されていません。

この他、*Kudoa* 属の粘液胞子虫には、ジェリーミート化と呼ばれる現象を起こす種類があることが知られています。

【参考】

ジェリーミート（筋肉融解現象）



ジェリーミート化したヒラメの筋肉組織

魚体に寄生した粘液胞子虫類が産生するタンパク質分解酵素によって、筋肉組織が軟化、融解する現象で、魚が生きている間は発症しない。ヒラメでは、*Kudoa* 属の粘液胞子虫の *K. thyrsites*、*K. lateolabracis* の寄生によるジェリーミート化が知られている。養殖ヒラメでも発症する事例もあり、商品価値の低下が問題となっている。

「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

農林水産省では、クドアによる食中毒の発生を防止するため、平成 23 年度新たな農林水産政策を推進する実用化技術開発事業において、「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」を実施しました。概要は以下の通りです。

研究参画機関：独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所、東京大学大学院農学生命科学研究科、愛媛県農林水産研究所水産研究センター、大分県農林水産研究指導センター水産研究部

○研究の概要

新種のクドア属粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* (以下「クドア」という。) による食中毒の発生を防止するため、種苗生産施設・養殖場等における感染実態の把握、種苗生産施設・養殖場における粘液胞子虫の感染環及び水平感染の有無の解明、ヒラメ体内の粘液胞子虫寄生部位の把握と簡易検査法の開発を実施。

○主な成果

- ・平成 23 年 6～7 月に全国のヒラメ種苗生産施設・養殖場を対象として実施した寄生実態調査では、クドアの寄生が確認されたヒラメの出現率は、全検体 (1,792 検体) のうち 0.7% と低く、寄生は地域的にも限定されていた。
- ・クドアが寄生したヒラメと非寄生ヒラメの同居飼育試験及び非寄生のヒラメ稚魚に対するクドア胞子の経口投与試験では、非寄生魚への新たな寄生は観察されなかった。
- ・クドアの寄生が確認されているヒラメ成魚について、部位別 (有眼側と無眼側の体側筋肉の中央部、背側、腹側、背鰭基部 (縁側)、鰓蓋内側および尾柄部) に筋肉を採取し、孢子密度と検出率を調べたところ、魚体内分布に大きな偏りはないことが明らかとなった。また、約 10 ヶ月の調査期間中に寄生率や孢子密度に明らかな増減の傾向は見られなかった。
- ・クドアの寄生を判別するための PCR 検査法について、従来の方法に比べて、クドアを特異的かつ高感度に検出できるプライマーを開発した。
- ・養殖現場で実施できるクドアの検査方法として、ウェットマウント法、ディフクイック染色法、メチレン・ブルー染色法による顕微鏡検査法について比較した結果、視認性等の面からメチレン・ブルー染色法が最も実用的であり、1つの検体を陰性と判断するまでの塗抹染色標本の平均観察所要時間は約 5 分/枚であった。
- ・供試魚を殺さずに検査を行うため、偽鰓付近 (鰓蓋内側筋肉) あるいは尾柄部切開部位 (体側筋) への綿棒挿入による組織標本採取を行ったヒラメは、術後 3 週間死亡しなかったことから、本法が活魚検査に適用できる可能性が示唆された。

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punkタータ）に対するリスク管理に必要な技術開発」の概要

農林水産省では、クドアによる食中毒の発生を防止するため、平成 24～26 年度にレギュラトリーサイエンス事業において、「寄生虫（クドア・セプテンpunkタータ）に対するリスク管理に必要な技術開発」を実施しました。概要は以下の通りです。

研究参画機関：国立研究開発法人 水産総合研究センター増養殖研究所、国立大学法人 東京大学大学院、愛媛県農林水産研究所、大分県農林水産研究指導センター

○研究の概要

本研究では、ヒラメの種苗生産・養殖施設において、クドア属粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata*（以下「クドア」という。）の生活環や感染経路を解明し、飼育方法、宿主である環形動物の除去、供給水の殺菌等の効果的な感染防除策を開発するほか、ヒラメ成魚の検査法の改良、ヒラメ稚魚での検査法の開発、ヒラメの鮮度を落とさないための冷蔵によるクドア失活法を開発。

○主な成果

- ・ クドアの感染環を明らかにするため、感染が報告された種苗生産施設、養殖施設の周辺の海域（以下、「感染海域」という。）2箇所において、交互宿主である可能性のある環形動物などの無脊椎動物や海水中のクドア遺伝子量等を調査した。一部の環形動物や海水からクドア遺伝子は検出されたが、放線胞子虫は確認されず、宿主とは判断できなかった。
- ・ クドアの感染時期を特定するため、平成 25 年 6 月から 12 月までの各月に感染海域の種苗生産施設に設置した実験水槽で稚魚を 2 週間飼育した後、非感染海域で 3 ヶ月飼育して検査した結果、7 月に最も感染率が高かった。
- ・ ヒラメのサイズによるクドア感染の違いを把握するため、感染海域の種苗生産施設に設置した実験水槽で稚魚（平均体長 5.3cm、平均体重 1.48g）、0 歳魚（平均全長 20.4cm、平均体重 80.6g）、1 歳魚（平均全長 33.6cm、平均体重 444.5g）を生海水で 1～3 ヶ月飼育したところ、1 歳魚までではいずれのサイズでも感染が認められた。ただし、稚魚に比べると 0 歳魚及び 1 歳魚は筋肉中の胞子密度が低い傾向が認められており、稚魚の胞子密度が高い傾向が見られた。
- ・ 感染海域の陸上水槽での感染実験では生海水を使用した場合に感染がみられたが、海水を砂ろ過と紫外線照射（46mJ/cm²）で処理することにより、感染防止できることを確認した。
- ・ 感染初期のヒラメ稚魚の魚体内動態を経時的に調査した結果、感染 2 週目以降では心臓、筋肉及び血液からクドア遺伝子を検出できることを確認した。

- ・ 養殖期間中又は出荷時にヒラメを殺さず検査する方法として、注射針(12G 及び 14G)を用い魚体から筋肉を採材し、ウエットマウント法により検鏡検査する方法を開発した。本検査は注射針で微量の筋肉を採取するため、本操作で得られるクドア孢子数にバラツキが大きくなるが、2カ所以上から採材することにより 1.0×10^6 個/g (食品衛生法の規制値) 以上の個体を問題なく検出できることを確認した。
- ・ 冷蔵や氷温(4℃、0℃、-1℃、-3℃)等の保存条件では、孢子は不活化されなかった。-50℃で急速凍結し、-30℃で低温貯蔵、氷水で解凍すれば、消費者から歯ごたえの点でその後5℃で冷蔵した鮮魚と識別されるものの、他の調査項目である色や味などでは差がなく、商品として受容される可能性が高い処理方法を開発した。
- ・ 平成24~26年度に、ヒラメ以外の魚種として、養殖されたマダイ85尾(平均体重0.5~1.7kg)、ブリ21尾(平均体重1.2~6.5kg)、スズキ10尾(1.0~1.5kg)、トラフグ5尾(平均体重0.3kg)、カンパチ17尾(平均体重0.8kg)のPCR検査又は検鏡検査を行ったところ、感染はなかった。
- ・ 平成24~26年度に、感染海域及びその近隣海域で漁獲された天然ヒラメ1,138尾を調査し、孢子密度が規制値(1×10^6 個/g)を超えたものは3尾(0.3%)だった。

ヒラメからの *Kudoa septempunctata* 検査法

1. 暫定検査法からの変更点

暫定検査法では顕微鏡検査を行う前のスクリーニング検査法としてリアルタイム PCR 法が記載されていたが、今回の改訂ではリアルタイム PCR 法に加え Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法とイムノクロマトグラフィー法を記載した。なお、リアルタイム PCR 法、顕微鏡検査法に関しては暫定検査法からの変更点はない。

2. 検体採取方法

食後数時間程度で一過性の嘔吐や下痢を呈し、軽症で終わる有症事例であって、当該病因物質が原因と疑われる事例のヒラメを対象とする。

3. 検査方法

1) または2)のどちらかの方法を用いる。

- 1) スクリーニング検査を行い、陽性の結果が得られた検体に対して、「5. 顕微鏡検査法」で述べた方法で、6～7個の極嚢を有する *Kudoa septempunctata* (*K. septempunctata*) の孢子数を計測する。
- 2) スクリーニング検査を行わず、「5. 顕微鏡検査法」で述べた方法で顕微鏡検査を行い、6～7個の極嚢を有する *K. septempunctata* の孢子数を計測する。陽性になった場合には、必要に応じて確認検査として、「4. スクリーニング検査法」で述べている方法、またはそれと同等以上の検査を行い、*K. septempunctata*であることを定性的に確認することが望ましい。

4. スクリーニング検査法

1) スクリーニング検査法の方法

スクリーニング検査はリアルタイム PCR 法、イムノクロマトグラフィー法、LAMP 法又はこれらの検査法と同等以上の性能を持っている方法により行う。

なお、同等以上の性能とは以下を満たすものをいう。

- 5 試験室以上で試験室間バリデーションを行う。試験室間バリデーションでは同一試料・濃度のサンプルを各試験室毎に 2 サンプルずつ以上を送付して判定率を評価する。*K. septempunctata*

を含む試料の陽性率は90%以上、ブランク試料における陰性率は90%以上とする。なお、いずれも95%以上が望ましい。試料に含まれる *K. septempunctata* レベルにはブランクと $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 孢子/g を含める。

- ヒラメに寄生する他のクドア属粘液胞子虫 (*K. lateolabracis*, *K. thyrsites* など) を検出しないことが望ましい。

2) LAMP 法

キットに付属の DNA 抽出液を用いて、ヒラメ筋肉から DNA を抽出する。等温増幅蛍光測定装置もしくは通常のリアルタイム PCR 装置を用いて測定を行う。使用機器によって結果の判定方法が異なるため注意する。陽性判定が得られた場合、顕微鏡検査を行い、検体中に孢子が含まれることを確認する。

現在までに *K. septempunctata* 検出用としてスクリーニング検査法の条件を満たす旨のデータが提示されている LAMP 法キットとして以下のキットがある。また、これと同等以上の性能を有する他のキットを使用してもよい。
※操作にあたっては、各検査キットに添付された説明書に従い検査を実施すること。

・ EasyAmp クドア・セブテンポククア検査キット

(製造：株式会社ニッポンジーン、販売：株式会社ファスマック)

*上記キットは国内試験研究機関および韓国済州大学水産ワクチンセンターで試験室間バリデーションが行われ、ヒラメ 1g あたり 10^5 個代以上の孢子を検出できることが確認されている。またヒラメに寄生する他のクドア属粘液胞子虫 (*K. lateolabracis*, *K. thyrsites*) を検出しないことが確認されている。

3) イムノクロマトグラフィー法

キットに付属の懸濁液にヒラメ肉を入れすり潰した後、イムノクロマトに滴下し、目視でテストラインの出現を判定する。陽性判定が得られた場合、必ず顕微鏡検査を行い、検体中に孢子が含まれることを確認する。

現在までに *K. septempunctata* 検出用としてスクリーニング検査法の条件を満たす旨のデータが提示されているイムノクロマトグラフィー法キットとして以下のキットがある。また、これと同等以上の性能を有する他のキットを使用してもよい。

※操作にあたっては、各検査キットに添付された説明書に従い検査を実施すること。

- ・ ARK Checker® IC *Kudoa septempunctata*
(製造・販売：アーク・リソース株式会社)

*上記キットは国内試験研究機関および韓国済州大学水産ワクチンセンターで試験室間バリデーションが行われ、ヒラメ 1g あたり 10^5 個代以上の胞子を検出できることが確認されている。またヒラメに寄生する他のクドア属粘液胞子虫 (*K. lateolabracis*, *K. thyrssites*) を検出しないことが確認されている。

4) リアルタイム PCR 法

以下に示した方法もしくは同等以上の方法を用いて行う。陽性判定が得られた場合、顕微鏡検査を行い、検体中に胞子が含まれることを確認する。

● ヒラメ試料からの DNA 抽出

(1) 器具および試薬

1.5 ml のエッペンドルフチューブを使用できる遠心分離装置、56℃と 70℃で使用できるヒートブロックもしくはウォーターバス 2 台、マイクロピペット (20、200、1000 μ l)、ボルテックスミキサー、ハサミ、エッペンドルフチューブ、分子生物学用エタノール (96-100 %ⁱ、QIAamp DNA Mini Kit)

(2) ヒラメ切り身からの DNA 抽出

ヒラメ切り身から約 50mg を 2 ヶ所より採取する。キアゲン社の QIAamp DNA Mini Kit の「組織からのプロトコール」に準じて以下の方法で DNA を抽出する。

- ① ヒートブロックまたはウォーターバスを 56℃と 70℃にセットする。
- ② エッペンドルフチューブに、ヒラメ試料 35~50 mg を秤量し、そ

れを 25 で割った値を F (秤量した値÷25=F) とする。

- ③ Buffer ATL (180×F) μ l を加える。
- ④ Proteinase K (20×F) μ l を加え、ボルテックスミキサーで攪拌する (ATL と Proteinase K を 9 : 1 で混ぜておき、(200×F) μ l 加えても良い)。
- ⑤ 時々ボルテックスミキサーで攪拌しながら 56°C で溶解させる (通常 1 時間程度で溶解する)。
- ⑥ 溶解サンプル 225 μ l を新しいエッペンドルフチューブに移す。
- ⑦ Buffer AL 200 μ l を加え、15 秒間ボルテックスミキサーで攪拌する。
- ⑧ 70°C で 10 分間インキュベートする。
- ⑨ 200 μ l の 99.5% エタノールを加え、15 秒間ボルテックスミキサーで攪拌する。
- ⑩ 2ml コレクションチューブのセットされた QIAamp Spin Column の中に⑨の溶液全量を入れる。8,000 rpm で 1 分間遠心する。QIAamp Spin Column を新しい 2ml コレクションチューブにセットする。
- ⑪ 500 μ l の Buffer AW1 を加える。8,000 rpm で 1 分間遠心する。QIAamp Spin Column を新しい 2ml コレクションチューブにセットする。
- ⑫ 500 μ l の Buffer AW2 を加える。14,000 rpm で 3 分間冷却遠心する。
- ⑬ QIAamp Spin Column を 1.5ml エッペンドルフチューブ (No を記入) にセットする。200 μ l の Buffer AE を加える。1 分間室温でインキュベートとしてから、8,000 rpm で 1 分間冷却遠心する。その溶出液を PCR サンプルとして使用する。

● リアルタイム PCR による検出

(1) 器具および試薬

リアルタイム PCR 装置 (ABI 社製または同等品)、PCR 反応チューブ、TaqMan Universal Master Mix (ABI 社)、プライマー・プローブミックス溶液、TE バッファー

(2) プライマー・プローブミックス溶液

使用するプライマーとプローブの配列は以下のとおりである。

Kudoa-F (sense) : CATGGGATTAGCCCGGTTTA

Kudoa-R (antisense) : ACTCTCCCAAAGCCGAAA

Kudoa-P (probe) : FAM-TCCAGGTTGGGCCCTCAGTGAAAA-TAMRA

10×Primer/Probe Mix はプライマーそれぞれが 4 μM、プローブが 2.5 μM になるように調整する（反応液中での最終濃度はそれぞれ 0.4 μM, 0.25 μM）。

（例）プライマー、プローブのストック溶液の濃度がそれぞれ 100 μM の場合

Kudoa-F 8 μl, Kudoa-R 8 μl, Kudoa-P 5 μl を
179 μl の TE バッファーに加える。

プローブおよびプライマー・プローブミックスの取り扱い、保存は遮光して行い、小分けにして保存するなど凍結融解をなるべく避けるようにする。

(3) 陽性コントロールの調製

1×10^9 コピー/1μl の *K. septempunctata* 18S rDNA を組み込んだ陽性コントロールプラスミド溶液を配布するので、TE バッファーで段階希釈し、 2.5×10^7 /μl, 2.5×10^5 /μl, 2.5×10^3 /μl, 2.5×10^1 /μl のプラスミド溶液を作成する（1 反応系につき 4μl 使用するので、反応系での最終コピー数はそれぞれ 1×10^8 , 1×10^6 , 1×10^4 , 1×10^2 になる）。

● PCR 反応

表 1 に基づいて反応調整液を作成する。表 1 の 1, 2, 4 を混合し、各ウェルに分注する。そこへ検体からの DNA 溶液、検量線作成のための「(2) 陽性コントロールの調整の項」で作成した陽性コントロール、陰性コントロールとして精製水のいずれかを 4μl 加える。ボルテックスミキサー等で混合した後、軽く遠心し、リアルタイム PCR 装置にかける。蛍光は FAM、クエンチャーは TAMRA を指定する。

表 1. リアルタイム PCR 反応調整液

	試薬	
1	TaqMan 2×Universal Master Mix	10 μl
2	プライマー・プローブミックス	2 μl
3	検体からの DNA 溶液 or 陽性コントロール溶液 or 精製水	4 μl
4	精製水	4 μl

以下の条件で反応を行う

95°C 10分 1サイクル

95°C 15秒

60°C 60秒 45サイクル

- 定量

陽性コントロールのコピー数（対数値）を縦軸に、PCR 反応から得られた Ct 値を横軸にプロットし、検量線を作成する。この際、陽性コントロールの各濃度につき最低 n=3 で測定を行う。そこから、PCR に用いた DNA 溶液 4 μl 中のコピー数を求める。最終的にヒラメ 1g あたりの Kudoa rDNA のコピー数を以下の式を用いて算出する。検量線の傾きが $-0.301 (\pm 0.020)$ 以下であることを確認する。傾きが $-0.301 (\pm 0.020)$ に収まらない場合、プライマー・プローブミックス溶液を再調製するか、Kudoa-P を再合成すると改善される場合が多い。

試料 1g 中の Kudoa rDNA のコピー数 = 検量線から得られた DNA 溶液 4 μl のコピー数 × 50 (200 μl の DNA 溶液の内 4 μl を使用したため) × 1000 mg ÷ DNA 抽出に用いた試料の重量 25 (mg)
= 4 μl 中のコピー数 × 2000/1 グラム試料

(例) 検量線から得られた DNA 溶液 4 μl のコピー数が 200 の場合

それに $200 \times 2000 = 4.0 \times 10^5$ kudoa rDNA のコピー数/1 グラム試料

- 結果の判定

10^7 Kudoa rDNA のコピー数/1 グラム試料以上検出された場合、遺伝子検査のスクリーニング陽性とする。

5. 顕微鏡検査法

スクリーニング検査で陽性と判定された場合、必ず顕微鏡検査を行い胞子の存在を確認する。

- 実験操作

検体を 0.5g 秤量し、シャーレ等に入れ目開き 200 μm 程度のメッシュ（未滅菌のものでよい）を検体の上に置き、PBS 約 3ml

を加え、ピンセットや注射筒の底で軽くつぶす。メッシュを通した PBS 溶液をさらに目開き 100 μ m 程度のメッシュ（未滅菌のものでよい）に通し、そのろ液を遠心管等に回収する。遠心管等を 1500rpm、10 分、10 $^{\circ}$ C の条件で遠心したのち、上清を出来る限り完全に捨て PBS 0.5ml を正確に加え、懸濁する。そこから 10 μ l をパラフィルム等にとり、同量のトリパンブルー溶液を加え混合し、Burker-Turk 型等の白血球用血球計算盤で、6～7 極嚢を有する *Kudoa* 胞子を計測する。1 区画 5～200 個になるように、適時 PBS で希釈する。トリパンブルー溶液はバックグラウンドを染めるために使用するので *K. septempunctata* 自体は基本的に染色されない。トリパンブルー溶液で染色された胞子が存在した場合、この胞子も計数する。

- 結果の判定

血球計算盤の 1 mm \times 1 mm \times 0.1 mm の区画を 4 箇所計測し、平均値 (n) を算定する。定量限界は 1 区画の *K. septempunctata* 数が 5 個のため、 n が 5 以上の場合、有効とする。

$$(n \times 10^4) \times 2 \text{ (トリパンブルー染色をしたため)} \times \text{希釈倍数} \\ = \text{グラム当たりの胞子数}$$

定量限界 10 万胞子

6. 総合判定

- 1) スクリーニング検査及び顕微鏡検査の結果が陽性の場合に、陽性と判定し、食中毒の原因と判断する。スクリーニング検査の結果が陰性の場合には、顕微鏡検査を行わず陰性と判定する。スクリーニング検査の結果が陽性であって顕微鏡検査の結果が陰性の場合には、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に郵送する。この場合、国立医薬品食品衛生研究所で再検査を行い、陽性か陰性かの最終判定を行う。スクリーニング検査の結果が陽性であって顕微鏡検査で定量限界以下の場合には、「*Kudoa septempunctata* は認められたが、定量限界以下」であることを明記する。

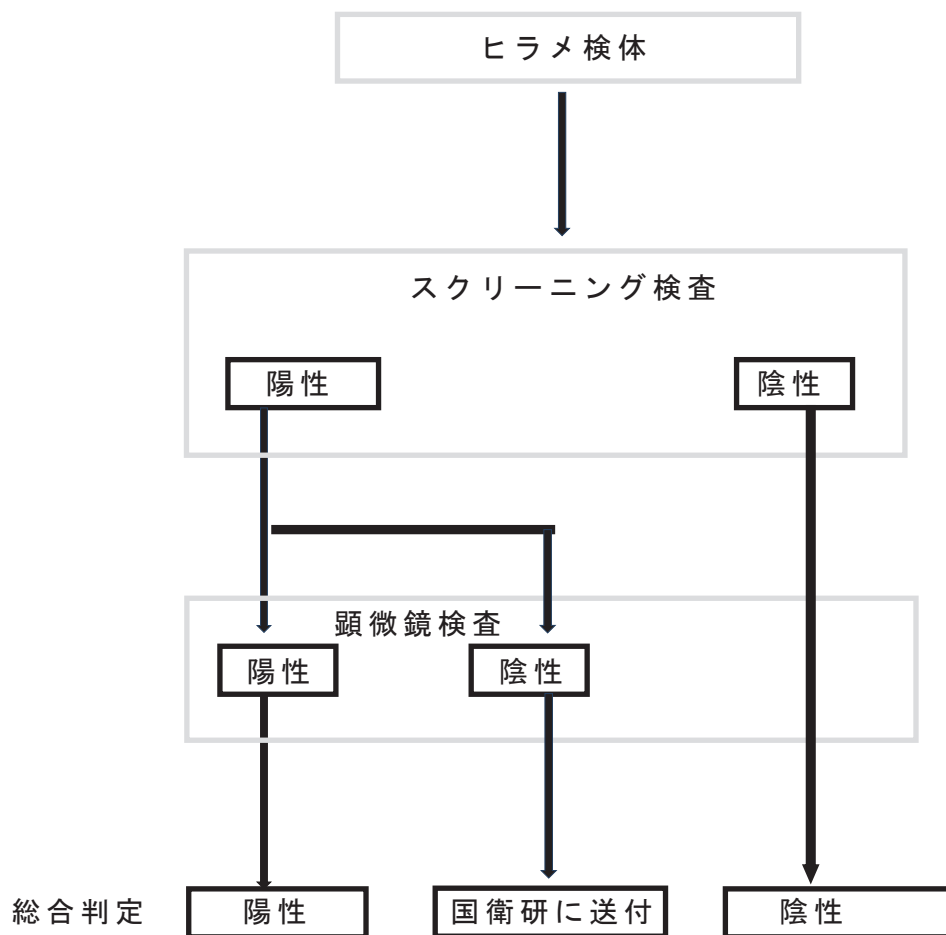
- 2) スクリーニング検査を行わず、顕微鏡検査を行い、その結果が陰性の場合、陰性と判断する。顕微鏡検査で陽性と判定された場合は、陽性と判断することができるが、必要に応じて「4. スクリーニング検査」で述べた方法を用いて、*K. septempunctata*の定性確認を行うことが望ましい。

7. 注釈

- 1) 本試験法で示したスクリーニング検査法は *K. septempunctata* の DNA もしくは抗原を検出するものである。スクリーニング法だけでは孢子の存在を確定できないため、必ず顕微鏡検査を行い6～7個の極嚢を有する孢子の存在を確認する必要がある。
- 2) 本試験で示したリアルタイム PCR 法は *K. septempunctata* に高い特異性を示すが、他のクドア属への交差反応は否定できない。正確に *K. septempunctata* の同定を行いたい場合は直接 18srDNA のシーケンスにより確認することが望まれる。

(参考) 検査法フローチャート

1) スクリーニング検査から行う場合



2) 顕微鏡検査から行う場合

