

事 務 連 絡

平成 26 年 5 月 26 日

各

都 道 府 県
保健所設置市
特 別 区

 衛生主管部（局）食品衛生担当課 御中

厚生労働省医薬食品局食品安全部
監視安全課食中毒被害情報管理室

食中毒患者便からの *Kudoa septempunctata* 遺伝子検出法（参考）について

ヒラメ中の *Kudoa septempunctata* の試験法については、平成 23 年 7 月 11 日付け食安監発 0711 第 1 号「*Kudoa septempunctata* の検査法について（暫定版）」（厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知）にて通知したところですが、今般、食中毒患者便からの *Kudoa septempunctata* 遺伝子検出法（参考）（別添）が取りまとめられましたので、御参考までにお送りいたします。

別添の留意点に記載のとおり、本検出法による検査結果については、発症者の糞便であっても陰性となりうること、及び生食用生鮮ヒラメの喫食から糞便検体採取までの期間が検査結果に大きく影響することに留意して下さい。

また、本検出法について問い合わせを多く受けた内容について、Q&A（参考）としてまとめておりますので、あわせてお送りします。

(別添)

食中毒患者便からの *Kudoa septempunctata* 遺伝子検出法(参考)

1. 試料からの DNA 抽出

1) 器具および試薬

遠心分離装置(マイクロチューブおよび 15 ml 遠心チューブ用)、FastPrep Instrument (MP Biomedicals)または同等のビーズ破砕機、マイクロピペットおよび滅菌チップ、滅菌先細スポイト、マイクロチューブ(1.5 ml, 2.0 ml)、15 ml 遠心チューブ、FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)または同等の性能を有する糞便および土壌サンプル用の DNA 抽出キット。

2) 患者便からの DNA 抽出

FastDNA SPIN Kit for Soil の取扱説明書に準じ、若干の変更を加え、以下の方法で DNA を抽出する(同等品の DNA 抽出キットを使用する場合はキット付属の取扱説明書に従う)。

1. Lysing Matrix E tube*に患者糞便検体**300 mg を秤量する。
2. Sodium Phosphate Buffer* 489 μ l を加える。
3. 転倒混和し、Lysing Matrix E tube のビーズと試料液を混ぜる。
4. 10,000 rpm、室温で数秒遠心する。
5. さらに Sodium Phosphate Buffer 489 μ l を加える。
6. MT Buffer* 122 μ l を加える。
7. FastPrep Instrument により、速度 6.0 で 40 秒間破砕する。
8. 14,000 \times g、室温で 5 分間遠心する。
9. 2.0 ml マイクロチューブに 250 μ l の PPS solution*を入れた後、遠心上清の全量を加えて、転倒混和する。
10. 14,000 \times g、室温で 5 分間遠心する。
11. 15 ml 遠心チューブに再懸濁した Binding Matrix* 1ml を入れた後、遠心上清の全量を加える。
12. 2 分間転倒混和後、3 分間静置する。
13. 3,000 rpm、室温で数秒遠心する。
14. 沈渣を崩さないよう注意しながら、滅菌先細スポイト等で上清をすべて捨てる。
15. 遠心沈渣に 1 ml の SEWS-M* (使用前にエタノールで希釈)を加え、転倒混和によって再懸濁する。
16. 室温で 3 分間静置後、マイクロピペットで上澄み液を捨てる。このとき、Binding Matrix を吸いとらないように注意する。
17. Binding Matrix をピペッティングにより再懸濁し、全量(約 600 μ l)を SPIN Filter*に移し

た後、14,000 × g、室温で1分間遠心する。

18. Catch tube*を交換し、乾燥のために14,000 × g、室温で2分間遠心する。
19. Catch tubeを1.5 ml マイクロチューブに交換し、室温で5分間放置する。
20. 100 μl の DES (DNase/Pyrogen-Free Water)*を加え、チップを使い Filter 上で Binding Matrix と懸濁する。
21. 14,000 × g、室温で1分間遠心する。
22. 溶出液をDNA抽出液として使用する。

*試薬および消耗品はすべて FastDNA SPIN Kit for Soil に含まれる。

**冷凍保存ではなく、冷蔵保存された糞便検体を使用する。

2. 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 PRISM7000 または同等品)、反応チューブ、Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (TaKaRa)、Primer、Probe、精製水 (PCR グレード)、マイクロピペット及び滅菌チップ

2) PCR 反応

表 1 に基づいて反応液を調製する。表 1 の 1-6 を混合し、各反応チューブに分注する。これに DNA 抽出液、陽性コントロール、陰性コントロール (精製水) のいずれかを 2 μl 加える。軽く遠心後、リアルタイム PCR 反応を行う。PCR 反応条件は、(95°C, 30 秒) × 1 サイクルの後、(95°C, 5 秒 → 60°C, 31 秒) × 50 サイクルで実施する。

表 1. リアルタイム PCR 反応液

	試薬	
1	精製水	9.4 μl
2	Premix Ex Taq	12.5 μl
3	F-Primer (25 μM)	0.2 μl
4	R-Primer (25 μM)	0.2 μl
5	Probe (25 μM)	0.2 μl
6	Rox Reference Dye (50 ×)	0.5 μl
	合計	23 μl

F-Primer: CGGTCATATCAGCCATGGATAAC

R-Primer: CTATCGACAAATTAATGTTTCGATATGC

Probe: (6-FAMTM)-TCACCATGTAAATGGTGGGAGCATTT-(Iowa Black®FQ)

3) 結果判定

ABI PRISM7000 の場合は、Threshold line を ΔRn ; 0.35 に設定し、Ct 値が 41 以下を示した検体を *Kudoa septempunctata* 遺伝子陽性と判定する。

4) 留意点

本食中毒の発症機序はまだ解明されていないが、現在のところ、本寄生虫はヒトの消化管では増殖しないと考えられている。そのため、この試験法は大量に摂取された *Kudoa septempunctata* 胞子の遺伝子の一部を糞便中から検出しているものと推測される。

2012年7月までに西日本で発生した生食用生鮮ヒラメに起因する30件の食中毒事例において、患者便90検体を解析したところ、喫食から糞便検体採取までの期間が3日未満の検体では陽性率が68.3%であるのに対し、3日以上検体では25.9%であった。

したがって、発症者の糞便であっても陰性となりうること、および生食用生鮮ヒラメの喫食から糞便検体採取までの期間が検査結果に大きく影響することに十分留意していただきたい。

参考文献

- Matsukane, Y., H. Sato, S. Tanaka, Y. Kamata, and Y. Sugita-Konishi. 2010. *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporidia: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. Parasitol. Res. 107: 865-872.
- Kawai, T., T. Sekizuka, Y. Yahata, M. Kuroda, Y. Kumeda, Y. Iijima, Y. Kamata, Y. Sugita-Konishi, and T. Ohnishi. 2012. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. Clin. Infect. Dis. 54: 1046-1052.
- Harada, T., T. Kawai, H. Sato, H. Yokoyama, and Y. Kumeda. 2012. Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Int. J. Food Microbiol. 156: 161-167.
- Harada, T., T. Kawai, M. Jinnai, T. Ohnishi, Y. Sugita-Konishi, and Y. Kumeda. 2012. Detection of *Kudoa septempunctata* 18S rDNA in patient fecal samples from novel foodborne outbreaks caused by consumption of raw olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Clin. Microbiol. 50: 2964-2968.

(参考)

食中毒患者便からの *Kudoa septempunctata* 遺伝子検出法(参考) Q&A

Q1. ヒラメ以外の生食用生鮮魚類を喫食した食中毒事例にも適用できますか。

A1. 本試験法は *K. septempunctata* を特異的に検出するように設計されています。また、現在のところ、*K. septempunctata* はヒラメにしか寄生しないと考えられています。

Q2. 無症状であっても陽性になることはありますか。

A2. 留意点にも書かれているように、この試験法は大量に摂取された *K. septempunctata* 胞子の遺伝子の一部を糞便中から検出しているものと推測されます。したがって、無症状であっても検出される可能性はあります。本食中毒の症例定義と合致した患者さんの糞便検体に使用してください。

Q3. 冷凍保存した糞便検体では使用できませんか。

A3. 検討していないので不明です。冷蔵保存検体のみ検討を行っています。

Q4. 凍結したヒラメを喫食した場合も検出されますか。

A4. 検討していないので不明です。生食用生鮮ヒラメを喫食して発症していることが前提になります。ただし、凍結したヒラメ(条件: $-15^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$ 、4 時間以上)は食中毒を起こしません。

Q5. FastPrep Instrument (MP Biomedicals)のかわりにボルテックスを使用できますか。

A5. 比較検討していません。

Q6. 患者糞便で本検査法による結果が陽性の場合、クドアによる食中毒と判断して良いか。

A6. 本検査は、*K. septempunctata* 胞子の遺伝子の一部を糞便中から検出しているものと推測されます。したがって、他の検査結果及び疫学調査を総合的に判断する必要性があります。