

平成28年4月27日
生食監発0427第3号

各

都道府県
保健所設置市
特別区

 衛生主管部（局）長 殿

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
(公 印 省 略)

*Kudoa septempunctata*の検査法について

ヒラメからの*Kudoa septempunctata*の検査法については、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）」により通知しているところです。

今般、当該通知を廃止し、*Kudoa septempunctata*の検査法について別添のとおり定めましたので、検査を行う場合はこの方法により実施されるようお願いいたします。

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、検体中に胞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・セブテンポクター検査キット

(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. 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、検体中に胞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、 $2.5 \times 10^7/\mu\text{l}$, $2.5 \times 10^5/\mu\text{l}$, $2.5 \times 10^3/\mu\text{l}$, $2.5 \times 10^1/\mu\text{l}$ 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。

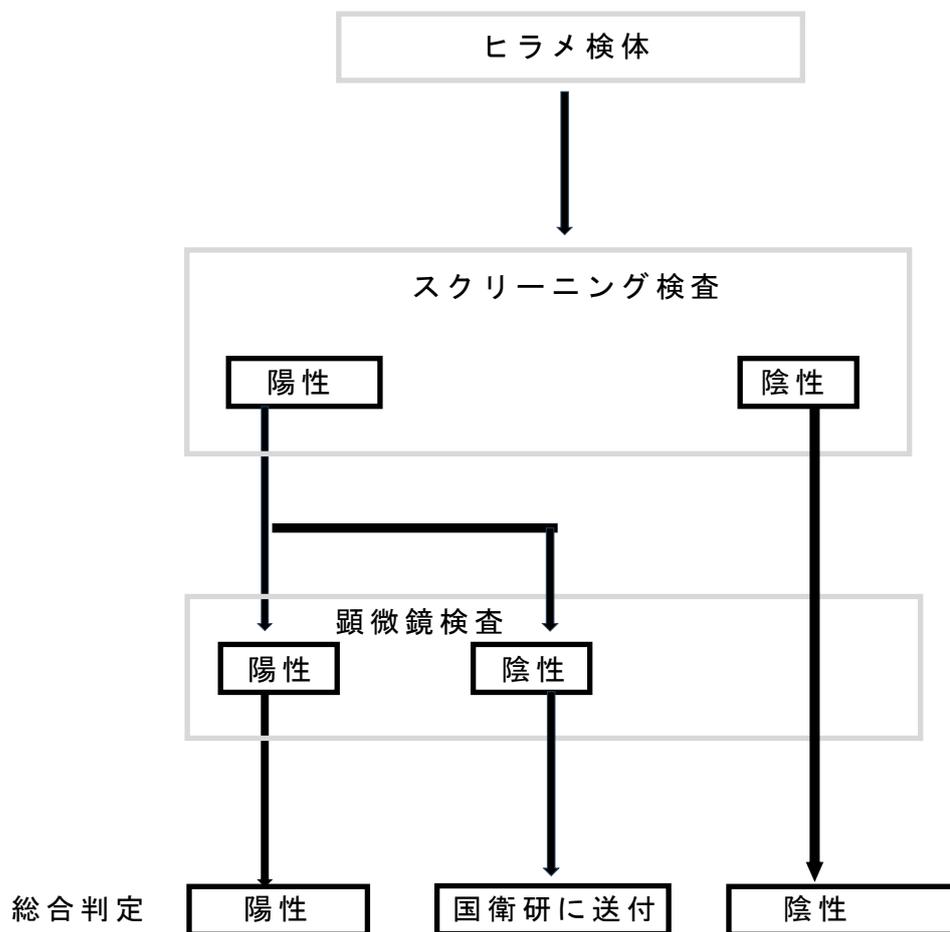
2) スクリーニング検査を行わず、顕微鏡検査を行い、その結果が陰性の場合、陰性と判断する。顕微鏡検査で陽性と判定された場合は、陽性と判断することができるが、必要に応じて「4. スクリーニング検査」で述べた方法を用いて、*K. septempunctata*の定性確認を行うことが望ましい。

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

