

平成23年7月11日
食安監発0711第1号

各
〔 都道府県知事
保健所設置市長
特別区長 〕 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長

*Kudoa septempunctata*の検査法について（暫定版）

平成23年6月17日付け食安発0617第3号「生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について」（厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）において、*Kudoa septempunctata*及び*Sarcocystis fayeri*を起因とすると考えられる有症事例が報告された際には食中毒事例として取り扱うとともに、関係事業者等に対し食中毒の発生防止に努めるよう指導方、特段の対応をお願いしたところです。

今般、*Kudoa septempunctata*の検査法について別添のとおり定めましたので、*Kudoa septempunctata*による食中毒が疑われる際には、暫定的に別添の検査法により実施されるようお願いいたします。

なお、*Sarcocystis fayeri*の検査法については、現在、検査法の確認中であり、確認でき次第、通知することとしていますので、検体等につきましては国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第四室に冷凍にて送付するようお願いいたします。

ヒラメからの *Kudoa septempunctata* 検査法(暫定)

1. 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、既知の病因物質が不検出、あるいは検出した病因物質と症状が合致せず、原因不明として処理された事例のヒラメを対象とする。

2. 検査方法

AまたはBのどちらかの方法を用いる^(注)。

A リアルタイム PCR 検査法でスクリーニングを行い、その結果ある一定の値を示した検体に対して顕微鏡検査を行い、6～7極嚢を有する *Kudoa septempunctata* の孢子数を計測する。

B リアルタイム PCR 検査法でスクリーニングを行わず、顕微鏡検査を行い、6～7極嚢を有する *Kudoa 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、リアルタイム PCR 検査法(2.1.1)またはそれに同等以上の遺伝子検査法を行い、*Kudoa septempunctata* であることを定性的に確認することが望ましい。

注：別添試験法については、A リアルタイム PCR を用いた遺伝子検査法をスクリーニングに使用する方法及び B 顕微鏡検査を行い遺伝子検査法を実施する方法を併記している。遺伝子検査法は、機器等の整備は必要であるが、多検体を同時に検査できるという利点があり、顕微鏡試験法は、1検体当たりコストが低く、技術的に簡易であるという利点がある。

2.1. 遺伝子検査法

ヒラメからの *Kudoa septempunctata* の検出を、遺伝子検査法を用いて実施する。遺伝子検査法としてリアルタイム PCR 法(2.1.1)または、同等以上の結果が得られる方法を用いる。

2.1.1. リアルタイム PCR 法

2.1.1.1. 実験操作

- 1) 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°Cと70°C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 %, 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°Cと70°C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 \div 25=F)とする。
- ③ Buffer ATL (180 \times F) μ l を加える。
- ④ Proteinase K (20 \times F) μ l を加え, ボルテックスする(ATLとProteinase Kを9:1で, 混ぜておき, (200 \times 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。
- ⑭ その溶出液を PCR サンプルとして使用する。

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 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): ACTCTCCCCAAAGCCGAAA

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)。

(3) 陽性コントロールの調整

1×10⁹ コピー/1μl の *Kudoa 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, 2.5×10⁷/μl, 2.5×10⁵/μl, 2.5×10³/μl, 2.5×10¹/μl のプラスミド溶液を作成する(1 反応系につき 4 μl 使用するので, 反応系での最終コピー数はそれぞれ 1×10⁸, 1×10⁶, 1×10⁴, 1×10²になる)。

3) 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, 各ウエルに分注する。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 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

4) 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 (± 0.020) 以下であることを確認する。

$$\begin{aligned} \text{試料 1g 中の } \textit{kudoa} \text{ rDNA のコピー数} &= \text{検量線から得られた DNA 溶液 4 } \mu\text{l のコピー数} \times \\ & 50 (200 \mu\text{l の DNA 溶液の内 4 } \mu\text{l を使用したため) \times 1000 \text{ mg} \div \\ & \text{DNA 抽出に用いた試料の重量 25 (mg)} \\ & = 4 \mu\text{l 中のコピー数} \times 2000 / 1 \text{ グラム試料} \end{aligned}$$

(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

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

2. 1. 1.2. 結果の判定

暫定的に 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。

2. 2. 顕微鏡による検査

2. 2. 1. 実験操作

検体を 0.5g 秤量し、シャーレ等に入れ 200 μm 程度のメッシュを検体の上に置き、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 100 μm 程度のメッシュに通し、そのろ液を遠心管等に回収する。遠心管等を 1500rpm, 10 分, 10 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL をパラフィルム等にとり、同量のトリパンプ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。

2. 2. 2. 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 $n=5$)。

$$(n \times 10^4) \times 2 \times \text{希釈倍数} = \text{グラム当たりの } \textit{Kudoa septempunctata}$$

定量限界 10 万胞子

3. 総合判定

A 遺伝子検査法かつ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。遺伝子検査法で陰性の場合には、顕微鏡検査を行わず陰性と判定する。遺伝子検査法が陽性であって顕微鏡検査で陰性の場

合は、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に郵送する。遺伝子検査法が陽性であって顕微鏡検査で定量限界以下の場合は、「*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。

- B 顕微鏡検査のみで陰性と判定することはできる。顕微鏡検査で陽性と判定された場合には、必要に応じて遺伝子検査により、*Kudoa septempunctata* の定性確認を行うことが望ましい。

注釈

(ア)本試験で示したリアルタイム PCR 法は *Kudoa 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 *Kudoa 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。

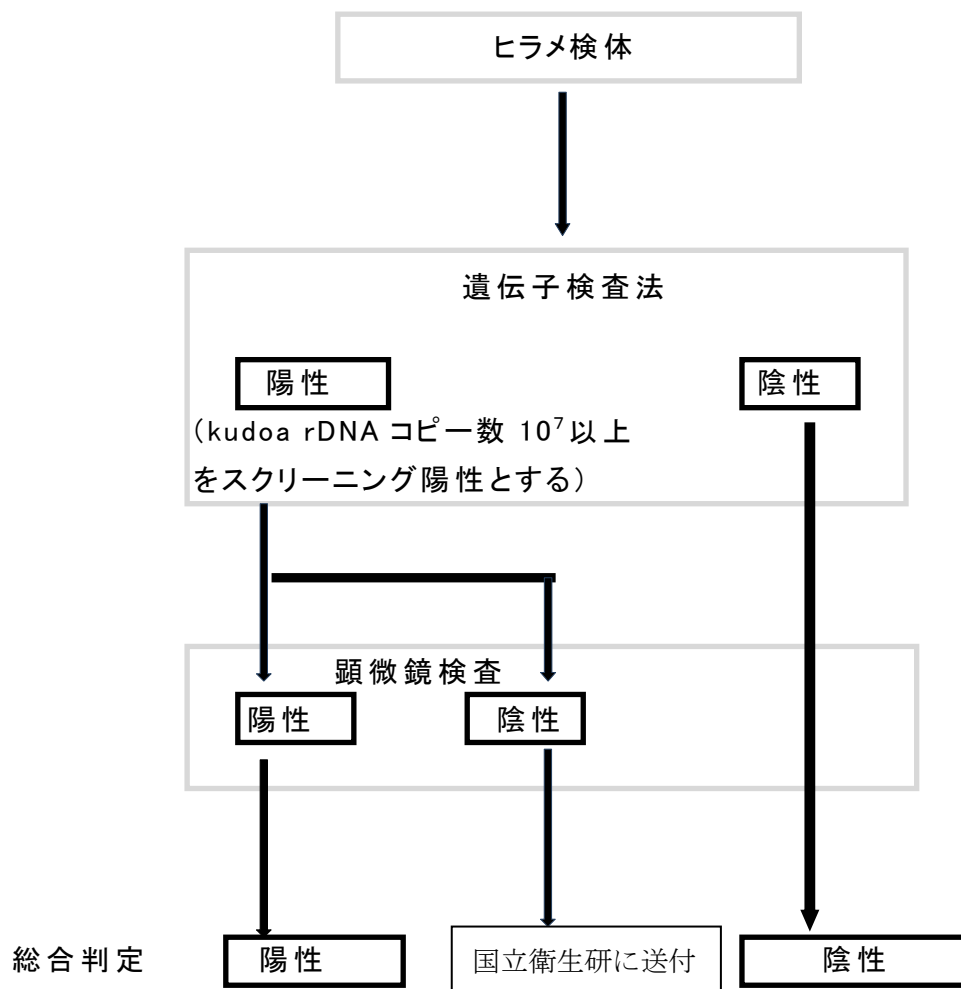
(イ)1*Kudoa* 孢子中の rDNA のコピー数は、現段階では不明なため、スクリーニング法の判定には rDNA コピー数を用いる。複数機関による妥当性試験の結果から、カットオフ値を暫定的に 10^7 とした。

<参考> *Kudoa* 孢子の顕微鏡検査法

URL : http://www.nihs.go.jp/kanren/kudoa_houshi_20110711-01.pdf

検査法フローチャート

A.スクリーニング法として、リアルタイム PCR を行う場合



B.顕微鏡検査から行う場合

