

## 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<sup>(注)</sup>。

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  $\mu$ 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) $\mu$ l を加える。
- ④ Proteinase K (20 $\times$ F) $\mu$ 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) $\mu$ 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  $\mu$ l を新しいエッペンドルフチューブに移す。
- ⑦ Buffer AL 200  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 × 10<sup>9</sup> 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 × 10<sup>7</sup>/μl, 2.5 × 10<sup>5</sup>/μl, 2.5 × 10<sup>3</sup>/μl, 2.5 × 10<sup>1</sup>/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 × 10<sup>8</sup>, 1 × 10<sup>6</sup>, 1 × 10<sup>4</sup>, 1 × 10<sup>2</sup>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 $-0.301$  ( $\pm 0.020$ ) 以下であることを確認する。

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

(例) 検量線から得られた DNA 溶液  $4 \mu\text{l}$  のコピー数が 200 の場合

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

### 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  $200 \mu\text{m}$  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  $100 \mu\text{m}$  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  $10 \mu\text{L}$  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  $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm}$  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。

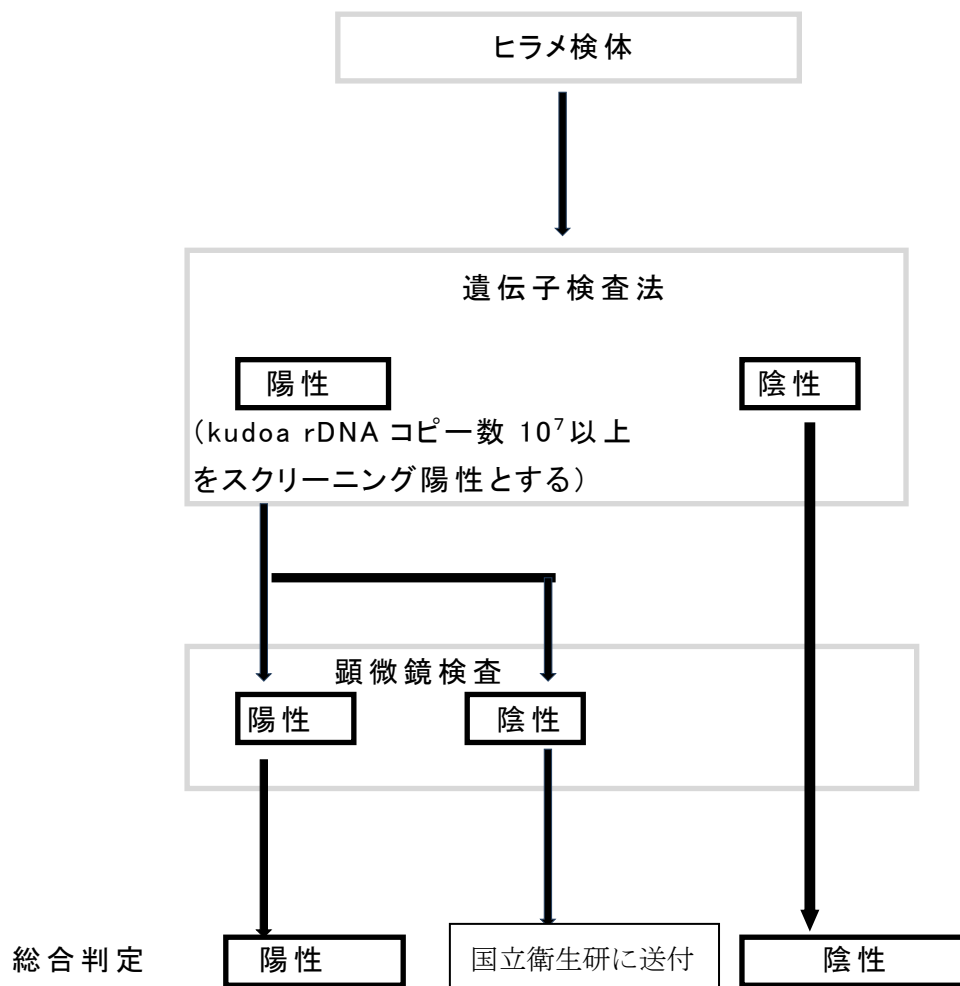
(イ)1*Kudoa* 孢子中の rDNA のコピー数は、現段階では不明なため、スクリーニング法の判定には rDNA コピー数を用いる。複数機関による妥当性試験の結果から、カットオフ値を暫定的に  $10^7$  とした。

<参考> *Kudoa* 孢子の顕微鏡検査法

URL : [http://www.nihs.go.jp/kanren/kudoa\\_houshi\\_20110711-01.pdf](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

