

## ヒラメ養殖における ナナホシクドア *Kudoa septempunctata* 検査キットの実用性

甲斐桑梓\*・西岡豊弘\*\*・木本圭輔・福田 穰

大分県農林水産研究指導センター水産研究部

### Practicality of test kit for detecting *Kudoa septempunctata* in Bastard Halibut *Paralichthys olivaceus*

SOSHI KAI, TOYOHIRO NISHIOKA, KEISUKE KIMOTO and YUTAKA FUKUDA

Fisheries Research Division, Oita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center

キーワード：*Kudoa septempunctata*, NASBA 法, 核酸クロマトグラフィー, イムノクロマトグラフィー, ヒラメ

ヒラメの筋肉に寄生する粘液胞子虫ナナホシクドア *Kudoa septempunctata* による食中毒は、ヒラメ養殖における重大な問題となっている。大分県では、食中毒の防止対策に関する通知（農林水産省通知）<sup>1)</sup> に準拠した県版ガイドライン<sup>2)</sup> によって、クドアフリー種苗の確保、種苗導入後のクドア寄生の監視、クドア寄生ヒラメを流通させないことを目的とした、種苗導入、養殖および出荷の三段階における監視検査が行われている。さらに、ガイドライン以外に種苗導入時の抜き取り検査も実施されている。

本県のナナホシクドア検査は、農林水産省通知に基づいた PCR 法または検鏡法で実施されている。とくに、種苗導入時の抜き取り検査では、高い検出感度が望まれることから PCR 法が採用されているが、最近の研究<sup>1)</sup> でナナホシクドア感染初期（感染から 2 週間）には現行の PCR 法で検出されない可能性が示唆されている。また、ヒラメ出荷時の検鏡検査は労力を要し、検査者の熟練度の差が問題となることなどから、簡便かつ高精度な検査手法が求められている。

そこで著者らは、最近開発されたナナホシクドア検査法のうち NASBA・核酸クロマトグラフィー法とイムノクロマトグラフィー法を応用した 2 種の検査キットについて、ヒラメ養殖生産現場への導入を目的とした

実用性の評価を行ったので、結果を報告する。

### 材料と方法

**供試ヒラメ筋肉** ナナホシクドア感染ヒラメ（平均体重 413g）の冷凍保存筋肉を陽性筋肉として用いた。陰性筋肉には水産研究部で生産された人工種苗を育成したヒラメ（約 500 ～ 800g）の筋肉を、PCR 法でナナホシクドア陰性確認して使用した。

**NASBA・核酸クロマトグラフィー法** 陰性筋肉に等量の DEPC 処理水を加え磨碎して陰性筋肉ホモジネートを調製した。ナナホシクドア胞子  $10^6$  個/g を含む陽性筋肉 1g に陰性筋肉ホモジネート 9g を加えて乳鉢で磨碎し、 $10^5$  個/g 筋肉由来相当の試料を作製した。さらに  $10^5$  個/g 試料を陰性筋肉ホモジネートで段階希釈し  $10^4$  個/g から  $10^0$  個/g 筋肉由来に相当する試料を調製した。

NASBA・核酸クロマトグラフィー法による検査には、スイフトジーン® クドア「カイノス」（カイノス）を用いて、キット添付のプロトコルに従い各調製試料について検査を実施した。また、各試料 50mg から DNA を抽出して PCR 法に供し、キットによる検査結果と比較した。PCR 法は農林水産省通知に記載されたプロト

\* 現所属：大分県水産振興課

\*\* 国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所上浦庁舎

\*1 養殖ヒラメに寄生した *Kudoa septempunctata* による食中毒の防止対策について（水産庁増殖推進部長通知.2012）

\*2 ヒラメによる食中毒の防止対策ガイドライン（大分県農林水産部水産振興課.2012）

コル B 法に従って行った。DNA 抽出には QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を、ポリメラーゼには AmpliTaq Gold® (ThermoFisher) を用い、S1000 サーマルサイクラー (BIO-RAD) および Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) の 2 機種 of サーマルサイクラーで反応を行った。その後電気泳動により増幅産物の確認を行った。

さらに、微生物感染症に罹病したヒラメが検査魚に混入した場合の検査結果への影響を検討するため、リンホシスチス病のヒラメ (体重 372g) とエドワジエラ症のヒラメ (体重 361g) の筋肉を用いた検査を実施した。これらの罹病魚筋肉は PCR 法でナナホシクドア陰性を確認したものである。それぞれの感染症の罹病魚筋肉に等量の DEPC 処理水を加え磨砕して病魚筋肉ホモジネートを調製した。10<sup>3</sup> 個/g 筋肉由来相当試料 1g に病魚筋肉ホモジネート 9g を加えて磨砕し、病魚混入陽性試料とした。

**イムノクロマトグラフィー法** イムノクロマトグラフィー法による検査には、ARK Checker® IC *Kudoa septempunctata* (アークリゾース) を使用したが、個別検査用の S-1 および 10 個体同時検査用の S-10 の 2 種類のキットについて、添付のプロトコルに従い水産研究部と増養殖研究所の 2 機関によるバリデーション試験を行った。すなわち、ナナホシクドア陽性筋肉のうち孢子数が 10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> および 10<sup>7</sup> 個/g の 4 試料に陰性筋肉を加えた計 5 試料を用いて、各機関でキットごとに 2 回の検査を実施した。

キット S-1 ではキット付属のネジにより各筋肉試料から 1 回採取操作して検査したが、S-10 では各陽性筋肉試料から採取操作した 1 本のネジと陰性筋肉試料から採取操作した 9 本のネジをプールして検査した。なお、本報で用いた筋肉試料の孢子数は厚労省通知の計数法<sup>3</sup>に基づき計測したが、10<sup>4</sup> 個/g の試料については血球計算盤上の 9 区画全ての孢子を計数し平均値を求めたものである。また、各検査試料 25mg から DNA を抽出し PCR 法に供し、キットによる検査結果と比較を

行った。

さらに、NASBA・核酸クロマトグラフィー法による検査と同様の感染症罹病魚を用い、検査魚に混入した場合の影響をキット S-10 で検討した。各感染症について罹病魚筋肉から採取処理したネジ 9 本に、ナナホシクドア 10<sup>5</sup> 個/g の陽性筋肉から採取処理したネジ 1 本を加えた病魚混入陽性試料と、罹病魚処理ネジ 10 本の病魚混入陰性試料を作製して検査に供した。

## 結 果

**NASBA・核酸クロマトグラフィー法** 各調製試料の NASBA・核酸クロマトグラフィー法キットを用いた検査結果が図 1 で、ナナホシクドアの孢子数が 10<sup>2</sup> 個/g 以上の試料が陽性になった。これに対して、同じ試料を PCR 法で検査した結果、サーマルサイクラー S1000 では 10<sup>3</sup> 個/g 以上、Veriti Thermal Cycler では 10<sup>2</sup> 個/g 以上の試料が陽性であった (表 1)。

微生物感染症に罹病したヒラメが検査魚に混入した場合のキット検査への影響を検討した結果が図 2 である。NASBA・核酸クロマトグラフィー法キット検査では、エドワジエラ症およびリンホシスチス病の罹病魚が含まれていても、ナナホシクドア孢子が含まれていなければ陰性であり、孢子が含まれていれば陽性であった。

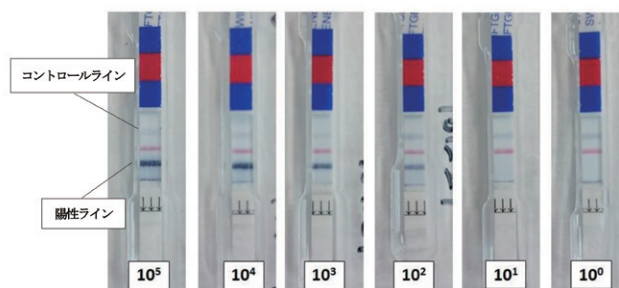


図1 NASBA・核酸クロマトグラフィー法キットによる検査結果。下部の数値は被検査ヒラメ筋肉中のナナホシクドア孢子数 (個/g)

表1 NASBA・核酸クロマトグラフィー法キット検査に用いた試料の PCR 法による検査結果\*

サーマルサイクラー	ナナホシクドア孢子数 (個/g)					
	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>
S1000	+	+	+	-	-	-
Veriti	+	+	+	+	-	-

\*+ : 陽性, - : 陰性

<sup>3</sup> ヒラメからの *Kudoa septempunctata* 検査法 (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通知.2016)

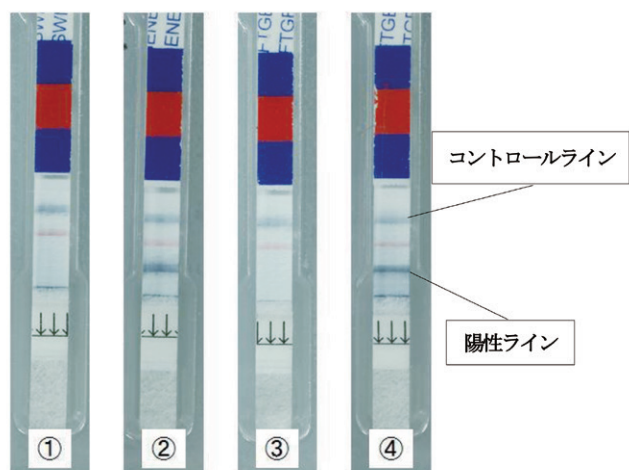


図2 エドワジエラ症(Ed)およびリンホシスチス病(LCD)罹病魚が混入した試料の NASBA・核酸クロマトグラフィー法キットによる検査結果。

- 1 : Ed 罹病魚混入ナナホシクドア陰性試料
- 2 : Ed 罹病魚混入ナナホシクドア陽性試料  
(孢子  $10^2$  個/g 相当)
- 3 : LCD 罹病魚混入ナナホシクドア陰性試料
- 4 : LCD 罹病魚混入ナナホシクドア陽性試料  
(孢子  $10^2$  個/g 相当)

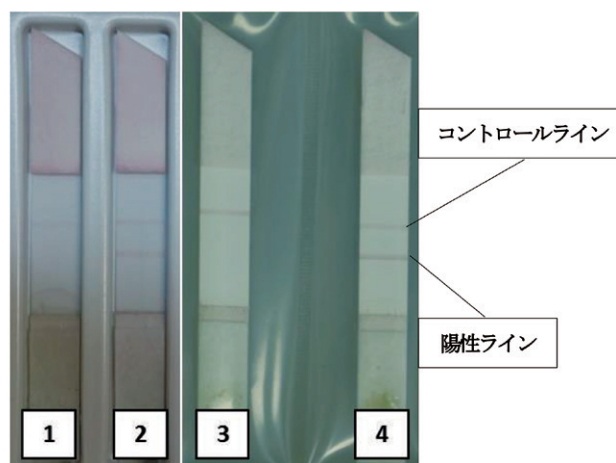


図3 エドワジエラ症(Ed)およびリンホシスチス病(LCD)罹病魚が混入した試料のイムノクロマトグラフィー法キット S-10 による検査結果。

- 1 : Ed 罹病魚混入ナナホシクドア陰性試料
- 2 : Ed 罹病魚混入ナナホシクドア陽性試料  
(孢子  $10^5$  個/g の 1 個体を含む)
- 3 : LCD 罹病魚混入ナナホシクドア陰性試料
- 4 : LCD 罹病魚混入ナナホシクドア陽性試料  
(孢子  $10^5$  個/g の 1 個体を含む)

表2 イムノクロマトグラフィー法キットおよび PCR 法による検査結果\*

検査法	検査機関**	ナナホシクドア孢子数 (個/g)				
		$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	陰性
イムノクロマトグラフィー						
S-10	A	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2
		2/2	2/2	2/2	0/2	0/2
	B	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2
		2/2	2/2	2/2	0/2	0/2
PCR	A	2/2	2/3	2/2	2/2	0/2

\* 陽性数/検査数

\*\* A : 水産研究部, B: 増養殖研究所

**イムノクロマトグラフィー法** イムノクロマトグラフィー法による 2 種のキットを用いたバリデーション試験の結果が表 2 である。キット種類にかかわらず 2 機関ともにナナホシクドア孢子数  $10^5$  個/g 以上の試料が陽性になり、 $10^4$  個/g 試料は陰性であった。なお、PCR 法ではナナホシクドア孢子を含む全ての試料が陽性となった (表 2)。

また、イムノクロマトグラフィー法キットの検査では、エドワジエラ症およびリンホシスチス病の罹病魚が含まれていても、ナナホシクドア孢子が含まれていなければ陰性であり、孢子が含まれていれば陽性であ

った。(図 3)

## 考 察

NASBA・核酸クロマトグラフィー法は、NASBA 法によりナナホシクドアの RNA を増幅させ、ラテラルフローを利用して、増幅産物を着色ラテックスオリゴプローブと固相化オリゴ DNA により特異的にサンドイッチハイブリダイズさせることで、目視による増幅産物の有無確認を可能にしたものである<sup>2, 3)</sup>。本報で使用

したキットではナナホシクドア胞子を  $10^2$  個/g 以上含むヒラメ筋肉試料で陽性が確認できた。検出限界が  $10^2$  個/g 以上とされる PCR 法<sup>4)</sup>で同じ試料について検査したところ、 $10^3$  個/g 以上の試料はサーマルサイクラーの機種にかかわらず陽性になったが、 $10^2$  個/g 試料では結果にばらつきが生じた。これらのことから、当該キットは PCR 法に比べて安定的な高感度でナナホシクドアを検出できることが示唆された。PCR 法がナナホシクドアの DNA を増幅、検出するのにに対し、NASBA・核酸クロマトグラフィー法では細胞中に DNA よりも多く存在する RNA を増幅、検出することで、感度の向上が期待される。さらに、PCR 法と比較して、本キットでは 1 検体あたりの採材量が多いことも、検出の安定性を高める要因になろう。また、ヒラメ養殖で発生するエドワジエラ症やリンホシスチス病の病魚が検査魚に混入した場合の影響も認められなかった。加えて、本キットは最大 30 個体をまとめて検査可能であり、養殖漁場への導入時のヒラメ種苗検査などに適した方法であると考えられる。

イムノクロマトグラフィー法は抗原抗体反応を利用したもので、抗原を含む検体が標識抗体と免疫複合体を形成し、メンブレン上の補足抗体と結合することで目視確認が可能となる。本報で使用したキットは、ナナホシクドアに対するマウスのモノクローナル抗体を利用している<sup>3)</sup>。本報におけるイムノクロマトグラフィー法キットのバリデーション試験では、両機関ともにナナホシクドア胞子の検出限界が、キット S-1 及び S-10 とともに  $10^5$  個/g と想定される結果が得られた。また、NASBA・核酸クロマトグラフィー法キットと同様に、検査魚にリンホシスチス病やエドワジエラ症の病魚が混入しても、検査結果に影響がないと思われる。食品衛生法第 6 条に基づきナナホシクドアが  $10^6$  個/g 以上感染したヒラメの出荷が禁止されているため、出荷時の検査では  $10^5$  個/g 以上の感染強度のナナホシクドアを検出することが必要である。キット S-10 及び S-1 はこの条件を満たしている。とくに、S-10 を用いれば 10 尾まとめて検査でき、検鏡検査に比べ作業時間・量を縮小できることから、出荷時検査に適した方法として期待される。

国内の養殖ヒラメにおけるナナホシクドア寄生は、種苗生産時の用水処理や検査法の普及などにより激減していると思われるが、今後も国産養殖ヒラメの安定

生産のために検査体制の強化が求められる。本報では、市販のナナホシクドア検査キットについて試験を行い、実用性を評価した。NASBA・核酸クロマトグラフィー法キットについては検出感度が高いこと、イムノクロマトグラフィー法キットは操作が簡便、迅速であることなどのメリットが挙げられる。しかしながら、これらのキットでは陽性反応が出た場合、PCR 法のように増幅産物の塩基配列を読んで信頼性を担保することができないという欠点がある。したがってキットで陽性時には PCR 法などによる再検査が必要となるが、PCR 法はナナホシクドア胞子が  $10^2$  個/g 以下の場合には検出できない可能性もある。今後は、Nested PCR 法や LAMP 法などの検出感度が高いとされる手法についても検討し、より良い検査体制を構築することが必要であろう。

## 引用文献

- 1) 森広一郎. 国内ヒラメ養殖現場のクドア対策の現状. 日本食品微生物学会雑誌 2017; 34: 77-80.
- 2) 宇治家武史. 簡便な遺伝子検査のツール「核酸クロマト法」. 臨床科学. 2007; 36: 19-24.
- 3) Sugita-Konishi Y, Fukuda Y, Mori K, Mekata T, Namba T, Kuroda M, Yamazaki A, Ohnishi T. New validated rapid screening methods for identifying *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Japanese Journal of Infectious Diseases. 2015; 68: 145-147.
- 4) Grabner D S, Yokoyama H, Shirakashi S, Kinami R. Diagnostic PCR assays to detect and differentiate *Kudoa septempunctata*, *K. thyrssites* and *K. lateolabracis* (Myxozoa, Multivalvulida) in muscle tissue of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture 2012; 338: 36-40.
- 5) Ohnishi T, Lim B, Nojima N, Ogasawara K, Ingaki S, Makitsuru K, Sasaki M, Nakane K, Tsuchioka H, Horikawa K, Kawabe M, Minegishi Y, Miyazaki N, Sugita-Konishi Y. Inter-laboratory study to validate new rapid screening methods for *Kudoa septempunctata*. Biocontrol Science 2016; 21: 135-138.