短 報

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* 成魚からの
筋肉生検による粘液胞子虫ナナホシクドア
Kudoa septempunctata の新検査法井上誠章,^{1*} 佐藤 純,¹ 米加田徹,²
西岡豊弘,¹ 森広一郎²(2016 年 1 月 6 日受付, 2016 年 6 月 12 日受理,
2016 年 8 月 30 日 J-STAGE 早期公開)¹(国研)水産研究・教育機構増養殖研究所 上浦庁舎,²同 南勢庁舎New method for detecting *Kudoa septempunctata* from
adult flounder *Paralichthys olivaceus* by muscle biopsyNARIAKI INOUE,^{1*} JUN SATOH,¹ TOHRU MEKATA,²
TOYOHIRO NISHIOKA¹ AND KOH-ICHIRO MORI²¹Kamiura Laboratory, National Research Institute of
Aquaculture, Fisheries Research and Education Agency,
Saiki, Oita 879-2602, ²Nansei Laboratory, National
Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research and
Education Agency, Minami-ise, Mie 516-0193, Japanキーワード: *Kudoa septempunctata*, 食中毒, ナナホシ
クドア, 粘液胞子虫, ヒラメ

近年, ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の魚体に寄生した
ナナホシクドア *Kudoa septempunctata* が生食による食
中毒の原因となることが明らかにされた。¹⁾ その後, ナ
ナホシクドア感染ヒラメの食中毒の発生防止について,
厚生労働省 (以下, 厚労省) より平成 23 年 6 月に「生
食用生鮮食品による原因物質不明有症事例についての提
言」がなされ, これにより出荷前ヒラメのモニタリング
検査等の実施が求められた。さらに厚労省よりヒラメ筋
肉 1 g 当たりのナナホシクドア胞子数が 1×10^6 /g 以上
の場合には食品衛生法第 6 条の違反として取り扱うこ
と (食安発 0607 第 7 号), および標準的なナナホシク
ドア胞子数の検査法 (食安監発 0711 第 1 号, *Kudoa*
septempunctata の検査法 (暫定版) http://www.nihs.go.jp/kanren/kudoa_houshi_20110711-01.pdf) が通知さ
れた。厚労省通知の検査法にはリアルタイム PCR 検査
法と顕微鏡検査法の 2 種類があるが, 養殖業者が自ら
検査を行う場合は後者の顕微鏡検査を行うと想定され
る。顕微鏡検査法では魚体から 0.5 g の筋肉の採材が必
要とされ, これを魚を生存させたまま行うことは困難で
あり, 活魚流通により高価値を持つヒラメ商材にとって

殺傷を前提とする本検査の実施は致命的である。水産庁
から養殖現場で対応可能な簡易検査法として綿棒を用い
る方法が示されているが, 綿棒法はそもそも生体検査を
本来の目的としておらず,²⁾ 生体を対象に本検査を行う
場合には後述の通り魚体に負担がかかる場合がある。ま
た綿棒法に限らず生体検査法の検出感度を統計学的に評
価した例はない。そこで, 本研究では前記の厚労省基準
を考慮したうえで, 魚を生かしたままで行うことができ
る新たなナナホシクドア検査法を開発し, 従来法と検出
感度を比較した。

ナナホシクドア感染魚が確認され, 生食用出荷を自主
的に制限している国内の養殖場から入手した 2 歳魚の
ヒラメ 45 個体 (平均体重 590.1 g, 平均全長 38.0 cm) を
供試魚とした。全ての供試魚はまず FA100 (DS ファー
マアニマルヘルス) を 1/3,000 に希釈した海水に約 3
分間浸漬して麻酔し, 全長・体重の計測と個体識別のため
に PIT タグ (BIOMARK) の装着を行った。次に,
各個体の頭部から尾部にかけて目視によりおよそ 5 等
分した位置それぞれ 1 ヶ所から合計 5 回, ピストンを
外した注射器を用いて, 背鰭側から腹側に向かって約 3
cm の筋肉部に注射針 (12G) が無眼側に貫通するよう
斜めに一様の力で刺し込んだ。注射針内に採取した筋肉
片は予め空の状態で計量した 1.5 mL のマイクロチュー
ブ (日本ジェネティックス) にピストンを使って押し出
して生検試料とし, 各試料は個別に取り扱った。その
後, 供試魚を底面積 4.5 m² の 5 kL 水槽 (水量 3.5 kL)
に收容し, 電解処理後に活性炭で脱塩素した海水 (平均
水温 21.8°C) を 7 回転/日で掛け流して 28 日間飼育し
た。また, 飼育水はすべて電解処理後に排水した。飼育
期間中の飼料にはひらめ EP フロート 6 号 (日本配合飼
料) を用い, 飽食量を週 3 回給餌した。飼育期間中の
死亡魚および 28 日間の飼育終了時の供試魚を飼育水槽
より取り上げ, 全長・体重の計測および生検による傷口
の治癒状況を目視で確認した後, 魚体を切開して有眼側
の背部の体側筋肉を 0.5 g 採材した。

生検による採材試料が入ったマイクロチューブは秤量
し, 50 μ L のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH = 7.4)
と直径 3.0 mm のジルコニアボール 1 個 (ニッカトー,
YTZ 3) を加え, 試料破砕装置 (Qiagen, TissueLyser)
で毎秒 28 往復で 120 秒間振盪し試料を磨砕した。この
磨砕液 10 μ L をスライドガラス上に滴下し, 18 mm 四
方カバーガラス下に出現するナナホシクドア胞子数を

ウェットマウント法により 200 倍率下で計数した（以後、生検法）。本研究では生検法と合わせて、以下に記述する前出の厚労省通知の顕微鏡検査法を一部改変しナナホシクドア孢子密度を算出した（以後、従来法）。まず、切開による採材試料 0.5 g を約 3.0 mL の PBS を加えて磨砕しながら目合い 230 μm のワイヤーメッシュ（Sigma-Aldrich, Cell Dissociation Sieve-Tissue Grinder Kit #CD-1）で濾過した。この磨砕液を全て回収し、さらに PBS で洗浄しながら目合い 100 μm のセルストレーナー（BD Falcon）で濾過した。続いて、この磨砕液を 50 mL 遠心管に全て回収し 1,500 rpm, 10 分, 10 $^{\circ}\text{C}$ の条件で遠心して上清を捨てた。沈澱に PBS を 0.5 mL 加えて再懸濁させ、この懸濁液 10 μL 中に出現したナナホシクドア孢子数を Burkert-Turk 型のバクテリア用計算盤を用いて計数した。ただし計数時には、計算盤 1 区画（縦 1 mm $\times$ 横 1 mm $\times$ 深さ 0.02 mm）あたりの孢子出現数を 5–200 個になるように懸濁液を PBS で希釈調整した。計数は計算盤 4 区画について行い、次式を用いて密度換算した（孢子数/ $g = (4 \text{ 区画の平均孢子数} \times 10^4 \times 5 \times \text{希釈倍数})$ ）。この従来法による孢子密度の定量下限は $1 \times 10^5/g$ である。

1 回のみの生検法による検査を行った場合に、従来法によりナナホシクドアに感染していると判断されたのものにもかかわらず生検法で感染なしと誤判定する、すなわち偽陰性が出現する確率（ P 、以後、偽陰性確率）をロジスティック回帰モデルにより推定した。モデルの応答変数には 1 回の生検法により算出されたナナホシクドア孢子密度が 0 より大きかった場合を陽性（ナナホシクドア感染を正判定した）と見なしダミー変数として 0 を、一方でナナホシクドア孢子密度が 0 であった場合を偽陰性（ナナホシクドア感染を誤判定した）と見なしダミー変数として 1 を与えた。説明変数には従来法により算出された各個体のナナホシクドア孢子密度（ $Den \times 10^4$ ）、生検法により採材した筋肉量（ $Weight$ ）および生検の位置情報（ $Point$ ）を用いた。全ての説明変数の組み合わせを用いたモデルを作成し、各モデルの赤池情報量基準（AIC）を算出して AIC 最小モデルを採択

した。本研究で使用したすべての統計検定、モデル推定および AIC の算出には Windows 版の R 3.0.1 を用いた。³⁾

生検時また直後の死亡は見られず、生検を行った供試魚 45 個体中、28 日後の飼育終了時まで生残した個体は 34 個体（生残率 75.5%）であった。飼育終了時には生残魚すべての個体における生検時の注射針による傷口は、肉眼では周辺組織との判別が困難なほど完全に治癒していた。生残魚の飼育開始時および終了時の平均体重はそれぞれ 648.4 g および 693.9 g であった。従来法により、45 個体中 30 個体からナナホシクドア孢子が観察され、これら感染個体の筋肉中のナナホシクドア孢子密度は 1×10^5 – $2.5 \times 10^8/g$ と算出された。従来法によるナナホシクドア感染確認魚 30 個体について、合計 150 回の生検がなされたが、そのうち明らかに採材に失敗したと思われる 32 回（採材筋肉量 5.0 mg 以下）を除いた 118 回の生検データをロジスティック回帰分析を含めた以後の解析に使用した。従来法により感染ありと判断された 30 個体中、24 個体について行われた合計 92 回の生検でナナホシクドア孢子が出現し、生検法から孢子密度は 3.0×10^4 – $3.4 \times 10^7/g$ と算出された。また、1 回の生検での筋肉の平均採材量は $15.2 \pm 7.7 \text{ mg}$ であった。生検法によって算出された孢子密度と従来法による孢子密度との間には有意な相関は検出されなかった（ $p > 0.05$ ）。

偽陰性確率（ P ）の推定候補モデルのなかで（Table 1）、ナナホシクドア孢子密度（ Den ）のみを説明変数とするモデル（Table 1 における Mode 1）の AIC が最小であり、これを採択モデルとした。採択モデルの切片（ β_0 ）およびナナホシクドア孢子密度（ Den ）の係数（ β_1 ）はそれぞれ 1.571（ $SE = 0.521$ ）および -0.020 （ $SE = 0.005$ ）であり、説明変数（ Den ）はワルド検定および尤度比検定によるスルモデルとの比較においても有意と判定された（ $p < 0.01$ ）。また採択モデルの残差逸脱度（ $= 60.185$ ）/自由度（ $= 116$ ）は 0.51 であり、これより採択モデルは過大または過小分散ではないと判断できた。採択モデルを用いて従来法によって孢子密度が 1×10^5 –

Table 1 Factor selection for generalized linear models (GLM) for changes in false-negative probability of *Kudoa septempunctata* infection

GLM model	Linear predictor	df	AIC	ΔAIC	Intercept (β_0)	Den (β_1)	$Weight$ (β_2)	$Point$ (β_3)
Model 1	$\lambda = \beta_0 + \beta_1 Den + e$	2	64.18	0.00	+	+		
Model 2	$\lambda = \beta_0 + \beta_1 Den + \beta_2 Weight + e$	3	66.11	1.93	+	+	+	
Model 3	$\lambda = \beta_0 + \beta_1 Den + \beta_3 Point + e$	6	70.08	5.90	+	+		+
Model 5	$\lambda = \beta_0 + \beta_1 Den + \beta_2 Weight + \beta_3 Point + e$	7	72.03	7.85	+	+	+	+
Null model		1	126.50	62.32				

+, Using factors for GLM analysis. Bold font indicates optimal model.

Fig. 1 Comparison between false-negative probability curves at the five different biopsy times.

$3 \times 10^6/\text{g}$ である個体について、生検法による偽陰性確率 (P) を推定した (Fig. 1)。これより、食品衛生法第 6 条の違反基準である孢子密度 $1 \times 10^6/\text{g}$ の個体について、1 回のみの生検を行った場合の偽陰性確率 (P) は 0.38 と推定された。1 回のみの生検法での偽陰性確率を P とすれば、各個体 n 回の生検法を行った場合に全ての検査で偽陰性が出る確率は P^n と表せる。これより従来法での孢子密度が $1 \times 10^5 - 3 \times 10^6/\text{g}$ と算出された個体について、1-5 回 ($n=1, 2, \dots, 5$) の生検法を行った場合に、全検査で偽陰性が出る確率 (P^n) を推定し比較した (Fig. 1)。従来法による孢子密度 $1 \times 10^6/\text{g}$ の個体について偽陰性確率 (P) を 0.05 以下にする場合には 3 回 ($P=0.05$) の生検が必要となるが、孢子密度 $2 \times 10^6/\text{g}$ 以上の個体では 2 回の生検で ($P=0.004$)、孢子密度 $2.5 \times 10^6/\text{g}$ 以上の個体ではわずか 1 回の生検で ($P=0.02$)、偽陰性確率 (P) を 0.05 以下とすることができる (Fig. 1)。ただし、必要な生検回数の決定基準となる偽陰性確率 (P) の閾値をどの程度に設定するかは検査対象魚の感染強度や使用目的に応じて慎重に検討されるべきであろう。

本研究において 5 回の生検を行った個体の生残率は 75.5% であった。本飼育期間と同時期に、供試魚と同じ由来のヒラメを 120 kL 水槽で飼育していたが、生検を行った供試魚とほぼ同様に生残率は 73.1% であった (未発表)。ナナホシクダの重篤寄生が確認されている供試魚および 120 kL 水槽の飼育魚の死亡原因は、その死亡状況からおそらくは養殖場から持ち込んだ *Edwardsiella tarda* および *Streptococcus parauberis* などの細菌感染症や原生動物である *Cryptocaryon irritans* の

寄生が原因であると考えられ、生検法による採材が死亡原因であった可能性は低い。生検法と従来法の両者で算出された孢子密度には有意な相関が検出されなかったことから、生検法による孢子密度を回帰式より従来法の孢子密度に変換することはできない。ロジスティックモデルの説明変数として生検の位置情報 (Point) が採択されなかったことから (Table 1)、ナナホシクダ孢子は頭部側または尾部側といった魚体部の一定の領域に偏って分布する傾向にはないと推察できる。

綿棒を用いる簡便な検査法²⁾を生体に用いる場合では、尾柄部分にメスを入れて切開するか、あるいは鰓の内側の筋肉部分である偽鰓に綿棒を刺し込んで採材する必要がある。そのため採材による傷口が大きくなることから魚体にかかる負担が大きく、細菌感染症に罹患または耐過したような個体では疾病が発症し死亡する危険性がある。実際、綿棒を用いた検査を行ったところ健全な群では検査後の死亡は認められなかったが、エドワジエラ症原因細菌 *E. tarda* の保菌群では 55% の死亡が認められた (未発表)。一方で、本研究で開発された生検法は個体を死亡させることなく、食品衛生法基準の $1 \times 10^6/\text{g}$ の個体では 3 回の生検により従来法と同程度 (偽陰性確率 $P=0.05$) の検出感度を有すると推定された。ただし 150 回の生検のうち、採材に 32 回 (21%) 失敗しており、今後はより効率的な採材手法の開発や検査方法の簡便化を図る必要がある。また生検後のヒラメを生食用として出荷することを考えれば、検査部位の傷跡の経時間的な変化や、筋肉中の内出血の有無など治癒状況の詳細な情報が必要であろう。いずれにせよ、本手法を用いれば魚体を死亡させることなくナナホシクダ検査を実施でき、さらに非食部位である尾柄部等で集中して検査を行えば、検査後も商品価値を損なうことなく活魚としてヒラメを出荷できる可能性が高い。本技術はヒラメ養殖の効率化とヒラメ生食の安全性の向上において重要であろう。

本研究は、農林水産省レギュラトリーサイエンス新技術開発事業のうち、寄生虫 (クダ・セブテンpunkタータ) に対するリスク管理に必要な技術開発 (課題番号 2403) の成果の一部である。

文 献

- 1) 大西貴弘. *Kudoa septempunctata* を原因微生物とする食中毒. 食品衛生研究 2011; **61**: 13-20.
- 2) ヒラメに寄生した *Kudoa septempunctata* の検査方法について, 水産庁, 東京. 2012.
- 3) R Core Team R: A language and environment for statistical computing. In: R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2009. URL <http://www.R-project.org/>.