

原 著

食中毒起因寄生虫 *Kudoa septempunctata* の LAMP 法による迅速検出

秋田 裕子, 高尾 信一

Rapid detection of *Kudoa septempunctata* by Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay

HIROKO AKITA and SHINICHI TAKAO

(Received October 13, 2016)

Kudoa septempunctata is the new causative agent of a food-borne disease associated with the consumption of raw olive flounder. A highly sensitivity method is required for the detection of *K. septempunctata* because it does not multiply in the human body. In this study, we developed a rapid and simple method for detection of *K. septempunctata* genomes using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. This assay could yield results within about 30 min under isothermal conditions at 65°C, and could be detected visually in a tube without any expensive equipment. All samples detected positive by microscopic observation were also detectable by LAMP assay. The detection limits for *K. septempunctata* genomes in olive flounder samples were about 10^6 copies/g or 10^4 spores/g. The sensitivity of this assay meets the criteria for detection limits prescribed in the official analytical method. These findings established that the LAMP assay is potentially useful for a rapid and simple screening for detection of *K. septempunctata* genomes from olive flounder in outbreaks of food-borne diseases.

Key words : 食中毒起因寄生虫, *Kudoa septempunctata*, LAMP法

緒 言

Kudoa septempunctata (クドア) は、ヒラメの筋肉に寄生する粘液胞子虫の一種で、極嚢と呼ばれる構造を6～7有するのが特徴であり、ヒトに対して一過性の嘔吐と下痢を引き起こすことが報告されている [1, 2]. クドアは、平成23年6月の厚生労働省通知(平成23年6月17日付食安監発0617第3号)により、食中毒の病因物質として取り扱われることとなり、平成24年12月には、食中毒統計の対象となる病因物質に追加された。食中毒統計によると、平成24年以後、クドアを原因とする食中毒は、毎年20～40件、200～500名程度発生している [3].

クドアの検査については、平成23年7月11日付厚生労働省通知(食安監発0711第1号)で暫定法として示されている(平成28年4月27日付生食監発0427第3号で改正)。検査法は、定量リアルタイムPCR法によるスクリーニング検査法と、鏡検によって直接胞子を検出する顕微鏡検査の2段階からなり、最終判定には顕微鏡検査による胞子の確認が必要である。すなわち、リアルタイムPCRで*Kudoa* rDNAのコピー数が1g試料当たり 10^7 以上

をPCR陽性とし、かつ顕微鏡検査で6～7つの極嚢を有する胞子が検出された場合、陽性と判定する。また、この方法により検査を実施し、筋肉1グラムあたりのクドアの胞子数が 1.0×10^6 個を超えることが確認された場合、食品衛生法第6条に違反するものとして取り扱うこととされている(平成24年6月7日付食安発0617第3号厚生労働省通知)。

クドアは細菌やウイルスと異なり、人体内での増殖は認められていないため、高感度な検出法が必要である。一方、暫定法で定められているリアルタイムPCR法は、高額な機器を必要とする。これに対して、LAMP法は、増幅反応過程でピロリン酸マグネシウムが生成され、反応液の白濁の有無により視覚的に陽性・陰性を判定できる特徴があることから、種々の微生物の迅速遺伝子検査に用いられており、操作も簡便である。

そこで、本研究では、LAMP法を用いたヒラメからの迅速・簡易なクドア検出法を検討した。

Table 1 Primer sets for detection of *Kudoa septempunctata*

Primer name	Sequences (5'-3')	Final concentration (μM)
F3	CGTCAGGGCTATTGGCACTA	0.2
B3	GACTTGTCCGCACGTAGC	0.2
FIP	AGCCGCATCCACGCCAACAAATATTTGAGGTTAAATGGCCAGCAGT	1.6
BIP	ATGTGTGTGTGGAAGCGTTGGTTTTCACTGTGACCAGAACGAACC	1.6
LF	TCATTGGCTGTGAAAGCCAAA	0.8
LB	GATGTATTGTTCGGTTGGTGTTCG	0.8

材料および方法

1 供試検体

平成23～25年度に当センターに搬入された食中毒事案等のヒラメ27検体を用いた。

2 方法

(1) 顕微鏡検査法

「*Kudoa septempunctata*の検査法について (暫定版)」(平成23年7月11日付食安監発0711第1号)に準じた。すなわち、検体を0.5 g秤量し、PBSを加え、軽くつぶしてメッシュを通し、ろ液を遠心分離後、上清を捨て、PBS 0.5 mlに懸濁したものを10 μlにメチレンブルー溶液を加えて混合し、血球計算板で6～7極嚢を有するクドア胞子を計測した。本研究では、クドア胞子が観察された場合を陽性とした。

(2) DNA抽出法およびリアルタイムPCR法

「*Kudoa septempunctata*の検査法について (暫定版)」(平成23年7月11日付食安監発0711第1号)に準じた。すなわち、ヒラメ検体から50 mgを2ヶ所より採取し、QIAamp DNAMini Kit (QIAGEN)を用い、200 μlのBuffer AEで溶出したDNA 4 μlをテンプレートとした。リアルタイムPCR法は、TaqMan Universal Master Mix (Life Technologies)を用いて反応液を調整し、7500リアルタイムPCRシステム (Life Technologies)で反応を行い、陽性コントロールのコピー数からDNA溶液のコピー数を求めた。本研究では、クドア遺伝子が検出された場合を陽性とした。

(3) LAMP法

クドア28S rDNAを標的遺伝子とし、*Kudoa septempunctata*に特異的な領域を含む6つのプライマー (Table 1)を設計し、DNA増幅試薬キット (栄研化学)を用いて、Table 2に示した組成で、LAMP反応を行った。LAMP反応は、Loopamp濁度測定装置LA-320Cを使用して、65℃で90分の条件で行い、Threshold time (Tt)値 (反応液の濁度が0.1を超えるまでの時間)を測定し、値が得られた場合を陽性とした。

Table 2 Components of reaction mixture for LAMP assay

	Volume
2× Reaction Mix	12.5 μl
Primer FIP (20 μM)	2.0 μl
Primer BIP (20 μM)	2.0 μl
Primer F3 (10 μM)	0.5 μl
Primer B3 (10 μM)	0.5 μl
Loop primer LF (10 μM)	1.0 μl
Loop primer LB (10 μM)	1.0 μl
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0 μl
template DNA	4.0 μl
Distilled Water	2.5 μl
Total	25 μl

(4) LAMP法の検出限界の測定

LAMP法の検出感度を測定するため、顕微鏡検査でクドア胞子が、それぞれ 3.0×10^7 胞子/g、 4.6×10^6 胞子/g確認できたクドア陽性ヒラメ2検体のDNA抽出液を10倍段階希釈してテンプレートとし、各3回ずつLAMP法を実施し、検出感度を測定した。また、クドア遺伝子のコピー数は、リアルタイムPCR法により各3回ずつ測定し、定量した。一部については増幅産物を確認するため、3%アガロースゲルにより電気泳動を行った。

結 果

1. LAMP法の確立と検出限界の測定

顕微鏡検査により確認されたクドア胞子の顕微鏡写真をFig. 1に示した。LAMP法の検出限界を測定するため、クドア陽性2検体のDNA抽出液を10倍段階希釈してリアルタイムPCR法およびLAMP法により測定し、比較した結果をTable 3に示した (n=3)。LAMP法では、いずれも、クドア遺伝子がリアルタイムPCR法による定量値が、オーダーとして 10^2 コピー/反応までは3/3ですべて陽性、 10^1 コピー/反応は1検体は1/3が陽性、もう1検体はすべて陰性であった。これらのことから、構築したLAMP法の検出限界は、リアルタイムPCR法での 10^2 コピー/反応であると考えられた。また、LAMP法が陽性の場合のTt値は16～30分であり、およそ30分以内に判定が可能であった。一方、リアルタイムPCR法では、 10^1 コピー/反応まで3/3ですべて陽性、それ以下では、

Table 3 Sensitivity of LAMP and Real-time PCR assay for positive samples of *Kudoa septempunctata* in olive flounder

Sample Number	DNA dilution rate	LAMP		Real-time PCR	
		Positive rate (n=3)	Tt (Ave.)	Positive rate (n=3)	copies /tube (Ave.)
1	10 ⁰	3/3	16:06	3/3	1.55 × 10 ⁷
	10 ¹	3/3	17:10	3/3	3.49 × 10 ⁶
	10 ²	3/3	18:42	3/3	3.61 × 10 ⁵
	10 ³	3/3	20:46	3/3	3.07 × 10 ⁴
	10 ⁴	3/3	23:44	3/3	2.58 × 10 ³
	10 ⁵	3/3	30:24	3/3	2.53 × 10 ²
	10 ⁶	0/3	-	3/3	2.15 × 10 ¹
	10 ⁷	0/3	-	1/3	5.69 × 10 ⁰
2	10 ⁰	3/3	16:08	3/3	1.23 × 10 ⁶
	10 ¹	3/3	17:48	3/3	4.00 × 10 ⁵
	10 ²	3/3	19:24	3/3	1.05 × 10 ⁴
	10 ³	3/3	22:54	3/3	3.65 × 10 ³
	10 ⁴	3/3	26:42	3/3	3.23 × 10 ²
	10 ⁵	1/3	30:24	3/3	3.07 × 10 ¹
	10 ⁶	0/3	-	2/3	1.03 × 10 ¹
	10 ⁷	0/3	-	0/3	-

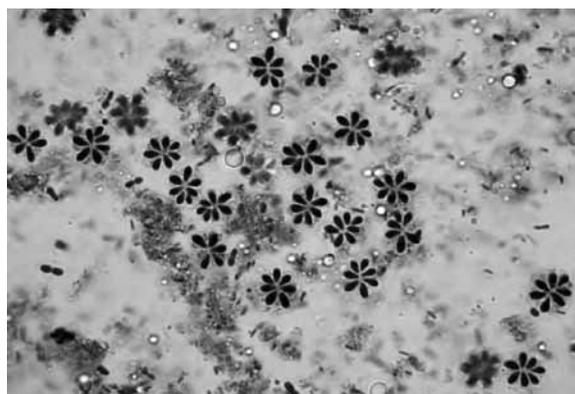


Fig. 1 *Kudoa septempunctata*. (methylene blue stain)

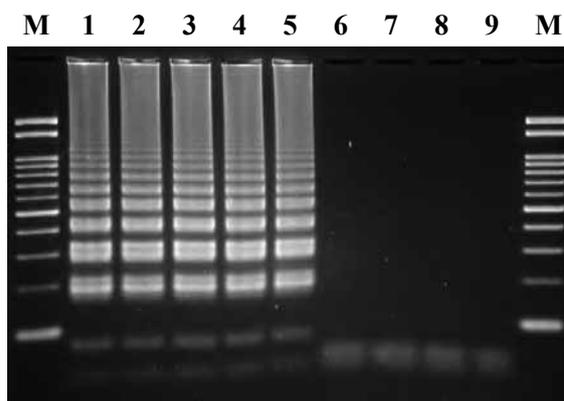


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of LAMP products. LaneM, 100bp ladder; Lane1, 10⁶ copies/tube; Lane2, 10⁵ copies/tube; Lane3, 10⁴ copies/tube; Lane4, 10³ copies/tube; Lane5, 10² copies/tube; Lane6, 10¹ copies/tube; Lane7, 10⁰ copies/tube; Lane8, 10¹ copies/tube; Lane9, negative control

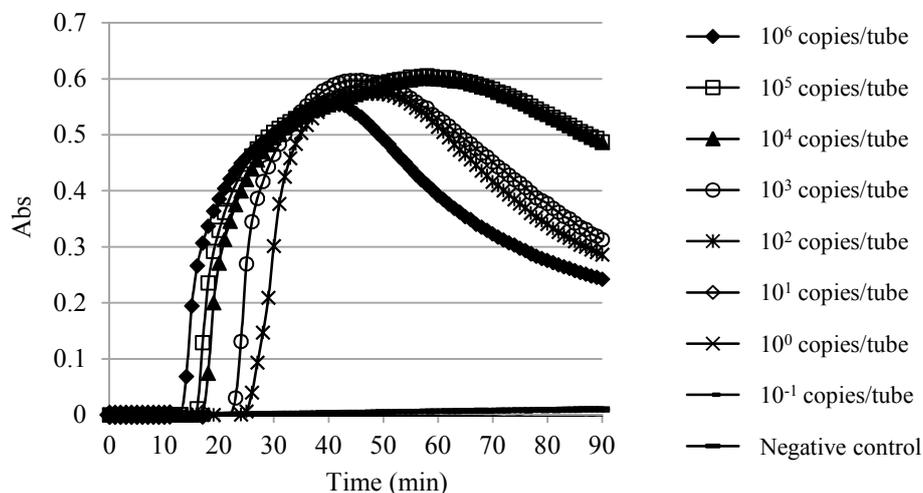


Fig. 3 Detection sensitivity of LAMP for *Kudoa septempunctata*.

Table 4 Comparison of Microscopy, Real-time PCR and LAMP assays for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder

	Microscopy		Real-time PCR		LAMP	
	Total sample no.	spores /g	Positive sample no.*2	copies /g	Positive sample no.*2	Tt (time)
Positive	4	$1.4-3.6 \times 10^7$	4/4	$2.9 \times 10^9-1.2 \times 10^{12}$	4/4	15:30-17:36
	4	$1.0-6.5 \times 10^6$	4/4	$1.2 \times 10^8-2.0 \times 10^{10}$	4/4	16:42-18:48
	1	4.8×10^5	1/1	2.9×10^9	1/1	17:42
	1	6.5×10^4	1/1	1.0×10^8	1/1	19:06
Negative	17	ND*1	3/3	$1.2-8.4 \times 10^6$	3/3	21:06-22:12
			2/2	$1.4-2.2 \times 10^4$	1/2	29:30
			2/2	$2.0-7.1 \times 10^3$	1/2	31:06
			0/10	-	0/10	-

*1Spores were not detected

*2positive sample no./ total sample no.

それぞれ, 1/3, 2/3 が陽性であった。

検体番号 2 のLAMP反応後の反応液の電気泳動像を Fig. 2に, リアルタイム濁度測定による増幅曲線を Fig. 3に示した。LAMP法に特徴的な増幅バンドが認められ, 増幅曲線は30分以内に立ち上がり始めた。

2. ヒラメ検体を用いたクドア検出法の比較

顕微鏡検査法, リアルタイムPCR法, LAMP法によるヒラメ検体からのクドア検出結果を Table 4に示した。顕微鏡検査により, クドア胞子が検出された10検体と, 検出されなかった17検体のグループについて, それぞれ, リアルタイムPCR法, LAMP法による検出結果を比較した。その結果, 顕微鏡検査でクドア陽性の10検体は, すべてリアルタイムPCR法およびLAMP法においても陽性であった。一方, 顕微鏡検査では陰性であった17検体は, リアルタイムPCR法では, 7検体が陽性 (7/17) で, これらのクドア遺伝子のコピー数は $2.0 \times 10^3 \sim 8.4 \times 10^6$ /gであった。

次に, 顕微鏡検査では陰性, リアルタイムPCR法で陽性の7検体について, 算出したコピー数のオーダーごとにLAMP法の検出感度を比較すると, 10^6 コピー/gオーダーの3検体は, いずれもLAMP法でも陽性 (3/3), 10^4 コピー/gおよび 10^3 コピー/gでは, いずれも2検体中1検体 (1/2) がLAMP法で陽性であった。LAMP法で陽性となった検体のTt値は15~31分であった。

これらの結果から, 今回構築したLAMP法をヒラメ検体に応用した場合, リアルタイムPCR法による算出値からみると, クドア遺伝子が 10^6 コピー/g以上, 顕微鏡検査から算出した胞子数でみると, 10^4 胞子/g以上でLAMP法により検出可能であると考えられた。なお, リアルタイムPCR法で陰性の10検体は, LAMP法でもすべて陰性であった。

考 察

ヒラメからの迅速, 簡易なクドア遺伝子検出法として,

クドア28S rDNAを標的遺伝子としたLAMP法を構築した。クドア陽性ヒラメから抽出したDNAを用いてリアルタイムPCR法とLAMP法の検出限界を比較したところ, LAMP法の検出限界は 10^2 コピー/反応であった。一方, リアルタイムPCR法の検出限界は 10^1 コピー/反応であり, LAMP法が約1オーダー劣る程度と考えられた。

続いて, 食中毒事案等のヒラメ検体を用いてLAMP法の有用性を検証したところ, 顕微鏡検査法によりクドア陽性であった検体は, リアルタイムPCR法およびLAMP法によりすべて陽性を示した。LAMP法のヒラメ検体からのクドアの検出限界は, リアルタイムPCR法の結果から算出した値では, 10^6 コピー/g, 顕微鏡検査の結果から算出した値では, 10^4 胞子/gであった。 10^5 コピー/gに該当する検体がなく, 10^3 胞子/g以下は顕微鏡で観察不可能なため, 正確な検出限界は測定できなかったが, 厚生労働省通知では, クドアrDNAが 10^7 コピー/g以上で遺伝子検査のスクリーニング陽性, クドアの胞子数が 10^6 個を超えた場合, 食品衛生法違反と定められていることから, 構築したLAMP法では, これらの基準に相当するクドア遺伝子のコピー数または胞子数は検出可能であり, 十分な検出感度を有していると考えられた。

リアルタイムPCR法の結果とLAMP法の結果を比較すると, リアルタイムPCR法で陽性の2検体がLAMP法では検出されなかったが, この検体は顕微鏡検査で陰性であり, コピー数も 10^4 /g以下であったため, LAMP法の検出限界以下であったと考えられる。また, リアルタイムPCR法およびLAMP法で陽性であったが, 顕微鏡検査では胞子が確認されなかった検体が存在した。これは, 検体に含まれるクドア胞子数が少ないためか, 顕微鏡で通常観察できるのは粘液胞子の段階のクドアのみであるため [4], 顕微鏡で観察できないステージのクドアが存在していた可能性が考えられる。つまり, 本研究で構築した高感度なLAMP法では, 顕微鏡検査で検出不能な場合でも, 検出できる可能性が考えられた。また, LAMP法は, およそ30分以内に結果を得ることができ, 迅速性に優れていた。

クドア検査法は、平成28年4月27日付厚生労働省通知(生食監発0427第3号)で改正され、スクリーニングの迅速検査法として、リアルタイムPCR法に加えて、イムノクロマトグラフィー法とLAMP法が記載された。通知では、キットを使用したLAMP法が記載されているが、この方法では、蛍光検出装置またはリアルタイムPCR装置が必要である。また、検出感度は 10^5 孢子/gであるが[5]、本研究で構築したLAMP法では 10^4 孢子/gの検体からも検出されており、検出感度は同等以上と考えられる。

ヒラメのクドア遺伝子を検出するLAMP法は、これまでも報告があるが[6, 7]、LAMP反応後にSYBR Green Iの添加あるいは電気泳動、エチジウムブロマイド染色を必要とする[6]、検出感度が通知に定められている値に十分でない[7]などの問題点がある。

今回構築したLAMP法は、試験室間バリデーション試験の実施、*K. lateolabracis*や*K. thyrstites*などヒラメに寄生する他のクドア属粘液胞子虫との交差反応の確認等の課題が残っているが、リアルタイムPCR装置等の高価な機器等を必要とせず、迅速に目視による確認ができることから、ヒラメ検体からクドアを検出するスクリーニング法として有用であると考えられた。

結 語

ヒラメからのクドア遺伝子検出法として、LAMP法を構築した。LAMP法により、顕微鏡検査でクドア陽性のヒラメはすべて約30分以内に検出可能であり、ヒラメ検体からは、クドア遺伝子 10^6 コピー/g、クドア孢子 10^4 /g以上で検出可能であったことから、厚生労働省通知に記載の方法と同等以上の検出感度を有していると考えられた。したがって、構築したLAMP法は、ヒラメからクドアを検出するための迅速、簡易なスクリーニング法として有用であると考えられる。

文 献

- [1] クドア・セブテンブクタータ. 食品衛生検査指針 微生物編 2015. 公益社団法人日本食品衛生協会; 2005. p. 791-799
- [2] 国立感染症研究所. クドアとザルコシステイス. 病原微生物検出情報. 2012;33(6):147-150.
- [3] 厚生労働省, 食中毒統計資料, [Internet], [cited 2016 Sep 8]. Available from: http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
- [4] Ohnishi T, Furusawa H, Yoshinari T, Yamazaki A, Horikawa K, Kamata Y, Sugita-Konishi Y., Electron Microscopic Study of *Kudoa septempunctata* Infecting *Paralichthys olivaceus* (Olive Flounder). Jpn J Infect Dis. 2013;66: 348-350.
- [5] Ohnishi T, Lim B, Nojima N, Ogasawara K, Inagaki S, Makitsuru K, Sasaki M, Nakane K, Tsuchioka H, Horikawa K, et al. Inter-laboratory study to validate new rapid screening methods for *Kudoa septempunctata*. Biocontrol Sci. 2016;21(2): 135-138.
- [6] Jeon CH, Wi S, Song JY, Choi HS, Kim JH. Development of loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida) in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Parasitol Res Parasitol Res. 2014;113(5)1759-1767.
- [7] 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*). Jpn J Infect Dis. 2015;68(2):145-147.