

2016 年 9 月 OIE 水生委員会会合報告に対する日本のコメント

我が国は、水生動物委員会（水生委員会）に対し、その成された仕事及び水生動物衛生コード及び水生動物の診断に関するマニュアルの改正案にコメントを提出する機会を与えてくれたことに謝意を表します。

1. （附属書 23）伝染性筋壊死症（水生マニュアル 第 2.2.4 章）

4.3.1.2.3. 分子生物学的技術

RT-PCR の混合試薬（SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA polymerase, Life Technologies Thermo Fisher Scientific):^{※1}

試薬	量	最終濃度
<u>dH₂O</u> ^{※2}	<u>5.5 µl</u> ^{※2}	<u>—</u> ^{※2}
2× reaction mix	12.5 µl	1 ×
Forward/reverse primer (各 10 <u>mM µM</u> ^{※3})	1.0 µl	0.4 <u>µM µM</u> ^{※3}
RT/Taq enzyme mix	1.0 µl	
RNA template ¹	<u>5.0 1.0-10.5</u> µl ^{※5}	<u>1-50 ng 20 ng/µl</u> ^{※5}
<u>dH₂O</u> ^{2※2}	<u>0-9.5 µl</u> ^{※4}	

²—最終的な混合試薬の量が 25 µl になるように dH₂O を加えるものとする。^{※4}

RT-PCR の設定条件

PCR プライマー	温度 (°C)	時間	サイクル 数	増幅産物の 長さ
4587F/4914R	<u>60 55</u> ^{※6} , 95	30 分, 2 分	1	328 bp
	95, <u>62 60, 68</u> ^{※6}	<u>45 15</u> ^{※6} 秒, <u>45 30</u> ^{※6} 秒, <u>—</u> <u>45 秒</u> ^{※6}	39	
	<u>60 68</u> ^{※6}	<u>7 2</u> 分 ^{※6}	1	

理由

1. 試薬使用量の表の修正

※1 SuperScript III の販売者を Life Technologies から Thermo Fisher Scientific (ブランド名 Invitrogen)に修正

※2 dH₂O は試薬量の調整に用いるものであることから、dH₂O の欄を表の最後に移動

※3 プライマーの Reagent 及び Final concentration の濃度単位が明らかに大きすぎ、タイプミスと思われるため mM を μM に修正。また、 $1.0\mu\text{M}$ のプライマー $10\mu\text{l}$ を $25\mu\text{l}$ に希釈すると濃度は $0.4\mu\text{M}$ になる。

※4 dH_2O は final volume of the reaction mixture を $25\mu\text{l}$ に調整するために使用する旨を記載

※5 (Inada et al., 2016)の手順で優れた結果が得られたことから、 500ng (製造者の推奨するプロトコルの最大値)の RNA テンプレートが $1.0\text{-}10.5\mu\text{l}$ に溶解したものをを用いることを提案する。また、最終的な濃度は $20\text{ng}/\mu$ となる。

2. RT-PCR 手順の変更

※6 ドラフト版では SuperScript III を用いることを推奨しているが、RT-PCR の手順は現行のマニュアルとほぼ同様である。しかしながら、SuperScript III を現行のマニュアルに記載された手順で用いた場合の IMN の検出精度は、今回提案する(Inada et al., 2016)による SuperScript III を 3 ステップ方式の RT-PCR 手順で用いた場合の検出精度よりも低い。また、今回提案する手順は、SuperScript III の製造者が推奨する方法に準じている。

RT-PCR 手順は、逆転写の温度を(60°C)から(95°C)に変更、
PCR の温度を(95°C 、 62°C)から(95°C 、 60°C 、 68°C)に変更、
PCR の時間を(45 秒、 45 秒)から(15 秒、 30 秒、 45 秒)に変更、
最後の伸張の温度を 60°C から 68°C に変更、
最後の伸張の時間を 7 分から 2 分に変更

参照文献:

Mari Inada et al., (2016) Modification of PCR Program for the Detection of Infectious Myonecrosis Virus. Fish Pathology, 51 (in press).

2. (附属書 20) 急性肝脾臓壊死症 (水生マニュアル第 2.2.X 章)

2.2.2. 証拠の不完全な感受性種

水生動物コード第 1.5 章に基づく、証拠が不完全な感受性種には、次のものが含まれる：コウライエビ (*Penaeus chinensis*) 及びクルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*)

理由

以下の理由により、AHPND の「証拠の不完全な感受性種」にクルマエビを記載することを提案する。

クルマエビが浸漬実験により AHPND に感染した旨の論文(Tinwongger et al., 2016)が受理されており、その実験結果を Aquatic Code の Chapter 1.5 に示されている「感受性種」の基準に照らしたところ、「証拠の不完全な感受性種」に合致したため。

「感受性種」の個々の基準(1~3)と実験結果の関係については、下記のとおりである。

基準 1：自然感染または自然な感染経路に似せた実験感染による病原体の移動が行われていること。

本実験の結果：本実験では $1 \times 10^5 \text{CFU ml}^{-1}$ および $1 \times 10^6 \text{CFU ml}^{-1}$ の濃度の浸漬実験により、AHPND に感染し死亡した。 $1 \times 10^5 \text{CFU ml}^{-1}$ は自然界で起こりえないような高濃度ではなく、また、飼育環境(28°C, 30ppt, エアレーションあり)は、クルマエビに適していることから、本実験は自然な感染経路に似せた実験感染と考えられ基準 1 に合致する。

基準 2：病原体が特定(同定)されていること。

本実験の結果：本実験では AHPND strain (D6)を用いており、病原体は特定済みである。よって、基準 2 に合致する。

基準 3：病原体の存在が感染を引き起こしていることを示す十分な証拠があること。具体的には以下の A に合致すること又は B,C,D の内 2 つ以上に合致していること。

A. 病原体が宿主内で増殖していること

B. 病原体が疑いのある動物から分離できること又は疑いのある動物から他の個体に感染すること

C. 臨床的または病的な変化が、感染症の症状と関連していること

D 病原体が確認される部位が、その感染症の標的組織であること

本実験の結果：本実験ではクルマエビは死亡しており、C. に合致する。しかし A, B, D の事柄については特段の記載はない。

以上より、本実験では基準 1 および基準 2 に合致した。よって、「感受性種」の 3 つの基準の一部を満たした場合に記載される「証拠の不完全な感受性種」にクルマエビを記載することを提案する。なお、基準 3 において合致しなかった箇所については今後も科学的知見をとりまとめ、合致した際にコメントを提出する予定である。

参照文献：

Tinwongger S, Nochiri Y, Thawonsuwan J, Nozaki R, Kondo H, Awasthi SP, Hinenoya A, Yamasaki S, Hirono I. (2016) Virulence of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease PirAB-like Relies on Secreted Proteins Not on Gene Copy Number. J Appl Microbiol. doi: 10.1111/jam.13256.