

平成 27 年 3 月 18 日

レギュラトリーサイエンス新技術開発事業研究実績報告書

課題番号：2403

寄生虫（クドア・セプテンpunkタータ）に対するリスク管理
に必要な技術開発

研 究 期 間：平成 24 年度～平成 26 年度（3 年間）

研究総括者名：西岡豊弘

試験研究機関名：独立行政法人 水産総合研究センター

国立大学法人 東京大学大学院

愛媛県農林水産研究所

大分県農林水産研究指導センター

I. 全体計画

1. 研究目的

クドア・セプトエンクタータ（以下「クドア」）は、平成 22 年に食中毒の原因としてヒラメで確認されたクドア属の新種である。これまでの研究成果として、顕微鏡を用いたクドアの孢子検査（以下「検鏡」と省略。成魚のみ）及び PCR 法によるクドア検出法が開発されているが、本クドアの生活環や感染経路などは不明であり、特に稚魚ではヒラメ体内におけるクドアの分布が不明なため、分布が濃密な部位を用いた効率的な検査法の開発が望まれている。また、凍結又は加熱により失活させることができることが報告されているが、これらの方法ではヒラメの商品価値が下がるため、実用的な処理技術の開発が必要である。以上のことから本研究では、クドアの感染経路や生活環に応じた感染防除策の確立、種苗導入時や出荷時等の効率的な検査法の開発、ヒラメの商品価値を低下させないような失活方法の開発及び及びヒラメ養殖魚以外でのクドアの感染状況の調査を行い、クドアによる食中毒発生のリスク低減を図る。

2. 研究内容

（1）中課題 1：ヒラメの種苗生産・養殖施設等でのクドアの感染防除策の開発

種苗生産・養殖施設等でのクドアの感染経路及び生活環を解明し、得られた知見に応じて、飼育方法や飼育条件、供給水のろ過や殺菌、環形動物の除去等、最も効果的な感染防除策を開発する。

1) 小課題 1：クドアの生活環の解明と環形動物の防除法の開発【東京大学大学院，愛媛県農林水産研究所，水産総合研究センター】

クドア感染は、ゴカイなどの環形動物が交互宿主として関与しているものと考えられるが、これまでの研究では明らかにされていない。交互宿主を特定し、これらの分布や季節的消長を明らかにすることは、クドアの感染防除策を講ずる上で、極めて重要な情報である。これまでの研究で明らかにした感染時期と考えられる 7 月～9 月の期間、飼育水をメッシュろ過して得られた採集物から DNA を抽出して、PCR により放線孢子虫の存在量を推定する。同じ時期に、感染が報告された海域の種苗生産場のろ過槽内及び周辺沿岸海域から環形動物を採集し、放線孢子虫の寄生を検鏡や PCR によって調べる。検鏡や PCR 検査で陽性反応が得られたら、SSU rDNA をシーケンスして、クドアと同一種かどうかを調べる。また、得られた放線孢子虫に未感染ヒラメを暴露するなどして、放線孢子虫の感染が成立するかどうか確認する。以上の結果、生活環が解明され交互宿主となる環形動物が特定されたら、その環形動物の生息場所や生物学的特性（水深、基質、付着性、底生性など）を明らかにし、それらを除去する方策を開発する。以上の試験のうち東京大学大学院は汚染が疑われる種苗生産場での調査、愛媛県農林水産研究所は養殖場での調査、水産総合研究センターは SSUrDNA の分子生物学的分析を担当する。

2) 小課題 2 : 種苗生産場での給水処理法の開発【水産総合研究センター, 東京大学大学院】

感染が報告された種苗生産場に実験水槽を設置し, ①陽性対照として生(未ろ過)海水, ②砂ろ過海水, ③砂ろ過+カートリッジフィルター等の微細メッシュろ過(<10 μ m)海水, ④砂ろ過+微細メッシュろ過+紫外線殺菌処理海水で, 未感染ヒラメ稚魚を飼育する。また, ⑤陰性対照は非感染海域の陸上水槽で飼育する。毎月 1 回, 6 か月後くらいまで寄生の有無を PCR と検鏡で調べ, 各実験区の寄生率を陽性対照区と比較することで, 最も有効な給水処理法を開発する。さらにその処理を種苗生産期間中のいつ実施すれば最も効率的かを決定する。水産総合研究センターは飼育装置のデザイン, 設置, 飼育管理, 東京大学大学院は感染状況の観察を担当する。

3) 小課題 3 : 養殖場での感染を軽減する対策の開発【愛媛県農林水産研究所, 東京大学大学院】

これまでの研究では, 本クドアの感染経路は, 養殖場に搬入前の種苗を介すると考えられる事例に加え, 養殖場内での感染が疑われる事例も観察された。クドアの感染経路が, 養殖場搬入前の種苗にあるのか, 搬入後の養殖環境にあるのかを明らかにすることは, クドアの感染を効果的に防除する上で極めて有益な情報となる。そこで, 本研究では, 養殖場に搬入前のヒラメ(種苗), 養殖場内に搬入後養成中のヒラメ(育成魚)について, 遺伝子診断法, 顕微鏡観察法によりクドアの感染状況を調査し, 養殖場でのクドアの感染経路の特定をおこなう。また, 前年度までの研究成果から感染が起こることが疑われる養殖場に未感染ヒラメを導入して, いつ, どれくらいの率で感染が起こるかを確認する。さらに, その養殖場にサイズの異なる種苗(大・中・小)を同時期に導入し, 毎月 1 回, 6 か月後くらいまで寄生の有無を PCR と検鏡で調べ, 寄生率と寄生強度(筋肉中の胞子密度)を実験区間で比較することで, 感染を軽減できるヒラメ種苗の導入時期, サイズ等を明らかにする。愛媛県農林水産研究所は養殖場での感染経路の解明, 東京大学大学院は感染サイズの解明を担当する。

(2) 中課題 2 : 感染したヒラメ排除のための効率的な検査法等の開発

ヒラメ稚魚の体内におけるクドアの分布を明らかにし, 分布が濃密な部位を用いた効率的な検査法や手順を開発する。また, ヒラメ成魚については食中毒の原因となるおそれのある個体を出荷前に排除できる効率的な検査法や手順を開発する。

1) 小課題 1 : 感染初期のクドアの魚体内動態の解明【東京大学大学院】

感染海域で育成したヒラメ稚魚の各臓器をエタノールまたはホルマリン固定して, PCR 検査または組織学的検査によりクドアの感染を調べる。パラフィン切片を *in situ* ハイブリダイゼーション法により観察し, 感染門戸や筋肉に定着する前のクドアの感染動態を明らかにする。また, 血液を採取し, PCR 検査でクドアの

有無を調べ、陽性の場合には塗抹標本を作製して顕微鏡検査により血液内ステージの形態を観察する。

2) 小課題2：魚を殺さずにクドアを診断する手法の開発【水産総合研究センター，東京大学大学院】

ヒラメの成魚を麻酔して鰓蓋内側または尾柄部から綿棒で微量の筋肉片を採取し、検鏡またはPCRにより検査する。検査した個体にタグを付けて標識し、引き続き飼育した後、数週間、生残することを確認してから、同一個体を殺して通常の方法により検査する。両検査の結果が一致するかどうか調べ、両者の精度と感度を比較する。

また前年度の成果より心臓のPCR検査によって陽性反応が得られたことから、血液中にクドアが存在する可能性が示唆された。そこでヒラメの稚魚及び成魚の血液を採取して、塗抹標本の検鏡検査やPCR検査等によりクドアの感染を診断する新たな手法を開発する。

水産総合研究センターは筋肉片からの検査感度等、東京大学大学院は血液からの検査方法の開発を担当する。

(3) 中課題3：商品価値を低下させずにクドアを冷蔵等により失活させる処理方法の開発

生食による消費が好まれるヒラメの商品価値を低下させないために、冷蔵等によるクドア胞子の失活法を開発する。

1) 小課題1：クドア胞子の毒性評価法及び失活法の開発【東京大学大学院】

細胞の生死を判定する方法として用いられる蛍光色素（Hoechst 33342 と propidium iodide）染色を応用して、クドア胞子の活性を評価する技法を開発する。さらに、ヒト腸組織由来のCaco-2細胞にクドア胞子を接種し、細胞層の経上皮電気抵抗の変化を測定する方法を用いて、クドア胞子の毒性を評価する実験系を標準化する。蛍光色素染色による胞子の活性評価法と培養細胞を用いた毒性評価法の結果が一致するかどうかを確認し、蛍光染色法が毒性の指標になるかどうかを明らかにする。また、蛍光染色によるクドア胞子の活性評価法を用いて、活性が落ちる冷蔵処理法（温度、時間などの条件）をスクリーニングする。その後、Caco-2細胞を用いた毒性評価系でクドアの毒性が失われたことを確認することで、クドア胞子の失活法を開発する。

2) 小課題2：商品価値を損なわないヒラメ食材の有効な処理方法の開発【大分県農林水産研究指導センター，東京大学大学院】

現場規模で利用が可能な冷蔵・冷凍技術について、ヒラメの加工処理形態と組み合わせることで現実的な処理方法を検討する。また、冷蔵・冷凍処理以外の処理方法（飼料添加物や調味料等）についても探索を試みる。事前にクドア寄生を確認したヒラメを用いて前述の処理を実施し、(1)で開発した胞子の毒性評価系を用い

て各種処理技術による失活効果を評価する。さらに、出荷サイズのヒラメに対してクドア孢子の失活効果が高いと判断された処理技術を施し、処理後のヒラメ体側筋の刺身商材としての適性を破断強度、加重ドリップ測定等の方法により評価する。大分県農林水産研究指導センターは有効な処理法の開発、東京大学大学院は孢子の失活効果の評価を担当する。

(4) 中課題4：ヒラメ以外の魚種におけるクドアの感染状況調査

養殖ヒラメ以外でクドア感染の報告があるメジマグロ等の魚種を対象に、クドア感染の状況について調査する。

1) 小課題1：天然及び養殖クロマグロにおけるクドアの感染状況調査【水産総合研究センター】

天然のクロマグロ及び養殖クロマグロの筋肉に寄生するクドア・ヘキサプンクタータ¹の感染状況について、産地別、時期別に顕微鏡検査とPCR法により調査する。

2) 小課題2：クドアの感染状況調査【愛媛県農林水産研究所、水産総合研究センター、東京大学大学院】

クドアの感染が報告された海域において、ヒラメ以外の養殖魚及び漁獲されるヒラメ等の天然魚について、顕微鏡検査とPCR法により寄生の有無を調べる。愛媛県農林水産研究所は養殖魚のサンプル採取と一次診断、水産総合研究センターは天然ヒラメのサンプル採取と一次診断を行い、東京大学大学院はクドアの分類を含めた確定診断を行う。

3) 小課題3：由来の異なるクドアの形態学的、遺伝学的比較【東京大学大学院、水産総合研究センター】

韓国産ヒラメと国産ヒラメから採集したクドア孢子や(1)、(2)で採集した由来の異なるクドア孢子について、極囊の数等、形態学的に変異があるかどうか調べるとともに、DNAを抽出して、遺伝学的な差異により識別できるかどうか調べる。東京大学大学院は、形態学的な比較、水産総合研究センターは遺伝学的な比較を担当する。

¹：クロマグロのクドアは、事業開始当時、*Kudoa neothunni*とされていたが、Yokoyama *et al.*(2014)により新種である*K. hexapunctata*とすることが示されたため、本報告ではクドア・ヘキサプンクタータに変更標記した。

3. 年次計画

項目	平成24年度	平成25年度	平成26年度
1. ヒラメの種苗生産・養殖施設等でのクドアの感染防除策の開発			
(1) クドアの生活環の解明と環形動物の防除法の開発	種苗生産場での調査(東大), 養殖場での調査(愛媛), 遺伝学的分析(水研)		
(2) 種苗生産場での給水処理法の開発	飼育試験の実施(水研), 感染状況の観察(東大)		
(3) 養殖場での感染を軽減する対策の開発	養殖場での感染経路の解明(愛媛), 感染サイズの解明(東大)		
2. 感染したヒラメ排除のための効率的な検査法等の開発			
(1) 感染初期のクドアの魚体内動態の解明	感染部位及び形態の分析(東大)		
(2) 魚を殺さずにクドアを診断する手法の開発	筋肉を用いた手法の開発(水研), 血液を用いた手法の開発(東大)		
3. 商品価値を低下させずにクドアを冷蔵等により失活させる処理方法の開発			
(1) クドア胞子の毒性評価法および失活法の開発	蛍光色素染色による活性評価法および失活条件の解明(東大)		
(2) 商品価値を損なわないヒラメ食材の有効な処理方法の開発	処理法の評価(大分), 失活効果の評価(東大)		
4. ヒラメ以外の魚種におけるクドアの感染状況調査			
(1) 天然および養殖クロマグロにおけるクドアの感染状況調査	クロマグロの感染状況の分析(水研)		
(2) クドアの感染状況調査	その他養殖魚および天然魚の分析(愛媛, 水研), 検出クドアの分類(東大)		
(3) 由来の異なるクドアの形態学的, 遺伝学的比較	形態学的比較(東大), 遺伝学的比較(水研)		
所要経費(合計)	9,000千円	8,910千円	8,780千円

東大：東京大学大学院，愛媛：愛媛県農林水産研究所，水研：水産総合研究センター，

大分：大分県農林水産研究指導センター

4. 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者	エフォート (%)
研究総括者	水産総合研究センター	森 広一郎 (～26年3月) 西岡豊弘 (26年4月～)	20 20
1. ヒラメの種苗生産・養殖施設等でのクドアの感染防除策の開発	東京大学大学院	○ 横山 博	30
(1) クドアの生活環の解明と環形動物の防除法の開発	東京大学大学院 東京大学大学院農学生命科学研究科農学共同研究員 愛媛県農林水産研究所 愛媛県農林水産研究所 愛媛県農林水産研究所 水産総合研究センター	△ 横山 博 SHIN SANG PHIL (26年4月～) 成田 公義 山下 亜純 清水 孝昭 佐藤 純	前出 30 5 5 5 10
(2) 種苗生産場での給水処理法の開発	水産総合研究センター 水産総合研究センター 水産総合研究センター 水産総合研究センター 水産総合研究センター 東京大学大学院	△ 森 広一郎 (～26年3月) 西岡豊弘 (26年4月～) 佐藤 純 米加田 徹 森岡 泰三 太田 健吾 横山 博 鈴川 健二	前出 前出 10 5 5 5 前出
(3) 養殖場での感染を軽減する対策の開発	愛媛県農林水産研究所 愛媛県農林水産研究所	△ 山下 亜純	5 前出
2. 感染したヒラメ排除のための効率的な検査法等の開発	東京大学大学院 水産総合研究センター	○ 横山 博 佐藤 純	前出 前出
(1) 感染初期のクドアの魚体内動態の解明	東京大学大学院	△ 横山 博	前出
(2) 魚を殺さずにクドアを診断する手法の開発	水産総合研究センター 水産総合研究センター 水産総合研究センター 水産総合研究センター	△ 佐藤 純 米加田 徹 森 広一郎 (～26年3月)	前出 前出 前出 前出

3. 商品価値を低下させずにクドアを冷蔵等により失活させる処理方法の開発 (1) クドア胞子の毒性評価法および失活法の開発 (2) 商品価値を損なわないヒラメ食材の有効な処理方法の開発	水産総合研究センター		西岡豊弘 (26 年 4 月～)	5
	東京大学大学院		井上誠章 (26 年 4 月～)	前出
	大分県農林水産研究指導センター	○	横山 博 福田 穰	5
	東京大学大学院	△	横山 博	前出
	大分県農林水産研究指導センター	△	福田 穰	前出
	大分県農林水産研究指導センター		木本圭輔	10
	大分県農林水産研究指導センター		徳丸 泰久 (～26 年 3 月)	5
	大分県農林水産研究指導センター		木藪 仁和	5
	大分県農林水産研究指導センター		吉岡宗祐(旧名吉岡左織)	5
	大分県農林水産研究指導センター		川上 恵 (26 年 4 月～)	前出
	東京大学大学院		横山 博 鈴川 健二	前出
	愛媛県農林水産研究所	○	鈴川 健二	前出
	水産総合研究センター	△	米加田 徹	前出
	水産総合研究センター		佐藤 純	前出
4. ヒラメ以外の魚種におけるクドアの感染状況調査 (1) 天然および養殖クロマグロにおけるクドアの感染状況調査	水産総合研究センター		森 広一郎 (～26 年 3 月)	前出
	水産総合研究センター		西岡豊弘 (26 年 4 月～)	5
	水産総合研究センター		久門 一紀 (24 年 12 月～)	5
	水産総合研究センター		清水 孝昭	前出
	水産総合研究センター		成田公義	前出
	水産総合研究センター		横山 博	前出
	水産総合研究センター		佐藤 純	前出
	水産総合研究センター		森 広一郎 (～26 年 3 月)	前出
	水産総合研究センター			前出
	水産総合研究センター			前出
(2) クドアの感染状況調査	愛媛県農林水産研究所	△	清水 孝昭	前出
	愛媛県農林水産研究所		成田公義	前出
	東京大学大学院		横山 博	前出
	水産総合研究センター		佐藤 純	前出
	水産総合研究センター		森 広一郎 (～26 年 3 月)	前出
	水産総合研究センター			前出

(3) 由来の異なるクドアの 形態学的，遺伝学的比較	水産総合研究センター		米加田 徹 西岡豊弘 (26 年 4 月 ～)	前出
	東京大学大学院 水産総合研究センター 水産総合研究センター 水産総合研究センター	△	横山 博 米加田 徹 佐藤 純 釜石 隆 (～26 年 3 月)	前出 前出 前出 5

研究担当者欄について，中課題担当者には○，小課題担当者には△を付すこと。

Ⅱ. 研究実績報告

1. 中課題1：ヒラメの種苗生産・養殖施設等でのクドアの感染防除策の開発

(1) 成果の概要

工程表	進捗状況・成果
感染が報告されたヒラメ種苗生産場 A や養殖施設 B において、交互宿主となる無脊椎動物の分布、季節変動調査、採集された無脊椎動物のクドア寄生検査、海水中からのクドア遺伝子の検出(小課題1 関連)。	※1：種苗生産場 A 及び養殖施設 B の周辺海域で無脊椎動物を採集して分布、季節変動及びクドア遺伝子の有無を調査した結果、多毛類、軟体動物の出現割合が高く、数種の多毛類からクドアの遺伝子が検出されたが、18S rDNA コピー数は微量であり、顕微鏡的に放線胞子虫も検出されなかったことから、交互宿主として特定するには至らなかった(表 1-1, 1-2, 図 1-1～1-5)。(平成 24～26 年度) 種苗生産場 A の飼育用水である生海水を 6～8 月に採取しクドア遺伝子を検出した結果、全ての月で遺伝子が検出され、特に 6 月に遺伝子数が多かった(表 1-3)。養殖施設 B 近傍の複数海域の海水を 7～12 月にかけて採取し、クドア遺伝子の検出を試みた結果、8 月中旬から 9 月上旬にかけて海水中からクドア遺伝子が検出された(図 1-6)。(平成 25, 26 年度)
ヒラメを用いたバイオアッセイによる感染場所の探索(小課題1 関連)。	※2：種苗生産場 A において感染場所を特定するために実施した非感染ヒラメを用いたバイオアッセイの結果、種苗生産場の取水口付近に感染源が存在する可能性が示された(表 1-4)。(平成 26 年度) 養殖施設 C 周辺で実施した非感染ヒラメを用いたバイオアッセイの結果では、筋肉、心臓ともにクドア遺伝子は検出されなかった。7 月～10 月の 23℃を超える水温帯では、実験魚の回収率が低く、感染の有無を確認することは出来なかった(表 1-5, 図 1-7)。(平成 26 年度) 種苗生産場 A の周辺海域では環形動物の種組成の季節変動を明らかにし、環形動物及び

感染防除に有効な用水処理法の確立及び決定された用水処理法の最も有効な実施時期の検討(小課題 2 関連)。	海水中からクドア遺伝子は検出されたが、検出された遺伝子量は微量なため、想定される胞子数は数個のレベルの値であり、交互宿主とは判断出来なかったことから、効果的な環形動物除去法については検討ができなかった。感染海域のヒラメ養殖場の周辺海域においては、底生生物では節足動物や軟体動物の現存量が多い事を確認できたがクドア遺伝子は検出されなかったことから、放線胞子虫を用いた感染実験は実施できなかった。また、感染海域にある種苗生産場 A の飼育用水及び養殖施設 B 周辺の海水中からクドア遺伝子が検出され、種苗生産場 A では 6 月、養殖施設 B 周辺では 8 月上旬から 9 月中旬にクドア遺伝子が多いことが分かった。飼育用水や海水中からクドアの遺伝子は検出されたが放線胞子虫の確認は出来なかった。(平成 25, 26 年度) ※ 3 : 種苗生産場 A での用水処理による防除試験を実施したところ、砂ろ過による防除効果が認められた(表 1-6)。(平成 24 年度) さらに、砂ろ過単独による用水処理と UV (46 mJ/cm²) による用水処理について 3 回の検証試験を実施し、これら用水処理の有効性が確認された(表 1-7)。また、UV の照射量については 11mJ/cm² でもクドアの感染を防除できることが確認された(表 1-8)。(平成 25, 26 年度) これまでの成果を基に、砂ろ過及び UV 照射 (46 mJ/cm²) した用水により、1kL 水槽を用いて実用規模でヒラメを飼育し、クドアの感染を防除できることを実証した(表 1-9)。(平成 26 年度) なお、本事業の成果を基に、種苗生産場 A で、用水を砂ろ過(フィルターろ過も併用するシステム)及び UV 照射(シーバスリミテッド社
---	---

養殖場において感染を軽減する種苗の導入時期とサイズの特定(小課題3関連)。(平成 26 年度)	製, PO-10MN 型 UV 殺菌装置にて 46mJ/cm² 以上を保持)を組み合わせ処理しヒラメの種苗生産を実施した結果, 30 万～40 万尾(生残率;約 45%, 全長 7～12cm)のクドア感染の無いヒラメ稚魚を生産でき, 用水処理による対策の実用性が確認された。(平成 26 年度) 一方, クドアの感染時期については, 感染海域の種苗生産場において, 6 月から 12 月までほぼ毎月ヒラメ稚魚を 2 週間飼育してから心臓, 血液, 筋肉を材料に PCR 検査をした後, 非感染海域の陸上水槽に移動して 3 か月飼育し, 感染が成立したかどうか調べた。その結果, 7 月に最も感染が起こり, 9 月以降はほとんど感染しないことが明らかとなった(表 1-10, 図 1-8)。この結果から, 特に 6～8 月は飼育用水の処理をするなどクドアの感染に注意する必要があることが示された。(平成 25 年度) ※ 4 : 種苗生産場 A でサイズの異なる種苗(中型魚(0 歳), 大型魚(1 歳))を飼育して寄生率と寄生強度(孢子密度)を比較した結果, いずれの魚群にも感染が認められたが, 中型・大型魚と同時に感染させた稚魚より孢子密度は低かった(表 1-11, 図 1-9)。(平成 24 年度) 養殖施設 B のクドア感染が確認されたロットで 18S rDNA を検出する PCR 検査のモニタリングの結果, 11 月から 12 月にかけてクドア陽性率が最大になる傾向が認められた(表 1-12, ～1-14, 図 1-10, 1-11)。(平成 24 年度) 養殖施設 B に搬入前の種苗, 搬入後, 養殖場内で養成中の育成魚について, クドアの感染状況を調査し, 養殖場でクドアに感染している施設を特定した(表 1-15～1-18)。これらの施設で異なるサイズの種苗を導入して感染との関連性を調べる実験を計画したが, 当該養殖場が廃業したため, 実験を行うことが出来なかった。
--	--

	(平成 24, 25 年度) これまでの結果より, クドアは夏季に最も感染頻度が高くなり, その後秋季から冬季に胞子が検出されやすくなると推察された。一方, ヒラメの感受性サイズについては, 1 歳魚においても感染することが明らかになり, 魚体のサイズにより感染を軽減することは困難であると考えられた。
成果目標：クドアの生活環を解明し, 環形動物の除去法, 種苗生産場での用水処理法, 養殖場での感染を軽減する方法を開発する。	

＜成果の概要の補足＞

※1：ヒラメ種苗生産・養殖場の周辺で採取された無脊椎動物

【方法】

クドアの交互宿主となる無脊椎動物の採取は、クドアの感染が報告されたヒラメ種苗生産場 A では、平成 24 年の 7 月、9 月、10 月及び 11 月、平成 25 年の 6 月、7 月、8 月及び 10 月、26 年の 7 月に行い、クドアの感染が報告されたヒラメ養殖施設 B, C, D の周辺では、平成 24 年の 8 月、9 月、10 月及び 11 月、25 年の 7 月、8 月、9 月及び 11 月、26 年の 7 月、8 月、9 月及び 10 月に行った。採取した無脊椎動物について、分布及び季節変動を調査するとともに、クドア遺伝子の有無を Grabner *et al.* (2012)による 28S rDNA を検出する PCR 法と 18S rDNA コピー数を定量する定量 PCR 法 (Harada *et al.*, 2012) により検査した。なお、養殖施設の調査定点については、養殖施設 B 近傍の定点を Stn.1, 養殖施設 C 近傍の定点を Stn.2, 3, 養殖施設 D 近傍の定点を Stn.4 とした。

【結果及び考察】

種苗生産場 A で数種の多毛類からクドアの遺伝子が検出されたが、18S rDNA コピー数は微量であり、顕微鏡検査で放線胞子虫も検出されなかったことから、交互宿主として特定するには至らなかった(表 1-1)。養殖施設 B では、数種から遺伝子が検出されたが、顕微鏡下で放線胞子の確認が出来ていないため、交互宿主の特定には至らなかった(表 1-2)。環形動物(多毛類)の中でもサシバゴカイ科、スピオ科、イソメ科及びイトゴカイ科の出現割合が高かった(図 1-1, 1-3, 1-5)。クドアの交互宿主には出現割合の高い環形動物(特に多毛類)の関与が強く疑われるが、今回の研究では特定に至っていないため、今後、宿主探索調査を行う場合、出現割合が高い節足動物や軟体動物も交互宿主になり得る可能性を考慮し、分析の対象に加える必要が考えられた。

表 1-1. 種苗生産場 A 周辺で採集された無脊椎動物。(H24～26 年度)

分類群		採集年		
目	科	平成 24 年	平成 25 年	平成 26 年
多毛類				
定在目*	ミズヒキゴカイ科	+++	+	-
	イトゴカイ科	++	+	-
	ケヤリムシ科	+	+++	+++
	フサゴカイ科	+	+	++
	スピオ科	++	++	-
	タケフシゴカイ科	+	+++	+
	サシバゴカイ科	+	++	+
	シロガネゴカイ科	+	+	+
	タマシキゴカイ科	-	-	+
遊在目*	チロリ科	+++	+++	+++
	ギボシイソメ科	+	+++	++
	ゴカイ科	+++	+++	+++
	イソメ科	++	++	-
	ウロコムシ科	++	+++	+++
ホシムシ類		+	++	+
コムシ類		-	++	+
ヒラムシ類		+	-	-
ヒル類		-	-	+
*現在の多毛類の分類では使われなくなっている用語であるが、生態的にわかりやすいため用いた。 1回のサンプリングで1～10個体採集されたものを「+」、11～20個体を「++」、21個体以上を「+++」と表記した。網かけした箇所は、PCR 陽性を表す。				

表 1-2 養殖施設 B 周辺で採集された無脊椎動物の PCR 結果 (H24～26 年度)

門	綱	科	H24	H25	H26
環形動物	多毛	イイジマムカシゴカイ			-
		ウミケムシ	-	-	-
		サシバゴカイ	+	-	-
		イソメ	-	-	-
		ホコサキゴカイ	-	-	-
		スピオ	+	-	-
		ハボウキゴカイ	-	-	-
		オフエリアゴカイ	+	-	-
		ダルマゴカイ	-	-	-
		イトゴカイ	-	-	-
		フサゴカイ	-	-	-
		ケヤリムシ	-	-	-
	貧毛	貧毛類spp	-	-	-
軟体動物	腹足	腹足類spp	-	-	-
	二枚貝	二枚貝類spp	-	-	-
節足動物	甲殻	オストラコーダ	-	-	-
		ミオドコーパ			-
		ハルバクチス			-
		クーマ		-	-
		タナイス	-	-	-
		等脚	-	-	-
		端脚	-	-	-
		十脚	-	-	-

+: 陽性、-: 陰性、無印: 未分析

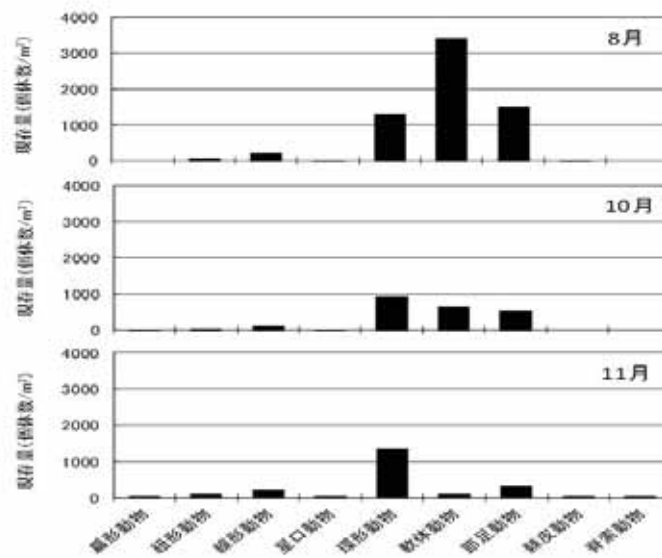


図 1-1 養殖施設 B 周辺 Stn.1 における底生生物の出現状況 (H24 年度)

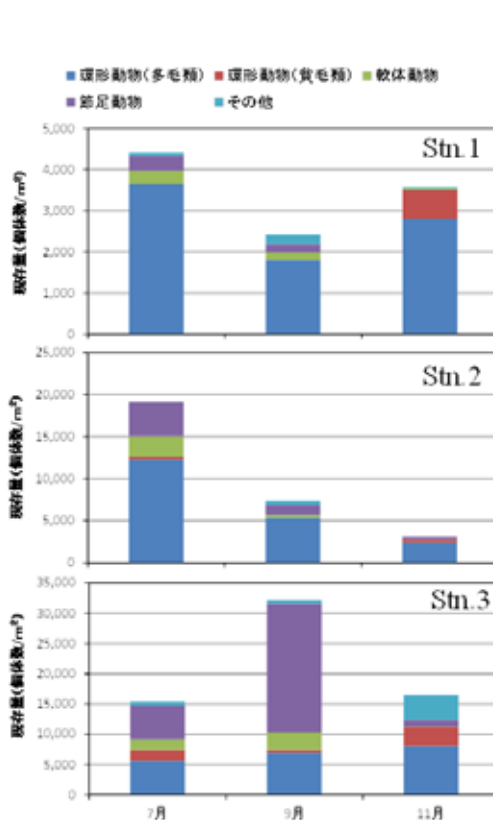


図 1-2 養殖施設 B, C 周辺の底生生物の出現状況 (H25 年度)

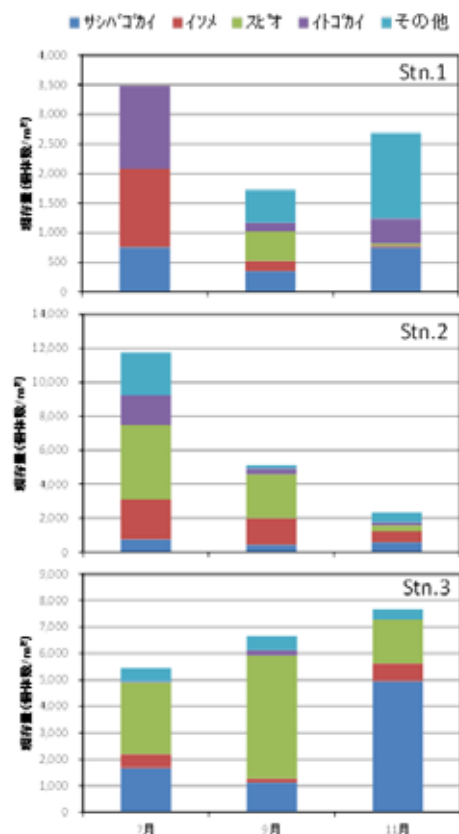


図 1-3 養殖施設 B, C 周辺の多毛類の出現状況 (H25 年度)

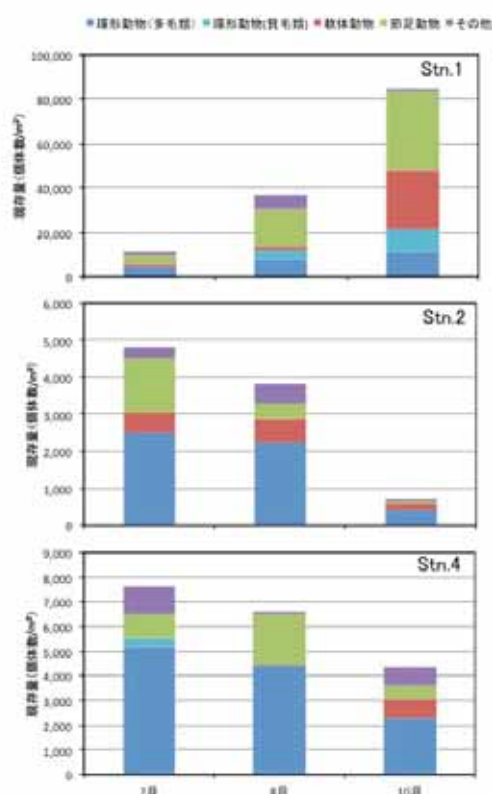


図 1-4 養殖施設 B,C,D 周辺の底生生物の出現状況 (H26 年度)

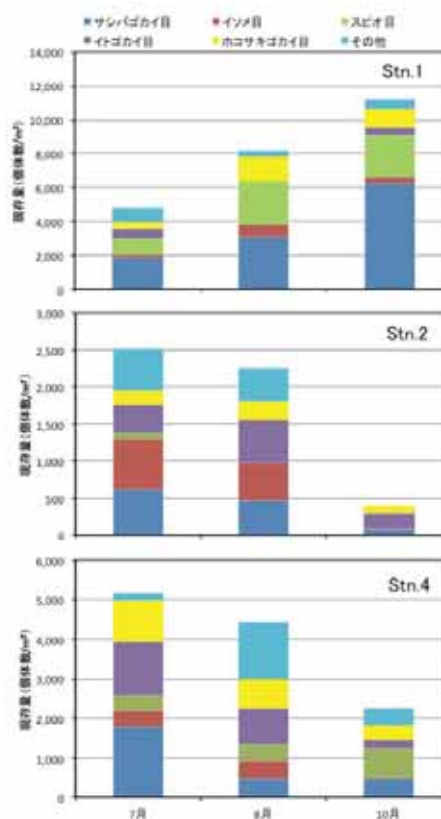


図 1-5 養殖施設 B,C,D 周辺の多毛類の出現状況 (H26 年度)

※1：ヒラメ種苗生産場の周辺の海水からのクドア胞子の検出

【方法】

6 月から 8 月にかけて種苗生産場 A で採取した生海水 1L を 5 μ m の MF-Millipore あるいは Isopore フィルターでろ過した。フィルター上に捕集した懸濁物より DNA を抽出し定量 PCR 法 (Harada *et al.*, 2012) によりクドア遺伝子の有無を調べた。また、コピー数に基づき、クドア胞子数を算出した。

【結果及び考察】

MF-Millipore フィルターでは 6, 7 月のサンプルから、Isopore フィルターでは、6～8 月のサンプルでクドア遺伝子が検出された。これらのことから、Isopore フィルターを用いた検出法がより有効であり、夏季に、特に本施設付近では 6 月に胞子が多く存在することが明らかになった。本結果は、ヒラメ稚魚を用いた暴露試験により明らかになった感染時期とほぼ一致した。

表 1-3 飼育用水のフィルターろ過物から定量 PCR により検出されたクドア遺伝子（H25 年度）

採集年月日	MF-Millipore (5 μ m)		Isopore (5 μ m)	
	コピー数/L	孢子数/L	コピー数/L	孢子数/L
H25/6/26	10.01	1.31	36.74	4.91
H25/7/5	1.94	0.31	0.30	0.05
H25/7/7	0.18	0.03	0.21	0.04
H25/7/31	0	0	1.18	0.20
H25/8/1	0	0	1.02	0.18

※1：ヒラメ養殖場の周辺の海水からのクドア孢子の検出

【方法】

7～12 月にかけて養殖施設 B, C, D 近傍の定点の底層より海水を採水し、1 μ m オムニポアフィルターで 1L 濾過した。フィルター上に捕集した懸濁物より DNA を抽出し、定量 PCR 法によりクドア遺伝子の有無を調べた。なお、養殖施設 B (Stn.1) では 6 地点、養殖施設 C (Stn.2) では 9 地点、養殖施設 D (Stn.4) では 1 地点で採水を行った。

【結果及び考察】

クドア遺伝子の検出を試みた結果、検出量は微量であったが、いずれの定点も 8 月中旬から 9 月上旬にかけて海水中からクドア遺伝子を検出することが出来た(図 1-6)。このことから、前述の種苗生産場 A とは若干時期がずれているものの、同じく夏季にクドア孢子が多く存在することが明らかになった。

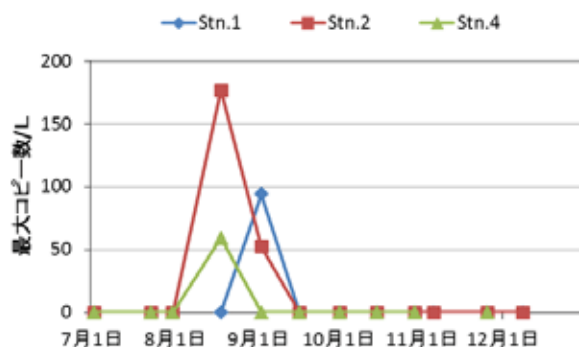


図 1-6 養殖施設 B, C, D 周辺の海水中のクドア遺伝子最大コピー数の変動（H26 年度）

※2：バイオアッセイによるクドア感染場所の探索

【方法】

種苗生産場 A では、排水口から約 50 m 沖に取水口があり、そこから岸边に沿って約 80 m 離れた場所に作業船係留場がある。平成 26 年 7 月に 2 か所（取水口と作業船係留場）に、クドア未感染ヒラメ 30 尾を籠(B タイプ、図 1-7)に収容し 10 日間無給餌で海中に暴露後、心臓、血液、筋肉を材料として PCR 検査し感染状況を調査した。養殖施設 B では、7 月から 12 月にかけて、2 種類の籠(A タイプ、B タイプ、図 1-7)を用いて同様の方法でバイオアッセイを実施した。

【結果及び考察】

種苗生産場 A では、取水口付近で暴露したヒラメが高率に感染しており、取水口付近に感染源が存在する可能性が示された(表 1-4)。この取水口は排水口と近い場所にあるので、排水口から放出された粘液胞子が取水口付近に生息する環形動物に取り込まれやすい環境にあり、ここで感染環が回っていることが示唆された。そこで、取水口と排水口の場所を遠ざけるなどの対策が考えられた。養殖施設 C 周辺では、非感染ヒラメを用いたバイオアッセイの結果、筋肉、心臓ともにクドア遺伝子は検出されなかった。夏季の 20℃を超える水温帯では、実験魚が死亡してしまい回収率が低く、感染の有無を確認することは出来なかった(表 1-5)。

表 1-4 感染が報告された海域の種苗生産場 A 付近 2 地点で実施したバイオアッセイ(H 26 年度)

網籠の設置場所*	PCR 検査結果（陽性尾数/検査尾数）**		
	心臓***	血液	筋肉
取水口付近	18/30 (60%)	4/30 (13%)	0/30 (0%)
作業船係留場	5/28 (18%)	0/28 (0%)	0/28 (0%)

*：2 地点は直線距離にして 80～90 m 離れている。

**：感染時期に 10 日間（H26 年 7 月 16 日～26 日）、未感染ヒラメを飼育した後、各臓器を摘出して PCR 検査した。

***：有意差（ $p < 0.05$ ）



図 1-7 バイオアッセイに用いた籠，A タイプ（左），B タイプ（右）

A タイプ：市販品を改良

B タイプ：水産総合研究センター特注品

表 1-5 感染が報告された海域の養殖施設 C 周辺 (Stn.2) におけるバイオアッセイ試験実験結果一覧 (H26 年度)

設置日	7月2日	7月23日	7月31日	8月18日	9月2日	9月16日	10月1日	10月15日	11月25日
回収日	7月17日	7月31日	8月18日	9月2日	9月16日	10月1日	10月15日	10月29日	12月8日
飼育日数	15	8	18	15	15	15	14	14	13
籠タイプ	A	A	A	A	B	B	B	B	B
底質	泥	泥	泥	泥	泥	泥	泥	泥	泥
水温(°C)	20.7-21.9	21.9-24.1	24.1-25.2	25.2-26.0	25.8-26.0	25.0-25.8	23.2-25.0	22.0-23.2	17.0-19.0
実験尾数	30	30	30	20	20	15	15	10	20
魚体重(g)	16	25	26	-	-	-	-	-	312
回収率(%)	16.7 (5/30)	46.7 (14/30)	3.3 (1/30)	0.0 (0/20)	0.0 (0/20)	0.0 (0/15)	0.0 (0/15)	0.0 (0/10)	95.0 (19/20)
陽性率(%)*	筋肉	0.0 (0/5)	0.0 (0/14)	0.0 (0/1)	-	-	-	-	0.0 (0/19)
	心臓	0.0 (0/5)	0.0 (0/14)	0.0 (0/1)	-	-	-	-	0.0 (0/19)

*:検査法: 定量PCR法

※3: 感染海域の種苗生産場での用水処理による防除, 感染時期の把握

【方法】

種苗生産場 A において, 平成 24 年度に生海水を砂ろ過, 砂ろ過+カートリッジフィルター, 砂ろ過+紫外線 (46mJ/cm²) 処理による防除効果, 平成 25 年度に砂ろ過と紫外線処理の効果と感染時期の把握, 平成 26 年度に紫外線照射量(紫外線量 11mJ/cm², 23mJ/cm², 46mJ/cm²) の検討及び実用規模で砂ろ過+紫外線 (46mJ/cm²) 処理による防除効果を検討した。平成 24 年度は, 種苗生産場 A において各実験海水でクドア未感染ヒラメを 3 か月間飼育した。平成 25 年度, 平成 26 年度は, それぞれで処理した用水でクドア未感染ヒラメを 2 週間飼育し, その後, 非感染海域に移動し電解処理海水で実験魚を管理した。28S rDNA を検出する PCR により実験魚のクドア感染を調査した。

クドアの感染時期を特定するため, 種苗生産場 A において, 6 月から 12 月までほぼ毎月ヒラメ稚魚を 2 週間飼育してから心臓, 血液, 筋肉の定量 PCR 検査(Harada *et al.*, 2012)をして陽性率を調べた後, 非感染海域の陸上水槽に移動して 3 か月飼育し, 最終的に感染が成立したかを確認した。

【結果及び考察】

砂ろ過による防除効果が認められた(表 1-6)。さらに, 砂ろ過単独による用水処理と UV (46 mJ/cm²) 単独による用水処理について 3 回の検証試験を実施し, これら用水処理の有効性が確認され(表 1-7), UV の照射量については 11mJ/cm² でもクドアの感染を防除できることが確認された(表 1-8)。感染時期の調査では, 7 月に最も感染が起こり, 9 月以降はほとんど感染しないことが明らかとなった(表 1-10, 図 1-8)。この結果から, 特に 6~8 月には飼育用水の処理をするなどクドアの感染に注意する必要があることが示された。以上の成果を基に, 実用規模でヒラメを飼育し, クドアの感染を防除できることを実証した(表 1-9)。

表 1-6 種苗生産場 A における用水処理別のクドア感染試験（平成 24 年度）

実験魚	用水処理法	部位	陽性率（陽性数/検査数）		
			1 か月	2 か月	3 か月
稚魚	生海水	筋肉	5 (1/20) *	15 (3/20)	10 (3/30)
		血液	70 (14/20)	0 (0/20)	0 (0/30)
	砂ろ過	筋肉	0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/30)
		血液	0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/30)
	砂ろ過＋カートリッジフィルター	筋肉	0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/30)
		血液	0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/30)
	砂ろ過＋紫外線処理（46mJ/cm ² ）	筋肉	0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/30)
		血液	0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/30)

*：生海水区と砂ろ過・砂ろ過＋カートリッジフィルター・砂ろ過＋紫外線処理区との間に有意差有り（ $p<0.05$ ）

表 1-7 種苗生産場 A における用水処理別のクドア感染試験（平成 25 年度）

試験実施時期	用水処理法*	部位	陽性率** (陽性数/検査数)		
			1 か月	2 か月	3 か月
7 月	生海水	筋肉	20.0% (2/10)	20.0% (2/10)	36.7% (11/30) ***
	砂ろ過	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/30)
	紫外線処理	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/30)
8 月	生海水	筋肉	10% (1/10)	10% (1/10)	10% (3/30)
	砂ろ過	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/30)
	紫外線処理	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/30)
9 月	生海水	筋肉	0% (0/10)	10% (1/10)	3.3% (1/30)
	砂ろ過	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/30)
	紫外線処理	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/30)

*：種苗生産場 A において各処理方法で処理した用水で 2 週間飼育し暴露した。砂ろ過は、設計上の能力は 10 飼育の粒子を捕捉するろ過装置でろ過したもの。紫外線処理は、生海水を 46mJ/cm² の照射量で処理したもの。**：28S rDNA を検出する PCR にて寄生率を調査。***：有意差有り（ $p<0.01$ ）

表 1-8 種苗生産場 A における紫外線照射量別のクドア感染試験（平成 26 年度）

試験区	照射量 (mJ/cm ²)	検査部位	陽性率* (PCR 陽性数/検査数)		
			1 か月	2 か月	3 か月
生海水区	0	筋肉	10% (1/10)	20% (2/10)	10% (3/30)
UV-1	11	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/30)
UV-2	23	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/30)
UV-3	46	〃	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/30)

*：生海水区の寄生率と UV 区 3 つの合計の寄生率を比較し有意差有り (P<0.01)

表 1-9 実用規模におけるクドア感染防除法の検討（平成 26 年度）

試験区	照射量 (mJ/cm ²)	検査部 位	寄生率* (PCR 陽性数/検査数)		
			1 か月	2 か月	3 か月
生海水区	0	筋肉	23% (7/30)	53% (16/30)	43% (13/30)
砂ろ過+UV 区	46	〃	0% (0/30)	0% (0/30)	0% (0/30)

表 1-10 種苗生産場 A で飼育後に非感染海域で飼育したヒラメ筋肉の 28S rDNA を検出する PCR 検出結果*（平成 25 年度）

	試験開始時期					
	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	12 月
検出数/ 検査数 (%)	2/30 (6.7%)	11/30** (36.7%)	3/30 (10.0%)	1/30 (3.3%)	1/30 (3.3%)	0/30 (0%)

*：種苗生産場 A の陸上水槽で各月に 2 週間飼育後に、非感染海域に移動し 3 か月飼育し感染状況を検査した。

**：各月の感染率で有意差が認められた。(P<0.01)

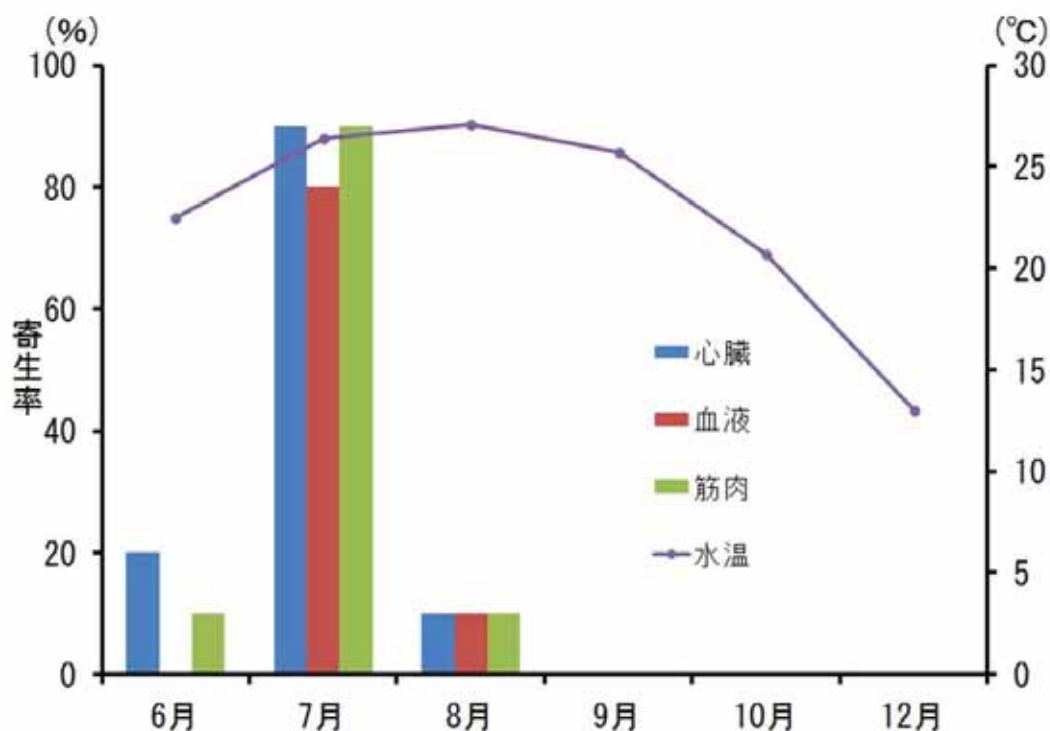


図 1-8 種苗生産場 A で各月に 2 週間飼育した直後のヒラメ各部位におけるクドア検出率から推定された感染時期（水温は種苗生産場の月間平均水温）（平成 25 年度）

※ 4：種苗生産場及び養殖施設におけるクドアの感染状況及び感染サイズの把握

【方法】

平成 24 年度に種苗生産場 A でサイズの異なる種苗（大型魚（1 歳魚，平均体長約 30 cm），中型魚（0 歳魚，平均体長約 15 cm））を生海水で飼育し，3 か月後に寄生の有無を調べた。Harada *et al.* (2012) による定量 PCR 法を用いて検出率を調べるとともに，孢子密度を測定することで寄生強度を調べ，同じ条件で飼育した稚魚（平均体長約 5 cm）と比較した。

平成 24，25 年度に養殖施設 B において養殖場に搬入前の種苗，搬入後，養殖場内で養成中の育成魚について，18S rDNA を標的とした PCR 法，定量 PCR 法による検査を行い，クドアの感染状況を調査した。

【結果及び考察】

種苗生産場の試験では，いずれの魚群にも感染が認められ，寄生率では大型魚・中型魚の方が稚魚より高いくらいであったが，大型魚・中型魚の孢子密度の多くは検出限界以下であったのに対し，稚魚では 10^6 個/g を超える重度感染もみられた（表 1-11，図 1-9）。

養殖ヒラメでは、原因は不明であるが 11 月から 12 月にかけて陽性率が最大になる傾向が認められた(表 1-12～1-14, 図 1-10, 1-11)。モニタリング調査の結果、養殖場でクドアに感染している施設を特定した(表 1-15～1-18)。これらの施設で養殖されているヒラメは、養殖施設へ搬入前の種苗検査で陰性であったか、もしくは他海域で養殖されている同一ロットのヒラメが陰性であったことから、種苗由来による感染ではなく、養殖施設内で感染したと考えられた(表 1-15, 表 1-17)。これらの施設で異なるサイズの種苗を導入して感染との関連性を調べる実験を計画したが、当該養殖施設が廃業したため、実験を行うことが出来なかった。

表 1-11 種苗生産場 A における用水処理別のクドア感染試験（平成 24 年度）

実験魚	飼育用水	検査部位	陽性率（陽性数/検査数）		
			1 か月	2 か月	3 か月
稚魚	生海水	筋肉	5 (1/20)	15 (3/20)	10 (3/30)
中型魚 (0 歳)		筋肉	NS	NS	23 (7/30)
大型魚 (1 歳)		筋肉	NS	NS	14 (4/29)

NS：サンプルなし

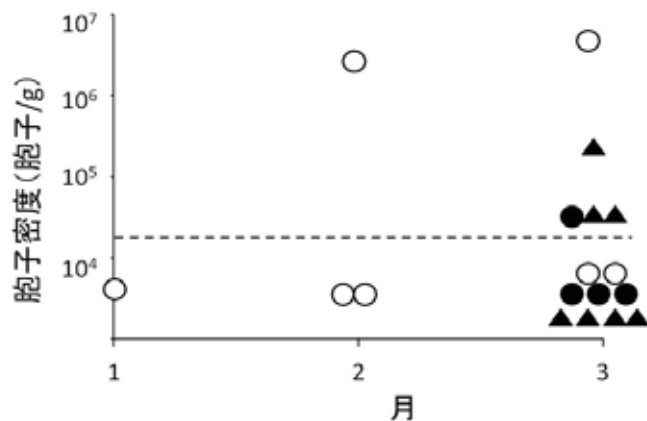


図 1-9 ヒラメのサイズによる寄生強度の違い（○：稚魚，▲：中型魚（0 歳），●：大型魚（1 歳）。点線は検出限界レベルを示す。）

表 1-12 業者①が保有するクドア感染ヒラメのクドア検出状況（H24 年度）

採材日	検鏡法	PCR	定量PCR		最大孢子数 (cells/g)
			遺伝子検出	10 ³ コピー数/g 以上	
H23.8.11	** (2/3) *	** (2/3)	未実施	未実施	2.3 × 10 ⁵
H24.7.11	** (2/5)	+++ (5/5)	+++ (5/5)	+	1.14 × 10 ⁶
H24.10.23	** (10/30)	** (20/30)	** (22/30)	** (16/30)	1.49 × 10 ⁶
H24.11.20	** (20/30)	+++ (28/30)	+++ (29/30)	+++ (28/30)	8.40 × 10 ⁶
H24.12.13	** (15/30)	+++ (25/30)	+++ (27/30)	+++ (25/30)	2.86 × 10 ⁷

+++：陽性率 80%以上
++：陽性率 30～79%
+：陽性率 1～29%
-：陰性
*：陽性尾数/検査尾数

表 1-13 業者⑤が保有するクドア感染ヒラメの検出状況（H24 年度）

採材日	検鏡法	PCR	定量PCR		最大孢子数 (cells/g)
			遺伝子検出	10 ³ コピー数/g 以上	
H24.6.27	- (0/3) *	- (0/3)	未実施	未実施	未実施
H24.7.24	- (0/5)	+	+	+	検出限界以下
H24.8.7	- (0/30)	+	+	+	検出限界以下
H24.9.4	- (0/30)	- (0/30)	- (0/30)	- (0/30)	検出限界以下
H24.10.17	- (0/30)	- (0/30)	+	+	検出限界以下
H24.11.13	- (0/30)	- (0/30)	+	+	検出限界以下
H24.12.5	+	+	+	+	9.38 × 10 ⁵
H25.1.11	- (0/30)	- (0/30)	+	+	検出限界以下

+++：陽性率 80%以上
++：陽性率 30～79%
+：陽性率 1～29%
-：陰性
*：陽性尾数/検査尾数

表 1-14 養殖ヒラメのクドア検出状況
(H25 年度)

採材日	検査法	PCR	定量PCR		最大胞子数 (cells/g)
			遺伝子検出	10 ³ コピー 数/g 以上	
H23.12.20	— (0/10) *	— (0/10)	未実施	未実施	—
H25.9.19	— (0/30)	— (0/30)	— (0/30)	— (0/30)	—
H25.10.16	— (0/30)	— (0/30)	+ (1/30)	— (0/30)	—
H25.11.19	+ (1/30)	+ (2/30)	+ (2/30)	+ (2/30)	2.8 × 10 ³
H25.12.13	— (0/20)	— (0/20)	— (0/20)	— (0/20)	—

+++ : 陽性率 80%以上
++ : 陽性率 30～79%
+ : 陽性率 1～29%
— : 陰性
* : 陽性尾数/検査尾数

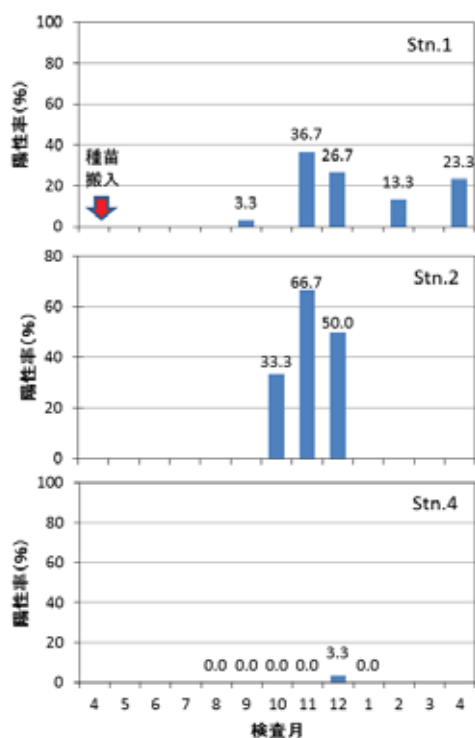


図 1-10 クドア感染魚のPCR 検査による陽性率の変動

Stn.1 (養殖施設 B) : H23 年度モニタリング結果より ; Stn.2, 4 : H24 年度モニタリング結果より

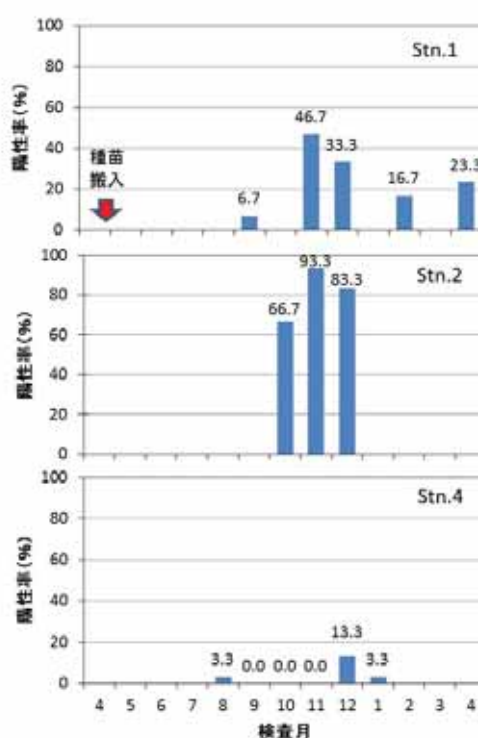


図 1-11 クドア感染魚の顕微鏡検査による陽性率の変動

Stn.1 (養殖施設 B) : H23 年度モニタリング結果より ; Stn.2, 4 (養殖施設 C, D) : H24 年度モニタリング結果より

表 1-15 養殖用ヒラメ種苗のクドア検出状況 (H24 年度)

検査日	依頼人	種苗名	体重(g)	尾数	PCR結果
H24.4.11	A社	A社(中間種苗)	104	10	-
H24.7.24	A社	A社	14	30	-
H24.8.28	A社	A社	2.1	30	-
H24.10.9	A社	A社	1.3	30	-
H24.11.2	A社	A社	1.2	30	-
H24.11.21	A社	A社(中間種苗)	94	5	-
H24.11.21	A社	A社(中間種苗)	60	5	-
H24.12.7	A社	A社	1.3	30	-

+: 陽性、-: 陰性

表 1-16 養殖ヒラメのクドアの検出状況 (H24 年度)

海域	業者	種苗	搬入日	魚体重	検査尾数	PCR結果
I	①	A社	H21年11月	1080	5	+
		A社	H22年11月	777	5	+
	②	A社	H22年秋	1786	5	-
	③	A社	H23年12月	1023	3	-
	④	A社	H23年7月	832	3	-
II		A社	H22年7月	844	5	-
	⑤	A社	H23年11月	1146	5	+
III	⑥	B社*	H23年5月	1169	5	-
IV	⑦	C社	H22年12月	552	5	-
	⑧	A社	H23年1月	787	5	-
V	⑨	D社	H23年10月	739	5	-
	⑩	E社	平成24年5月	1247	3	-
		A社	平成23年2月	1410	3	-
VI	⑪	A社	H23年春	761	5	-
	⑫	A社	H23年11月	644	5	-
VII		E社	H23年4月	1208	5	-
		E社	H24年6月	607	5	-
	⑬	E社	H24年1月	482	5	-
		A社*	H24年3月	868	5	-
	⑭	A社	H24年3月	509	5	-
		A社	H24年4月	557	5	-
	⑮	A社	H23年11月	792	5	-
	⑯	A社	H24年1月	461	5	-
VIII	⑰	A社	H23年12月	334	5	-
	⑱	E社	H23年12月	916	5	-

* 中間育成業者から購入

表 1-17 養殖用ヒラメ種苗のクドア検出状況 (H25 年度)

検査日	依頼人	種苗名	体重	尾数	PCR結果
H25.4.15	中間育成業者A	B社	6.7	30	-
H25.4.15	中間育成業者A	A県	9.5	30	-
H25.5.22	A社	A社	2.4	60	-
H25.7.3	A社	A社	1.4	60	-
H25.10.11	A社	A社	2.3	60	-
H25.11.25	中間育成業者A	B社	2.2	55	-
H25.12.24	A社	A社	2.4	60	-

表 1-18 養殖ヒラメのクドア・セブテンプリンクタータの検出状況 (H25 年度)

海域	業者	種苗	搬入日	魚体重(g)	検査尾数	PCR結果
I	④	A社	H23年12月	889	30	+
II	⑥	A社	H24年5月	737	5	-
III	⑦	F社	H24年12月	250	5	-
IV	⑨	A社	H24年10月	436	5	-
V	⑩	A社	H24年11月	524	5	-
VI	⑫	A社	H24年11月	734	5	-
VII		A社*	H25年3月	786	5	-
	⑬	E社	H25年2月	610	5	-
		A社*	H25年6月	463	5	-
	⑭	A社	H23年12月	580	5	-
	⑮	A社	H24年11月	378	5	-
		A社	H24年12月	323	5	-
	⑯	A社	H25年5月	382	5	-
	⑰	A社	H24年12月	278	5	-
	⑱	A社	H24年10月	522	5	-

* 中間育成業者から購入

Ⅱ. 研究実績報告

1. 中課題2：感染したヒラメ排除のための効率的な検査法等の開発

(1) 成果の概要

工程表	進捗状況・成果
感染初期のヒラメ稚魚体内におけるクドアの動態の時系列的調査による効率的な検査法の開発(小課題1 関連)	※1：稚魚での適切な検査用のサンプリング部位を明らかにするため、感染後のクドアの動態をPCRにより検査した。感染が報告された海域の種苗生産場で平成25年7月及び8月に曝露したヒラメ稚魚群において、暴露後1週目で心臓からのみ、2週目で心臓、血液、筋肉からクドアの遺伝子が検出できた(表2-1, 図2-1)。しかし、平成26年に実施した同様の試験では、2週目に初めて心臓、血液、筋肉からクドアが検出され、部位による検出率は4か月目まで大きな差異はなかった(図2-2)。検出率は2か月目にピークがみられたが、コピー数では4か月目まで徐々に増加しているように見えた(図2-3)。検鏡では2か月目から孢子が検出され、徐々に孢子数が増加して4か月目には 10^6 個/gを超えるケースもみられた(図2-4)。これらの結果から、感染初期の種苗については、心臓、血液、筋肉の何れでも利用可能と考えられる。また、検鏡は2か月目以降に適用可能であること、魚を殺さずに診断する手法として血液を検体として利用できる可能性が示された。(平成25, 26年度)
魚を殺さずにクドアを診断する手法の開発として筋肉の採材法、検鏡検査との検出感度比較(小課題2関連)	※2：綿棒を用いる検鏡検査法(綿棒検査法)を生残ヒラメに適用したところ、健全な群では検査による死亡は認められなかったが(表2-2)、エドワジエラ症の原因菌 <i>Edwardsiella tarda</i> 等を保菌している群では54.5%の個体が死亡し、このような群の検査には不適であった。新たな診断法として綿棒検査法と同等の感度の生検(注射器で筋

魚を殺さずにクドアを診断する手法の実用性の評価(小課題2関連)	肉を採取) し, 検鏡検査を行う生検法を開発した(表 2-3)。(平成 24, 25 年度) 生検法の検出精度の検証と適正な検査手法を構築するため, 感染ヒラメの複数箇所から筋生検を行い, 標準法である検鏡による検出精度と魚体への影響を観察した。その結果, 生検法は魚への影響が少なく, 12G あるいは 14G の注射針を用いることで, クドア孢子密度が 10⁶個/g 以上の個体では, 複数ヵ所からの採材により, 93%以上の割合で検出可能であった(表 2-4)。(平成 26 年度) ※3: 感染ヒラメ 2 歳魚(孢子密度が 1.0×10⁵~2.5×10⁷ 個/g) を用い, 検鏡による筋肉中の孢子密度と生検法でのクドア孢子観察結果について 30 個体分のデータを収集し, 個体別に, 重複を許して n か所(n=5, 4, 3, 2, 1) の孢子計数データを疑似サンプリングするデータを基に, 誤判定が起こる確率を推定するモデル(式 1) の構築とモデルを使用し実用性の評価を統計的に検討した(式 1, 表 2-5)。その結果, 1.0×10⁶ 個/g 以上の感染個体では, 1 個体あたり 2 か所からの採材で誤差判定が起こる確率を 5%以下にできると推定された(図 2-5)。(平成 26 年度) 同じデータセットから, 同様に作成した疑似データに基づき, 採材する筋肉量の違いにより, 誤判定が起こる確率を計算するロジスティックモデルを推定した(式 2)。上記モデルより, 孢子密度が 1.0×10⁶ 個/g 以上の個体から生検法で誤判定を起こさない, 採材量は 50mg 以上が妥当で, これは結果的に 2 か所(10~20mg/か所) からの採材を促すものとする(図 2-6)。
--	---

	以上より，養殖期間中や出荷時に魚を殺さずに検査する方法としては，注射器で2か所から筋肉を採材する生検法が使用可能と思われる。（平成26年度）
成果目標：感染初期のクドアの動態を解明し，種苗導入時に効果的な検査法を確立すると同時に，養殖期間中や出荷時に魚を殺さずに検査することで感染ヒラメを効率よく排除する手法を開発する。	

＜成果の概要の補足＞

※ 1：感染初期のヒラメ稚魚体内のクドア感染動態と効率的検査法の開発

【方法】

平成 25 年は 7 月及び 8 月に 2 週間、平成 26 年は 7 月から 1 か月間種苗生産場 A でヒラメ稚魚を生海水に曝露した。平成 25 年の試験では、1, 2 週間後に 10 尾ずつサンプリングして、心臓、血液、筋肉を定量 PCR (Harada *et al.*, 2012) または検鏡により検査し、クドア感染の有無を調査した。平成 26 年の試験では、種苗生産場での飼育期間中、1, 2, 3 週目及び 1 か月目に 20 尾ずつサンプリングした後、非感染海域の陸上水槽に移動して飼育を継続し、移動後から毎月（実験開始時から 2, 3, 4 か月後まで）20 尾ずつサンプリングして、前年度と同様に心臓、血液、筋肉におけるクドア感染の有無を調べた。

【結果及び考察】

平成 25 年 7 月及び 8 月に曝露した群において、1 週目で心臓からのみ、2 週目で心臓、血液、筋肉からクドアの遺伝子が検出できた（表 2-1, 図 2-1）。しかし、平成 26 年に実施した同様の試験では、2 週目に初めて心臓、血液、筋肉からクドアが検出され、部位による検出率は 4 か月目まで大きな差異はなかった（図 2-2）。検出率は 2 か月目にピークがみられたが、コピー数では 4 か月目まで徐々に増加しているように見えた（図 2-3）。検鏡では 2 か月目から孢子が検出され、徐々に増加して 4 か月目には 10^6 個/g を超える重度感染魚もみられた（図 2-4）。これらの結果から、感染初期の種苗については、心臓、血液、筋肉の何れかを検査すればよいと考えられた。また、検鏡は 2 か月目以降に適用可能であること、魚を殺さずに診断する手法の選択肢として血液検査も利用できる可能性が示された。

表 2-1 感染初期のヒラメ体内における部位別の定量 PCR による検出(平成 25 年度)

検査部位	感染試験開始			
	7 月		8 月	
	1 週目	2 週目	1 週目	2 週目
心臓	1/9* (11%)	9/10 (90%)	4/10 (40%)	1/10 (10%)
血液	0/10 (0%)	8/10 (80%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)
筋肉	0/10 (0%)	9/10 (90%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)

*:検出数/検査数

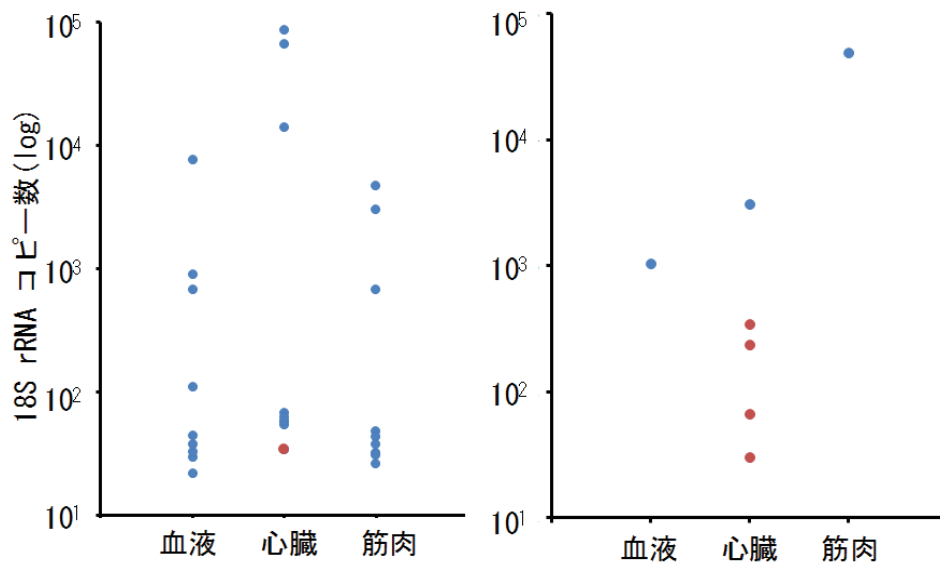


図 2-1 感染初期（7 月（左）と 8 月（右））のヒラメ体内における部位別クドア・セプテンプレクターコピー数。赤が 1 週目、青が 2 週目。（平成 25 年度）

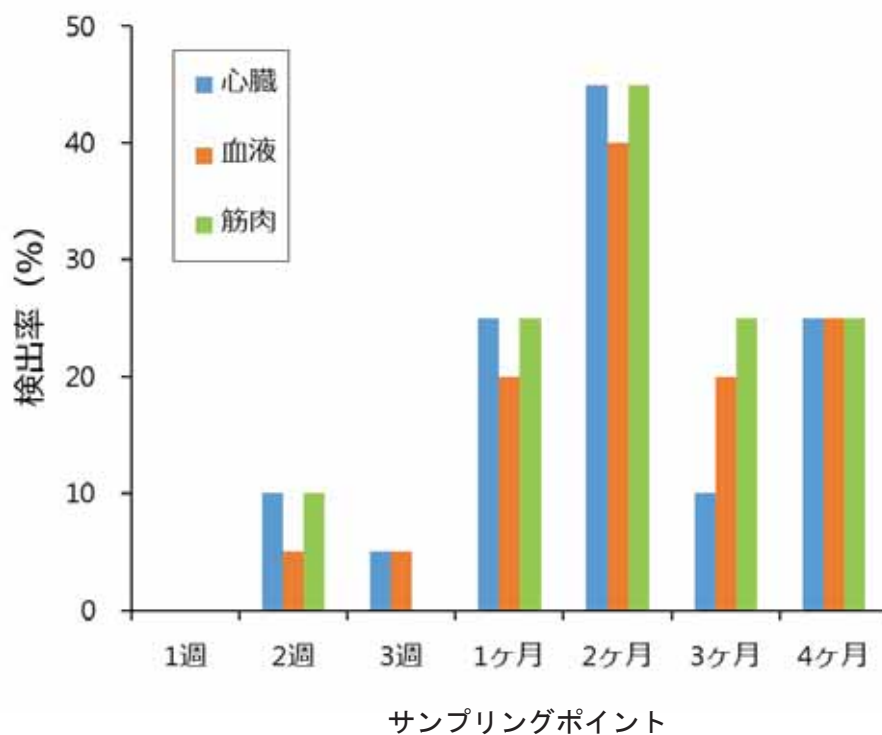


図 2-2 種苗生産場 A で 1 か月（平成 26 年 7 月 12 日～8 月 12 日）飼育（毎週 20 尾サンプリング）後、非感染海域の陸上水槽に移動して 3 か月の飼育期間中（毎月 20 尾サンプリング）における、心臓、血液、筋肉中の定量 PCR によるクドア・セプテンプレクター検出（平成 26 年度）

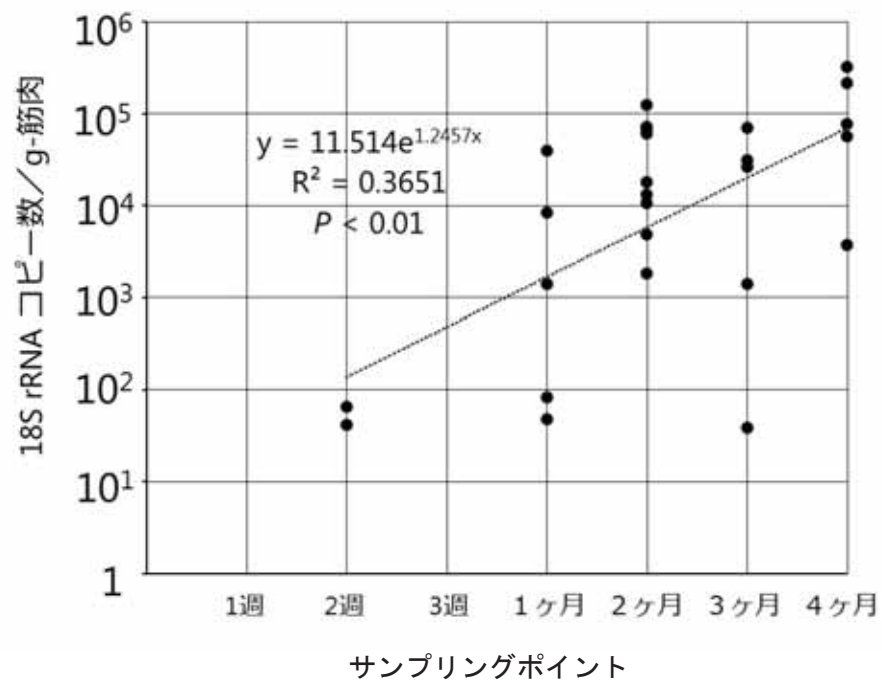


図 2-3 種苗生産場 A で 1 か月飼育後、非感染海域の陸上水槽に移動して飼育した期間中、筋肉中のクドア 18S rDNA コピー数（平成 26 年度）

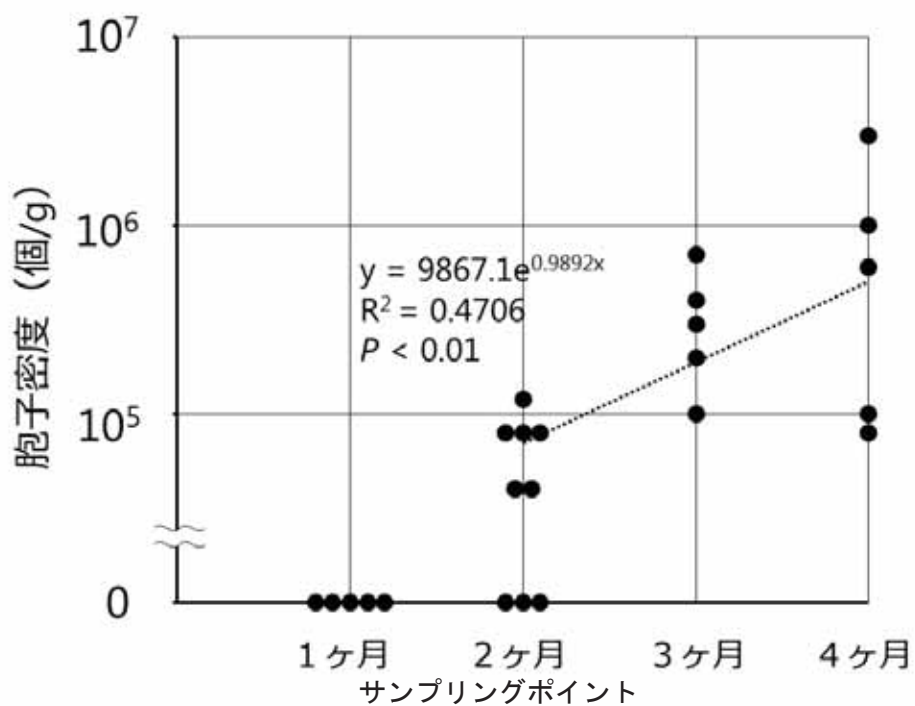


図 2-4 種苗生産場 A で 1 か月飼育後、非感染海域の陸上水槽に移動して飼育した期間中、定量 PCR 陽性魚の筋肉中におけるクドア孢子密度（平成 26 年度）

※2：魚を殺さずにクドアを診断する手法の開発

【方法】

クドア感染を診断する方法として、生きたヒラメの尾柄部の切開箇所あるいは偽鰓から、綿棒で採材した組織をスライドグラスに塗抹・染色して顕微鏡観察する方法（水産庁通知，24 水推第 374 号，以下，「綿棒検査法」という。）と注射針（12G、14G 獣医針）を用いて採材した組織をスライドグラス上でカバーガラスにより押しつぶし，顕微鏡観察する方法（以下「生検法」という。）を試みた。また，ヒラメの生残に与える影響も観察した。これらの観察の後，殺した実験魚の筋肉 0.5g を採材し血球計算盤を用いて顕微鏡観察により孢子密度を計数する方法（厚労省通知法，食安監発 0711 第 1 号，以下「標準法」という。）により孢子密度を算出し，綿棒検査法及び生検法による孢子検出の成否と標準法による孢子密度を比較することで，綿棒検査法と生検法の検出感度を把握した。実験魚には，種苗生産場 A でクドア感染が確認された飼育群のヒラメを用いた。

【結果及び考察】

綿棒検査法を生きたヒラメに適用したところ，健全な群では検査による死亡は認められなかった（表 2-2）。しかし，綿棒検査法をエドワジエラ症の原因菌 *Edwardsiella tarda* 等を保菌している群に適用したところ，無処理の対照区の死亡率が 4 か月間で 31.3%であったのに対し，綿棒検査法で検査した群では 54.5%の個体が死亡したことから，このような群の検査には不適であると考えられた。一方，12G 針を用いる生検法では，実験魚の生残率はエドワジエラ症原因菌を保菌している群においても対照区と同等の生残率を示し，採材による魚体への影響は少ないと考えられた。検出感度の比較では綿棒を用いる綿棒検査法と生検法との間に感度に差はなく，いずれも 5×10^5 個/g の孢子密度の検体であれば，検査漏れも認められなかった。（表 2-3）。複数箇所からの採材による生検法と標準法による孢子密度の比較から，生検法 12G あるいは 14G の注射針を用いることで，クドア孢子密度が 10^6 個/g 以上の個体では，複数ヵ所からの採材により，93%以上の割合で検出可能であった（表 2-4）。以上のことから，生検法は魚体への影響が少なく，かつ孢子密度が 10^6 個/g 以上のクドア感染個体を高確率で検出できる方法であり実用性があると考えられた。

表 2-2 綿棒法と生検法による筋肉組織採材後のヒラメの生残状況（平成 24 年度）

採材方法	イニシャル			39 日後		
	供試尾数 (尾)	平均全長 (cm)	平均体重 (g)	生残尾数 (生残率: %)	平均全長 (cm)	平均体重 (g)
対照区	20	13.4	18.1	16 (80)	14.3	25.5
鰓内側(綿棒)	20	12.8	16.2	20 (100)	13.9	23.8
尾柄部(綿棒)	20	12.8	16.2	19 (95)	13.7	22.5
生検(注射針 12G)	20	12.9	16.4	20 (100)	14.1	24.7

表 2-3 綿棒検査法と生検法の検出感度の比較（平成 25 年度）

標準法*による孢子密度 ×10 ⁴ （個/g）	綿棒検査法	生検法	
		（12G 針で採材）	（18G 針で採材）
不検出	2/7**	4/7	1/7
5	0/1	0/1	0/1
20～<50	3/5	3/5	3/5
50～<100	3/3	3/3	1/3
100～<500	8/8	8/8	5/8
500～<1000	8/8	8/8	8/8
1000～<2500	7/7	7/7	7/7

*：厚労省通知（食安監発 0711 第 1 号）の顕微鏡検査に準拠し測定した。

**：検出数／検査数

表 2-4 クドア感染ヒラメの通常法と生検法との検出状況（平成 26 年度）

個 体 数	標準法* 孢子密度 （×10 ⁴ 個 /g）	定量 PCR* （コピー数 /g）	生検法**					
			12G					14G
			尾柄部	背部 1	背部 2	背部 3	背部 4	尾柄部
15	ND	3.36×10 ⁶ ～ 1.72×10 ⁹	2/15***	1/15	2/15	2/15	2/15	8/15
7	10～36	3.87×10 ⁶ ～ 1.10×10 ⁹	1/7+	1/7	2/7	2/7	2/7	3/7
15	100～730	7.29×10 ⁷ ～ 1.67×10 ¹¹	15/15	14/15	14/15	15/15	14/15	14/15
5	1,150～ 4,755	1.60×10 ¹⁰ ～ 6.53×10 ¹⁰	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
3	11,135～ 25,075	3.79×10 ⁹ ～ 7.28×10 ¹⁰	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

*:厚労省通知(食安監発 0711 第 1 号)に則り, 実験終了時に殺した個体の 0.5g 筋肉中胞子の顕微鏡検査を標準法とし, 厚労省通知に基づいた定量 PCR を実施した。

** :陽性判定個体/検査個体数

***:注射針で採材した筋肉をウェットマウントし検鏡によりクドア胞子を確認

※ 3 : 生検法の実用性の評価

【方法】

生検法の検査精度の検証と適正な検査手法を構築するため, 感染ヒラメの背部筋肉の複数箇所からの筋生検による生検法と標準法による検出精度を比較し実用性を評価した。すなわち, ①クドア感染ヒラメ 2 歳魚を用い, 検鏡法による筋肉の胞子密度, 生検法の観察結果について 30 個体分のデータを収集し, 1 個体あたり生検による採材を何回 (=何か所) 行えば, 誤判定を起こしにくくなるかについて統計的に検討した。胞子密度が $1.0 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^7$ 個/g である個体の, 各背部 5 か所から生検法により得られた観察結果を元に個体ごとに, 重複を許して n か所 ($n=5, 4, 3, 2, 1$) の胞子計数データをブートストラップサンプリングして疑似データを作成し, 誤判定が起こる確率を計算するロジスティックモデルを推定した (式 1)。ロジスティックモデルの説明変数には各個体の胞子密度 (Den) を用い, また従属変数には誤判定が起こる場合に 1, 正判定が起こる場合に 0 を与えてモデルの切片 (β_0) 及び係数 (β_1) の推定を行った。このモデルを用いれば各個体の胞子密度に対応して, n か所から生検法を行った場合に誤判定が起こる確率を計算することが可能である。以上を各 n について 1000 回繰り返して行い, 得られた 1000 個の切片 (β_0) 及び係数 (β_1) の平均値を各 n についての両推定値とした。

②次に, 同じデータセットを用いて, 採材する筋肉量の違いにより, 誤判定が起こる確率について推定した。基データから各個体ごとに, 重複を許して n か所 ($n=5, 4, 3, 2, 1$) の胞子計数データをブートストラップサンプリングし, それらをすべて結合して一つの疑似データを作成し, 誤判定が起こる確率を計算するロジスティックモデルを推定した (式 2)。ロジスティックモデルの説明変数には各個体の胞子密度 (Den) と n か所から採集した筋肉量の合計 (Mas) を対数変換して用い, また従属変数には誤判定が起こる場合に 1 を, 正判定が起こる場合に 0 を与えてモデルの切片 (β_0) 及び係数 (β_1), (β_2) の推定を行った。このモデルを用いれば胞子密度及び生検法により採材した筋肉量に対応して誤判定が起こる確率を計算できる。以上を 1000 回繰り返して行い, 得られた 1000 個の切片 (β_0) 及び係数 (β_1) (β_2) の平均値を各係数の推定値とした。以上より切片 (β_0) の推定値として -16 ± 3.27 , 胞子密度の係数 (β_1) として 3.43 ± 0.7 及び筋肉量の係数 (β_2) として 1.02 ± 0.42 が推定された。

【結果及び考察】

①採材回数を検討した結果、1~5回の採材における生検法の切片と係数の平均が推定できた（表2-5）。これら各生検回数についての切片と係数の推定値を式1に代入し、孢子密度（Den）が $1.0 \times 10^5 \sim 1.50 \times 10^6$ 個/g の場合について誤判定が起こる確率を求めた結果、 1.0×10^6 個/g 以上の感染個体であれば、1個体あたり2か所からの採材による生検法で誤差判定が起こる確率を5%以下にできることが推定された（図2-5）。

②採材する筋肉量と誤判定が起こる確率を求める推定式を用いて、孢子密度が $10 \times 10^4 \sim 150 \times 10^4$ 個/g の条件下において、10, 20, 50, 100 及び 150mg の筋肉量が得られた場合に誤判定が起こる確率を計算した。ただし、本シミュレーション条件下では、生検回数と採材される筋肉量の増加との間に比例関係があることは明白であり、この点から判断すれば、推定された誤判定確率は過小評価である可能性が高い。これら各生検回数についての切片と係数の推定値を式1に代入し、孢子密度（Den）が 10×10^4 個/g~ 150×10^4 個/g の場合について誤判定が起こる確率を図示したものが図2-6である。

以上のシミュレーション結果から、孢子密度が 10^6 個/g 以上の個体から生検法で誤判定を起こさないためには、採材すべき筋肉量を 50mg 以上とすることが妥当と考えられ、これは結果的に2か所以上（10-20mg/か所）からの採材を促すものとする。

$$P(\text{occurrence Den}) = 1 / 1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{Den})} \dots (\text{式1})$$

表2-5 各生検回数において誤判定が起こる確率を推定するロジスティックモデルの切片及び係数（平成26年度）

生検回数	切片 (β_0)	係数 (β_1)
1	-17.255223	4.2437704
2	-18.21066	4.6688191
3	-16.11798	4.2433753
4	-16.1591	4.2776895
5	-16.06837	4.2664578

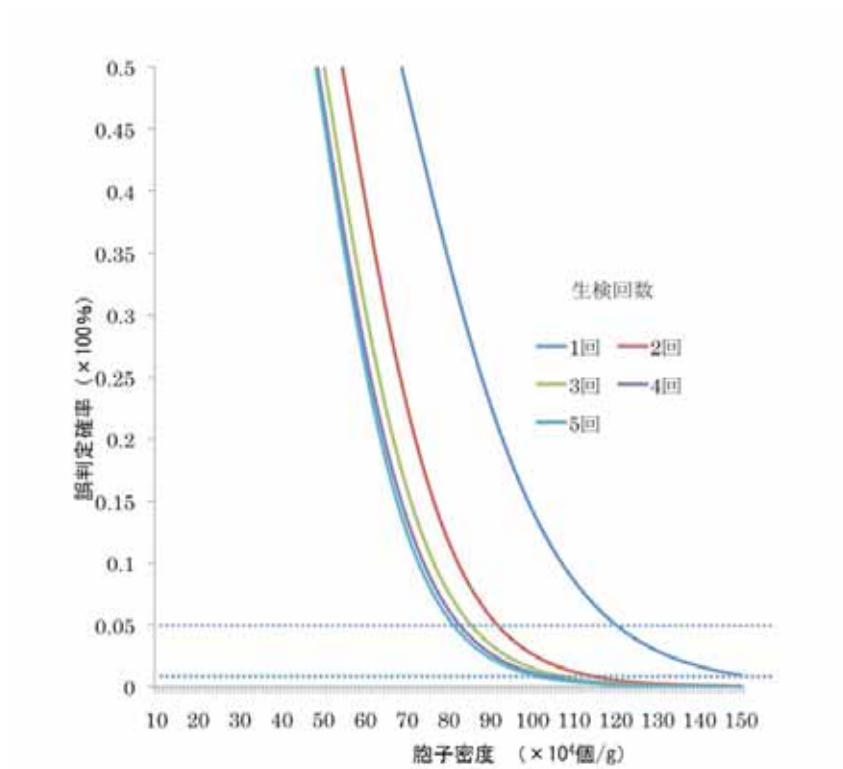


図 2-5 各生検回数における誤判定の発生確率(平成 26 年度)

$$P(\text{occurrence Den}) = 1 / (1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 \cdot \log(\text{Den}) + \beta_2 \cdot \log(\text{Mas}))}) \dots (\text{式 2})$$

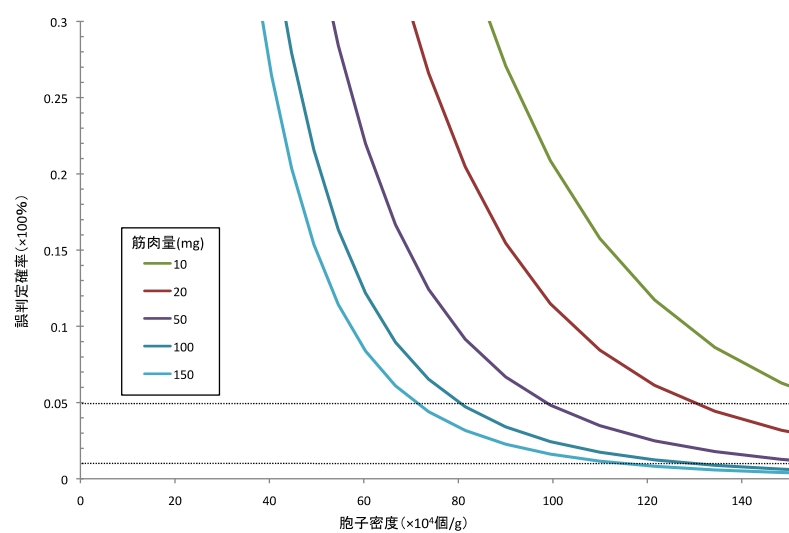


図 2-6 各採材筋肉量における誤判定の発生確率(平成 26 年度)

3. 中課題3：商品価値を低下させずにクドアを冷蔵等により失活させる処理方法の開発

(1) 成果の概要

工程表	進捗状況・成果
クドア胞子の活性評価法と毒性評価法の開発，及びその評価法を用いたクドア胞子の失活法の検討(小課題1 関連)	※1：細胞の生死を判定する方法として用いられる蛍光色素(Hoechst 33342 (HO) と propidium iodide (PI))を応用して，クドア胞子の活性を評価する技法を開発した(表 3-1)。HO & PI 染色法による結果は，ヒト腸組織由来の Caco-2 細胞を用いた毒性評価法の結果と一致したことから，胞子の不活化処理条件をスクリーニングするための簡便・迅速な方法として有用であると考えられた(図 3—1)。(平成 24 年度) HO & PI 染色評価法を用いて，胞子が失活する処理条件について検討した。その結果，冷蔵や電子レンジ処理では不活化できなかったが，80℃・10 秒以上の加熱，25%以上のエタノール，10 µl/ml のリモネン処理，及び塩分 16%と 0%(淡水)処理には不活化効果がみられ(図 3-2～3-6) Caco-2 細胞を用いた試験によって裏付けられた(図 3-7)。(平成 25 年度)しかし，これらは実験的な条件であり，養殖ヒラメの生産，流通，消費のいずれの段階でも実用化は難しいと考えられる。
冷凍・冷蔵処理からクドアの活性及び毒性評価の実施体制を整え，クドア失活効果をスクリーニングし，その結果を基に効果的で商品価値を損なわない処理方法を検討する。冷凍処理については，出荷サイズのヒラメを用いた現場規模の流通実験(凍結～貯蔵～解凍)等を実施。また，冷蔵・冷凍以外の処理法(食品添加物等)も探索。(小課題2 関連)	※2：クドア粘液胞子不活化試験 不活化条件として凍結，冷蔵と氷冷，化学物質，通電，浸透圧，及びその他(高温，高圧，強制遊泳等)を選び(表 3-2)，加工処理形態としてクドアの精製胞子，真空包装フィルム，活魚を対象として，HO&PI 染色(小課題1)により不活化効果を評価した。精製胞子に対しては，複数の方法で不活化効果が得られた(表 3-2、図 3-8、3-9)。(平成 24、25 年度)しかし，筋肉中のクドア粘液胞子

	を不活化する技術を開発することはできなかった。 ※3:冷凍品質試験 近年，冷凍魚の品質に影響する過程として，凍結よりむしろ貯蔵・解凍過程が注目されており，可能な限り低い温度での凍結貯蔵（低温凍結貯蔵）と 0℃下の解凍（氷水解凍）が推奨されている。本試験では，低温凍結貯蔵と氷水解凍がヒラメの商品価値を低下させない方法として有効か否かを，現場規模の流通実験を模した出荷サイズのヒラメを用い，物理化学的方法と官能試験により評価した。その結果，低温凍結貯蔵と氷水解凍により，菌ごたえ以外の点で鮮魚と差がない商品を提供できる可能性が示された（図 3-10～3-16）。（平成 26 年度）
成果目標：食中毒原性を失活させかつヒラメの商品価値を低下させないような冷蔵・冷凍処理技術を開発することにより，養殖ヒラメの食品としての安全性を確保する。	

＜成果の概要の補足＞

※ 1：クドア孢子の活性評価法と毒性評価法の開発とクドア孢子の失活法の検討

【方法】

細胞の生死を判定する方法として用いられる蛍光色素（Hoechst 33342 (HO) と propidium iodide (PI)）で染め分ける方法について、ヒラメ筋肉から精製したクドア孢子を試料として、クドア孢子の活性を評価する技法としての有効性を確認するため、トリパンブルー（TB）染色による生残率と、Caco-2 細胞を用いた毒性評価法と比較した。

HO 溶液（1 mM）50 μ l と PI 溶液（0.02 mg/ml）25 μ l をクドア孢子の PBS 懸濁液 25 μ l に添加し、30 分間静置して染色した。その後、染色した孢子懸濁液をスライドグラスに載せ、蛍光顕微鏡を用いて UV 励起と G 励起で観察した。UV 励起では HO で染色された全ての孢子の核が青く発光し、G 励起では PI で染色された死んだ孢子の核が赤く発光するため、両者の数の差が生きた孢子の数となる。そこで、合計 100 個の孢子を観察し、PI 陰性の割合を生残率とした。

TB 染色においては、市販の 0.4%TB 液とクドア孢子の PBS 懸濁液を 1:1 で混合した後、すぐにスライドグラスに載せて 100 個の孢子を光学顕微鏡で観察し、TB 陰性（青く染色されていない）の割合を生残率とした。

クドア孢子の不活化条件を検討するため、各種温度（ -80°C ～ 80°C ）、電子レンジ（100 W～300 W）、エタノール（5%～100%）、リモネン 10 μ l/ml（5～60 分間）、塩分（0%～16%）処理を施した後、HO & PI 染色により生残率を求めた。以上の結果より、不活化効果が認められた条件を選択し、既報（Ohnishi *et al.*, 2013）の方法によりヒト腸組織由来の Caco-2 細胞を用いた毒性試験を行った。

【結果及び考察】

TB 染色では図 3-1 で失活が確認されたエタノール処理孢子も活性があるものとして検出してしまうことが確認され（表 3-1）、HO & PI 蛍光染色の有効性が確認された。

不活化条件を検討した結果、 0°C または 4°C で 3 日間という冷蔵保存では失活しなかったが、 80°C ・10 秒の加熱条件では失活することがわかった（図 3-2）。電子レンジ処理ではいずれの条件でもほとんど失活しなかった（図 3-3）だけでなく、100 W と 170 W で 15 秒、300 W・10 秒以上、500 W・5 秒以上では筋肉の熱変性がみられたため、刺身として食するには実用的ではない。エタノール処理では 25%以上（1 時間）の濃度で失活した（図 3-4）。データは示していないが、その後の試験では 25%エタノール・5 分間処理でも失活することがわかった。しかし、いずれにしても応用するのは困難な条件である。一方、リモネン（10 μ l/ml）処理では 5 分間でも不活化効果がみられた。すでに商業化されている「かぼすヒラメ」の筋肉にどの程度のリモネンが含有されているかは不明であるが、ヒラメへの経口投与による殺虫効果を試験する価値はある。塩分処理については、16%で完全に不活化したことから、醤油に漬けることは有効である（図 3-6）。しかし、刺身を食するときに

表面につける程度では筋肉の深部にまで浸透しないため、効果は不十分と考えられる。

これら HO & PI 染色法により不活化効果があるとされた条件（80℃・10 秒、25%エタノール・5 分、リモネン（10 μ l/ml、5 分）で処理したクドア孢子は、Caco-2 細胞を用いた毒性試験でも毒性が失われた（経上皮電気抵抗値が変化しなかった）という結果が得られた（図 3-7）ことから、クドア孢子の不活化処理条件をスクリーニングするための簡便・迅速な方法として有用であると考えられた。

表 3—1 HO & PI 染色とトリパンプルー（TB）染色により評価したクドア孢子の生残率（H24 年度）

処理条件	生残率（%）	
	HO & PI 蛍光染色	TB 染色
対照	90	98
加熱（75℃・1 時間）	0.3	3.7
冷凍（-20℃・4 時間）	0.3	10
氷冷（0℃）	83	96
50%エタノール・1 時間	0.3	90
70%エタノール・1 時間	0	2.7
100%エタノール・1 時間	0	1.7

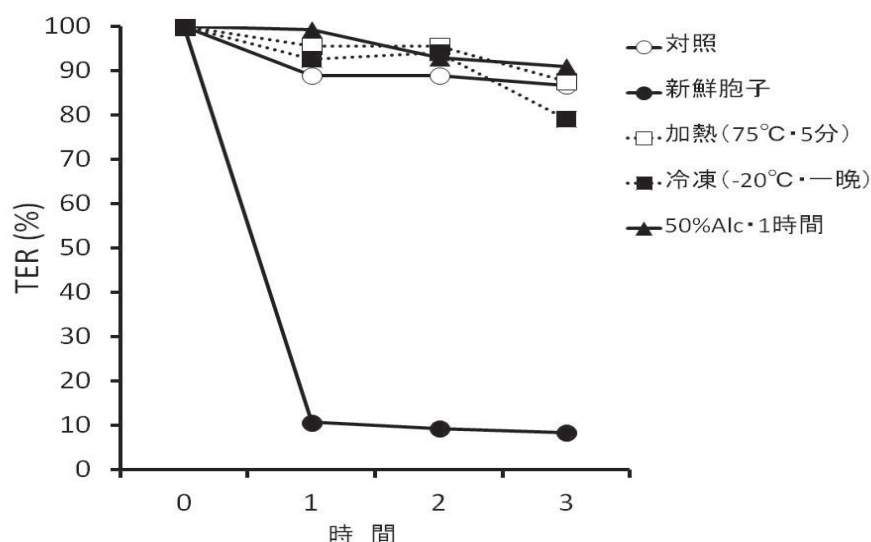


図 3—1 Caco-2 細胞を用いたクドア孢子の毒性試験（孢子 10^5 個を接種した 3 ウェルの経上皮電気抵抗 (TER) の平均値。対照区は培地のみ接種。）（H24 年度）

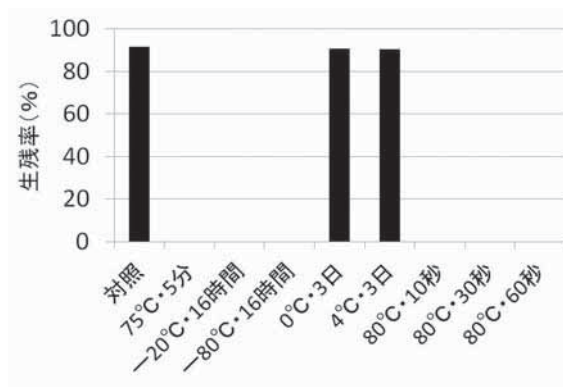


図 3-2 温度処理による不活化効果(H25年度)

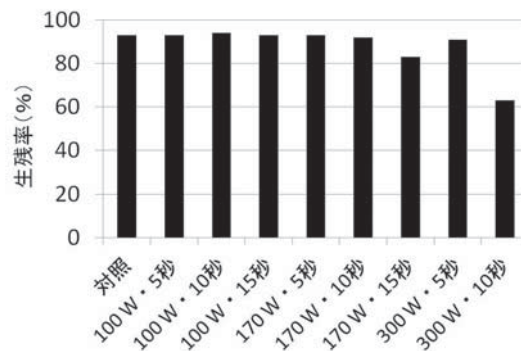


図 3-3 電子レンジによる不活化効果 (H25年度)

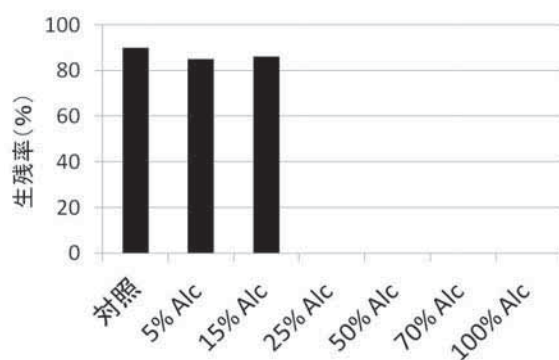


図3-4 アルコール1時間処理による不活化効果 (H25年度)

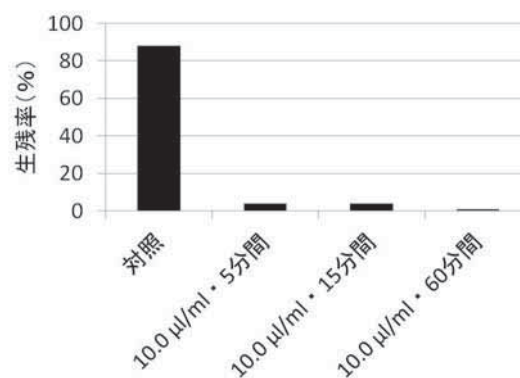


図 3-5 リモネン処理による不活化効果 (H25年度)

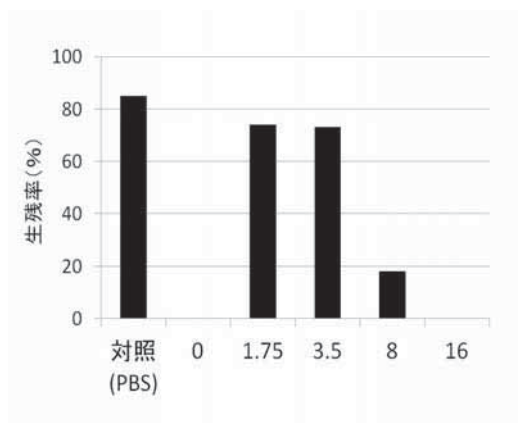


図3-6 塩分5分間処理による不活化効果 (H25年度)

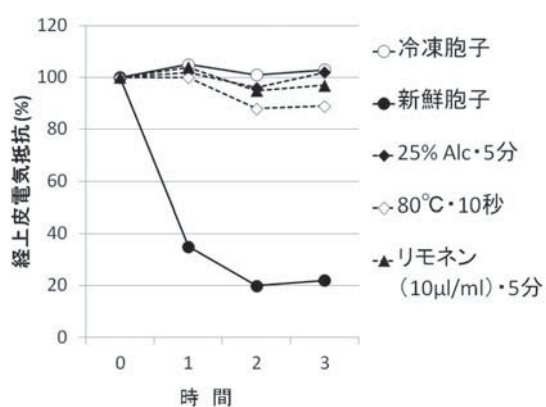


図 3-7 蛍光染色法により失活したと判定された孢子の Caco-2 細胞を用いた毒性試験 (H25年度)

※2：クドア粘液胞子不活化試験

【方法】

不活化条件として凍結（家庭用冷凍庫：-20℃/1時間/2時間/4時間；アルコールブライン：-33℃/20分間；CAS凍結：-53℃/15分間；3D凍結：-40℃/10分間），冷蔵（4℃/24時間/48時間/96時間），氷冷（-3℃/24時間/48時間/96時間；-1℃/24時間/48時間/96時間），化学物質（リモネン：8.4/84/840ppm/1時間；乳酸：120/1,200/12,000ppm/1時間；パイセス：0.4/4/40ppm/2時間），通電（直流2mA/10分間；20mA/1分間/5時間；180mA/10分間；交流100V/30分間），浸透圧，及びその他（高温[29℃～32℃/1～14日間]、高圧[50MPa/1時間；100MPa/1時間/5時間；150MPa/1時間；200MPa/1時間/5時間]，強制遊泳[24時間]）を選び，クドアの精製胞子，真空包装フィレ，活魚を対象に不活化試験を行った。処理後の精製胞子に対してHO&PI染色を施し，生残胞子と死亡胞子を計数することにより胞子の生残率を求め，不活化効果を評価した（表3-2）。

【結果及び考察】

①凍結では，フィレが厚く，凍結時間が短い場合は不活性効果が低かった（図3-8）。②フィレの冷蔵と氷冷に不活化効果はなかった。③高圧で胞子是不活化されたが筋肉が白濁した。④リモネンと乳酸は精製胞子を不活化したが，フィレ，活魚では効果がなかった（図3-9）。⑤精製胞子への温度急変，活魚に対する高温飼育，ブロナポール，直流電流，交流電流，濃塩水浴，長時間淡水浴，強制遊泳に効果は見られなかった（表3-2）。④の結果から，筋肉中の胞子を不活化するためには偽シストの破壊が必要と考えられた。

表 3-2 クドア粘液孢子不活化試験内容（平成 24～25 年度）

	試験項目	試験条件	暴露条件	孢子生残率		
				精製孢子	フィレ	活魚
凍結	家庭用冷凍庫	-20℃	1時間		55.0%	
			2時間		0.2%	
			4時間		0.0%	
	ブライン	-33℃	20分間		0.0%	
	CAS	-53℃	15分間		0.0%	
	3D	-40℃	10分間		35.7%	
温度(凍結以外)	冷蔵	4℃	24時間		78.5%	
			48時間		75.0%	
			96時間		67.1%	
	氷温	0℃	24時間		79.4%	
			48時間		66.8%	
			96時間		75.2%	
		-1℃	24時間		79.4%	
			48時間		82.2%	
			96時間		82.6%	
		-3℃	24時間		80.5%	
			48時間		79.0%	
			96時間		81.5%	
	温度急変	20℃→10℃	1時間ずつ	63%		
		29℃→4℃	1時間ずつ	61%		
	高温保存	29-32℃	24時間		67%	
			48時間		77%	
			72時間		25.2%	
			144時間		8.1%	
			240時間		0.0%	
			336時間		0.5%	
	高温飼育	29℃	2日間			72.1%
			3日間			77.3%
			4日間			89.7%
			5日間			70.6%
			7日間			55.8%
			9日間			75.0%
化学物質	リモネン	8.4ppm	15℃/1時間	78.6%	93%	
		84ppm	15℃/1時間	63.0%	93%	
		840ppm	15℃/1時間	0.0%	89%	
		0.1ml	尾部血管に打注			76.0%
		EPに5%外添	2,300ppm/2週間/個体			67%
	乳酸	120ppm	15℃/1時間	75.1%		
		1,200ppm	15℃/1時間	70.9%		
		12,000ppm	15℃/1時間	0.0%		
		1ml	尾部血管に打注			76.7%
	プロノポール	0.4ppm	25℃/2時間	66%		
		4ppm	25℃/2時間	72%		
		40ppm	25℃/2時間	59%		
通電	直流	2mA	10分間		73%	
		20mA	1分間		72%	
			5時間		83%	
		180mA	10分間		58%	
	交流(淡水中)	100V	30分間			83%
浸透圧	淡水浴	7時間	処置後25日海水飼育			0
		12時間	処置後15日海水飼育			0
		8時間	処置後20日海水飼育			60%
	淡水→6%NaCl加海水	1時間ずつ	処置後1日海水飼育			58.4%
その他	高圧	50MPa	1時間		72.9%	
		100MPa	1時間		69.3%	
			5時間		72.0%	
		150MPa	1時間		63.1%	
		200MPa	1時間		30.4%	
			5時間		2.6%	
	強制遊泳	循環水槽	24時間			64.6%

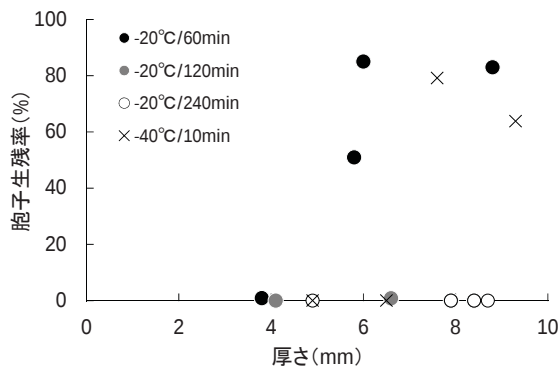


図 3-8 フィレ（筋肉）の厚さとクドア孢子生残率の関係（H26 年度）

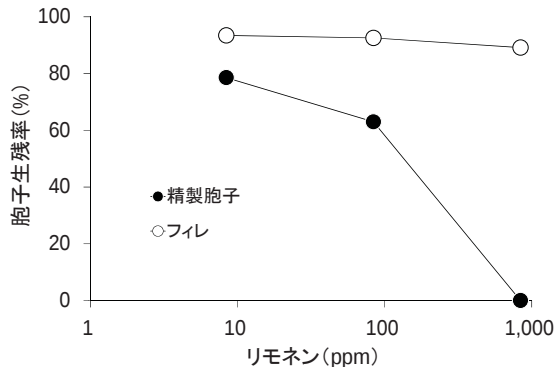


図 3-9 リモネンのクドア孢子不活化効果（H26 年度）

※3: 冷凍品質試験

【方法】

貯蔵・解凍工程がヒラメ筋肉の物理化学的性状に及ぼす効果を把握するため、急速凍結（ -70°C ）したヒラメ筋肉の真空包装フィレを従来法（ -20°C ；家庭用冷凍庫を想定）と低温凍結貯蔵（ -35°C ；業務用冷凍庫を想定）で貯蔵し、両群のフィレに対して水道水流水解凍（約 $11^{\circ}\text{C}/30$ 分間）と氷水解凍（ $0^{\circ}\text{C}/1$ 時間）を施し、それぞれについてドリップ率と破断強度（貯蔵 73 日後）、ATP 関連物質（111 日後）を調べた。また、氷水解凍を現場で実施する際に必要な情報として、フィレの厚さと氷水解凍に要する時間の関係を調べた。さらに、貯蔵・解凍工程がヒトの味覚に及ぼす効果を把握するため、冷蔵（ $5^{\circ}\text{C}/21$ 時間）した鮮魚を対照として、急速凍結（ -50°C ）・低温凍結貯蔵（ $-30^{\circ}\text{C}/19$ 時間）・氷水解凍した冷凍魚の官能試験を実施した。パネリストに対して、両群の刺身の色、透明感、臭み、歯ごたえ、旨みの強い方を選ばせ、冷凍魚を識別させ、その理由を尋ねた。

【結果及び考察】

①貯蔵 110 日の K 値は従来法（ -20°C ）よりも低温凍結貯蔵（ -35°C ）で低かった（ t 検定, $P < 0.05$; 図 3-10）。②貯蔵温度が同じ場合、ドリップ率は氷水解凍によって著しく改善された（二元配置分散分析, $P < 0.001$; 図 3-11）。③破断強度は解凍温度による差は見られず、低温凍結貯蔵で鮮魚より優れ、活魚と差がなかった（クラスカル・ウォリス検定, $P < 0.001$; Steel-Dwass の多重比較, 活魚と -35°C 貯蔵, -20°C 貯蔵と鮮魚で有意差なし; 図 3-12）。④氷水解凍での解凍所要時間（中心部が 0°C に達する時間）は、筋肉が薄い場合に約 110 分、厚い場合には約 230 分であった（図 3-13）。⑤官能試験のパネリストは歯ごたえによって冷凍魚と鮮魚を識別できたが、臭みや旨みでは識別できなかった（図 3-14）。⑥ただし、冷凍魚と鮮魚の識別理由は正・誤答者間で類似し、実際には識別できない味や臭みが挙げられた（図 3-15）。⑥の結果から、冷凍魚への悪いイメ

ーが伺われたものの、低温凍結貯蔵・氷水解凍により、菌ごたえ以外の点で鮮魚と差がない商品を提供できる可能性が示された。

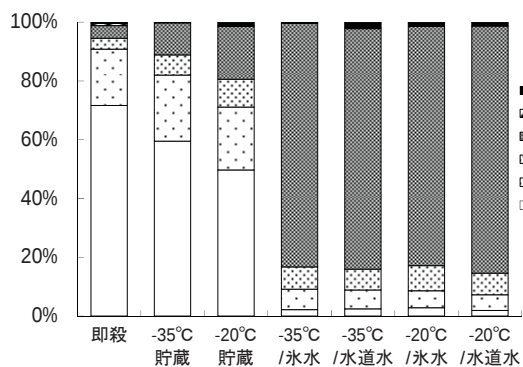


図 3-10 即殺, 貯蔵, 解凍後の K 値 (ATP 関連物質) (H26 年度)

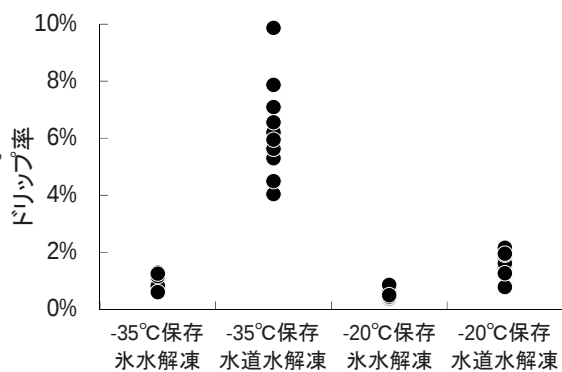


図 3-11 貯蔵・解凍温度とドリップ率 (H26 年度)

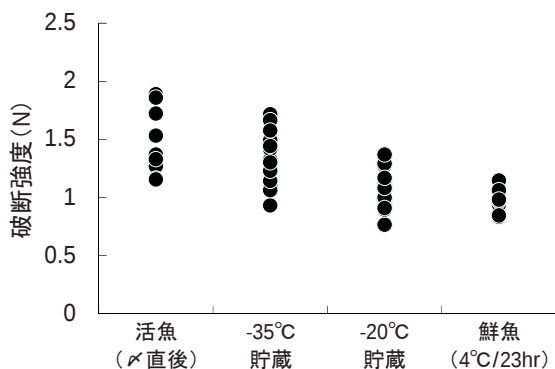


図 3-12 貯蔵・解凍温度と破断強度 (H26 年度)

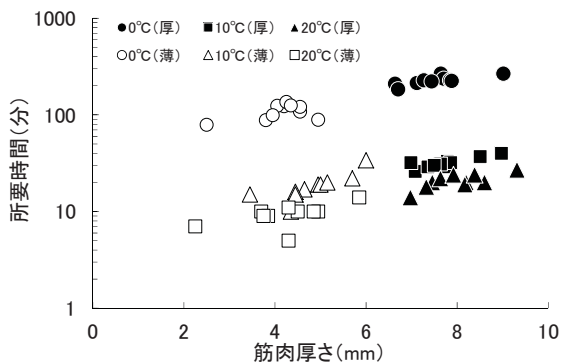


図 3-13 凍結筋肉の厚さと解凍所要時間 (H26 年度)

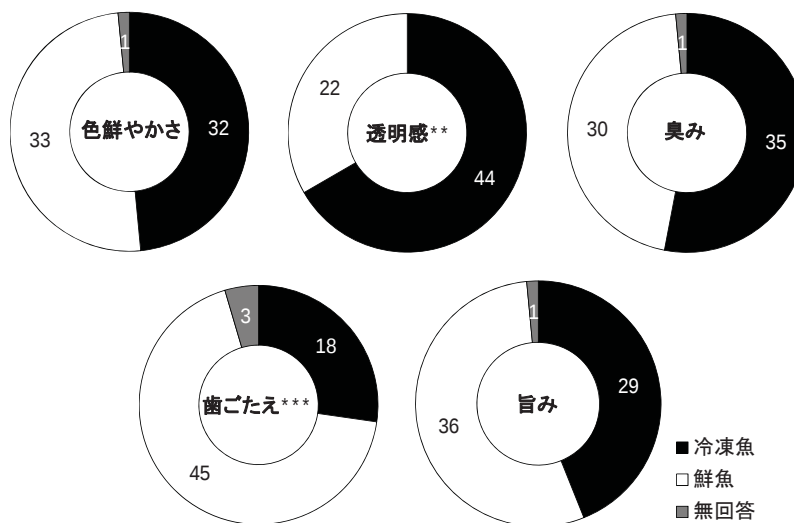


図 3-14 冷凍魚と鮮魚の品質評価項目の強さに対するパネリストの判断
 (アスタリスクは二項検定〔片側〕で有意差あり〔** < 0.01, *** < 0.001〕
 (H26 年度)

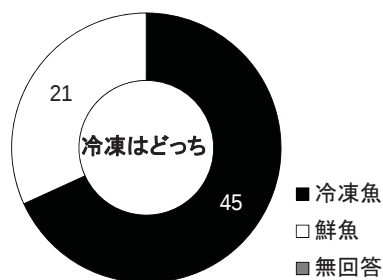


図 3-15 パネリストによる冷凍魚と鮮魚の識別 (二項検定〔片側〕, $P < 0.001$) (H26 年度)

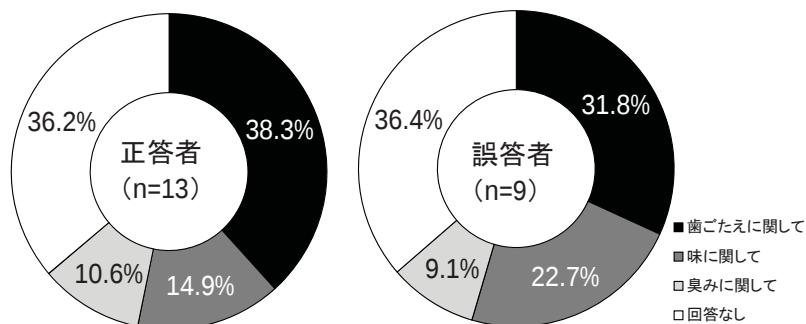


図 3-16 冷凍魚と鮮魚の識別における正答者と誤答者による識別理由内訳 (H26 年度)

4. 中課題4：ヒラメ以外の魚種におけるクドアの感染状況調査

(1) 成果の概要

工程表	進捗状況・成果
天然のクロマグロ及び養殖クロマグロのクドア・ヘキサブクタータの感染状況を調査（小課題1関連）。	※1：平成24年～26年に収集した天然クロマグロ(体重64.3g～78kg, 平均5.4kg)計427尾のクドア・ヘキサブクタータ感染について、28S rDNAを検出するPCR法で検査を行ったところ41.7%の個体が検査陽性となった。PCR陽性個体の孢子密度の計数結果では、孢子数は10^1から10^5個/gであり、当歳魚と2歳以上魚の孢子密度に顕著な差異は認められなかった(表4-1, 図4-1)。
クドア感染海域において、ヒラメ以外の養殖魚や漁獲される天然ヒラメ等に寄生するクドアの感染状況を調査（小課題2関連）。	※2：養殖ヒラメ以外の魚種におけるクドアの感染状況調査については、調査したいずれの海域の養殖マダイ、ブリ、スズキ、トラフグ、カンパチからPCR及び検鏡で、クドアは検出されなかった。（表4-2）（平成24～26年度） 感染海域を中心にその他海域を含む海域において漁獲された天然ヒラメ1138尾のクドア感染状況をPCRにより調査したところ、50尾がPCR陽性となり、このうち3尾は1×10^6個/gを超える孢子が観察された（表4-3, 図4-2）。（平成24～26年度）
韓国産ヒラメと国産ヒラメから採集したクドアの形態学的・遺伝学的比較及び韓国産と国産のクドアを識別する形態的・遺伝学的な検査法の実用性について検討（小課題3関連）。	※3：韓国産ヒラメ9尾と国産ヒラメ19尾から採集したクドアの形態学的比較を行ったところ、極嚢数、とくに7極嚢を有する孢子の割合において顕著な差があることが明らかとなった（図4-3）。（平成24年度）なお、7極嚢孢子の出現頻度は、魚体サイズや採集時期と明瞭な関係がみられなかったため（図4-4, 4-5）、遺伝的違いであることが示唆され、由来を識別する指標のひとつとして提案できる。（平成25年度）

	韓国産ヒラメと国産ヒラメから採集したクドアの遺伝学的な差異について、ITS 領域を標的とし変異解析を行った結果、国内株に特徴的な配列が 1 塩基のみ認められた(図 4-6)。さらに、変異解析に多用されるミトコンドリア DNA の遺伝子配列の取得を試みたところ、約 1 万塩基対のミトコンドリア DNA の遺伝子配列の取得に成功した(図 4-7)。このうち 2 千塩基対について株間の差異を解析したところ、国内株とその他の株(韓国株及び食中毒残品由来株)に特徴的な変異領域が認められた(図 4-8)。これらの遺伝子情報を基に、PCR-RFLP 法による遺伝子多型解析を行った結果、制限酵素 Hpy188I 及び Hpy188III による消化により、3 タイプの遺伝子型が存在することが明らかとなった(図 4-9)。(平成 26 年度)
成果目標：ヒラメ以外の魚種及び由来の異なるヒラメにおけるクドアの感染状況を把握する。	

＜成果の概要の補足＞

※1：天然クロマグロ及び養殖クロマグロのクドア・ヘキサプンクタータの感染状況を調査

【方法】

平成24年度から平成26年度にかけて、我が国沿岸海域で水揚げされたクロマグロ427尾(表4-1)についてクドア・ヘキサプンクタータの検査を実施した。検査には凍結された尾部筋肉の一部より個体別に抽出したDNAを鋳型とし、28S rDNAの部分配列を増幅するプライマーによりPCR検査を行った。PCR陽性の検体は、顕微鏡観察にてクドア孢子数を計数した。すなわち、約1.0gの筋肉サンプルをフィルター付ホモジナイズバッグで破碎後、ろ液を遠心し上清を廃棄した。100 µlのPBSに沈殿を懸濁し、5 µl中の孢子数を計数した。孢子が認められなかったサンプルについてはさらに遠心し、上清を90µl廃棄後、沈殿を懸濁し、残りの5µl中の孢子数を計数した。

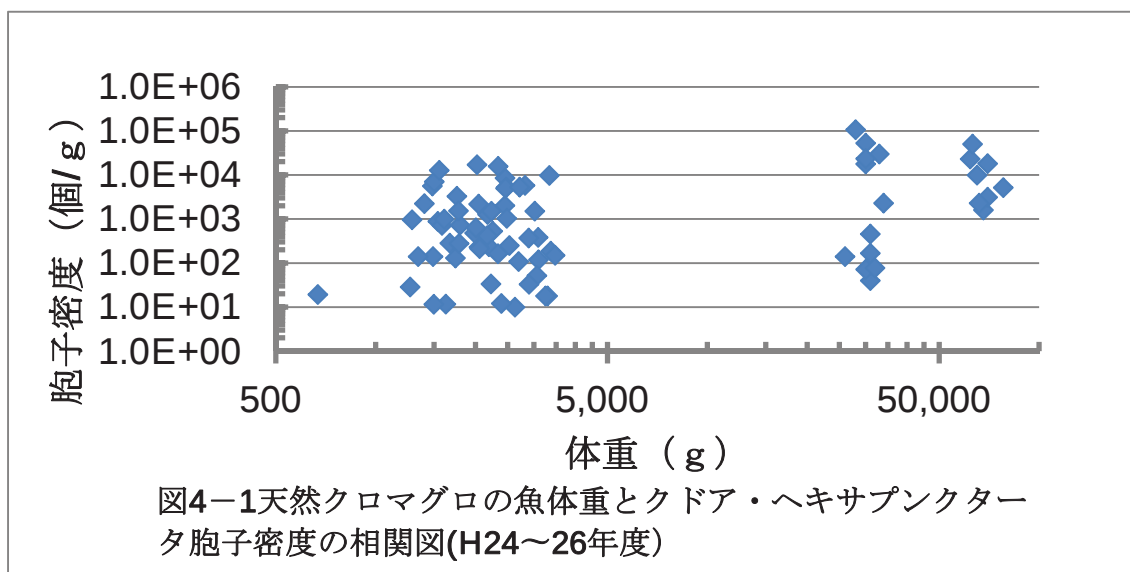
【結果及び考察】

クロマグロは広く回遊することと、特定の時期に採取したサンプルであることから、3年分まとめてPCR検査の結果を取りまとめた。PCR陽性個体の孢子密度の計数の結果、孢子数は10から10⁵個/gの範囲にあった(表4-1、図4-1)。

なお、クドア・ヘキサプンクタータについては、Caco-2細胞による毒性試験の結果、毒性の発現に多くの孢子を必要とすることから、ヒラメのクドアと比較して毒性は低いとされている(Suzuki et al., 2015)。また、この調査では我が国沿岸での平均的な感染の程度を示すものではない。

表4-1 天然クロマグロのクドア・ヘキサプンクタータ感染状況(H24～H26年度)

採取年度	(尾数)	平均体重(範囲)	PCR陽性数 (陽性率)	検鏡陽性数 (陽性率)	孢子密度 (個/g)
H24-26年度	427	5391.3g(64.3g-78kg))	178(41.7)	78(18.2)	10 ~ 1.1x10 ⁵



※2：養殖魚及び天然ヒラメのクドア感染状況調査

【方法】

養殖魚では平成 24, 25 年度に感染海域のマダイ及び隣接海域のマダイ, カンパチ, ブリ, スズキについて, 定量 PCR, 28S rDNA を検出する PCR 及び検鏡法によりクドアの感染状況を調査した。

天然ヒラメでは, 主に感染海域及びその他の海域において, 他の調査で採集され提供されたヒラメを調査に供した。なお、平成 24 年度は感染海域及びその他海域、平成 25 年度は感染海域と隣接海域, 26 年度は前年度の調査で感染個体が確認された海域のみ調査を行った。検査には凍結されたヒラメ筋肉の一部を用い, クドアの 18S rDNA を検出するプライマーにより PCR 検査を行い, PCR 陽性の検体は, 厚生省通知に基づきクドア孢子数を計数した。

【結果及び考察】

養殖魚では, いずれの海域の養殖マダイ, ブリ, スズキ, トラフグ, カンパチにおいて PCR 及び検鏡による検査で, クドアは検出されなかった。

天然ヒラメの調査では, 調査海域には偏りがあることから 3 年間の結果をとりまとめた。調査した個体のうちの 4.4% からクドアが PCR により検出された (表 4-3)。また, PCR 陽性検体の孢子密度を計数した結果、調査個体の 0.3% にあたる 3 尾で 1×10^6 個/g を超える孢子が観察された (表 4-3)。この 3 個体は, 230g, 484g, 612g であった。天然ヒラメの魚体重とクドアの孢子密度との相関を見ると, 孢子密度が高い個体は小型魚で見られた (図 4-2)。ただし、今回は陽性検体が少なかったため、体重と孢子密度の関係については、今後の課題である。また、この結果は我が国沿岸での平均的な感染の程度を示すものではない。

表 4-2 養殖魚におけるクドア感染状況（H24～H26 年度）

魚種	採材 (年. 月)	尾数	平均魚体重 (g)	PCR 法	孢子密度 (×104 個/g)
マダイ	H25.1.	30	554	—*	未実施
	H26.11.	30	508	—**	ND***
マダイ	H24.8	5	1,725	—*	ND
	H25.1	5	1,747	—*	ND
	H25.9	5	558	—*	未実施
	H26.1	5	991	—*	未実施
	H26.12	5	717	未実施	ND
ブリ	H24.8	5	6,484	未実施	ND
	H25.1	5	4,046	未実施	ND
	H26.1	5	5255	—**	未実施
	H26.12	6	1233	未実施	ND
スズキ	H24.8	5	1,486	未実施	<0.01
	H25.1	5	1,003	—*	未実施
トラフグ	H25.9	5	275	—**	未実施
カンパチ	H26.11	17	809	未実施	ND

*：水産庁通知法（28S）

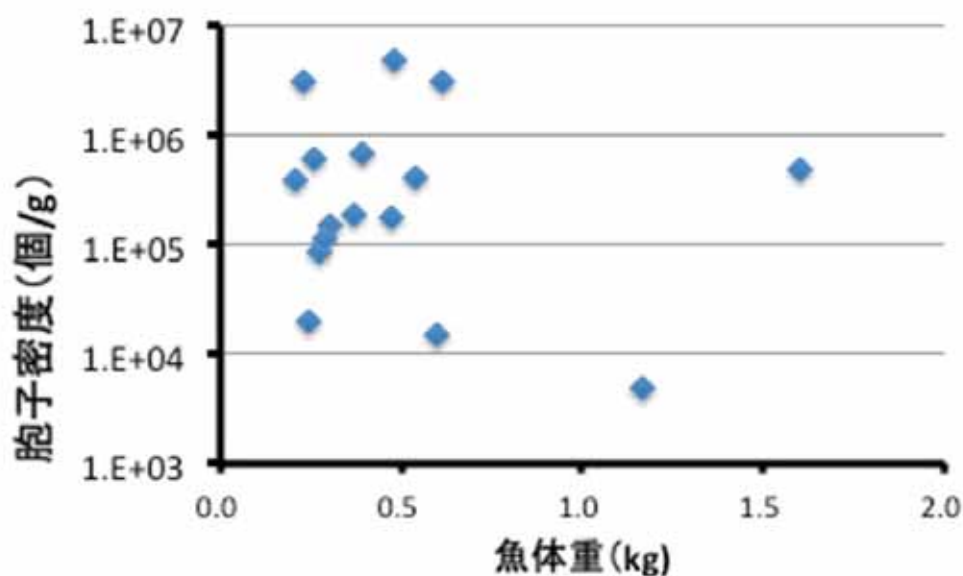
**：厚労省通知法

ND：検出限界以下

表 4-3 天然ヒラメのクドア感染状況（H24～26 年度）

尾数	平均体重 (kg)	PCR 陽性数 (陽性率) *1	検鏡検査で胞子が確認され た検体数 (率)	胞子密度が 1×10^6 個 /g を超える (率) *2
1138	0.97 (0.01 ～12.9)	50 (4.4)	16 (1.4)	3 (0.3)

1：PCR 検査は 18S rDNA を検出する方法で実施した。ただし 423 尾は定量 PCR により行った。
2：PCR 陽性検体は厚生労働省通知（食完監発 0711 第 1 号）に従い顕微鏡により胞子を計数した。胞子密度が 1.0×10^6 /g を超える事が確認された場合，食品衛生法第 6 条に違反するものとして取り扱われる。



4-2 天然ヒラメの魚体重とクドア胞子密度の相関図

※3：韓国産ヒラメと国産ヒラメから採集したクドアの形態学的・遺伝学的比較及び韓国産と国産のクドアを識別する形態的・遺伝学的な検査法の実用性について検討

【方法】

韓国産養殖ヒラメ 9 尾と国産養殖ヒラメ 19 尾からクドア孢子を採集して、試料とした。ウエットマウントまたは塗抹標本をメチレンブルー染色して、得られた株ごとに 200 個の孢子を観察し、そのうちの各極嚢数（5～8 個）を持つ孢子の割合を求めた。

次に、7 極嚢の出現割合に影響する要因を分析するため、日本産ヒラメ由来のクドアの情報を利用して、7 極嚢の割合と魚体重及び採集月との関係をそれぞれグラフにプロットして調べた。

韓国産ヒラメと国産ヒラメに感染するクドアの遺伝的差異を解析するため、各国のクドア感染魚及び食中毒残品より DNA を抽出し、PCR 法によりスペーサー領域（ITS 領域）を含む 28S, 5.8S 及び 18S リボソーム RNA 遺伝子を増幅した。遺伝子産物は、大腸菌にクローニングし、ABI PRISM 3130xl ジェネティックアナライザ（Applied Biosystems）によりシーケンス解析を実施した。

また、クドアの新規遺伝子を取得するために、クドアの EST 解析を行った。ヒラメの筋肉片を PBS 中で細切し、Percoll 不連続密度勾配遠心法を 2 回行い、筋繊維とクドア孢子を分離し、クドア孢子を精製した。得られた孢子より total RNA を抽出し、mRNA の精製を行った。cDNA ライブラリーを構築後、同ライブラリーのデュアル・エンド・シーケンス解析を行い、EST を得た。

EST 解析により、クドアのミトコンドリア DNA と予測された遺伝子配列を増幅するプライマーを設計した。韓国産ヒラメと国産ヒラメのクドアより抽出した DNA を鋳型とし、PCR 法によりミトコンドリア DNA の部分塩基配列を増幅した。ダイレクトシーケンス法により、増幅産物の遺伝子配列を解析した。

株間で遺伝子変異が認められた領域について、制限酵素切断パターンを確認し、変異の検出に有効な制限酵素を選択した。

【結果と考察】

国産ヒラメ由来のクドア孢子も韓国産ヒラメ由来のクドア孢子も、6 個の極嚢を持つ孢子の割合が最も多かったが（それぞれ 70.1%と 53.6%）、7 個の極嚢を持つ孢子の割合は国産ヒラメで 2.3%しかなかったのに対して、韓国産ヒラメでは 43.6%もあった（図 4—3）。統計的には、5 極嚢、6 極嚢、7 極嚢のいずれの割合も日本と韓国の間で有意差があり、極嚢数の割合で日本産と韓国産のヒラメ由来のクドアを識別できることが示唆された。ただ、実際の検査においては、5 極嚢に見える孢子はもともと 5 極嚢であったのか、標本を作製する過程で脱落してしまったのか判断できないケースもあったのに対して、7 極嚢の孢子は明瞭に認識できるため、7 極嚢の出現割合を指標にするのが現実的だと考えられる。

7 極嚢の出現割合と魚体重または採集月との間には、まったく相関関係が見られなかった（図 4-4, 4-5）。

韓国産ヒラメと国産ヒラメから採集したクドアの 28S, 5.8S 及び 18S リボソーム RNA

遺伝子に差異は認められなかった。ITS 領域において国内株に特徴的な配列が 1 塩基のみ認められた(図 4-6)。

さらに、変異解析に多用されるミトコンドリア DNA の遺伝子配列の取得を試みたところ、約 1 万塩基対のミトコンドリア DNA の遺伝子配列の取得に成功した(図 4-7)。このうち 2 千塩基対について株間の差異を解析したところ、国内株とその他の株(韓国株及び食中毒残品由来株)に特徴的な変異領域が認められた(図 4-8)。これらの遺伝子情報を基に、PCR-RFLP 法による遺伝子多型解析を行った結果、制限酵素 Hpy188I 及び Hpy188III による消化により、3 タイプの遺伝子型が存在することが明らかとなった(図 4-9)。

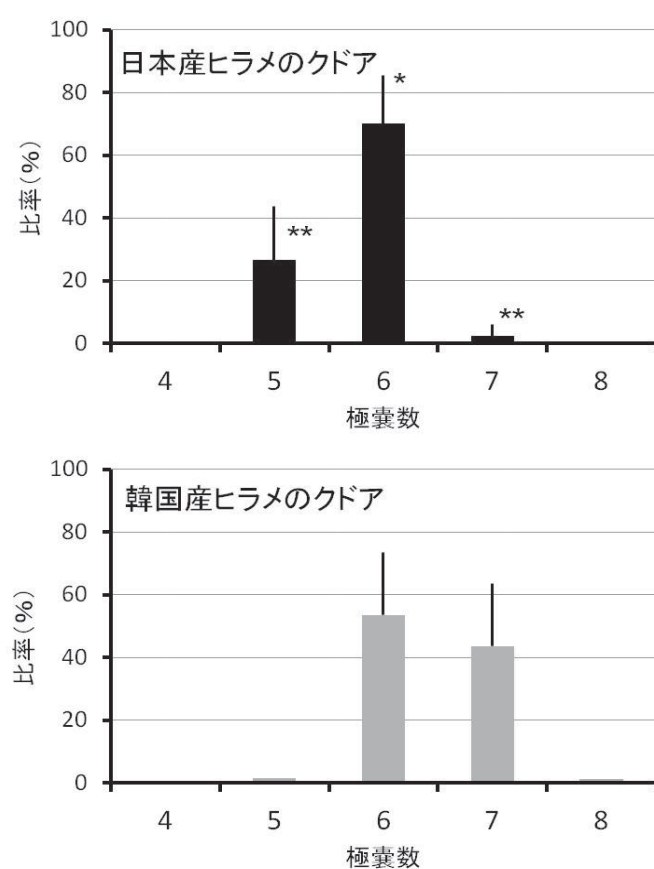


図 4-3 日本産ヒラメと韓国産ヒラメ由来のクドア孢子における極囊数の出現割合(孢子 200 個のうちの、各極囊数を持つ孢子の割合。縦棒は標準偏差, *は $p<0.05$, **は $p<0.01$ で対応する極囊数の韓国産クドアと有意差が有ることを示す。)(平成 24 年度)

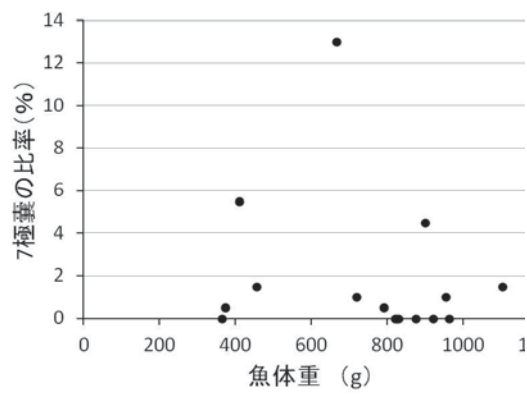


図 4-4 7 極囊の比率と魚体重との関係
(平成 25 年度)

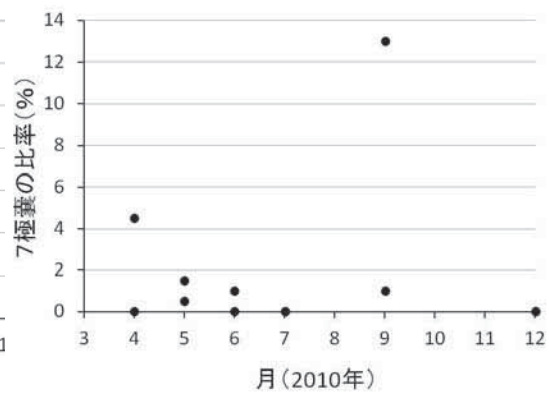


図 4-5 7 極囊の比率と採集月との関係
(平成 25 年度)

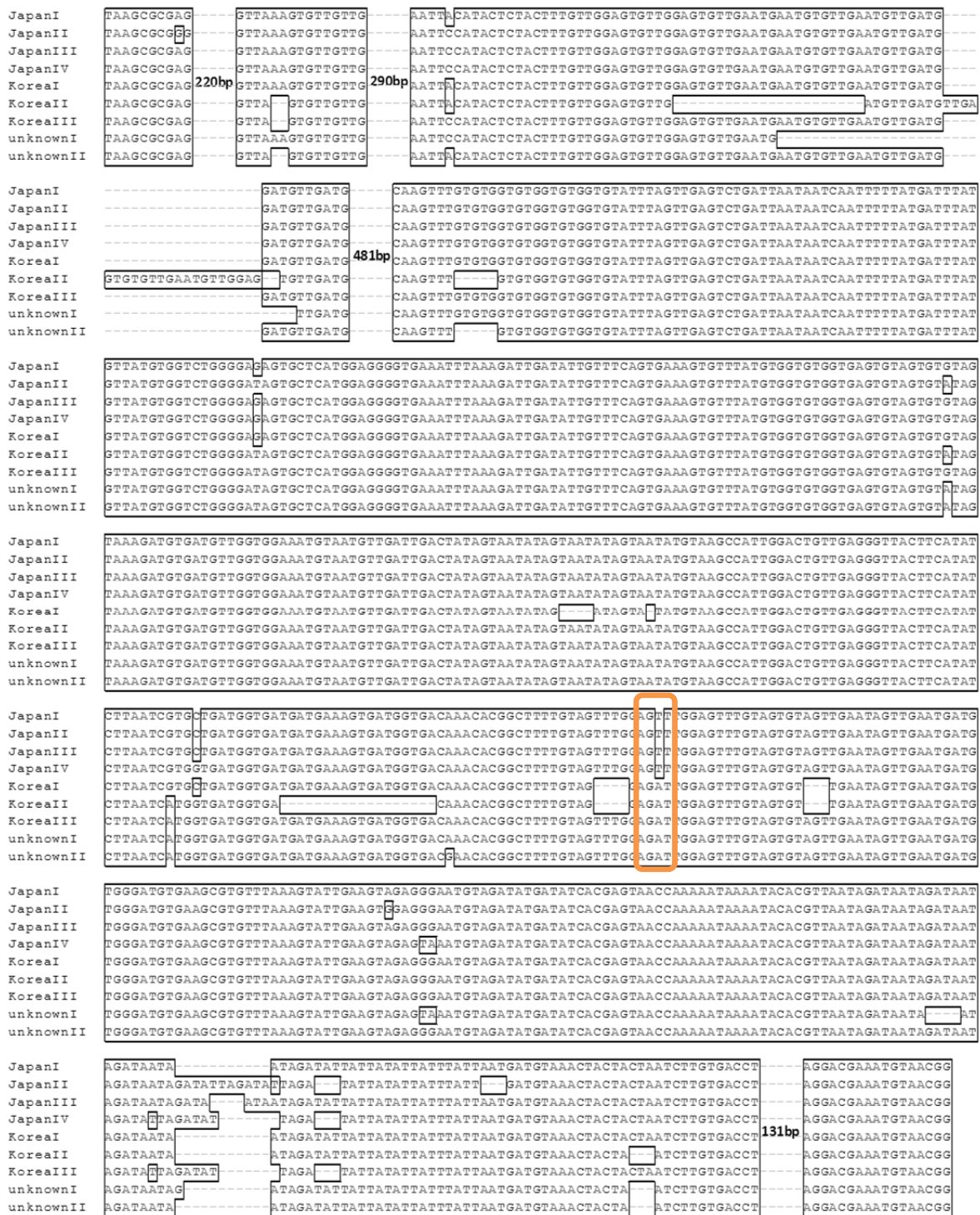


図 4-6 国内由来 4 株、韓国由来 3 株および食中毒残品由来 2 株のクド
アの ITS 領域（約 1800 塩基対、一部省略）の比較（国内株に特異的な
配列をオレンジ枠で示す）（平成 26 年度）

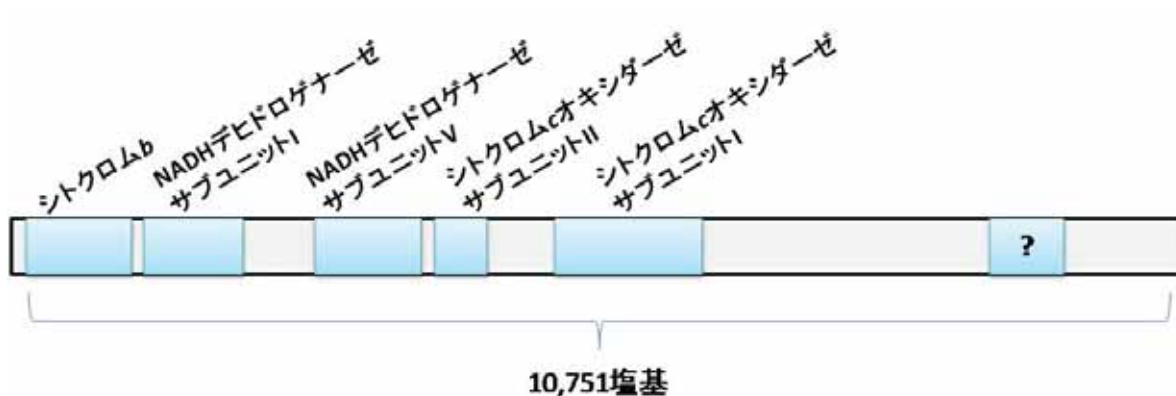


図 4-7 クドアのミトコンドリア DNA の構成遺伝子(平成 26 年度)

Japan	1	AGTT	CAGCTAAGATGCTTCAGCTGGCTAAGATGAGCATGAAAGCTATCAGGCT
Korea_I	1	AGCT	CAGCTAAGATGCTTCAGCTGGCTAAGATGAGCAGGAAAGCTGTAGGCT
Korea_II	1	AGTT	CAGCTAAGATGCTTCAGCTGGCTAAGATGAGCATGAAAGCTATCAGACT
Unknown_I	1	AGCT	CAGCTAAGATGCTTCAGCTGGCTAAGATGAGCAGGAAAGCTGTAGGCT
Unknown_II	1	AGTT	CAGCTAAGATGCTTCAGCTGGCTAAGATGAGCATGAAAGCTATCAGACT

図 4-8 国内由来 1 株、韓国由来 2 株および食中毒残品由来 2 株のクドアのミトコンドリア DNA の株間での比較 (平成 26 年度))

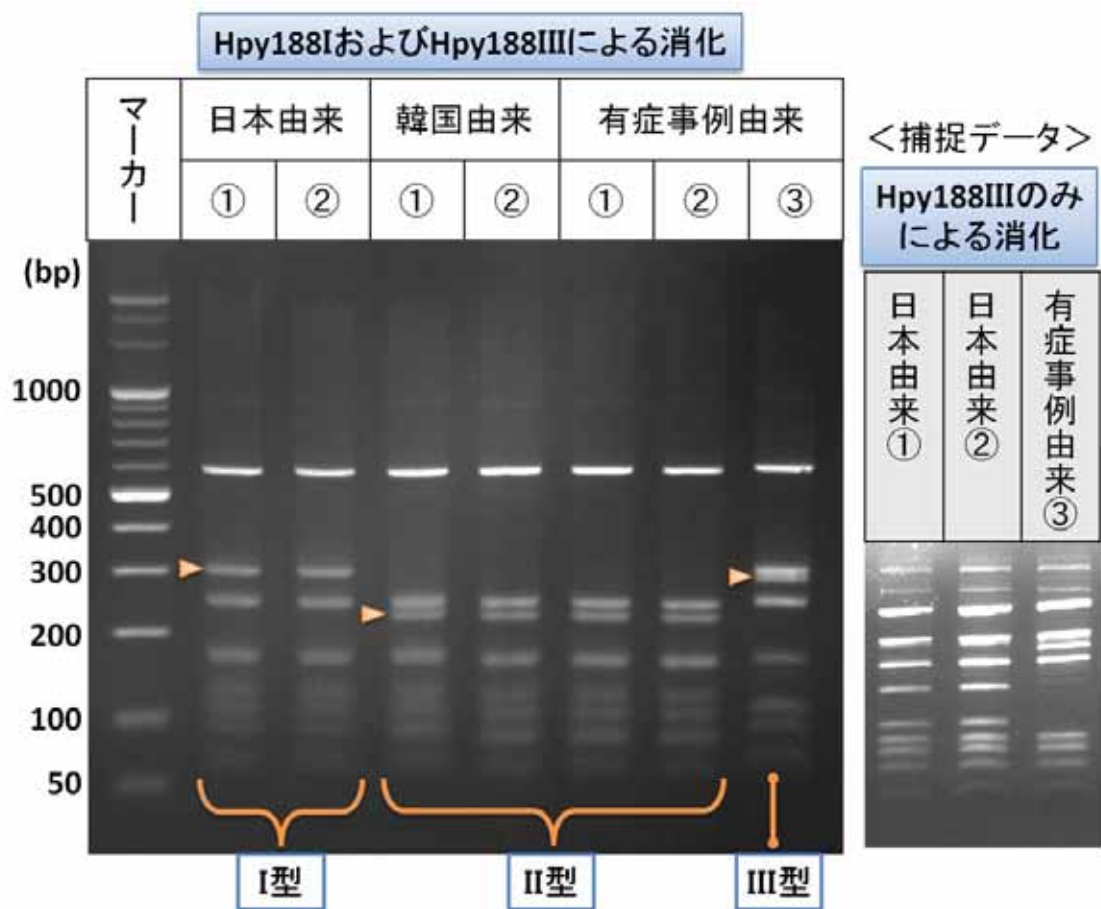


図 4-9 PCR-RFLP 法によるクドアの遺伝子多型解析(平成 26 年度)

*各遺伝子型に特徴的なバンドを矢頭で示す。

右に I 型と III 型の区別を明確にするため捕捉データを示す。

参考文献

- Grabner D.S., H.Yokoyama, S. Shirakashi and R. Kinami (2012): Diagnostic PCR assays to detect and differentiate *Kudoa septempunctata*, *K. thyrsites* and *K. lateolabracis* (Myxozoa, Multivalvulida) in muscle tissue of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 338-341, 36-40.
- Harada T., T. Kawai, H. Sato, H. Yokoyama and Y. Kumeda (2012): Development of a quantitative PCR assay for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Int. J. Food Microbiol.* 156, 161-167.
- Ohnishi, T., Kikuchi, Y., Furusawa, H., Kamata, Y. and Y. Sugita-Konishi (2013): *Kudoa septempunctata* invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 137-142.

- Suzuki, J., R. Murata, H. Yokoyama, K. Sadamasu and A. Kai (2015) :Detection rate of diarrhoea-causing *Kudoa hexapunctata* in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* from Japanese waters. *Int. J. Food Microbiol.*, 194, 1–6.
- Yokoyama, H., J. Suzuki and S. Shirakashi (2014): *Kudoa hexapunctata* n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from the somatic muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* and re-description of *K. neothunni* in yellowfin tuna *T. albacares*. *Parasitol. Int.* 63, 571–579.

1. 成果の内容

1) ヒラメの種苗生産・養殖施設等でのクドア感染防除策の開発

陸上水槽では用水によりヒラメ種苗が感染することから、用水を砂ろ過と紫外線照射（46mJ/cm²）で処理するクドア感染防除法を確立した。さらに事業レベルで、クドア感染の無いヒラメ種苗の生産に成功し、用水処理による対策の実用性が証明された。クドアは夏季に高率に感染することから、特にこの時期は用水の管理に十分注意する必要がある。当歳魚及び1歳魚でも、本寄生虫に感染しうることから、感染のおそれのある海域の陸上養殖施設においても用水処理が必要であることが分かった。ただし、稚魚に比べると当歳魚及び1歳魚は筋肉中の孢子密度が低い傾向が認められており、当歳魚及び1歳魚で感染した個体が食中毒の起こす孢子密度まで到達するか否かについては更なる検討が必要である。

2) 感染したヒラメ排除のための効率的な検査法等の開発

ヒラメ稚魚での感染後の本虫の魚体内動態を経時的に調査することにより、感染2週目以降では心臓、筋肉及び血液においても検査できることを確認し、これらの部位がヒラメ稚魚、即ち養殖場に導入する前の種苗の検査部位に適していることを明らかにした。養殖期間中あるいは出荷時にヒラメを殺さず検査する方法として、注射針(14G)を用い魚体から筋肉を採材し、ウェットマウント法により検鏡検査する方法を開発した。本検査は注射針で微量の筋肉を採取するため、本操作で得られるクドア孢子数にバラツキが大きくなるが、2か所から採材することにより 1.0×10^6 個/g 以上の孢子を有する個体であれば問題なく検出できることを確認した。

3) 商品価値を低下させずにクドアを冷蔵等により失活させる方法の開発

簡易に孢子の失活の有無を確認する HO&PI による蛍光色素染色法を開発した。本法を用いて、80℃・10 秒以上の加熱、25%以上のエタノール、10 µl/ml のリモネン処理、-20℃・4 時間以上、塩分濃度が 0%、16%の条件下で精製クドア孢子が失活することを明らかにした。また、商品価値を低下させずにクドアを失活させる方法については、急速凍結し、貯蔵・解凍の条件を検討することで、消費者から歯ごたえの点で鮮魚と識別されるものの、他の調査項目である色や味などでは差がなく、厳密に鮮魚等と比較されない局面ならば、商品として受容される可能性が高い、処理方法を開発した。

4) ヒラメ以外の魚種におけるクドアの感染状況調査

日本周辺で漁獲される当歳及びそれ以上の天然クロマグロにクドア・ヘキサブンクタータが感染していることを明らかにした。孢子数は何れも 10^5 個/g 以下であった。天然ヒラメのクドア・セプテンブンクタータ感染状況の把握では、一部には出荷サイズと

しては小型ではあったが孢子数が 1.0×10^6 個/g 以上を超えた個体が確認された。感染海域の養殖マダイ及びその周辺の海域で養殖されたマダイ、ブリ、スズキ、トラフグ、カンパチではクドア・セブテンプンクタータの感染は認められなかった。マダイ等の他魚種では、本クドアは感染しない可能性が示唆され、感染海域においては、代替魚種としてヒラメ以外のこれらの魚種を養殖することで産業被害を軽減し得ることが示唆された。クドアの韓国株と国内株の形態及び遺伝子配列を比較したところ、極囊数及びミトコンドリア DNA に株特徴的な変異領域が認められた。

2. 成果の活用

得られた成果は、水産庁より発出されている養殖ヒラメのクドア食中毒防止対策に追加し、ヒラメ養殖業者や検査機関への普及を図る予定である。

IV. 論文, 特許等の実績及び推進会議の開催状況等

学会発表

1. 「食中毒の原因となるヒラメ筋肉寄生粘液胞子虫*Kudoa septempunctata*胞子の活性評価法の開発」, 横山 博, 船隈奈緒子, 小林彰子, 平成25年日本魚病学会秋季大会講演要旨集, (2013) 17.
2. 「粘液胞子虫*Kudoa septempunctata*のEST解析」, 米加田 徹, 佐藤 淳, 森 広一郎, 平成25年日本魚病学会秋季大会講演要旨集, (2013) 17.
3. 「日本産と韓国産ヒラメ由来の*Kudoa septempunctata*胞子の形態学的・遺伝学的比較」, 横山 博, 米加田 徹, 佐藤 淳, 釜石 隆, 森 広一郎, 平成25年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, (2013) 47.
4. 「魚類のクドア感染症について」横山 博, 平成25年度日本魚病学会春季大会講演要旨集, (2013) 16.
5. 「ヒラメの筋肉寄生粘液胞子虫*Kudoa septempunctata*の感染動態と感染時期の推定」, 横山 博, 呂 明媚, 良永知義, 森 広一郎, 佐藤 純, 米加田 徹, 平成26年度日本魚病学会春季大会講演要旨集, (2014) 32.
6. 「ヒラメ筋肉に寄生する粘液胞子虫*Kudoa septempunctata*の感染防除法に関する検討」, 西岡豊弘, 佐藤 純, 米加田 徹, 森 広一郎, 太田健吾, 森岡泰三, 呂 明媚, 横山 博, 良永知義, 平成26年度日本魚病学会秋季大会講演要旨集, (2014) 12.

雑誌

「ヒラメのクドア症感染防止技術の開発」森 広一郎, アクアネット, 15 巻, (2012) 34-35.

特許

なし

推進会議

1. 平成 25 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業「寄生虫(クドア・セブテンpunkター)に対するリスク管理に必要な技術開発」研究推進設計会議, 平成 24 年 6 月 20 日, 農林水産省.
2. 平成 24 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業「寄生虫(クドア・セブテンpunkター)に対するリスク管理に必要な技術開発」研究推進報告会議, 平成 25 年 2 月 7 日, 農林水産省.

3. 平成 25 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業「寄生虫(クドア・セブテンブクター)に対するリスク管理に必要な技術開発」研究推進設計会議, 平成 25 年 6 月 11 日, 農林水産省.
4. 平成 25 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業「寄生虫(クドア・セブテンブクター)に対するリスク管理に必要な技術開発」研究推進報告会議, 平成 26 年 2 月 6 日, 農林水産省.
5. 平成 26 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業「寄生虫(クドア・セブテンブクター)に対するリスク管理に必要な技術開発」研究推進設計会議, 平成 26 年 6 月 13 日, 農林水産省.
6. 平成 26 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業「寄生虫(クドア・セブテンブクター)に対するリスク管理に必要な技術開発」研究推進報告会議, 平成 27 年 2 月 5 日, 農林水産省.
7. クドアのリスク管理技術開発共同研究機関 第 1 回運営委員会(メール会議), 横山 博, 福田 穰, 山下亜純, 森 広一郎, 西岡豊弘, 平成 26 年 6 月 14 日.