

課題番号2

環境中からの魚への 粘液胞子虫類の感染リスク調査

微生物部

○福留智子 引地恵一 津路優葉
三浦美穂 吉野修司

1

粘液胞子虫類とは

- クドア属
 - ・ *Kudoa septempunctata* (ヒラメ)
 - ・ *K. hexapunctata*
 - ・ *K. lateolabracis*
 - ・ *K. iwatai*
- ユニカプスラ属
 - ・ *Unicapsula seriolae* (カンパチ)

喫食後、数時間で一過性の下痢、嘔吐をおこす

2

目的

粘液胞子虫類はどこからくるのか？

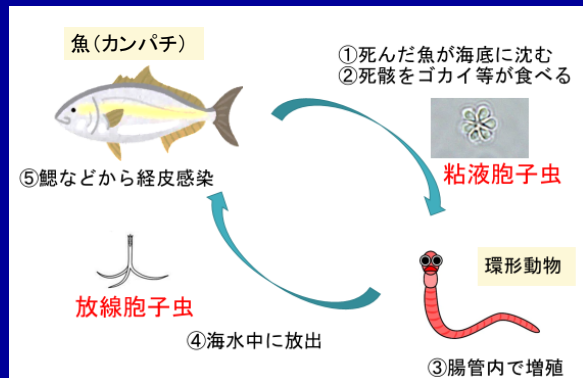
中国から輸入される際に種苗に寄生している可能性



環境中における粘液胞子虫類の感染リスクについては不明な点が多い

3

粘液胞子虫類の生活環について



4

研究計画

【計画】

- ・海水からの粘液胞子虫類の検出法の確立
- ・交互宿主となる環形動物の調査

【方法】

キットを用いたDNA抽出後リアルタイムPCR

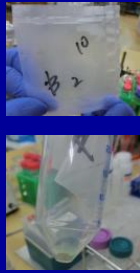
5

海水からの粘液胞子虫類の検査法の確立について

6

海水からの微胞子虫（べこ病）の検出

海水1Lのフィルター濾過
↓
フィルターを袋に入れDNA抽出試薬を添加
(Buffer100 μ l + 蛋白分解酵素20 μ l)
↓
56°Cのインキュベーター内でストマッカー
にかけDNA抽出
↓
50mL遠沈管に捕集
↓
抽出キットに従いDNA抽出



宮崎県水産試験場：海水からのべこ病の検出

7

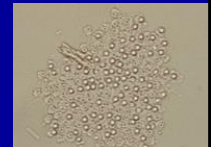
粘液胞子虫類の添加回収試験

海水に *U. seriola* の胞子を添加し、遺伝子
検査を実施

↓
得られた遺伝子量が低く、*U. seriola* に合った
方法が必要

【考えられる要因】
抽出試薬が少なく接着性の強い
U. seriola をフィルター上で十分
にDNA抽出できていない可能性

U. seriola × 400



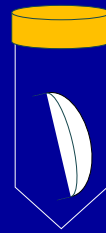
8

海水からの粘液胞子虫類の検出

海水1Lのフィルター濾過
↓
フィルター洗浄液をマイクロチューブに捕集し
DNA抽出試薬を添加
(Buffer100 μ l + 蛋白分解酵素20 μ l)
↓
56°Cの恒温水槽で1晩
↓
50mL遠沈管に捕集
↓
抽出キットに従いDNA抽出

9

検出方法の検討



洗浄方法
ボルテックス法
超音波洗浄法

洗浄液の検討
PBSに添加する
界面活性剤 (Tween80) の濃度
: 0.1% 1.0%

10

検出方法の検討

海水200mLにユニカプスラの胞子1mlを添加し、1 μ mの
フィルターで捕集



洗浄液を入れ
ボルテックス



洗浄液を入れ
超音波洗浄へ

洗浄液をファルコン
チューブに回収

5000rpm、10分間遠心

11

検出方法の検討

上清を捨て洗浄液で再浮遊したものを
マイクロチューブに捕集

↓
5,000rpm、10分間遠心

↓
上清を吸引し、沈渣をDNA抽出[※]

※ QIAGEN QIAmp DNA Mini Kit 使用

12

回収率結果

①ボルテックス洗浄

時間	Tween80 添加 PBS	
	濃度0.1%	濃度 1.0%
1分	24.3%	73.9%
2分	23.1%	86.1%

②超音波洗浄

時間	Tween80 添加 PBS	
	濃度0.1%	濃度1.0%
5分	1.8%	10.6%
10分	2.4%	11.8%

13

考察と今後

- ・界面活性剤の濃度を1.0%にすることで回収率を上げることができたが、Tween80のみの結果であることから他の界面活性剤との比較を行う
- ・すでに微孢子虫類調査のため海水からの遺伝子検査を行っている水産試験場と情報を共有していく

14

環形動物における粘液孢子虫類調査

15

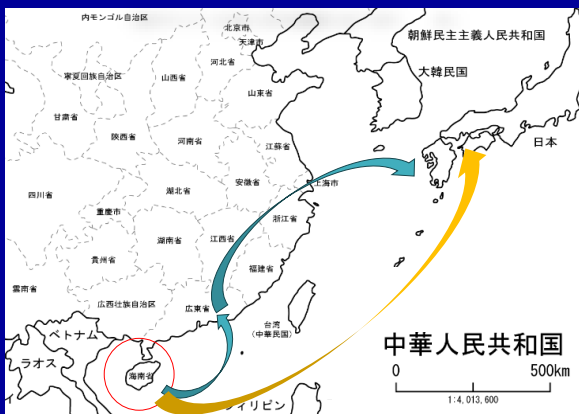
クダアにおける種苗生産場の地先周辺で採取された無脊椎動物のPCR結果例

分類	平成24年	平成25年	平成26年
多毛類			
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	-	-	-
サンバゴカイ科	-	-	-
シロガネゴカイ科	-	-	-
タマシキゴカイ科	-	-	-
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	-	-	-

寄生虫(クダア・セブテンプランクタ)に対するリスク管理に必要な技術開発(水産省・水産総合研究センター)

16

カンパチの輸入ルート



17

環形動物

カンパチの生簀付近での採取は難しい



釣り具店で販売されている活き餌約10~20gを購入



アオゴカイ



イシイソゴカイ



チロリ

18

対象



多毛類	産地	件数
アオゴカイ	不明	11
	中国	27
イシゴカイ	国産	24
チロリ	中国	12
イワゴカイ	中国	10
合計		84

方法



- ① 胴部(腸管)約3cmを採取
- ② マイクロチューブ内でホモジナイザーペッスルを用いて磨り潰す
- ③ 25mg採取し、QIAGENのDNeasy Blood & Tissue Kitを用いてDNA抽出
- ④ PCR法を用いて遺伝子検索

19

20

遺伝子の増幅阻害について

ゴカイの体液や血液

→ 遺伝子増幅を阻害しないか確認

(方法)

ゴカイに直接粘液胞子虫の胞子を添加 (1.8×10^4 個/g)

↓
マイクロチューブ内で混和しDNA抽出

(QIAGENのDNeasy Blood & Tissue Kit)

↓
阻害なく検出可能なことを確認

(260個/g程度の胞子があれば検出可能)

結果

多毛類	産地	件数	結果
アオゴカイ	不明	11	陰性
	中国	27	
イシゴカイ	国産	24	陰性
チロリ	中国	12	陰性
イワゴカイ	中国	10	陰性
合計		84	

21

22

考察と今後

- ・ 今回は中国の輸入元を中心にさまざまな環形動物(生き餌)の調査を行ったが、カンパチ種苗の養殖地域周辺から輸入されている環形動物の調査が必要
- ・ 現在、水槽でアオゴカイを飼育しながらカンパチ刺身を餌としてアオゴカイから遺伝子検査が可能か検証し、交互宿主について検討

23