

流入河川の影響に着目した養殖カキのノロウイルス汚染解析

山形大学	正会員	○渡部	徹
山形大学	正会員	伊藤	紘晃
東北大学大学院	正会員	真砂	佳史
宮城県保健環境センター	正会員	植木	洋
山形大学	正会員	梶原	晶彦

1. 目的

ノロウイルス(*Norovirus*; NoV)を原因とする食中毒は、我が国を含め世界各地で問題となっている。NoVに感染する経路は様々であるが、中でもカキは、その体内にNoVを蓄積する機能を有しており、食中毒の原因がカキの喫食にあった事例も少なからず報告されている。これまでに、養殖カキにNoVが蓄積していく経路として、感染者の体内で増殖したNoVが下水道や河川を通過して沿岸域のカキに蓄積している可能性が提唱されてきている¹⁾。しかしながら、流域内におけるNoVの流行状況とカキに含まれるNoVとの定量的な関係については未だ明らかにされておらず、カキへのNoVの蓄積に関する諸問題に未然に対応する有効な手段は講じられていない。

本研究においては、沿岸域の4地点におけるカキを対象にNoVの存在量をモニタリングし、陸域から沿岸域へのNoVの流入と、カキへのNoVの蓄積との関係を考察した。

2. 実験方法

2.1 試料の採取

宮城県 A 湾の河口付近(St. 1)及びカキ養殖水域 3 地点(St. 2, 3, 4)においてカキをサンプリングした。A 湾に流れ込む主要河川には、河口から 1.8 km 上流に下水処理場が存在する。St. 1-4の河口からの距離は、それぞれ、0.4 km, 2.0 km, 2.6 km, 3.2 km であった。カキは St. 4 において 2012 年 6 月初旬に養殖を始め、成長したカキを同年 10 月中旬に一旦回収し、ネットに入れて、各地点に 3 段階の深さ(上・中・下層)に分けて設置した。以降、毎月中旬に各条件から 3 個ずつカキを回収し、NoV GI 型と GII 型の定量を試みた。

カキ採取時には、pH、電気伝導度(EC)、水温、practical salinity、溶存酸素濃度(DO)、濁度、DOC、クロロフィル α (Chl. α)、大腸菌数および大腸菌群数を測定した。また、20 L の水をポリプロピレン製のバッグに採水し、Haramoto ら²⁾の手法に従い、陰電荷膜によるNoV GIおよびGIIの濃縮と定量を試みた。

ここで、陰電荷膜にウイルスをトラップするためのカチオンには、25 mM の塩化マグネシウムを用いた。以上の水質及び水中ウイルスの測定は、河口から 0.7 km 上流の河川(St. 5)においても行った。

2.2 カキに含まれるウイルスの抽出

カキからのウイルスの抽出は Ueki ら¹⁾の手法を参考にした。まず、眼科用剪刀(TGK)を用い、カキから中腸腺を摘出し、3.2 mm ステンレスビーズ(TOMY)を 2 個、内部標準としてのマウスノロウイルス(murine norovirus; MNV)を $10^5 - 10^7$ copy, 200 mM クエン酸緩衝液(pH 2.5)を 1 mL 加え、Micro Smash (TOMY)による 4,200 rpm 1 分間の細胞破碎を行った。続いて、 $9,100 \times g$ 12 分の遠心分離を行い、回収した上清を 55 μ L の 10 M NaOH により中和し、これをウイルス回収液として得た。

2.3 ウイルスの定量

得られたウイルス回収液から 140 μ L を分取し、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてウイルス RNA (約 60 μ L)を抽出した。得られたウイルス RNA に対して、iScript cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD)を用いて逆転写を行った。逆転写における反応溶液の組成と反応条件は製品の推奨プロトコールに従い、20 μ L テンプレート RNA から 40 μ L の cDNA を得た。最後に、リアルタイム PCR によって NoVGI, GII 及び MNV の定量を行った。プライマーと TaqMan プロブは、NoV GI と GII については Kageyama ら³⁾の改良法に従い⁴⁾、MNV については Hata ら⁵⁾の手法に従った。PCR マスターミックスには SsoFast Probes Supermix(BIO-RAD) 10 μ L を用い、テンプレート cDNA は 5 μ L とし、20 μ L の反応溶液をリアルタイム PCR に供した。温度条件は、いずれの場合も 95°C 30 秒の後 95°C 15 秒と 56°C 60 秒を 45 サイクルとした。

3. 結果と考察

表 1 に各地点において採取されたカキからの NoV の定量結果を示す。11 月と 12 月に採取したいずれの試料においても、NoV は検出されなかった。一方、1

キーワード ノロウイルス、牡蠣、遺伝子定量

連絡先 〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23 TEL 0235-28-2907

表 1. カキからの NoV 定量結果 (log copy)

St.番号	St. 1			St. 2			St. 3			St. 4		
	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下
深さ												
NoV GI	11月	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12月	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1月	-	-	-	-	-	3.6	-	-	-	-	-
NoV GII	11月	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12月	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1月	-	-	4.4	-	-	4.2	-	4.5	4.7	-	-

—は本研究で用いた定量検出法(検出限界 3.2 log copy)において陰性であったことを表す。定量値は、陽性であったサンプル(各条件3検体中1検体)の結果を表す。

月の試料においては、St. 3の上層の1検体から NoV GI が、St. 4の上層と中層、St. 3の中層および St. 2の上層からそれぞれ1検体ずつ NoV GII が検出された。本研究で採用した手法の検出下限値は 2,000 copy 程度であり、A 湾流域においては、12月の時点では、少なくとも 2,000 copy を超える量の NoV はカキに蓄積していなかったことが示された。また、調査対象流域内においては、11月初旬から NoV 感染者の発生が報告されている⁹⁾。カキから検出された NoV は GI 型よりも GII 型の方が多かったが、感染者に関しても GI 型よりも GII 型への感染の割合の方が高かった(図 1)。カキに対するノロウイルスの汚染源が陸域で発生した感染者に由来していた可能性も考えられるが、今後、調査の継続による量的データの蓄積や、相同解析による質的データの比較を通した解析によって、汚染源に関する知見が得られると期待される。

各地点における水質の測定結果を表 2 に示す。また、水中に存在する NoV の定量を試みたが、本研究で用いた手法によって検出されるような高濃度の NoV の存在は認められなかった(すなわち < 500 copy/L)。A 湾においては、河口付近である St. 1 においても塩分濃度が高く、海水の割合が高いことが示された。一方で、大腸菌及び大腸菌群数には、河口付近の St.1 から沖側の St. 4 に向かうにつれて減少する傾向があり、湾へ流入してくる河川水の影響の違

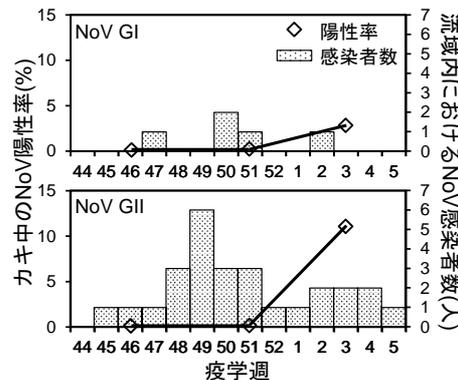


図 1. カキ中の NoV 陽性率と流行曲線の関係

いが認められた。本研究においては、St. 1 からは NoV は検出されておらず、カキに蓄積する NoV がシーズン内に湾に流入してくる河川水に由来している場合には、カキへのノロウイルス汚染について解析する際に地点における水の滞留時間等を考慮する必要があると考えられる。

4. おわりに

本研究においては、2012年シーズンの1月までのカキへの NoV の蓄積に関する調査結果を報告した。NoV は11月と12月には検出されず、1月に全36検体中5検体のカキから検出された。カキの採取は2月以降も継続しており、今後得られる NoV の定量結果から、環境中におけるカキへの NoV の汚染に関する定量的な知見が新たに得られることが期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり力添えをいただいた山形大学農学部の星健太氏に謝意を表す。本研究は、JST 戦略的創造研究推進事業(CREST)研究課題「迅速・高精度・網羅的な病原微生物検出による水監視システムの開発」および JSPS 科学研究費助成事業研究課題「水環境におけるヒト NoV 未知動態の解明」の一環で行われた。

参考文献

- 1) Ueki et al. (2005) *Water Res.*, **39**, 4271.
- 2) Haramoto et al. (2004) *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 2154.
- 3) Kageyama et al. (2003) *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1548.
- 4) 西尾治, 未発表.
- 5) Hata et al. (2011) *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 4336.
- 6) 押谷ら, 未発表.

表 2. 水質測定結果

St.番号	St. 1			St. 2			St. 3			St. 4			St. 5 (河川)		
	11月	12月	1月	11月	12月	1月									
水温 (°C)	14.3	6.1	1.2	13.5	6.2	1.5	13.8	6.2	1.8	13.5	5.7	2.6	14.1	6.4	1.9
pH	8.2	8.8	8.5	8.3	8.8	8.5	8.3	8.8	8.5	8.4	8.7	8.6	7.5	8.4	8.4
EC (S/m)	4.3	4.6	4.9	4.4	4.7	4.8	4.4	4.6	4.9	4.3	4.5	4.8	1.8	2.2	3.0
Practical salinity	26.1	27.5	28.9	27.1	27.6	28.6	27.2	27.2	29.0	26.7	26.7	28.9	10.0	12.2	17.2
DO (mg/L)	7.3	10.1	11.9	7.3	10.2	10.3	7.6	10.3	11.6	7.7	10.3	11.2	7.7	9.3	12.3
濁度 (NTU)	8	8	9	6	5	7	3	6	13	5	6	5	13	10	6
DOC (mg/L)	3.9	2.8	3.1	3.4	3.4	3.7	3.0	3.2	3.9	1.9	3.3	5.0	4.7	1.5	2.1
Chl. α (µg/L)	1.8	8.2	6.0	1.1	7.3	5.5	1.0	6.8	5.5	1.1	8.5	4.8	1.6	2.0	3.1
大腸菌数 (CFU/100 mL)	20	17	7	3	0	0	30	0	0	6	0	0	270	40	43
大腸菌群数(CFU/100 mL)	860	950	70	67	30	0	93	93	7	400	16	0	18000	2500	1100