

## 養殖牡蠣ノロウイルス汚染指標としての PMMoV とアイチウイルスの利用可能性

山形大学農学部	学生員○伊藤絵里香
熊本大学大学院自然科学研究科	正会員 伊藤紘晃
山形大学農学部	正会員 渡部徹
山形大学農学部	正会員 Pu Jian
岩手大学大学院連合農学研究科	正会員 Nguyen T. Gia

### 1. はじめに

ノロウイルスは、2014年度の食中毒事件病因物質のうち約54%を占めており、またそのうち約8.5%が牡蠣によって引き起こされている(厚生労働省, 2014)。これは単一の食品の中では最も多く、食中毒防止のためにも、牡蠣中のノロウイルスへの対策を行うことは重要である。牡蠣の汚染経路として植木ら(2003)は、「感染者～下水～海域～牡蠣」という経路を示唆した。また有坂ら(2015)が東北地方のある湾で行った調査では、養殖牡蠣中のノロウイルス量が多い時期と、同湾の流域でノロウイルスによる感染性胃腸炎の患者が多い時期が重なっていた。しかし、感染性胃腸炎が流行し始める11月から12月にかけては、まだノロウイルスの蓄積が少なく、ウイルスが検出されない牡蠣も多かった。一方で、ノロウイルスと同じく糞便起源のトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)とアイチウイルス(AiV)は、感染症流行に関わらず下水中の濃度が高いことが知られている。本研究では、養殖牡蠣からPMMoVとAiVを検出し、牡蠣のノロウイルス汚染指標として利用することを検討した。

### 2. 方法

牡蠣養殖海域で浄化処理前の牡蠣を、2014年9月下旬より週に一度の頻度で、河口から3.2km離れた地点から9個ずつ採取した。滅菌した鋏を用いて牡蠣から中腸腺を摘出した。中腸腺からウイルス抽出液を作るまでの工程は伊藤ら(2013)に従い、アミラーゼ、リパーゼ、プロテナーゼKからなる酵素溶液1mLを加え、低pHのバッファを用いることで、ウイルス抽出効率の向上を図った。中腸腺3個より回収した抽出液を混合し、1つのサンプルとした。その後、NucliSENS miniMAG (bioMérieux)を用いてウイルスRNAを約50μL抽出した。RNA抽出の操作は付属のプロトコルに従った。

ウイルスRNAに対して、iScript Advanced cDNA Synthesis kit (BIO-RAD)を用いて逆転写を行った。反応溶液の組成及び反応条件は付属のプロトコルに従った。

逆転写されたcDNAを、SsoAdvanced Universal Probes Supermix (BIO-RAD)を用いてウイルスの定量を行った。プライマーとプローブは、AiVについては北島ら(2013)、PMMoVについてはRosarioら(2009)に従った。反応液の組成は付属のプロトコルに従った。反応条件は95°C30秒の後、AiVは95°C15秒・60°C30秒のサイクル、PMMoVは95°C15秒・53°C10秒・72°C20秒のサイクルの反復とし、40サイクルまでに定量シグナルが確認されたものを陽性と判定した。

### 3. 結果と考察

週別の陽性サンプル数と、陽性サンプル中での各ウイルス濃度の平均値を図1に示す。

PMMoVはすべての週で検出された。ウイルス濃度は2014年12月から2015年2月へかけて増えていく傾向がみられるが、増加前の時期でも $10^5$ copies/g-中腸線付近で推移し、2014年12月中旬からは $10^6$ copies/g-中腸線付近、2015年1月中旬以降はさらに増加した。2015年2月以降は再び $10^6$ copies/g-中腸線付近で推移し、7月下旬までその濃度を維持していた。

AiVはシーズンを通じて非検出が多く見られた。ピーク時のウイルス濃度は $10^2$ copies/g-中腸線から $10^4$ copies/g-中腸線で推移していた。3月以降は検出されない週もあり、5月以降は全く検出されなかった。

同じ牡蠣からのNoVGIIの検出結果と比較すると、PMMoV、AiVともにウイルス量の増加のタイミングが同じだった。しかし減少の時期に関しては、NoVGIIが1か月ほど遅れていた。NoVGIについては、増加、減少の時期とも大きなずれはなかった。

以上より、常時高い濃度で牡蠣から検出され、ノロウイルスと類似した濃度変化を示すPMMoVの方が、AiVよりも牡蠣の汚染指標としての妥当性が高いと判断した。

キーワード：ノロウイルス、牡蠣、トウガラシ微斑ウイルス

住所：山形県鶴岡市若葉町1-23、Tel:0235-28-2907 Email:to-ru@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

実際の指標としての活用法として、①PMMoVの濃度からNoVGIIの濃度を推定する方法、②PMMoVの濃度からノロウイルスの陽性率を推定する方法を提案する。それぞれの方法の有効性を、2014年9月から2015年7月のデータを用いて検証した。

方法①では、PMMoVの濃度とNoVGIIの濃度の相関を調べた。その相関係数は  $r=0.62$

( $p=0.0005$ ) であり、ノロウイルスの濃度とPMMoVの濃度には正の相関があることが確認された。しかしその相関は強くなく、PMMoVの濃度からNoVGII濃度を推定することはやや難しいようである。

方法②では、PMMoVの濃度ごとにサンプルを分け、それらのNoVGII陽性率を調べた。その結果を表1に示す。PMMoV濃度が  $10^5$ copies/g-中腸線を超えると陽性率は高くなり、 $10^7$ copies/g-中腸線以上では89%となっている。図1に示すように、PMMoVはNoVGIIよりも濃度が高いため、今回用いた方法よりも簡単な検査で検出できるかもしれない。それが可能であれば、ノロウイルスの検査を行うよりも簡単に、汚染牡蠣の出荷制限などの対策をとることができる。一方、PMMoVが  $10^5$ copies/g-中腸線未満の時は、NoVGIIの陽性率は20%と低い。この時には、低濃度のノロウイルスを見逃さないために、引き続き厳密な検査が求められる。

4. まとめ

牡蠣中のPMMoVは、ノロウイルスと比較し検出頻度や濃度が高く、牡蠣のノロウイルス汚染の指標として利用できる可能性が示された。また、PMMoVの濃度からNoVGIIの陽性率を推定できれば、実際の現場におけるウイルス検査を省力化でき、その分より多くの牡蠣を検査することで、安全安心な牡蠣を出荷できる。この推定方法の妥当性については、2015~2016シーズンの検出結果をもとに、さらに検討していきたい。

謝辞：本研究は、JST-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」の一環で行われた。

参考文献

厚生労働省・食中毒統計 <http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/112-1.html>  
 植木ら：環境工学研究論文集, 40, 607-616, 2003.  
 有坂知朗：平成26年度土木学会東北支部技術研究発表会、2015.  
 Kitajima, et al.: Applied and Environmental Microbiology 79 (13), 3952-3958, 2013.  
 Rosario, et al.: Applied and Environmental Microbiology 75 (22), 7261-7267, 2009.  
 伊藤ら：土木学会論文集 G (環境) Vol. 69, No. 7 p. III\_657-III\_665, 2013.

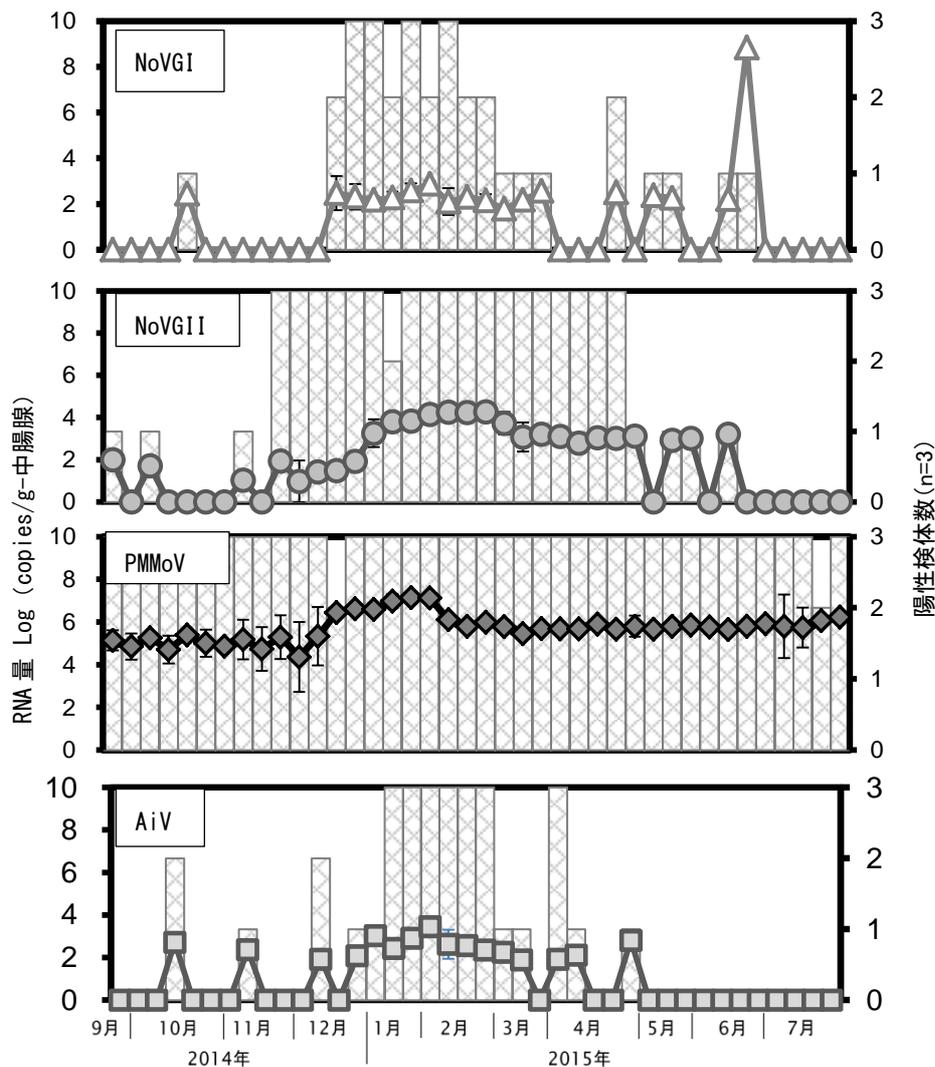


図1. 陽性サンプル数 (n=3, 棒グラフ) と陽性サンプル中のウイルス濃度平均 (折れ線グラフ, 縦軸の0は非検出を示す)

表1. PMMoV濃度とNoVGII陽性率の変化

	PMMoV濃度 (copies/g-中腸線)			
	$10^4 \sim 10^5$	$10^5 \sim 10^6$	$10^6 \sim 10^7$	$10^7 \sim 10^8$
全ての検体数	15	75	21	9
NoVGII陽性検体数	3	58	15	8
陽性率(%)	20.0	77.3	71.4	88.9