

養殖カキに対するノロウイルス汚染の時空間的変動

山形大学	学生会員	○星 健太
山形大学	正会員	伊藤紘晃
山形大学	正会員	渡部 徹
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	非会員	植木 洋
山形大学	正会員	梶原晶彦

1. はじめに

ノロウイルス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。ノロウイルスに感染する経路は様々であるが、中でもカキは、その体内にノロウイルス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、養殖カキにノロウイルスが蓄積していく経路として、罹患者の体内で増殖したノロウイルス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、流域内におけるノロウイルスの流行状況とカキに含まれるノロウイルス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、カキへのノロウイルス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ノロウイルスの存在量をモニタリングし、陸域から沿岸域へのノロウイルスの流入と、カキへのノロウイルス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設置した。以降、毎月中旬に各地点から9個ずつカキを回収し、ノロウイルスGIとGIIの定量を試みた。

カキ採取時には、pH、電気伝導度(EC)、水温、実用塩分、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、陰電荷膜によるノロウイルス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、5 mLの自立型チューブ(ザルスタット)に入れ、3.2 mmステンレスビーズ(TOMY)を2個加えた。ここで、内部標準としてマウスノロウイルスを $10^5 - 10^7$ copy加えた。続いて、ウイルスを溶出させるための溶液として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。破碎した細胞に対して9,100×g 12分の遠心分離を行い、回収した上清を55 μ Lの10 M NaCl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56 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は、5×iScript reaction mix 8 μ L, iScript reverse transcriptase 2 μ L, スクレアーゼフリー水 10 μ L, テンプレート RNA 20 μ Lとし、温度条件は25°C5分, 42°C30分, 85°C5分とした。最後に、リアルタイムPCRによってノロウイルスGI, GII及びマウスノロウイルスの定量を行った。リアルタイムPCRにおいては、SsoFast Probes Supermix(BIO-RAD) 10 μ L, テンプレート cDNA 5 μ L, 表1に示したプライマーとプローブ、及び、スクレアーゼフリー水からなる20 μ Lの反応溶液を用いた。温度条件は、いずれのウイルスの定量においても95°C30秒の酵素活性化の後、95°C15秒の変性と56°Cのアニーリングおよび伸長を45サイクルとした。

3. 結果と考察

表2に各地点において採取されたカキからのノロウイルスの定量結果を示す。11月と12月に採取したいずれの試料においても、ノロウイルスは検出されなかつ

キーワード：ノロウイルス、牡蠣、遺伝子定量

連絡先：山形県鶴岡市若葉町1-23, TEL : 0235-28-2907, e-mail : to-ru@tdsl.tr.yamagata-u.ac.jp

表 1. リアルタイム PCR のプライマーとプローブの組成

検出対象	プライマーおよびプローブ(10 μM)	液量(μL)	
NoV GI	センスプライマー	COG1F ³⁾	0.8
	アンチセンスプライマー	COG1R ³⁾	0.8
	TaqMan プローブ	RING1(a)-TP ³⁾	0.6
		RING1(b)-TP ³⁾	0.2
NoV GII	センスプライマー	COG2F ³⁾	0.8
	アンチセンスプライマー	COG2R ³⁾	0.8
		ALPF ⁴⁾	0.8
	TaqMan プローブ	RING2AL-TP ⁴⁾	0.4
MNV	センスプライマー	MKMNVF ⁵⁾	0.8
	アンチセンスプライマー	MKMNVR ⁵⁾	0.8
	TaqMan プローブ	MKMNV-TP ⁵⁾	0.6

NoV と MNV は、それぞれノロウイルスとマウスノロウイルスを表す。

た。本研究で用いた手法においては、ウイルス抽出溶液からリアルタイム PCR による定量までの操作の間に、試料は 200 倍程度希釈される。また、内部標準として添加したマウスノロウイルスの回収率は 10%程度であり、これらのことから、本研究で採用した手法の検出下限値は 2,000 copy と考えられる。A 湾流域においては、11 月初旬からノロウイルス感染者の発生が報告されており⁶⁾、感染者の体内で増殖し、排泄されたノロウイルスの一部が A 湾内に流入している可能性が考えられる。しかしながら、本研究の結果から、12 月の時点では、少なくとも 2,000 copy を超える量のノロウイルスはカキに蓄積していなかったことが示された。

各地点における水質の測定結果を表 3 に示す。また、水中に存在するノロウイルスの定量を試みたが、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ノロウイルスの存在は認められなかった(すなわち < 5 × 10² 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、pH や EC は海水の影響を強く受けていた。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

表 2. カキからのノロウイルス定量結果 (copy)

		St. 1	St. 2	St. 3	St. 4
NoV GI	11 月	< 2 × 10 ³	< 2 × 10 ³	< 2 × 10 ³	< 2 × 10 ³
	12 月	< 2 × 10 ³	< 2 × 10 ³	< 2 × 10 ³	< 2 × 10 ³
NoV GII	11 月	< 2 × 10 ³	< 2 × 10 ³	< 2 × 10 ³	< 2 × 10 ³
	12 月	< 2 × 10 ³	< 2 × 10 ³	< 2 × 10 ³	< 2 × 10 ³

する傾向があり、湾へ流入してくる河川水の影響の違いが認められた。このことから、河川水を起源とするノロウイルスのカキへの蓄積の度合いも異なってくると予想される。本調査は 1 月以降も継続する予定であり、今後、カキへのノロウイルスの蓄積に関して、上述したような傾向が見られるか検証できると考えられる。

4. おわりに

本研究においては、2012 年シーズンの 12 月までのカキへのノロウイルスの蓄積に関する調査結果を報告した。1 月以降も継続してノロウイルスの定量を行っていくことにより、環境中におけるカキへのノロウイルスの蓄積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

本研究は、科学技術振興機構 (JST) による戦略的創造研究推進事業 (CREST) で推進される研究課題「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」および日本学術振興会 (JSPS) による科学研究費助成事業の支援を受ける研究課題「水環境におけるヒトノロウイルス未知動態の解明」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 3. 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	11 月	12 月	11 月	12 月	11 月	12 月	11 月	12 月
測定月	11 月	12 月	11 月	12 月	11 月	12 月	11 月	12 月	11 月	12 月
水温 (°C)	14.3	6.1	13.5	6.2	13.8	6.2	13.5	5.7	14.1	6.4
pH	8.19	8.78	8.26	8.78	8.31	8.77	8.39	8.74	7.49	8.43
EC (S/m)	4.27	4.64	4.36	4.65	4.38	4.57	4.31	4.52	1.75	2.21
実用塩分	26.1	27.5	27.1	27.6	27.2	27.2	26.7	26.7	10.0	12.2
DO (mg/L)	7.3	10.1	7.3	10.2	7.6	10.3	7.7	10.3	7.7	9.3
濁度 (NTU)	7.7	7.7	6.3	4.9	3.4	5.6	5.2	6.4	13.1	9.6
DOC (mg/L)	3.9	2.8	3.4	3.4	3.0	3.2	1.9	3.3	4.7	1.5
Chl. α (μg/L)	1.8	8.2	1.1	7.3	1.0	-	1.1	-	1.6	2.0
大腸菌数 (CFU/100 mL)	2.0 × 10 ¹	1.7 × 10 ¹	0.3 × 10 ¹	非検出	0.3 × 10 ¹	非検出	0.6 × 10 ¹	非検出	2.7 × 10 ²	4.0 × 10 ¹
大腸菌群数 (CFU/100 mL)	8.6 × 10 ²	9.5 × 10 ²	6.7 × 10 ¹	3.0 × 10 ¹	9.3 × 10 ¹	9.3 × 10 ¹	4.0 × 10 ²	1.6 × 10 ¹	1.8 × 10 ⁴	2.5 × 10 ³