

養殖カキに蓄積したノロウイルスの網羅的な検出・同定

山形大学農学部 学生会員 ○熊谷卓也
山形大学農学部 正会員 伊藤紘晃, 渡部徹
東北大学未来科学技術共同研究センター 正会員 真砂佳史
宮城県保健環境センター 非会員 植木洋
山形大学農学部 非会員 梶原晶彦

1. はじめに

ノロウイルスは我が国における食中毒事例の原因としてもっとも一般的である。厚生労働省による平成24年度データ¹⁾によると、ノロウイルスによる食中毒は、全食中毒件数1,100件のうち416件を、総患者数26,699名のうち17,632名をそれぞれ占めていた。我々がノロウイルスに感染する主な経路の一つに、カキの喫食があげられる。しかしながら、カキに溜まったノロウイルスがどこから来たものなのか、いつごろから溜まり始めるかなどは完全には明らかになっていない。このことが解明されれば、カキをノロウイルスの汚染が少ない海域で育てることに役立ち、カキの喫食による食中毒の被害は大幅に減少すると考えられる。

植木ら²⁾はカキの汚染経路を調べるために、カキと食中毒患者のノロウイルスの遺伝子型を特定した。その結果、河川とそれが流入する海域の養殖カキのノロウイルスの遺伝子配列が100%一致していた。これらは流域に居住する感染者から分離されたノロウイルスの遺伝子型とも96%以上の相同性を示しており、同一のウイルスと考えられた。このことは、「感染者～河川～海域～カキ」というノロウイルスのカキへの汚染経路の重要な裏付けである。そのため、カキに蓄積されたノロウイルスの量は流域内での食中毒発生状況と関連している可能性が非常に高い。しかしこの実験は11月から1月の3か月間のみの実施である。またこの実験で使われていた遺伝子解析技術では、カキの中に 10^1 ～ 10^2 個のオーダーで存在するノロウイルスの数個程度の遺伝子型しか調べることができない。そのため、その年の流域内感染者以外のノロウイルスが関係している可能性については、はっきりとしたことが分かっていない。

以上の背景から、本研究においては最新の遺伝子解析技術であるパイロシーケンスを用いて、カキに蓄積したノロウイルス全ての遺伝子型を調べることで、カキと患者から分離されるノロウイルスの関連性をより詳細に明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2. 1 実験に用いたサンプル

2014年1月に、国内A湾において浄化处理前のカキ12個を採取した。検出を行う遺伝子型はGII型を対象とした。なお、2013年12月のサンプルからもGII型が検出されたが、PCR産物の収量が低く、パイロシーケンスで分析できる濃度が得られなかった。

2. 2 ウイルス抽出

カキからのウイルスの抽出はUeki³⁾ら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た。その後、3.2mmステンレスビーズ(TOMY)を2個と、アミラーゼ(6.3 mg/L)・リパーゼ(6.3 mg/L)・プロテナーゼK(0.25 g/L)混合酵素溶液を1 mL加え、Micro Smash (TOMY)を用いて中腸腺の細胞破碎(4,200 rpm 60秒)を行った。細胞破碎後のサンプルに対して37°C1時間のインキュベーションを行い、その後、さらに60°C15分間のインキュベーションを行った。続いて、スピンドウンの後に、400 mMクエン酸緩衝液(pH 2.5)を1 mL加え、9,100 × g 12分の遠心分離を行った。

2. 3 RT-PCR

遠心分離後の上清から300 μLを分取し、Mag Extractor-Viral RNA(TOYOBO)を用いてウイルスRNAを抽出した。得られたウイルスRNA溶液に対して、DNase I(New England)を用いてカキ由来のDNAの除去を行った。すなわち、RNA26 μLに対し、DNase Iと付属のバッファーをそれぞれ1 μLと3 μLとずつ添加し、37°C10分のインキュベーションを行い、続いて、155 mMのEDTAを1 μL添加し、75°C10分のインキュベーションを行った。その後、iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)を用いて逆転写を行った。反応溶液の組成は、5×iScript reaction mix 8 μL, iScript reverse transcriptase 2 μL, ヌクレアーゼフリー水 10 μL, テンプレートRNA 20 μLとし、温度条件は25°C5分、42°C30分、85°C5分とした。

逆転写によって得られたcDNAに対して、TAKARA

キーワード：カキ, ノロウイルス, パイロシーケンス, 食中毒

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

Ex Taq (TAKARA)を用いて GII 型を対象とした nested-PCR を行った。1st PCR の反応液の組成はヌクレアーゼフリー水 20.75 μ L, 10 \times Ex Taq Buffer 5.0 μ L, 2.5 mM dNTP 4.0 μ L, 25 mM MgCl₂ 10.0 μ L, Ex Taq 0.25 μ L, 10 μ M COG2F²⁾ 10 μ M G2SKR²⁾各 2.5 μ L, テンプレート cDNA 5 μ L とした。温度条件は 94 $^{\circ}$ C 3 分の後, 94 $^{\circ}$ C 1 分, 50 $^{\circ}$ C 1 分, 72 $^{\circ}$ C 2 分 25 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 15 分とした。2nd PCR の反応液の組成はヌクレアーゼフリー水 23.75 μ L, 10 \times Ex Taq Buffer 5.0 μ L, 2.5 mM dNTP 4.0 μ L, 25 mM MgCl₂ 10.0 μ L, Ex Taq 0.25 μ L, 10 μ M G2SKF²⁾と 10 μ M G2SKR²⁾各 2.5 μ L, 1stPCR 産物 2 μ L とした。温度条件は 1st PCR と同様とした。

nested-PCR 産物に対して電気泳動を行い, 対象とした産物の塩基長にバンドが見られたものについてゲルを切り出し, GENE CLEAN KIT (MP Biomedicals) を用いて DNA を精製した。

2. 5 パイロシーケンス

GS Junior システム(Roche Applied Science)を用いて, 精製された PCR 産物に対してパイロシーケンスを行った。まず, フージョンプライマーによるアンプリコンライブラリを作成し, AMPure XP ビーズによるアンプリコンライブラリの精製を行った。作成したライブラリに対して GS Junior Titanium emPCR Kit(Lib-L)(Roche Applied Science)を用いてエマルジョン PCR を行い, DNA ビーズを作成した。最後に DNA ビーズと Gs junior Titanium Sequencing Kit を用いて, GS Junior によりパイロシーケンスを行いノロウイルスの塩基配列を得た。各操作の手順と反応液の組成はメーカーのプロトコールに従った(投稿時には実験が終了していない)。

3. 結果及び考察

nested-PCR により得られた PCR 産物の電気泳動結果を図 1 に示す。本研究においては, 2014 年 1 月の採取した 12 個のカキの内 5 つ(42%)から GII 型が検出された(レーン 2, 4, 7, 8, 9)。バンドは比較的薄く, ゲル精製によって, 20 μ L 中に 0.9 -5.2 ng/ μ L の DNA が回収された。本研究においては, PCR 時の非特異的増幅を抑えるため, nested-PCR におけるサイクル数を 25 回ずつとしたが, サイクル数を増やすことによって, より高い濃度の増幅産物が得られると考えられる。また, 準備実験の結果から, PCR 反応溶液中の Mg²⁺濃度が 10 mM までは, Mg²⁺濃度が高いほど増幅効率が良くなる傾向が確認されており, Mg²⁺濃度を上げることで収量を上げる方法も考えられる。

4. まとめ

電気泳動を行った結果, 12 サンプル中 5 サンプルからノロウイルス GII 型の遺伝子が確認された。パイロシーケンスを行い網羅的な塩基配列解析を行うことで, ノロウイルスの詳細な情報が手に入ると考えられる。また, これを流域内感染者から分離されたノロウイルス株との塩基配列比較を行うことで, カキに蓄積するノロウイルスの動態に関する詳細な知見が得られることが期待される。

謝辞: 本研究は, 科学技術振興(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」の一環で行われた。

参考文献

- 1) 厚生労働省 (2013) 食中毒統計資料.
- 2) Ueki et al. (2005) *Water Research*, **39**, 4271-4280.

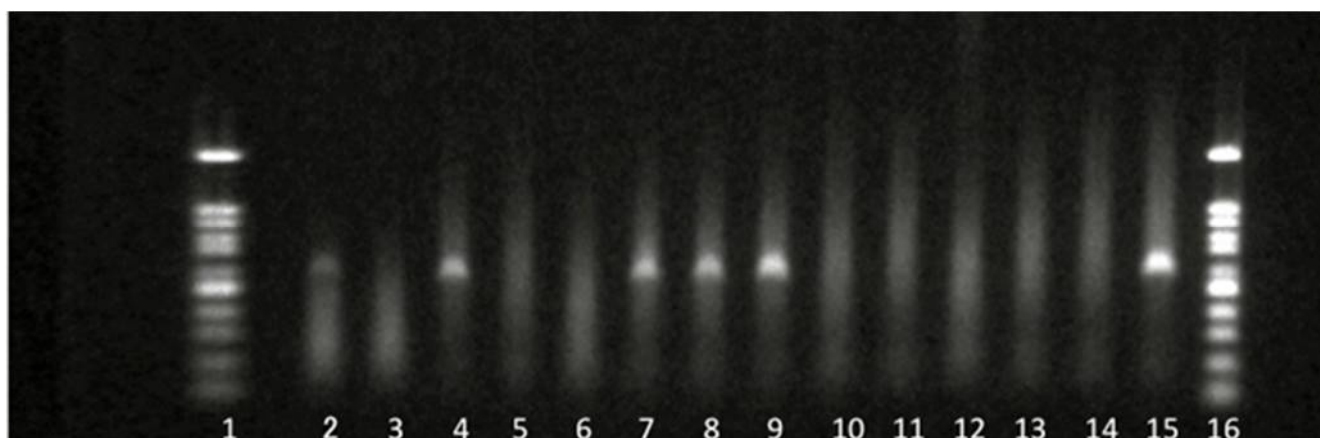


図 1. nested-PCR 産物の電気泳動結果。レーン 1 と 16 がラダー, レーン 2 - 13 がカキから抽出したノロウイルスに由来する PCR 産物, レーン 14 と 15 がそれぞれネガティブコントロールとポジティブコントロールである。