

# 2014-2015 年シーズンの感染性胃腸炎流行期までの養殖牡蠣のノロウイルス汚染の動向

山形大学農学部

学生会員 ○有坂知朗

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. 背景

感染性胃腸炎の主たる原因微生物の1つにノロウイルスが挙げられる(12,672人, 2013年)<sup>1)</sup>。一度ノロウイルスが人へ感染すると, 吐物・糞便等を介した人から人への二次感染の危険がある<sup>2)</sup>。地域内である程度感染者が増加すると, その二次感染によって爆発的な流行が拡大することすらある。このことから, 衛生環境改善のためノロウイルスへの対策は重要であると言える。

感染者の排泄物とともに排出されたノロウイルスは下水処理場で処理されるが, 一部が処理されずに環境水中に流出し<sup>3)</sup>, 河川・海域へと流下する<sup>2)</sup>。そこで牡蠣が養殖されている場合には, 牡蠣がノロウイルスを蓄積する<sup>4)</sup>。そして, ノロウイルスに汚染された牡蠣を喫食することにより人がノロウイルスに感染する<sup>2)5)</sup>。

近年では, 牡蠣のノロウイルス汚染への対策が強化されている。しかし, 未だに牡蠣によるノロウイルス食中毒が発生している。牡蠣がノロウイルスに汚染される原因として, 海水中に存在するウイルス<sup>2)</sup>が牡蠣の体内に入り, 消化器官である中腸腺内に蓄積し<sup>2)</sup>, 特異的に結合する<sup>5)</sup>。そのため, 収穫した後に清潔な海水中に浸漬させる現在の浄化方法<sup>2)</sup>では, 牡蠣からノロウイルスを十分に除去することが困難である<sup>2)6)</sup>。

さらに, 現在厚生労働省により推奨されているノロウイルス検査手法<sup>2)7)</sup>では100個以上のウイルス粒子が牡蠣中に存在しなければ陽性と判定されない<sup>7)</sup>。これに対して, ノロウイルスの感染力は非常に強く, 100個以下のウイルス粒子で感染・発症する可能性がある<sup>7)</sup>。すなわち, 現行のノロウイルス検査手法では検査をクリアした牡蠣の安全性が必ずしも保証されているわけではない<sup>2)</sup>。

## 2. 目的

牡蠣がノロウイルスに感染する起点となりうることから(その他多くは調理従事者による二次感染が原因とさ

れる), 牡蠣へのノロウイルス蓄積を回避することは重要である。現行の検査手法がノロウイルス感染に関する牡蠣の安全性を十分に担保できない中, 養殖中の牡蠣へのノロウイルス蓄積の予測が可能となれば, 牡蠣へのノロウイルス蓄積の有無や安全な養殖場の推定につなげることができる<sup>5)</sup>。

そこで本研究では, 2014-2015 シーズンにおいて養殖中の牡蠣へのノロウイルス蓄積量のモニタリングを行い, 牡蠣へのノロウイルス蓄積の変動性を解明することを目的とした。

## 3. 方法

### 3-1. 供試牡蠣サンプル

牡蠣養殖海域の2地点(A,B)で2014年9月第4週以降, 週に1回の頻度で, 出荷前の浄化を行っていない牡蠣をそれぞれの地点より9個ずつ採取した。地点A,Bの河口からの距離は, それぞれ2.0, 3.2 kmである。

### 3-2. ウイルス抽出

アミラーゼ(Sigma Aldrich), リパーゼ(Sigma Aldrich), プロテナーゼK(Roche)をそれぞれ6.3 mg/L, 6.3 mg/L, 0.25 g/Lとなるように滅菌超純水に溶解し, 酵素溶液を作成した<sup>8)</sup>。

眼科用剪刀(TGK)を用いて牡蠣から中腸腺を摘出した。中腸腺に3.2 mm ステンレスビーズ(TOMY)を2個と酵素溶液を1 mL加えた。その後, 4,200 rpm, 1分間の細胞破碎(Micro Smash-100, TOMY)を行った後, 37°C1時間, 60°C15分間湯煎した。最後に9,100 × g, 12分にて遠心分離(9,100 × g, 12分, model7000, KUBOTA)を行い, 上清をウイルス抽出液として全量回収した。中腸腺3個より回収した抽出液を混合し, 1点あたり3個の混合試料を得た。

### 3-3. ウイルス RNA の抽出

3-2のウイルス抽出液500 μL と pH 2.5 クエン酸バッフ

キーワード: ノロウイルス, 牡蠣, 食中毒, 遺伝子定量

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

アー (400 mM) 500  $\mu$ L を混合した後、遠心分離(9,100  $\times$  g, 12分)を行い、その上清を全量回収した。その後、NucliSENS miniMAG (bioMérieux)を用いてウイルス RNA を約 50  $\mu$ L 抽出した。操作は付属のプロトコルに従った。

### 3-4. ウイルスの定量

3-3 のウイルス 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い、5 $\times$  iScript reaction mix 12  $\mu$ L, iScript reverse transcriptase 3  $\mu$ L, ヌクレアーゼフリー水 15  $\mu$ L, テンプレート RNA 30  $\mu$ L とし、温度条件は、42 $^{\circ}$ C30分、85 $^{\circ}$ C5分とした。

逆転写を行った後、Sso Advanced Universal Probes Supermix (BIO-RAD)を用いてウイルスの定量を行った。反応溶液の組成は、遺伝子群 I (GI)に関しては滅菌超純水 2.6  $\mu$ L, Sso Advanced Universal Probes Supermix 10  $\mu$ L, フォワードプライマー(COG1F, 10  $\mu$ M) 0.8  $\mu$ L, リバースプライマー(COG1R, 10  $\mu$ M) 0.8  $\mu$ L, TaqMan プローブ(10  $\mu$ M) 0.8  $\mu$ L (RING1(a)-TP 0.6  $\mu$ L, RING1(b)-TP 0.2  $\mu$ L), テンプレート cDNA 5  $\mu$ L とし<sup>9)</sup>、遺伝子群 II (GII)に関しては滅菌超純水 2.2  $\mu$ L, SsoFast Probes Supermix 10  $\mu$ L, フォワードプライマー(COG2F, 10  $\mu$ M) 0.8  $\mu$ L, リバースプライマー(10  $\mu$ M) 1.6  $\mu$ L (COG2R 0.8  $\mu$ L, ALPF 0.8  $\mu$ L), TaqMan プローブ(RING2AL-TP, 10  $\mu$ M) 0.4  $\mu$ L, テンプレート cDNA 5  $\mu$ L とし<sup>9)</sup>、反応条件は 95 $^{\circ}$ C30秒の後、95 $^{\circ}$ C15秒、56 $^{\circ}$ C60秒のサイクルを 50 サイクルとした。

なお、逆転写及び定量における PCR には CFX96 Touch リアルタイム PCR 解析システム(BIO-RAD)を用いた。

### 4. 結果と考察

ノロウイルス GI は 10 月 22 日に地点 A で 1 検体が陽性(86.4 copies / g)となったのみであった。

ノロウイルス GII は 11 月下旬以前には分散して 1 検体から検出されたのみであったが、11 月下旬以降には 3 検体中 2,3 検体から恒常的に検出された(表 1)。昨シーズンにおける月 1 度(中旬)のモニタリングでは、11 月までは検出されず、12 月から検出され始め(地点 A で 18.6, 地点 B で 16.5 copies / g), 2 月に陽性率(検体に占める陽性検体の割合)のピークに達した。今後のモニタリングにより同様の汚染状況を示す可能性がある。

なお、牡蠣からノロウイルスが検出された一方で、本研究で対象とした牡蠣養殖海域の周辺ではノロウイルス患者の発生が見られない(2015 年 1 月 13 日現在)<sup>10)</sup>ことから、不顕性感染の存在が窺えた。

表 1. ノロウイルス GII の検出結果

採取日	地点 A(2.0 km)		地点 B(3.6 km)	
	陽性 検体数	定量値 <sup>a</sup> (copies/g) <sup>b</sup>	陽性 検体数	定量値 (copies/g)
9/24	1	18.8 <sup>c</sup>	0	-
10/1	0	-	0	-
10/8	1	9.6	0	-
10/15	0	-	1	15.4
10/22	0	-	0	-
10/29	0	-	0	-
11/5	0	-	1	6.1
11/12	1	2.6	0	-
11/19	0	-	2	9.3
11/26	3	21.6	2	10.1
12/4	3	13.3	2	12.8
12/10	3	14.7	2	39.5

a 40 サイクルまでに増幅が確認できたものを陽性とする

b 中腸腺 1 g 当たりのコピー数 (copies/g)

c 陽性検体の定量値の幾何平均

### 5. まとめ

週毎に牡蠣に蓄積したノロウイルスの量をモニタリングすることによって、2014 年 11 月下旬から多くのノロウイルスが検出され始めた。今後、12 月 10 日以降のモニタリングを継続していくことで、牡蠣の汚染の動向に関する全体像が確認できると考えられる。

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」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) 厚生労働省・食中毒統計
- 2) 西尾ら, 食品衛生学雑誌, **46**, 235-245, 2005.
- 3) Kazama S et al., submitted.
- 4) 植木ら, 環境工学研究論文集, **40**, 607-616, 2003.
- 5) 室賀ら, 日本水産学会誌, **71**, 535-541, 2005.
- 6) Le Guyader F. S. et al., *Current Opinion in Virology*, **2**, 103-110, 2012.
- 7) 重茂ら, 科学技術動向, 10-22, 2008.
- 8) 熊谷, 2014 年度山形大学農学部卒業論文, 2014.
- 9) Kageyama T et al., *Journal of Clinical Microbiology*, **41**, 1548-1557, 2003.
- 10) 東北大学大学院医学系研究科微生物学分野  
<http://www.virology.med.tohoku.ac.jp/research.html>