トウガラシ微斑ウイルスの養殖牡蠣ノロウイルス汚染指標としての可能性

山形大学農学部　○伊藤絵里香，伊藤紘晃，梶原晶彦，渡部徹
岩手大学大学院連合農学研究科　Nguyen Thanh Gia

１．はじめに

牡蠣は海水を濾過し、プランクトンなどを体内へ取り込む際、海水中の病原ウイルスもまた牡蠣の体内へ取り込まれる（室賀、高橋、2005)。2014 年度のノロウイルスによる食中毒は 293 件報告されており、そのうち牡蠣が原因であると判明しているのは 24 件である（厚生労働省、2014)。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、アイチウイルス（AiV）とトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）は、ノロウイルスと同様にヒトの糞便中に存在するウイルスであり、感染症流行に関わらず年間を通して糞便汚染を受けた水域から検出されることが知られているが、これらのウイルスを牡蠣から検出した研究例は少ない。本研究では、養殖牡蠣から AiV と PMMoV を検出し、ノロウイルスの蓄積量の指標として活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 離れた地点で 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）に従った。ここで中腸腺 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。ウイルス抽出液と pH2.5 クエン酸緩衝液（400 mM）を同量混合し、遠心分離（9100×g、12 分）を行い、上清を回収した。その後、NucliSENS miniMAG（bioMérieux）を用いてウイルス RNA を約 50μL 抽出した。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 Synthesiskit（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 を用いて、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）に、。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℃30 秒の後、AiV は 95℃15 秒・60℃30 秒のサイクル、PMMoV は 95℃15 秒・53℃10 秒・72℃20 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。

表 1. 各ウイルスが検出された牡蠣の検体数（n=3）

採取日	NoV GI	NoV GII	AiV	PMMoV
2014.9.24	0	1	0	3
2014.10.1	0	0	0	3
2014.10.8	0	1	0	3
2014.10.15	0	0	2	3
2014.10.22	1	0	0	3
2014.10.29	0	0	0	3
2014.11.5	0	0	0	3
2014.11.12	0	1	1	3
2014.11.19	0	0	0	3
2014.11.26	0	3	0	3
2014.12.4	0	3	0	3
2014.12.10	0	3	2	3
2014.12.17	2	3	0	2
2014.12.24	3	3	1	3
2015.1.14	3	3	1	3
2015.1.22	2	2	3	3
2015.1.28	3	3	3	3
2015.2.4	2	3	3	3
2015.2.12	3	3	3	3
2015.2.19	2	3	3	3
2015.2.25	2	3	3	3
2015.3.12	1	3	1	3
2015.3.18	1	3	1	3
2015.3.26	1	3	0	3
2015.4.1	0	3	3	3
2015.4.8	0	3	1	3
2015.4.15	0	3	0	3
2015.4.22	2	3	0	3

３．結果と考察

週別の陽性検体数を表 1 に、陽性検体の中での各ウイルスの定量結果を図 1 に示す。

AiV は 2014 年 9 月を除きすべての月で検出されたが、2015 年 12 月までは検出されない週もあった。2015 年 1 月から 2 月においては毎週検出されており、ウイルス濃度は 10^2copies/g-中腸線から 10^4copies/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った。

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 10^5copies/g-中腸線付近で推移し、2014 年 12 月中旬からは 10^6copies/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 10^6copies/g-中腸線付近で推移し、4 月下旬までその濃度を維持していた。

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

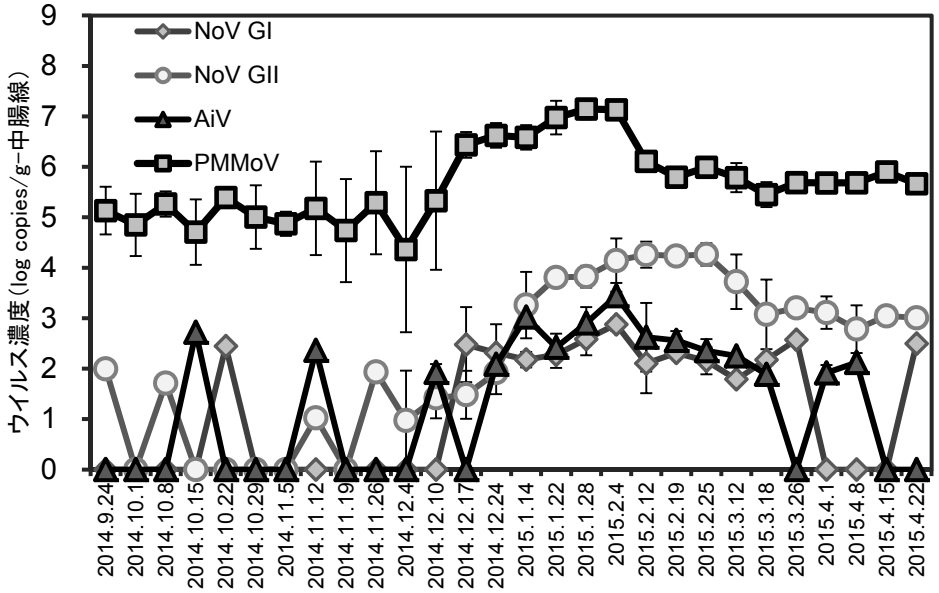

図 1. 養殖牡蠣中のウイルス濃度（陽性サンプルの濃度の平均値、縦軸の 0 は非検出を示す）

同じ牡蠣からの NoVGII の検出結果と比較すると、AiV、PMMoV 共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、牡蠣の汚染指標としての妥当性が高い。

実際の指標としての活用法として、①二つのウイルスの相関を見る方法と、②PMMoV の濃度とノロウイルスの陽性率を比較する方法を提案する。2014 年 9 月から 2015 年 4 月のデータを用いて検証した。

方法①の結果を図 2 に示す。なお、近似曲線はどちらのウイルスとも検出されたデータから求めた。ノロウイルスの濃度と正の相関がみられたものの、相関係数は大きくなかった。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 2 に示す。PMMoV 濃度が 10^5copies/g-中腸線を超えると陽性率は高くなり、10^6copies/g-中腸線以上ではほぼ 100%となっている。よってノロウイルスの検査を省略し、出荷の制限などの方法をとることができる。一方、PMMoV が 10^5copies/g-中腸線未満の時は、低い濃度のノロウイルスを検出するために厳密な検査をする必要がある。

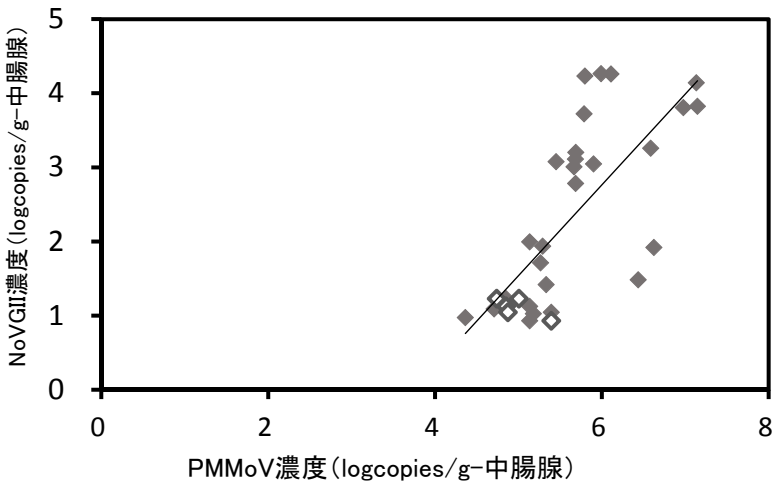

図 2. NoVGII と PMMoV の相関関係（非検出があったデータでは検出下限値を当てて、マーカーを白抜きにした）

4．まとめ

方法②について、2015～2016 シーズンの検出結果をもとに、PMMoV の濃度を NoVGII 陽性率の目安として用いることが出来ないかさらに検討していきたい。

表 2. PMMoV 濃度と NoVGII 陽性率の変化

PMMoVRNA量 (logcopies/g−中腸腺)	10^4～10^5	10^5～10^6	10^6～10^7	10^7～10^8
NoVGII陽性検体数	2	5	8	9
NoVGII陰性検体数	7	4	1	0
陽性率	22%	56%	89%	100%

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
室賀清邦、高橋計介：日本水産学会誌、71,535-541,2005.
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.