

## ヒト腸管系ウイルス数種の養殖牡蠣への蓄積の季節的変動

山形大学大学院農学研究科	学生員○伊藤絵里香
熊本大学くまもと水循環・減災研究教育センター	正会員 伊藤紘晃
東洋大学情報連携学部	正会員 浦剣
山形大学農学部	正会員 西山正晃
山形大学農学部	正会員 渡部徹

## 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<sup>1</sup>。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<sup>2</sup>。これは、感染性胃腸炎患者がウイルスを下水中に放出し、それが下水処理場で処理される際に全てのウイルスを除去・不活化できずに、一部のウイルスが処理水と共に養殖海域へ流入するためである。しかし、ノロウイルス以外の腸管系ウイルスについては、ノロウイルスと同じ経路で牡蠣体内へ取り込まれる可能性があるにも関わらず、その蓄積を長期的にモニタリングした事例は少ない。そこで、本研究では、ノロウイルスと同様にヒト糞便に由来するロタウイルスおよびアストロウイルスを牡蠣から検出し、その季節的変動を明らかにすることを目的とした。

## 2. 実験方法

東北地方のある湾で、河口から 3.2km 離れた養殖棚において、2014 年 9 月下旬より週に一度の頻度で牡蠣を 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）<sup>3</sup>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 つのコンポジットサンプルとした。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。上清からウイルス RNA を約 50μL 抽出し、ウイルス RNA の逆転写を行い、作製された cDNA を用いてウイルスの定量を行った。定量により得られたウイルス量から、中腸腺 1g あたりのウイルス RNA コピー数(copies/g-DT)を算出した。ロタウイルスおよびアストロウイルスの結果とともに、比較対象としてのノロウイルス GI および GII の結果（一部は伊藤（2016）<sup>4</sup>にて報告済み）も報告する。

## 3. 結果と考察

各ウイルスの検出結果を図 1 に示す。ノロウイルス（NoV）GI は、2014 年 12 月以前はほとんど検出されなかった。12 月から陽性検体数とウイルス濃度が増加し、2015 年 2 月にウイルス濃度が  $10^3$ copies/g-DT に達した。その後 3 月頃まで  $10^2$ copies/g-DT 付近で推移していた。4 月以降は非検出の検体が多くなったが、時折ウイルスが検出される個体があった。2015 年 10 月からは昨シーズンより濃度および検体数が多く、 $10^3$ copies/g-DT から  $10^4$ copies/g-DT の濃度で推移していた。その後 2016 年 4 月にかけて少しずつ濃度が減少し、 $10^2$ copies/g-DT 付近で推移していた。5 月以降は全く検出されなかった。ノロウイルス GII は、2014 年 11 月までは  $10^2$ copies/g-DT から  $10^3$ copies/g-DT で推移していた。12 月下旬より陽性検体数が増加し、それに続く形でウイルス濃度が増加した。2015 年 3 月まで  $10^3$ copies/g-DT から  $10^4$ copies/g-DT 付近で推移し、その後やや濃度が減少した。5 月以降は非検出の週が増えた。2015 年 10 月から 12 月は昨シーズンよりやや濃度が高く、 $10^2$ copies/g-DT から  $10^3$ copies/g-DT で推移していたが、2016 年 1 月に濃度が増加する傾向は昨シーズンと同様であった。その後 4 月に濃度が減少し、5 月以降は非検出の週が多くなった。

キーワード：ロタウイルス，アストロウイルス，サポウイルス，定量 PCR，牡蠣

住所：〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23、Tel: 0235-28-2907 Email: to-ru@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

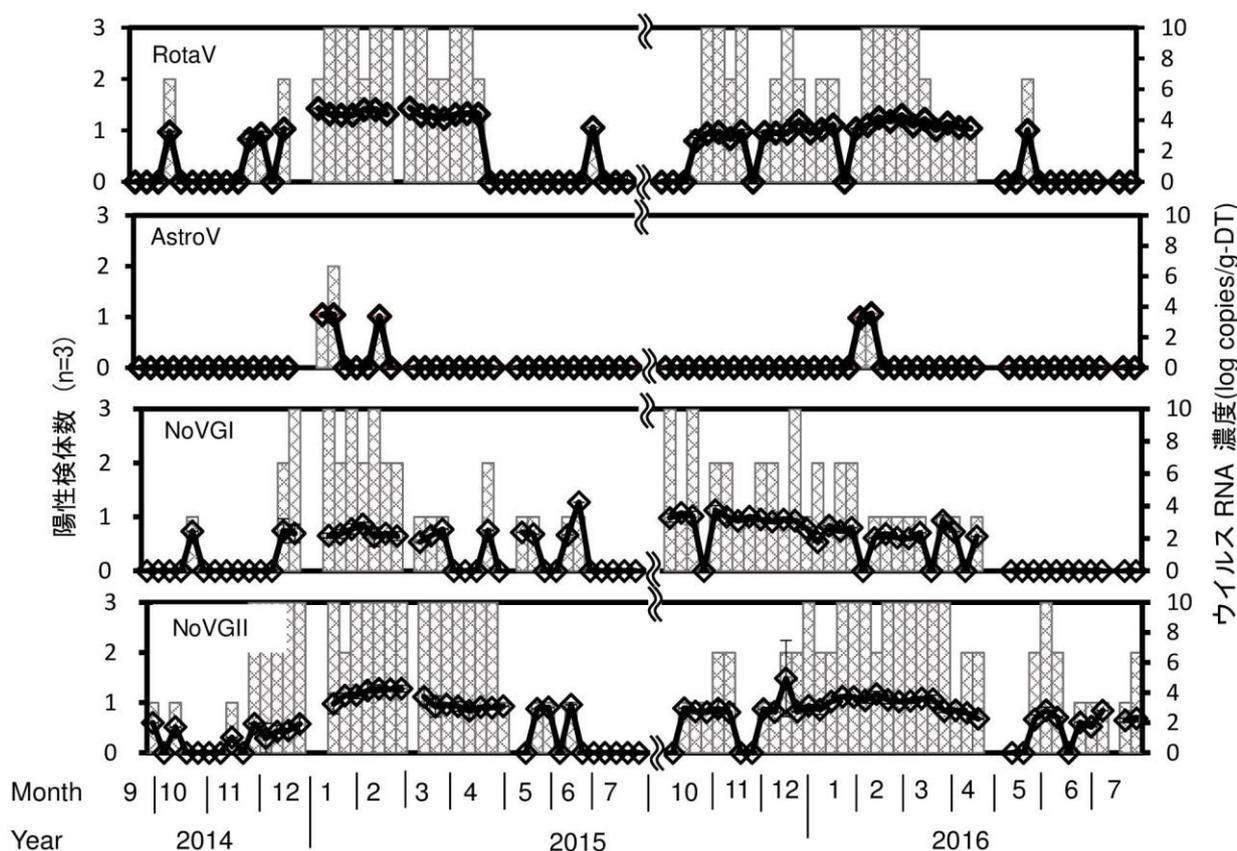


図1. 各ウイルスの検出結果. 棒グラフはウイルスが検出されたサンプル数(n=3)を, 折れ線グラフは陽性サンプルで得られたウイルス濃度の平均値を示している.

ロタウイルス (RotaV) は、2014年11月以前はほとんど検出されなかった。12月より濃度および陽性検体数が増加し始め、2015年1月から4月まで  $10^4$ copies/g-DT から  $10^5$ copies/g-DT とノロウイルスより高い濃度で検出された。5月以降は全く検出されなかった。2015年10月はウイルスが検出されなかったが、11月以降は2014年においては非検出であったのに対し、2015年11月からは  $10^3$ copies/g-DT 付近と比較的高い濃度で検出されていた。その後2016年4月まで濃度を維持し、5月以降はほとんど検出されなかった。

アストロウイルス (AstroV)、2015年および2016年の冬季にわずかに検出されたが、殆どの週では検出されなかった。しかしながら、検出された週については  $10^3$ copies/g-DT と比較的高い濃度であった。

各ウイルスの検出結果を比較すると、ロタウイルスは冬季に濃度が高くなっており、ノロウイルスのようにウイルス性胃腸炎患者数が増加する時期に、牡蠣中のロタウイルスも同様に増加しているという傾向が示唆されている。アストロウイルスは検出率が低く、季節性を議論することは難しいが、陽性検体は冬季にのみ現れていることから、他のウイルスと同様に冬季に牡蠣に蓄積される傾向があるのかも知れない。

#### 参考文献

- 1 室賀清邦, 高橋計介: カキのノロウイルス汚染, 日本水産学会誌, 71(4), 535-541, 2005.
- 2 有坂知朗, 伊藤紘晃, 真砂佳史, 植木洋, 梶原晶彦, 渡部徹: 2014~2015年シーズンの感染性胃腸炎流行期に至るまでの養殖牡蠣のノロウイルス汚染の動向, 平成26年度土木学会東北支部技術研究発表会講演概要集, 2015.
- 3 伊藤紘晃, 真砂佳史, 植木洋, 渡部徹: 低 pH 抽出法及び酵素抽出法を用いた養殖カキからのノロウイルスの定量検出, 土木学会論文集 G (環境), 69(7), III\_657-III\_665, 2013.
- 4 伊藤絵里香, 伊藤紘晃, 浦剣, Nguyen Thanh Gia, 渡部徹: トウガラシ微斑ウイルスおよびアイチウイルスの牡蠣への蓄積とノロウイルス汚染指標としての利用可能性. 土木学会論文集 G (環境), 72(7), III\_295-III\_304, 2016.