

牡蠣と下水からのロタウイルスワクチン株の検出と胃腸炎流行との関連

山形大学農学部	正会員	○渡部 徹
岩手大学大学院連合農学研究科	非会員	伊藤 絵里香
国立保健医療科学院	正会員	三浦 尚之
山形大学農学部	正会員	西山 正晃
東北大学 NICHe	正会員	大村 達夫

1. はじめに

ロタウイルスは感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、2006年には2種類のワクチン（Rotarix, RotaTeq）が開発された。この2つはどちらも経口生ワクチンであり、接種を受けた乳幼児の体内ではワクチン由来のロタウイルス株が増殖する。増殖したワクチン株は糞便中に排出され、生活排水とともに水環境中に流入する可能性がある。我々の先行研究では、養殖牡蠣中および下水中のロタウイルス A（RVA）をリアルタイム PCR で定量的に検出し、周辺地域のロタウイルス感染症流行との関連性を調べた¹⁾。養殖牡蠣中の RVA 量は、ロタウイルス感染症の流行期である冬季に増加する傾向が見られた一方で、下水中の RVA 量と周辺地域の感染者数のどちらにも有意な関連性がなかった。その原因として、RVA には野生株とワクチン株の両方が存在していることが挙げられる。野生株の水環境中での動態や感染症との関連性をより正確に解明するためには、ワクチン株の挙動を把握する必要がある。

本研究では、養殖牡蠣および都市下水中の Rotarix および RotaTeq 株を定量検出し、全 RVA の定量値から差し引くことで RVA 野生株のみのウイルス量を明らかにした。また、牡蠣または下水中の野生株とワクチン株と周辺地域におけるロタウイルス感染症の流行との関連性を調査した。

2. 方法

2. 1 サンプルング方法

東北地方の牡蠣養殖で有名な湾において、2014年9月から2016年7月まで、養殖牡蠣を毎週9個体ずつ採取し、中腸腺を摘出した。また、この湾に流入する河川の上流にある下水処理場（処理人口約10,000人、処理方法はオキシデーションディッチ方式）で、同時期に週1回の頻度で未処理下水を1L採取した。

2. 2 ウイルス濃縮・RNA抽出

牡蠣からのウイルス抽出の手法は先行研究²⁾に従った。すなわち、中腸腺サンプルに3.2 mm ステンレスビーズ（TOMY）と酵素溶液を加えた後、4,200 rpm、1分間の細胞破碎（Micro Smash-100, TOMY）を行い、さらに、37°C 1時間、60°C 15分間インキュベートした。最後に9,100×g、12分の遠心分離を行い、上清をウイルス抽出液として全量回収した。中腸腺3個より得られた抽出液を混合し、コンポジット試料とした。その試料500μLに500μLのクエン酸バッファーを添加し、9,100×g、12分の遠心分離を行った後、上清の全量をRNA抽出に用いた。

下水サンプルからは、ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法によるウイルス濃縮を行った。すなわち、3.2gのPEG 6000（富士フィルム和光純薬株式会社）と0.92gの塩化ナトリウム（関東化学）を40mLの下水サンプルに加え、4°Cで12時間攪拌した。続いて、4°Cで9000×g、30分の遠心分離を行い、上清を除いた後、1mLの滅菌超純水を加えてボルテックスで懸濁させた。懸濁液を4°Cで10000×g、10分遠心分離し、上清をウイルス濃縮液として回収した。回収した濃縮液のうち140μLをRNA抽出に用いた。

中腸腺サンプルからのRNA抽出にはNucliSENS miniMAG RNA extraction kit（bioMérieux）を、下水サンプルからのRNA抽出にはQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いた。それぞれの実験操作は付属のプロトコルに従った。

2. 3 逆転写およびウイルスの定量

ウイルスRNAの逆転写をiScript Advanced cDNA Synthesis kit（BIO-RAD）を用いて行った。反応にはT100サー

キーワード：ロタウイルス、ワクチン株、牡蠣、下水、胃腸炎流行

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

マルサイクラー（BIO-RAD）を用いた。反応条件は付属のプロトコルに従った。逆転写によって作製した cDNA を用いて、全 RVA、Rotarix 株および RotaTeq 株の定量を行った³⁾⁴⁾。全 RVA の定量値から 2 つのワクチン株の定量値を差し引くことで、野生株のウイルス量を求めた。

3. 結果及び考察

養殖牡蠣および下水からの野生株、Rotarix 株および RotaTeq 株の定量結果を図 1 に示す。牡蠣中の野生株および RotaTeq 株は両シーズンの冬季に検出されたが、Rotarix 株は 2016 年のみ検出された。各ウイルス株の牡蠣中の陽性率は、野生株が 54%、Rotarix 株が 14%、RotaTeq 株が 31%であった。下水においては、野生株は牡蠣からと同程度の頻度（57%）で両シーズンともに検出された。RotaTeq 株も両シーズンともに検出されたが、2015-2016 シーズンの陽性率は牡蠣に比べて明らかに低かった。また、Rotarix 株は 2 シーズンを通じて下水からは検出されなかった。

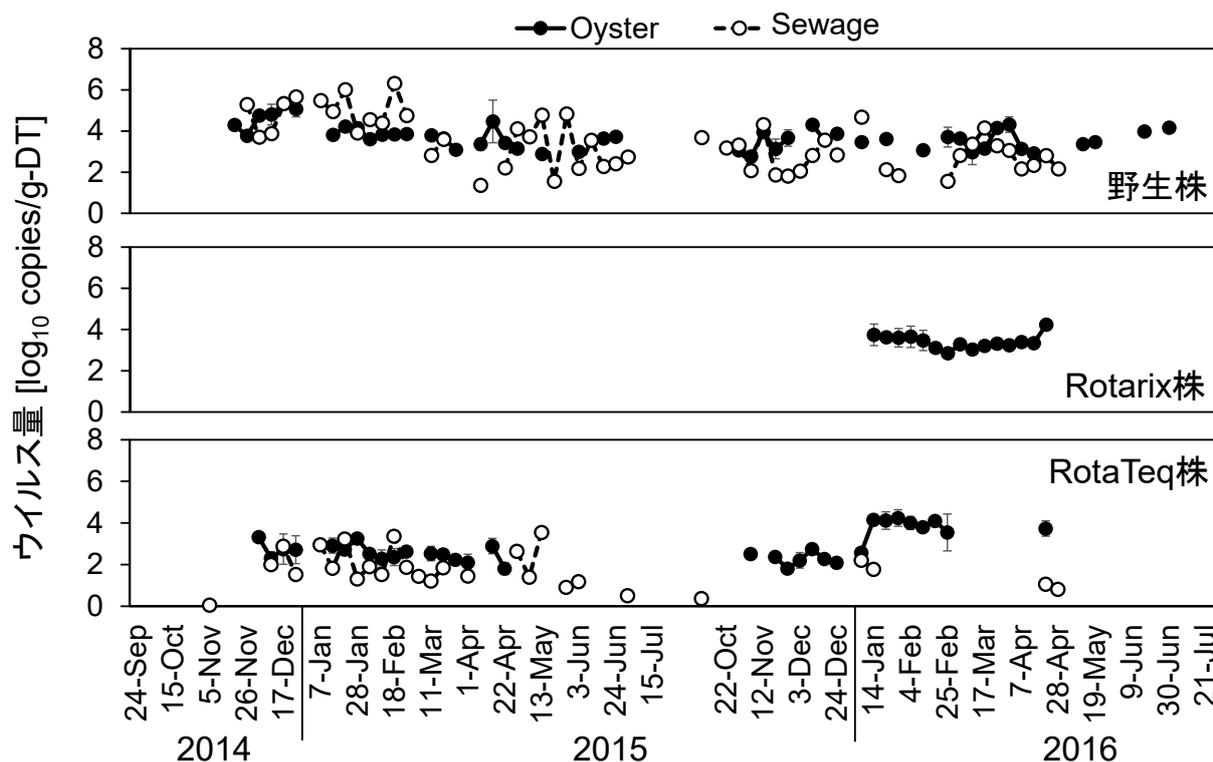


図 1 養殖牡蠣中のロタウイルス野生株およびワクチン株の定量結果
（ウイルス量は陽性個体だけの平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す）

図 1 に示した牡蠣中および下水中のウイルス量と、ロタウイルス感染者報告数の 3 者で相関分析（牡蠣または下水からウイルスが検出されなかった週は除外）を行った結果、下水における野生株とロタウイルス検出者の間には有意な相関関係がなく、検査を受けていない無症候性のロタウイルス感染者が存在していることが示唆された⁵⁾⁶⁾。牡蠣中と下水中の野生株は、ノロウイルスでの分析結果²⁾と同様に、-6~0 週間のタイムラグで有意な相関が見られた ($p < 0.05$)。この結果から、症候性および無症候性のロタウイルス感染者から排出された野生株は、下水道や浄化槽、その後の水環境を通じて牡蠣に到達するまで、最大で 6 週間ほどの時間を要することが示された。

4. おわりに

本研究では、ロタウイルスワクチン株の定量的な検出により、RVA 全体を検出するだけでは得られない野生株 RVA の動態に関するより詳細な情報を提供できた。牡蠣中の野生株 RVA は下水中の同株と相関関係にあったことから、牡蠣中の野生株を監視することにより、安全な牡蠣を消費者に提供できるだけでなく、無症候性を含むロタウイルス感染の流行をより正確に把握することができる。

謝辞:本研究は、科研費（18H03792, 19J13607, 20K20637）の助成を受けた。

参考文献 1) Ito et al. 2019, Pathogens 8, 89; 2) Pu et al. 2018, Int. J. Food Microbiol. 284, 48–55; 3) Miura et al. 2018, Food Environ. Virol. 10, 176–186; 4) Gautam et al. 2014, Hum. Vaccin. Immunother. 10, 767–777; 5) Paul et al. 2014, Vaccine 32, A49–A54; 6) Phillips et al. 2010, Am. J. Epidemiol. 171, 1023–1030