

ウイルスの遺伝子型に着目した牡蠣へのノロウイルス蓄積特性の評価

山形大学農学部	非会員	○齋藤	美樹
岩手大学大学院連合農学研究科	学生会員	米田	一路
山形大学農学部	正会員	西山	正晃
株式会社日本環境衛生研究所	非会員	植木	洋
宮城県保健環境センター	非会員	坂上	亜希恵
山形大学農学部	正会員	渡部	徹

1. はじめに

ノロウイルスは食中毒の主要な原因ウイルスの1つである。ノロウイルスによる食中毒の中で、原因食材が判明している事例では魚介類を原因とするものが多く、そのうち80%以上を牡蠣が占めている。ノロウイルスはGI～GXの10遺伝子群に分類される。GI、GII、GIVはヒトへの感染が報告されており、特にGIIによる感染例が多い¹⁾。GII遺伝子群はさらに27の遺伝子型（GII.1～GII.27）に分類され、GII.2とGII.4は感染性胃腸患者から頻繁に検出される。また、養殖牡蠣から検出されるノロウイルスの遺伝子型を分析した研究²⁾はあるが、その水域に存在していたウイルスの遺伝子型までは調べられていないため、どの遺伝子型のウイルスが牡蠣に蓄積しやすいかに関する情報はない。本研究では、牡蠣をノロウイルスGII.2、GII.4、GII.17に人為的に汚染する実験を行い、ノロウイルスの遺伝子型による牡蠣への蓄積特性の違いを評価した。

2. 方法

牡蠣のノロウイルス人為汚染実験は、2022年1月24～28日、10月17～21日、10月24～28日、10月31日～11月4日の計4回行った。第一回実験³⁾の条件は、ノロウイルスを添加しないが浄化処理を行うコントロール、ノロウイルスGII.2に汚染させ、浄化処理を行うGII.2（浄化あり）、ノロウイルスGII.4に汚染させ、浄化処理を行うGII.4（浄化あり）および浄化処理を行わないGII.4（浄化なし）とした。はじめに、人工海水が10～12L入った水槽に宮城県産の養殖マガキ（*Crassostrea gigas*）をそれぞれ20個入れ、42時間馴致した。馴致後、各水槽の人工海水を交換した上で、ウイルス濃度が約 10^3 genome copies/mLになるように、GII.2（浄化あり）の水槽にノロウイルスGII.2を、GII.4（浄化あり）とGII.4（浄化なし）の水槽にGII.4を添加し、牡蠣をノロウイルスに24時間汚染した。汚染後には、清浄な人工海水中で24時間の浄化処理を行った。その後、水槽から牡蠣をすべて取り出し、ノロウイルス遺伝子の定量に供した。

第二回～第四回の実験では、牡蠣をノロウイルスGII.2、GII.4、GII.17で汚染した。実験手順は第一回とほとんど同じであるが、実験開始時には35～41個の牡蠣を水槽に入れた。各水槽から馴致後（コントロール）、汚染後（浄化なし）、浄化後（浄化あり）のタイミングでそれぞれ5、10、15個の牡蠣を取り出し、ノロウイルス遺伝子の定量に供した。

汚染実験後には、すぐに牡蠣試料の殻から身を取り出し、個体重量を測定した。その後、中腸腺を摘出し、その重量も測定した。中腸腺に酵素溶液を添加して細胞粉碎を行った後、遠心分離して得られた上清をウイルス抽出液として回収した。ウイルス抽出液500 μLにクエン酸バッファー500 μLを添加し、混合した後に遠心分離した。この上清からNucliSENSminiMAG（BioMérieux）を用いてウイルスRNAを抽出した。抽出したウイルスRNAから逆転写によりcDNAを合成し、CFX96 TouchリアルタイムPCR解析システム（Bio-Rad）でcDNA定量をした。

3. 結果及び考察

第一回汚染実験におけるノロウイルスGIIの陽性個体数とその割合およびウイルス蓄積量を表1に示す。汚染実

キーワード：ノロウイルス、Norovirus、bioaccumulation、*Crassostrea gigas*、Depuration

住所：山形県鶴岡市若葉町1-23, Tel: 0235-28-2907, Email: a190444@st.yamagata-u.ac.jp

験後の牡蠣のノロウイルス GII 陽性個体割合は、GII.2（浄化あり）が 80.0%（16/20 個）、GII.4（浄化あり）が 60.0%（12/20 個）、GII.4（浄化なし）が 80.0%（16/20 個）であり、ノロウイルス無添加のコントロール（20.0%、4/20 個）よりも有意に高かった。このことから、本実験システムで牡蠣を人為的にノロウイルス GII で汚染できたといえる。また、GII 陽性個体割合は GII.4 添加（浄化あり）（60.0%）よりも GII.2 添加（浄化あり）（80.0%）でわずかに高かった。このことから、GII.2の方が GII.4よりも牡蠣に蓄積されやすい、牡蠣から除去されにく

表 1 第一回汚染実験のノロウイルス GII の陽性個体数および中腸腺への平均ウイルス蓄積量³⁾

系列	全個体数	陽性個体数 (陽性個体割合)	ウイルス蓄積量 (log copies/g-DT)
コントロール	20	4 (20.0%)	3.18
GII.2 (浄化あり)	20	16 (80.0%)	3.41
GII.4 (浄化あり)	20	12 (60.0%)	3.16
GII.4 (浄化なし)	20	16 (80.0%)	3.28

表 2 第二回汚染実験のノロウイルス GII の陽性個体数および中腸腺への平均ウイルス蓄積量

系列	全個体数	陽性個体数 (陽性個体割合)	ウイルス蓄積量 (log copies/g-DT)
コントロール	15	2 (13.3%)	3.12
GII.2 (浄化なし)	10	8 (80.0%)	3.75
GII.2 (浄化あり)	15	10 (66.6%)	4.08
GII.4 (浄化なし)	10	0 (0.0%)	N.D.
GII.4 (浄化あり)	15	2 (13.3%)	3.12
GII.17 (浄化なし)	10	9 (90.0%)	4.67
GII.17 (浄化あり)	15	15 (100.0%)	4.52

い、または両方であった可能性が示唆された。浄化処理によって GII 陽性個体割合はわずかに低下した（GII.4 添加（浄化なし）で 80.0%、GII.4 添加（浄化あり）で 60.0%）。しかし、浄化処理後（GII.4 添加（浄化あり））の陽性個体割合はコントロール（20.0%）よりも高かったことから、24 時間の浄化処理では牡蠣に一旦取り込まれたウイルスを完全に除去することは困難であったといえる。

第二回汚染実験におけるノロウイルス GII の陽性個体数とその割合およびウイルス蓄積量を表 2 に示す。GII.2（浄化なしで 80.0%、浄化ありで 66.6%）および GII.17（浄化なしで 90.0%、浄化ありで 100.0%）で汚染した系列の GII 陽性個体割合はノロウイルス無添加のコントロール（13.3%）よりも高かったことから、この 2 つの遺伝子型については牡蠣を人為的にウイルス汚染できたといえる。しかし、GII.4 で汚染した系列（浄化なしで 0.0%、浄化ありで 13.3%）の GII 陽性個体割合はコントロールとほぼ同じであり、GII.4 では牡蠣を汚染できなかった。第一回汚染実験では牡蠣を GII.4 で汚染できたことから、第二回汚染実験で使用した牡蠣が GII.4 を蓄積しにくい個体であった可能性がある。GII.2 と GII.17 の GII 陽性個体割合は、浄化処理前は同程度（GII.2 が 80.0%、GII.17 が 90.0%）であった一方で、浄化処理後は GII.17（100.0%）の方が GII.2（66.6%）よりも高かったことから、GII.17 は GII.2 と比べて牡蠣から除去されにくい可能性が示唆された。

以上の二回の実験では、各系列のノロウイルス GII 陽性個体と非陽性個体間で、個体重量と中腸腺重量に有意な差はなかった。このことから、牡蠣にノロウイルス GII 遺伝子が蓄積するかどうかという個体差は、個体の大きさや成長度合いには依存していなかった。

また、どちらの実験でも、高濃度のノロウイルスに汚染された海水中で飼育したにも関わらずウイルスが検出されなかった牡蠣個体が存在した。牡蠣の中腸腺にノロウイルスと特異的に結合する糖鎖の存在を指摘する研究⁴⁾があることから、ウイルスが検出されなかった牡蠣はこの種の糖鎖を保有していなかったのかもしれない。

4. まとめ

牡蠣をノロウイルスに人為的に汚染させる実験を行った結果、牡蠣の中腸腺にはノロウイルス GII.17、GII.2、GII.4 の順で蓄積しやすい傾向があった。また、ノロウイルス GII 遺伝子の牡蠣への蓄積と、牡蠣の個体および中腸腺重量との間に関係性は見られなかった。今後、第三回、第四回の実験結果もふまえて、さらに考えを深める予定である。

謝辞：この研究は、科学研究費補助金（20K20637）の支援を受けた。

参考文献 1) Medici et al., *Eurosurveillance.*, 35, 1-5, 2015; 2) Pu et al., *Int J of Food Microbiol.*, 2, 48-55, 2018; 3) 米田ら., 土木学会文集 G（環境）, 7, III_23-III_32, 2022; 4) Maalouf et al., *Appl Environ Microbiol.*, 16, 5621-5630, 2010