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

伊藤 絵里香¹・伊藤 絃晃²・浦 剣³・Nguyen Thanh Gia⁴・渡部 徹⁵

¹学生会員 山形大学修士課程学生 大学院農学研究科生物環境学専攻
(〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23)

²正会員 熊本大学助教 大学院先端科学研究部 (〒860-8555 熊本県熊本市中央区黒髪 2-39-1)

³正会員 山形大学助教 農学部食料生命環境学科 (〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23)

⁴学生会員 岩手大学博士課程学生 大学院連合農学研究科生物環境科学専攻
(〒020-8550 岩手県盛岡市上田 3 丁目 18-8)

⁵正会員 山形大学教授 農学部食料生命環境学科 (〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23)

Email: to-ru@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

トウガラシ微斑ウイルスとアイチウイルスを養殖牡蠣から検出し、ノロウイルス汚染の指標として用いることが出来ないか検討した。トウガラシ微斑ウイルスは検出頻度がノロウイルスよりも高く、その RNA 量も多かったが、アイチウイルスは検出頻度、RNA 量ともにノロウイルスと同程度であり、指標として適さないことが明らかになった。トウガラシ微斑ウイルスの RNA 量を指標として、ノロウイルス陽性率を推定する方法を提案した。高い陽性率が推定される場合には、ノロウイルス検出を省略することで時間や費用を削減できる可能性がある。

Key Words: oyster, Norovirus, Aichi virus, Pepper Mild Mottle virus

1. はじめに

ノロウイルスは食中毒の主な原因物質である。厚生労働省のデータによると、2014 年度の食中毒事件 976 件のうちノロウイルスによるものは 293 件であり、これは全体のおよそ 30% に相当する¹⁾。ノロウイルスはカリシウイルス科ノロウイルス属に分類され、直径 30~38nm の球状のエンベロープを持たないウイルスである。ノロウイルスは内部に約 7.7 kb のプラス一本鎖 RNA を持っており、GI-GV の 5 つの遺伝子群に分類される。そのうち人間に感染するのは GI, GII, GIV であり、GIII はウシ、GV はマウスに感染する²⁾。

2014 年のノロウイルス食中毒事件 293 件のうち、牡蠣を原因食品とするものは 24 件(8.3%)であった。その他に複合調理食品などがあるが、単一の食品を原因とするものの中では牡蠣による事件が最も多い。これは、牡蠣が餌となるプランクトンや有機懸濁物を体内に取り込むために海水を濾過する過程

で、海水中のノロウイルスも牡蠣の体内に取り込まれ、消化器官である中腸腺内へ特異的に結合し蓄積される³⁾性質によるものと考えられている。

東北地方のある湾で行われた調査では、湾内で養殖されていた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⁴⁾。また、同じ湾を対象にした別の調査では、湾内に流入する河川水と養殖牡蠣から同時期に 100% 塩基配列が一致するノロウイルスが検出された⁵⁾。さらに、流域で発生した感染性胃腸炎患者の便からも、配列が 96% 一致するノロウイルスが検出され、この地域における「感染者～河川～海域～牡蠣～新たな感染者」という汚染経路を示唆する結果が得られた⁵⁾。

上述の調査では、感染性胃腸炎が流行し始める 11 月や 12 月には、ウイルスが検出されない牡蠣検体も多かった⁴⁾。この陰性牡蠣検体の中には、体内にウイルスが存在しているにも関わらず、その量が少ないために検出できなかったケースが含まれる可能性

がある。我々の研究グループでは、各種の消化酵素と低い pH のバッファーを用いることで、牡蠣からのウイルス検出効率を高めるための研究開発を行ってきた。その結果、現在の公定法に比べて 40 倍の感度でノロウイルスを検出することに成功した⁶⁾。それでも検出限界は牡蠣 1 個体あたり 100 個程度であり、それより少ない量のウイルスは検出できない。

上述の通り、ノロウイルスが感染者と牡蠣の間で循環していることが疑われる中で、牡蠣に少ない量で蓄積しているウイルスを検出することは、牡蠣に由来する食中毒を回避し、それを契機にして発生するかもしれない胃腸炎の流行を未然に防止するために重要である。しかしながら、前述したように現在の検出法では検出できるウイルス量に限界がある。そのような中、ノロウイルスと同様の性質や季節性を示し、より牡蠣中での存在量が多いウイルスを代替指標として用いることができれば、牡蠣中に少ない量で蓄積しているノロウイルスの存在量を類推することが可能になると期待できる。本研究では、ノロウイルスと同様にヒトの糞便中に存在し、糞便汚染の起こっている海域から多く検出されることが知られており⁷⁾、ノロウイルスと同様に海水の濾過によって牡蠣の体内へ取り込まれている可能性が高いウイルスを代替指標とすることを提案する。具体的には、アイチウイルス (*Aich virus*; AiV) とトウガラシ微斑ウイルス (*Pepper mild mottle virus*; PMMoV) に着目し、これらのウイルスを牡蠣から定量検出することで、ノロウイルス汚染の指標として利用できる可能性と、その活用法について検討することを目的とした。

AiV は、ピコルナウイルス科コブウイルス属に分類され、粒子直径約 30 nm の正二十面体形のウイルスである⁸⁾。AiV の関与が認められた食中毒事件の事例では、12 事例中 11 事例において生牡蠣が原因食品であると推定された⁶⁾。牡蠣から AiV を検出した研究はあるものの⁹⁾、ノロウイルスの汚染指標として用いる試みはなされていない。

PMMoV は、ビルガウイルス科トバモウイルス属に分類される、長さ約 300 nm の棒状のウイルスであり、環境中で非常に安定性が強いことが知られている¹⁰⁾。土壤中に存在するウイルスが根の傷口などを介してトウガラシやピーマンに感染し、葉などに明瞭なモザイク症状を発生させるモザイク病を引き起こす¹¹⁾。PMMoV は、植物への感染性や防除などの面では盛んに研究が行われているが、下水中や牡蠣体内での動態は、本ウイルスが下水中で高い濃度で検出されることが分かっている⁷⁾にもかかわらず、あまり研究が行われていないのが現状である。

2. 材料と方法

(1) 牡蠣サンプリング

ある牡蠣養殖海域において、河口から 3.2 km 離れた地点より、2014 年 9 月 24 日から 2015 年 6 月 17 日までの期間に、浄化処理前の養殖牡蠣を毎週 9 個体ずつ採取した。この海域では牡蠣の養殖が行われている。また、この海域に流入する主要河川には、河口の 1.8 km 上流に下水処理場が存在する。

(2) ウイルス抽出手法

a) ウイルス抽出溶液の準備

ウイルス抽出の準備として、酵素溶液を作製した。有坂らの研究⁴⁾に従い、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 となるように滅菌した超純水に溶解して作成した。これら 3 種の酵素は、中性 pH を至適 pH 領域に含むものを用いた。

b) 牡蠣からのウイルス抽出

牡蠣からのウイルス抽出の手法は、有坂ら⁴⁾に従った。眼科用剪刀 (TGK) を用い牡蠣から中腸線を摘出した。その後、3.2 mm ステンレスビーズ (TOMY) 2 個と酵素溶液 1 mL を添加した。また、内部標準としてマウスノロウイルスを 1.0×10^7 copies 添加した。ここで添加したマウスノロウイルスには、日本大学生物資源科学部の遠矢幸伸教授より分与されたマウスノロウイルス S7-PP3 株を用いた。その後、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。最後に遠心分離 (9,100 × g, 12 分) 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、1 週あたり 3 つのコンポジットとした。ウイルス抽出液 500 μL に対して pH 2.5 クエン酸バッファー (400 mM) を 500 μL 添加した後、遠心分離 (9,100 × g, 12 分) を行い、その上清の全量を RNA の抽出に用いた。

c) ウイルス RNA 抽出

NucliSENS miniMAG (bioMérieux) を用いてウイルス RNA を抽出・精製し、約 50 μL のウイルス RNA を得た。操作は付属のプロトコルに従った。

d) cDNA 合成

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。反応溶液の組成は、5 × iScript advanced reaction mix 8 μL, iScript advanced reverse transcriptase 2 μL, スクレアーゼフリー水 10 μL, テンプレート RNA 20 μL と

表-1. 定量 PCR のプライマーとプローブの組成

検出対象	プライマー及びプローブ	終濃度 (nM)
MN ¹²⁾	フォワードプライマー	MKMNV-F 400
	リバースプライマー	MKMNV-R 400
	TaqMan プローブ	MKMNV-TP 300
NoVG ¹³⁾	フォワードプライマー	COG1F 400
	リバースプライマー	COG1R 400
	TaqMan プローブ	RING1(a)-TP 300 RING1(b)-TP 100
NoVGII ¹⁴⁾	フォワードプライマー	COG2F 400
	リバースプライマー	COG2R 400
	TaqMan プローブ	ALPF 400 RING2AL-TP 200
PMMoV ⁷⁾	フォワードプライマー	PMMoV-F 400
	リバースプライマー	PMMoV-R 400
	TaqMan プローブ	PMMoV-TaqMan 125
AiV ¹⁵⁾	フォワードプライマー	AiV-F2 400
	リバースプライマー	AiV-R2 400
	TaqMan プローブ	AiV-univ2_s-TaqMan 300

MNVはマウスノロウイルスを、NoVはノロウイルスを表す。

した。反応には T100 サーマルサイクラー (BIO-RAD) を用いた。反応条件は付属のプロトコルに従った。

e) 牡蠣に蓄積したウイルスの定量

逆転写された cDNA から、リアルタイム PCR によるウイルスの定量を行った。本研究では、マウスノロウイルス、ノロウイルス GI, ノロウイルス GII, PMMoV, AiV について定量を行った。各ウイルスの定量 PCR に用いたプライマーとプローブの組成を表-1 に示す。リアルタイム PCR 試薬には SsoAdvanced Universal Probes Supermix (BIO-RAD) を用いた。分析結果においては、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。陽性対照として、マウスノロウイルス、PMMoV, AiV については対象配列を含むオリゴ DNA を、ノロウイルス GI および GII については国立感染研究所より分与された陽性対照 DNA の 10 倍希釈系列 ($10^1 \sim 10^5$ copies) を使用し、x 軸を初期鋳型量、y 軸を Cq 値とし検量線を作成した。陰性対照にはヌクレアーゼフリー水を使用した。サンプルと対照検体からのウイルス検出はデュープリケートで行い、その幾何平均値を用いた。リアルタイム PCR 解析システムには CFX96 Touch リアルタイム PCR 解析システム (BIO-RAD) を用いた。

なお定量の際の cDNA 増幅阻害の程度を確認するため、ヌクレアーゼフリー水で 10 倍に希釈した cDNA についても定量を行った。cDNA 増幅阻害が無い場合、10 倍希釈した cDNA の Cq 値から希釈しない cDNA の Cq 値を引いた値は、理想的には式 (1) で求められる検量線の傾きと一致する。

$$Cq = (\text{傾き}) \times \log(\text{初期 cDNA 濃度}) + (\text{切片}) \quad (1)$$

Cq 値の差が検量線の傾きから 0.5 を引いた値よ

りも小さくなった場合に、cDNA 増幅阻害があったと考え、10 倍希釈した cDNA の定量値を採用することとした。

f) ウイルス回収率

サンプルに内部標準として添加したマウスノロウイルスの定量値を、本来のマウスノロウイルス添加量で除することにより、ウイルス回収率を算出した (式 (2))。

$$\frac{\text{サンプルからのマウスノロウイルス定量値}}{\text{マウスノロウイルス添加量}} \times 100 = \text{ウイルス回収率} \quad (2)$$

測定した全てのサンプルについてのウイルス回収率の結果を Tukey の箱ひげ図にまとめ最大値および最小値を算出した。その範囲にウイルス回収率が収まらなかったサンプルを異常値として除外した。また、回収率が 10% を下回ったサンプルも同様に異常値と判断した。

(3) ノロウイルス GI, GII と PMMoV の牡蠣へ蓄積するまでの損失の比較

ノロウイルス GI, GII と PMMoV は、環境中において日射による不活化や、他の懸濁物質への吸着などが起こりうる。これらが原因で起こるウイルスの損失の程度を比較するため、ノロウイルス GI と PMMoV, ノロウイルス GII と PMMoV の未処理下水中の RNA 量の比と、牡蠣中での RNA 量の比をそれぞれ比較した。未処理下水中のウイルス量のデータは、対象とした湾に流入する河川沿いに存在する下水処理場の未処理下水のデータであり、東北大学大村達夫教授から提供を受けた。ノロウイルス GI およびノロウイルス GII の未処理下水中、牡蠣中でのそれぞれの RNA 量を、PMMoV の RNA 量で割り、その値の対数を取り比較を行った。

(4) ノロウイルス汚染の指標としての PMMoV の活用法の検討

本研究では AiV や PMMoV の蓄積量をモニタリングすることで、ノロウイルスが蓄積しはじめる時期を大まかに予測することを目指している。

実際の指標としての活用法として、PMMoV を対象に、二つの方法を検討した。一つ目は指標とするウイルスの RNA 量からノロウイルスの RNA 量を推定する方法であり、ノロウイルス GI, GII に対する PMMoV の相関をとり、どちらのウイルスも検出されたサンプルより相関係数を算出した。強い相関が認められれば、指標とするウイルスの RNA 量からノロウイルスのおおよその RNA 量を導くことが出来る。二つ目は指標とするウイルスの RNA 量から

図-1. 各サンプルのウイルス回収率の Turkey の箱ひげ図。マーカーは外れ値を表す。

ノロウイルスの陽性率を推定する方法であり、PMMoV の RNA 量について、10 倍の幅でサンプルを階級分けし、その階級ごとにノロウイルス GI と GII の陽性率を算出した。これにより、指標とするウイルスの RNA 量の大小でノロウイルスの陽性率を把握できるかどうかを検討した。

3. 結果と考察

(1) ウイルス回収率の結果

測定した全てのサンプルについてのウイルス回収率の結果を Tukey の箱ひげ図にまとめた。その結果を図-1 に示す。ウイルス回収率は、第 1 四分位が 28.1%、中央値が 238.2%、第 3 四分位が 451.7% であり、また、log 値の平均が 1.93 (85.6%)、標準偏差が 1.0 であった。中には 1000% を超えるような非常に回収率の高いサンプルが見られた。その理由として、一つには牡蠣からの抽出操作を経た cDNA は、qPCR のデュプリケートの結果を比較した場合に Cq 値の 95% 信頼区間の上限が 1.4Cq となっており、真値から 2.6 倍程度の測定のバラツキが生じてしまっていたことが挙げられる。その他の要因として、MNV のストック溶液に含まれる宿主細胞や培地に由来する成分が幾分か cDNA 増幅を阻害してしまい、マウスノロウイルス添加量が実際よりも低く測定されて回収値が高くなってしまった可能性が考えられる。本研究において算出した MNV の回収率は、ウイルスの回収率が他のサンプルと比較して非常に

低くなってしまったデータを検知するために使用した。

各サンプルのウイルス回収率について四分位範囲を求め、それより最大値及び最小値を算出した。その結果、最大値が 2596.5%、最小値が 0.01% となった。ここで便宜的な最小値を 10% とし、ウイルス回収率が最大値を超えるあるいは最小値を下回るサンプルを異常値と判断し、以下の分析対象より除外した。

(2) 牡蠣中のウイルスの経時的変化

各ウイルスの検出結果を図-2 に示す。

a) ノロウイルスの検出結果

ノロウイルス GI は、2014 年 12 月初旬まではほとんど検出されなかった (図-1)。12 月中旬より検出頻度が上がり、2015 年 3 月まで 10^2 copies/g-中腸腺から 10^3 copies/g-中腸腺で検出された。2015 年 4 月以降も RNA 量に変化は無かったが、検出されない週が増えた。

ノロウイルス GII は、2014 年 12 月までは 10^2 copies/g-中腸腺以下で推移しているが、非検出の週も多かった。2014 年 12 月より陽性検体数が増加し、2015 年 1 月よりそれに続く形で RNA 量が増加し、ピーク時には 10^4 copies/g-中腸腺を超えた。2015 年 3 月上旬から RNA 量が減少し始めたが、増加前の時期よりも高い RNA 量の 10^2 copies/g-中腸腺から 10^3 copies/g-中腸腺で推移していた。また、陽性検体数も減少せず、3 個のままであった。その後 2015 年 4 月下旬以降、陽性検体数が減少し、非検出の週が出てきた。

本研究と同様に、牡蠣からノロウイルスを検出した先行研究¹⁶⁾と比較すると、今回の定量値が 10 倍程度高い傾向が見られた。この理由として、本研究で調査した牡蠣の汚染が強度であったか、あるいは牡蠣の汚染は本研究と先行研究とで同程度であったが検出手法が異なるためにウイルス量の測定値に差が出たかのどちらかであると考えられる。後者であれば、サンプルの処理過程において酵素溶液を加えたことにより、より高感度でウイルスを検出できたものと考えられる。

b) PMMoV の検出結果

PMMoV は全ての週で検出され、陽性検体数もほとんどの週で 3 個 (100%) であった。RNA 量は 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 10^5 copies/g-中腸腺付近で推移している。2014 年 12 月中旬からは 10^6 copies/g-中腸腺付近、2015 年 1 月中旬以降はさらに増加し、 10^7 copies/g-中腸腺を超えた。2015 年 2

図-2. 各ウイルスの検出結果. 棒グラフは陽性検体数, 折れ線グラフはウイルスが検出された検体中でのウイルス RNA 量の幾何平均値, 縦軸の 0 は非検出を示す. NoV はノロウイルスを表す.

月以降は再び 10^6 copies/g-中腸腺付近で推移していた. 2014 年 11 月下旬から 12 月上旬に標準偏差が大きくなっているのは, ウイルス RNA 量が増加し始めた個体と増加していない個体で差が大きくなったためではないかと考えられる. これはノロウイルスにおいても見られた傾向であるが, PMMoV においてはノロウイルスよりも標準偏差が大きい結果となり, 個体間のばらつきが大きかったと考えられる. PMMoV の RNA 量は 12 月の第 1, 2 週に最も大きな標準偏差となっており, 次の 3 週目から明瞭な RNA 量の上昇がみられた. ここで, 12 月の第 1, 2 週の平均値はそれ以前よりも低いあるいは同程度の値を示しており, RNA 量が増加し始める前になんらかの理

由で一旦 RNA 量が減少した牡蠣が存在した可能性がある. あるいは偶然この 2 週に RNA 量が低い牡蠣がサンプリングされたために標準偏差が過剰に大きくなった可能性も想定すべきであろう. また 11 月以前の RNA 量が低い時期には標準偏差が比較的大きく, この時期にはほとんど非検出で定量できなかったノロウイルスの量も, おそらくは標準偏差が大きかったと予想される. ノロウイルスが非流行期に散発的に検出された場合に, それは必ずしも養殖されている牡蠣全ての RNA 量が上昇したことを示さないと思われる.

c) AiV の検出結果

AiV は 2015 年 12 月までは検出されない週が多

図-3. 下水中および牡蠣中のノロウイルスと PMMoV の RNA 量の比率. NoV はノロウイルスを表す.

く、RNA 量は 10^2 copies/g-中腸線から 10^3 copies/g-中腸線であった。2015 年 1 月から 2 月においては毎週検出された。3 月以降は再び検出されない週が見られ、5 月以降は全く検出されなかった。時期によっては検出頻度が高いものの、PMMoV と比較すると非検出が多い事が分かる。

d) 各ウイルスの比較

各ウイルス検出の結果を比較する。

PMMoV が 4 月下旬まで RNA 量を維持していたのは、ノロウイルス GII と同じ傾向であった。一方で、PMMoV は 5 月以降も高い値を維持していた。これはノロウイルスとは異なる傾向である。各ウイルスの増加のタイミングは必ずしも一致しないが、いずれのウイルスも、12 月から 1 月の間において RNA 量や陽性率が上昇していた。このことから、12 月頃あるいはその少し前から牡蠣のウイルス汚染の度合いが次第に強まっていたと推察される。このように牡蠣のウイルス汚染が進行する中、本研究で行われた週ごとのモニタリングの結果から、RNA 量に先んじてまず陽性率が上昇し、少し遅れて RNA 量が増加し始める、という傾向が示された。しかし減少の時期に関しては、PMMoV、AiV が 2015 年 2 月頃から減少し始めるのに対し、ノロウイルス GII は 1 か月ほど遅れて 2015 年 3 月頃より減少を開始していた。ノロウイルス GII については、調査海域周辺の地域において 1 月から 2 月にかけて多くの患者の発生が報告されており、牡蠣中の RNA 量は患者数に合わせた変動を示していた。また、ノロウイルスの中には牡蠣の体内へ特異的に結合する特性を有するものがあり、このこともノロウイルス GII の牡蠣中の RNA 量が高い時期が長く続くことと関連する

かもしれない。しかしながら、流行状況を考慮しつつ考えると、カキ中の RNA 量が高い時期は、特異性の影響を支持するほど長くは続かなかったと考えられる。先行研究⁹⁾においても、牡蠣よりノロウイルスが検出される時期には、同時に AiV も検出されており、二者の季節性には共通点がある事が分かる。PMMoV については、牡蠣からウイルスの検出を行ったのは本研究が初めてである。PMMoV はヒトの糞便中に大量に存在するが、宿主は植物であり、下水以外からの流入があった可能性は否定できない。また Rosario らは、鳥の糞便中から PMMoV が検出されたと報告しており⁷⁾、鳥などが起源となっている可能性も考えられる。しかしながら Rosario らは同論文内で、鳥の糞便中の PMMoV 量はヒト糞便中の PMMoV 量よりも少なかったと報告している。また下水中において PMMoV が比較的高い濃度で検出されているため、下水からの流入を上回る濃度の PMMoV が他の起源から流入してきたとは考えづらく、PMMoV は下水由来であったと考えるのが妥当である。

(3) ノロウイルス GI, GII と PMMoV の牡蠣へ蓄積するまでの損失の比較の結果

以上の観測結果からは、PMMoV が牡蠣中でのノロウイルスの RNA 量の変動を示す指標としての有効性が示された。牡蠣に蓄積するノロウイルスや PMMoV の主たる起源は人の糞便であり、それが集約される下水であると想定されている。そこで、ノロウイルス GI と PMMoV、ノロウイルス GII と PMMoV の下水中の RNA 量の比と、牡蠣中での RNA 量の比をそれぞれ比較した。

結果を図-3に示す。ノロウイルス GI, GII のどちらについても、PMMoV との RNA 量の比では牡蠣で下水よりも小さくなった。このことから、下水中のこれらのウイルスが牡蠣まで到達して蓄積されるまでの効率は、ノロウイルスの方が PMMoV よりも低いと言える。時期によってばらつきはあるものの、今回の結果では、下水と牡蠣における両者の存在比は 20~1000 倍程度の差が見られている。下水処理施設におけるノロウイルス GI および GII の処理効率は、PMMoV のおおよそ 10 倍程度である¹⁷⁾。また、環境中においては、ウイルスに対して日射による不活化や、他の懸濁物質への吸着などが起こりうる。Flannery らによれば、海水中でノロウイルス GII が 1log 減少するのにかかる時間は、夏の日照条件下で 20.5 時間、暗条件下で 41.0 時間、冬の日照条件下で 83.9 時間、暗条件下で 101.5 時間と報告されており、ノロウイルス GI もこれとほぼ同等の値が報告されている¹⁸⁾。また、Rosario らによれば、PMMoV の海水での生残性は、31~33℃ の高温環境であっても 1log 減少するのに 5 日以上かかるとされている⁷⁾。さらに、Hamza et al. (2011) によれば、河川水中での観測であるが、PMMoV は 25℃ において 21 日で 1.1log 減少した¹⁹⁾。したがって、日照あり/なしでの値の平均を取って計算すると、冬場のノロウイルスの生残性と夏場の PMMoV の生残性を比べたとしても、1log 程度減少するのにおよそ 1~15 日程度の差があると言える。ここで、指数関数的な減少を仮定すると、PMMoV は夏場に 1 日で 0.05~0.2log 程度減少する一方、GII は夏場に 1 日で 0.81log 減少、冬場に 1 日で 0.26log 減少する。すなわち、PMMoV の方が GII よりも海水中での減少の比速度は 4~16 倍程度遅いと考えられる。環境中におけるウイルスはおおむね指数関数的に減少すると考えられるため、処理後の下水が放流され牡蠣まで到達するまでの時間、あるいは下水処理場から牡蠣までの距離は、牡蠣中のノロウイルスと PMMoV の RNA 量の比に影響するであろうし、ウイルス RNA 量自体にも影響するであろう。本研究のサンプリング地点は河口から 3.2km 程度離れた地点であった。この他に、牡蠣がウイルスを取り込む効率や排出する効率も牡蠣中の RNA 量に関わってくると考えられる。例えば、Dancer et al. によると、牡蠣が周囲のノロウイルス GI の濃度を 141 時間で 1log 減少させるような速度で取り込んでいたと報告されている²⁰⁾。また、Choi and Kingsley によると、清浄な水環境中において、牡蠣中のノロウイルス量は、6 週間のうちに 7℃ にて 1.6log 程度減少、15℃ にて 2.2log 程度減少したとされている²¹⁾。PMMoV についてはこのような牡蠣に

よる取り込みや排出に関する知見がないが、詳細な比較分析を行うためには必要となってくるであろう。

(4) ノロウイルス汚染の指標としての PMMoV の活用法の検討

ウイルスの検出結果より、AiV は検出頻度、RNA 量共にノロウイルスと同程度であり、汚染指標としての利用価値は低いことが示された。一方で、PMMoV は検出頻度、RNA 量共に高く、汚染指標として活用できる可能性が十分に高いことが示された。したがって、ノロウイルス汚染の指標としての活用法の検討は、AiV に関しては行わず、PMMoV に関してのみ行った。

a) PMMoV の RNA 量からノロウイルスの RNA 量を推定する方法の検討

同一コンボジットについての PMMoV 量とノロウイルス GI 量および PMMoV 量とノロウイルス GII 量の相関図を図-4に示す。なお、どちらかのウイルスが非検出だったサンプルについては、非検出だったウイルスの RNA 量に検出下限値を当て、マーカーを白抜きにした。

PMMoV とノロウイルス GI の間には有意な相関は見られなかった。また、PMMoV とノロウイルス GII の間には有意な相関がみられたが、相関係数は大きくなかった ($r = 0.62$)。時期によって相関が変動する可能性を考慮し、ノロウイルスが増加を始める 11 月から 12 月のデータを取り出して検証を行ったが、これらにおいても相関係数は大きくなかった。このことから、PMMoV の RNA 量よりノロウイルスの RNA 量を推定するのは難しいと判断した。

b) PMMoV の RNA 量からノロウイルスの陽性率を推定する方法の検討

同一コンボジットについての PMMoV の量とノロウイルス GI の陽性率および PMMoV 量とノロウイルス GII の陽性率の関係を表-2に示す。

PMMoV の RNA 量が 10^5 copies/g-中腸線を超えると、ノロウイルス GII の陽性率は急激に高くなり、 10^6 copies/g-中腸線以上ではノロウイルス GI の陽性率も高い値を示した。PMMoV の RNA 量が 10^7 copies/g-中腸線を超えると、ノロウイルス GI の陽性率はおおよそ 78%、ノロウイルス GII の陽性率はおおよそ 89% とさらに高い値となっている。この時の養殖牡蠣は、ウイルス検出検査をするまでもなく、高い確率でノロウイルス陽性であると考えられる。よって検査を省略し、すぐに出荷の制限などの対策をとるべきである。

一方で PMMoV の RNA 量が 10^5 copies/g-中腸線

図-4. PMMoV 量と (A) ノロウイルス GI 量および (B) ノロウイルス GII 量の相関図。PMMoV とノロウイルスが共に検出されたものについては黒塗りで、いずれかが非検出であったものについては白抜きで示している。また、非検出の項目については検出下限値を当てた。

表-2. PMMoV 量とノロウイルス GI の陽性率および PMMoV 量とノロウイルス GII の陽性率の関係

		PMMoV 量 (copies/g-中腸線)			
		10 ⁴ ~10 ⁵	10 ⁵ ~10 ⁶	10 ⁶ ~10 ⁷	10 ⁷ ~10 ⁸
NoVGI	全ての検体数	15	60	15	9
	陽性検体数	0	12	13	7
NoVGII	陽性率(%)	0.0	20.0	86.7	77.8
	陽性検体数	3	58	15	8
	陽性率(%)	20.0	96.7	100.0	88.9

未満の時、ノロウイルス GI の陽性率は 0%、ノロウイルス GII の陽性率は 20% となっている。低い値ではあるが、ノロウイルス GII に関してはウイルスの蓄積した牡蠣が存在している可能性がある。そのため陽性の牡蠣を見落とさないよう厳密な検査を行う必要がある。

PMMoV は RNA 量が高いため、本研究での検出法よりも簡易な方法で検出できる可能性がある。簡易な検出法とこの方法を用いることで、ノロウイルスそのものを検出するよりも時間や費用を削減できるのではないか、というのがこの方法のアイデアである。

実際の簡易な検出法としては、ウイルス抽出液に対して ELISA 法を用いて PMMoV の濃度を測定する方法が考えられる。ELISA 法はリアルタイム PCR 法よりも検出限界値が高く、牡蠣中のノロウイルスは量が少ないために ELISA 法での検出および定量は困難である。一方、PMMoV はノロウイルスに比べ濃度が高く、ELISA 法を用いて検出できる可能性があり、結果として時間や費用の削減に繋がると考えられる。

糞便中に含まれるウイルスは、糞便に含まれるノロウイルス等の汚染の指標とするのに有効である。特に PMMoV は下水中に高い濃度で存在しており、定量感度の観点から検出が容易な指標として用いることができる。ノロウイルスの汚染を反映する指標

としては、しかしながら、下水及びその影響を受ける水域におけるノロウイルスの濃度が感染症の流行に合わせて変動するために、あくまで糞便汚染の指標としてしか機能せず、感染症流行に伴う変動までは反映しないものと、一般的には想定されるべきであろう。この想定に反して、本研究では、牡蠣中の PMMoV の RNA 量がノロウイルスとほぼ同じ時期に上昇し、正確に同期しないまでも、ある程度似通った変動が見られることが示された。この結果の解釈としては、本研究における調査の時期に、偶然 PMMoV の RNA 量の変動がノロウイルスと似通った変動を示したという可能性も考えられる。それゆえ、本実験で示唆された傾向が一般にみられるかどうかを結論づけるためには、さらなる検証を必要とする。一方、PMMoV とノロウイルス、AiV が共にある程度似通った変動を示すことが一般的な現象であるとしたら、その理由は、例えば人間の体の都合で冬場の環境に起因するなんらかの影響でウイルスを多く排泄しやすい体になる可能性や、一般にウイルスが冬場に環境中で生存しやすくなるという影響を受けている可能性が考えられる。後者に関しては、冬場に生残性が増すことがノロウイルスの流行の一因となっているともいわれていることから、PMMoV はノロウイルスを含めた一般的なウイルスの生残性を示唆する指標として見ることができ、そのために牡蠣中の RNA がある程度似通った変動示したのかもしれない。

4. 結論

本研究では、PMMoV および AiV が、養殖牡蠣のノロウイルス汚染指標として利用できる可能性を調

べた。その結果、AiV は検出頻度、RNA 量共にノロウイルスと同程度であったため、ノロウイルス汚染の指標として活用できる可能性は低いと考えられる。PMMoV は検出頻度や RNA 量がノロウイルスよりも高く、またノロウイルスと同様の季節性を示した。したがって、PMMoV はノロウイルス汚染の指標としての利用可能性が高いことが明らかになった。

実際の活用法としては、PMMoV とノロウイルスの RNA 量には強い相関は見られず、PMMoV の RNA 量からノロウイルスの RNA 量を推定するのはやや難しい。一方、PMMoV の RNA 量とノロウイルスの陽性率を比較することにより、PMMoV の RNA 量が低い時には厳密な検査を行い、PMMoV の RNA 量が高い時には、検査を省略しすぐにノロウイルス汚染の対策をとる、といった活用方法が有効であるかもしれない。

以上の結果は 1 シーズンのみのデータに基づく結果であり、今後もウイルスの検出と定量を重ね、その妥当性を確認していくことが望まれる。

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

- 1) 厚生労働省：食中毒統計調査, 2014.
- 2) 佐藤裕徳：ヒトノロウイルスの生存戦略, ウイルス, 1, 60, pp.21-32, 2010.
- 3) 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, 4, 71, pp.535-541, 2005.
- 4) 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.
- 5) 植木洋, 秋山和夫, 渡部徹, 大村達夫：遺伝子相同性にもとづく *Norovirus* (NV) のカキへの汚染経路の判明, 環境工学研究論文集, 40, pp.607-616, 2003.
- 6) 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), 7, 69, pp. 657-665, 2003.
- 7) Rosario K., Symonds E. M., Sinigalliano C., Stewart G. and Breitbart M. : *Pepper mild mottle virus* as an indicator of fecal pollution, *Applied and Environmental Microbiology*, 22, 75, pp.7261-7267, 2009.
- 8) 山下昭夫：新型ピコルナウイルス「アイチウイルス」

の性状と疫学, ウイルス, 2, 49, pp.183-191, 1999.

- 9) Le Guyader F. S., Le Saux J. -C., Ambert-Balay K., Krol J., Serais O., Parnaudau S., Giraudon H., Delmas G., Pommepuy M., Pothier P. and Atmar R. L. : *Aichi virus, Norovirus, Astrovirus, Enterovirus, and Rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak*, 12, 46, pp.4011-4017, 2008.
- 10) 花田薫：植物性ウイルスの特性とその保存について, 微生物遺伝資源利用マニュアル, 31, 2012.
- 11) 津田新哉：園芸作物の土壤伝染性ウイルス病について.
- 12) Hata A., Katayama H., Kitajima M., Visvanathan C., Nol, C. and Furumai H. : Validation of internal controls for extraction and amplification of nucleic acids from enteric viruses in water samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 13, 77, pp.4336-4343, 2011.
- 13) Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushima S., Hoshino F. B., Takeda N. and Katayama K. : Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 4, 41, pp. 1548-1557, 2003.
- 14) 原 正幸, 矢野 一好, 宇田川悦子：Real time PCR を用いたノロウイルスの遺伝子定量比較 (genogroup II), 感染症学会誌, 4, 82, pp.354-356, 2008.
- 15) Kitajima M., Hata A., Yamashita T., Haramoto E., Minagawa H. and Katayama H. : Development of a reverse transcription-quantitative PCR system for detection and genotyping of *Aichi viruses* in clinical and environmental samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 13, 79, pp.3952-3958, 2013.
- 16) Nishida T., Nishio O., Kato M., Chuma T., Kato H., Iwata H. and Kimura H. : Genotyping and quantitation of *Noroviruses* in oysters from two distinct sea areas in Japan, *Microbiology and Immunology*, 2, 51, pp.177-184, 2007.
- 17) Kitajima, M., Iker, B. C., Pepper, I. L. and Gerba, C. P. : Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes—Identification of potential viral indicators, *Science of The Total Environment*, pp.290-296, 2014.
- 18) Flannery J., Keaveney S. K., Rajko-Nenow P., O'Flaherty V., and Dore W. : Concentration of *norovirus* during wastewater treatment and its impact on oyster contamination, *Journal of Applied Microbiology*, 115, pp. 915-922, 2013.
- 19) Hamza I. A., Jurzik L., Überla K. and Wilhelm M. : Evaluation of *pepper mild mottle virus*, *human picobirnavirus* and *Torque teno virus* as indicators of fecal contamination in river water, *Water Research*, 45, pp.

- 1358-1368, 2011.
- 20) Dancer D., Rangdale R. E., Lowther J. A., and Lees D. N. : Human *norovirus* RNA persists in seawater under simulated winter conditions but does not bioaccumulate efficiently in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*), *Journal of Food Protection*, 73, pp.2123-2127, 2010.
- 21) Choi C., and Kingsley D. H. : Temperature-dependent persistence of human *norovirus* within oyster (*Crassostrea virginica*), *Food Environmental Virology*, 73, pp. 2123-2127, 2016.

(2016. 5. 26 受付)

ACCUMULATIONS OF PEPPER MILD MOTTLE VIRUS AND AICHI VIRUS IN OYSTER AND THEIR POTENTIALS AS INDICATOR OF NOROVIRUS CONTAMINATION

Erika ITO, Hiroaki ITO, Jian PU, Gia Thanh NGUYEN, Toru WATANABE

Pepper mild mottle virus (PMMoV) and *Aichi virus* were detected from cultivated oysters and their potential as indicator for *Norovirus* contamination of oysters were examined. Both of the detection frequency and amount of RNA of PMMoV in oysters were higher than those of *Norovirus*, showing a potential of PMMoV as the *Norovirus* indicator. Then, we proposed a practicable usage of PMMoV to estimate the probability of *Norovirus*-positive oysters. When PMMoV are detected at a high concentration than 10^6 copies/g-DT, indicating over 77% of oysters contaminated with *Norovirus*, we can skip the detection of *Norovirus* to reduce the time and cost for test.