

ノロウイルスを用いたマガキへの取り込み試験の評価

Evaluation of the uptake of Noroviruses by *Crassostrea gigas*

庄司 美加 菊地奈穂子*¹ 山木 紀彦*²
 後藤 郁男 植木 洋 沖村 容子
 秋山 和夫*³ 須藤 篤史*⁴ 酒井 敬一*⁵

Mika SHOJI, Naoko KIKUCHI, Norihiko YAMAKI
 Ikuo GOTO, You UEKI, Yoko OKIMURA
 Kazuo AKIYAMA, Athushi SUTO, Keiichi SAKAI

ノロウイルス (Norovirus : NoV) の代替ウイルスとして一般的に用いられているネコカリシウイルス (Feline calicivirus F4 : FCV F4) と感染性胃腸炎患者便から調整したNoVを用いてマガキへの取り込み実験を行った。その結果、両ウイルスともマガキへの取り込みは48時間にピークが認められた。またマガキへのウイルス取り込み量と中腸線重量との間には、明らかな関係は認められなかった。

キーワード：ノロウイルス；ネコカリシウイルス；マガキ；取り込み試験

Keywords : Norovirus ; *Feline calicivirus F4* ; oysters ; investigation test

1 はじめに

NoVによる食中毒では、主に生カキなどの二枚貝が推定原因食品¹⁾²⁾になる事例が多い。全国有数のカキ生産県である本県は、安全なカキを提供するために、NoVの汚染防止やNoVによって汚染された養殖カキの浄化対策に取り組んでいる。しかしNoVは培養法が確立されていないために、NoVを用いてマガキへの取り込み試験および浄化試験を行うのは困難である。そこで我々はこれまでに同じカリシウイルス科に属し、培養可能で、しかも形態や紫外線、塩素等に対する抵抗性が類似しているFCV F4を用い、取り込みや浄化を検討してきた³⁾。しかし、NoVとFCV F4では宿主および臓器指向性に大きな違いがあるためにFCV F4での実験結果が直接NoVに反映されることは考えにくい。そこで感染性胃腸炎患者便由来のNoVを用いてのマガキへの取り込み試験を行い、FCV F4の取り込み試験との比較を行ったので報告する。

2 材料

2.1 供試ウイルス

FCV F4は、Crandall's feline kidney cells (CrFK) に接種後、37℃、48時間、CO₂インキュベーターで培養し、CPEが確認された細胞の培養液をプールし、-80℃に保

存した。

NoVは、感染性胃腸炎患者便を用いて約10%乳剤を作製し上清をウイルス液とした。ウイルス液は使用までに4℃に保存した。

2.2 マガキ及び海水

マガキは宮城県内のA湾内で2年間養殖されたものを用いた。マガキの飼育やウイルス取り込み試験には、砂ろ過海水を使用した。

2.3 植物プランクトン

植物プランクトンは*Chaetoceros gracilis* (Cg) を用いた。

3 取り込み試験

200Lのパンライト水槽に砂ろ過海水を入れ、植物プランクトンと供試ウイルスを添加した。一時間混和した後、県産マガキを投入した。供試ウイルス、Cg入り砂ろ過海水は24時間毎に交換した。なお、ウイルスの取り込みは72時間まで行った。また、マガキは24時間毎に10個ずつサンプリングした。海水温はカキの出荷時期で、かつNoVの汚染頻度が高くなる冬季の海水温に近い10℃で行った⁴⁾。なお、取り込み試験中はエアレーションを行った。

4 ウイルスの濃縮及び遺伝子定量

4.1 ウイルス濃縮

経時的に採取した海水及びマガキは、それぞれの方法でウイルスの濃縮、回収を行った。海水はPolyethylen

* 1 仙南・仙塩広域水道事務所
 * 2 仙台保健福祉事務所黒川支所
 * 3 財宮城県公衆衛生協会
 * 4 宮城県水産研究開発センター
 * 5 漁業振興課

Glycolを最終濃度10%になるように加え、4℃1晩攪拌後9,200×g 30分間遠心し、沈渣をDW 1mlで浮遊した検体を濃縮液とした。マガキは個々に中腸腺を取り出し、φ3.2mmのステンレスビーズ入りの5mlのアシストチューブに入れ、4,500rpm 60秒間破碎後、9,200×g 10分間遠心した上清をウイルス回収液とした。

4.2 ウイルス定量

ウイルスを濃縮、回収した検体からQIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) により、RNAを抽出しDNase処理後、逆転写反応を行い、cDNAを作製し、定量PCRを実施した。FCV F4 遺伝子の定量PCRについて山木らの方法⁵⁾ に準じて行った。またNoVについては、景山らの方法⁶⁾ で実施した。

5 結果及び考察

5.1 ウイルスの取り込み状況

NoV及びFCV F4 のマガキ中腸腺 1 g あたりの平均取り込み量の経時的变化を図1に示した。NoVの取り込み量は24時間後 1.7×10^4 copies/g、48時間後 2.2×10^5 copies/g、72時間後 1.4×10^5 copies/gを示した。一方FCV F4 は取り込み24時間後 2.6×10^3 copies/g、48時間後 5.2×10^3 copies/g、72時間後 2.2×10^3 copies/gを示し両ウイルスとも48時間で取り込み量のピークが確認された。

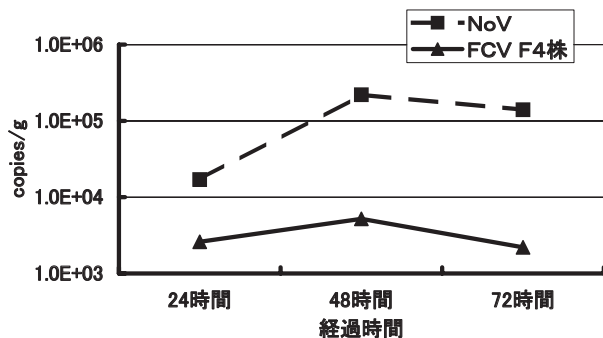


図1 マガキの経時的ウイルス取り込み状況

5.2 マガキのウイルス取り込み量と中腸腺重量の関係

マガキへのウイルスの取り込みと中腸腺の重量について調べた結果を図2 (NoV) 及び図3 (FCV F4) に示した。この二つグラフから明らかなように両ウイルスともマガキのウイルス取り込み量と中腸腺重量の間には、相関関係は確認されなかった。

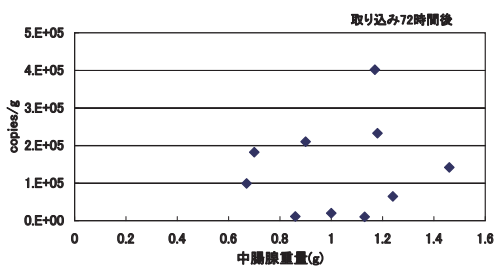


図2 マガキのNoV取り込み量と中腸腺重量

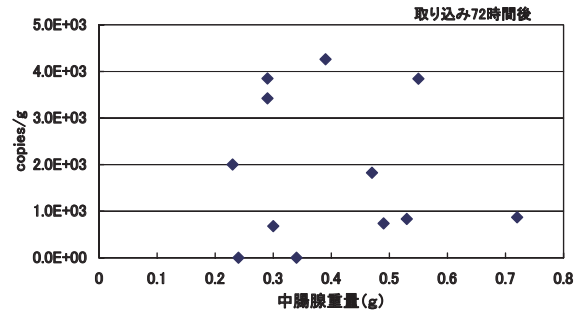


図3 マガキのFCV F4 取り込み量と中腸腺重量

5.3 ろ過海中のウイルス量とマガキの取り込みウイルス量の関係

ウイルスによるマガキへの取り込みの違いについて検討するため、ろ過海中のウイルス遺伝子量と経時的に採取したマガキ10個体のウイルス遺伝子の合計量の割合を比較した結果を図4に示す。割合は下式を用いて算出した。

$$\text{割合(\%)} = \frac{\text{マガキ取り込みウイルス量}}{\text{ろ過海水(カキ投入直前)ウイルス量}} \times 100$$

それぞれのウイルスで比較した結果、取り込み開始24時間では、NoVは0.2%、FCV F4 は0.4%、取り込み開始48時間では、NoVは8.7%、FCV F4 は2.4%、取り込み開始72時間では、NoVでは2.6%、FCV F4 は2.4%となり、取り込み開始24時間と72時間では両ウイルスともほぼ同じ割合を示していたが、48時間ではNoVがFCV F4 の3.6倍高い値を示した。ウイルスの違いがマガキの取り込みに及ぼす影響については浄化法を確立する上で非常に重要であるので、今後評価方法も含め検討する必要がある。

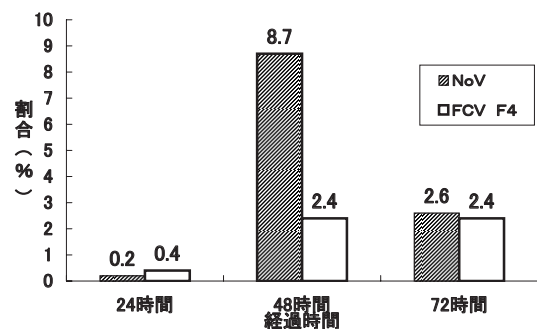


図4 ろ過海水とマガキ取り込みウイルス量の割合

6 まとめ

今回は、これまでに報告例のないNoVを用いてマガキへの取り込み試験を行い、FCV F4 の取り込みと比較検討を行った。その結果、両者ともに取り込み量は中腸腺の重量に依存していないことが明らかになるとともに、NoVとFCV F4 では取り込みに違いがあることが示唆された。今後その機序について検討する必要がある。

参考文献

- 1) 永安聖二, 千屋誠造, 小松照子, 上岡英和, 崎本祥仁, 阿倍淳介, 堀見雄三, 橋本節夫, 井上泰夫: Rep.Pub.Hlth.kochi, **47**, 41 (2001).
- 2) 西 香南子, 杉山 明, 中山 治, : 三重県保健環境研究部年報, **46**, 65 (2001).
- 3) 山木紀彦, 植木 洋, 伊藤大介, 文谷俊雄, 後藤郁男, 佐藤千鶴子, 渡辺 節, 秋山和夫: 宮城県保健環境センター年報, **21**, 63 (2003)
- 4) 秋山和夫, 野池道子, 佐々木美江, 山口友美, 有田富和, 佐藤千鶴子, 畠山 敬, 沖村容子, 齊藤紀行, 白石廣行: 宮城県保健環境センター年報, **18**, 49 (2000)
- 5) 山木紀彦, 植木洋, 伊藤大介, 文谷俊雄, 菊地奈穂子, 後藤郁男, 沖村容子, 秋山和夫: 宮城県保健環境センター年報, **22**, 50 (2004)
- 6) T. kageyama, S.Kojima, M.Shinohara, K.Uchida, S.Fukushi, F.B.Hoshino, N.Takeda, K.Katayama: Journal of Clinical Microbiology, **41**, 1548 (2003)