

博士学位論文

二枚貝の安全性向上のための  
ヒト腸管系ウイルス蓄積特性の解明

岩手大学大学院連合農学研究科

地域環境創生学専攻

(山形大学配属)

伊藤絵里香



# 目 次

第1章 序論.....	1
1. 1 研究背景および目的.....	1
1. 2 論文の構成.....	2
参考文献.....	3
第2章 既往の研究.....	5
2. 1 感染性胃腸炎.....	5
2. 2 腸管系ウイルス.....	6
2. 3 二枚貝を原因とするウイルス性食中毒.....	9
2. 4 まとめ.....	11
参考文献.....	11
第3章 河口域に自生する二枚貝のノロウイルス汚染状況と周辺地域の感染症流行 状況との関係.....	20
3. 1 はじめに.....	20
3. 2 実験方法.....	21
3. 2. 1 サンプルング方法.....	21
3. 2. 2 ウイルス濃縮・RNA 抽出.....	22
3. 2. 3 逆転写およびウイルスの定量.....	23
3. 2. 4 相関分析.....	24
3. 2. 5 次世代シーケンス解析.....	25

3. 3	結果.....	26
3. 3. 1	ノロウイルス定量結果.....	26
3. 3. 2	相関分析結果.....	27
3. 3. 3	遺伝子型解析結果.....	28
3. 4	考察.....	30
	参考文献.....	32
第4章	養殖牡蠣のロタウイルス野生株およびワクチン株の汚染実態の解明 .....	38
4. 1	はじめに.....	38
4. 2	実験方法.....	39
4. 2. 1	サンプリング方法.....	39
4. 2. 2	ウイルス濃縮・RNA抽出 .....	39
4. 2. 3	逆転写およびウイルスの定量.....	40
4. 2. 4	相関分析.....	42
4. 3	結果.....	42
4. 3. 1	養殖牡蠣および下水中のウイルス定量結果.....	42
4. 3. 2	相関分析結果.....	43
4. 4	考察.....	45
	参考文献.....	48
第5章	牡蠣のウイルス蓄積能力の個体差およびウイルス蓄積に関する糖鎖構造 の探索.....	53

5. 1	はじめに.....	53
5. 2	実験方法.....	54
5. 2. 1	養殖牡蠣のウイルス汚染実験.....	54
5. 2. 2	ウイルス濃縮・RNA 抽出.....	54
5. 2. 3	逆転写およびウイルスの定量.....	55
5. 2. 4	糖タンパク質抽出.....	55
5. 2. 5	糖鎖構造解析.....	56
5. 3	結果.....	58
5. 3. 1	汚染実験によるウイルス蓄積量の定量結果.....	58
5. 3. 2	牡蠣体内の糖鎖構造解析結果.....	60
5. 4	考察.....	60
	参考文献.....	78
第6章	結論および提言.....	82
	参考文献.....	84
	謝辞.....	86

## 要 旨

感染性胃腸炎は世界的に重要な疾病であり、特に、発展途上国ではこの疾病のために毎年多くの小児が死亡している。感染性胃腸炎の病因物質は様々であるが、ウイルスを原因とする胃腸炎の占める割合が高い。胃腸炎を引き起こすヒト腸管系ウイルスの中でも、ノロウイルスやロタウイルスは感染性が強く、ヒトからヒトへ簡単に広がるために、現状では完全な予防は難しい。これらのウイルスに感染した胃腸炎患者は、排泄物とともに膨大な数のウイルスを排出する。排出されたウイルスが下水道等を通して微量ながら海域に流入した結果、海水をろ過する性質がある二枚貝の体内に蓄積されることが、牡蠣のノロウイルス汚染の例で明らかになっている。本研究では、牡蠣以外の二枚貝、そして、ノロウイルス以外のヒト腸管系ウイルスについても、同様に感染性胃腸炎の患者を起源とする汚染経路が成立するか調べることが第一の目的とする。この経路で汚染された二枚貝を浄化する試みが数多く行われているが、二枚貝の体内に蓄積されたウイルスを不活化する、あるいは、体外へ吐き出させることは極めて困難である。従来の対策とは一線を画した抜本的な対策として、ウイルスを蓄積しにくい二枚貝を選別して養殖するアイデアを実現するために、牡蠣のノロウイルス蓄積量と糖鎖構造の関係を明らかにすることを本研究の第二の目的とする。

初めに、二枚貝のウイルス汚染と周辺の感染性胃腸炎流行との関連性を明らかにするため、下水処理水が放流される河口域に自生する牡蠣およびイソシジミを採取し、体内のノロウイルス量を測定した。その結果、牡蠣とイソシジミのどちらについても、体内のノロウイルス量に季節的な変動が見られた。これらの二枚貝に含まれるノロウイルス量は、周辺地域からの下水中のノロウイルス量との有意な相関関係が認められた。一方、二枚貝のウイルス量と感染性胃腸炎患者報告数には有意な相関がなく、医療機関からの報告では把握できない潜在的なノロウイルス感染者の存在が示唆された。これらの感染者は無症状でウイルスを排出するため、二枚貝のウイルス汚染の排出源対策を難しくする存在である。

二枚貝のノロウイルス汚染に関しては比較的多くの先行研究があるが、その他のヒト胃腸炎ウイルスによる汚染については情報が少ない。そこで、ノロウイルスに次いで患者報告数が多いロタウイルス（ここでは、A群ロタウイルスを対象）について、二枚貝の汚染の実態を明らかにした。ロタウイルスには現在、ワクチン（商品名：ロタリックスおよびロタテック）が使用されているため、このワクチン株と区別して、ヒトに病

気を引き起こすことができる野生株を調査した。その際、同一の牡蠣サンプルから、A群ロタウイルスの全株とワクチン株の遺伝子をそれぞれ定量検出し、両者の差を野生株の量とみなした。2年間の研究期間において、ロタリックス株は2年目のサンプルのみ検出されたが、ロタテック株は1年目と2年目の両方で検出された。また、野生株とロタテック株は両者とも冬季にウイルス量が増加する傾向が見られた。このうち野生株については、牡蠣と下水に含まれるウイルス量に有意な相関関係があり、感染者由来のロタウイルス株が養殖牡蠣に効率的に蓄積されていた。

牡蠣の体内には、ノロウイルスが特異的に結合する糖鎖が発現していることが知られている。同じロットの養殖牡蠣でもノロウイルス蓄積量に個体差があることから、ウイルスの蓄積が少ない牡蠣が発現している糖鎖の種類や量を明らかにし、同様の糖鎖構造を有する牡蠣を選別して養殖することができれば、ノロウイルス汚染を著しく低減できる。そこでまず、牡蠣を水槽内でノロウイルス GI.7 株または GII.2 株に人為的に汚染し、そのウイルス量が多い牡蠣および少ない牡蠣を選別し、その体内に発現している糖鎖の種類と量をレクチンアレイ解析によって調べた。GI.7 株と GII.2 株のどちらもケースでも、牡蠣への蓄積量には個体間で 1000 倍を超える差が見られた。GI.7 株の蓄積が多い牡蠣個体では、少ない個体に比べて4種類の糖鎖の発現量が有意に少なかった。一方、GII.2 株の蓄積が多い個体では、9種類の糖鎖の発現量が有意に多く、ノロウイルスに汚染されにくい牡蠣を選別するための重要な情報が得られた。

結論として、ノロウイルスだけでなくロタウイルスでも、二枚貝の汚染には、その地域での感染性胃腸炎の流行が関与していた。無症状者も含めて感染性胃腸炎の流行の把握や予防を確実に行うことが、二枚貝が生息する海域へのヒト腸管系ウイルスの流入を減らし、二枚貝の安全性向上につながる。本研究ではまた、ウイルスに汚染されにくい牡蠣を選別するための牡蠣体内の糖鎖構造に関する基礎的な情報を取得した。今後の研究によって、糖鎖構造にもとづく牡蠣の選別が可能となれば、感染性胃腸炎の流行時であっても安全な牡蠣が出荷できるようになる。この頑強な対策は、生牡蠣の安全性に対する消費者の不安を払拭し、過去の食中毒事例の影響を受け続けている養殖業の振興に貢献することが期待される。

## 第1章 序論

### 1. 1 研究背景および目的

感染性胃腸炎とは、ウイルスや細菌などの感染によって引き起こされる、下痢や嘔吐症状を伴う感染症の総称である。感染性胃腸炎は世界的に重要な疾病の一つであり、ウイルス性の感染性胃腸炎は、例年ノロウイルスによるものが8割以上を占めている(国立感染症研究所, 2020)。その他の原因ウイルスには、ロタウイルスやサポウイルスなどが挙げられる。中でもノロウイルスは感染性が非常に強く、人間社会におけるノロウイルス感染症の流行を完全に防止することは非常に難しい。

これらの胃腸炎の原因となる腸管系ウイルスは、ヒトへ感染すると主に小腸内で増殖する。増殖したウイルスは感染者の嘔吐や下痢によって、吐瀉物や糞便を介して体外へ排出され、生活排水とともに下水処理場へ送られる。下水処理場での消毒過程において90%以上のウイルスは不活化・除去される(Kitajima et al., 2014)。しかしながら、現在の技術では100%ウイルスを除去することはできず、わずかながら残存したウイルスは処理水と共に環境中へ放出されている。

二枚貝は、餌となる有機懸濁物やプランクトンを体内へ取り込むため、大量の海水を濾過する性質を持っている。その際に、海水中に微量に存在するウイルスもまた体内へ取り込んでしまう。海水中のウイルス量は、人間社会での生活利用においては問題ないほどの非常に少ない量であるが(Grøndahl-Rosado et al., 2014)、二枚貝が海水をろ過する際にウイルスも体内に高濃度で蓄積されてしまう。この性質から、ウイルスを体内に濃縮させた二枚貝による食中毒が問題視されている。二枚貝の腸管系ウイルス汚染に関する国の基準や法律はないが、特に牡蠣に関しては、生食される機会が多いことから食中毒事件の原因食品となりやすいため、多くの都道府県が自主的な検査を行っている(野田, 2017)。また、牡蠣体内に蓄積されたウイルスを排出させるため、出荷前の牡蠣

を清浄な海水中で一定期間浄化させる試みも行われている。しかし、牡蠣体内にはノロウイルスが特異的に結合できる糖鎖が存在することから (Maalouf et al., 2011, 2010)、ウイルスが排出されにくく浄化が難しいことが明らかになっている。このように様々な対策を講じているにもかかわらず、腸管系ウイルスに汚染された二枚貝による食中毒事件を完全に防ぐのは難しい状況にある。二枚貝の安全性をより高めるには、これまでの対策に加えさらに抜本的な汚染対策が必要である。

本研究では、その汚染対策に役立つように、二枚貝の腸管系ウイルス蓄積特性や蓄積メカニズムをより詳細に明らかにすることを目的とした。上述したように、二枚貝の腸管系ウイルス蓄積の原因は、人間集団から排出され海域に流入するウイルスと、二枚貝が本来有している海水のろ過および生物蓄積特性である。これらの問題に対し本研究では3つのテーマを設け、多角的な研究によって問題解決を目指した。人間集団から排出されるウイルスの海域への流入に対しては、そのメカニズムをより詳細に解明し対策を講じるため、腸管系ウイルスの中でも検出頻度の高いノロウイルスおよびロタウイルスによる二枚貝の汚染状況と、周辺地域の感染性胃腸炎流行状況との関係を調査した。また、二枚貝のノロウイルス蓄積のメカニズムを解明するため、ノロウイルス蓄積に関与しているといわれている牡蠣体内の糖鎖構造を調査し、ウイルス蓄積量によって構造や発現量に違いが見られるかどうかを明らかにすることとした。

## 1. 2 論文の構成

図 1.1 に、本研究の構成を示す。第 2 章では、感染性胃腸炎やその原因ウイルス、胃腸炎ウイルスによる二枚貝の汚染に関する既存の研究をまとめ、本研究の位置づけを示した。第 3 章では、河口域に自生する二枚貝中のノロウイルス汚染状況を調査し、周辺地域の感染性胃腸炎流行との関連性を明らかにした。第 4 章では、養殖牡蠣に蓄積したロタウイルスワクチン株および患者由来の野生株を定量的に検出し、ロタウイルス感染

症の流行状況との関連性を調査した。第5章では、養殖牡蠣を人為的にノロウイルスに汚染させ、ウイルス蓄積量の多い牡蠣および少ない牡蠣の体内に発現している糖鎖構造を明らかにした。第6章では研究の総括として、本研究で得られた新たな知見と今後取り組むべき課題について述べた。

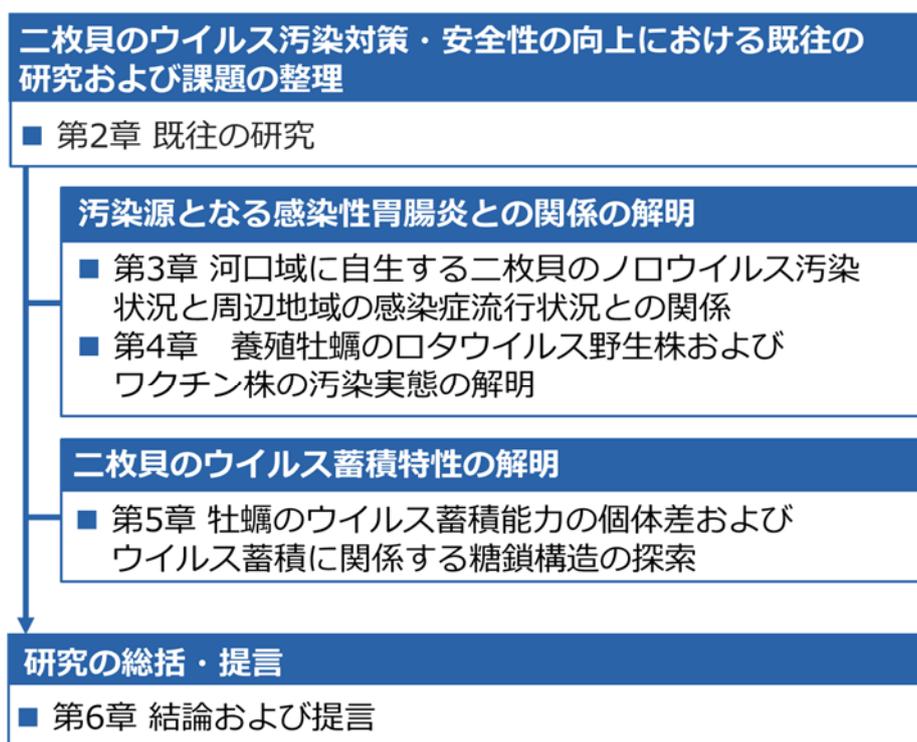


図 1.1 本研究の構成

## 参考文献

- Grøndahl-Rosado, R.C., Yarovitsyna, E., Trettenes, E., Myrmel, M., Robertson, L.J., 2014. A One Year Study on the Concentrations of Norovirus and Enteric Adenoviruses in Wastewater and A Surface Drinking Water Source in Norway. *Food Environ. Virol.* 6, 232–245. <https://doi.org/10.1007/s12560-014-9161-5>
- Kitajima, M., Iker, B.C., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2014. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes - Identification of potential

viral indicators. *Sci. Total Environ.* 488–489, 290–296.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.087>

Maalouf, H., Schaeffer, J., Parnaudeau, S., Le Pendu, J., Atmar, R.L., Crawford, S.E., Le Guyader, F.S., 2011. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl.*

*Environ. Microbiol.* 77, 3189–3196. <https://doi.org/10.1128/AEM.03010-10>

Maalouf, H., Zakhour, M., Pendu, J. Le, Le Saux, J.C., Atmar, R.L., Le Guyader, F.S., 2010.

Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in

oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5621–5630. <https://doi.org/10.1128/AEM.00148-10>

国立感染症研究所, 2020. ノロウイルス等検出状況. 病原微生物検出情報,

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-noro.html>

野田 衛, 2017. 二枚貝を介するノロウイルス食中毒の現状と対策. 58, 1, 12-25.

<https://doi.org/10.3358/shokueishi.58.12>

## 第2章 既往の研究

### 2. 1 感染性胃腸炎

嘔吐や下痢を引き起こす胃腸炎のうち、ウイルスや細菌、寄生虫などの感染が原因であるものの総称を感染性胃腸炎という。原因となる病原体は、細菌性のもものでは病原性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラ菌など、ウイルスではノロウイルスやロタウイルスなど、寄生虫ではクリプトスポリジウムやランブル鞭毛虫などが挙げられる。細菌性の感染性胃腸炎は、食中毒事件などに起因する散発的な発生が多く、夏季に患者数の増加傾向があるが明確なピークは見られないことが多い。ウイルス性の感染性胃腸炎の流行期は冬季であり、例年12月～3月頃に患者数のピークを迎える（図2.1）。感染経路としては、病原体に汚染された水や食品の摂取、感染者からの糞便や嘔吐物からの接触感染が主である（Boone and Gerba, 2007; Boxman et al., 2009）。細菌や寄生虫が原因であった場合は、抗菌薬など病原体そのものに作用する治療法が存在することがあるが、ウイルス性の場合は根本的な治療法がなく、対症療法に限られる。また、ロタウイルスは2012年からワクチン（ロタリックス、ロタテック）が認可され、小児が接種を受けることができるが、ノロウイルス及び他の病原体については特異的な予防法はない（Atmar et al., 2011）。さらに、ノロウイルスやロタウイルスの感染者の中には、胃腸炎症状を引き起こさない無症候感染者が一定数存在することが明らかになっており（Qi et al., 2018）、本人が自覚しないままに感染を拡大させてしまうケースがある。実際に、無症候感染者が関与したノロウイルス感染症の発生が国内外で報告されている（García et al., 2006; Ozawa et al., 2007）。このように、ワクチンなど特異的な予防法が無いこと、自覚症状が無いまま周囲に感染を広げてしまうことなどから、ウイルスを初めとした感染性胃腸炎の完全な予防は非常に困難である。先進国では医療が発展しているため、感染性胃腸炎による死者は比較的少数であるが（Desai et al., 2012; Kowalzik et al., 2015）、医

療や公衆衛生が未発達な発展途上国においては、胃腸炎が5歳未満の小児の死亡原因において25%以上を占めており（Fischer Walker et al., 2012; Liu et al., 2012）、積極的な研究により胃腸炎のまん延を防ぐ必要がある。

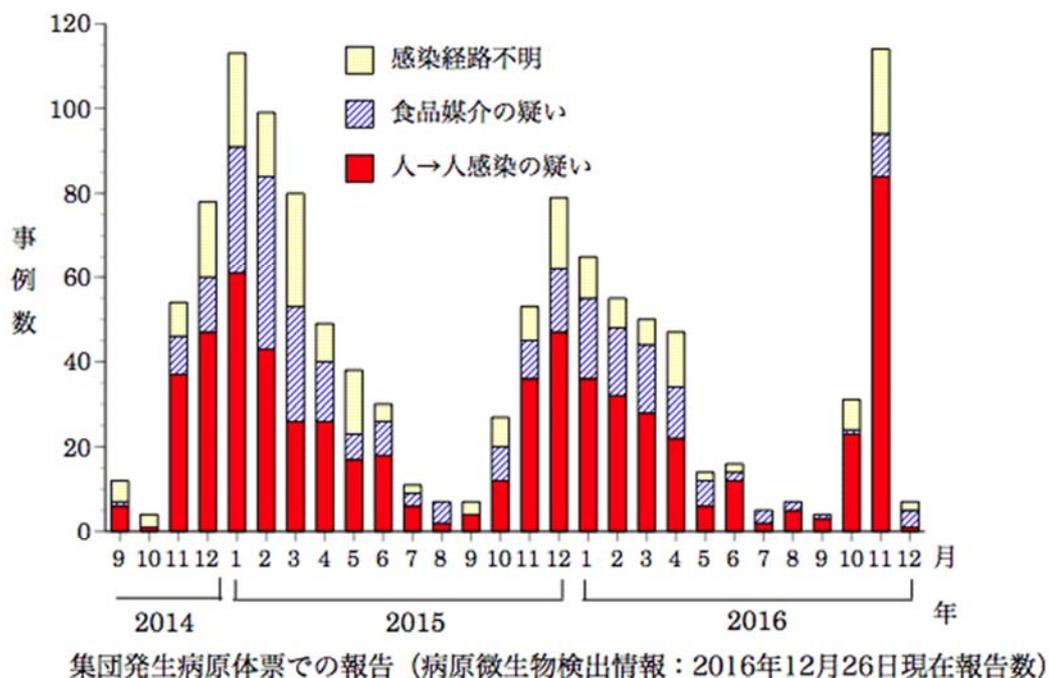


図 2.1 ノロウイルス感染集団発生事例数の月別推移

(国立感染症研究所 IASR Vol. 38 p.1-3: 2017 年 1 月号より抜粋)

## 2. 2 腸管系ウイルス

感染性胃腸炎を引き起こす病原体のうち、非細菌性の原因病原体は1972年まで特定されていなかった。1972年に、電子顕微鏡観察により胃腸炎患者の糞便中からウイルスが発見され（Kapikian et al., 1972）、1993年にはヌクレオチド配列の解析によりカリシウイルス科に分類されることが明らかになった（Jiang et al., 1993）。このウイルスは、その形状からSRSV（小型球状ウイルス）や、ウイルスの発見された感染性胃腸炎患者の

発生地からノーウォークウイルスと呼ばれてきたが、2002年に国際ウイルス命名委員会によってノロウイルスと命名された。ノロウイルスは現在10つの遺伝子群(GI~GX)に分けられ、そのうちGIおよびGIIが主にヒトの感染性胃腸炎の原因となるグループであり、さらにGI.1~GI.9およびGII.1~GII.27の遺伝子型に分類されている (Chhabra et al., 2019)。感染性胃腸炎患者の糞便から分離されたウイルスのうち、90%以上をノロウイルスGIIが占めており (国立感染症研究所, 2019) (図2.2)、疫学的に非常に重要なウイルスである。さらに、以前はGII.4がノロウイルスGII感染症の70%ほどを占めていたが (Siebenga et al., 2010)、2015年にGII.17の変異体による世界的な流行が起こってからは (Lu et al., 2015; Matsushima et al., 2015; Medici et al., 2015; Parra et al., 2017)、GII.17による感染症流行も増えてきている。

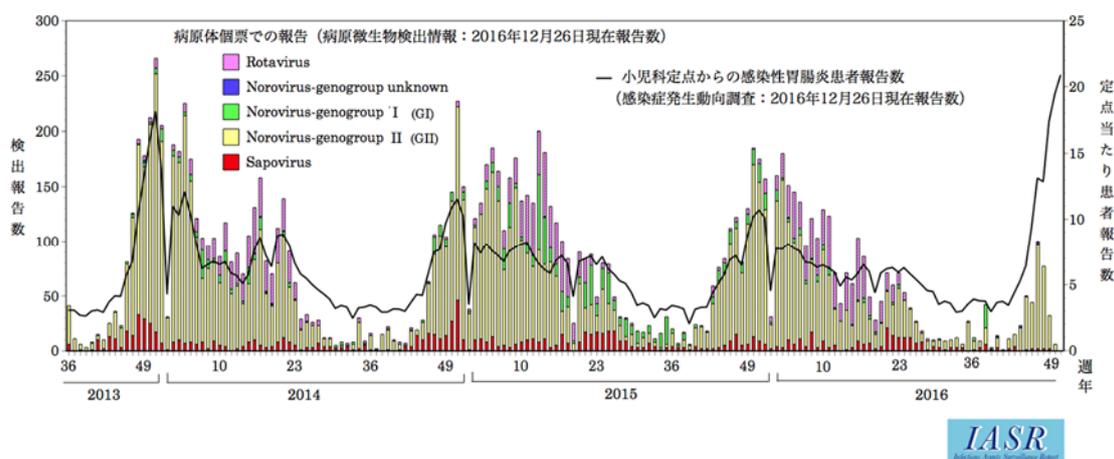


図2.2 2013~2016年における日本の感染性胃腸炎患者から検出されたウイルスの報告数 (国立感染症研究所 IASR Vol. 38 p.1-3: 2017年1月号より抜粋)

ノロウイルスの感染率は非常に強く、ヒト一人に感染を成立させるのに必要なノロウイルス粒子の数は、10~100個程度であると言われている (Atmar et al., 2014)。またノロウイルスは、現在のところヒトの体外での培養は非常に困難であり、ワクチンの開発への大きな壁となっている。ノロウイルスの感染には外殻タンパク質 (VLP) の構造が関

連していることから、近年はノロウイルスの組み換え VLP を利用したワクチンの開発が行われている (Bernstein et al., 2015; Kim et al., 2018) が、実用化には至っていない。感染力が強く特異的な予防法もないことから、ノロウイルス感染症が経済および社会に与える影響は大きく、ノロウイルスが関連する社会的コストを推定した研究では、全世界で 444~834 ドルのコストがかかると見積もられている (Bartsch et al., 2016)。

感染性胃腸炎を引き起こすウイルスのうち、ノロウイルスに次いで検出数が多いのはロタウイルスである。ロタウイルスは、1973 年に急性胃腸炎患者の十二指腸粘膜から、電子顕微鏡観察により発見された (Bishop et al., 1973)。ロタウイルスはその抗原性から A~G 群の 7 種類に分けられ、主に A 群および C 群がヒトに感染する。さらに、ロタウイルスのゲノムは 11 の遺伝子分節に分けられ、それぞれについて遺伝子型が定められている。ロタウイルス感染者の多くは小児であり、5 歳までのすべての小児は少なくとも一度はロタウイルス感染による胃腸炎を経験している (Parashar et al., 2003)。

ロタウイルスの遺伝子型は、以前は VP7 および VP4 の配列に基づいた型 (G 型、P 型) を表記するのが一般的であり、ワクチン導入以前は、ロタウイルスの流行株は主に G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8] の 5 種類がほとんどを占めていたという報告もある。しかし、ロタウイルスは遺伝子再集合 (リアソートメント) により、新たな遺伝子型構成の株が生まれやすい性質がある。このため、2008 年に Rotavirus Classification Working Group (RCWG) により、全ゲノムの配列に基づく遺伝子型の表記法が提案された (Matthijssens et al., 2008)。この新たな分類法で流行株を表記すると、Wa 遺伝子群 (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1)、DS-1 遺伝子群 (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2)、AU-1 遺伝子群 (G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3) の 3 種類いずれかの遺伝子型構成を有することが明らかになった。しかし、日本でのワクチン導入直後である 2012 年には、前述の 3 種類とは異なる遺伝子型構成を持つ DS-1-like G1P[8] 株 (G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) が検出された (Fujii et al., 2014)。また、2014 年には G8P[8] 株 (G8-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) (Kondo et al., 2017)、2015 年には

DS-1-like G3P[8]株 (G3-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) (Donato et al., 2015) の世界的な流行が見られた。この 2 株は、それぞれウシロタウイルスの G8 型およびウマロタウイルスの G3 株と近い配列を有しており (Kamiya et al., 2019)、ヒトロタウイルスに限らずリアソートメントによる遺伝子組み換えが起こっていることが示されている。

ノロウイルスやロタウイルスなどの腸管系ウイルスは、感染者の体内で増殖し、糞便や吐瀉物と共に体外に排出される。排出されたウイルスは生活排水と共に排水処理施設へ送られるため、未処理排水中には多量のウイルスが存在している。未処理排水中のウイルスは、処理施設において塩素や紫外線などによって不活化され、ノロウイルスで 1~2 Log、ロタウイルスで 0~1 Log 減少することが明らかになっている (Kitajima et al., 2014)。しかしながらウイルスを完全に除去することは不可能であり、残存したウイルスは処理水と共に環境中へ流入している。実際に、多くの先行研究において海水や河川水から腸管系ウイルスが検出されている (Gibbons et al., 2010; Gyawali and Hewitt, 2018; Mans et al., 2013; Sedji et al., 2018)。

### 2. 3 二枚貝を原因とするウイルス性食中毒

日本におけるウイルス性の食中毒事件は、95%以上をノロウイルスが占めており、その原因食品は、単一の食品では二枚貝が最も多い (厚生労働省, 2020)。これは二枚貝の採餌行動である、多量の海水のろ過が関係している。二枚貝類は海水中のプランクトンを主な餌としており、1 時間に 10~20L の海水をろ過していることが明らかになっている (Kobayashi et al., 1997)。その際に、海水中に含まれる病原性微生物も取り込まれ、体内に濃縮・蓄積させてしまう。前述した通り、腸管系ウイルスの感染者は体外にウイルスを排出し、排出されたウイルスは生活排水と共に海域に流入する。このことから、二枚貝に蓄積されるウイルスはウイルスに感染したヒト由来であると考えられる。ヒトがウイルスに感染し、排出されたウイルスが二枚貝に蓄積されるまでの経路を図 2.3 に

示す。先行研究では、Ueki らが感染者、都市下水、養殖牡蠣から検出したノロウイルスの塩基配列を調べ、90%以上一致していることを明らかにした (Ueki et al., 2005)。その後も、多くの先行研究で環境水中と二枚貝中のノロウイルスの関連が示されている (Medici et al., 2015; Nguyen et al., 2018; Pu et al., 2016)。また、牡蠣のノロウイルス蓄積量は、感染性胃腸炎の流行期である冬季に増加する傾向があることが示されている (Flannery et al., 2012)。

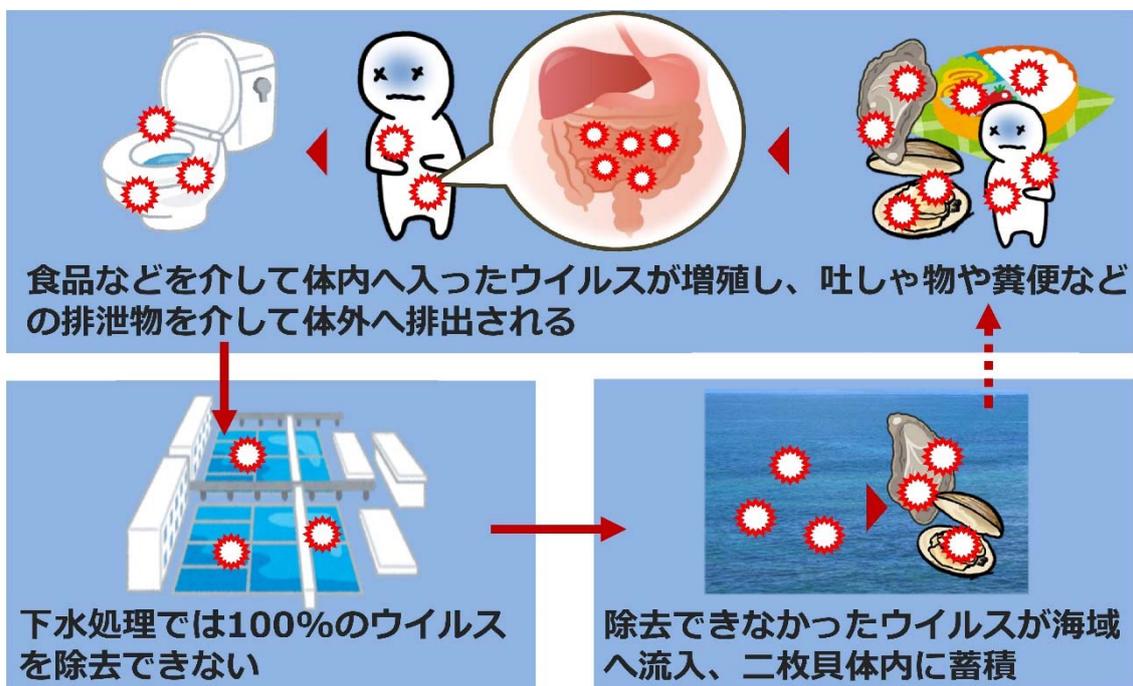


図 2.3 ヒトの腸管系ウイルス感染および排出されたウイルスが二枚貝に蓄積されるまでの経路

二枚貝の腸管系ウイルス汚染に関する研究の中で、最も多く取り上げられているのがマガキ (*Crassostrea gigas*) であり (Grodzki et al., 2014; Nishida et al., 2003; Rajko-Nenow et al., 2012; Rasmussen et al., 2016; Wang et al., 2008)、日本国外ではバージニアカキ (*Crassostrea virginica*) やポルトガルカキ (*Crassostrea angulata*)、スミノエガキ (*Crassostrea ariakensis*) の研究も行われている (Choi and Kingsley, 2016; Montazeri et

al., 2015; Nappier et al., 2008)。マガキを初めとした牡蠣は世界的に生食される機会が多く、腸管系ウイルスの食中毒事件でも報告数が多いため、研究対象として重要な二枚貝であるといえる。さらに、牡蠣体内の消化器官である中腸腺の組織には、ノロウイルスと結合する糖鎖が発現していることが明らかになり (Le Guyader et al., 2012; Maalouf et al., 2010)、二枚貝の中でも特にノロウイルスとの親和性が高いと考えられる。この糖鎖はヒトにノロウイルスが感染する際に結合するものと同一の構造であり、ノロウイルスと強い結合力があることから、一度ノロウイルスに汚染された牡蠣は浄化されづらいことが示されている (Maalouf et al., 2011)。これまで一般的に用いられてきた、滅菌した海水中で牡蠣を飼育し浄化させる方法では、ノロウイルスを完全に取り除くのに不十分であることが明らかになっている。新たな浄化方法として、加熱 (Araud et al., 2016) や紫外線、高圧処理 (Kingsley et al., 2007) によりノロウイルスを不活化させる方法が開発されている。

## 2. 4 まとめ

以上のように、二枚貝のウイルス汚染とそれに関連する感染性胃腸炎、また環境中の胃腸炎ウイルスの動態については多くの先行研究が行われてきた。一方で、未だ不明な点も多くあり、また二枚貝のウイルス汚染を完全に防止することはできていない。本研究では先行研究で得られていない新たな知見を得るため、ノロウイルスによる二枚貝の汚染状況と周辺地域の感染性胃腸炎流行状況との関係、ロタウイルス野生株およびワクチン株による養殖牡蠣の汚染状況、二枚貝のノロウイルス蓄積に関与する糖鎖構造の解明を目的として研究を行った。

## 参考文献

Araud, E., DiCaprio, E., Ma, Y., Lou, F., Gao, Y., Kingsley, D., Hughes, J.H., Li, J., 2016.

- Thermal inactivation of enteric viruses and bioaccumulation of enteric foodborne viruses in live oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2086–2099.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.03573-15>
- Atmar, R.L., Bernstein, D.I., Harro, C.D., Al-Ibrahim, M.S., Chen, W.H., Ferreira, J., Estes, M.K., Graham, D.Y., Opekun, A.R., Richardson, C., Mendelman, P.M., 2011. Norovirus Vaccine against Experimental Human Norwalk Virus Illness. *N. Engl. J. Med.* 365, 2178–2187. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1101245>
- Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Ramani, S., Hill, H., Ferreira, J., Graham, D.Y., 2014. Determination of the 50% human infectious dose for norwalk virus. *J. Infect. Dis.* 209, 1016–1022. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit620>
- Bartsch, S.M., Lopman, B.A., Ozawa, S., Hall, A.J., Lee, B.Y., 2016. Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *PLoS One* 11, e0151219.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151219>
- Bernstein, D.I., Atmar, R.L., Lyon, G.M., Treanor, J.J., Chen, W.H., Jiang, X., Vinjé, J., Gregoricus, N., Freneck, R.W., Moe, C.L., Al-Ibrahim, M.S., Barrett, J., Ferreira, J., Estes, M.K., Graham, D.Y., Goodwin, R., Borkowski, A., Clemens, R., Mendelman, P.M., 2015. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: A challenge study in healthy adults. *J. Infect. Dis.* 211, 870–878. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu497>
- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H., Ruck, B.J., 1973. VIRUS PARTICLES IN EPITHELIAL CELLS OF DUODENAL MUCOSA FROM CHILDREN WITH ACUTE NON-BACTERIAL GASTROENTERITIS. *Lancet* 302, 1281–1283.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)92867-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)92867-5)
- Boone, S.A., Gerba, C.P., 2007. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.02051-06>
- Boxman, I., Dijkman, R., Verhoef, L., Maat, A., Van Dijk, G., Vennema, H., Koopmans, M.,

2009. Norovirus on swabs taken from hands illustrate route of transmission: A case study. *J. Food Prot.* 72, 1753–1755. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.8.1753>
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G.I., Chan, M.C.W., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P.A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M.P.G., Vinjé, J., 2019. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J. Gen. Virol.* 100, 1393–1406. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001318>
- Choi, C., Kingsley, D.H., 2016. Temperature-Dependent Persistence of Human Norovirus Within Oysters (*Crassostrea virginica*). *Food Environ. Virol.* 8, 141–147. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9234-8>
- Desai, R., Hembree, C.D., Handel, A., Matthews, J.E., Dickey, B.W., McDonald, S., Hall, A.J., Parashar, U.D., Leon, J.S., Lopman, B., 2012. Severe outcomes are associated with genogroup 2 genotype 4 norovirus outbreaks: A systematic literature review. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/cis372>
- Donato, C.M., Cowley, D., Roczo-Farkas, S., Kirkwood, C.D., 2015. Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *Artic. J. Gen. Virol.* <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000352>
- Fischer Walker, C.L., Aryee, M.J., Boschi-Pinto, C., Black, R.E., 2012. Estimating Diarrhea Mortality among Young Children in Low and Middle Income Countries. *PLoS One* 7, e29151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029151>
- Flannery, J., Keaveney, S., Rajko-Nenow, P., O’Flaherty, V., Doré, W., 2012. Concentration of norovirus during wastewater treatment and its impact on oyster contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3400–3406. <https://doi.org/10.1128/AEM.07569-11>
- Fujii, Y., Nakagomi, T., Nishimura, N., Noguchi, A., Miura, S., Ito, H., Doan, Y.H., Takahashi, T., Ozaki, T., Katayama, K., Nakagomi, O., 2014. Spread and predominance in Japan of

- novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect. Genet. Evol.* 28, 426–433.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.001>
- García, C., DuPont, H.L., Long, K.Z., Santos, J.I., Ko, G.P., 2006. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2997–3000.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00065-06>
- Gibbons, C.D., Rodríguez, R.A., Tallon, L., Sobsey, M.D., 2010. Evaluation of positively charged alumina nanofibre cartridge filters for the primary concentration of noroviruses, adenoviruses and male-specific coliphages from seawater. *J. Appl. Microbiol.* 109, 635–641. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04691.x>
- Grodzki, M., Schaeffer, J., Piquet, J.C., Le Saux, J.C., Chev e, J., Ollivier, J., Le Pendu, J.L., Le Guyader, F.S., 2014. Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis e virus in bivalve shellfish from France. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4269–4276. <https://doi.org/10.1128/AEM.00978-14>
- Gyawali, P., Hewitt, J., 2018. Detection of Infectious Noroviruses from Wastewater and Seawater Using PEMAX™ Treatment Combined with RT-qPCR. *Water* 10, 841.  
<https://doi.org/10.3390/w10070841>
- Jiang, X., Wang, M., Wang, K., Estes, M.K., 1993. Sequence and genomic organization of norwalk virus. *Virology* 195, 51–61. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1345>
- Kamiya, H., Tacharoenmuang, R., Ide, T., Negoro, M., Tanaka, T., Asada, K., Nakamura, H., Sugiura, K., Umemoto, M., Kuroki, H., Ito, H., Tanaka, S., Ito, M., Fukuda, S., Hatazawa, R., Hara, Y., Guntapong, R., Murata, T., Taniguchi, Kiyosu, Suga, S., Nakano, T., Taniguchi, Koki, Komoto, S., 2019. Characterization of an Unusual DS-1-Like G8P[8] Rotavirus Strain from Japan in 2017: Evolution of Emerging DS-1-Like G8P[8] Strains through Reassortment. *Jpn. J. Infect. Dis.* 72, 256–260.

<https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2018.484>

Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R., Chanock, R.M., 1972.

Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *J. Virol.* 10.

Kim, L., Liebowitz, D., Lin, K., Kasparek, K., Pasetti, M.F., Garg, S.J., Gottlieb, K., Trager, G.,

Tucker, S.N., 2018. Safety and immunogenicity of an oral tablet norovirus vaccine, a phase I randomized, placebo-controlled trial. *JCI insight* 3.

<https://doi.org/10.1172/jci.insight.121077>

Kingsley, D.H., Holliman, D.R., Calci, K.R., Chen, H., Flick, G.J., 2007. Inactivation of a

norovirus by high-pressure processing. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 581–585.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02117-06>

Kitajima, M., Iker, B.C., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2014. Relative abundance and treatment

reduction of viruses during wastewater treatment processes - Identification of potential viral indicators. *Sci. Total Environ.* 488–489, 290–296.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.087>

Kobayashi, M., Hofmann, E.E., Powell, E.N., Klinck, J.M., Kusaka, K., 1997. A population

dynamics model for the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 149, 285–321.

[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01456-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01456-1)

Kondo, K., Tsugawa, T., Ono, M., Ohara, T., Fujibayashi, S., Tahara, Y., Kubo, N., Nakata, S.,

Higashidate, Y., Fujii, Y., Katayama, K., Yoto, Y., Tsutsumi, H., 2017. Clinical and molecular characteristics of human rotavirus G8P[8] outbreak strain, Japan, 2014. *Emerg.*

*Infect. Dis.* 23, 968–972. <https://doi.org/10.3201/eid2306.160038>

Kowalzik, F., Riera-Montes, M., Verstraeten, T., Zepp, F., 2015. The burden of norovirus

disease in children in the European Union. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 34, 229–234.

<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000546>

- Le Guyader, F.S., Atmar, R.L., Le Pendu, J., 2012. Transmission of viruses through shellfish: When specific ligands come into play. *Curr. Opin. Virol.*  
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.029>
- Liu, L., Johnson, H.L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J.E., Rudan, I., Campbell, H., Cibulskis, R., Li, M., Mathers, C., Black, R.E., 2012. Global, regional, and national causes of child mortality: An updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 379, 2151–2161. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60560-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60560-1)
- Lu, J., Sun, L., Fang, L., Yang, F., Mo, Y., Lao, J., Zheng, H., Tan, X., Lin, H., Rutherford, S., Guo, L., Ke, C., Hui, L., 2015. Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1240–1242.  
<https://doi.org/10.3201/eid2107.150226>
- Maalouf, H., Schaeffer, J., Parnaudeau, S., Le Pendu, J., Atmar, R.L., Crawford, S.E., Le Guyader, F.S., 2011. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3189–3196. <https://doi.org/10.1128/AEM.03010-10>
- Maalouf, H., Zakhour, M., Pendu, J. Le, Le Saux, J.C., Atmar, R.L., Le Guyader, F.S., 2010. Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5621–5630. <https://doi.org/10.1128/AEM.00148-10>
- Mans, J., Netshikweta, R., Magwalivha, M., Van Zyl, W.B., Taylor, M.B., 2013. Diverse norovirus genotypes identified in sewage-polluted river water in South Africa. *Epidemiol. Infect.* 141, 303–313. <https://doi.org/10.1017/S0950268812000490>
- Matsushima, Y., Ishikawa, M., Shimizu, T., Komane, A., Kasuo, S., Shinohara, M., Nagasawa, K., Kimura, H., Ryo, A., Okabe, N., Haga, K., Doan, Y.H., Katayama, K., Shimizu, H., 2015. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from december 2014 to march 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Eurosurveillance* 20, 1–6.

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.26.21173>

Matthijssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P.C., Nakagomi, O., Patton, J.T., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Desselberger, U., Van Ranst, M., 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>

Medici, M.C., Tummolo, F., Calderaro, A., Chironna, M., Giammanco, G.M., De Grazia, S., Arcangeletti, M.C., De Conto, F., Chezzi, C., Martella, V., 2015. Identification of the novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy, 2015. *Eurosurveillance* 20, 30010. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.35.30010>

Montazeri, N., Maite, M., Liu, D., Cormier, J., Landry, M., Shackleford, J., Lampila, L.E., Achberger, E.C., Janes, M.E., 2015. Surveillance of Enteric Viruses and Microbial Indicators in the Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*) and Harvest Waters along Louisiana Gulf Coast. *J. Food Sci.* 80, M1075–M1082. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12871>

Nappier, S.P., Graczyk, T.K., Schwab, K.J., 2008. Bioaccumulation, retention, and depuration of enteric viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6825–6831. <https://doi.org/10.1128/AEM.01000-08>

Nguyen, G.T., Pu, J., Miura, T., Ito, H., Kazama, S., Konta, Y., Van Le, A., Watanabe, T., 2018. Oyster Contamination with Human Noroviruses Impacted by Urban Drainage and Seasonal Flooding in Vietnam. *Food Environ. Virol.* 10, 61–71. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9325-1>

Nishida, T., Kimura, H., Saitoh, M., Shinohara, M., Kato, M., Fukuda, S., Munemura, T., Mikami, T., Kawamoto, A., Akiyama, M., Kato, Y., Nishi, K., Kozawa, K., Nishio, O.,

2003. Detection, Quantitation, and Phylogenetic Analysis of Noroviruses in Japanese Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5782–5786.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5782-5786.2003>
- Ozawa, K., Oka, T., Takeda, N., Hansman, G.S., 2007. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3996–4005.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01516-07>
- Parashar, U.D., Hummelman, E.G., Bresee, J.S., Miller, M.A., Glass, R.I., 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 565–572.  
<https://doi.org/10.3201/eid0905.020562>
- Parra, G.I., Squires, R.B., Karangwa, C.K., Johnson, J.A., Lepore, C.J., Sosnovtsev, S. V., Green, K.Y., 2017. Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLOS Pathog.* 13, e1006136.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006136>
- Pu, J., Kazama, S., Miura, T., Azraini, N.D., Konta, Y., Ito, H., Ueki, Y., Cahyaningrum, E.E., Omura, T., Watanabe, T., 2016. Pyrosequencing Analysis of Norovirus Genogroup II Distribution in Sewage and Oysters: First Detection of GII.17 Kawasaki 2014 in Oysters. *Food Environ. Virol.* 8, 310–312. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9261-5>
- Qi, R., Huang, Y. ting, Liu, J. wei, Sun, Y., Sun, X. feng, Han, H.J., Qin, X.R., Zhao, M., Wang, L. jun, Li, W., Li, J. hong, Chen, C., Yu, X.J., 2018. Global Prevalence of Asymptomatic Norovirus Infection: A Meta-analysis. *EClinicalMedicine* 2–3, 50–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2018.09.001>
- Rajko-Nenow, P., Keaveney, S., Flannery, J., O’Flaherty, V., Doré, W., 2012. Characterisation of norovirus contamination in an Irish shellfishery using real-time RT-qPCR and sequencing analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 105–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.001>

- Rasmussen, L.D., Schultz, A.C., Uhrbrand, K., Jensen, T., Fischer, T.K., 2016. Molecular evidence of oysters as vehicle of norovirus GII.P17-GII.17. *Emerg. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.3201/eid2211.161171>
- Sedji, M.I., Varbanov, M., Meo, M., Colin, M., Mathieu, L., Bertrand, I., 2018. Quantification of human adenovirus and norovirus in river water in the north-east of France. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 30497–30507. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3045-4>
- Siebenga, J.J., Lemey, P., Kosakovsky Pond, S.L., Rambaut, A., Vennema, H., Koopmans, M., 2010. Phylodynamic Reconstruction Reveals Norovirus GII.4 Epidemic Expansions and their Molecular Determinants. *PLoS Pathog.* 6, e1000884. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000884>
- Ueki, Y., Sano, D., Watanabe, T., Akiyama, K., Omura, T., 2005. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res.* 39, 4271–4280. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.06.035>
- Wang, D., Wu, Q., Kou, X., Yao, L., Zhang, J., 2008. Distribution of norovirus in oyster tissues. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1966–1972. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03970.x>
- 国立感染症研究所, 2017. ノロウイルス感染症 2015/16 シーズン. 病原微生物検出情報 (IASR) , 38, 1-3. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/norovirus-m/norovirus-iasrtpc/7015-443t.html>

## 第3章 河口域に自生する二枚貝のノロウイルス汚染状況と周辺地域の感染症流行状況との関係

### 3. 1 はじめに

第2章で述べたように、感染性胃腸炎は全世界で重要な疾患であり、感染性胃腸炎発生状況の継続的なモニタリングは、大規模な流行の予防や対策を講じるのに効果的である。現在日本では全国の小児科定点から感染性胃腸炎患者数が報告され、国立感染症研究所の病原微生物検出情報（Infectious Agents Surveillance Report : IASR）として報告されている。一方で、小児科定点での患者報告数には成人や無症状の感染者が数えられておらず、正確な流行状況が把握できていない可能性がある。

腸管系ウイルス感染者は、症状の有無にかかわらず体外にウイルスを排出していることから、生活排水が含まれる都市下水中には胃腸炎患者由来のウイルスが含まれている。我々の研究グループでは、都市下水中に含まれるノロウイルス量を継続的にモニタリングし、周辺地域で報告された感染性胃腸炎患者数との関連性を調査した。その結果、下水中のノロウイルス量は感染性胃腸炎の流行期である冬季に増加し、周辺地域の感染性胃腸炎患者報告数とタイムラグなく有意に相関していることが示された（Miura et al., 2016）。この結果から、下水中のノロウイルス量をモニタリングすることで、従来の小児科定点からの報告数よりもより正確な流行状況を把握できる可能性がある。一方で、この方法を下水道が未整備の地域で適用するのは困難である。発展途上国では下水道が整備されていない地域が多く、感染性胃腸炎の重要度は発展途上国でより高いことから（Fischer Walker et al., 2012; Liu et al., 2012）、下水中のウイルスモニタリングに代わるモニタリング方法が必要である。二枚貝には海水中のウイルスを取り込み体内に濃縮させる特性があることから（Ueki et al., 2005）、上流域の人間集団から排出されたウイルスを体内に蓄積できると考えられる。このことから、二枚貝中のウイルス量をモニタリン

グすることで、周辺地域の感染症流行を把握することができるかもしれない。以上の背景から、本研究では河口域に自生する二枚貝中のノロウイルス量を継続的に定量検出し、その汚染実態を把握すること、また下水中のノロウイルス量や周辺地域の感染症流行状況との関連性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 2 実験方法

#### 3. 2. 1 サンプルング方法

下水処理水を受容する二枚貝生息地として、宮城県仙台市の七北田川河口に位置する蒲生干潟を選定した。この河口付近には南蒲生浄化センターが位置し、河口から 16 km 上流の位置には、上谷刈浄化センターが存在する。仙台市南蒲生浄化センターは、仙台市内の約 7 割（約 70 万人/100 万人）の人口を対象とした大規模な処理場であり、処理方法は標準活性汚泥法である。その放流口は河口の外である一方で、上谷刈浄化センターは、処理人口約 37000 人と南蒲生浄化センターと比較して少ないが、処理水を七北田川に直接放流している。処理方法は標準活性汚泥法に加え、凝集沈殿および急速ろ過法を用いている。

この蒲生干潟にどのような二枚貝が生息しているか事前に調査を行い、マガキ (*Crassostrea gigas*) とイソシジミ (*Nuttallia olivacea*) を研究対象として選定した。その後 2017 年 10 月中旬から 2019 年 3 月上旬まで、4 月から 10 月は月に一度、11 月から 3 月は隔週で牡蠣およびイソシジミを採取した。サンプルング地点の概要を図 3.1 に示す。牡蠣は護岸に自生している個体を、イソシジミは潮間帯において砂の表面から 20 cm 程度手掘りして、それぞれ 20 個体ずつ採取を実施した。採取した二枚貝は実験室到着後に中腸腺を摘出し、4 個体の中腸腺をまとめて 5 個のコンポジットサンプルとした。中腸腺の処理の概要を図 3.2 に示す。また、同期間において 4 月から 10 月は週に一度、11 月から 3 月は週に二度の頻度で、南蒲生浄化センターから未処理都市下水を 1L 採取

した。下水および二枚貝サンプルは、分析開始まで-80°Cで保存した。



図 3.1 サンプルング地点概要 (○は牡蠣、□はイソシジミの採取地点を示す)

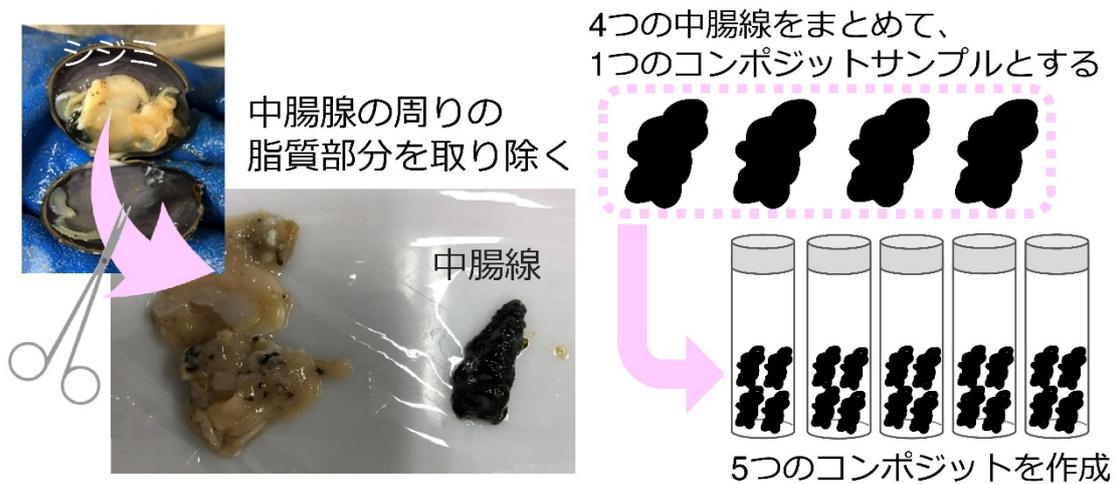


図 3.2 二枚貝の中腸腺処理概要

### 3. 2. 2 ウイルス濃縮・RNA 抽出

下水中のウイルス回収においては、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法により濃縮を行った。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、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、約  $1.0 \times 10^7$  copies のマウスノロウイルス（MNV）S7-PP3 株を内部コントロールとして添加し、4°Cで 12 時間攪拌した。続いて、4°Cで  $9000 \times g \cdot 30$  分の遠心分離を行い、上清を除いて 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  $10000 \times g \cdot 10$  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、140 $\mu$ L を RNA 抽出に用いた。

二枚貝からのウイルス抽出の手法は先行研究に従った（Pu et al., 2018）。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、酵素溶液を作成した。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。各中腸腺サンプルに 3.2 mm ステンレスビーズ（TOMY）2 個と酵素溶液 1 mL を加え、また下水サンプルと同様に、内部コントロールとしてマウスノロウイルス S7-PP3 株を  $1.0 \times 10^7$  copies 添加した。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°C1 時間、60°C15 分間インキュベートした。最後に  $9,100 \times g \cdot 12$  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。ウイルス抽出液 500  $\mu$ L に対して 500  $\mu$ L のクエン酸バッファー（pH 2.5, 400 mM）を添加した後、 $9,100 \times g \cdot 12$  分の遠心分離を行い、その上清の全量を RNA の抽出に用いた。

下水サンプルからの RNA 抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を、中腸腺コンポジットサンプルからの RNA 抽出には NucliSENS miniMAG RNA extraction kit（bioMérieux）を用い、実験操作は付属のプロトコルに従った。

### 3. 2. 3 逆転写およびウイルスの定量

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 $\times$ iScript advanced reaction mix 8  $\mu$ L, iScript advanced reverse transcriptase 2  $\mu$ L, ヌクレアーゼフリー水 10  $\mu$ L, テンプレート RNA 20  $\mu$ L とし

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。

逆転写によって作製した cDNA を用いて、ノロウイルス GI、GII および MNV の定量を行った。プライマー配列および反応条件は、それぞれ Kageyama ら (Kageyama et al., 2003)、原ら (原 et al., 2009)、Hata ら (Hata et al., 2011) に従った。使用したプライマーの配列を表 3.1 に示す。反応液の組成は、SsoAdvanced universal probes supermix 10 $\mu$ L、cDNA 5 $\mu$ L、プライマー・プローブおよびヌクレアーゼフリー水 5 $\mu$ L の計 20 $\mu$ L とした。The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) ガイドラインに従い、検出対象が一定の値まで増幅した際のサイクル数である Cq が 40 以下のサンプルを陽性とした (Bustin et al., 2009)。検量線の作成には、ターゲット配列を含むオリゴ DNA の 10 倍希釈系列 (10<sup>1</sup>-10<sup>5</sup> copies/ウェル) の定量値を用いた。

表 3.1 本研究で使用したプライマー配列

Target	Primer and probe	Sequence	Ref.
GI	COG1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	Kageyama et al.
	COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	
	RING1(a)-TP	FAM-AGATYCGGA-ZEN-TCYCCTGTCCA-IBFQ	
	RING1(b)-TP	FAM-AGATCGCGG-ZEN-TCTCCTGTCCA-IBFQ	
GII	COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	Hara et al.
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTACACA	
	ALPF	TTTGAGTCCATGTACAAGTGGATGCG	
	RING2AL-TP	FAM-TGGGAGGGS-ZEN-GATCGCRATCT-IBFQ	
MNV	MNV-F	CGGTGAAGTGCTTCTGAGGTT	Hata et al.
	MNV-R	GCAGCGTCAGTGCTGTCAA	
	MNV-TaqMan	VIC-CGAACCTACATGCGTCAG-TAMRA	

### 3. 2. 4 相関分析

二枚貝中のウイルス量と周辺地域の感染性胃腸炎流行との関連性を明らかにするため、二枚貝と下水中のノロウイルス GI および GII のウイルス量、また宮城県仙台市の感染性胃腸炎患者報告数を用いて相関分析を行った。感染性胃腸炎患者から二枚貝にノ

ロウイルスが蓄積されるまでのタイムラグを考慮し、二枚貝採取日から1〜3日前および1〜3日後の下水中ウイルス量と胃腸炎患者報告数を用いて相互相関分析を行った。

### 3. 2. 5 次世代シーケンス解析

二枚貝中および下水中のノロウイルス GII について、次世代シーケンシングにより遺伝子型の調査を行った。ノロウイルス量に基づき、2018年1月31日および2018年4月18日の下水処理サンプルと、2017年12月21日、2018年4月18日、2018年1月31日の二枚貝サンプルを選択し解析に用いた。3.2.3 で作成した cDNA を鋳型とし、ノロウイルスカプシドたんぱく質の N/S 領域のターゲット配列を nested PCR 法によって増幅した。プライマーセットは Kageyama ら、Kojima らに従い、COG2F/G2SKR および G2SKF/G2SKR を用いた。ターゲット配列の増幅、PCR 産物の複製およびインデックスの付加、シーケンシングおよびデータ解析は FASMAC へ委託された。KAPA HiFi HotStart ReadyMix ( ) および COG2F/G2SKR を用いて 1st PCR を行い、得られた PCR 産物 1 $\mu$ L を鋳型として、G2SKF/G2SKR を用いて 2nd PCR を行った。得られた PCR 産物 25 $\mu$ L を AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter) で精製し、溶出液 2 $\mu$ L を鋳型として PCR によりインデックス配列を付加した。得られた PCR 産物 25 $\mu$ L を AMPure XP ビーズで生成し、アンプリコン溶出液 25 $\mu$ L を得た。アンプリコンは Miseq (illumina) を用いてシーケンシングを行い、各サンプルの塩基配列データを得た。sickle ver 1.3 (Joshi N.A., Fass J.N.) を用いてクオリティフィルタリングを行い、Fastx toolkit ver 0.0.13.2 (Hannon G.J.) によってインデックスおよびプライマー配列を除去した。FLASH ver1.2.10 (Magoč and Salzberg, 2011) によりペアエンドリードの結合を行い、USEARCH ver 8.0.1623\_i86linux64 (Edgar, 2010) を用いて 97%以上の相同性を持つ配列を operational taxonomic unit (OTU) にまとめた。得られた OTU の代表配列は、Norovirus Genotyping Tool Ver 2.0 (Kroneman et al., 2011) によって遺伝子型を決定した。

### 3. 3 結果

#### 3. 3. 1 ノロウイルス定量結果

二枚貝からのノロウイルス定量結果を図 3.3 に示す。ノロウイルス GI の定量値は、牡蠣およびイソシジミ中のどちらも、2017 年シーズンである 10 月から 2018 年 2 月までは大きな変動は無く、2~3 Log copies/g-中腸腺で推移していた。その後 3 月から 4 月にかけて上昇し、4 月にはどちらも 3 Logcopies/g-中腸腺を超えた。5 月から 7 月には一度低下するが、8 月以降は再び上昇し、2018 年シーズンの 11 月上旬にピークに達した。蓄積濃度は、2~4 Log copies/g-中腸腺程度を示した。ノロウイルス GII の定量値は、2017 年シーズンである 10 月から 12 月に近づくにつれて上昇を示し、1 月にかけて低下した。3 月からは定量値がさらに上昇し、5 月に一度大きく低下するが、6 月および 7 月は 3 月と同程度の値で検出された。8 月から 9 月は定量値が低下したが、2018 年シーズン始めの 11 月には再び上昇し、本研究期間中で最も高い値を示した。蓄積濃度は、1.5~5 Log copies/g-中腸腺程度を示した。ノロウイルス GII の陽性検体数は 2~5 個で推移しており、ウイルス濃度の増減と陽性検体数の増減のタイミングは必ずしも一致しなかった。またノロウイルス GII は、ノロウイルス GI と比較して陽性検体数が多かった。

#### 3. 3. 2 相関分析結果

二枚貝および下水中のノロウイルス濃度と感染性胃腸炎患者報告数との相関分析結果を表 3.2 に示す。本研究期間においては、下水中のノロウイルス GI および GII 濃度と、感染性胃腸炎患者報告数の間には有意な相関関係が見られなかった。牡蠣およびイソシジミ中のノロウイルス GI は、いずれも下水中のノロウイルス GI と有意な相関が見られなかった。一方で、イソシジミ中のノロウイルス GI は、感染性胃腸炎患者報告数と 1 週のタイムラグで有意な負の相関関係にあった。牡蠣中およびイソシジミ中のノ

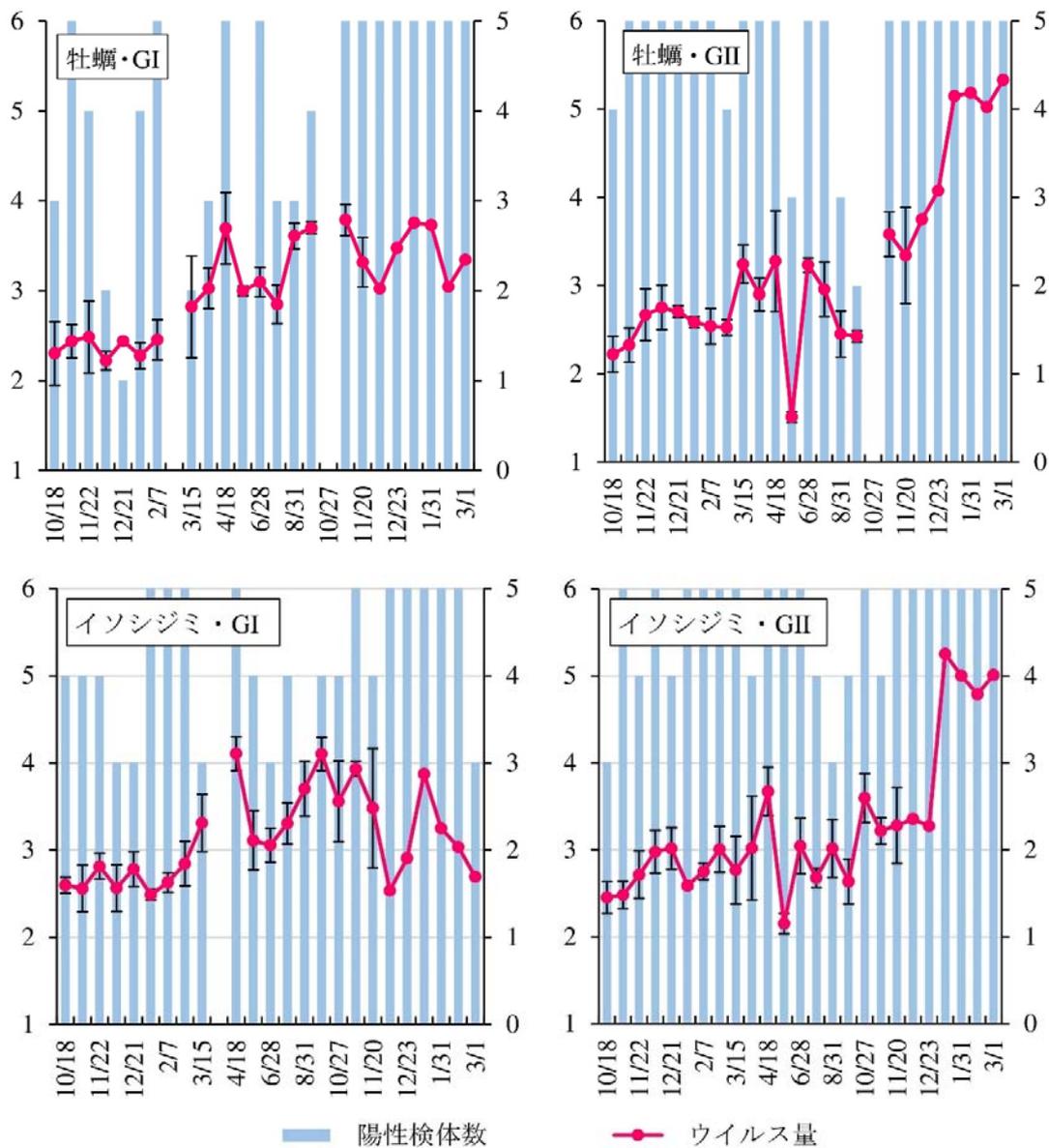


図 3.3 牡蠣およびイソシジミ中のノロウイルス量定量結果.

棒グラフはウイルスが検出された陽性検体数 (N=5)、折れ線グラフは陽性検体中のウイルス量の平均値の Log 値、エラーバーは標準偏差を示す。

ロウイルス GII 濃度は、下水中のノロウイルス GII 濃度と 0~2 週のタイムラグで有意な正の相関関係が見られた。牡蠣中と下水中では 2 週のタイムラグで、イソシジミ中と下水中ではタイムラグなしで相関係数が最大値を示した。一方で、牡蠣中およびイソシジ

ミ中のノロウイルス GII 量のどちらも、感染性胃腸炎患者報告数とは有意な相関関係が見られなかった。

**表 3.2** 二枚貝中と下水中のウイルス量および感染性胃腸炎患者数の相関分析結果.

表中の数値は相関係数を、色を付けたセルは有意な相関があったことを、

D は二枚貝採取日からのタイムラグ (週) を示す。

二枚貝	遺伝子型	下水との相関係数				患者数との相関係数			
		D=0	-1	-2	-3	D=0	-1	-2	-3
牡蠣	GI	0.14	-0.40	0.18	0.20	-0.22	-0.47	-0.26	-0.29
	GII	0.69	0.57	0.72	0.37	0.01	-0.02	0.11	0.18
シジミ	GI	0.29	-0.09	0.30	-0.05	-0.33	-0.52	-0.30	-0.51
	GII	0.72	0.65	0.71	0.36	-0.02	-0.12	0.05	0.13

### 3. 3. 3 遺伝子型解析結果

下水中および牡蠣・イソシジミ中のノロウイルス GII の遺伝子型解析結果を図 3.4 に示す。牡蠣中ではおよそ 80%、イソシジミ中ではおよそ 20~40%のノロウイルス GII が遺伝子型を同定できた。2017 年 12 月の二枚貝サンプルでは、牡蠣中のノロウイルス GII の 50%以上は GII.4 Sydney\_2012 であり、さらに GII.17 が 25.3%を占め、他の遺伝子型および遺伝子型が同定できないものは全体の 20%以下であった。イソシジミでは GII.4 Sydney\_2012 が 14.7%、GII.17 は 1.0%であり、80%以上は遺伝子型が同定できなかった。2018 年 4 月の二枚貝サンプルでは、2017 年 12 月のサンプルから大きく遺伝子型の割合が変化した。牡蠣中では GII.17 の割合が 46.6%を占め、GII.4 Sydney\_2012 は 4.0%に減少した。また、新たに GII.2、GII.21、GII.13 の割合が大きくなった。イソシジミ中では GII.4 Sydney\_2012 の割合は大きく変化しなかったが、GII.17 の割合は 7.7%とやや増加し、牡蠣と同様に GII.2 や GII.21 の割合が大きく増加した。さらに、イソシジミ中では

GII.4 Sydney\_2012 とは異なる配列を持つ GII.4 other が同定された。2019 年 1 月の牡蠣およびイソシジミサンプルでは、2018 年 4 月と同様に GII.17 が最も大きな割合を占めていた。牡蠣中では GII.4 Sydney\_2012 の割合が 23.0%とやや増加したが、イソシジミでは 15.5%とほとんど変化しなかった。また、牡蠣では GII.4 other や GII.2 が検出され、GII.21 は牡蠣およびイソシジミの両方で検出されなかった。2018 年 1 月の下水中サンプルでは、約 65%のノロウイルス GII 遺伝子型が同定され、最も割合が大きいのは GII.17 (30.1%) であった。続いて GII.2 が 15.4%、GII.4 Sydney\_2012 が 14.3%、GII.13 が 4.9%を占めていた。2018 年 4 月は、約 50%のノロウイルス遺伝子型が同定された。GII.4 Sydney\_2012 および GII.2 の割合は 1 月から変化せず、GII.17 の割合がやや減少し、GII.21 が新たに検出された。

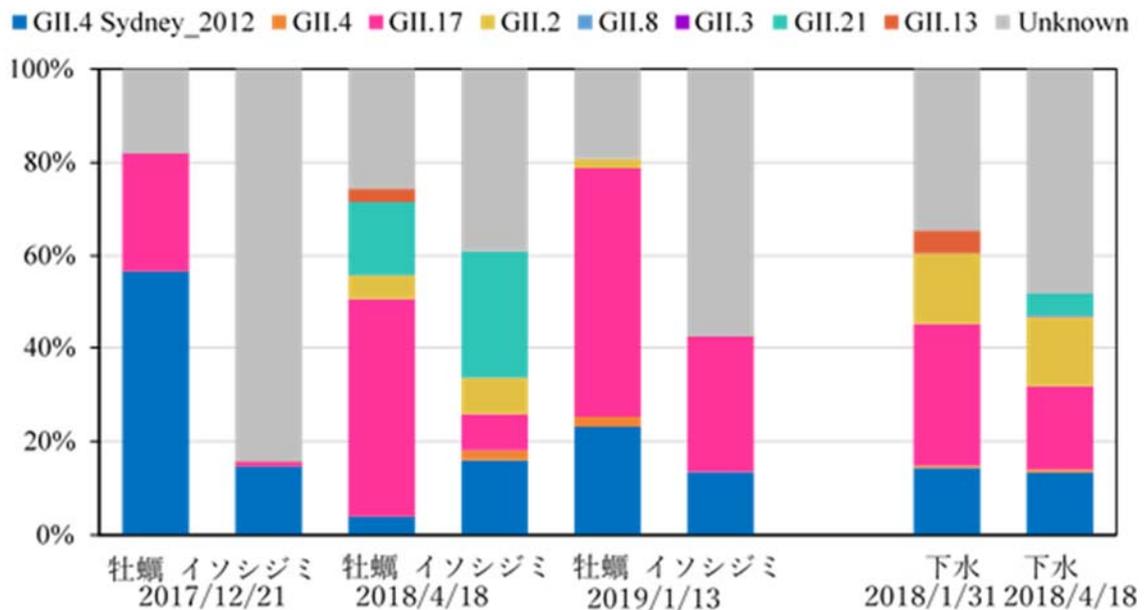


図 3.4 二枚貝および下水中に蓄積されたノロウイルス GII の遺伝子型同定結果。

各凡例は全配列中でそれぞれの遺伝子型が占める割合を示している。

### 3. 4 考察

本研究では、下水処理水を受ける河口域に自生する二枚貝のノロウイルス汚染状況を調査し、周辺地域の感染症流行との関係性を明らかにした。それぞれのウイルス量の最高値は、ノロウイルス GI で 4.1 Log copies/g-中腸腺、ノロウイルス GII で 5.3 Log copies/g-中腸腺であった。ノロウイルス GI の蓄積量はイソシジミ中の方が多く、ノロウイルス GII は牡蠣の方が多かった。本研究における牡蠣中のノロウイルス量は、多くの先行研究 (Le Guyader et al., 2006; Lowther et al., 2018; Polo et al., 2016; Schaeffer et al., 2018) よりも高い値を示した。この要因としては、サンプリング地点の違いや季節的な影響、ウイルス抽出法の違いなどが考えられる。イソシジミの属するマルスダレガイ目 (*Veneroida*) には、ヤマトシジミ (*Corbicula japonica*) やアサリ (*Venerupis philippinarum/Ruditapes philippinarum*)、シナハマグリ (*Meretrix pethechialis*) などがあるが、これらのノロウイルス汚染に関する研究は非常に少ない。Polo らの研究では、スペインのとある海域から *Mytilus galloprovincialis*、*Venerupis philippinarum*、*Venerupis decussata*、*Cerastoderma edule* の4種の二枚貝を採取し、A型肝炎ウイルスおよびノロウイルスの定量を行った (Polo et al., 2015)。このうちマルスダレガイ目は *Venerupis philippinarum* および *Venerupis decussata* であるが、これらから定量されたノロウイルス量は GI と GII 共に 4 Log copies/g-中腸腺を超えており、我々の結果は先行研究で得られた結果を支持した。

二枚貝中および下水中のノロウイルス量と感染性胃腸炎患者報告数との相関分析の結果、二枚貝中と下水中のノロウイルス GII には1~3週のタイムラグで有意な相関関係が見られた。我々のグループの先行研究においても同様の傾向が示されており (Pu et al., 2018)、二枚貝中のノロウイルス GII 量には下水中のウイルス量の変動が反映されているのは明らかである。一方で、感染性胃腸炎患者報告数は、二枚貝中のノロウイルス GI 量と有意な負の相関関係にあった。日本国内では、感染性胃腸炎患者のほとんどはノロウイルス GII 由来であることが知られている (厚生労働省, 2020)。感染性胃腸炎患者が

増加し、ノロウイルス GII の排出量が増え、二枚貝中のノロウイルス量も同様に増加するにつれて、ノロウイルス GI の蓄積量が相対的に減少した可能性がある。一方で、ノロウイルス GI とノロウイルス GII が同時に蓄積される場合において、どちらが優位に蓄積されるのかは不明な点が多く、今後さらなる研究で検証していく必要がある。

本研究期間においては、感染性胃腸炎流行期には非流行期と比較して下水中のウイルス量が有意に高くなった一方で、感染性胃腸炎患者報告数は明確な増加が見られなかった。また、感染性胃腸炎患者報告数と下水中のノロウイルス量には有意な相関関係が見られず、我々の先行研究とは異なる傾向であった (Miura et al., 2016; Pu et al., 2018)。下水中のウイルス量から、人間集団からのノロウイルスの排出量は例年通りであったと考ええると、症状が無い比較的軽症であったノロウイルス感染者が多かったことが推測される。このようなケースでは、下水中のウイルス量のモニタリングと同様に、医療機関からの患者報告数よりもより正確に流行状況を把握できる可能性がある。

二枚貝および下水中に含まれるノロウイルス GII の関連性をより詳しく把握するため、次世代シーケンス解析によりノロウイルス GII 遺伝子型の同定を行った。2017 年 12 月の二枚貝サンプルにおいては、GII.4 Sydney\_2012 が最も主要な遺伝子型であった。GII.4 Sydney\_2012 は、2015 年に GII.17 の新たな流行株が報告されるまで、ノロウイルス性の感染性胃腸炎における世界的な流行株であり (He et al., 2016; Leshem et al., 2013; Ruis et al., 2017; van Beek et al., 2013)、下水や二枚貝から同定された先行研究も数多くある (Kazama et al., 2016; Nguyen et al., 2018; Victoria et al., 2016)。また、牡蠣中には GII.17 も多く含まれ、全体の約 1/4 を占めていた。GII.17 は 2014~2015 年シーズンの大流行において、新たな遺伝子型である GII.17 kawasaki 2014 が報告されてから、環境中での検出事例が増加した (Mabasa et al., 2018; Medici et al., 2015; Pu et al., 2016; Rasmussen et al., 2016; Thongprachum et al., 2018)。しかしながら、本研究で同定された GII.17 が kawasaki 2014 であるかどうかは判定できなかった。2018 年 4 月には、牡蠣中のみで GII.17 の割合が大幅に増加した。また牡蠣中とイソジミ中では、新たに GII.2 と GII.21 が検出さ

れた。GII.2 および GII.17 は胃腸炎流行において主流の遺伝子型ではないが、世界的に胃腸炎患者の糞便からの検出報告がある (Hoa Tran et al., 2013; Khamrin et al., 2017; Lee et al., 2017; Thongprachum et al., 2017; Yahiro et al., 2015)。同日の下水中のノロウイルス GII 遺伝子型は、二枚貝中と同様に GII.4 Sydney\_2012、GII.17、GII.2、GII.21 が検出された。一方で、その割合は大きく異なっていた。ノロウイルスは遺伝子型によって牡蠣への蓄積効率が異なっているという報告があり (Maalouf et al., 2011)、今回の遺伝子型の効率については不明だが、下水中・牡蠣中・イソシジミ中の遺伝子型の割合がすべて異なっていることから、蓄積効率の違いが大きく影響していると考えられる。

結論として、下水処理水を受容する水域の二枚貝の体内に蓄積されるノロウイルス量には、下水中のノロウイルス量の変化が反映されており、下水中に無症候性の感染者からのウイルスが排出されているとすれば、医療機関の報告者数よりも正確に流行状況をモニタリングできる可能性がある。また、周辺地域の感染症予防を推進することで、下流域の二枚貝の安全性を向上させることにも繋がるため、水産や環境工学、公衆衛生など、多くの分野で連携してさらなる研究を行う必要がある。

## 参考文献

- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Fischer Walker, C.L., Aryee, M.J., Boschi-Pinto, C., Black, R.E., 2012. Estimating Diarrhea Mortality among Young Children in Low and Middle Income Countries. *PLoS One* 7, e29151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029151>

- Hata, A., Katayama, H., Kitajima, M., Visvanathan, C., Nol, C., Furumai, H., 2011. Validation of internal controls for extraction and amplification of nucleic acids from enteric viruses in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4336–4343.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00077-11>
- He, Y., Jin, M., Chen, K., Zhang, H., Yang, H., Zhuo, F., Zhao, D., Zeng, H., Yao, X., Zhang, Z., Chen, L., Zhou, Y., Duan, Z., 2016. Gastroenteritis Outbreaks Associated with the Emergence of the New GII.4 Sydney Norovirus Variant during the Epidemic of 2012/13 in Shenzhen City, China. *PLoS One* 11, e0165880.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165880>
- Hoa Tran, T.N., Trainor, E., Nakagomi, T., Cunliffe, N.A., Nakagomi, O., 2013. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: Global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J. Clin. Virol.*  
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.11.011>
- Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K., 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1548–1557. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1548-1557.2003>
- Kazama, S., Masago, Y., Tohma, K., Souma, N., Imagawa, T., Suzuki, A., Liu, X., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T., 2016. Temporal dynamics of norovirus determined through monitoring of municipal wastewater by pyrosequencing and virological surveillance of gastroenteritis cases. *Water Res.* 92, 244–253.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.024>
- Khamrin, P., Kumthip, K., Supadej, K., Thongprachum, A., Okitsu, S., Hayakawa, S., Ushijima, H., Maneekarn, N., 2017. Noroviruses and sapoviruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in Thailand: increased detection of recombinant

- norovirus GII.P16/GII.13 strains. *Arch. Virol.* 162, 3371–3380.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-017-3501-3>
- Kroneman, A., Vennema, H., Deforche, K., Avoort, H., Peñaranda, S., Oberste, M.S., Vinjé, J., Koopmans, M., 2011. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J. Clin. Virol.* 51, 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.03.006>
- Le Guyader, F.S., Bon, F., DeMedici, D., Parnaudeau, S., Bertone, A., Crudeli, S., Doyle, A., Zidane, M., Suffredini, E., Kohli, E., Maddalo, F., Monini, M., Gallay, A., Pommepuy, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M., 2006. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3878–3882. <https://doi.org/10.1128/JCM.01327-06>
- Lee, J.W., Lee, S.G., Cho, H.G., Park, Y.J., Yun, J.W., Park, C.J., Paik, S.Y., 2017. Full-genome sequence analysis of an uncommon norovirus genotype, GII.21, from South Korea. *Epidemiol. Infect.* 145, 2231–2240. <https://doi.org/10.1017/S0950268817001273>
- Leshem, E., Wikswa, M., Barclay, L., Brandt, E., Storm, W., Salehi, E., DeSalvo, T., Davis, T., Saupe, A., Dobbins, G., Booth, H.A., Biggs, C., Garman, K., Woron, A.M., Parashar, U.D., Vinjé, J., Hall, A.J., 2013. Effects and clinical significance of GII.4 Sydney norovirus, United States, 2012–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1231–1238.  
<https://doi.org/10.3201/eid1908.130458>
- Liu, L., Johnson, H.L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J.E., Rudan, I., Campbell, H., Cibulskis, R., Li, M., Mathers, C., Black, R.E., 2012. Global, regional, and national causes of child mortality: An updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 379, 2151–2161. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60560-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60560-1)
- Lowther, J.A., Gustar, N.E., Powell, A.L., O'Brien, S., Lees, D.N., 2018. A One-Year Survey of Norovirus in UK Oysters Collected at the Point of Sale. *Food Environ. Virol.* 10, 278–287.  
<https://doi.org/10.1007/s12560-018-9338-4>

- Maalouf, H., Schaeffer, J., Parnaudeau, S., Le Pendu, J., Atmar, R.L., Crawford, S.E., Le Guyader, F.S., 2011. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3189–3196. <https://doi.org/10.1128/AEM.03010-10>
- Mabasa, V. V., Meno, K.D., Taylor, M.B., Mans, J., 2018. Environmental Surveillance for Noroviruses in Selected South African Wastewaters 2015–2016: Emergence of the Novel GII.17. *Food Environ. Virol.* 10, 16–28. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9316-2>
- Magoč, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Medici, M.C., Tummolo, F., Calderaro, A., Chironna, M., Giammanco, G.M., De Grazia, S., Arcangeletti, M.C., De Conto, F., Chezzi, C., Martella, V., 2015. Identification of the novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy, 2015. *Eurosurveillance* 20, 30010. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.35.30010>
- Miura, T., Kazama, S., Konta, Y., Masago, Y., Tohma, K., Manaka, T., Liu, X., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T., 2016. Applicability of Norovirus Monitoring in Sewage as an Early Warning System of Infectious Gastroenteritis. *J. Japan Soc. Civ. Eng. Ser. G (Environmental Res.* 72, III\_285-III\_294. [https://doi.org/10.2208/jscej.72.III\\_285](https://doi.org/10.2208/jscej.72.III_285)
- Nguyen, G.T., Pu, J., Miura, T., Ito, H., Kazama, S., Konta, Y., Van Le, A., Watanabe, T., 2018. Oyster Contamination with Human Noroviruses Impacted by Urban Drainage and Seasonal Flooding in Vietnam. *Food Environ. Virol.* 10, 61–71. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9325-1>
- Polo, D., Schaeffer, J., Fournet, N., Le Saux, J.C., Parnaudeau, S., McLeod, C., Le Guyader, F.S., 2016. Digital PCR for quantifying norovirus in oysters implicated in outbreaks, France. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 2189–2191. <https://doi.org/10.3201/eid2212.160841>
- Polo, D., Varela, M.F., Romalde, J.L., 2015. Detection and quantification of hepatitis A virus

- and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas. *Int. J. Food Microbiol.* 193, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.007>
- Pu, J., Kazama, S., Miura, T., Azraini, N.D., Konta, Y., Ito, H., Ueki, Y., Cahyaningrum, E.E., Omura, T., Watanabe, T., 2016. Pyrosequencing Analysis of Norovirus Genogroup II Distribution in Sewage and Oysters: First Detection of GII.17 Kawasaki 2014 in Oysters. *Food Environ. Virol.* 8, 310–312. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9261-5>
- Pu, J., Miura, T., Kazama, S., Konta, Y., Azraini, N.D., Ito, E., Ito, H., Omura, T., Watanabe, T., 2018. Weekly variations in norovirus genogroup II genotypes in Japanese oysters. *Int. J. Food Microbiol.* 284, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.027>
- Rasmussen, L.D., Schultz, A.C., Uhrbrand, K., Jensen, T., Fischer, T.K., 2016. Molecular evidence of oysters as vehicle of norovirus GII.P17-GII.17. *Emerg. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.3201/eid2211.161171>
- Ruis, C., Roy, S., Brown, J.R., Allen, D.J., Goldstein, R.A., Breuer, J., 2017. The emerging GII.P16-GII.4 Sydney 2012 norovirus lineage is circulating worldwide, arose by late-2014 and contains polymerase changes that may increase virus transmission. *PLoS One* 12, e0179572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179572>
- Schaeffer, J., Treguier, C., Piquet, J.C., Gachelin, S., Cochenec-Laureau, N., Le Saux, J.C., Garry, P., Le Guyader, F.S., 2018. Improving the efficacy of sewage treatment decreases norovirus contamination in oysters. *Int. J. Food Microbiol.* 286, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.016>
- Thongprachum, A., Fujimoto, T., Takanashi, S., Saito, H., Okitsu, S., Shimizu, H., Khamrin, P., Maneekarn, N., Hayakawa, S., Ushijima, H., 2018. Detection of nineteen enteric viruses in raw sewage in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 63, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.006>
- Thongprachum, A., Okitsu, S., Khamrin, P., Maneekarn, N., Hayakawa, S., Ushijima, H., 2017.

- Emergence of norovirus GII.2 and its novel recombination during the gastroenteritis outbreak in Japanese children in mid-2016. *Infect. Genet. Evol.* 51, 86–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.03.020>
- Ueki, Y., Sano, D., Watanabe, T., Akiyama, K., Omura, T., 2005. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res.* 39, 4271–4280.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.06.035>
- van Beek, J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Eden, J.S., Fonager, J., Hewitt, J., Iritani, N., Kroneman, A., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Koopmans, M., 2013. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of Genotype II.4, LATE 2012. *Eurosurveillance* 18, 20345.  
<https://doi.org/10.2807/ese.18.01.20345-en>
- Victoria, M., Tort, L.F.L., Lizasoain, A., García, M., Castells, M., Berois, M., Divizia, M., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., Cristina, J., Colina, R., 2016. Norovirus molecular detection in Uruguayan sewage samples reveals a high genetic diversity and GII.4 variant replacement along time. *J. Appl. Microbiol.* 120, 1427–1435.  
<https://doi.org/10.1111/jam.13058>
- Yahiro, T., Wangchuk, S., Wada, T., Dorji, C., Matsumoto, T., Mynak, M.L., Tshering, K.P., Nishizono, A., Ahmed, K., 2015. Norovirus GII.21 in children with Diarrhea, Bhutan. *Emerg. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.3201/eid2104.141856>
- 原正章, 矢野一好, 宇田川悦子, 2009. 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* 83, 564–565.  
<https://doi.org/10.11150/kansenshogakuzasshi.83.564>

## 第4章 養殖牡蠣のロタウイルス野生株およびワクチン株の汚染実態の解明

### 4. 1 はじめに

第2章で述べたように、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 (Troeger et al., 2017)、2006年にはグラクソ・スミスクライン社およびメルク・アンド・カンパニー社によってワクチン (Rotarix, RotaTeq) が開発された (Ruiz-Palacios et al., 2006; Vesikari et al., 2006)。Rotarix および RotaTeq 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。増殖したロタウイルスは糞便中に排出され、生活排水と共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 (Ito et al., 2019)。養殖牡蠣中の RVA 量は、ロタウイルス感染症の流行期として知られている冬季に増加する傾向が見られた。しかし、牡蠣中の RVA 量は、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、我々が先行研究で調査した 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。我々が用いたプライマーセットは RVA を網羅的に検出するように設計されており (Pang et al., 2004)、感染者由来である野生株 RVA と RVA ワクチンを区別することができない。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 株をリアルタイム PCR によって定量的に検出し、全 RVA の定量値から差し引くことで野生株 RVA のみのウイルス量を明らかにした。また、調査地域の医療機関から報告されたロタウイルス検出者数と、牡蠣または下水中の野生株 RVA とワクチン株との相関分析を行い、周辺地域の流行との関連性を調査した。

## 4. 2 実験方法

### 4. 2. 1 サンプルング方法

研究対象地として、東北地方の牡蠣養殖が盛んに行われているとある湾を選定した。サンプルング地点の模式図を図 4.1 に示す。この湾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し、その処理人口は約 10000 人、処理方法はオキシデーションディッチ方式（活性汚泥を浅い水路で巡回させる方式）であった。2014 年 9 月 24 日から 2016 年 7 月 28 日まで、河口から 3.2 km 離れた地点より、浄化処理前の養殖牡蠣を毎週 9 個体ずつ採取した。また、2014 年 9 月 24 日から 2016 年 4 月 28 日まで、週に 1 度の頻度で未処理都市下水を 1L 採取した。養殖牡蠣サンプルは冷蔵で実験室まで運ばれ、中腸腺の摘出処理を行った。下水及び中腸腺サンプルは、分析開始まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存された。



図 4.1 サンプルング地点模式図

### 4. 2. 2 ウイルス濃縮・RNA 抽出

下水中のウイルス回収においては、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法により濃縮を行った。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、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、約  $1.0 \times 10^7$  copies のマウスノロウイルス（MNV）S7-PP3 株を内部コントロールとして添加し、4°Cで 12 時間攪拌した。続いて、4°Cで  $9000 \times g \cdot 30$  分の遠心分離を行い、上清を除いて 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  $10000 \times g \cdot 10$  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、140 $\mu$ L を RNA 抽出に用いた。

牡蠣からのウイルス抽出の手法は先行研究に従った（Pu et al., 2018）。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、酵素溶液を作成した。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。各中腸腺サンプルに 3.2 mm ステンレスビーズ（TOMY）2 個と酵素溶液 1 mL を加え、また下水サンプルと同様に、内部コントロールとしてマウスノロウイルス S7-PP3 株を  $1.0 \times 10^7$  copies 添加した。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°C1 時間、60°C15 分間インキュベートした。最後に  $9,100 \times g \cdot 12$  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、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  $\mu$ L に対して 500  $\mu$ L のクエン酸バッファー（pH 2.5, 400 mM）を添加した後、 $9,100 \times g \cdot 12$  分の遠心分離を行い、その上清の全量を RNA の抽出に用いた。

下水サンプルからの RNA 抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を、中腸腺コンポジットサンプルからの RNA 抽出には NucliSENS miniMAG RNA extraction kit（bioMérieux）を用い、実験操作は付属のプロトコルに従った。

#### 4. 2. 3 逆転写およびウイルスの定量

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 $\times$ iScript advanced reaction mix 8  $\mu$ L, iScript advanced

reverse transcriptase 2  $\mu\text{L}$ , ヌクレアーゼフリー水 10  $\mu\text{L}$ , テンプレート RNA 20  $\mu\text{L}$  とした。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。

逆転写によって作製した cDNA を用いて、ロタウイルス A 群 (RVA)、ロタリックスおよびロタテックの定量を行った。プライマー配列および反応条件は、RVA の定量は三浦ら (Miura et al., 2018)、ロタリックスおよびロタテックの定量は Gautam ら (Gautam et al., 2014) に従った。使用したプライマーの配列を表 4.1 に示す。

表 4.1 本研究で使用したプライマー配列。{C}は AP-dC (G-clamp) を、“C”は C-5 propynyl-dC を示す。

Target	Primer and probe	Sequence	Ref.
ロタウイルス A	Rota NVP3-F1	ACCATCTACACATGACCCTC	Miura et al.
	Rota NVP3-F2	ACCATCTTCACGTAACCCTC	
	Rota NVP3-R	GGTCACATAACGCCCC	
	Rota NVP3-TP	FAM-TGAGCACAATAGTTAAAAAGC-MGB-NFQ	
ロタリックス	Rotarix VP4-F	TGTGAGTAA"C"GATTCAAATAAAATGGAAGTT	Gautam et al.
	Rotarix VP4-R	TCACCATGAAATGTCCATACTCTCCACCA	
	Rotarix VP4-P	FAM-ATA{C}CAGA{C}TTGTAGGAATAYTTAAATA-BHQ1	
ロタテック	RotaTeq-VP6-F	GCGGCGTTATTTCCAAATGCACAG	Gautam et al.
	RotaTeq-VP6-R	CGTCGGCAAGCACTGATTCACAAA	
	RotaTeq-VP6-P	FAM-ATCACGCAA"C"AGTAGGACT"C"ACGCTT-BHQ1	

反応液の組成は、SsoAdvanced universal probes supermix 10 $\mu\text{L}$ 、cDNA 5 $\mu\text{L}$ 、プライマー・プローブおよびヌクレアーゼフリー水 5 $\mu\text{L}$  の計 20 $\mu\text{L}$  とした。The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) ガイドラインに従い、検出対象が一定の値まで増幅した際のサイクル数である  $C_q$  が 40 以下のサンプルを陽性とした (Bustin et al., 2009)。検量線の作成には、ターゲット配列を含むオ

リゴ DNA の 10 倍希釈系列 ( $10^1$ – $10^5$  copies/ウェル) の定量値を用いた。RVA の定量値からロタリックスおよびロタテックの定量値を差し引くことで、ロタウイルス感染者由来の野生株 RVA のウイルス量を求めた。

#### 4. 2. 4 相関分析

養殖牡蠣中のウイルス量と周辺地域のロタウイルス感染症流行との関連性を明らかにするため、養殖牡蠣と下水中の野生株 RVA、ロタリックスおよびロタテックのウイルス量、また調査対象地域のロタウイルス検出者報告数を用いて相関分析を行った。ロタウイルス感染者から養殖牡蠣にロタウイルスが蓄積されるまでのタイムラグを考慮し、牡蠣採取日から 1~7 日前および 1~7 日後の下水中ウイルス量とウイルス検出者報告数を用いて相互相関分析を行った。下水や牡蠣からウイルスが検出されなかったケースを考慮し、(a) ウイルスが検出された週のデータのみを用いた相関分析と、(b) 非検出であった週に検出限界値の 1/2 を代入した相関分析の 2 通りを行い、結果の比較を行った。

#### 4. 3 結果

##### 4. 3. 1 養殖牡蠣および下水中のウイルス定量結果

養殖牡蠣および下水からの野生株 RVA、ロタリックスおよびロタテックの定量結果を図 4.2 に示す。牡蠣中の野生株 RVA およびロタテックは両シーズンの冬季に検出されたが、ロタリックスは 2016 年のみ検出された。各ウイルスの牡蠣中の陽性率は、野生株 RVA が 54%、ロタリックスが 14%、ロタテックが 31%であった。全シーズンを通じた牡蠣中のウイルス量の最高値は、野生株 RVA が  $5.4 \log_{10}$  copies/g-中腸腺、ロタリックスが  $4.2 \log_{10}$  copies/g-中腸腺、ロタテックが  $4.2 \log_{10}$  copies/g-中腸腺であった。下水においては、野生株 RVA は牡蠣中の同程度のウイルス量、検出頻度で両シーズン検出さ

れた。ロタテックは両シーズン検出されたが、2015-2016 シーズンの検出頻度は牡蠣中に比べて低かった。また、ロタリックスは前シーズンを通じて下水から検出されなかった。各ウイルスの下水中の陽性率は、野生株 RVA が 57%、ロタテックが 35%であった。全シーズンを通じた下水中のウイルス量の最高値は、野生株 RVA が  $6.3 \log_{10}$  copies/mL、ロタテックが  $3.5 \log_{10}$  copies/mL であった。

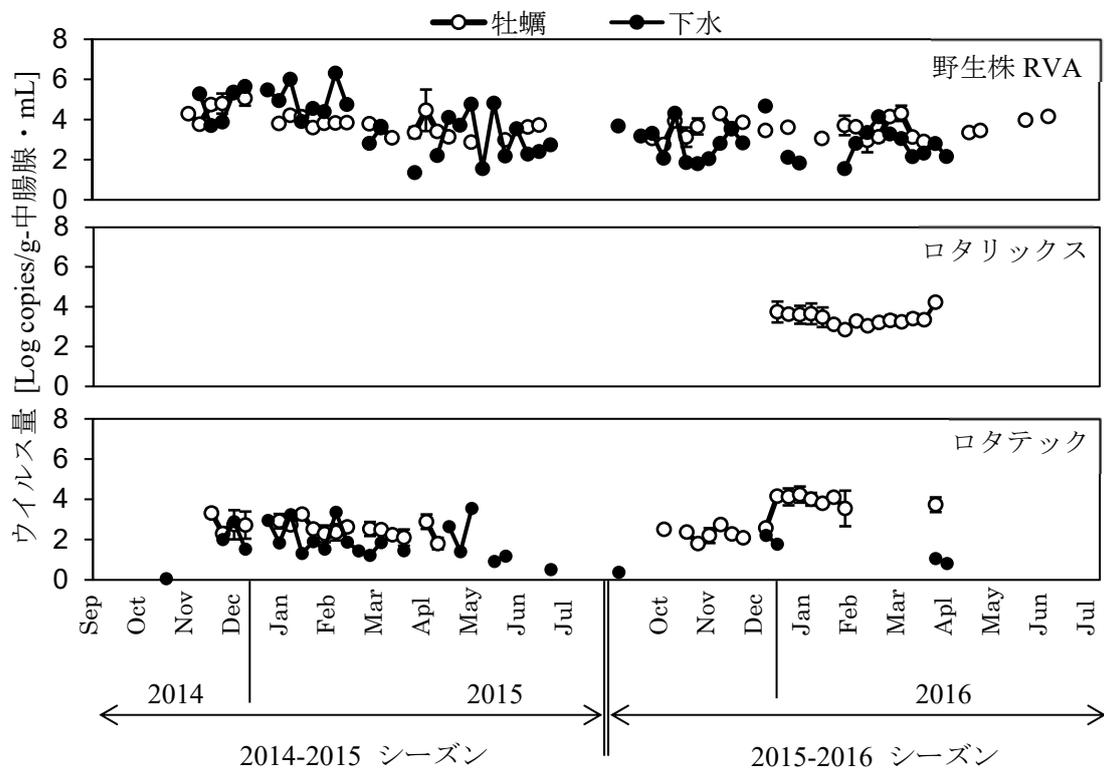


図 4.2 養殖牡蠣中の野生株 RVA およびワクチン株定量結果。折れ線グラフは陽性検体中のウイルス量の平均値の Log 値、エラーバーは標準偏差を示し、白抜きのもは牡蠣中のウイルス量、黒塗りのものは下水中のウイルス量を表している。

#### 4. 3. 2 相関分析結果

牡蠣中および下水中のウイルス量、ロタウイルス感染者報告数の相関分析結果を表 4.2 に示す。なお、ロタリックスは下水から検出されなかったため、分析を省略した。方法 (a) の分析では、牡蠣中と下水中の野生型 RVA 量において、-6~0 週間のタイムラ

グで有意な相関関係が見られた。一方で、牡蠣中と下水中のロタテックには有意な相関関係が見られなかった。また、牡蠣中と下水中の野生株 RVA およびロタテックのいずれも、周辺地域のロタウイルス検出者報告数とは相関関係が見られなかった。方法 (b) の分析では、牡蠣中と下水中の野生型 RVA 量において、-4~0 週間のタイムラグで有意な相関関係が見られた。また、ロタテックについては、1~7 週のタイムラグでロタウイルス検出者報告数と有意な相関関係にあった。

**表 4.2** 養殖牡蠣中と下水中のロタウイルスとロタウイルス検出者数との相関分析の結果。(a) は非検出のデータを除外し、(b) は非検出のデータに定量限界値の 1/2 を代入して分析を行った結果である。表中の数値は相関係数を、色付きのセルは有意な相関があったことを示す。

(a)		タイムラグ (週)														
		-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7
野生株	下水-牡蠣	0.31	0.50	0.45	0.55	0.48	0.39	0.48	0.47	0.18	0.37	0.23	0.23	0.10	0.37	-0.03
	患者-牡蠣	0.01	-0.18	0.07	-0.39	-0.13	-0.26	-0.53	-0.30	-0.47	0.01	0.03	-0.18	-0.28	-0.39	-0.22
	患者-下水	0.29	0.45	0.37	-0.09	0.06	-0.10	0.06	-0.29	-0.27	-0.39	-0.03	-0.21	-0.20	0.06	0.08
ロタテック	下水-牡蠣	-0.01	-0.33	0.45	0.13	-0.13	-0.01	-0.35	-0.25	0.22	0.13	0.20	-0.12	-0.06	0.13	0.32
	患者-牡蠣	-0.36	-0.34	-0.19	-0.35	-0.15	-0.29	-0.28	-0.35	-0.49	-0.31	-0.47	-0.26	-0.49	-0.39	-0.26
	患者-下水	0.04	0.34	-0.03	-0.23	-0.18	-0.42	0.08	-0.17	0.11	0.00	0.15	0.09	-0.01	0.35	0.33
(b)		タイムラグ (週)														
		-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7
野生株	下水-牡蠣	0.24	0.32	0.31	0.46	0.43	0.31	0.38	0.34	0.22	0.28	0.15	0.02	-0.18	-0.33	-0.20
	患者-牡蠣	0.18	0.16	0.16	-0.01	0.06	-0.03	-0.07	-0.02	-0.24	-0.10	-0.23	-0.29	-0.22	-0.38	-0.44
	患者-下水	-0.05	0.09	0.04	0.01	0.13	-0.06	0.01	0.00	0.10	0.14	0.13	0.12	0.22	0.26	0.36
ロタテック	下水-牡蠣	-0.21	-0.46	-0.27	-0.22	-0.30	-0.23	-0.33	-0.17	0.03	0.02	-0.04	-0.07	-0.17	-0.12	-0.23
	患者-牡蠣	-0.23	-0.31	-0.31	-0.31	-0.31	-0.45	-0.33	-0.34	-0.42	-0.29	-0.32	-0.24	-0.26	-0.23	-0.28
	患者-下水	0.10	0.28	0.20	0.30	0.24	0.19	0.31	0.28	0.42	0.37	0.36	0.33	0.43	0.49	0.55

#### 4. 4 考察

本研究では、養殖牡蠣および下水から RVA ワクチン株（ロタリックスおよびロタテック）を定量的に検出し、周辺地域の感染症流行との関係性を調査した。先行研究では、シーケンシングによって糞便や環境水からワクチン株が検出されている。Yen らの報告によれば、RVA ワクチンの接種を受けた小児の 21.4%が、接種後 3~9 日間糞便中にワクチン株を排出していた (Yen et al., 2011)。さらに、Bucardo らは下水サンプルからロタウイルスの VP7 遺伝子を検出し、ワクチン株 RotaTeq-WI79-4 と 98%の配列類似性を示した (Bucardo et al., 2011)。これらの研究から、環境中に存在する RVA ワクチン株はヒト由来であると考えられる。本研究はこの仮説を支持するだけでなく、牡蠣および環境中のワクチン株の時間的変動を定量的に明らかにし、水環境におけるワクチン株の動態に対する理解をさらに深めた。

野生型 RVA とロタテックは両シーズンで牡蠣から検出されたが、ロタリックスは 2014-2015 シーズンでは検出されなかった。さらに、下水からのロタテックの検出率は牡蠣と比較して低く、ロタリックスは下水から全く検出されなかった。グラクソ・スミスクライン株式会社および MSD 株式会社より提供された RVA ワクチン接種者数のデータによれば、2014-2015 シーズンの RVA ワクチン接種者数は、2015-2016 シーズンと有意差はなかった。したがって、ロタリックスとロタテックの検出傾向の違いは、日本におけるロタリックスとロタテックの使用方法の違いに起因する可能性がある。ロタリックスは 24 週齢まで乳児に 2 回接種され、ロタテックは 32 週齢まで 3 回接種される。日本では、乳児の離乳は約 20~24 週齢で開始される。離乳食を与えられた乳児の糞便は、成人の糞便と同様にトイレへ流され、下水に流入する。このことから、ロタテックはロタリックスよりも下水へ流入する機会が多いと考えられる。また、ロタリックスおよびロタテックは、下水から検出されなかった場合でも牡蠣から検出された。この結果

から、下水中の RVA ワクチン株濃度は定量 PCR の検出限界以下であり、牡蠣の生物濃縮作用により検出率が上がったと考えられる。

牡蠣中での野生株 RVA、ロタリックスおよびロタテックの陽性率は、それぞれ 54、14、および 31%であった。牡蠣から RVA ワクチン株を定量的に検出した先行研究はないため、我々の結果を先行研究と比較するのは困難である。しかし、野生株 RVA の陽性率は、ブラジル (19%) (Rigotto et al., 2010) およびタイ (13%) (Kittigul et al., 2015) で実施された先行研究の RVA すべての検出率よりも高かった。この違いは、サンプリング地域、調査時期、または検出法の違いに影響を受けた可能性がある。特に、我々の用いた牡蠣からのウイルス抽出法は、アミラーゼを用いた牡蠣由来の有機物の分解と、クエン酸バッファーによる不純物の効率的な沈殿により、工程法の 6.7 倍の効率でウイルスを抽出することが可能である (Ito et al., 2013)。一方で、下水中の野生型 RVA およびロタテックの陽性率は、それぞれ 57%および 35%であった。この値は、RVA すべてを対象とした先行研究での報告と近い値であった (Fumian et al., 2010; Hassine-Zaafraane et al., 2015)。

2015-2016 シーズンにおける牡蠣中のワクチン株の割合は、前のシーズンよりも著しく高かった。この理由として、両シーズンにおけるロタウイルス検出者数の違いが挙げられる。2015-2016 シーズンの検出者はわずか 12 人であり、2014-2015 シーズン (80 人) よりも明らかに少なかった。野生株 RVA の排出源はロタウイルスに感染した胃腸炎患者であるため、この検出者数の差が割合の差に影響したと考えられる。対照的に、下水に含まれるワクチン株の割合は、全シーズンを通じて 10%未満であった。この結果から、ワクチン株が野生株より高い生残性、安定性および牡蠣体内への親和性を有していることが示唆されたが、現段階では不明な点が多く、さらなる研究によって明らかにする必要がある。

本研究ではさらに、牡蠣と下水に含まれるロタウイルスと、ロタウイルスに関連する胃腸炎の症例数との関係を特定するため、相関分析を行った。下水における野生型 RVA

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 (Paul et al., 2014; Phillips et al., 2010)。Ruggeri らは、ロタウイルスの入院患者における RVA 検出の季節的傾向は下水とは異なり、無症候性の感染者における RVA の循環を示唆していると報告しており (Ruggeri et al., 2015)、本研究ではこの報告を支持する結果が得られた。牡蠣中と下水中の野生株 RVA は、ノロウイルスでの分析結果と同様に、方法 (a) を使用した場合は -6~0 週間のタイムラグで ( $p < 0.05$ )、方法 (b) を使用した場合は -4~0 週間のタイムラグで有意な相関が見られた (Pu et al., 2018)。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 RVA は、下水システムおよび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。牡蠣中のロタテック量は、方法 (a) および (b) のどちらでも下水中のロタテックとは相関関係になかった。一方で、前述したようにロタテックは野生株よりも効率的に蓄積されている可能性があり、この矛盾を解決するためにはさらなる分析が必要である。

結論として、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 RVA 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、より安全な牡蠣を消費者に提供するだけでなく、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。また、野生株 RVA とロタウイルスワクチン株は、87 の牡蠣サンプル (37%) と 23 の下水サンプル (30%) から同時に検出されており、牡蠣および下水由来のロタウイルス感染者の体内で、野生株とワクチン株の遺伝子再集合 (リアソートメント) が起こる可能性がある。モニタリングの際には、遺伝子再集合によって生成された新たな配列の RVA 株に特別な注意を払う必要がある (Donato et al., 2012; Jere et al., 2017; Rose et al., 2013)。

## 参考文献

- Bucardo, F., Lindgren, P.-E., Svensson, L., Nordgren, J., 2011. Low Prevalence of Rotavirus and High Prevalence of Norovirus in Hospital and Community Wastewater after Introduction of Rotavirus Vaccine in Nicaragua. *PLoS One* 6, e25962.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025962>
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Donato, C.M., Ch'Ng, L.S., Boniface, K.F., Crawford, N.W., Buttery, J.P., Lyon, M., Bishop, R.F., Kirkwood, C.D., 2012. Identification of strains of rotateq rotavirus vaccine in infants with gastroenteritis following routine vaccination. *J. Infect. Dis.* 206, 377–383.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jis361>
- Fumian, T.M., Leite, J.P.G., Castello, A.A., Gaggero, A., Caillou, M.S.L. d., Miagostovich, M.P., 2010. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J. Virol. Methods* 170, 42–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.08.017>
- Gautam, R., Esona, M.D., Mijatovic-Rustempasic, S., Ian Tam, K., Gentsch, J.R., Bowen, M.D., 2014. Real-time RT-PCR assays to differentiate wild-type group A rotavirus strains from Rotarix<sup>®</sup> and RotaTeq<sup>®</sup> vaccine strains in stool samples. *Hum. Vaccin. Immunother.* 10, 767–777. <https://doi.org/10.4161/hv.27388>
- Hassine-Zaafraane, M., Kaplon, J., Ben Salem, I., Sdiri-Loulizi, K., Sakly, N., Pothier, P., Aouni, M., Ambert-Balay, K., 2015. Detection and genotyping of group A rotaviruses isolated from sewage samples in Monastir, Tunisia between April 2007 and April 2010. *J. Appl.*

- Microbiol. 119, 1443–1453. <https://doi.org/10.1111/jam.12920>
- Ito, E., Pu, J., Miura, T., Kazama, S., Nishiyama, M., Ito, H., Konta, Y., Nguyen, G.T., Omura, T., Watanabe, T., 2019. Weekly Variation of Rotavirus A Concentrations in Sewage and Oysters in Japan, 2014–2016. *Pathogens* 8, 89. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030089>
- Ito, H., Masago, Y., Ueki, Y., Watanabe, T., 2013. Detection and Quantification of Norovirus in Oysters using Low pH Elution and Enzymatic Virus Elution Methods. *J. Japan Soc. Civ. Eng. Ser. G (Environmental Res.* 69, III\_657-III\_665. [https://doi.org/10.2208/jscejer.69.III\\_657](https://doi.org/10.2208/jscejer.69.III_657)
- Jere, K.C., Chaguzza, C., Bar-Zeev, N., Lowe, J., Peno, C., Kumwenda, B., Nakagomi, O., Tate, J.E., Parashar, U.D., Heyderman, R.S., French, N., Cunliffe, N.A., Iturriza-Gomara, M., 2017. Emergence of Double- and Triple-Gene Reassortant G1P[8] Rotaviruses Possessing a DS-1-Like Backbone after Rotavirus Vaccine Introduction in Malawi. *J. Virol.* 92, 1246–1263. <https://doi.org/10.1128/jvi.01246-17>
- Kittigul, L., Singhaboot, Y., Chavalitshewinkoon-Petmitr, P., Pombubpa, K., Hirunpetcharat, C., 2015. A comparison of virus concentration methods for molecular detection and characterization of rotavirus in bivalve shellfish species. *Food Microbiol.* 46, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.020>
- Miura, T., Schaeffer, J., Le Saux, J.C., Le Mehaute, P., Le Guyader, F.S., 2018. Virus Type-Specific Removal in a Full-Scale Membrane Bioreactor Treatment Process. *Food Environ. Virol.* 10, 176–186. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9330-4>
- Pang, X.L., Lee, B., Boroumand, N., Leblanc, B., Preiksaitis, J.K., Yu Ip, C.C., 2004. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. *J. Med. Virol.* 72, 496–501. <https://doi.org/10.1002/jmv.20009>
- Paul, A., Gladstone, B.P., Mukhopadhyaya, I., Kang, G., 2014. Rotavirus infections in a

- community based cohort in Vellore, India. *Vaccine* 32, A49–A54.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.039>
- Phillips, G., Lopman, B., Rodrigues, L.C., Tam, C.C., 2010. Asymptomatic Rotavirus Infections in England: Prevalence, Characteristics, and Risk Factors. *Am. J. Epidemiol.* 171, 1023–1030. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq050>
- Pu, J., Miura, T., Kazama, S., Konta, Y., Azraini, N.D., Ito, E., Ito, H., Omura, T., Watanabe, T., 2018. Weekly variations in norovirus genogroup II genotypes in Japanese oysters. *Int. J. Food Microbiol.* 284, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.027>
- Rigotto, C., Victoria, M., Moresco, V., Kolesnikovas, C.K.K., Corrêa, A.A., Souza, D.S.M.S.M., Miagostovich, M.P.P., Simões, C.M.O.M.O., Barardi, C.R.M.R.M., 2010. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1979–1987.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04827.x>
- Rose, T.L., da Silva, M.F.M., Gómez, M.M., Resque, H.R., Ichihara, M.Y.T., Volotão, E. de M., Leite, J.P.G., 2013. Evidence of vaccine-related reassortment of rotavirus, Brazil, 2008-2010. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1843–1846. <https://doi.org/10.3201/eid1911.121407>
- Ruggeri, F.M., Bonomo, P., Ianiro, G., Battistone, A., Delogu, R., Germinario, C., Chironna, M., Triassi, M., Campagnuolo, R., Cicala, A., Giammanco, G.M., Castiglia, P., Serra, C., Gaggioli, A., Fiore, L., 2015. Rotavirus genotypes in sewage treatment plants and in children hospitalized with acute diarrhea in Italy in 2010 and 2011. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 241–249. <https://doi.org/10.1128/AEM.02695-14>
- Ruiz-Palacios, G.M., Pérez-Schael, I., Velázquez, F.R., Abate, H., Breuer, T., Clemens, S.C., Chevart, B., Espinoza, F., Gillard, P., Innis, B.L., Cervantes, Y., Linhares, A.C., López, P., Macías-Parra, M., Ortega-Barría, E., Richardson, V., Rivera-Medina, D.M., Rivera, L., Salinas, B., Pavía-Ruz, N., Salmerón, J., Rüttimann, R., Tinoco, J.C., Rubio, P., Nuñez, E.,

Guerrero, M.L., Yarzabal, J.P., Damaso, S., Tornieporth, N., Sáez-Llorens, X., Vergara, R.F., Vesikari, T., Bouckenooghe, A., Clemens, R., De Vos, B., O’Ryan, M., 2006. Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 354, 11–22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052434>

Troeger, C., Forouzanfar, M., Rao, P.C., Khalil, I., Brown, A., Reiner, R.C., Fullman, N., Thompson, R.L., Abajobir, A., Ahmed, M., Alemayohu, M.A., Alvis-Guzman, N., Amare, A.T., Antonio, C.A., Asayesh, H., Avokpaho, E., Awasthi, A., Bacha, U., Barac, A., Betsue, B.D., Beyene, A.S., Boneya, D.J., Malta, D.C., Dandona, L., Dandona, R., Dubey, M., Eshrati, B., Fitchett, J.R.A., Gebrehiwot, T.T., Hailu, G.B., Horino, M., Hotez, P.J., Jibat, T., Jonas, J.B., Kasaeian, A., Kisseff, N., Kotloff, K., Koyanagi, A., Kumar, G.A., Rai, R.K., Lal, A., El Rizek, H.M.A., Mengistie, M.A., Moe, C., Patton, G., Platts-Mills, J.A., Qorbani, M., Ram, U., Roba, H.S., Sanabria, J., Sartorius, B., Sawhney, M., Shigematsu, M., Sreeramareddy, C., Swaminathan, S., Tedla, B.A., Jagiellonian, R.T.M., Ukwaja, K., Werdecker, A., Widdowson, M.A., Yonemoto, N., El Sayed Zaki, M., Lim, S.S., Naghavi, M., Vos, T., Hay, S.I., Murray, C.J.L., Mokdad, A.H., 2017. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect. Dis.* 17, 909–948. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30276-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30276-1)

Vesikari, T., Matson, D.O., Dennehy, P., Van Damme, P., Santosham, M., Rodriguez, Z., Dallas, M.J., Heyse, J.F., Goveia, M.G., Black, S.B., Shinefield, H.R., Christie, C.D.C., Ylitalo, S., Itzler, R.F., Coia, M.L., Onorato, M.T., Adeyi, B.A., Marshall, G.S., Gothefors, L., Campens, D., Karvonen, A., Watt, J.P., O’Brien, K.L., DiNubile, M.J., Clark, H.F., Boslego, J.W., Offit, P.A., Heaton, P.M., 2006. Safety and Efficacy of a Pentavalent Human–Bovine (WC3) Reassortant Rotavirus Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 354, 23–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052664>

Yen, C., Jakob, K., Esona, M.D., Peckham, X., Rausch, J., Hull, J.J., Whittier, S., Gentsch, J.R.,

LaRussa, P., 2011. Detection of fecal shedding of rotavirus vaccine in infants following their first dose of pentavalent rotavirus vaccine. *Vaccine* 29, 4151–4155.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.074>

## 第5章 牡蠣のウイルス蓄積能力の個体差およびウイルス蓄積に関係する糖鎖構造の探索

### 5. 1 はじめに

我々のグループの先行研究では、2年間にわたって養殖牡蠣中のノロウイルス量をモニタリングし、その季節的変動を明らかにした (Pu et al., 2018)。その結果、全体的な傾向としては冬季にノロウイルス量が増加する傾向が見られたが、個体ごとのウイルス蓄積量には個体差が見られた。先行研究に用いられた養殖牡蠣サンプルは、とある海域の同じ牡蠣養殖棚から同時に採取されたものであり、周囲のウイルス量や物理的条件はほとんど同じであると考えられる。前述したように、牡蠣のウイルス蓄積に糖鎖が関与していることから、牡蠣体内へのウイルス蓄積量の個体差は、体内に発現している糖鎖の構造や量の違いが影響しているという仮説が立てられる。

牡蠣の体内に発現している糖鎖とノロウイルスとの結合に関する先行研究は多く (Langlet et al., 2015; Li et al., 2015; Maalouf et al., 2011, 2010)、少しずつそのメカニズムが解き明かされつつあるが、牡蠣個体それぞれの個体差に着目して研究を行った例はない。これまで牡蠣のノロウイルス汚染については、海域に流入するウイルスを減少させるか、蓄積されたウイルスを不活化させる方法での対策が多かったが、未だほぼ確実にウイルス汚染を防ぐ方法は確立されていない。しかし、ウイルスを蓄積しづらい牡蠣が存在するのであれば、これまでの方法と組み合わせることで、養殖牡蠣の安全性をさらに向上させることが可能である。

本研究では、養殖牡蠣を人為的にノロウイルスに汚染させる実験を行い、その蓄積量に個体差が見られるかどうかを明らかにする。さらに、ウイルスの蓄積量が多い個体と少ない個体について、体内の糖鎖構造に差が見られるかどうかを糖鎖構造解析により調査する。

## 5. 2 実験方法

### 5. 2. 1 養殖牡蠣のウイルス汚染実験

ウイルス汚染実験の養殖牡蠣サンプルは、東北地方太平洋沿岸のとある海域で養殖されたマガキ (*Crassostrea gigas*) を、各遺伝子型についてそれぞれ 20 個用いた。汚染させるノロウイルス株は、宮城県保健環境センターに保存されていた、胃腸炎患者の糞便から分離されたノロウイルス GI.7 株および GII.2 株を用いた。ろ過海水それぞれ 175L に約  $10^6$  copies/mL のノロウイルス GI または GII 溶液を 62.5mL 添加し、飼育に用いた。200L パンライト水槽に各ウイルス添加ろ過海水と牡蠣個体を 20 個ずつ入れ、餌として *Chaetoceros gracilis* を  $10^9$  cell 加えた。エアレーションを行いながら 24 時間ごとに換水および餌の添加を実施し、計 72 時間の飼育を行った。飼育後回収した牡蠣は直ちに殻を外し、中腸腺を摘出した。摘出した中腸腺は氷上で冷却しながら実験室へ運ばれ、ウイルスの定量用サンプルとして 0.5 g の中腸腺を取り分けた。各中腸腺サンプルは、分析開始まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存された。

### 5. 2. 2 ウイルス濃縮および RNA 抽出

牡蠣からのウイルス抽出の手法は先行研究に従った (Pu et al., 2018)。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 mg/L となるように滅菌した超純水に溶解し、酵素溶液を作成した。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。各中腸腺サンプル 0.5 g に対し、3.2 mm ステンレスビーズ (TOMY) 2 個と酵素溶液 1 mL を加え、内部コントロールとしてマウスノロウイルス S7-PP3 株を  $1.0 \times 10^7$  copies 添加した。その後、4200 rpm、1 分間の細胞破碎 (Micro Smash-100, TOMY) を行い、さらに、 $37^{\circ}\text{C}$  1 時間、 $60^{\circ}\text{C}$  15 分間インキュベートした。最後に  $9100 \times g$ 、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、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  $\mu$ L に対して 500  $\mu$ L のクエン酸バッファー (pH 2.5, 400 mM) を添加した後、9100 $\times$ g、12 分の遠心分離を行い、その上清の全量を RNA の抽出に用いた。RNA 抽出には NucliSENS miniMAG RNA extraction kit (bioMérieux) を用い、実験操作は付属のプロトコルに従った。

### 5. 2. 3 逆転写およびウイルス定量

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 $\times$ iScript advanced reaction mix 8  $\mu$ L, iScript advanced reverse transcriptase 2  $\mu$ L, ヌクレアーゼフリー水 10  $\mu$ L, テンプレート RNA 20  $\mu$ L とした。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。

ノロウイルス GI、GII および MNV の定量を行った。プライマー配列および反応条件は、それぞれ Kageyama ら (Kageyama et al., 2003)、原ら (原 et al., 2009)、Hata ら (Hata et al., 2011) に従った (表 3.1 参照)。反応液の組成は、SsoAdvanced universal probes supermix 10 $\mu$ L、cDNA 5 $\mu$ L、プライマー・プローブおよびヌクレアーゼフリー水 5 $\mu$ L の計 20 $\mu$ L とした。The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) ガイドラインに従い、検出対象が一定の値まで増幅した際のサイクル数である C<sub>q</sub> が 40 以下のサンプルを陽性とした (Bustin et al., 2009)。検量線の作成には、ターゲット配列を含むオリゴ DNA の 10 倍希釈系列 (10<sup>1</sup>–10<sup>5</sup> copies/ウェル) の定量値を用いた。

### 5. 2. 4 糖タンパク質抽出

各サンプルのウイルス定量値に基づき、ウイルス蓄積量の多いサンプルおよび少ないサンプルを 3 個体ずつ、計 12 個体のサンプルを選定した。選定したサンプルから、糖鎖を含む糖タンパク画分の抽出を行った。抽出手法は Maalouf らを参考に、中腸腺の重

量に応じて若干の改変を加えた (Maalouf et al., 2010)。保存されていた各中腸腺サンプルにステンレスビーズ 1 個と 0.8mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.4) を加え、Micro Smash-100 (TOMY) で 4200 rpm・1 分間の細胞破碎を行った。破碎液を 95°C で 10 分インキュベートした後、4°C で 13000×g・7 分の遠心分離を行い、上清を糖タンパク抽出液として回収した。各抽出液は、Qubit™ Protein Assay Kit (Life Technologies,) を用いてタンパク質濃度を測定し、40µg/mL となるように PBS で希釈した (Maalouf et al., 2010)。

### 5. 2. 5 糖鎖構造解析

牡蠣から抽出した糖タンパク画分中に含まれる糖鎖の構造は、Lectin Array 95 (RayBiotech) を用いた、95 種類のレクチンアレイ解析によって明らかにした。レクチンは、特定の糖鎖構造を認識して結合するタンパク質の総称である。使用したレクチンの情報と認識する糖鎖構造を表 5. 1. 1 および表 5. 1. 2 に示す (RayBiotech, 2018)。分析においては各サンプルを 100µL 用い、アレイによる分析およびデータ解析はフナコシ株式会社に委託した。各サンプル中の糖タンパク質へビオチンを付着させ、続いてビオチンへの親和性が非常に高い標識ストレプトアビジンを結合させて、標識物質の蛍光強度を測定することで各レクチンに認識される糖鎖構造の存在量を明らかにした。蛍光測定においてはサンプルを加えない陰性対照系列を作成し、糖鎖に由来しないバックグラウンド蛍光の強度を測定して、各サンプルの蛍光強度測定値から差し引いた。それぞれのレクチンの蛍光強度測定結果は、ウイルス蓄積量の多い 3 サンプルおよび少ない 3 サンプルの平均値を算出し、有意水準 5% で有意差検定を行った。

表 5.1.1 レクチンアレイに用いたレクチンの情報および認識する糖鎖構造。

	Lectins	Abbreviation	Source	Carbohydrate specificity
1	<i>Anguilla anguilla</i>	AAA	<i>Anguilla anguilla</i> (Fresh Water Eel)	αFuc
2	<i>Aleuria aurantia</i>	AAL	<i>Aleuria aurantia</i> mushrooms	Fuca6GlcNAc
3	<i>Agaricus bisporus</i> lectin	ABA	<i>Agaricus bisporus</i>	Galactose (β1,3) N-Acetylgalactosamine
4	<i>Agaricus bisporus</i> lectin	ABL	<i>Agaricus bisporus</i> (White button mushroom)	galactose-β-1,3-N-acetylgalactosamine, galactose-β-1,3-N-acetylglucosamine
5	<i>Agrocybe cylindracea</i> lectin	ACG	<i>Agrocybe cylindracea</i> gaelectin lectin	α2-3 Sialic Acid
6	<i>Amaranthus caudatus</i>	ACL, ACA	<i>Amaranthus caudatus</i> seeds	Galβ3GalNAc
7	<i>Arum maculatum</i> lectin	AMA	<i>Arum maculatum</i> (Lords and Ladies)	Mannose
8	<i>Allium sativum</i>	ASA	<i>Allium sativum</i> agglutinin (Garlic)	αMan
9	<i>Musa acuminata</i> lectin	BanLec	E. coli expressed <i>Musa acuminata</i>	containing α1,3-glycoside bond
10	<i>Burkholderia cenocepacia</i> lectin	BC2L-A	E. coli expressed <i>Burkholderia cenocepacia</i>	High-mannose
11	<i>Burkholderia cenocepacia</i> lectin	BC2LCN (AiLe cS1)	E. coli expressed <i>Burkholderia cenocepacia</i>	Fuca1-2Galβ1-3GalNAc (H type 3), Fuca1-2Galβ1-3GlcNAc (H type 1)
12	<i>Bauhinia purpurea</i>	BPA, BLP	<i>Bauhinia purpurea alba</i> (Camel's Foot Tree)	Galβ3GalNAc
13	<i>Colchicum autumnale</i>	CA	<i>Colchicum autumnale</i>	Lactose > N-Acetylgalactosamine > Galactose
14	<i>Caragana arborescens</i>	CAA	<i>Caragana arborescens</i> (pea tree)	N-Acetylgalactosamine
15	<i>Calystegia sepium</i> lectin	Calsepa	E. coli expressed <i>Calystegia sepium</i>	High-mannose
16	<i>Coprinopsis cinerea</i> lectin	CGL2	E. coli expressed <i>Coprinopsis cinerea</i>	βGal, GalNAcα1-3Gal (Blood Group A), Galα1-3Gal (Blood Group B)
17	<i>Clitocybe nebularis</i> lectin	CNL	E. coli expressed <i>Clitocybe nebularis</i>	2]Galβ1-4GlcNAc (Blood Group A)
18	Coanavalin A	Con A	<i>Coanavalia ensiformis</i> (Jack Beans) seeds	αMan, αGlc
19	<i>Cicer arietinum</i> lectin	CPA	<i>Cicer arietinum</i> (chick pea)	Fetuin
20	<i>Cytisus scoparius</i> lectin	CSA	Scotch broom	N-Acetylgalactosamine
21	<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	<i>Dolichos biflorus</i> (Horse Gram) seeds	αGalNAc
22	<i>Dictyostelium discoideum</i> lectin	Discoidin I	E. coli expressed <i>Dictyostelium discoideum</i>	αGalNAc (Tn antigen), LacNAc
23	<i>Dictyostelium discoideum</i> lectin	Discoidin II	E. coli expressed <i>Dictyostelium discoideum</i>	Gal, LacNAc, Asialoglycans, Gal/GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-6Gal/GalNAc
24	<i>Datura stramonium</i>	DSA, DSL	<i>Datura stramonium</i> (Thorn Apple, Jimson Weed) seeds	(GlcNAc) <sub>2-4</sub>
25	<i>Erythrina cristagalli</i>	ECA, ECL	<i>Erythrina cristagalli</i> (Coral Tree) seeds	Galβ4GlcNAc
26	<i>Eunonymus europaeus</i>	EEL	<i>Eunonymus europaeus</i> (Spindle Tree) seeds	Galα3Gal
27	<i>E. coli</i> lectin	F17AG	E. coli expressed <i>E. coli</i>	GlcNAc
28	<i>Pure Helix aspersa</i> lectin	HAA	Garden Snail	N-Acetylgalactosamine
29	<i>Homarus americanus</i> lectin	HMA	<i>Homarus americanus</i> (California lobster)	N-Acetylneuraminic acid, N-Acetylgalactosamine
30	Human galectin1 lectin (stable form)	Gal1	E. coli expressed human galectin1 (stable form)	branched LacNAc, Gal
31	Human galectin1-S lectin	Gal1-S	E. coli expressed human galectin1-S	branched LacNAc
32	Human galectin2 lectin	Gal2	E. coli expressed human galectin2	GalNAcα1-3Gal (Blood Group A), branched LacNAc
33	Human galectin3 lectin (full-length)	Gal3	E. coli expressed Human galectin3(full-length)	poly LacNAc
34	Human galectin 3C-S lectin	Gal3C-S	E. coli expressed Human galectin 3C-S	poly LacNAc
35	Human galectin7-S lectin	Gal7-S	E. coli expressed Human galectin7-S	Galβ1-3GlcNAc
36	Human galectin9 lectin (Stable Form)	Gal9	E. coli expressed human galectin9	poly LacNAc, GalNAcα1-3Gal (Blood Group A)
37	<i>Glechoma Hederacea</i> lectin	GHA	<i>Glechoma hederacea</i> (ground ivy)	Gal, methyl α-D-galactopyranoside, GalNAc
38	<i>Galanthus nivalis</i>	GNA, GNL	<i>Galanthus nivalis</i> (Snowdrop) bulbs	αMan
39	<i>Griffithia sp. Lectin</i>	GRFT	E. coli expressed <i>Griffithia sp.</i>	High-mannose
40	<i>Griffonia (Banderaea) simplicifolia I</i>	GS-I, GSL-II, BSL-I	<i>Griffonia (Banderaea) simplicifolia</i> seeds	αGal, α3GalNAc
41	<i>Griffonia (Banderaea) simplicifolia</i>	BSL-II	<i>Griffonia (Banderaea) simplicifolia</i> seeds	α or βGlcNAc
42	<i>Hippeastrum hybrid</i>	HHA, HHL, AL	<i>Hippeastrum hybrid</i> (Amaryllis) bulbs	αMan
43	<i>Iris hybrid</i> lectin	IRA	<i>Iris hybrid</i> (Dutch Iris)	N-Acetyl-D-Galactosamine
44	Jacalin	Jacalin, AIL	<i>Artocarpus integrifolia</i> (Jackfruit) seeds	Galβ3GalNAc
45	Laburnum anagyroides lectin	LAL	<i>Laburnum anagyroides</i>	α-Me-L-Fucose among monosacchrides
46	<i>Phaseolus lunatus</i>	LBA	<i>Phaseolus lunatus</i> (Lima Bean) seeds	GalNAcα[1,3][αFuc(1,2)]Gal
47	<i>Lens Culinaris</i>	LcH, LCA	<i>Lens culinaris</i> (lenti I) seeds	αMan, αGlc
48	<i>Lycopersicon esculentum</i>	LEA, LEL, TL	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato) fruit	(GlcNAc) <sub>2-4</sub>
49	Lentil lectin	Lentil	<i>Lens culinaris</i> seeds	D-Mannose, D-glucose
50	<i>Limulus polyphemus</i>	LPA	<i>Iris hybrid</i> (Dutch Iris)	Sialic Acid (N-Acetylneuraminic acid)
51	<i>Lotus tetragonolobus</i>	Lotus, LTL	<i>Lotus tetragonolobus</i> , <i>Tetragonolobus purprea</i> (Winged Pea, Asparagus Pea) seeds	αFuc
52	<i>Laetiporus sulphureus</i> lectin	L.SL-N	E. coli expressed <i>Laetiporus sulphureus</i>	LacNAc, poly LacNAc
53	<i>Maackia amurensis I</i>	MAA, MAL, MAL-I	<i>Maackia amurensis</i> seeds	Galβ4GlcNAc
54	Human malectin lectin	Malectin	E. coli expressed human malectin	Glc <sub>2</sub> -N-biose
55	Pure Morniga G lectin	MNA-G	Black mulberry	Galactose
56	Morniga M Lectin	MNA-M	Black mulberry	Mannose
57	<i>Marasmius oreades</i> lectin	MOA	E. coli expressed <i>Marasmius oreades</i>	3Galβ1-4GlcNAc, Galα1-3Gal
58	<i>Maclura pomifera</i>	MPL, MPA	<i>Maclura pomifera</i> (Osage Orange) seeds	Galβ3GalNAc
59	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	NPA, NPL, DL	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> (Daffodil) bulbs	αMan
60	<i>Oryza sativa</i> lectin	Orysata	E. coli expressed <i>Oryza sativa</i>	High-mannose

表 5.1.2 レクチンアレイに用いたレクチンの情報および認識する糖鎖構造。

61	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lectin	PA-III.	<i>E. coli</i> expressed <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fucose, Fucose containing oligosaccharides,
62	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lectin	PA-IL	<i>E. coli</i> expressed <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gal $\alpha$ 1-3(4)Gal
63	<i>Phlebotidium aureum</i> lectin	PALa	<i>E. coli</i> expressed <i>Phlebotidium aureum</i>	High-mannose
64	<i>Phaseolus vulgaris</i> Erythroagglutinin	PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> Erythroagglutinin (Red Kidney Bean) seeds)	Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6(GlcNAc $\beta$ 4)(GlcNAc $\beta$ 4Man $\alpha$ 3)Man $\beta$ 4
65	Leucoagglutinin	PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> Erythroagglutinin (Red Kidney Bean) seeds)	Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 6(GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3)Man $\alpha$ 3 Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6(GlcNAc $\beta$ 4)(GlcNAc $\beta$ 4Man $\alpha$ 3)Man $\beta$ 4, Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 6(GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3)Man $\alpha$ 3
66	<i>Phaseolus vulgaris</i> agglutinin	PHA-P	<i>Phaseolus vulgaris</i> Erythroagglutinin (Red Kidney Bean) seeds)	Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6(GlcNAc $\beta$ 4)(GlcNAc $\beta$ 4Man $\alpha$ 3)Man $\beta$ 4, Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 6(GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3)Man $\alpha$ 3
67	Peanut	PNA	<i>Arachis hypogaea</i> Peanut	Gal $\beta$ 3GalNAc
68	<i>Pleurocybella porrigens</i> lectin	PPL	<i>E. coli</i> expressed <i>Pleurocybella porrigens</i>	$\alpha$ / $\beta$ GalNAc
69	<i>Pisum sativum</i>	PSA, PEA	<i>Pisum sativum</i> (Pea) seeds	$\alpha$ Man, $\alpha$ Glc
70	<i>Polyporus squamosus</i> lectin	PSL1a	<i>E. coli</i> expressed <i>Polyporus squamosus</i>	$\alpha$ 2-6 Sialic Acid
71	<i>Psophocarpus</i>	PTL, PTL-I, WBA I	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i> (Winged Bean) seeds	GalNAc, Gal
72	<i>psophocarpus tetragonolobus</i> lectin ii	PTL-II, WBA-II	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i> (Winged Bean) seeds	anomeric configuration), blood group H structures and the T-antigen
73	<i>Phytolacca americana</i> lectin	PWM, PWA	<i>Phytolacca americana</i> (Pokeweed)	GlcNAc( $\beta$ 1,4) GlcNAc oligomers, [Gal-( $\beta$ 1,4)
74	<i>Ricinus communis</i> agglutinin ii	RCA60	<i>Ricinus communis</i> (Castor bean)	Galactose, N-acetyl-D-galactosamine, lactose
75	<i>Ricinus communis</i> agglutinin I	RCA120	<i>Ricinus communis</i> (Castor bean)	galactose, lactose
76	<i>Robinia pseudoacacia</i> lectin	RPA	black locust	N-Acetylgalactosamine, thyroglobulin
77	<i>Ralstonia solanacearum</i> lectin	RS-Fuc	<i>E. coli</i> expressed <i>Ralstonia solanacearum</i>	Fucose
78	<i>Sambucus Sieboldiana</i> Lectin	SAMB	Japanese elderberry	NeuAc $\alpha$ 2-6Gal/GalNAc
79	Soybean	SBA	<i>Glycine max</i> (Soybean) seeds	$\alpha$ > $\beta$ GalNAc
80	<i>Salvia horminum</i> lectin	SHA	<i>Salvia horminum</i>	N-Acetylgalactosamine
81	<i>Sophora japonica</i>	SJA	<i>Sophora japonica</i> (Japanese Pagoda Tree)	$\beta$ GalNAc
82	<i>Sambucus nigra</i> I	SNA-I	<i>Sambucus nigra</i> (Elderberry) bark	NANA $\alpha$ (2,6)GalNAc > GalNAc = Lac >
83	<i>Sambucus nigra</i> II	SNA-II	<i>Sambucus nigra</i> (Elderberry) bark	GalNAc > Gal
84	<i>Salvia sclarea</i> lectin	SSA	<i>Salvia</i>	N-Acetylgalactosamine
85	<i>Solanum tuberosum</i>	STL, PL	<i>Solanum tuberosum</i> , (potato) tubers	(GlcNAc) $_{2-4}$
86	<i>Tulipa</i> lectin	TL	<i>Tulipa</i> sp.	N-Acetylgalactosamine
87	<i>Urtica dioica</i>	UDA	<i>Urtica dioica</i> (Stinging Nettle) seeds	GlcNAc
88	<i>Ulex europaeus</i> I	UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> (Furze Gorse) seeds	$\alpha$ Fuc
89	<i>Ulex europaeus</i> II	UEA-II	<i>Ulex europaeus</i> (Furze Gorse) seeds	Poly $\beta$ (1,4)GlcNAc
90	<i>Vicia faba</i>	VFA	<i>Vicia faba</i> (Fava Bean) seeds	$\alpha$ Man
91	<i>Vicia villosa</i>	WA, VL	<i>Vicia villosa</i> (Hairy Vetch) seeds	GalNAc
92	<i>Vicia villosa</i>	VVA-M	<i>Vicia villosa</i> (Hairy Vetch) seeds	Mannose
93	<i>Vigna radiata</i> lectin	VRA	mung bean	$\alpha$ -Galactose
94	<i>Wisteria floribunda</i>	WFA	<i>Wisteria floribunda</i> (Japanese Wisteria) seeds	GalNAc
95	Wheat Germ	WGA	<i>Triticum vulgare</i> (Wheat Germ)	GlcNAc

Sugar Abbreviations			
Fuc: L-Fucose	Gal: D-Galactose	GalNAc: N-Acetylgalactosamine	Glc: D-Glucose
GlcNAc: N-Acetylglucosamine	Lac: Lactose	Man: Mannose	

## 5. 3 結果

### 5. 3. 1 汚染実験によるウイルス蓄積量の定量結果

汚染実験に用いた海水の水温は、飼育期間中 7.5~11.4°Cの間で推移していた。ノロウイルス GI および GII の定量結果を図 5.1 に示す。ノロウイルス GI はすべてのサン

プルで検出された。定量値の最高値は 6.8 copies Log/g-中腸腺、最低値は 3.5 copies Log/g-中腸腺であり、およそ 2300 倍の差が見られた。ノロウイルス GII は、GI と同様にすべてのサンプルで検出された。定量値の最高値は 6.8 Log copies /g-中腸腺、最低値は 3.2 Log copies/g-中腸腺であり、およそ 3600 倍の差が見られた。それぞれの標準偏差は、ノロウイルス GI が 0.7 Log、GII が 1.1 Log であり、ノロウイルス GII の方が蓄積量のばらつきが大きかった。定量結果をもとに、糖鎖構造解析に用いるサンプルを各遺伝子型 6 個体ずつ選定した。選定したサンプルの定量値は、ノロウイルス GI がそれぞれ 6.8 Log copies/g-中腸腺、6.8 Log copies/g-中腸腺、6.7 Log copies/g-中腸腺、3.5 Log copies/g-中腸腺、5.4 Log copies/g-中腸腺、5.5 Log copies/g-中腸腺、GII がそれぞれ 6.8 Log copies/g-中腸腺、6.8 Log copies/g-中腸腺、6.8 Log copies/g-中腸腺、3.7 Log copies/g-中腸腺、3.7 Log copies/g-中腸腺、3.2 Log copies/g-中腸腺であった。

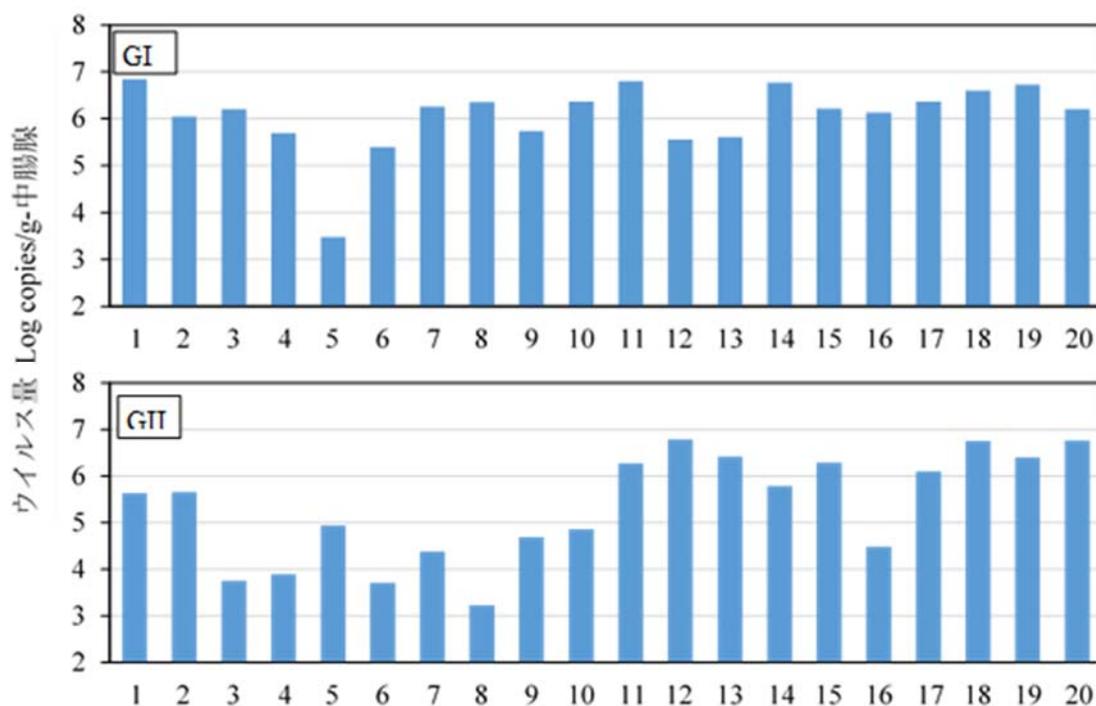


図 5.1 汚染実験によりノロウイルスを蓄積させた養殖牡蠣中のウイルス定量結果.

### 5. 3. 2 牡蠣体内の糖鎖構造解析結果

レクチンアレイによる糖鎖構造解析結果を図 5. 2. 1~5. 2. 15 に示す。ノロウイルス GI を蓄積させた牡蠣の糖鎖構造解析結果は、95 種のうち 4 種のレクチン（BPA、DSA、GAL1-S、HMA）の反応強度に有意差が見られた。いずれもノロウイルス GI を多く蓄積した牡蠣でレクチンとの反応強度が低く、体内の特定の糖鎖構造が少ない牡蠣の方がウイルスを多く蓄積しているという結果が示された。ノロウイルス GII を蓄積させた牡蠣の糖鎖構造解析結果では、9 種のレクチン（DSA、ECA、LcH A、PNA、PSA、SHA、SNA-1、VFA、VRA）の反応強度に有意差が見られた。いずれもノロウイルス GII を多く蓄積した牡蠣でレクチンとの反応強度が高く、特定の糖鎖構造が多い牡蠣の方がウイルスを多く蓄積していた。

### 5. 4 考察

本研究では、人為的なノロウイルス汚染実験により、同じ条件下で複数の牡蠣にウイルスを蓄積させ、個体差があるかどうかを明らかにした。ノロウイルスを添加した海水で牡蠣を人為的に汚染させる実験は、多くの先行研究で行われている（Maalouf et al., 2011, 2010; Ueki et al., 2007; Ventrone et al., 2013; Wang et al., 2008）。Maalouf らの研究においては、ノロウイルス GI.1、GII.3、GII.4 株を含む糞便懸濁液を接種した海水中で、養殖牡蠣を 24 時間飼育し汚染させる実験が行われた。その結果、GI.1 および GII.3 では 6.0~7.0 Log copies/g-中腸腺、GII.4 では 1.0~4.0 Log copies/g-中腸腺の定量値が得られた（Maalouf et al., 2011）。Ventrone らの研究でも同様に、GI.1 および GII.3 株を含む糞便サンプルを海水に接種し、1~9 日養殖牡蠣を汚染させる実験が行われている。得られた定量値は GI.1 で 3.7~5.1 Log copies/g-中腸腺、GII.3 で 4.6~5.7 Log copies/g-中腸腺であった（Ventrone et al., 2013）。本研究で得られた定量値は、GI.3 で

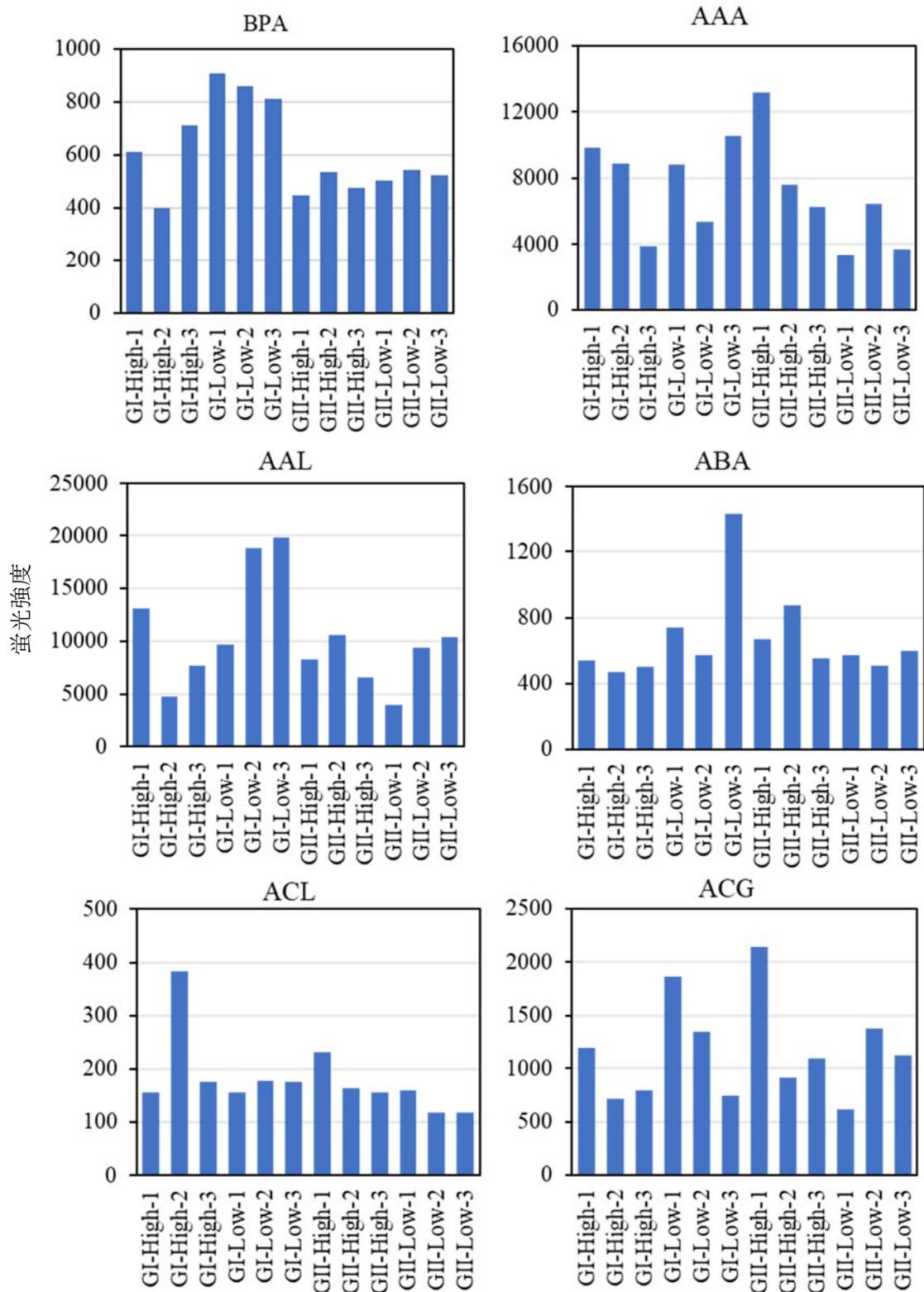


図 5.2.1 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.High はウイルス量が多かったことを、Low は少なかったことを示す。グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している。

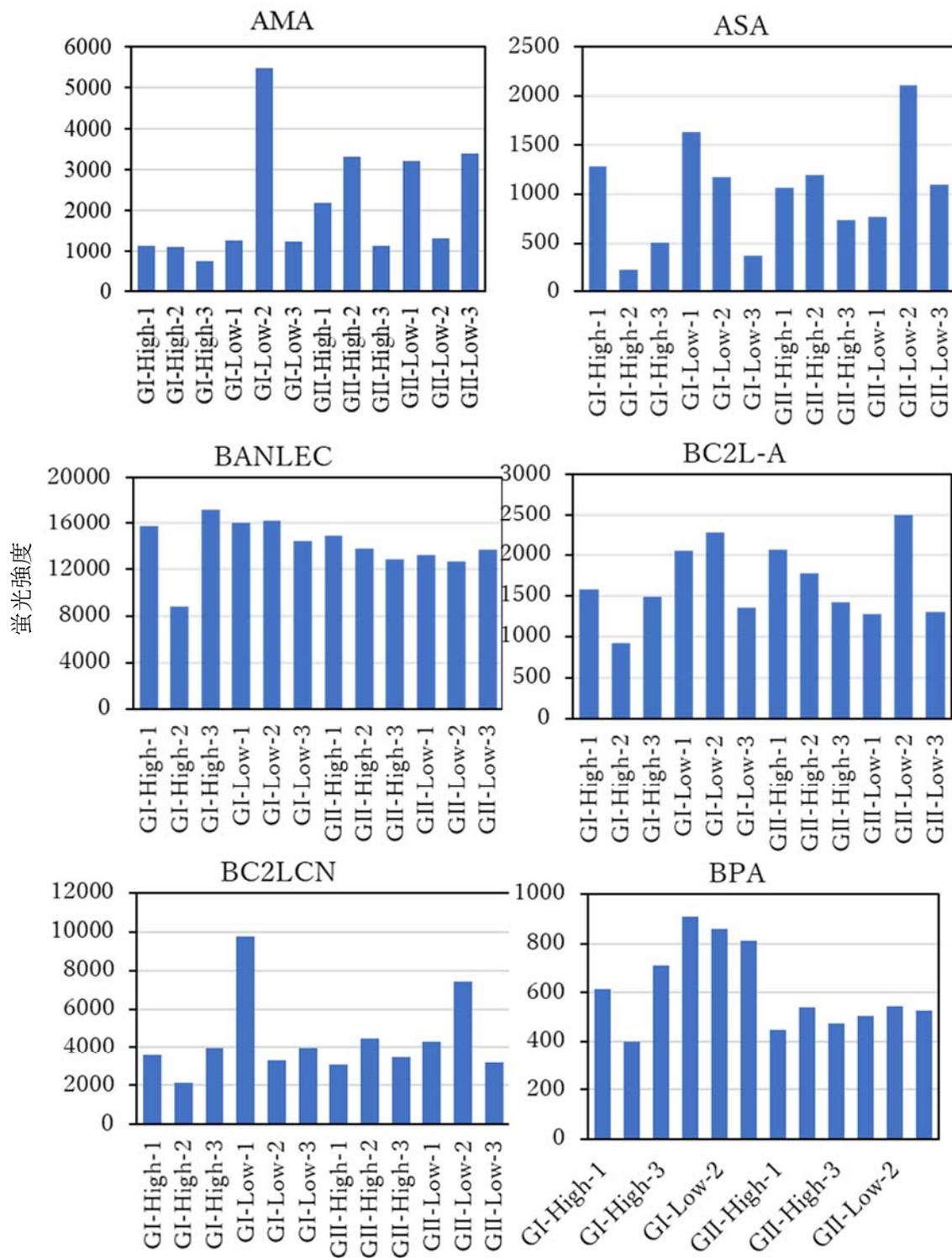


図 5.2.2 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.High はウイルス量が多かったことを、Low は少なかったことを示す.グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している.

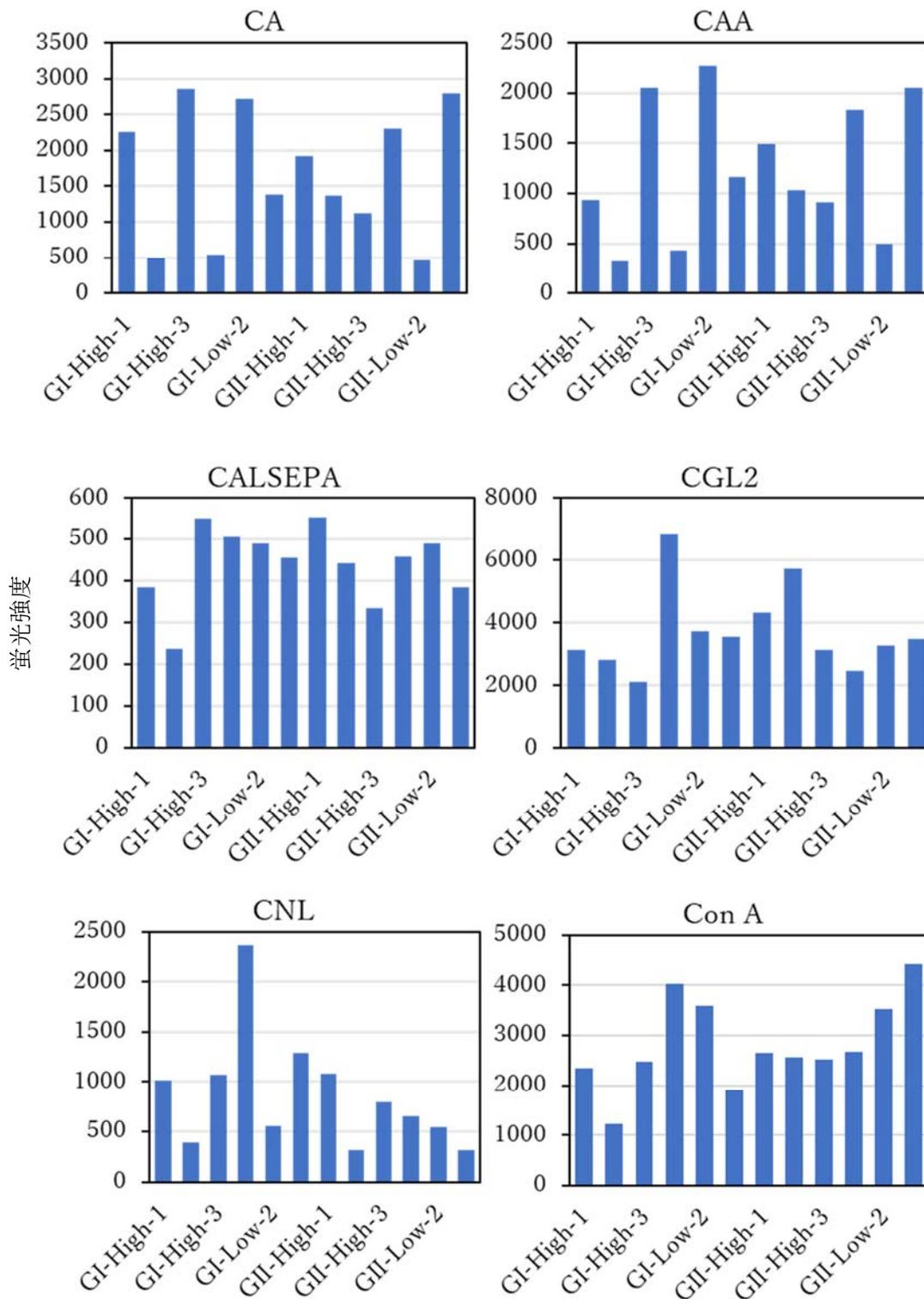


図 5.2.3 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.Highはウイルス量が多かったことを、Lowは少なかったことを示す.グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している。

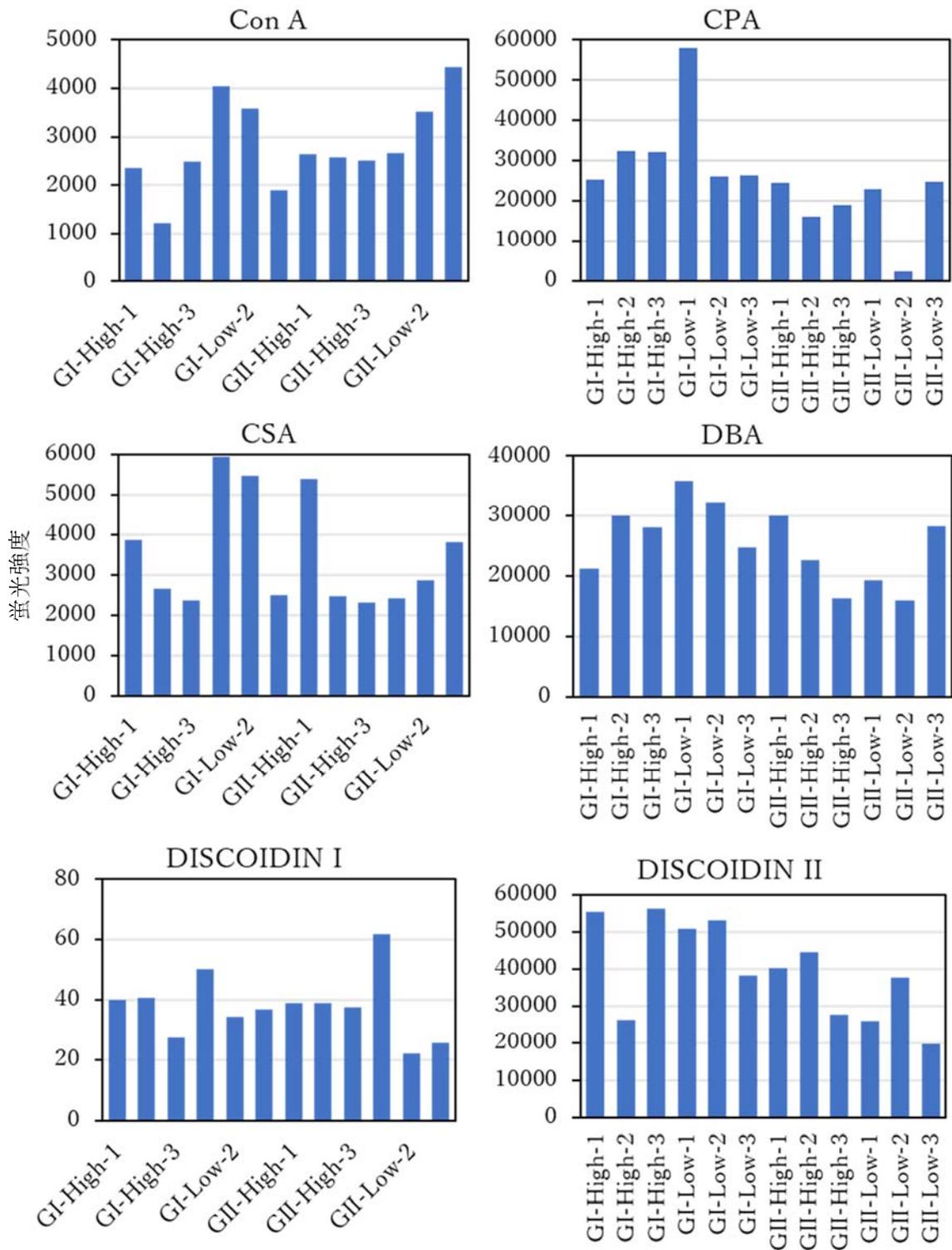


図 5.2.4 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.High はウイルス量が多かったことを、Low は少なかったことを示す.グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している。

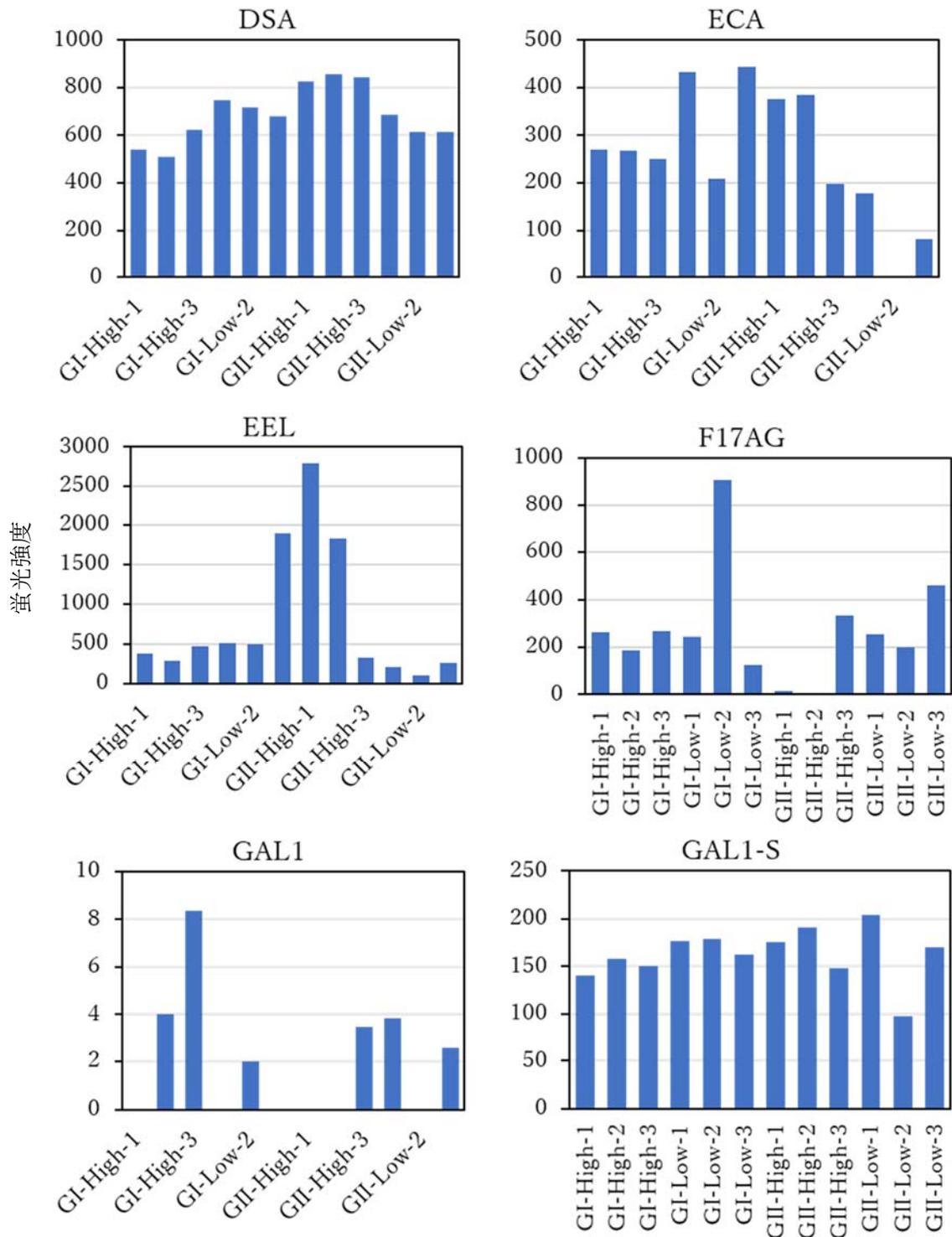


図 5.2.5 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.High はウイルス量が多かったことを、Low は少なかったことを示す.グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している.

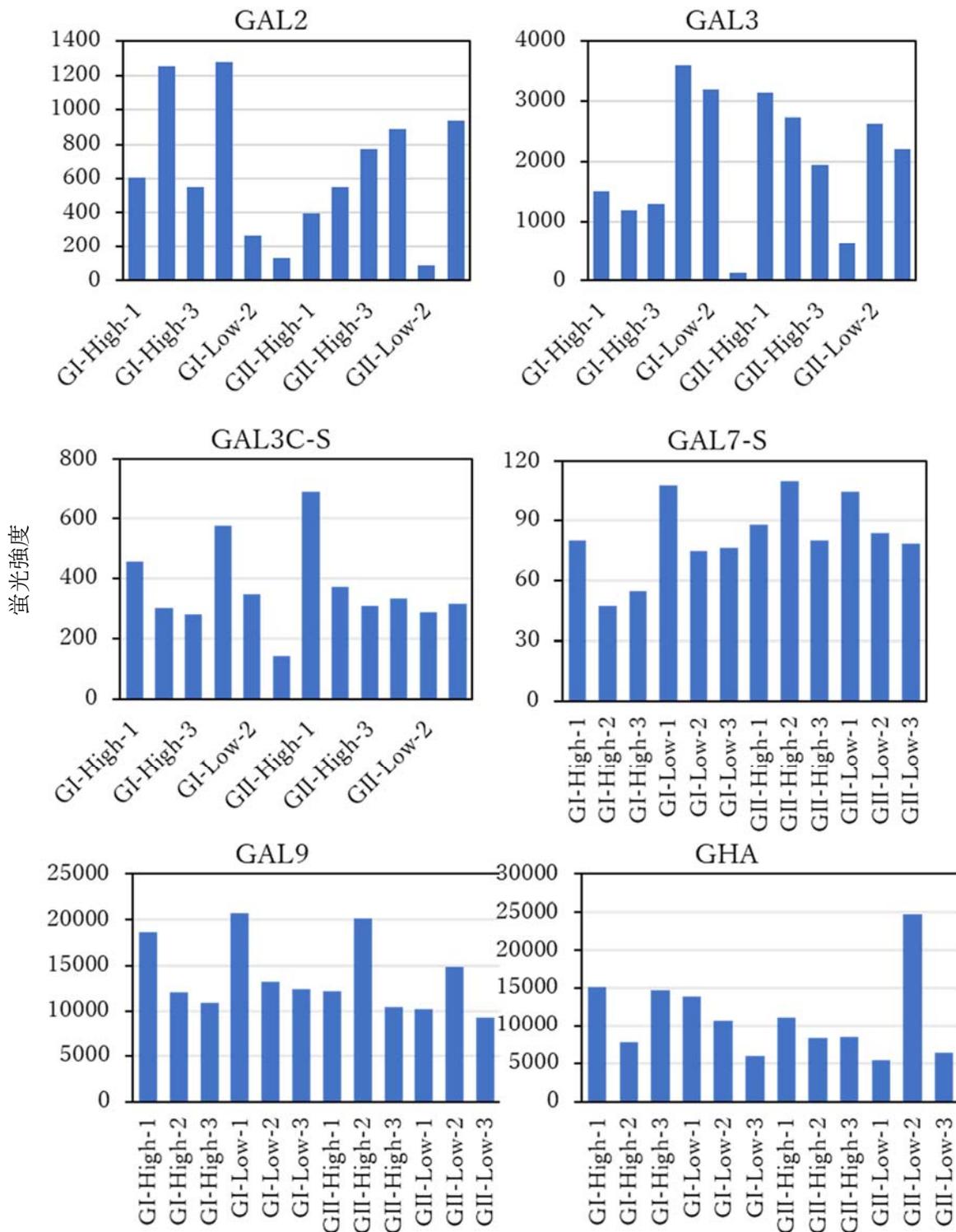


図 5.2.6 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.High はウイルス量が多かったことを、Low は少なかったことを示す.グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している.

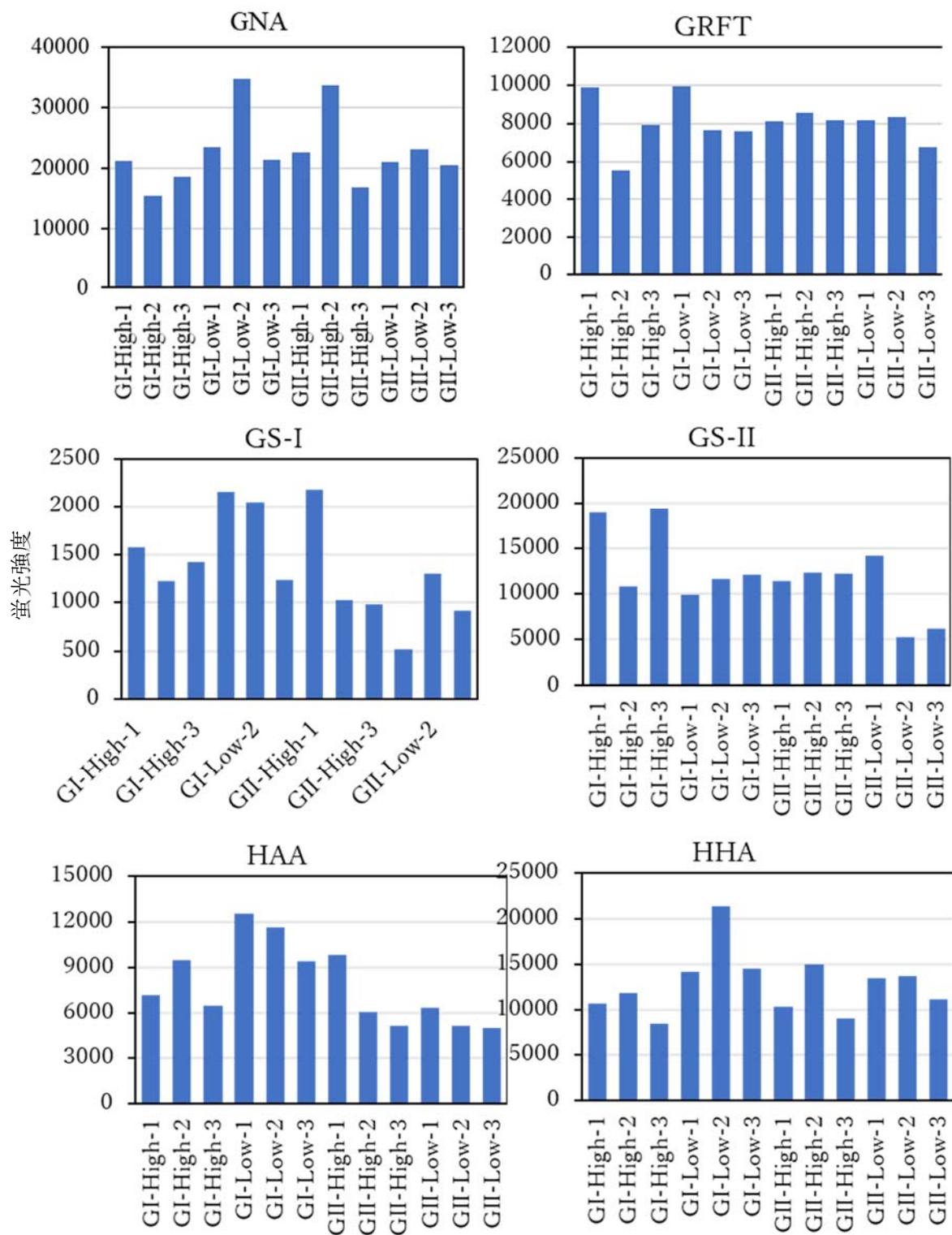


図 5.2.7 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.High はウイルス量が多かったことを、Low は少なかったことを示す.グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している。

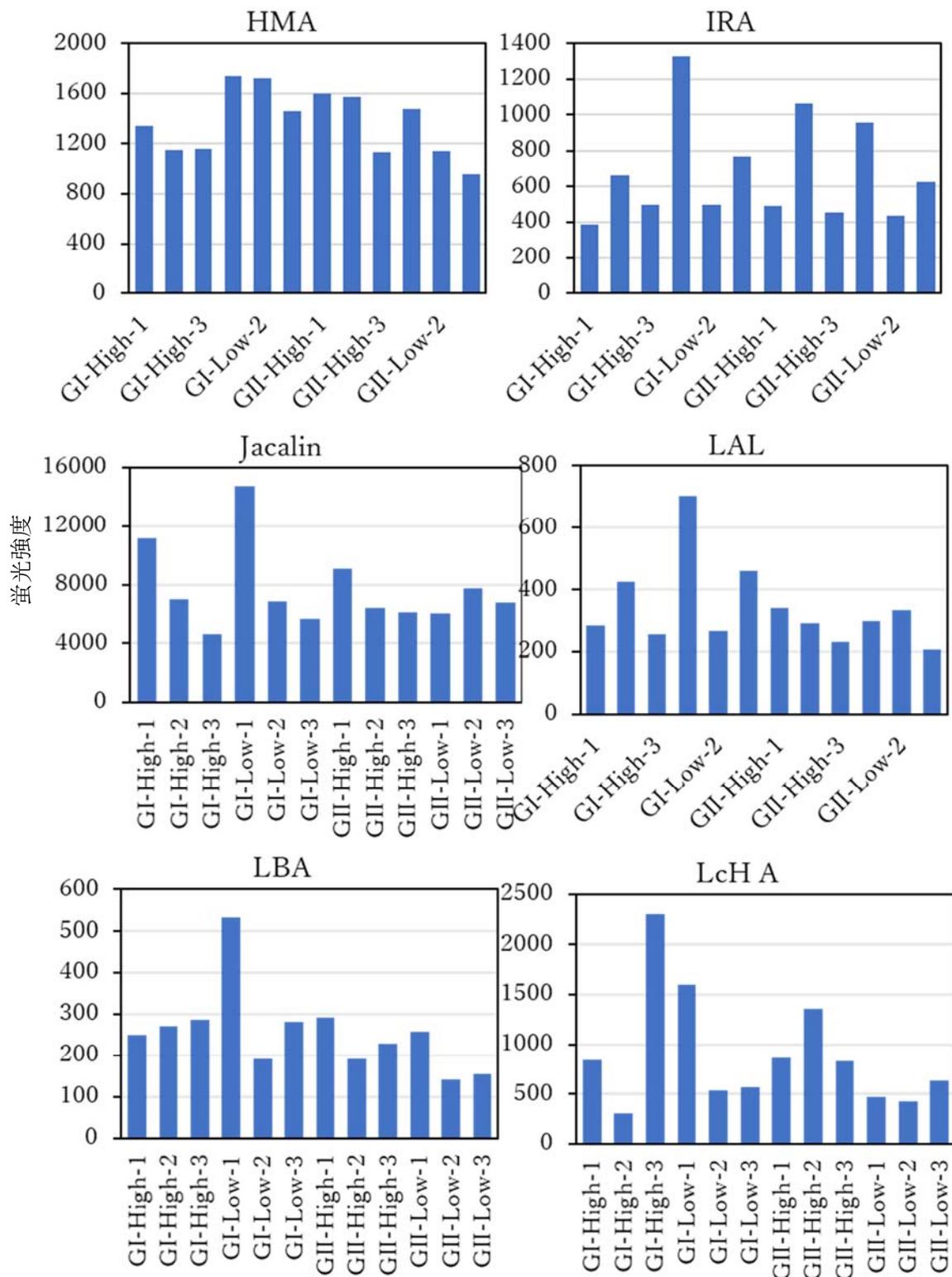


図 5.2.8 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.High はウイルス量が多かったことを、Low は少なかったことを示す.グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している。

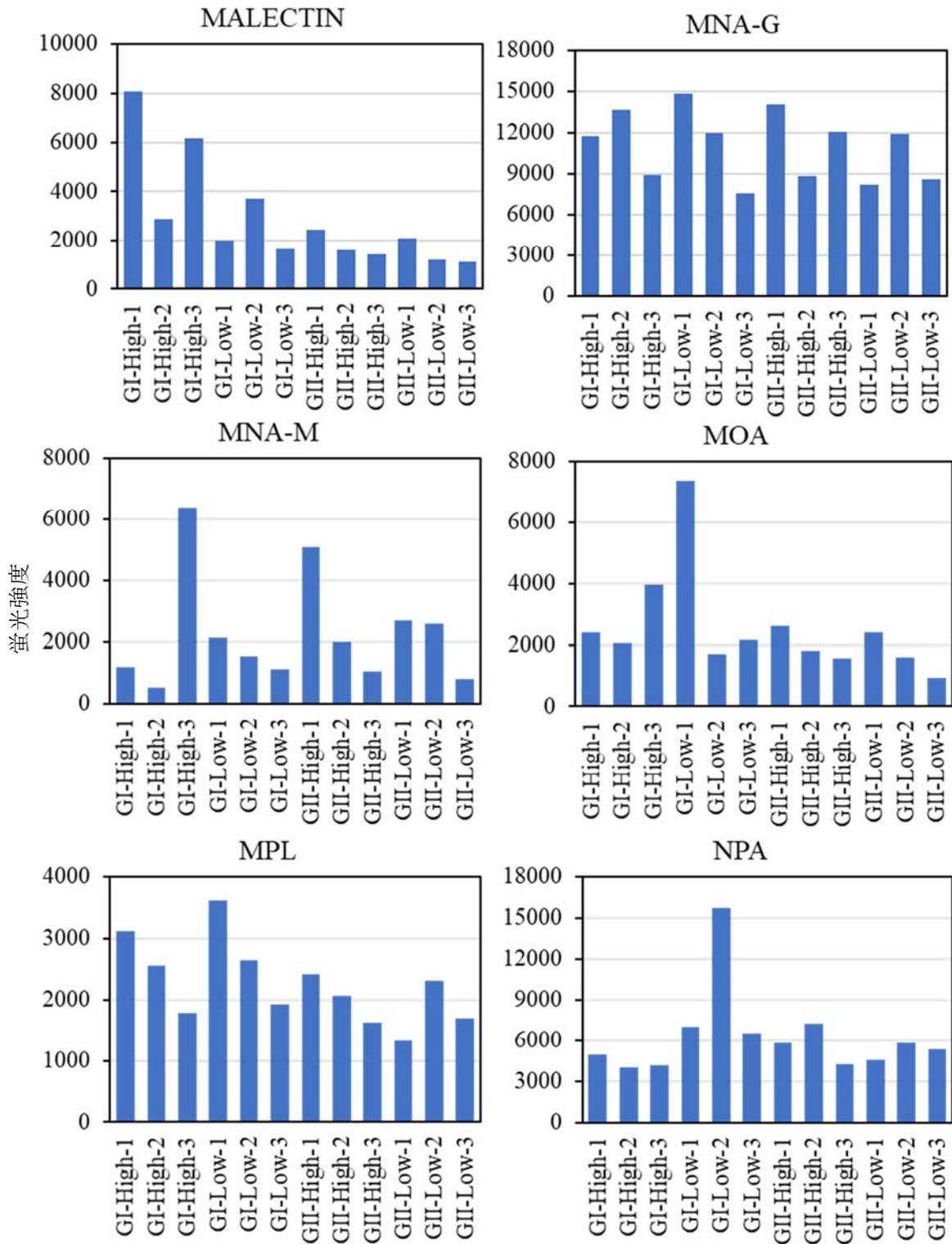


図 5.2.9 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.High はウイルス量が多かったことを、Low は少なかったことを示す。グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している。

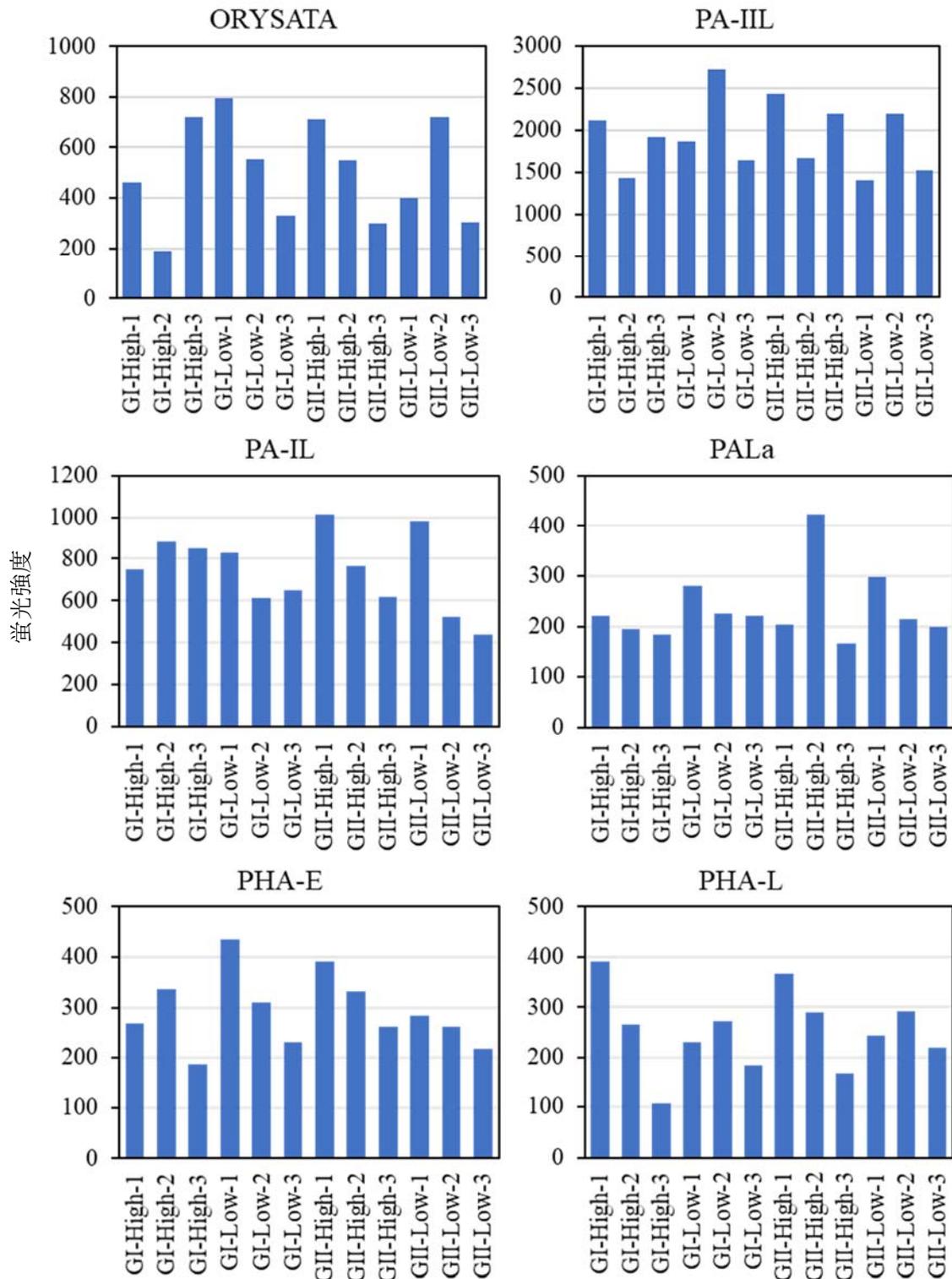


図 5.2.10 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.High はウイルス量が多かったことを、Low は少なかったことを示す.グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している。

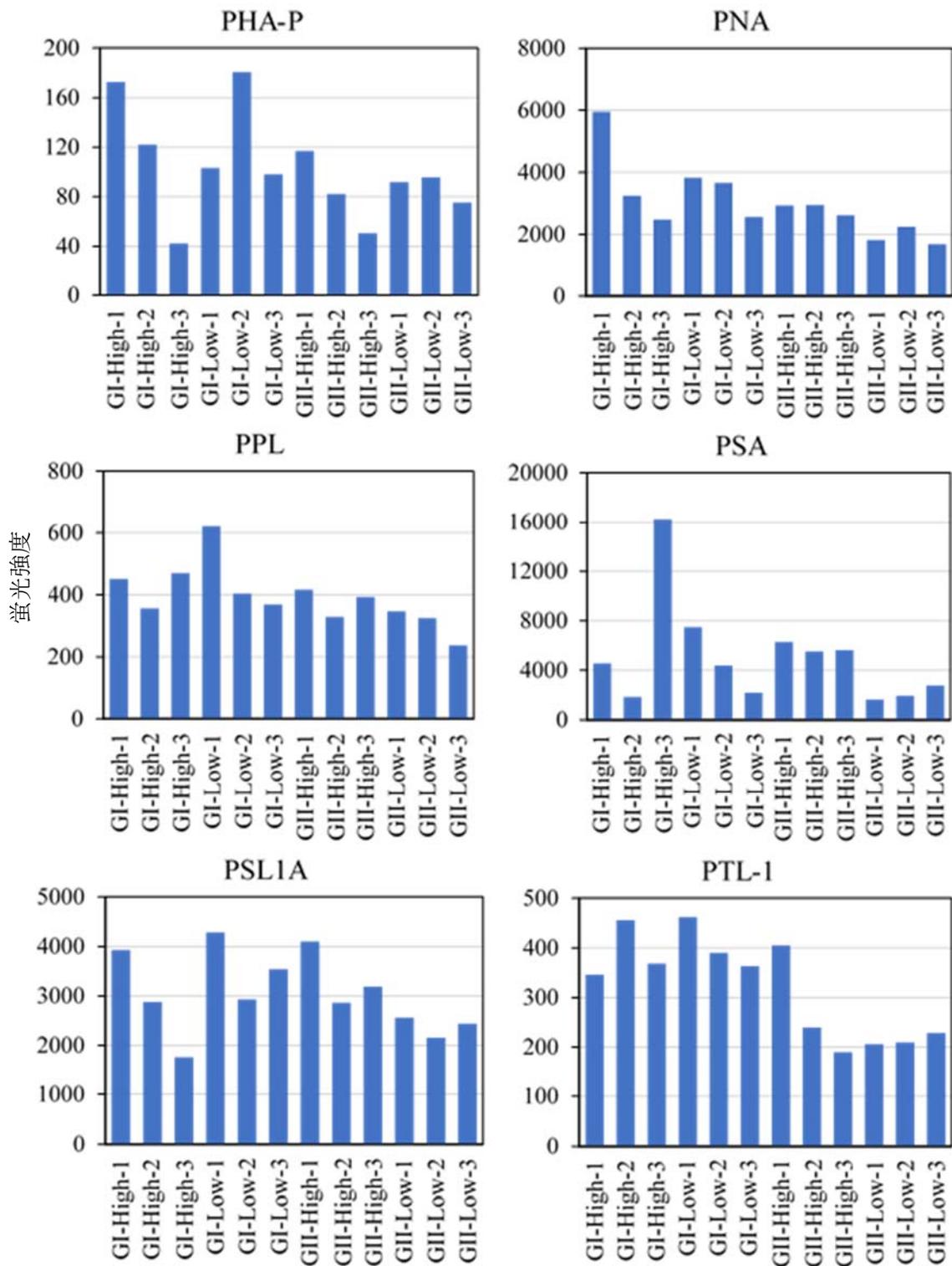


図 5. 2. 11 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.High はウイルス量が多かったことを、Low は少なかったことを示す.グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している.

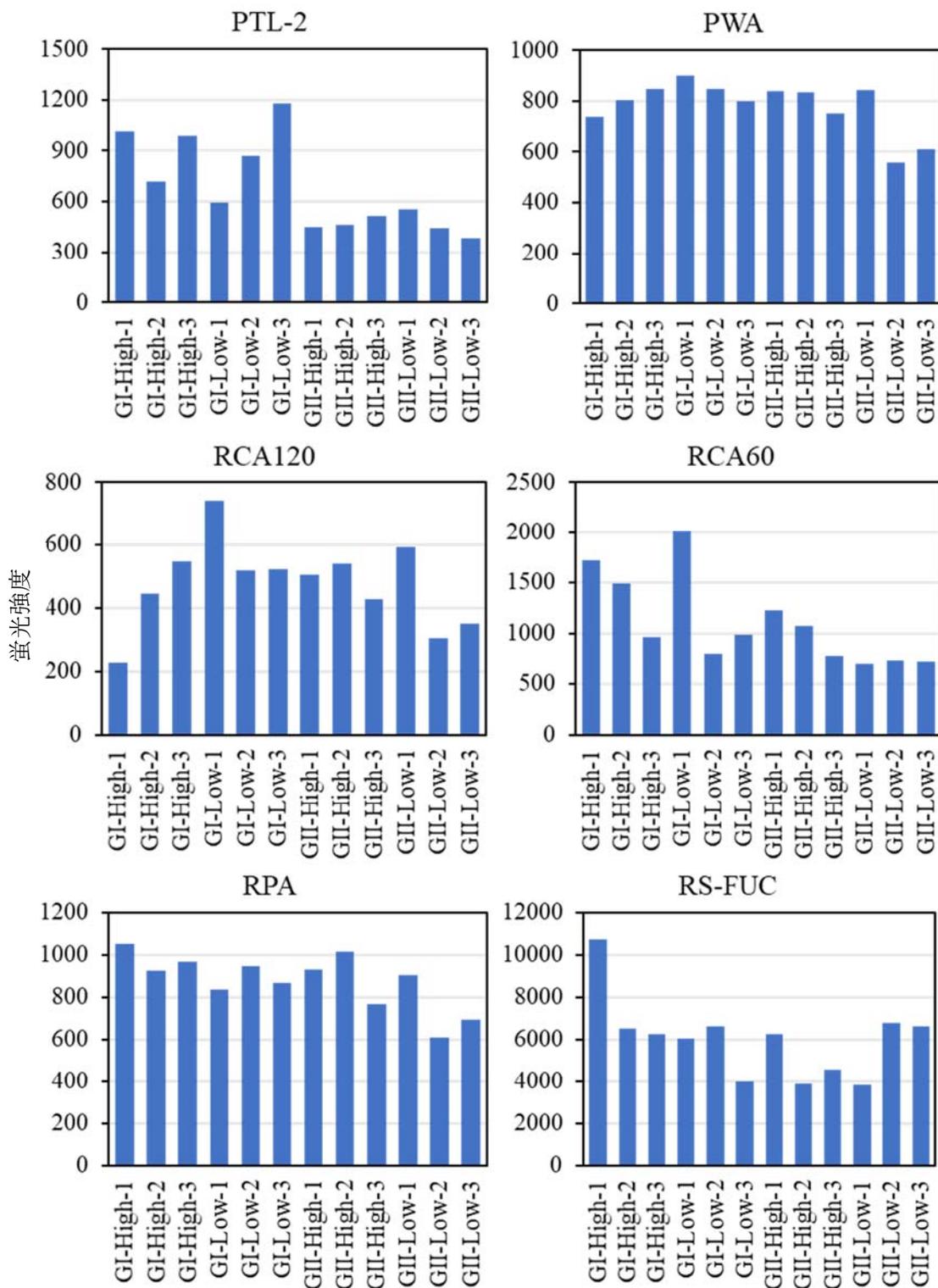


図 5.2.12 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.Highはウイルス量が多かったことを、Lowは少なかったことを示す。グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している。

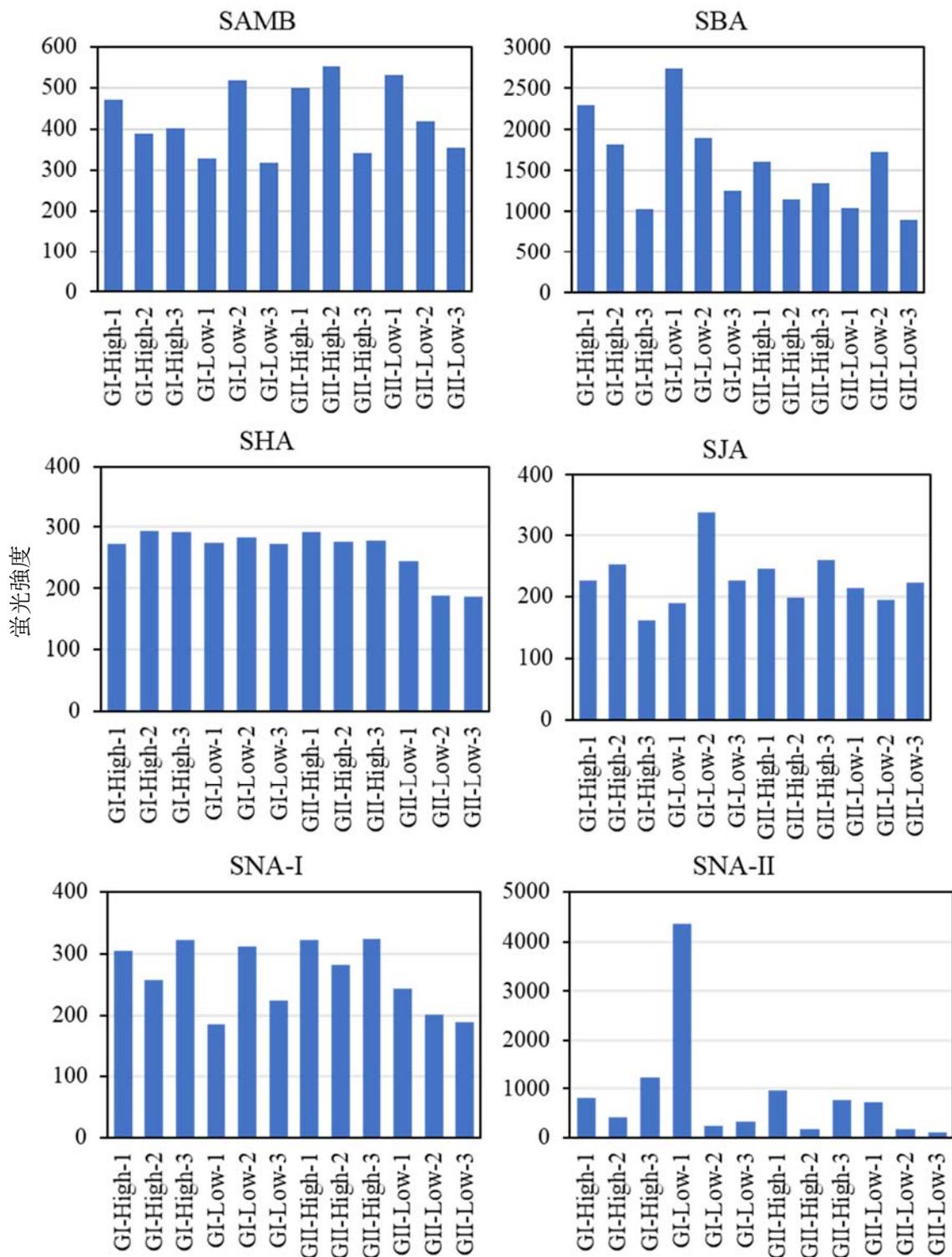


図 5. 2. 13 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.High はウイルス量が多かったことを、Low は少なかったことを示す.グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している.

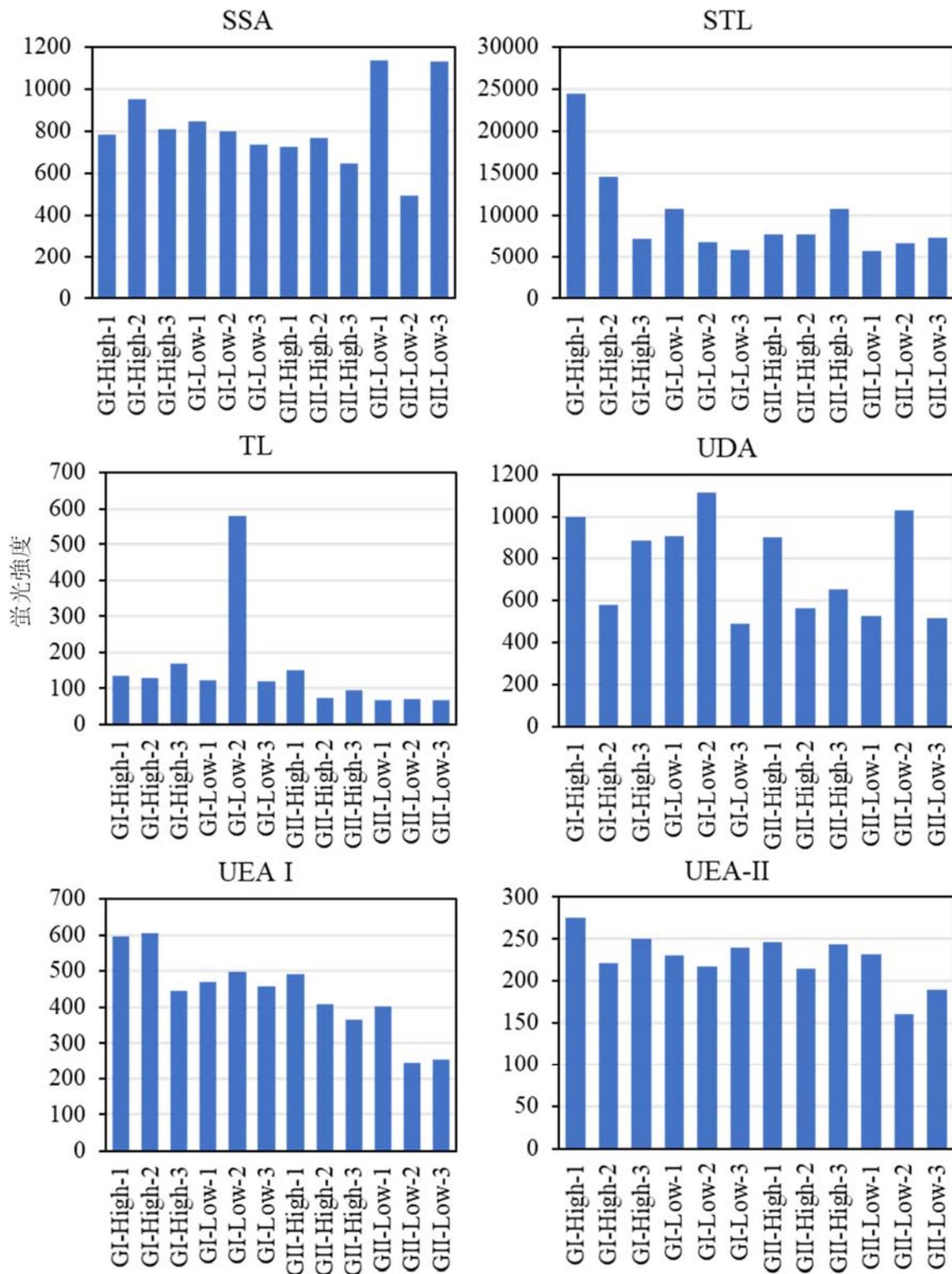


図 5.2.14 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.High はウイルス量が多かったことを、Low は少なかったことを示す.グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している.

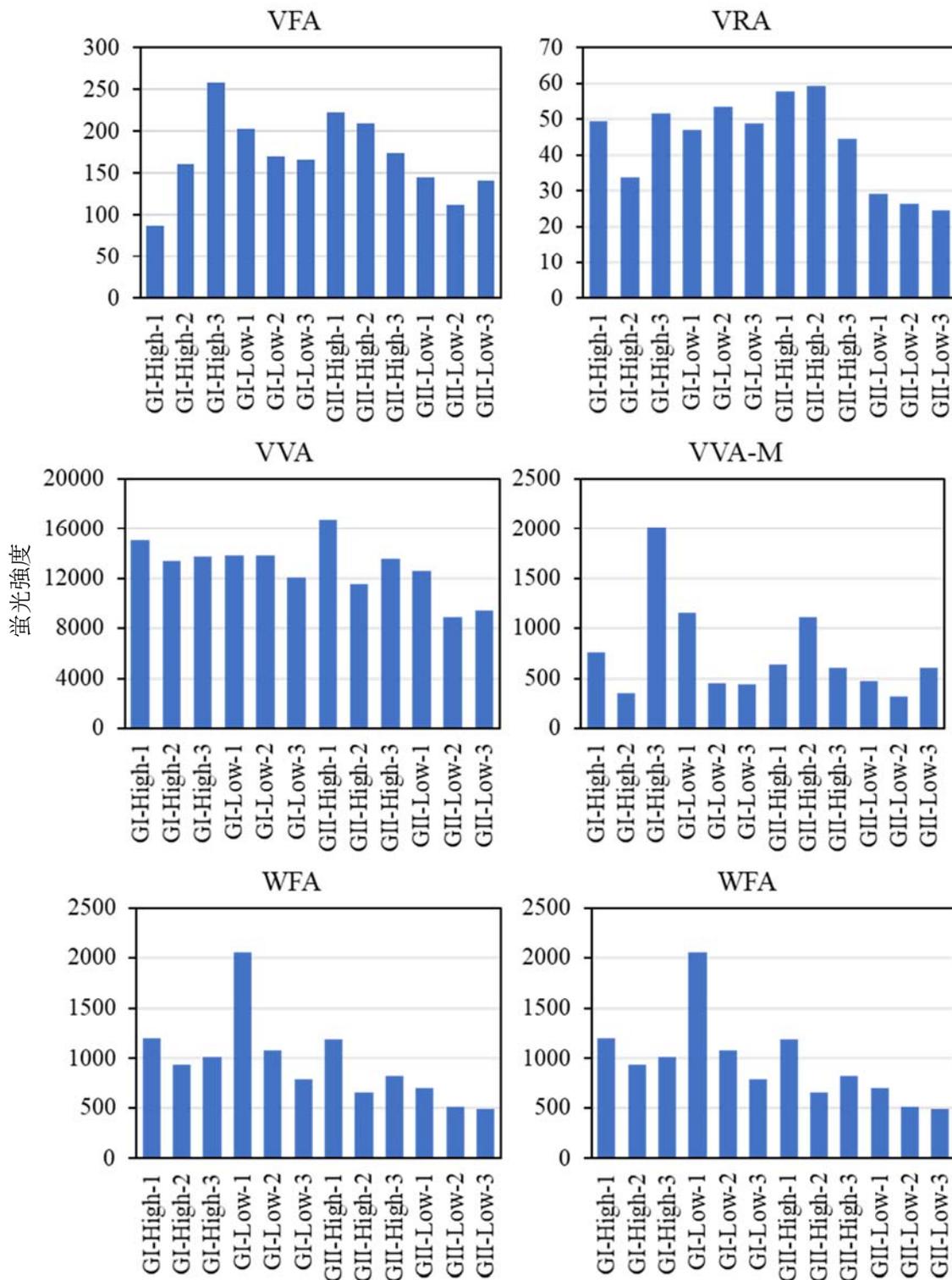


図 5.2.15 ウイルス高蓄積および低蓄積牡蠣の体内の糖鎖構造解析結果.High はウイルス量が多かったことを、Low は少なかったことを示す.グラフは蛍光強度を示し、高いほどレクチンに認識される糖鎖が多く存在したことを表している。

3.5~6.8 Log copies/g-中腸腺、GII.2 で 3.2~6.8 Log copies/g-中腸腺と、先行研究と比較してより高い値が得られた。この原因としては、水温を初めとした実験条件の違いや用いたノロウイルスの遺伝子型の違い、また水中に接種したノロウイルス濃度の違いなど、様々な要因が考えられる。さらに、本研究で用いられたウイルス抽出法および RNA 抽出法は、我々のグループの先行研究で改良されたより検出感度の高い独自の手法である（伊藤ら, 2013）。この改良法により、ウイルスの回収や検出における障害が少なく、より効率的にウイルスを定量できた結果、高い定量値が得られた可能性がある。また飼育時間を比較すると、先行研究の 1~9 日に対し本研究は 72 時間と大きく差があるが、先行研究の 9 日汚染された牡蠣サンプルよりも高い定量値が得られたことから、牡蠣の飼育期間はウイルス量に与える影響が小さいと考えられる。

また、本研究では 1 つの遺伝子型につき 20 個体の牡蠣を用いて、同条件でノロウイルスに汚染させた際に個体差が見られるかどうかを明らかにした。各個体のノロウイルス GI.3 および GII.2 の蓄積量には有意な個体差が見られ、最も蓄積量の多い個体と少ない個体では 1000 倍以上の差があった。各牡蠣個体の剥き身重量および中腸腺重量とウイルス蓄積量には関連がなく、蓄積量の個体差は個体の大きさや成長度合いに依存しないことが明らかになった。本研究のように牡蠣のウイルス蓄積能力の個体差に着目した研究は前例がなく単純比較は難しいが、牡蠣から検出したウイルス量に 1000 倍以上の有意差が見られる先行研究はなかった。一方で、同じ海域で採取された牡蠣の中でも、ノロウイルスが検出される個体とされない個体がある先行研究は多くある（Kittigul et al., n.d.; Le Guyader et al., 2008; Lowther et al., 2018; Nguyen et al., 2018; Nishida et al., 2007）。自然海域でのウイルス蓄積については潮流などの気象条件が関係しているため、個体差の要因が牡蠣のウイルス蓄積能力の差であると断言はできないものの、原因の一端を担っている可能性がある。

95 種のレクチンアレイ解析により、ノロウイルス蓄積量の少ないおよび多い牡蠣の有する糖鎖構造には有意な差があることが明らかになった。ノロウイルス GI 蓄積サン

プルにおいて差が見られたレクチン (BPA、DSA、GAL1-S、HMA) の認識する糖鎖構造は、Gal $\beta$ 3GalNAc、N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) 2-4、LacNAc 側鎖、N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) および N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) である。LacNAc は細胞表面に発現する主要な糖構造の一つであり、組織血液型抗原 (HBGA) やルイス抗原など様々な抗原の一部を構成している (Hakomori, 2000; Watkins, 1995)。また、GlcNAc や GalNAc、Neu5Ac も HBGA の構成要素の一つであり、多くの先行研究における牡蠣の中腸腺には HBGA が発現しているという報告を支持する結果が得られた。特に GalNAc は、A 型 HBGA を構成する糖類の一つであり、ノロウイルス GI.7 は A 型 HBGA を認識して結合することが明らかになっている (Shanker et al., 2014)。しかしながら、本研究では牡蠣体内の糖鎖量が少ないほど、ノロウイルス GI.7 の蓄積量が多いという結果が得られた。これは多くの先行研究とは異なる結果であり、牡蠣のノロウイルス汚染実験や糖鎖へのウイルス結合実験のみでは得られない情報である。

ノロウイルス GII 蓄積サンプルにおいては、9 種類のレクチン (DSA、ECA、LcH A、PNA、PSA、SHA、SNA-1、VFA、VRA) において差が見られた。これらのレクチンが認識する糖鎖構造は、(GlcNAc)2-4、Gal $\beta$ 4GlcNAc、 $\alpha$  マンノースおよび  $\alpha$  グルコース、Gal $\beta$ 3GalNAc、N-アセチルガラクトサミン、NANA $\alpha$ (2,6)GalNAc およびラクトース、 $\alpha$ -ガラクトース である。GlcNAc や GalNAc、Neu5Ac など、GI と同様に HBGA および A 型 HBGA を構成する糖鎖が含まれており、本研究で用いた GII.2 は A 型 HBGA のみを認識できるという先行研究の報告を支持する結果となった (Shanker et al., 2014)。一方で、Gal $\beta$ 4GlcNAc や Gal $\beta$ 3GalNAc、NANA $\alpha$ (2,6)GalNAc など、HBGA とは異なる糖鎖構造も含まれていた。これらはタンパク質に結合する O-結合型糖鎖および N-結合型糖鎖を構成する糖鎖構造であり、生体内の様々な機能に関与している。しかし牡蠣の O-結合型糖鎖および N-結合型糖鎖の機能ははまだ解明されておらず (Staudacher, 2015)、さらなる研究が必要である。

結論として、本研究で得られた結果から、牡蠣個体のウイルス蓄積量には個体差があり、その体内に発現している糖鎖の構造や発現量にも差があることが示された。ウイルス蓄積量の少ない個体を選別して養殖できれば、より安全性の高い牡蠣の出荷および提供に貢献することが出来る。実用化へ向けて、低蓄積性の牡蠣の選別法についてより詳細な研究が必要である。

## 参考文献

- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Hakomori, S. itiroh, 2000. Traveling for the glycosphingolipid path. *Glycoconj. J.* <https://doi.org/10.1023/A:1011086929064>
- Hata, A., Katayama, H., Kitajima, M., Visvanathan, C., Nol, C., Furumai, H., 2011. Validation of internal controls for extraction and amplification of nucleic acids from enteric viruses in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4336–4343. <https://doi.org/10.1128/AEM.00077-11>
- Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K., 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1548–1557. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1548-1557.2003>
- Kittigul, L., Thamjaroen, A., Chiawchan, S., Chavalitsheewinkoon-Petmitr, P., Kannika Pombubpa, •, Diraphat, P., n.d. Prevalence and Molecular Genotyping of Noroviruses in Market Oysters, Mussels, and Cockles in Bangkok, Thailand. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9228-6>

- Langlet, J., Kaas, L., Greening, G., 2015. Binding-Based RT-qPCR Assay to Assess Binding Patterns of Noroviruses to Shellfish. *Food Environ. Virol.* 7, 88–95.  
<https://doi.org/10.1007/s12560-015-9180-x>
- Le Guyader, F.S., Le Saux, J.C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepey, M., Pothier, P., Atmar, R.L., 2008. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 46, 4011–4017.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01044-08>
- Li, D., Breiman, A., le Pendu, J., Uyttendaele, M., 2015. Binding to histo-blood group antigen-expressing bacteria protects human norovirus from acute heat stress. *Front. Microbiol.* 6, 659. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00659>
- Lowther, J.A., Gustar, N.E., Powell, A.L., O'Brien, S., Lees, D.N., 2018. A One-Year Survey of Norovirus in UK Oysters Collected at the Point of Sale. *Food Environ. Virol.* 10, 278–287.  
<https://doi.org/10.1007/s12560-018-9338-4>
- Maalouf, H., Schaeffer, J., Parnaudeau, S., Le Pendu, J., Atmar, R.L., Crawford, S.E., Le Guyader, F.S., 2011. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3189–3196. <https://doi.org/10.1128/AEM.03010-10>
- Maalouf, H., Zakhour, M., Pendu, J. Le, Le Saux, J.C., Atmar, R.L., Le Guyader, F.S., 2010. Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5621–5630. <https://doi.org/10.1128/AEM.00148-10>
- Nguyen, G.T., Pu, J., Miura, T., Ito, H., Kazama, S., Konta, Y., Van Le, A., Watanabe, T., 2018. Oyster Contamination with Human Noroviruses Impacted by Urban Drainage and Seasonal Flooding in Vietnam. *Food Environ. Virol.* 10, 61–71.  
<https://doi.org/10.1007/s12560-017-9325-1>
- Nishida, T., Nishio, O., Kato, M., Chuma, T., Kato, H., Iwata, H., Kimura, H., 2007.

- Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol. Immunol.* 51, 177–184. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03899.x>
- Pu, J., Miura, T., Kazama, S., Konta, Y., Azraini, N.D., Ito, E., Ito, H., Omura, T., Watanabe, T., 2018. Weekly variations in norovirus genogroup II genotypes in Japanese oysters. *Int. J. Food Microbiol.* 284, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.027>
- Shanker, S., Czako, R., Sankaran, B., Atmar, R.L., Estes, M.K., Prasad, B.V. V., 2014. Structural Analysis of Determinants of Histo-Blood Group Antigen Binding Specificity in Genogroup I Noroviruses. *J. Virol.* 88, 6168–6180. <https://doi.org/10.1128/jvi.00201-14>
- Staudacher, E., 2015. Mucin-Type O-Glycosylation in Invertebrates. *Molecules.* <https://doi.org/10.3390/molecules200610622>
- Ueki, Y., Shoji, M., Suto, A., Tanabe, T., Okimura, Y., Kikuchi, Y., Saito, N., Sano, D., Omura, T., 2007. Persistence of caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5698–5701. <https://doi.org/10.1128/AEM.00290-07>
- Ventrone, I., Schaeffer, J., Ollivier, J., Parnaudeau, S., Pepe, T., Le Pendu, J., Le Guyader, F.S., 2013. Chronic or accidental exposure of oysters to norovirus: Is there any difference in contamination? *J. Food Prot.* 76, 505–509. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-296>
- Wang, D., Wu, Q., Kou, X., Yao, L., Zhang, J., 2008. Distribution of norovirus in oyster tissues. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1966–1972. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03970.x>
- Watkins, W.M., 1995. Chapter 5 Biosynthesis 5. Molecular Basis of Antigenic Specificity in the ABO, H and Lewis Blood-Group Systems. *New Compr. Biochem.* 29, 313–390. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60597-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60597-9)
- 伊藤紘晃, 真砂佳史, 植木洋, 渡部徹, 2013. 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, III\_657-III\_665. [https://doi.org/10.2208/jscej.69.iii\\_657](https://doi.org/10.2208/jscej.69.iii_657)

原正章, 矢野一好, 宇田川悦子, 2009. 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 83, 564–565.

<https://doi.org/10.11150/kansenshogakuzasshi.83.564>

## 第6章 結論および提言

本研究では、二枚貝のヒト腸管系ウイルス汚染の新たな対策を講じるために、ウイルスの蓄積特性や蓄積メカニズムをより詳細に明らかにすることを目的とした。本研究で得られた結果は以下のとおりである。

- ・河口域に自生する二枚貝中のノロウイルス量には周辺地域の都市下水におけるノロウイルス量の変動が反映されており、二枚貝中のノロウイルス量をモニタリングすることで、感染性胃腸炎患者報告数には含まれていない無症状・軽症の感染者を含めた、より正確な感染性胃腸炎流行状況を把握できる可能性がある。
- ・ロタウイルスワクチン株の検出により牡蠣中および下水中の野生株 RVA 量を明らかにした結果、牡蠣中と下水中の野生株 RVA 量には有意な相関関係が見られ、ロタウイルスの環境中での動態に関して、全 RVA の定量検出だけでは得られなかった新たな情報を得ることが出来た。
- ・養殖牡蠣を人為的にノロウイルス GI および GII で汚染させる実験を行った結果、牡蠣体内へのウイルス蓄積量には 1000 倍以上の個体差が見られ、さらにウイルス蓄積量の多い個体と少ない個体の体内に発現している糖鎖構造を解析すると、特定の糖鎖構造の発現量に有意な差が見られた。

以上の結果から、二枚貝の腸管系ウイルス汚染には腸管系ウイルスによる感染性胃腸炎の流行が深く関与していることは明白である。モニタリングおよびサーベイランスにより、感染性胃腸炎の流行状況の把握や予防を確実なものにして、人間社会からのウイルスの排出をコントロールすることが、二枚貝の腸管系ウイルス汚染の防止に貢献すると考えられる。

また、実際にウイルスの蓄積量が少ない牡蠣個体が存在したことから、ウイルス低蓄積性の牡蠣のみを選択して養殖するという対策手法も考えられる。腸管系ウイルス

の排出量コントロールだけでは完全にウイルス汚染を防ぐのは難しいとしても、よりウイルスが蓄積しづらい牡蠣の選択的な養殖と組み合わせることで、養殖牡蠣の安全性をさらに高めることができる。

一方で、本研究を通じ、今後さらなる研究により解明すべき点もいくつか明らかになった。牡蠣へのノロウイルスの蓄積については、季節性や周辺地域の感染症流行との関係性、ノロウイルスに結合できる糖鎖や牡蠣体内の糖鎖構造など、汚染源や汚染のメカニズムなどが少しずつ解明されてきている。しかし、牡蠣のウイルス汚染については、これまで調査された人間からのウイルス排出や糖鎖以外にも、微生物や RNA の物理的性質などの要因が関連していることが明らかになりつつある。微生物については、体表にノロウイルスの結合できる HBGA を発現させている腸内細菌の存在が報告されており (Miura et al., 2013)、実際に体表面にノロウイルスが吸着されていることが示されている。一方で、このような細菌が牡蠣体内に存在するか、また牡蠣のウイルス汚染において何らかの役割を果たしているかは未だ解明されておらず、今後の研究において明らかにする必要がある。RNA の物理的性質については、ウイルス RNA と二枚貝の組織間において静電性・疎水性の非特異的相互作用が働いていることが示唆されており (Dika et al., 2011; Langlet et al., 2008)、HBGA を初めとした糖鎖によるノロウイルスとの結合以外の影響も考慮する必要がある。現在、ノロウイルスと牡蠣の結合能力を調査した先行研究の多くで、ウイルスの外殻構造のみである VLP が用いられており、Langlet らはノロウイルスの結合能力を正確に調査するには、VLP を用いた実験では不十分であると指摘している (Langlet et al., 2015)。VLP は外殻構造に由来するノロウイルスの抗原性に関する研究においては有用なツールであるが、牡蠣のウイルス汚染については、完全なウイルス粒子を用いた研究を更に行うべきである。

また、二枚貝のノロウイルス以外による汚染については研究例が少なく、汚染のメカニズムなどについてはノロウイルスよりも不明点が多い。本研究では下水および牡蠣からロタウイルス株を定量的に検出したが、これは初めての試みであり、他にワク

チン株の環境中での濃度や動態を調査した研究はない。ロタウイルスは非常に遺伝子組み換えが起こりやすい特性を持つことから、ワクチン株をはじめとした様々な株の環境中での挙動に関する研究を推進し、多くの知見を集めて新たな型の発生に備える必要がある。ロタウイルスをはじめとした他の腸管系ウイルスは、ノロウイルスほど食中毒事件や感染性胃腸炎の原因として検出されないため、研究対象になりにくい側面がある。しかし、新たな株の発生や大規模な流行に備え、継続的なモニタリングや物理的・化学的な性質について研究を行うべきである。また、本研究で示されたように、二枚貝中のウイルス蓄積特性を感染症モニタリングに活用できる可能性がある。このことから、ノロウイルス以外についても二枚貝への蓄積特性について積極的に研究に取り組む必要があると考える。

総括として、本研究では二枚貝のウイルス蓄積特性について調査し、その防止と対策を講じるに有効な新たな知見を得ることが出来た。一方で、より安全な二枚貝の生産を実現するため、今後取り組むべき課題も明らかになった。これらの成果にもとづいた今後の研究によって、感染性胃腸炎流行のコントロールおよび二枚貝のウイルス汚染の抑止を実現することで、二枚貝の安全性に対する消費者の不安が払拭され、過去の食中毒事例の影響を受け続けている二枚貝（特に牡蠣）の養殖業の振興が期待される。

## 参考文献

- Dika, C., Duval, J.F.L., Ly-Chatain, H.M., Merlin, C., Gantzer, C., 2011. Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: Comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4939–4948.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00407-11>
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Gantzer, C., Duval, J.F.L., 2008. Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft multilayer particles: The case

of bacteriophage MS2. *Biophys. J.* 94, 3293–3312.

<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.115477>

Langlet, J., Kaas, L., Greening, G., 2015. Binding-Based RT-qPCR Assay to Assess Binding Patterns of Noroviruses to Shellfish. *Food Environ. Virol.* 7, 88–95.

<https://doi.org/10.1007/s12560-015-9180-x>

Miura, T., Sano, D., Suenaga, A., Yoshimura, T., Fuzawa, M., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Okabe, S., 2013. Histo-Blood Group Antigen-Like Substances of Human Enteric Bacteria as Specific Adsorbents for Human Noroviruses. *J. Virol.* 87, 9441–9451.

<https://doi.org/10.1128/jvi.01060-13>

## 謝 辞

本学位論文の作成に関して、指導教員である岩手大学大学院連合農学研究科地域環境創生学専攻 渡部徹先生には、多岐にわたってご指導いただき、多大なるご尽力いただいたことに心より感謝いたします。また、同学科の渡邊一哉先生（本論文の副査）、坂元君年先生（本論文の副査）、山形大学農学部食料生命環境学科 西山正晃先生には、研究に関してのご指導ご助言を頂き厚く御礼申し上げます。

東北大学未来科学技術共同開発センターの大村達夫研究室の皆様には、牡蠣中のウイルス検出に関してのご指導およびご助言や、下水中のウイルス量データのご提供など、様々な面でサポートして頂き、深く感謝申し上げます。

また、熊本大学くまもと水循環・減災研究教育センターの伊藤紘晃先生、東北大学大学院環境科学研究科の佐野大輔先生、東京大学未来ビジョン研究センターの浦剣先生、国立保健医療科学院生活環境研究部水管理研究領域の三浦尚之先生、東京大学大学院工学系研究科の風間しのぶ先生には、牡蠣中のウイルス検出に関してのご指導およびご助言を頂きまして、深く感謝申し上げます。

そして、同じ研究室の学生の皆様および研究者の皆様には、私の実験に快くご協力いただいたことに深く感謝申し上げます。