

ノート

2000年度養殖海域におけるノーウォークウイルス汚染調査

西香南子, 杉山明, 中山治

The Investigation of Norwalkvirus Contamination at Oyster Cultivation Field in 2000

Kanako NISHI, AkiraSUGIYAMAandOsamuNAKAYAMA

1997年より牡蠣の養殖を行っている2海域に定点を定め牡蠣のノーウォークウイルス(NV)の汚染状況と下痢症患者由来NVの遺伝子解析を進めてきた。さらにポリオウイルスを用いて牡蠣の浄化実験を試みた。2000年度はNV陽性となった牡蠣は2検体しかなかった。前年に比べ陽性となった牡蠣が少ないのは、NVによる乳児下痢症や急性胃腸炎の発生が少ないことや雨量の減少による牡蠣の餌となるプランクトンの減少、夏季の豪雨による海域の変化等様々な環境中の要因が影響したと推察された。

キーワード：ノーウォークウイルス, RT-PCR, 浄化実験

はじめに

ノーウォークウイルス(以下NV)は冬季の乳幼児下痢症や急性胃腸炎の起因ウイルスの1つである⁶⁾⁷⁾⁸⁾。特に、急性胃腸炎患者では牡蠣の喫食が疑われる事例が多かったが、食中毒の原因物質に定められていなかったこと、NVが従来ウイルス分離に使用する培養細胞では増殖できず検査方法が確立していなかったことから食中毒として扱われることは少なかった。しかし、平成9年5月にノーウォークウイルスが食中毒の原因物質に指定され、検査法もウイルス粒子の検出だけでなくRT-PCR法により遺伝子の検出を行うようになり、患者や食品等で幅広く検査されるようになってきた。

生食用牡蠣については食品衛生法で大腸菌陰性であることが定められており、三重県では殺菌海水による浄化を義務づけ、安全性を高めてきた。しかし、浄化を行い、食品衛生法の基準を遵守しているにもかかわらず、毎年牡蠣の喫食が疑われる健康被害が冬季に発生しており、この原因が牡蠣のNV汚染であることが示唆され、確実にウイルスを浄化する方法を検討する必要性が生じてきた。

また、NVはヒトの腸管でのみ増殖できると考えられており、牡蠣養殖海域が何らかによりNVで汚染され、

牡蠣も汚染を受けていると考えられるが、NVの動向についてはほとんど解明されていない。NVの動向を把握することは「farm to table」の観点からも養殖海域におけるNV汚染を減少させるだけでなく、確実に浄化を行うための基礎データとして重要であると考えられる。そこで、養殖場に定点を定め牡蠣の汚染状況を調査するとともに、NV汚染を受けた牡蠣を用いて浄化実験を行うことを目的とした。

材料と方法

1. 採取材料及び期間

表1に示したように2000年10月から2001年3月12日までを採取期間とし、A養殖海域は1カ所及びB養殖海域は2月19日までは2カ所、26日以降は3カ所を定点とし、採取を行った。各定点で牡蠣5個を採取した。また、2001年1月12日に採取した海水の殺菌前及び殺菌後の海水及びプランクトンについても検査を行った。

2. 浄化方法

定点で採取した牡蠣の5個のうち4個以上がNV陽性となったものについて、伊勢保健所志摩支所の閉鎖系浄化装置を用いて15及び20で18, 24, 48時間浄化を行う。

表1 月別検査材料数

		10月		11月		12月		1月		2月			3月	
		11日	13日	7日	11日	12日	15日	29日	5日	13日	19日	26日	5日	12日
	牡蠣	5	5		5		5	5	5	5	5	5	5	5
A	殺菌前													
	海水													
	プランクトン													
	殺菌後													
	海水													
	プランクトン													
B-1	牡蠣	5	5	5			5	5	5	5	5	5	5	5
B-2	牡蠣	5	5	5			5	5	5	5	5	5	5	5
B-3	牡蠣										5	5	5	5

3. 検査方法

牡蠣は志摩支所で剥き身にし、冷凍後、保健環境研究所に送付する。牡蠣の前処理は中腸線を摘出し、PBS(-)で10倍希釈し、ストマッカーで2分間粉碎する。3000rpm15分遠心後、上清に24%polyethylenglicol/1.5MNaCl(以下PEG)を1/2量加え4で1夜放置する。3000rpm30分遠心後、沈渣をPBS(-)500μLで再浮遊し、1.1.2-トリクロロ-1.2.2-トリフルオロエタン300μL加え、vortexする。9000rpm15分遠心し、上清にPEG1/2量加え430分以上放置する。12000rpm20分遠心し、沈渣をDEPC-DW50μLで再浮遊し、ProtenaseKで3715分処理をする。

プランクトンはプランクトンネットで海水20Lを濾過し、PBS(-)で41夜浮遊する。3000rpm20分遠心し、沈渣をホモジナイザーで粉碎後、3000rpm20分遠心し、沈渣をPBS(-)100μLで再浮遊する。海水20Lは孔径0.45μmのHA膜で濾過する。次にHA膜を希硫酸(pH3)で洗浄後、水酸化ナトリウム(pH5)で中和・溶出する。溶出液にPEGを1/2量加え、41晩放置後9000rpm30分遠心し、沈渣をDEPC-DW100μLで再浮遊する¹⁾。

前処理した検体50μLをPhase Lock gel 2mLの入ったマイクロチューブに移し、1.5%glycogen 200μLを加える。ISOGEN-LS 750μLを加え、混和後、室温で5分放置する。クロロフォルム200μLを加え混和後、室温で5分放置する。12000rpm室温で遠心後、上清に等量のイソプロピルアルコールを加え-8020分以上放置する。1200

0rpm20分遠心後、沈渣に75%エタノール1mLを加え、12000rpm15分遠心する。上清を廃棄後3710分乾燥し、DEPC-DW20μLを加え、6010分加温溶解し、RT-PCRに使用する。

RT-PCRはNV系及びYuri系のprimerを用いて行った。NV系のRT-1st PCRではNV-35(3'-CTTGTTGGTTTGAGGCCATAT-5')、NV-36(3'-ATTAAGTTGGCATGAACA-5')、nested PCRではNV-81(3'-ATTAAGTTGGCATGAACA-5')、NV82(3'-TCATTTTGATGCAGATTA-5')、SM-82(3'-CCACTATGATGCAGATTA-5')を使用した²⁾。Yuri系はRT-1st PCRにYuri22F(3'-ATTGAATGAGGATGGACCCAT-5')、Yuri22R(3'-CATCATCCCGTAGAAAGAT-5')、MR-3(3'-CCGTCAGATGGGTATGAA-5')、MR-4(3'-AGTGGGTTTGAGGCCGTA-5')、nested PCRはYuri52F(3'-CAATCAGATTTGGCATGAA-5')、Yuri52R(3'-TGTTGGGATCAGCCCGTA-5')を使用した⁵⁾。各RT-1st PCR反応液45μLに抽出液5μLを加え、RT-1st PCR終了後、各nested PCR反応液49μLにRT-1st PCR産物1μLを加える。Nested PCR産物5μLを2%agarose gelで約45分泳動後、ethidium bromideで染色後、紫外線を照射し、NV系は330bp、Yuri系は370bpのバンドの有無を確認する。

表2 牡蠣におけるNV検査結果

		10月		11月		12月		1月		2月			3月	
		11日	13日	7日	11日	15日	29日	5日	13日	19日	26日	5日	12日	
A	NV系	0/5	0/5	N.T	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Yuri系	0/5	0/5	N.T	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	NV	0/5	0/5	N.T	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
B-1	NV系	0/5	0/5	0/5	N.T	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Yuri系	0/5	0/5	0/5	N.T	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	NV	0/5	0/5	0/5	N.T	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
B-2	NV系	0/5	0/5	0/5	N.T	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Yuri系	0/5	0/5	0/5	N.T	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	NV	0/5	0/5	0/5	N.T	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
B-3	NV系	N.T	0/5	0/5	0/5	0/5								
	Yuri系	N.T	0/5	0/5	0/5	0/5								
	NV	N.T	0/5	0/5	0/5	0/5								

N.T:Not test

