

ネコカリシウイルスを用いたマガキのウイルス浄化に関する研究

須藤篤史*¹・酒井敬一*²・庄司美加*³・山木紀彦*⁴・植木洋*³

Research on the depuration of Feline calicivirus F4 by the oysters, *Crassostrea gigas*

Atsushi SUTO*¹, Kei-ichi SAKAI*², Mika SHOJI*³, Norihiko YAMAKI*⁴ and Yo UEKI*³

キーワード：ノロウイルス、ネコカリシウイルス、マガキ、浄化

ノロウイルス (NV) は、食中毒や冬季に流行する感染性胃腸炎の主要な病因物質であり、特にウイルス性食中毒の 95%以上を占める重要な病原体である¹⁾。NV による食中毒では、生カキなどの二枚貝が推定原因食品になる事例もあり、食品衛生上問題となるとともに、カキの生産に甚大な影響を及ぼしている。宮城県では、安全なカキを提供するため、業界が主体となって養殖カキの NV 検査体制を構築し、陽性となった場合には生食用カキの出荷の自粛や加熱用への切り替えを行っている。しかし、生食用出荷が主体である宮城県においては、加熱用への切り替えによる損害は著しく大きく、NV の浄化技術の開発が強く求められている。NV は培養系が確立されていないため、培養可能な代替ウイルスによる検討が行われており、ポリオウイルス^{2, 3)}や NV と同じカリシウイルス科に属し、形態等が類似しているネコカリシウイルス⁴⁻⁶⁾による浄化実験の報告がある。今回、ネコカリシウイルスを用いて、通常、カキの浄化に用いられる流水浄化と給餌及び加温による浄化促進効果の有無について検討したので報告する。

材料と方法

1. 材料

カキは宮城県内で養殖されたマガキ (*Crassostrea gigas*) を用い、予め泥や付着生物等を除去後、飼育水

槽中で砂ろ過海水を注水し、無給餌で2日間程度予備飼育した。

ネコカリシウイルス (*Feline calicivirus* F4 株：以後、FCV F4) は、Crandell's feline kidney cells (CrFK) に接種して、37°C、48 時間、CO₂ インキュベーターで培養し、細胞変性効果を確認後、培養液をプールし、使用時まで -80°C に保存して、実験に供した。

ウイルス取り込みの際の餌として、実験室内での培養系が確立されており、二枚貝の種苗生産に多用されている植物プランクトン *Chaetoceros gracilis* (Cg) もしくは *C. calcitrans* (Cc) を用いた。また浄化の際には、同じく培養系が確立されており、形態が針状であることから消化盲囊の細部まで侵入しやすく、粘着性もあるので消化物を捕捉しやすいのではないかと仮説を立て *Nitzschia closterium* (Nc) を用いた。

なお実験に用いた砂ろ過海水は、事前に FCV F4 に汚染されていないことを確認した。

2. ウイルスの取り込ませ

ウイルスの取り込み及び浄化実験は、水産研究開発センター飼育棟で 2004 年 5 月から 2005 年 7 月までに計 8 回実施した (表 1)。

マガキにウイルスを取り込ませるため、マガキ 1 個体当たり 4.5L の砂ろ過海水と 2.5×10^9 個の Cg (または Cc) を水槽に入れ、実験ごとに FCV F4 株を所定の濃度になるよう加えて 1 時間エアレーションしながら攪拌した後、マガキをカゴに入れ水槽内に垂下した。

これを 24 時間ごとに、同じ条件に調整した水槽に移動することを 2 回繰り返す、合計 72 時間、ウイルスを取り込ませた。なお、その直後、引き続き浄化試験を実施した。

表 1 実験実施期間と取り込みに用いたウイルス濃度及び実験海水温

実験回	実施期間	取り込ませウイルス濃度	実験海水温
1	2004/5/17-5/22	10^9 copies/L	13°C±1
2	2004/6/14-6/23	10^8 copies/L	10°C(冷却海水) 25°C(加温海水)
3	2004/7/30-8/31	10^9 copies/L	22~26°C
4	2004/11/30-12/24	10^9 copies/L	10°C(冷却海水) 25°C(加温海水) 13~14°C(自然海水)
5	2005/4/19-4/25	10^8 copies/L	10°C±1
6-1		10^6 copies/L	
6-2	2005/5/17-5/23	10^5 copies/L	11~14°C
6-3		10^7 copies/L	
7	2005/5/31-6/6	10^4 copies/L	14~19°C
8	2005/6/14-7/17	10^3 copies/L	16~21°C

3. 浄化実験

1) 砂ろ過海水による流水浄化

ウイルスを取り込ませたマガキを 200L パンライト水槽に移動し、第 1 回と第 5~8 回実験では自然海水温の砂ろ過海水を、第 2, 4 回実験では冷却砂ろ過海水 (10°C) を毎分約 12L で注水した。第 3 回実験については止水飼育とし、2~3 日ごとに砂ろ過海水を全交換した。

2) 給餌による浄化促進 (第 1, 2, 4 回実験)

ウイルスを取り込ませたマガキを、砂ろ過海水 200L を入れたパンライト水槽に移動し、Nc を 3.0×10^{11} 個加え 2 時間エアレーションしながら止水状態とした。その後 6 時間砂ろ過海水を毎分 12L で注水し、これを 1 サイクルとして第 1, 4 回実験は 6 サイクル、第 2 回実験では 18 サイクル繰り返した。なお、対照区では、Nc を添加せずに 2 時間の止水、6 時間

の砂ろ過海水の注水を 1 サイクルとした。

3) 加温による浄化促進 (第 2, 4 回実験)

ウイルスを取り込ませたマガキを 200L パンライト水槽に移動し、アクアトロンを経由した砂ろ過海水を毎分 12L で注水した。注水開始時は自然海水温とし、その後 24 時間をかけて段階的に 25°C まで注水海水温を上昇させ、浄化中は 25°C を維持して注水した。なお、対照区は、同様にアクアトロンを経由して 10°C に冷却した砂ろ過海水を毎分 12L で注水した。

4. マガキ体内 (消化盲嚢部) のウイルス遺伝子の定量

浄化状況を調べるため、経時的に、4~18 個体をサンプリングし、その消化盲嚢部を無菌的に摘出した。摘出した消化盲嚢部から個体別にウイルスを抽出して、定量 PCR でウイルスを定量した。消化盲嚢部からのウイルス抽出は、細胞破砕法⁷⁾を用いた。また、定量 PCR は山木ら⁶⁾に準じた。

結果

1. 砂ろ過海水による流水浄化

マガキ体内のウイルスの取り込み量 (浄化 0 時間) は、取り込ませ時のウイルス濃度に依存して変化し、 $2.0E+03$ copies/g から $5.2E+06$ copies/g であった (図 1)。第 6 回実験で取り込ませウイルス濃度とマガキ体内のウイルス取り込み量の関係について検討した結果、ウイルス濃度が 10^4 copies/L の場合は $2.0E+03$ copies/g, 10^5 copies/L の場合は $5.7E+05$ copies/g, 10^7 copies/L の場合は $5.2E+06$ copies/g であった (表 1, 図 1)。

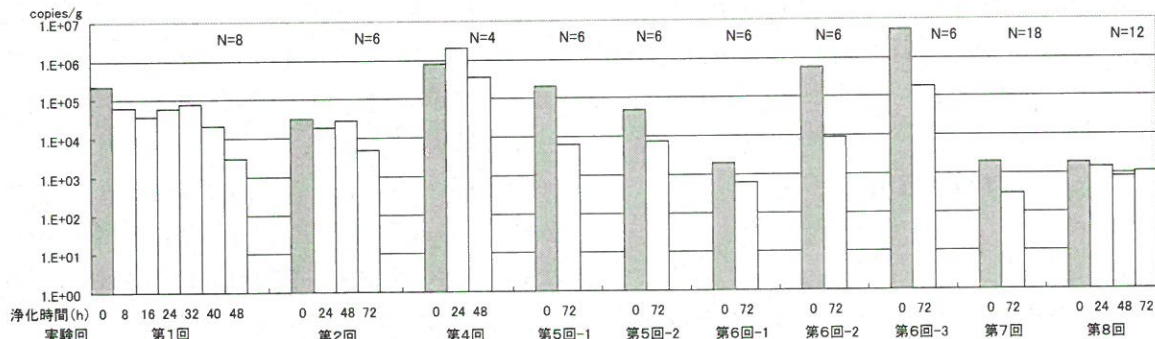


図 1 砂ろ過海水の流水によるカキ体内のウイルス量の経時変化 (それぞれ 4~18 個体の平均値) 72 時間のウイルス取り込み直後の値を浄化 0 時間 (色塗り) で示した。

流水条件下では、時間の経過とともにマガキ体内のウイルス量は減少したが、浄化開始時に対して48時間後では1.3~89.9%、72時間後では1.6~58.4%のウイルスの残存が認められた(図1, 2)。特に、浄化開始時のウイルス量が $10^3 \sim 10^4$ copies/gのレベルでは、72時間後でも14.4~58.4%のウイルスが残存した。

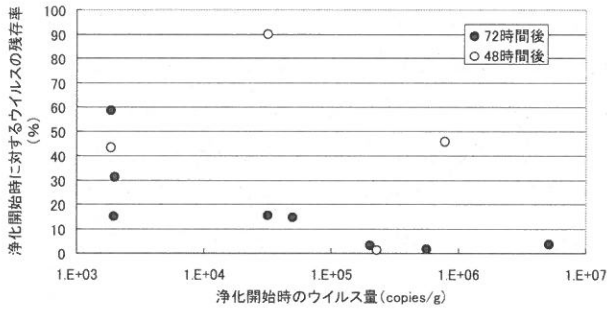


図2 砂ろ過海水の流水による浄化開始時のカキ体内のウイルス濃度と48時間または72時間後のウイルス濃度の関係

5日間以上、常時砂ろ過海水による流水浄化を続けた結果、第4回実験では浄化開始時の平均値は $8.4E+05$ copies/gであったが、10日後に $6.8E+03$ copies/g、18日後に $1.2E+02$ copies/gと減少し、18日後にはウイルスが検出された個体は8個体中2個体であった(図3)。第8回実験では、浄化開始時の平均値は $1.9E+03$ copies/gであったが、5日後に $4.0E+02$ copies/g、10日後に $3.1E+02$ copies/gとなり、20日後と30日後には全ての個体からウイルスは検出されなかった。第3回実験では2~3日ごとに砂ろ過海水を全交換する方法で飼育した結果、浄化開始時の平均値は $2.9E+05$ copies/gであったが、14日

後には $3.6E+02$ copies/g、29日後に $1.8E+02$ copies/gとなった。なお、この29日後に採取したサンプルでは、12個体中11個体からウイルスが検出された。

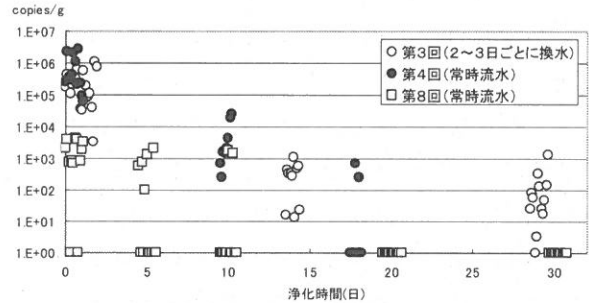


図3 砂ろ過海水の流水によるカキ体内のウイルス量の長期変化

2. 給餌及び加温による浄化の促進

第1回実験では、浄化開始時のウイルス取り込み量の平均値は $3.7E+05$ copies/gであったが、48時間後には対照区が $3.0E+03$ copies/gに対し、給餌区では $7.2E+03$ copies/gであった(図4)。第2回実験では、浄化開始時は $3.2E+04$ copies/gであったが、48時間後には対照区が $2.9E+03$ copies/gに対し、給餌区が $8.3E+03$ copies/g、 25°C に加温した区は $2.9E+04$ copies/gであった。また、144時間後には対照区が $7.6E+04$ copies/gに対し、給餌区が $5.0E+04$ copies/g、 25°C に加温した区は $1.4E+05$ copies/gであった。第4回実験では、浄化開始時に $7.8E+05$ copies/gであったが、48時間後には対照区が $3.5E+05$ copies/gに対し、 25°C に加温した区が $3.6E+05$ copies/g、 25°C に加温した上で給餌した区は $1.1E+05$ copies/gであった。このように、いずれの実験でも、給餌及び加温による顕著な浄化促進効果は認められなかった。

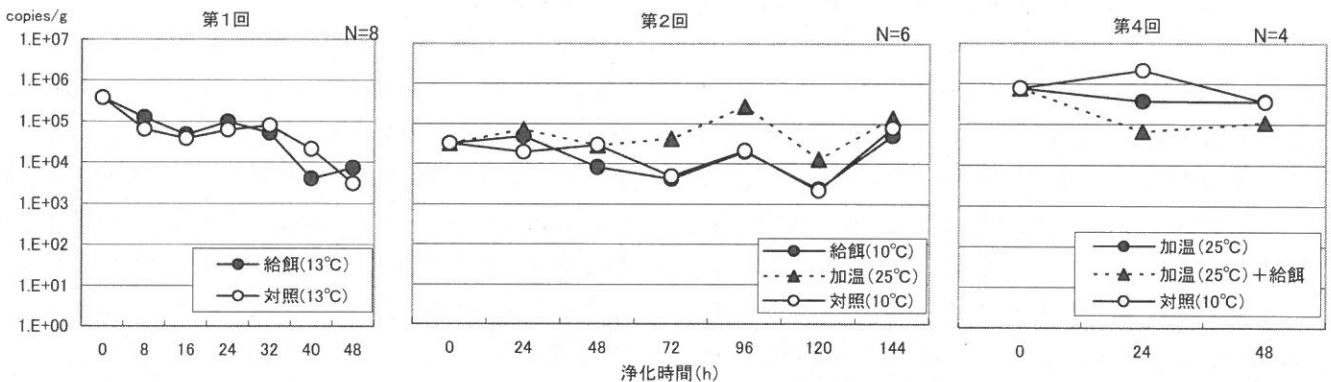


図4 給餌及び加温による浄化促進効果の検討

考 察

一般に NV は人間の小腸上皮細胞のみで増殖することが知られており、カキ体内での増殖はないとされている。しかし、濾過摂食者である二枚貝類は、餌料とともに環境水中に存在する NV を体内に取り込む可能性を有しており、これが生食による食中毒を引き起こす原因の一つとなる。カキを原因とする NV による食中毒を防止するためには、陸域からの NV の汚染経路を遮断することと併せて、カキ体内に取り込まれた NV を取り除く（浄化する）ことが求められている。

大腸菌は、砂ろ過海水の流水を 22 時間行うことで、マガキ体内から完全に浄化されると報告されている⁹⁾。一方、ポリオウイルスを用いた浄化実験では、取り込ませを 48 時間で行った場合は流水 6 時間で浄化されるが、2 週間にわたり取り込ませた場合は、10 日後までマガキ体内からウイルスが検出されたとの報告がある²⁾。また、FCV F4 では、5 日間に 3 回ウイルスを取り込ませた場合、浄化開始時に 1.68×10^6 copies/g が、砂ろ過海水の流水 6 時間後に 2.02×10^5 copies/g、72 時間後でも約 1/100 の 4.11×10^3 copies/g が検出されたと報告されており⁵⁾、ウイルス浄化の難しさが指摘されている。

今回の砂ろ過海水による流水浄化実験は、マガキ 1 個体当たりの水量が現在カキ処理場で実施されている細菌を対象とした人工浄化（1,000 個当たり毎分 12L 以上で 22 時間以上：生かきの取扱いに関する指導指針）に比べはるかに多く、ウイルスの再取り込みが生じる可能性がきわめて低い条件で実施した。それにも関わらず、ウイルスはマガキ体内に 72 時間経過後も 1/100~1/2 程度残存し、10 日間以上経過しても一部の個体から検出され、最終的に全個体からウイルスが未検出となるには 20 日間を要した。また、換水による浄化試験では、29 日後でも大部分の個体からウイルスが検出されており、再取り込みが生じる可能性の高い条件下では、ウイルスの浄化にはさらに長時間が必要であることが示唆された。

マガキの NV 自然汚染は 93% 以上が 1,000 copies/g 以下であるとの報告がある⁸⁾。本研究では、取り込ませ時の水槽内のウイルス濃度を 10^4 copies/L 程度にすることで、マガキ体内への取り込

み量を自然汚染レベルに近い 10^3 copies/g 程度に調整できることが明らかになった。さらに、低濃度に取り込ませた場合、高濃度よりも 72 時間後のマガキ体内のウイルス残存率が高くなる傾向があることが示された。

以上の結果から、ウイルスはマガキ体内で大腸菌とは異なる挙動を示しており、きわめて長時間マガキ体内に残存することが明らかとなった。NV の人体への感染性は非常に強く、10~100 個のウイルス接種で感染が成立する¹⁾という報告もある。従って、現行の流水による浄化方法では、ある程度のリスク低減は期待できるものの、安全性の確保は困難であると言わざるを得ない。20 日間以上の浄化は、現在の養殖、生産の形態を考慮すれば実現不可能である。

また、給餌と加温、さらにその複合処理による浄化促進効果についても検討したが、今回の実験からはいずれについても効果が認められなかった。給餌による浄化では、消化管内容物の排泄促進による浄化効果を期待したが、明確な効果は認められなかった。また、マガキの酸素消費量は水温 32°C までは直線的に増加するとされており¹⁰⁾、冬季に NV によるカキの食中毒が多発する要因が低水温によるカキの活性の低下によるとの指摘もある²⁾。25°C に加温することでマガキの生理活性が上昇し、ウイルスの消化及び排泄速度の増加によって浄化促進効果が生じることが期待されたが、明確な効果は認められなかった。今回の一連の砂ろ過海水流水実験において、自然海水温を用いた場合は実験回ごとに海水温が 10°C から 21°C まで変動があるにもかかわらず、その影響は認められなかったことから、少なくとも 25°C 以下の場合には、加温による浄化促進効果は生じないと考えられる。

マガキ体内からのウイルス浄化が困難な理由として、山木らは、FCV F4 をマガキに取り込ませて *in situ* Hybridization 法で消化盲嚢部のウイルス分布を調査した結果、食作用のある体組織内の変形細胞並びに成熟した消化盲嚢上皮細胞でウイルスの存在を確認したことを指摘している⁶⁾。ウイルスがマガキ消化盲嚢部の細胞内に取り込まれた場合は、流水条件下で飼育したとしても短時間にウイルスが排出される可能性は非常に低い。今回の一連の実験でウイルスがマガキ体内に長期間残存したことは、消化盲

嚢部である導管、細管、嚢状部位の上皮細胞及び結合組織内の変形細胞にウイルスが取り込まれたことが要因と考えられる。

マガキ体内に取り込まれたウイルスに対する流水による浄化には限界が示されたことから、今後、流水以外の浄化方法の探索が求められる。その際には、消化管内のウイルスだけでなく、細胞内に取り込まれたウイルスを併せて除去あるいは不活化する手法の開発が必要となる。

浄化技術を開発する上での課題は、どのレベルまでウイルスを除去あるいは不活化しなければならないかである。ただ、現在のところ生食用カキについては NV の規格基準はない。その一つの理由として、NV のヒトへの最少感染量が明確でないことなどが挙げられる。このために十分なリスクコミュニケーションをとることができず、規格基準の設定が困難となっている。一方、前述のように NV の感染性は非常に強く、10~100 個のウイルスで感染が成立する¹⁾という報告もある。従って、安全性を確保するためには、現在の検出技術で「未検出」のレベルまでマガキ体内のウイルス量を減少させることが求められる。また、ネコカリシウイルスがノロウイルスと近縁であり形態等が類似しているとはいえ、マガキ体内で NV と異なる性質を呈示している可能性は否定できない。従って、最終的な浄化効果の確認は、

代替ウイルスではなくノロウイルスで行う必要があると考えられる。

要 約

- 1) ネコカリシウイルス (FCV F4) を取り込ませたマガキについて、砂ろ過海水による流水および給餌、加温の浄化効果を検討した。
- 2) 砂ろ過海水の流水では、72 時間後にマガキ体内のウイルス量は最大で 100 分の 1 程度まで減少した。しかし、完全浄化には 20 日間以上を要した。
- 3) 給餌及び加温による浄化促進効果は認められなかった。
- 4) 流水浄化においてマガキ体内のウイルス除去に長時間を要するのは、マガキの細胞内にウイルスが取り込まれているためと判断された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、貴重な FCV F4 を分与していただいた、東京大学大学院獣医微生物学研究室 遠矢幸伸先生に感謝します。また、サンプリング、分析等に協力頂いた保健環境センター微生物部、水産研究開発センター環境養殖部の方々に感謝します。

参考文献

- 1) 中込治 (2004) ノロウイルス感染症：最近の研究の展開. モダンメディア, 50 (6), 7-16
- 2) 中正純・岡田恵美・岡山あゆみ・南川藤雄・米奥正則・福田美和・矢野拓弥・川田一伸・櫻井悠郎 (2000) かきの養殖海域における SRSV 汚染調査とウイルス浄化試験について. 食品衛生研究, 50 (8), 97-103
- 3) 吉田靖子・矢野一好・藪内清 (1988) マガキによるポリオウイルスの蓄積実験. 東京衛研年報, 39, 49-53
- 4) 山木紀彦・植木洋・伊藤大介・文谷俊雄・後藤郁男・佐藤千鶴子・渡邊節・秋山和夫 (2003) ネコカリシウイルスを用いたマガキの浄化試験. 宮城県保健環境センター年報, 21, 63-65
- 5) 山木紀彦・植木洋・伊藤大介・文谷俊雄・菊地奈穂子・後藤郁男・沖村容子・秋山和夫 (2004) 砂ろ過海水と電解海水を用いたカキ浄化試験. 宮城県保健環境センター年報, 22, 50-53
- 6) 山木紀彦・植木洋・須藤篤史・酒井敬一・菊地奈穂子・後藤郁男・沖村容子・秋山和夫・遠矢幸伸 (2006) *in situ* Hybridization 法によるカキ消化盲嚢部の組織化学的ウイルス分布. Jpn. J. Food. Microbiol., 23 (1), 21-26
- 7) 植木洋・西尾治 (2004) ノロウイルスの下水処理施設における挙動および養殖カキへの汚染経路の把握. 厚生労働科学研究費補助金 [食品安全確保研究事業] 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 平成 15 年度研究報告書, 118-124
- 8) 西尾治 (2004) 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 [食品安全確保研究事業] 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 平成 15 年度研究報告書, 23-43

- 9) 秋山和夫・上村弘・荒井富夫・白地良一・白石廣行 (1995) 殻付きカキの人工浄化試験. 宮城県保健環境センター年報, 13, 43-46
- 10) 今井丈夫 (1981) カキの生物学的研究. 浅海完全養殖, 今井丈夫編. 105-109, 東京, 恒星社厚生閣, 454pp.