

高圧処理によるノロウイルスとネコカリシウイルスの不活化効果の比較

須藤 篤史^{*1}・田邊 徹^{*1}・庄司 美加^{*2}・植木 洋^{*2}・上村 弘^{*2}

Comparison of inactivation effects of high-pressure processing on Norovirus and Feline calicivirus within oyster

Atsushi SUTO^{*1}, Toru TANABE^{*2}, Mika SHOJI^{*2}, You UEKI^{*2} and Hiroshi UEMURA^{*3}

キーワード: マガキ, ノロウイルス, ネコカリシウイルス, 高圧処理, 定量PCR

ノロウイルス (NV) は冬季に流行する感染性胃腸炎や食中毒の主要な原因物質である。特にウイルス性食中毒においては、その原因の95%以上を占める最も重要なウイルスとなっている¹⁾。NVはヒト体内でのみ増殖するウイルスであるが、環境水を通じて汚染された生ガキが食中毒の原因となることが指摘されており²⁾、NVによるカキの汚染は水産業界にも甚大な影響を及ぼしている。特に宮城県は全国第2位のマガキ生産県であり、生食用出荷が主体であるためNV汚染による損害は著しく大きい。

この対応の一つとしてマガキ体内のNV浄化技術の開発が強く求められている³⁾。宮城県ではこれまでNVやその代替ウイルスであるネコカリシウイルス (FCV) を用いて汚染マガキに対する滅菌海水による流水、加温、給餌等の浄化促進手法を検討してきたが⁴⁻⁷⁾、いずれも顕著な効果は認められていない。浄化が困難である要因としてウイルスが消化盲嚢部まで取り込まれること⁸⁾、NVは消化管の上皮細胞に特異的に結合すること⁹⁾が挙げられており、これはマガキ体内からのウイルス排出を原理とした浄化手法の限界を示唆している。

そこで、本研究では近年食品の非加熱殺菌技術の一つとして注目され、いくつかのウイルスに対して不活化効果が報告されている高圧処理について¹⁰⁻¹³⁾、ウイルス単体およびマガキ体内のウイルスに対する不活化効果を検討したので報告する。高圧処理では処理容器内に均一に

作用が及ぶため、マガキ体内における存在部位に関わらずウイルスを不活化できる可能性がある。また温度変化が生じない機器で処理することでほぼ生食用の品質を維持できるため、生ガキの安全性確保の手法としての期待は大きい。なお、対象ウイルスとしてNVとFCVの2種を用いた。FCVは浄化手法を検討する上で培養技術が確立されていないNVの代替ウイルスとして頻用されているものである。

材料と方法

1 供試ウイルス

ネコカリシウイルス (Feline calicivirus F4 (FCV F4)) は、Crandell's feline kidney cells (CrFK) に接種後、37°C に設定したCO₂インキュベーターで48時間培養し、細胞変性効果を確認後、使用時まで-80°Cで保存した。

ノロウイルス (Norovirus G II genotype 6 (NV G II/6)) は感染性胃腸炎患者由来便約20 gを200mlのDWに懸濁した後、10,000rpmで30分遠心分離し、その上清を-20°Cで保存した。

2 ウイルス単体に対する超高圧処理

凍結保存していたFCV F4 (以後FCV) とNV G II/6 (NV) を室温で自然解凍した後、それぞれ0.2mm厚の

^{*1}水産技術総合センター養殖生産部, ^{*2}宮城県保健環境センター

ポリ袋中に約 5ml 封入し, Dr.CHEF ((株) 神戸製鋼所製) を用いて 600MPa, 5°C で 1~10 分間処理した (表 1. Exp.1~4)。処理後, ポリ袋からウイルス液を 3~5 回採取し, QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan) でウイルス RNA を抽出後 FCV については山木ら⁸⁾, NV については Kageyama et al.¹⁴⁾ に準じて定量 PCR 法でウイルス遺伝子を定量した。実験 1 の FCV についてはプラークアッセイ法で感染価も評価した。また, 実験 2,3,4 では一部ウイルス液について高圧処理後に Invitrogen RNase-A を 37°C で 2 時間処理した後, ウイルス遺伝子を定量した。なお, 対照として処理区と同様にポリ袋に封入し, 5°C に保持したウイルス液中の遺伝子を定量した。

3 マガキ体内のウイルスに対する処理

宮城県内で養殖されたマガキに既報^{3,7)} に準じて FCV または NV を取り込ませた。脱殻後, 軟体部のみを 1 個体ずつ 0.2mm 厚のポリ袋に封入し, Dr.CHEF を用いて 600MPa, 5°C または 10°C で 1~15 分間処理した (表 1. Exp.5~8)。処理後直ちに無菌的に消化盲嚢部を切り出し, 個体別に定量 PCR 法でそれぞれのウイルス遺伝子を定量した。また, 実験 7 では一部の個体について高圧 10 分間処理後 4°C で 48 時間冷蔵保存した後, 消化盲嚢部を切り出してウイルス遺伝子を定量した。消化盲嚢部からのウイルス抽出は細胞破砕法¹³⁾ を用い前述の方法に従って定量した。なお, 対照としてウイルス取り込みカキを処理区と同様にポリ袋に封入し 5°C に保持した個体について, 盲嚢部を切り出しウイルス遺伝子を定量した。

4 自然汚染ガキに対する処理

養殖漁場から採取したマガキをカゴに入れて宮城県内の A 河川河口近傍に垂下し, 約 1 ヶ月後に取り上げて 3 と同様に軟体部を封入し, 700MPa, 5°C で 20 分間処理した (表 1. Exp.9)。

表 1 高圧処理条件

Exp.	ウイルス		ウイルスの状態		処理方法			備考
	FCV	NV	単体	カキ体内	圧力 (Mpa)	処理時間 (分)	温度	
1	○		○		600	5,10	5°C	+プラーク法
2	○		○		600	1,5,10	5°C	+RNase処理
3		○	○		600	1	5°C	+RNase処理
4		○	○		600	10	5°C	+RNase処理
5	○			○	600	1	5°C	
6	○			○	600	1,5,10	5°C	
7		○		○	600	5,10	5°C	+48時間冷蔵保存
8		○		○	700	15	10°C	
9		○		○	700	20	5°C	自然汚染ガキ

結 果

1 ウイルス単体への処理

FCV 単体に対し 600MPa 処理後に定量 PCR で検出された遺伝子数は, 実験 1 では対照区が平均 1.2×10^{10} copy/ml だったのに対し, 5 分間処理で平均 1.5×10^9 copy/ml, 10 分間処理で平均 1.5×10^9 copy/ml となり, それぞれ 0.9 log 減少した。実験 2 では対照区が平均 5.5×10^8 copy/ml だったのに対し, 1 分間処理で平均 1.9×10^7 copy/ml, 5 分間処理で平均 1.7×10^7 copy/ml, 10 分間処理で平均 7.4×10^6 copy/ml となり, それぞれ 1.5 log, 1.5 log, 1.9 log 減少した (図 1)。600MPa 処理後に RNase 処理した場合, 処理前に対して対照区で 2.2 log 分間処理区で 0.4 log 減少し, 対照区で減少率が大きかった。プラーク法でウイルスの感染価を調べた結果, 対照区では 8.6×10^7 PFU/ml だったのに対し, 5 分間処理, 10 分間処理ではともに 0 PFU/ml となった (表 2)。

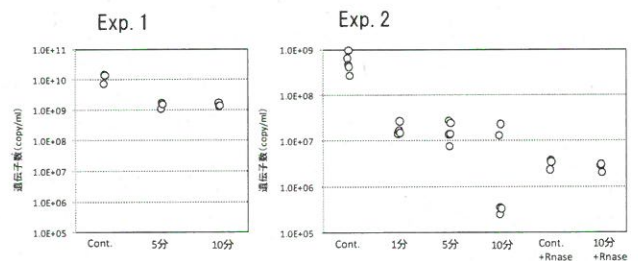


図 1 FCV 単体への超高圧処理による遺伝子数の変化

表 2 FCV 単体への高圧処理による感染価の変化 (Exp.1)

処理	PFU/ml
Cont.	8.6×10^7
600MPa・5分	0
600MPa・10分	0

NV 単体に対し 600MPa 処理後に定量 PCR で検出された遺伝子数は, 実験 3 では対照区が平均 4.5×10^5 copy/ml, 1 分間処理が平均 6.1×10^5 copy/ml, 実験 4 では対照区が平均 2.7×10^4 copy/ml, 10 分間処理が平均 2.6×10^4 copy/ml となり, 2 回ともほとんど変化は認められなかった (図 2)。600MPa 処理後に RNase 処理した場合, 処理前に対して, 実験 3 では対照区, 1 分間処理区ともに 0.3 log, 実験 4 では対照区で 0.9 log 分間処理区で 1.3 log 減少した。

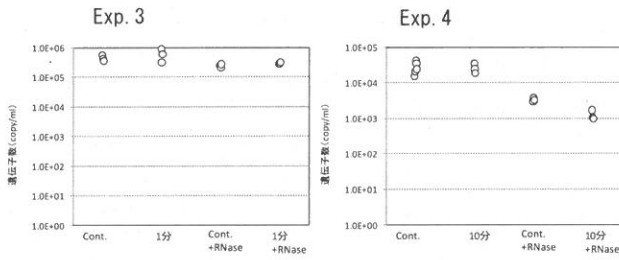


図2 NV単体への高圧処理による遺伝子数の変化

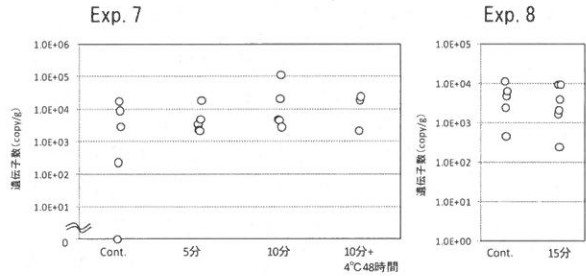


図4 カキ体内のNVに対する高圧処理による遺伝子数の変化

2 マガキ体内のウイルスへの処理

FCVを取り込ませたマガキから検出されたウイルス遺伝子数は、実験5では対照区が平均 4.7×10^5 copy/gだったのに対し、600MPaの1分間処理で平均 5.1×10^3 copy/gとなり、2.0 log減少した。実験6では対照区が平均 8.3×10^4 copy/gだったのに対し、600MPaの1分間処理で平均 8.9×10^3 copy/g、5分間処理で平均 2.9×10^3 copy/g、10分間処理で平均 4.1×10^1 copy/gとなり、処理時間に伴い減少が認められた(図3)。10分間処理では、対照区に対して3.3 log減少し、さらに5個体中2個体からはウイルスが検出されなかった。

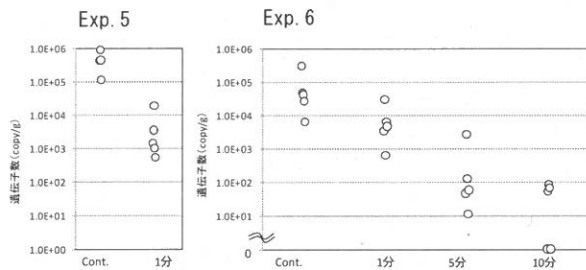


図3 カキ体内のFCVに対する高圧処理による遺伝子数の変化

NVを取り込ませたマガキから検出されたウイルス遺伝子数は、実験7では対照区が平均 6.0×10^3 copy/g、600MPaの5分間処理が平均 6.4×10^3 copy/g、10分間処理が平均 2.9×10^4 copy/gとなり、ほとんど変化はなかった。また、10分間処理後4°Cで48時間放置後に定量を行った場合も検出されたウイルス遺伝子数は平均 1.5×10^4 copy/gとなり、変化は認められなかった。700MPaで処理温度を10°Cに設定した実験8においても、対照区が平均 5.0×10^3 copy/g、15分間処理が平均 4.4×10^3 copy/gとなり、顕著な減少は確認されなかった(図4)。

3 自然汚染マガキ体内のウイルスへの処理

対照区、700MPaの20分間処理区ともに7個体ずつ体内のNV遺伝子コピー数を定量したところ、対照区では1個体、処理区では2個体でのみNV遺伝子が検出された(表3)。

表3 自然汚染マガキへの高圧処理による体内のNV遺伝子数の変化(Exp.9)

	Cont.	20分
1	0.0	0.0
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0
4	0.0	6.2
5	0.0	0.0
6	12.5	2.0
7	0.0	0.0
平均	1.8	1.2

(copies/g)

考 察

ウイルス単体への高圧処理として、ヒトヘルペスウイルス(HSV-1およびHCMV)では400MPaの10分間処理でそれぞれ7および4log¹⁰、A型肝炎ウイルス(HAV)では450MPaの5分間処理、FCVでは275MPaの5分間処理でそれぞれ7logの感染価の減少が確認されている¹²⁾。カキ体内に取り込ませたウイルスについては、HAVでは400MPaの1分間処理で3log¹¹⁾、NVと同じカリシウイルス科に属し腸管性ウイルスであるマウスノロウイルス(MNV-1)では350MPaの5分間処理で5log以上の感染価の減少が確認されている¹³⁾。

本研究では、既報¹⁰⁻¹³⁾で効果があると報告されている圧力よりもさらに高圧である600~700MPaという条件でNVおよびその代替ウイルスであるFCVの不活化を試み

た。その結果、ウイルス単体、マガキ体内に取り込ませたウイルスともに高圧処理による効果はFCVとNVで大きな違いが認められた。FCVではウイルス単体、カキ体内のウイルスともに600MPa処理で処理時間に伴い検出されるウイルス遺伝子数は減少し、10分間処理で単体では1.9log、カキ体内では3.3logの減少が認められた。感染価についても、ブランク法で検討を行った結果、600MPaの5分間処理でウイルスの不活化が確認された。これに対してNVでは600MPa、700MPa処理を1~20分間行っても遺伝子数の減少は認められなかった。さらに汚染率が低いという問題はあるものの、自然汚染ガキを用いた実験でも高圧処理後にNVが検出されており、汚染レベルが低い場合でもその有効性は認められなかった。

高圧処理のウイルスに対する不活化効果の要因は主にエンベロープの損傷であるため、エンベロープを持たないウイルスでは効果が少ないという報告がある¹⁰⁾。しかし、FCV、NVともにエンベロープを持たないカリシウイルス科に属していること、他にもエンベロープを持たないHAV^{11,12)}やMNV-1¹³⁾でも圧力処理による不活化効果が確認されていることから、エンベロープの有無だけで高圧処理効果を説明することは困難である。

不活化効果に影響する要因として処理時の温度も指摘されている^{11,13)}。HAVでは温度が高いほど有効性が高い可能性が示唆されているのに対し¹¹⁾、FCVとMNV-1では5~30℃の範囲では温度が低いほど減少率が大きいと報告されている¹³⁾。FCVとMNV-1の結果から、NVでも高圧処理効果が温度依存的で低温ほど有効性が高くなることが予測されるが、本研究では低温条件の5℃で高圧処理効果を比較し、NVについては10℃の処理条件も検討したが、いずれも有効性は確認できず処理温度の影響はなかった。

マガキ体内からの排泄という点では、滅菌海水を用いた流水条件下での蓄養においてFCVとNVに対する浄化効果が著しく異なっており⁷⁾、この原因としてはNVのカキ消化管上皮細胞への特異的結合が関与していると推察されている^{7,9)}。しかし、高圧処理は処理空間内に均一に作用されることから、今回の実験結果に対しては関連が低いと推察される。

NV、FCVともにカリシウイルス科に属し、大きさや形態を含めその基本構造は類似している。しかし、今回の実験でNV単体に対する高圧処理後にRNase処理をした場

合、またカキ体内に取り込ませたウイルスに対する処理後冷蔵48時間を経過した後ウイルスの抽出操作を施した場合でも、高圧処理の効果は確認されなかった。このことから、NVでは高圧処理を行った場合でもウイルスRNAにRNaseが作用できない状態にあったことが示唆され、カプシド構造がFCVに比べて極めて頑強である可能性が考えられる。

今回のFCVを用いた実験では、高圧処理前後において検出されたFCVの遺伝子数の減少が明確でない場合でも、感染性が失われていることが確認できた。このことから、今回の実験で高圧処理後に検出されたNV遺伝子が感染性を有する粒子のみに由来するかは不明であるものの、一部のウイルス遺伝子は不活化されたウイルスに由来する可能性も考えられる。また、NVと同じ腸管性ウイルスであるMNV-1でも高圧処理によって感染価の減少が確認されていることから¹³⁾、NVでも感染性が失われていることも推測される。しかし、培養法が確立されていない現状では、不活化効果を評価するにはウイルス遺伝子数の変化で判断せざるを得ない。さらに、FCVにおいては有効な条件下でもNVには効果がなかったことから、代替ウイルスの結果をもって有効性を判断することは危険が伴う。流水水槽中の蓄養でFCVが3~10日でマガキ体内から完全に検出されなくなるのに対し、NVでは30日後も残存するという結果もあり⁷⁾、マガキ体内におけるNVの挙動は他のウイルスと大きく異なっていることが想定される。したがって、NV浄化を評価するためには、NVそのものを用いた検討が不可欠であると考えられる。

今後の研究の進展のためにはNVの培養系確立がきわめて重要であり、その方面での研究の進展を強く期待する。また、同時にこれまで確立してきたカキ体内のNV浄化評価手法(定量PCR)でもその効果が確認できる浄化手法の開発に努めていく必要がある。

要 約

食中毒原因物質として問題となっているノロウイルス(NV)とその実験代替ウイルスとして頻用されているネコカリシウイルス(FCV)に対する高圧処理による不活化効果を比較した。

1) ウイルス単体に対しては、FCVでは600MPaで処理時

間依存的にウイルス遺伝子数が減少し、10分間で1.9logの減少が確認されたのに対し、NVでは20分間処理までウイルス遺伝子数の減少は認められなかった。またFCVでは5分間処理でウイルスの感染価は失われた。

- 2) マガキ体内に取り込ませたウイルスでも同様に、FCVでは600~700MPaで処理時間依存的にウイルス遺伝子数が減少し、10分で3.3logの減少が確認されたのに対し、NVでは20分間処理までウイルス遺伝子数の減少は認められなかった。また、処理後48時間冷蔵保存した場合でも遺伝子数の減少は認められず、ウイルスRNAが比較的安定な状態を維持していることが確認された。
- 3) NVとFCVの高圧耐性が異なることが明らかとなった。今後、カキ体内からのNV不活化を目的とした検討を行う際には、NVそのものを用いる必要性が示唆された。

謝 辞

高圧処理を実施するにあたり、宮城県水産加工研究所（現水産技術総合センター水産加工開発部）三浦悟氏、菊池喜彦氏より多大な御協力を頂いた。ここに厚く御礼申し上げます。また、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。本研究は「生がき安全安心対策事業（平成16~19年度）」により実施した。記して謝意を表します。

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) 西尾治・西香南子・福田伸治・西田知子・篠原美千代・三上稔之・沖村容子・川奈緒美・杉枝正明・古屋由美子・大瀬戸光明・鈴木宏（2003）ウイルス性食中毒の病因．臨床とウイルス，31（3），163-169
- 3) 室賀清邦・高橋計介（2005）カキのノロウイルス汚染．日水誌，71，535-541
- 4) 須藤篤史・酒井敬一・庄司美加・山木紀彦・植木洋（2007）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．宮城水産研報，7，71-76
- 5) 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
- 6) 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
- 7) You Ueki, Mika Shoji, Atsushi Suto, Toru Tanabe, Yoko Okimura, Yoshihiko Kikuchi, Noriyuki Saito, Daisuke Sano, and Tatsuo Omura（2007）Persistent observation of Norovirus in artificially-contaminated oyster during depuration process. Appl. Environ. Microbiol., 73, 5687-5701.
- 8) 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
- 9) Le Guyader, F. S., F. Loisy, R. L. Atmar, A. M. Hutson, M. K. Estes, N. Ruvoen-Clouet, M. Pommepuy, and J. Le Pendu（2006）Norwalk Virus-specific binding to oyster digestive tissues. Emer. Infect. Dis. 12, 931-936.
- 10) 中上辰芳・重久保・大森丘（1994）ウイルスに及ぼす高圧処理の影響．高圧バイオサイエンス．164-171．京都，さんえい出版．

- 11) Calci, K. R., G.K.Meade, R. C. Tezloff, and D.H. Kingsley (2005) High-Pressure Inactivation of Hepatitis A Virus within Oysters. *Appl .Environ.Microbiol.*, 71, 339-343.
- 12) Kingsley,D.H., D.Hoover, E. Papafragkou, and G.P.Richards (2002) Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure. *J .Food Prot.* 65, 1605-1609.
- 13) Kingsley,D.H., D.R.Holliman, K..R.Calci, H.Chen,G.J.Flick (2007) Inactivation of a Norovirus By High-Pressure processing. *Appl .Environ.Microbiol.*, 73, 581-585.
- 14) Kageyama, H., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Takeda, N., and 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.