

ネコカリシウイルスを用いたマガキの浄化試験

The Depuration of *Feline calicivirus F4* by the Oysters, *Crassostrea gigas*

山木 紀彦 植木 洋 伊藤 大介*¹
 文谷 俊雄*¹ 後藤 郁男 佐藤 千鶴子*²
 渡邊 節 秋山 和夫

Norihiko YAMAKI, Yo UEKI, Daisuke ITOU
 Toshio BUNYA, Ikuo GOTO, Chizuko SATO
 Setsu WATANABE, Kazuo AKIYAMA

キーワード：小型球形ウイルス，ネコカリシウイルス，マガキ，取込試験，浄化試験

Key Words：Small Round Structured Virus, *Feline calicivirus F4*, Oysters, Investigation test, Depuration test

小型球形ウイルス (Small Round Structured Virus: SRSV) は培養細胞での増殖が確認されていない。そこでSRSVに替わる指標としてネコカリシウイルス (*Feline calicivirus F4*: FCV F4) を用いてマガキへの取込試験ならびに浄化試験を実施した。海水およびマガキのウイルス量は、ブラック法で行った。その結果、マガキのウイルス取込は、ウイルスとの接触開始1時間後に最も高いウイルス量を示し、その後、減少した。浄化試験では、砂ろ過海水で浄化開始72時間後、マガキで浄化96時間後でFCV F4が検出されないことが明らかになった。

1 はじめに

SRSVは、食中毒病因物質の一つとして知られており、生カキなどの二枚貝が推定原因食品¹⁾²⁾になる事例が多く食品衛生上問題となっている。宮城県を初めとするカキ生産県では、安全なカキを提供するために養殖カキのSRSV汚染防止やSRSVによって汚染された養殖カキの浄化対策に取り組んでいる。これまで、この一環の研究としてSRSVが培養細胞での増殖が不可能であることから、ポリオウイルスで浄化方法を検討した報告³⁾がある。

今回、SRSVと同じカリシウイルス科に属し培養可能で、しかも形態や紫外線、塩素等に対する抵抗性が類似しているFCV F4を用いて、海水中での挙動とマガキへの取込試験ならびに浄化試験を行ったので報告する。

2 材 料

2.1 供試ウイルス

1.90 × 10⁹ PFU/mlのFCV F4をCrandell's feline kidney cells (CrFK)に接種後、37℃, 48時間, CO₂インキュベーターで培養し、ウイルス量が10⁸ PFU/ml以上のFCV F4培養液をプールし、-80℃に保存し用いた。

2.2 マガキおよび海水

宮城県内のA湾内で2年間養殖されたマガキを宮城県水産研究開発センターで泥や付着物を殻から除去後、飼育水槽に入れ流水状態で2日間飼育し試験材料とした。なお、マガキの飼育、取込試験および浄化試験には砂ろ過海水を使用し、FCV F4に汚染されていないことを確認のうえ、試験に用いた。

3 方 法

取込試験および浄化試験は宮城県水産研究開発センター飼育棟で実施した。

3.1 取込試験 (図1)

取込試験は、2002年11月26日から30日まで5日間実施した。180 Lの砂ろ過海水が入った水槽1.80 × 10⁷個の植物プランクトン (*Chaetoceros gracilis*: Cg)を加え、ウイルス培養液1.95 × 10⁹ PFU/mlを2.4 L添加し、1時間後にマガキ60個体を入れた。水温は、養殖カキからSRSVの検出率が高くなる時期の海水温を想定し10℃に保ち、エアレーションを行いながら120時間取込を実施した。検体は経時的(0, 1, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120時間後)に海水1 Lとマガキ5個体を採取した。

なお、Cgは、実験室内での培養系も確立されている利点があることから用いた。Cgの添加量は、1985年に水産

* 1 宮城県水産研究開発センター

* 2 宮城県がんセンター

研究開発センターが実施した養殖海域の植物プランクトンの調査結果に基づいて決定し、水槽内を海域環境に近づけるため、24時間毎に加えた。

3.2 浄化試験 (図 1)

浄化試験は2003年3月16日から22日までの7日間実施した。マガキへのFCV F4の取込みは、上述の取込試験に従った。すなわち、水槽に180 Lの砂ろ過海水に 1.80×10^7 個のCgと 2.60×10^9 PFU/mlのウイルス培養液を4.2 L加え、1時間後にマガキを入れ、エアレーションを行

いながら水温を10 に保ち、12時間取込を行った。検体は経時的(0, 1, 6, 12時間後)に海水1 Lとマガキ5個体を採取した。浄化はFCV F4で12時間汚染したマガキを、180 Lの砂ろ過海水が入った新しい水槽に移し行った。砂ろ過海水の流量は、毎分1 Lに設定した。なお、水温は10 に保ちエアレーションも併行した。浄化の確認は、経時的(1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120時間後)に水槽の海水1 Lと浄化中のマガキ5個体を採取し、それぞれの検体からFCV F4を定量した。

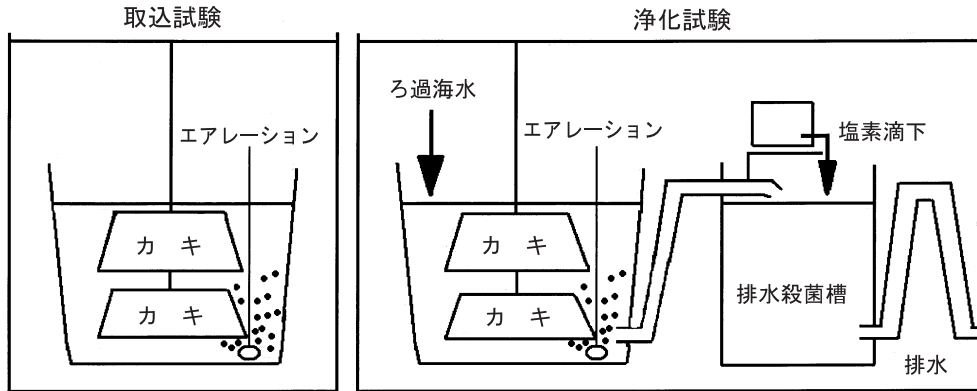


図1 試験模式図

3.3 ウイルス濃縮法

採取した海水はPolyethylene Glycolを最終濃度が10%になるように加え、4 1晩攪拌後10,000rpm30分間遠心し、沈渣をDW500 μ lで再浮遊し検体とした。また、マガキは個々に中腸腺を摘出し、-80 に1晩保存後、70 に暖めたDWを等量加え竹串で軽く破碎した。その後、10,000rpm20分間遠心した上清をさらに40,000rpm 2時間超遠心し、沈渣をDW500 μ lで再浮遊した。

3.4 プラック法⁴⁾

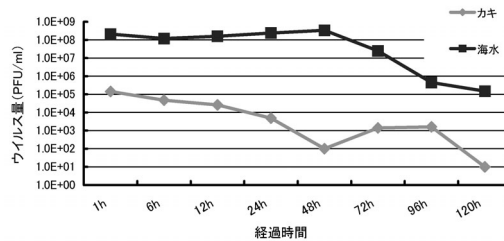
6穴プラスチックプレートで単層培養したCrFKに、採取した検体から抽出したFCV F4を2% -Globulin free Fetal Bovine Serumで10倍段階希釈の系列を作り、各希釈系列あたり100 μ lをそれぞれ2穴の細胞に接種し、37、90分、CO₂インキュベーターで吸着させた。その後メチルセルロースを3ml重層して37、48時間、CO₂インキュベーターで培養したのち、10%中性緩衝ホルマリン液で室温3時間固定後、メチレンブルーで染色し、プラック数を算定した。

4 結果及び考察

4.1 取込試験

経時的に採取した海水及びマガキのFCV F4の定量結果を図2に示した。海水では、1時間後 2.10×10^8 PFU/ml、6時間後 1.20×10^8 PFU/ml、48時間後 3.40×10^8 PFU/mlとほぼ同じウイルス量で推移した。72時間後には 2.50×10^7 PFU/mlとなり、120時間では 1.50×10^5 PFU/mlまで減少した。

次に、マガキ中腸腺での経時的FCV F4取込量は、各段階で採取した5個体の個々について定量し、その平均値で示した。取込開始1時間後には 1.44×10^5 PFU/mlと最も高いウイルス量であったが、6時間後 4.76×10^4 PFU/ml、12時間後 2.62×10^4 PFU/mlと緩やかに減少し、120時間後には 1.0×10^1 PFU/mlまでになった。この間、48時間後には一時 1.00×10^2 PFU/mlまで急激に下降したのち、72時間後には 1.40×10^3 PFU/mlまでに増加した。この原因は不明であるが、海水に白濁が観察されたことから殻表面やマガキの排泄物由来の微生物が関与した可能性も考えられた。



個体No.	経過時間							
	1h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	120h
1	2.50E+03	2.00E+04	5.00E+04	1.00E+02	5.00E+02	0.00E+00	2.50E+03	0.00E+00
2	0.00E+00	2.90E+04	7.00E+03	2.00E+01	0.00E+00	5.50E+03	5.00E+02	0.00E+00
3	2.00E+05	1.90E+04	3.60E+04	1.00E+03	0.00E+00	1.50E+03	2.00E+03	5.00E+01
4	4.70E+05	1.50E+05	1.50E+04	2.30E+04	0.00E+00	0.00E+00	1.50E+03	0.00E+00
5	4.70E+04	2.00E+04	2.30E+04	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.50E+03	0.00E+00
AVE	1.44E+05	4.76E+04	2.62E+04	4.82E+03	1.00E+02	1.40E+03	1.60E+03	1.00E+01
海水	2.10E+08	1.20E+08	1.60E+08	2.40E+08	3.40E+08	2.50E+07	4.50E+05	1.50E+05

図2 取込試験におけるFCV F4の経時的変化

今回の取込試験は、カキの出荷の最盛期でかつSRSVの汚染頻度が高くなる時期の海水温に近い10℃で行った。また、マガキがSRSVで汚染される養殖海域の環境には、多数の植物プランクトンが生息していること、さらに、海水中でのウイルスの状態についての報告⁵⁾⁷⁾は少ないが、一般的に、ウイルス粒子が海水中に単一で浮遊していることは少なく、プランクトンなどと凝集塊を形成している可能性が疑われていることから、マガキの餌となるCgを24時間毎に添加して行った。その結果FCV F4は、海水中で長時間にわたり検出されていること、かつ、マガキ中腸腺には短時間で取り込まれることが明らかになった。

しかし、養殖海域におけるマガキのSRSVによる単一暴露は考えられず、冬期には常時ウイルスの汚染を受けている可能性が高いことから、今後、低濃度ウイルス量を用いた取込試験や再現性試験を行う必要がある。

4.2 浄化試験

取込ならびに浄化試験の結果について図3に示した。マガキのウイルス量については、取込試験と同様に中腸腺5個の平均値で示した。取込試験での成績及び今井ら⁶⁾によるカキが餌を取り込んでから20時間で排泄を始めるとの知見を参考に12時間の取込で浄化試験を実施した。

なお、取込段階での海水のウイルス量は、マガキを入れる直前の0時間では 6.20×10^8 PFU/mlであり、取込開始12時間後には、 1.30×10^8 PFU/mlであった。また、マガキでは取込12時間後 3.32×10^4 PFU/mlであった。

カキ中腸腺におけるウイルス量は、浄化開始1時間後から8時間後まで 10^4 PFU/mlであったが、それ以降、時間の経過と共に減少し、48時間後には 2.60×10^2 PFU/ml、72時間後に 1.00×10^1 PFU/mlとなり、96時間後にウイルスは検出されなかった。

一方、海水においては、浄化開始1時間後 1.40×10^5 PFU/ml、4時間後 7.20×10^4 PFU/mlと24時間後まで 10^4 から 10^5 PFU/mlで推移し、浄化48時間後に 1.30×10^3 PFU/mlと減少、72時間後には検出されなかった。

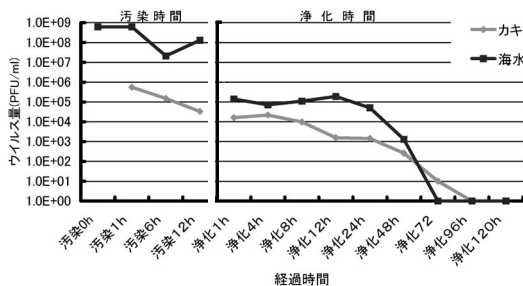


図3 浄化試験におけるFCV F4の経時的変化

中ら³⁾が行ったポリオウイルスを用いた浄化試験では、取込を48時間で行った場合は浄化開始6時間で浄化され、2週間にわたり取込みを行った場合は、長時間カキ体内から浄化されなかったと報告されている。

今回のFCV F4を用いた方法では、一度の取込で浄化を行ったにも拘わらず、72時間以上の浄化時間を要した。これが、FCV F4の性質に由来する現象なのか、今後、さらに回数を重ねて検討する必要がある。

5 まとめ

今回の取込試験および浄化試験では、FCV F4がSRSVの代替ウイルスとして有用であることが明らかとなった。これらの試験は、最終的にSRSVの浄化を前提に実施しており、今後は本ウイルスを用いて取込状態の再現性、より養殖環境に近い条件を想定し、取込や浄化方法について検討を加え、SRSVの浄化に有用な方法を構築していきたいと考えている。

6 謝辞

本試験を行うにあたり、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 遠矢幸伸先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) 藤田満他: 食品衛生研究, 49 (4), 123 - 130, 1999
- 2) 永安聖二他: Rep.Pub.Hlth.kochi, 47, 41 - 45, 2001
- 3) 中正純他: 食品衛生研究, 50 (8), 97 - 103, 2000
- 4) S.Bidawid.et al: Journal of Virological Methods, 107, 163 - 167, 2003
- 5) Y.Yosida.et al: Ann.Rep.Tokyo.Metr.Res.Lab.P.H., 39, 49 - 53, 1988
- 6) 今井丈夫: 浅海完全養殖, . 85 - 189, 1981, 恒星社厚生閣, 東京
- 7) 西香南子他: 三重県保健環境研究部年報, 46 (3), 2001