

砂ろ過海水と電解海水を用いたカキ浄化試験

Oyster Purification test in Sand filtration sea water and Electrolysis sea water

山木 紀彦 植木 洋 伊藤 大介*¹
文谷 俊雄*² 菊地 奈穂子 後藤 郁男
沖村 容子 秋山 和夫

Norihiko YAMAKI, Yo UEKI, Daisuke ITO
Toshio BUNYA, Naoko KIKUTI, Ikuo GOTO
Yoko OKIMURA, Kazuo AKIYAMA

カキに一定濃度のFCV F4を頻回添加し、取込みウイルス量の推移を定量PCR法で確認した。さらに、FCV F4が取り込まれたカキを用いて、砂ろ過海水および電解海水によるウイルス除去について検討を行った。その結果、カキへのウイルス取込は、添加量とほぼ同じウイルス量 1.00×10^5 copies/g以上維持された。また、砂ろ過海水と電解海水での浄化試験では、浄化72時間後でも中腸腺からFCV F4が検出され、効果的なウイルス除去は認められなかった。

キーワード：ノロウイルス、ネコカリシウイルス、浄化試験、砂ろ過海水、電解海水

Keywords : *Norovirus* ; *Feline calicivirus F4* ; purification test ; sand filtration sea water ; electrolysis sea water

1 はじめに

宮城県では、食中毒原因物質^{1)~3)}の1つであるノロウイルス (*Norovirus*:NV) のカキからの浄化を検討しており、これまで、NVの代替ウイルスとしてネコカリシウイルス (*Feline calicivirus F4*:FCV F4) を用いて、海中での挙動とカキへの取込試験ならびに砂ろ過海水による浄化試験を行った⁴⁾。その結果、FCV F4は砂ろ過海水中で120時間にわたり検出された。また、カキ体内に1時間で取り込まれることが確認された。さらに、FCV F4をカキに1回添加し、取込を行い浄化した場合、カキからウイルスを除去するためには72時間以上の浄化時間を要した。

冬季は、NVによる感染性胃腸炎の流行が多く確認される。患者から排泄されたNVは、下水処理場を経て、河川等に放流される。カキのNVによる汚染経路は胃腸炎患者～下水処理場～河川～カキと推定されており、NVによる胃腸炎患者が流行する冬季においては、養殖カキがNVに暴露される機会が多い。このことを考慮し、今回の取込試験は、一定濃度のウイルス量を頻回添加し実施した。また、浄化試験においては、県が定めている「生かきの取扱いに関する指導指針」に基づき、砂ろ過海水および砂ろ過海水を海水電解装置に通過させた海水（以下、電

解海水）を用いて検討したので報告する。

2 材 料

2.1 供試ウイルス

定量PCR法で測定し、 8.10×10^8 copies/mlのFCV F4を用いた。

2.2 カキおよび海水

宮城県内のA湾で2年間養殖され、泥や付着物を除去したカキ (*Crassostrea gigas*) を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、カキの飼育、FCV F4取込および浄化試験にはFCV F4汚染のないことを確認した砂ろ過海水を使用した。

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

FCV F4の取込を2004年3月15日から20日まで5日間実施した。砂ろ過海水180Lが入った水槽に 3.00×10^{11} 個の植物プランクトン (*Chaetoceros gracilis*: Cg) とウイルス培養液500ml (FCV F4 8.10×10^8 copies/ml) を添加し、1時間後にカキ152個体を入れた。その後、48時間毎に同じ条件でCgとFCV F4を添加した水槽にカキを移動し、計120時間取込みを行った。なお、水温は、養殖カ

* 1 宮城県栽培漁業センター

* 2 宮城県産業経済部漁場漁港課

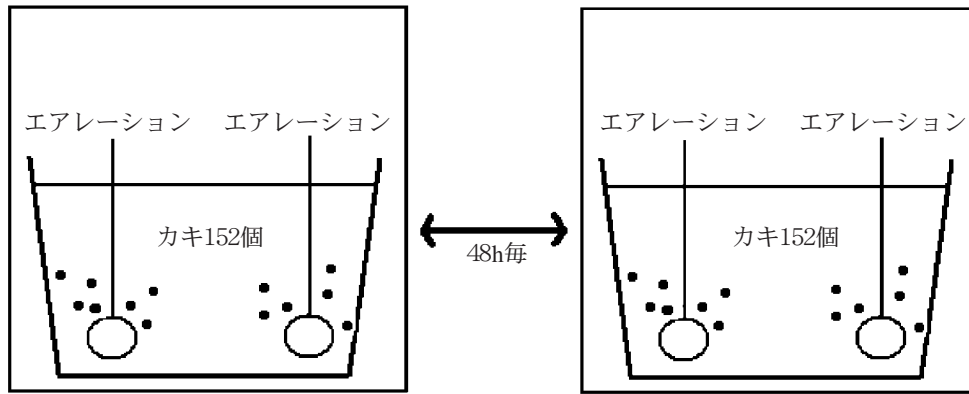


図1 取込試験

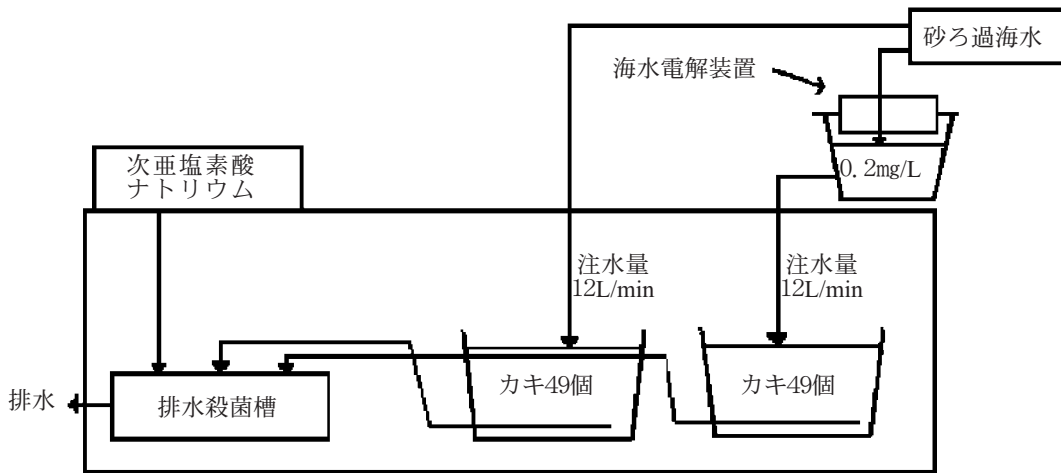


図2 浄化試験

キからNVの検出率が高くなる1月の海水温⁵⁾を想定し10℃に維持し、エアレーションを行い実施した。

検体は経時的(0, 1, 24, 48, 72, 96, 120時間後)に海水1Lとカキ8個体を採取した。

3.2 浄化試験

浄化試験は2004年3月20日から23日までの3日間実施した。

浄化は、180Lの砂ろ過海水および電解海水の水槽に取込試験を行ったカキを49個ずつ水槽に移し開始した。浄化の条件として、流量は、中ら⁶⁾が行ったポリオウイルスの浄化試験を参考に毎分12Lに設定し、水温は10℃に保ちエアレーションを行った。電解海水は、県が定めている「生食用かきの衛生処理指導基準」に基づき、残留塩素濃度0.2mg/Lに調整し使用した。浄化の確認は、経時的(1, 6, 24, 48, 72時間後)にカキ8個体を採取し、それぞれの検体からFCV F4を定量した。

3.3 ウイルス濃縮法

海水はPolyethylene Glycolを最終濃度10%に加え、4℃1晩攪拌後10,000rpm30分間遠心し、沈渣をDW500μlで再浮遊し検体とした。また、カキは個々に中腸腺を取り出し、3.2φのステンレスビーズ入りの5mlチューブに入れ4,500rpm60秒間破碎後、10,000rpm10分間遠心し、上

清140μlを検体とした。

3.4 ウイルス定量法

濃縮検体140μlをQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)によりウイルスRNAを抽出しDNase処理後、逆転写反応を行いcDNAを作成した後、影山ら⁷⁾の方法で定量PCRを実施した。

primerとprobeは、forward primer 5'-AGG CGT TAG CGA CGC AAT C-3', reverse primer 5'-CAA CAC TCG GAC TGT CCA TGT T-3'およびprobe 5'-(FAM)-CAA ACC ACC AGT ATG GCC CAA TTC AAG TT-(TAMURA)-3'でFCV F4株 (accession No.D31836)の全塩基配列をもとにPrimer Express (ABI)で設計した。

定量PCR条件は、50℃ 2分間と95℃ 10分間行い、95℃ 15秒間と57℃ 1分間を40サイクル行った。定量PCR反応は、96-well optical reaction plates (Applied Biosystems)で実施した。検量線は、コピー数既知(1.00×10¹⁰copies/μl)のFCV F4遺伝子の10倍階段希釈系列を作成し用いた。

4 結果及び考察

4.1 取込試験

経時的に採取した海水およびカキのFCV F4の定量結

果を図3に示した。海水は、1時間後 8.10×10^8 copies/ml、24時間後 4.50×10^8 copies/ml、48時間後で 1.07×10^8 copies/ml、72時間後に 4.54×10^7 copies/mlと緩やかに減少し、その後は96時間で 7.97×10^7 copies/ml、120時間で 8.74×10^7 copies/mlとほぼ同じウイルス量で推移した。

中腸腺での経時的取込量は、設定時間ごとに採取した8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 8.37×10^3 copies/g、24時間後 2.11×10^5 copies/g、48時間後 4.42×10^5 copies/g、72時間後には 3.39×10^6 copies/gと増加し、96時間で 3.14×10^5 copies/gと一度減少し、その後120時間では 1.68×10^6 copies/gまで増加した。

今回の取込試験は、前回の試験⁴⁾において、ウイルス培養液2.4Lを1回添加した場合、取込開始120時間後に1/10,000程度に減少したことを考慮して実施した。通常、カキは、養殖海域でNVによる単一暴露は考えられず、冬期に常にウイルスの汚染を受け、カキ体内にウイルスが常在している可能性が高いことから、一定濃度のウイルス量で頻回取り込ませた。また、海水中にウイルス粒子が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示唆されていること⁸⁾⁹⁾から、植物プランクトンの添加量を 1.80×10^7 個から 3.00×10^{11} 個に増やして行った。その結果、FCV F4は、海水中で長時間にわたり、ウイルス添加量とほぼ同じウイルス量を維持し、かつ、カキ中腸腺では、取込開始24時間以降、 10^6 copies/g以上で推移することが明らかになった。

4.2 浄化試験

浄化試験の結果について図4に示した。カキのウイルス量については、中腸腺5個の平均値で示した。

中ら⁶⁾が行った浄化試験によると、カキによるポリオウイルスの取込を14日間7回頻回投与した場合は、浄化開始24時間まで急激に浄化されたが、その後は、長時間カキ体内から浄化されなかったとの報告がある。そこで、FVC F4を5日間3回頻回添加した後、カキの浄化試験を実施した。

砂ろ過海水を用いた浄化におけるカキ中腸腺のウイルス量は、浄化開始1時間後 4.61×10^5 copies/g、6時間後 2.02×10^5 copies/g、24時間後 5.59×10^5 copies/gと

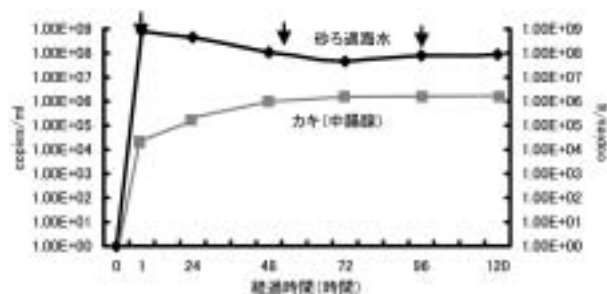


図3 取込試験におけるFCV F4の経時的変化

10^5 copies/gで推移した。浄化48時間後 9.86×10^3 copies/g、72時間後 4.11×10^3 copies/gと減少した。

次いで、電解海水でのカキ中腸腺におけるウイルス量は、浄化開始1時間後 2.63×10^5 copies/g、6時間後 2.80×10^5 copies/gと24時間後 1.53×10^5 copies/gまで 10^5 copies/gで推移し、浄化48時間後に 6.96×10^3 copies/g、72時間後 2.31×10^3 copies/gと減少した。

今回、カキから細菌を浄化することを目的とした「生かきの取扱いに関する指導指針」に基づき電解海水と砂ろ過海水を用いてウイルスの浄化を試みた結果、両浄化方法ともにウイルス量は同一のパターンを示し、0時間から72時間後には約1/100程度まで減少したが、完全に除去できなかった。このことは、砂ろ過海水のみを使用した場合と大きな差はなく、電解海水がウイルス浄化に対してはほとんど効果がないことを示唆していた。また、カキの消化器系は、胃と腸で行う細胞外消化、消化盲嚢部が主体となる細胞内消化、変形細胞による消化があるが⁸⁾、0.2mg/Lの電解海水がカキの消化および排泄に影響を及ぼしていないと考えられた。

今後、NVの海水中での状態を考慮して、今回よりも低濃度FCV F4量の頻回添加でカキへの取込を行い、再現性を確認したうえで浄化方法を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、ウイルスを頻回添加することにより、カキ中腸腺に長時間同じウイルス量が維持されることが明らかとなった。また、砂ろ過海水による浄化法と電解海水による浄化法では、カキ体内のウイルス浄化が困難であることが判明した。これらの試験は、最終的にNV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、浄化方法について検討を加え、NV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。

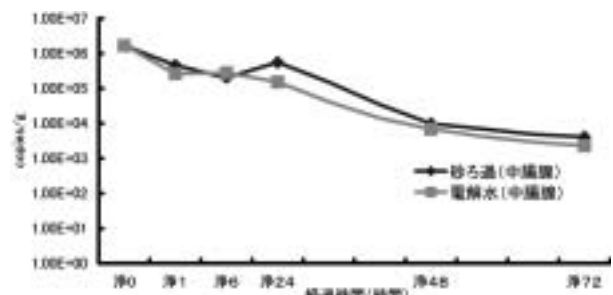


図4 浄化試験におけるFCV F4の経時的変化

参 考 文 献

- 1) 永安聖二, 千屋誠造, 小松照子, 上岡英和, 崎本祥仁, 安倍淳介, 堀見雄三, 橋本節夫, 井上泰夫: *Rep.Pub.Hlth.kochi*, **47**, 41 (2001).
- 2) 西 香南子, 杉山 明, 中山 治: 三重県保健環境研究部年報, **46**, 65 (2001).
- 3) 藤田 満, 小川恭正, 寺村 渉: 食品衛生研究, **49**, 123 (1999).
- 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: 宮城県保健環境センター年報, **21**, 63 (2003).
- 5) 秋山和夫, 野池道子, 佐々木美江, 山口友美, 有田富和, 後藤郁男, 佐藤千鶴子, 畠山 敬, 沖村容子, 斎藤紀行, 白石廣行: 宮城県保健環境センター年報, **18**, 49 (2000).
- 6) 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: 食品衛生研究, **50**, 97 (2000).
- 7) T.Kageyama, S.Kojima, M.Shinohara, K.Uchida, S.Fukushi, F.B.Hoshino, N.Takeda, K.Katayama: *Journal of Clinical Microbiology*, **41**, 1548 (2003).
- 8) 今井丈夫: “浅海完全養殖”, p.85(1981), (恒星社厚生閣).
- 9) Y.Yosida, K.Kazuyosi, K.Yabuuchi: *Ann.Rep. Tokyo.Metr.Res.Lab.P.H.*, **39**, 49 (1988).