



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ネコカリシウイルス（FCV）を代替えとしたカキのノロウイルス浄化法に関する研究
Author(s)	笠井, 久会; 稲垣, 奈都子; 吉水, 守
Citation	Top food techno focus, 10, 1-10
Issue Date	2006
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39503
Type	journal article
File Information	yoshimizu-238.pdf



ネコカリシウイルス(FCV)を代替えとした カキのノロウイルス浄化法に関する研究

笠井 久 会・稲垣 奈都子・吉 水 守*

Elimination of Norovirus (NV) from Oyster Survival of Feline Calicivirus (FCV), a NV Surrogate, in Marine Environments and Under Inactivating Conditions

結 言

ノロウイルス食中毒は、周年を通して発生が報告されているが、カキに起因するものは12月から2月がピークになる傾向がある。ノロウイルスはヒトの腸管でのみ増殖するウイルスであり、カキには感染しない。すなわち、ノロウイルスを保有していてもカキは影響を受けない。ノロウイルス感染者から排泄された糞便もしくは嘔吐物は下水処理場に至るが、ウイルスの一部は下水処理をかいぐり、河川に排出される。そのまま海へ流出したウイルスは、ろ過食性であるカキなどの二枚貝の中腸腺に生物濃縮される¹⁾。このノロウイルスを有する、いわゆる“汚染カキ”をヒトが生のままあるいは加熱不十分のまま食すると、ウイルスはヒトの消化管に戻り、感染を引き起こす。ウイルスの感染経路は、大きく分けて経口感染と飛沫感染に分けられ、具体的にはカキなどの二枚貝の生ないし加熱処理不十分での摂食、ノロウイルス感染者を介する汚染食品の摂食および患者ないし健康感染者の糞便・吐物からの二次感染が挙げられる。カキのノロウイルス汚染および浄化の現状に関しては室賀・高橋の総説²⁾に詳述されている。

ノロウイルスは1968年、米国オハイオ州のNorwalk市の小学校で発生した集団胃腸炎の患者から見出され、土地の名を冠してノーウォークウイルスと呼ばれている。1972年に電顕下でその形態が明らかになり小型球形ウイルス(SRSV)と称されたが³⁾、2002年に国際ウイルス学会でノロウイルスという正式名称が決定し、日本でも2003年8月、食品衛生法の改正でSRSVからノロウイルスに変更された⁴⁾。

ノロウイルスはカリシウイルス科のベシウイルス属に属し、直径27～40 nm、正十二面体構造で、7.5～7.7 kbの1本鎖(+) RNAを持つウイルスである。現在、抗ウイルス薬はなく治療は困難であり、感染者の体内のウイルスは便中に2週間ほど排泄され続ける。ノロウイルスは人工的に培養できないために、今回、代替ウイルスとして、培養が可能な同科のネコカリシウイルス(FCV F-23株)を用いることにした。カリシウイルス科ベシウイルス属のFCVは、ノロウイルスと生化学的な性状が類似し、主要な塩基配列やゲノム構

* 北海道大学大学院水産科学研究院 海洋生物防疫学研究室 教授

成も類似しているにもかかわらず、ノロウイルスと異なり培養細胞での培養が容易である。

カキのノロウイルス食中毒が主に冬場に発生することから⁵⁾、以下の各要因を本研究の仮説として設定した。1) 夏季は患者の発生がないために、環境へのウイルス放出が少なくなり、食物連鎖が成立しなくなる。2) 水温が上昇し、カキの消化活性が上昇して、ウイルスが消化あるいは排出される。3) カキの消化管内に存在する細菌が産生する物質により、ウイルスが不活化される。4) 水温の上昇により環境中のウイルスの安定性が低下し、夏季には検出されなくなる。2)～4)の検証のため、およびカキの浄化施設で使用する清浄海水を確保するために、まずFCVの紫外線感受性および電解水感受性について検討し、次いでFCVに対するカキの消化酵素および消化管内細菌の影響について検討した。続いてFCVの温度安定性を検討し、さらにカキ殻を外すための高静圧水処理によるFCVの不活化効果について検討した。

1. カキ浄化用海水の確保

カキの大腸菌浄化に関しては、紫外線照射および次亜塩素酸の海水への添加により浄化用海水の確保が計られているが、ノロウイルスが不活化される条件については不明である。そこで、まずノロウイルス代替FCVの紫外線感受性について検討し、次いで海水およびNaCl溶液の電気分解により生成する次亜塩素酸によるFCVの不活化効果について検討した。

1-1 ネコカリシウイルスの紫外線感受性

紫外線ランプには市販の殺菌灯(ナショナルGL-15)を使用し、照射量は紫外線強度計(井内盛栄堂UVR-400GL)による照度の実測値と照射時間から計算した。ウイルス液を径90mmのプラスチックシャーレに約0.5mLとり、均一に広げた後、低圧紫外線ランプを用いて所定時間紫外線照射を行い、ウイルス感染価を測定した。FCVの紫外線感受性を図-1に示した。FCVは $1.0 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ の紫外線照射でも一桁の感染価減少

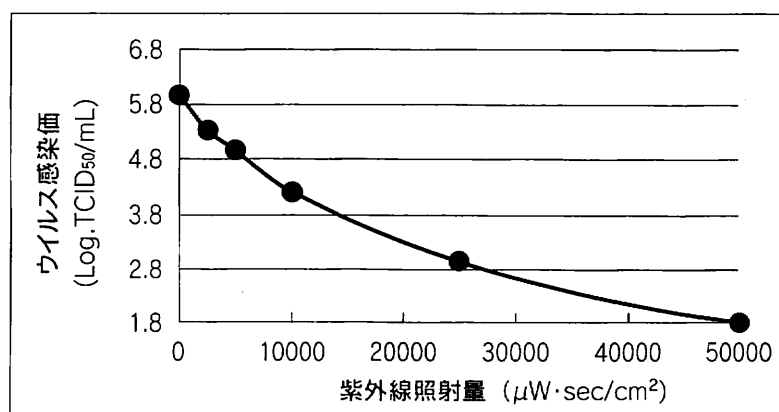


図-1 紫外線照射後のFCVのウイルス感染価の消長

を示したに過ぎなかった。吉水・笠井⁵⁾の衛生細菌、魚類病原ウイルスと比較すると紫外線感受性が低く、紫外線殺菌には高性能中圧ランプが必要であることが明らかとなった。

1-2 ネコカリシウイルスの電解水感受性

1 Lの海水もしくは3% NaCl溶液にFCV培養液を1 mL添加し、所定の塩素濃度になるまで電気分解し、1、2.5および5分後に9倍量の培地を加え塩素の作用を止め、ウイルス感染価を測定した。図-2に見られるように、3% NaCl溶液の場合、FCVは0.23 mg/Lの残留塩素を含む電解水で1分間処理することにより、感染価は二桁以上減少し分離されなくなった。海水の場合は、残留塩素濃度0.41 mg/Lでほぼ検出限界以下となった(図-3)。FCVの電解水感受性は魚類病原ウイルスと比較すると高く、3%食塩水中では0.23 mg/L、海水中では0.3 ~ 0.4 mg/Lの塩素濃度で十分不活化が可能となり、ウイルスを不活化した電解水中でカキの生理活性を保持したまま飼育ができる結果となった。なお、カキは0.3 mg/Lの残留塩素を含む電解海水中でも、接餌および外套膜の動きは正常であった。

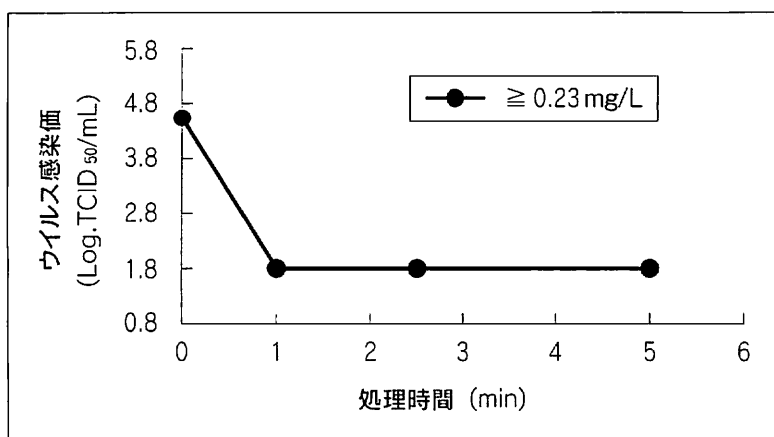


図-2 FCVを添加した3% NaCl溶液を電気分解した場合のウイルス感染価の消長

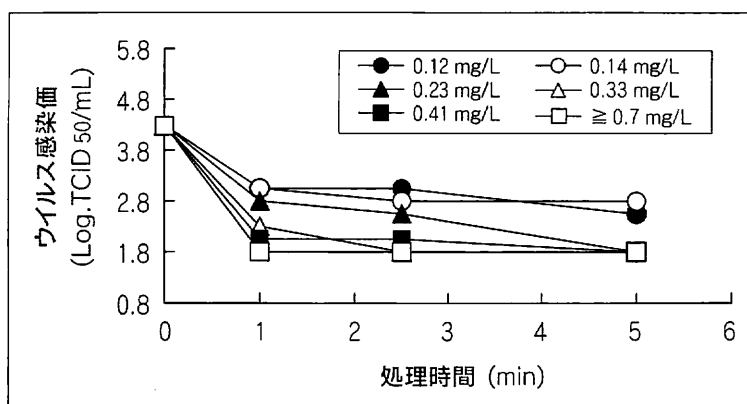


図-3 FCVを添加した海水を電気分解した場合のウイルス感染価の消長

2. ノロウイルスに対するカキ消化酵素および消化管内細菌の影響

夏場に、ノロウイルスによる食中毒の発生が減少することから、水温が上昇し、カキの消化活性が上昇してウイルスが消化あるいは排出されるか、もしくはカキの腸内細菌が産生する物質により、ウイルスが不活化される現象があるのかどうか、イガイおよびカキを使用して試験を行った。

試験 I

函館湾内で採取したイガイの軟体部に等量のPBSを加え、ホモジナイズした液（未ろ過）および0.45 μm ミリポア HA フィルターろ過した液（ろ過）900 μL に、この場合は、ノロウイルス代替として形態が類似する魚類ノダウイルス BF-NNV 液100 μL を添加し、10℃および20℃で48時間保持した。未ろ過の試料は HA ろ過し、ろ過済み試料はろ過せずに感染価を測定した。ろ過したホモジナイズ液中では安定であったが、未ろ過液（細菌を含む）中では不安定であり、この結果はイガイの消化酵素よりも、消化管に存在する細菌、主として腸内細菌がウイルスの不活化に関与している可能性が示唆された（図-4）。

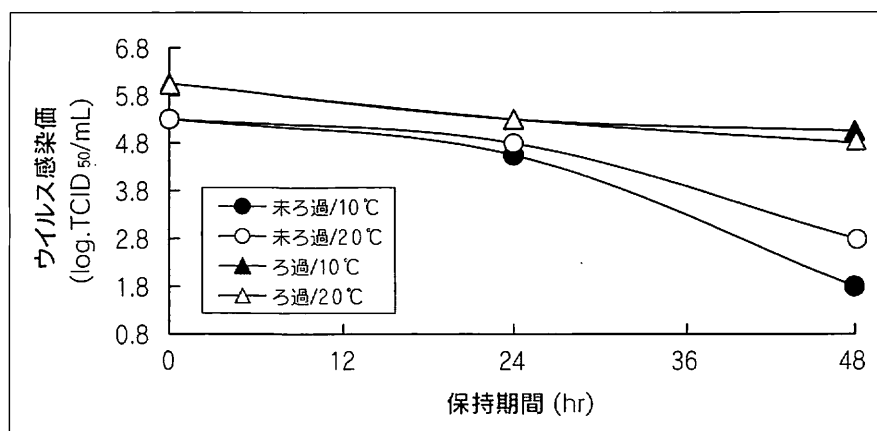


図-4 イガイホモジナイズ液中において各温度（10℃および20℃）で保持した場合のBF-NNVの安定性（感染価の消長）

試験 II

広島湾奥の海岸に吊したカキの中腸腺に等量のPBSを加え、ホモジナイズした液（図では“未ろ過”）180 μL および14,000 rpm・20分間遠心分離し得られた上清（図では“上清”）180 μL に、FCV 液を20 μL 添加し、20℃で48時間保持した後に、ろ過せずに感染価を測定した。この場合、個体別に5検体について検討した。供試した5個体中3個体のホモジナイズ液（未ろ過）において、FCV の感染価が二桁減少した（図-5）。同一ロットのカキでも個体により差が認められた。ろ過したホモジナイズ液では未ろ過のものほど感染価の減少が見られないために、このFCVの不活化には細菌が関与していると考えられた。

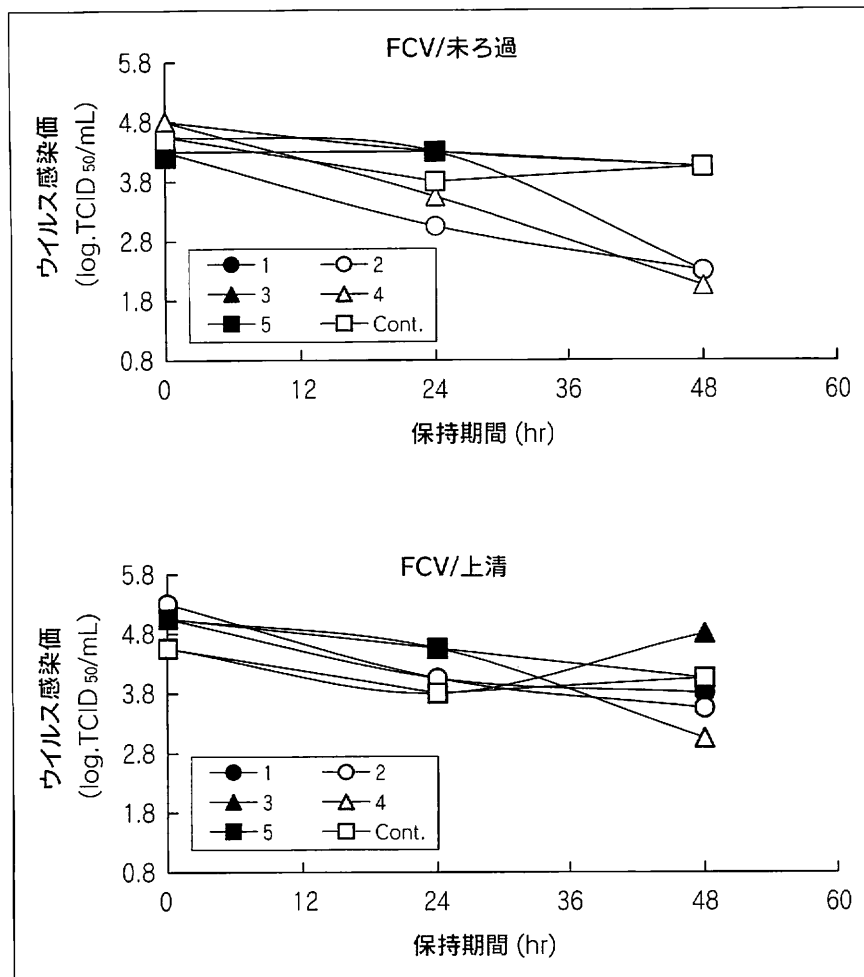


図-5 カキホモジナイズ液中で20℃にて保持した場合のFCVの安定性(感染価の消長)

試験 III

実験IIでカキの消化盲嚢とFCVを混合したところ、5検体中3検体でFCVの感染力価が減少した。これは、中腸腺を含むカキ消化管にFCVを不活化する物質が存在するか、あるいはFCVを不活化する物質を産生する細胞が存在する可能性があると考えられる。そこで、カキ消化管から抗FCV活性を有する細菌を探索し、得られた抗ウイルス活性物質産生細菌を対象に、抗ウイルス活性を検討した。

広島湾奥の海岸に吊るしたカキ10個体の消化管ホモジナイズ液から、2004年7月21日に204菌株を、8月6日に106株を釣菌し、M-CYG培地に接種して20℃で48時間振とう培養を行った。得られた培養ろ液(HA濾過)と3.0 Log.TCID₅₀/wellのFCVを48wellマイクロタイタープレートに、50 µlずつ1:1の割合で混合し20℃で3時間反応させた。陰性対照区にはMEM₀を、陽性対照区にはウイルス液を用いた。CRFK細胞に接種後、37℃で72時間培養し、抗FCV活性の有無を観察した。抗ウイルス活性の測定は1.0から^{6.0}log.TCID₅₀/wellまで段階希釈したFCVをどこまで不活化できるかで評価した。

カキの中腸線から分離した供試株計310菌株を用いて行った抗FCV活性のスクリーニ

ング結果を表－1に示した。表－1に見られるように、抗FCV活性を示した細菌は、7月分離株204菌株中に1株（0.49%）、8月分離株106菌株中に3株2.83%見いだされた。FCVに対する抗ウイルス活性は、No.176が5.75、No.52、58、63が3.0Log.TCID₅₀/wellのウイルスを不活化した。カキ消化管内容物由来細菌の0.5～2.8%に抗FCV活性を有する細菌が見いだされ、これらの株の培養液50μlが5.75log.TCID₅₀ものウイルスを不活化したことから、カキの消化管内でのFCVの不活化はこれら細菌による可能性が示唆された。なお、No.176株は*gap* 遺伝子の塩基配列より *Vibrio neptunis* と推定されたが、本菌は海洋から分離される *Vibrio* 属細菌でヒトへの病原性は報告されていない。また、産生している抗ウイルス物質の分子量は3,000以上5,000以下の易熱性の物質であった。

表－1 抗FCV活性を有するカキ消化管ホモジナイズ液由来細菌の検索結果

分離日	抗ウイルス活性vs FCV (Log.TCID ₅₀ /well)	陽性菌株数 (%)	〈菌株番号〉
2004年7月21日	5.75	1/204 (0.49%)	〈No.176〉
2004年8月6日	3.00	3/106 (2.83%)	〈No.52・58・63〉

3. ネコカリシウイルスの温度安定性および海水中での安定性

ノロウイルスによる食中毒が主に冬季間に発生することから、代替FCVの温度安定性をウイルス培養液および海水を用いて検討した。ノロウイルスの代替としてFCVを用い、血清を含まない細胞およびウイルス培養液MEM₀で希釈したFCV液を5、10、20および37℃の各温度で保持し、感染価の消長を観察した。また、海水および海水中的細菌を除去したろ過海水にFCV液を添加し、5、10および20℃の各温度で保持し、感染価の消長を観察した。

ウイルス培養液および海水中でのFCVの感染価の変化を図－6および7に示した。FCVもノロウイルス同様、37℃前後で増殖するウイルスであるにもかかわらず、37℃では不安定であり、20℃を下回る温度から安定性が増し、10℃、5℃と温度が低くなるにつれ長く生存した。特に10℃以下では、海水中で20日間も安定であった。

このことは、ノロウイルスによる食中毒が夏場に少なく、冬季間に多く見られる要因の一つと推察される。

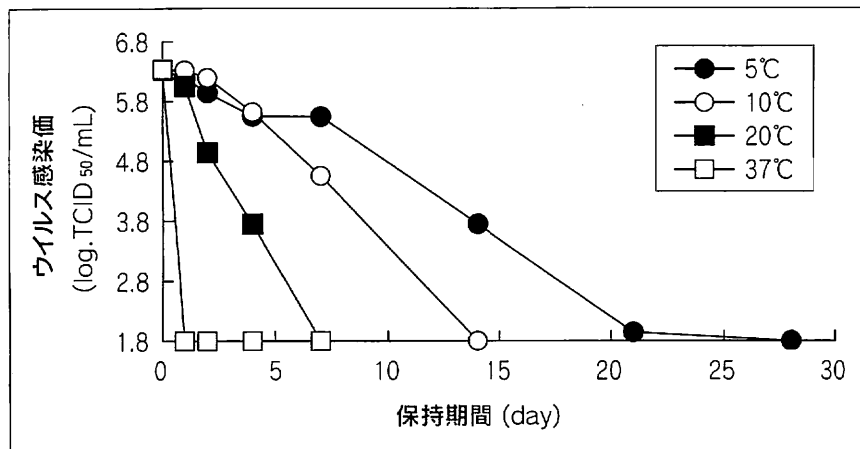


図-6 各温度 (5、10、20、37℃) で保持した場合のFCVの安定性 (感染価の消長)

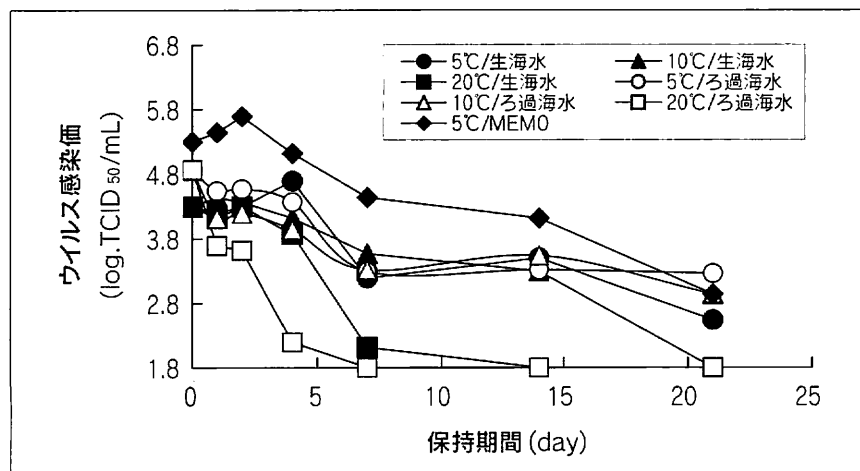


図-7 各温度 (5、10、20℃) の海水中で保持した場合のFCVの安定性 (感染価の消長)

4. 高静水圧処理によるウイルスの不活化

カキ殻を剥くのに 40℃・80 MPa・5 分間の高圧処理をする技術が開発され、実用化されている。高圧下では細菌およびウイルスが不活化されるとの報告があることから、本条件で FCV が不活化されるかどうか検討した。

FCV 培養液をストマッカー用ポリ袋に封入し、加圧装置に入れ、40℃で80 MPa、200 MPa、300 MPa、400 MPa で5 分間処理し、減圧・冷却後、ウイルス感染価を測定した。40℃・80 MPa・5 分間の処理で、FCV の感染価は約 1 桁減少し、200 MPa で99.99%以上不活化された (図-8)。本装置でFCVを完全に不活化するとすれば40℃・300 MPa・5 分間の処理が必要となった。FCV を 40℃・80 MPa・5 分間処理した時の FCV の感染価を実数値で表示すると図-9 のようになり、40℃・80 MPa・5 分間の高静水圧処理で、FCV の感染粒子が百万感染粒子単位で不活化でき、カキの浄化に有効な手段と考えられた。

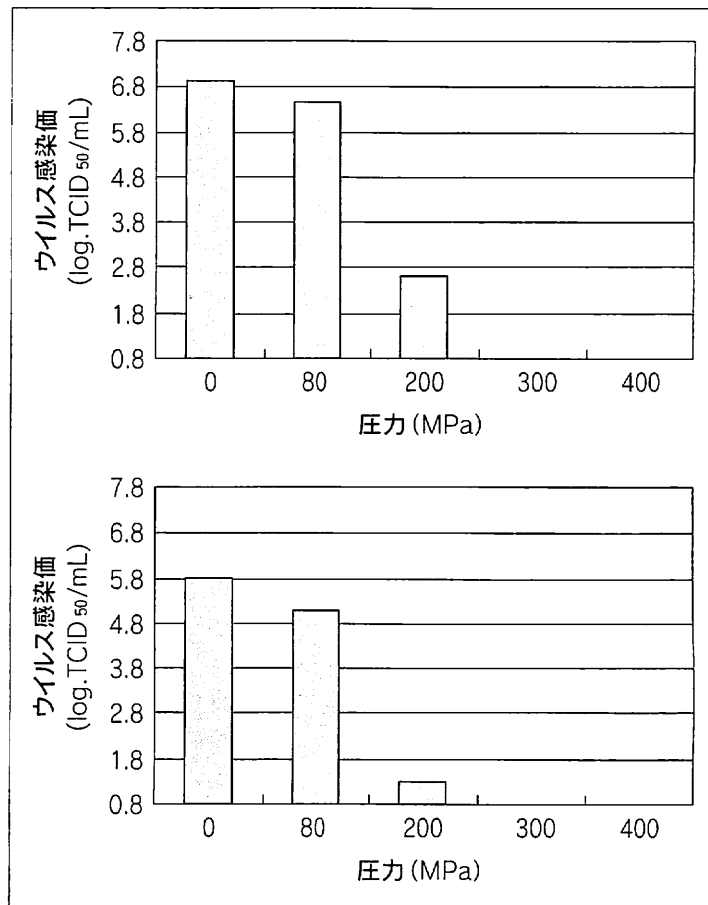


図-8 40℃・高静水圧下・5分間処理におけるFCVの感染価の変化

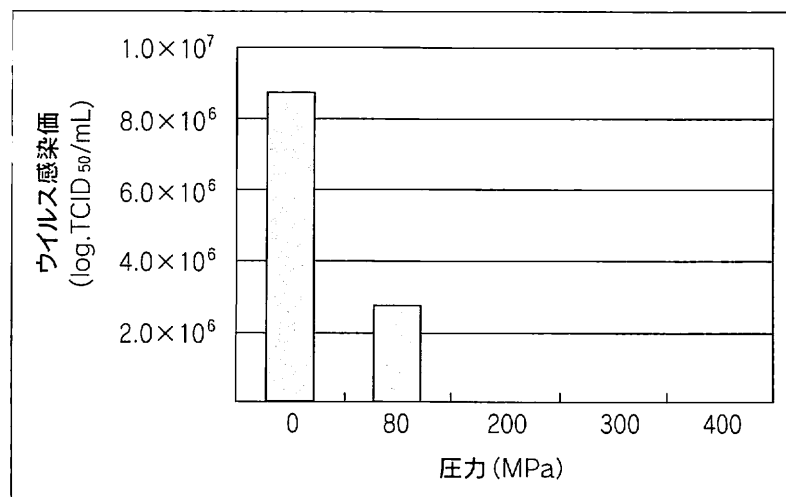


図-9 実数値で見た40℃・80MPa・5分間処理によるFCV感染価の減少

次いでカキの殻剥機に上記同様封入したFCV培養液を入れ、40℃・80MPa・5分間処理した時のFCVの感染価を表-2に示した。この場合、FCVは40℃・5分の加熱により約1桁減少し、加圧によりさらに約1桁減少した。

表-2 実用機でウイルス液を加圧した場合の感染価の変動

試験区	ウイルス感染価 (Log.TCID ₅₀ /mL)
対照区 (0℃)	8.5
加温区 (40℃, 5 min)	6.7
加圧区 (40℃, 80 Mpa, 5 min)	5.8

考 察

ノロウイルスはカリシウイルス科ノロウイルス属のウイルスで、ヒトの腸管上皮で増える。しかし、未だ培養細胞を用いて増やすことができず、その存在は本ウイルス特異遺伝子を検出して確かめるしか術がない。ノロウイルスの不活化条件を検討するに際し、培養可能な代替ウイルスの検索と代替ウイルスを用いた不活化法の検討を行ってきた。魚類ウイルスを検討したが、よりノロウイルスに近いネコカリシウイルス (FCV) を用い、カキの消化管に取り込まれたウイルスを想定した不活化法の検討を行った。

まず、大腸菌を指標としたカキの浄化に関しては、紫外線殺菌装置および次亜塩素酸の海水への添加による浄化用水の確保が計られているが、ノロウイルスが不活化される条件については不明である。今回、FCVの紫外線感受性について検討したところ、FCVは $1.0 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ の紫外線照射でも一桁の感染価減少を示すに過ぎず、既報の衛生細菌等と比較すると紫外線感受性が低い部類に属すウイルスであった。一方、FCVの電解水感受性を検討したところ、FCVは食塩電解水 (3% NaCl) 中で0.23 mg/L、海水電解水中では0.3~0.4 mg/Lの塩素濃度で不活化され、この濃度はカキの生理活性を保持したままウイルス不活化水で飼育ができることを示し、ノロウイルスの浄化に電解水が有効であることが示された。

次いで、カキのノロウイルス食中毒が主に冬場に発生することから、本研究の仮説として設定した各要因について検証した。FCVに対するカキの消化酵素および消化管内細菌の影響を、カキの中腸腺ホモジナイズ液および遠心上清にFCV液を添加し、10および20℃で2日間保持して感染価の変化を測定したところ、5個体中3個体のホモジナイズ液においてFCVの感染価が2桁減少した。濾過除菌液では感染価の減少は見られなかった。このことはウイルスの不活化に細菌が関与していることを示唆している。実際にカキの消化管から細菌を分離し、抗FCV活性を有する細菌の検索を行ったところ、310菌株中に

4株見いだされ、FCVに対する抗ウイルス活性は、1株が 5.75 、3株が $3.00\text{Log.TCID}_{50}/\text{well}$ のウイルスを不活化した。このように、カキ消化管内容物由来細菌の $0.5 \sim 2.8\%$ に抗FCV活性を有する細菌が見いだされ、これらの株の培養液がFCVを不活化したことから、カキの消化管内でのFCVの不活化はこれら細菌による可能性が示唆された。さらにFCVを 5 、 10 、 20 および 37°C の各温度に保持し感染価の消長を観察したところ、温度が低くなるにつれFCVは安定となった。これらの結果は夏季に海水温が上昇すればFCVは不安定となり速やかに不活化される可能性が示唆された。

現在、カキ殻を剥くために $40^{\circ}\text{C} \cdot 80\text{MPa} \cdot 5$ 分間の高圧処理をする技術が開発され実用化されている。そこでこの条件下でFCVが不活化されるかどうかを検討したところ、FCVの数百万感染粒子が不活化され、初発の感染粒子数を下げても同様に不活化され、カキの浄化に有効な手段と考えられた。

以上の結果は、ノロウイルスと同属の培養可能なFCVを用いて得られたものであり、ノロウイルスにそのまま適応することは出来ないものの、ノロウイルスも同様の挙動をとると考えると、カキのノロウイルス対策を考える上で参考になる知見であると考え。今後は、本条件がノロウイルスに有効かどうかの評価系を確立する必要がある。

引用文献

- 1) Guyader FL, L Haugarreau, L Miossec, E Dubois and M Pommepuy (2000) : three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 3241-3248.
- 2) 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.
- 3) Kapikian AZ, RG Wyatt, R Dolin, TS Thornhill, AR Kalica and RM Chanock (1972) : Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 10 : 1075-1081.
- 4) 入谷展弘、勢戸祥介 (2003) : ノロウイルス感染症. 生活衛生 47 : 344-349.
- 5) Nishida T, H Kimura, M Saitoh, M Shinohara, M Kato, S Fukuda, T Munemura, T Mikami, A Kawamoto, M Akiyama, Y Kato, K Nishi, K Kozawa and O Nishio (2003) : Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 : 5782-5786.
- 6) 吉水 守・笠井久会 (2002) : 種苗生産施設における用水及び排水の殺菌. 工業用水 523 : 13-26.
- 7) 吉水 守・笠井久会・室越 章 (2005) : カキのノロウイルス浄化法に関する研究—培養可能なネコカリシウイルス(FCV)を代替えとして—. カキ研究所ニュース No. 16 : 14-21.

E-mail : yosimizu@fish.hokudai.ac.jp

目次

CONTENTS

ネコカリシウイルス (FCV) を代替えとしたカキのノロウイルス浄化法に関する研究

北海道大学大学院水産科学研究院 海洋生物防疫学研究室

笠井 久会、稲垣奈都子、吉水 守 ……01~10

Norovirus (NV) はヒトの腸管上皮で増殖するウイルスであり、近年糞口感染が問題となっている。しかし、二枚貝、特にカキがウイルスを濃縮し食中毒を引き起こすことから、水産分野でもその対策が急がれている。カキの NV 浄化法の確立を目的として、培養できない NV の代替に、同じ科に属する feline calicivirus (FCV) を用い、環境水中およびカキ消化管中での生存性、紫外線、電解処理および高静圧処理による不活化効果について検討した。FCV の感染価は保持温度が高いほど速やかに減少したが、10℃以下では検出限界以下となるのに2~3週間を要した。さらにカキ消化管中でも感染価は速やかに減少し、抗FCV活性を有する細菌も分離され、消化管内細菌の影響が示唆された。しかし、FCVを99.9%以上不活化するには $2.5 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ の紫外線照射を要した。電解処理では、3% NaCl 溶液および海水でそれぞれ有効塩素濃度0.23および0.41mg/L・1分間の処理により感染価が99%以上減少し、ほぼ検出限界以下となった。高静圧処理では、カキの殻を外す条件である80 MPa・40℃・5分間の処理で、FCVの感染価が1~2桁減少した。以上の結果から、カキの NV 浄化には電解海水を用い、水温を20℃程度とし、高静圧処理を組み合わせることが効果的であると考えられる。ただし、代替ウイルスによる試験であることから、今後は NV の感染性評価系の確立が急務と考える。

Elimination of Norovirus (NV) from Oyster Survival of Feline Calicivirus (FCV), a NV Surrogate, in Marine Environments and Under Inactivating Conditions

Laboratory of Marine-Biotechnology and Microbiology

Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University

Hisae Kasai, Natsuko Inagaki and Mamoru Yoshimizu ……01~10

Oysters (*Crassostrea gigas*) harvested from major culture areas are sometimes contaminated with norovirus (NV). Elimination of NV from oysters is needed to reduce losses for oyster traders and farmers because it causes gastroenteritis in humans by a fecal-oral route. However, there is little information on survival of NV in marine environments and under inactivating conditions because determination of infectivity of NV by cell culture methods is impossible. Nevertheless, cell propagation of feline calicivirus (FCV), a surrogate for NV, is possible. Thus, in the present study, survival of FCV in aquatic environments and virucidal effects of UV irradiation, hypochlorite produced by electrolysis of seawater and high hydrostatic pressure were examined. FCV infectivity decreased quickly with temperature increase in seawater. Above 20℃, for a period of 1 week, infectivity decreased to below detection limits. FCV was more unstable in non-treated seawater than in sterilized seawater. Furthermore FCV is unstable in intestinal contents of oyster. Therefore, FCV was inactivated by antiviral substances produced by intestinal bacteria. FCV was inactivated ($\geq 99.9\%$) by UV irradiation at doses of $2.5 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{s}/\text{cm}^2$. At the concentration of 0.23 and 0.41 mg/L of chlorine, produced by electrolysis of 3% NaCl solution and seawater reduced infectivity more than 99% in 1 min, respectively. Seawater electrolyzers have ability to treat large volumes of water and cost performance of this method is better than that of UV irradiation. Challenged with high hydrostatic pressure, FCV was almost completely inactivated at 200 MPa for 5 min. Oysters separated from their shells under a pressure of 80 MPa for 5 min at 40℃. Under these conditions, one to two-log. inactivation of FCV was observed. From these results, it is considered that electrolysis of seawater at 20℃ or above is a useful method for post harvest elimination of NV from oysters. High hydrostatic pressure is also effective for inactivation of NV.