

# イワガキのノロウイルス浄化方法に関する調査研究

【保健衛生室】

松本尚美

Investigative Research on the Elimination of Norovirus in Rock Oysters

Naomi MATSUMOTO

Abstract

We conducted tests on the contamination and purification of Noroviruses (NV) in rock oysters from Tottori prefecture. Tests resulted in the oysters not being fully contaminated, but even then it took 46 hours for the purification process. The results suggested that it was necessary to consider that the viral contamination of oysters depend on a number of factors such as seawater temperature, oxygen levels, pH and the number virus particles.

## 1 はじめに

NV は、カキ等で代表される 2 枚貝の消化管に存在し食中毒や感染性胃腸炎の原因となるウイルスである。

全国的にも、平成 17 年の NV による食中毒は 274 件発生し、患者数は 8,727 人であった。これは、食中毒全体の 32.3 % を占め患者数としては第 1 位である。

本県でも、平成 19 年 1 月には、給食センターで NV が原因とみられる食中毒が発生し 2 次感染も含め患者数が 1,000 人以上になった。

また、本県において県産イワガキはブランド化され出荷量は年々増加傾向にあり、NV が検出されるということは風評被害が懸念され経済面への影響も大きいと思われる。

このような背景から、当所では県栽培漁業センターと共同で平成 17 年度から安全・安心な県内産イワガキの供給を目的として NV の浄化方法について検討しているところである。

平成 17 年度は、NV と同じカリシウイルス科に属し培養可能なネコカリシウイルスを用い浄化試験を行ったところ、紫外線照射による浄化効果が示唆された。

平成 18 年度は実際に NV を用いて取り込み試験および紫外線による浄化試験を実施した。

## 2 材料

### 2-1 海水及びカキ

使用した海水は鳥取県中部海域で採水し、UV 照射 (50,000  $\mu$  W) したものをを用いた。イワガキも同海域から採取した。また、飼育期間中カキの活力を維持するため植物プランクトン (クロレラ、キートセロスグラシリス (以下「Cg」)) を給餌した。

### 2-2 ノロウイルス

ノロウイルスは培養出来ないため、鳥取県中部下水処理施設から下水原水を採水しそこに含まれる NV を用いた。

## 3 方法

取り込み試験及び浄化試験は鳥取県栽培漁業センター内において実施した。

### 3-1 取り込み及び浄化時間確認試験

#### (1) 取り込み時間確認試験

NV を含む下水原水 9 L にカキの飼料 (クロレラ  $1.0 \times 10^8$  cell/ml 110ml) を混合し、カキ 15 個体を入れた 200L 水槽に滴下した。水温は、冬季の海水温を想定し 16 に保ちエアレーションを行いながら 48 時間取り込みを実施した。

(図 1)

NV の取り込みの確認は、0,24,48 時間後に海水 10ml とカキ 3 個を採取し、NV を定量した。



図1 取り込み試験

## (2)浄化時間確認試験

(1) で用いたカキを UV 殺菌装置付きの滅菌海水 100L 水槽に移し、16 時間の浄化を行った。この時の UV 照射量は 50,000  $\mu$  W、海水循環のポンプ容量は 20L/分であった。また、(1) と同様に水温は 16 に保ちエアレーションも併行した。(図2)

浄化の確認は、4,8,16 時間後に海水 10ml とカキ 3 個を採取し、NV を定量した。



図2 浄化試験

## 3 - 2 取り込み及び浄化試験

### (1)取り込み試験

上述の 3 - 1 (1) に従って取り込み試験を実施した。

カキの飼料を Cg(  $1.0 \times 10^8$  cell/ml ) に変えて、9 L の下水原水に 112.5ml 加え 200L 海水水槽に滴下し、カキに 24 時間 NV を取り込ませた。

取り込みの確認は 24 時間後にカキを 3 個採取し NV を定量した。また、無給餌のカキを対照とした。

### (2)浄化試験

上述 3 - 1 (2) に従って浄化試験を実施した。

取り込み試験に用いたカキを 24 時間後に UV 殺菌装置付きの滅菌海水 100L 水槽に移し、46 時間の浄化を行った。

浄化の確認は、24,46 時間後にカキを 3 個採取し NV を定量した。

また、100L の通常海水のみの水槽にカキを 2 個ずつ入れて対照とした。

## 3 - 3 海水及びカキ中腸腺内のウイルス定量

海水は水槽から 50ml 採水し、このうち 10ml を 1 検体として用いた。ポリエチレングリコール 6,000 (以下「PEG」) を 8%、NaCl を 2.1g/100ml になるように加え、4 で 1 夜静置した。その後 10,000rpm で 20 分間遠心分離し沈渣を 200  $\mu$  l の DDW に懸濁させたものを RNA 抽出に用いた。

カキは中腸腺 1 個を 1 検体とした。摘出した中腸腺は碎切後 10% 懸濁液となるように PBS を加え、10,000rpm で 20 分間遠心分離後上清に海水と同様に PEG を加え、4 で 1 夜静置した。その後 10,000rpm で 20 分間遠心分離し沈渣を 200  $\mu$  l の DDW に懸濁させたものを RNA 抽出に用いた。

なお、海水及びカキのウイルス定量は、「ノロウイルスの検出法について」(平成 15 年 11 月 5 日付け厚生労働省課長通知) に基づき実施した。

## 4 結果

### 4 - 1 取り込み時間確認試験

NV を  $5.1 \times 10^6$  北<sup>°</sup>-/L 含む下水原水を加えた海水中の NV を 24,48 時間後に定量したところ全て陰

性であった。

次に、カキの NV 定量結果を図 3 に示した。24 時間後で 121.4 北<sup>°</sup>- (中腸腺 1g 当たり、以下同じ) 48 時間後は 24.6 北<sup>°</sup>-であった。

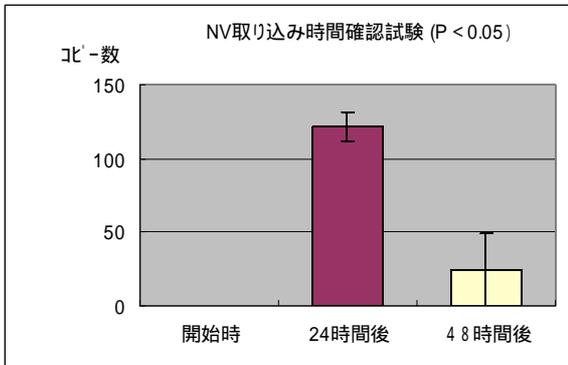


図 3 NV 取り込み時間確認試験

#### 4 - 2 浄化時間確認試験

前述の取り込み時間確認試験に続いて、浄化時間確認試験を行った。

浄化中のカキから排出された NV を確認するため 4,8,16 時間後の海水中 NV を定量したところ全て陰性であった。

次に、カキの NV 定量結果を図 4 に示した。4 時間後は 55.3 北<sup>°</sup>-、8 時間後は 210.3 北<sup>°</sup>-、16 時間後は 98.2 北<sup>°</sup>-であった。

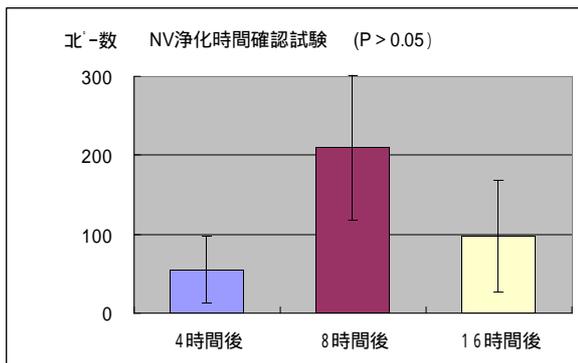


図 4 NV 浄化時間確認試験

#### 4 - 3 給餌条件による取り込み試験の比較 (図 5)

取り込み時間確認試験から、24 時間で NV がカキに取り込まれていたことが確認されたので 24 時

間の取り込み試験を行った。

また、ここでは給餌の有無によるカキの NV 取り込みの比較を試みた。

Cg ( $1.0 \times 10^8$  cell/ml) 112.5ml を下水原水 (NV  $1.0 \times 10^7$  北<sup>°</sup>-/L) 9L に混合した場合 (給餌あり) の 24 時間後のカキの中腸腺の NV は 2.3 北<sup>°</sup>-であった。また、下水原水のみを与えた場合 (無給餌) は 24 時間後のカキの NV は 10.8 北<sup>°</sup>-であり、給餌ありの場合よりも多くの NV を取り込んでいた。

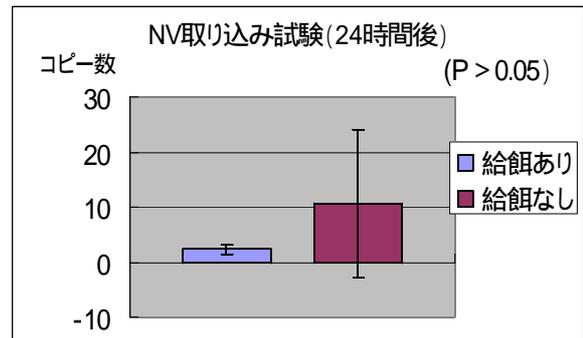


図 5 NV 取り込み試験

#### 4 - 4 浄化試験 (図 6、図 7)

浄化時間確認試験では、16 時間後も NV はカキ中腸腺に残っていたため、浄化時間を 46 時間に延長した。

前述の取り込み試験に用いたカキを 24 時間後に UV 殺菌装置付きの滅菌海水 100L 水槽に移し、46 時間の浄化を行った。

カキの NV は給餌ありの場合で、24 時間後 0.3 北<sup>°</sup>-、46 時間後 3.9 北<sup>°</sup>-であった。

対照では 24 時間後 4.4 北<sup>°</sup>-、46 時間後 1.9 北<sup>°</sup>-であった。

一方、無給餌の場合は、24 時間後 45.5 北<sup>°</sup>-、46 時間後 21.6 北<sup>°</sup>-であった。

対照では 24 時間後 4.6 北<sup>°</sup>-、46 時間後 7.5 北<sup>°</sup>-であった。

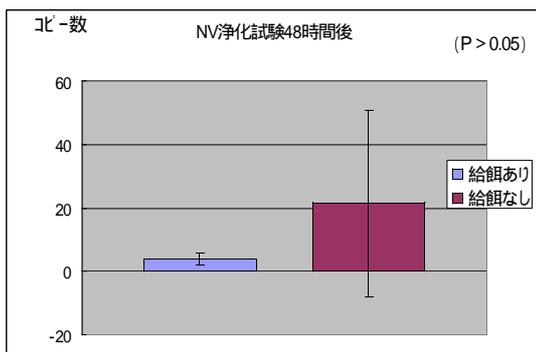
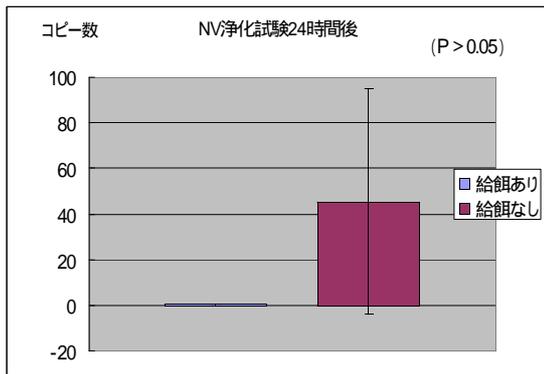


図6 浄化試験（24時間後、46時間後）

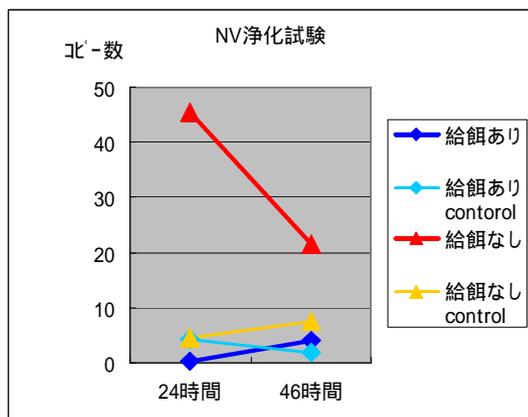


図7 NV浄化試験（コントロール含む）

## 5 考察

NVの取り込み時間確認試験では、観察により48時間でカキが衰弱していること、コピー数が減少していることから24時間が限度と推察された。

しかし、その後の浄化時間確認試験の結果では、

同じ水槽でNVを取り込ませていたカキに多くNVが残存していたことから取り込み48時間でカキのNV取り込みが減少したと判断できなかった。

取り込みに用いた下水原水中のNV数に比べてカキのNV取り込み数が少なかったことから、海水中でのNVの消長も検討する必要がある、その原因についても明らかにする必要があると考えた。

また、浄化時間も16時間では浄化効果の有無は不明であった。

次に、取り込み試験では給餌の有無についてNV取り込みの比較をしたところ無給餌では給餌ありの場合に比べ約5倍のNVを取り込んでいたため、無給餌の方が安定した取り込みが期待できると考えた。

浄化試験では、給餌ありの場合では浄化効果については不明であった。無給餌の場合は、対照と比較してNVのコピー数が減少していることからUVによる浄化の効果が示唆されたが、46時間浄化してもNVは残存していたため、長時間浄化の追跡が必要であると考えた。

本試験では、計画段階での条件設定などが不十分であり、取り込みから浄化までに得られたデータから結論はできなかった。

## 6 まとめ

取り込みに影響する要因として、海水中のpH、アンモニウムイオン濃度、酸素濃度、水温、添加するNV数、給餌の有無などが考えられることから、様々な条件設定に基づく比較検討が必要と考える。

また、カキにおけるNVの取り込み機構（レセプターによる取り込みなど）、カキ体内のNV存在場所、排泄機構などについての情報収集も必要であり、本試験でNV取り込みが困難であった理由を明確にする必要がある。（カキの個体差、またそれが生じる要因など）

今回得られたカキからの平均データの差を比較しても有意差はなかった。

他県のマガキを用いた事例では、サンプル数100個以上の報告があることから、イワガキが天然ものであることを考慮しても少なくともどれくらいのサンプル数が必要であるかを検討する必要がある。

【参考文献】

- 1) 福田美和他：養殖カキのウイルス浄化試験．  
感染症雑誌， 77：95（2003）
- 2) 山木紀彦他：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（2003）
- 3) 独立行政法人産業技術総合研究所 HP  
（2004,8 発表）
- 4) 吉田靖子他：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(1998)
- 5) 中 正純他：かきの養殖海域における S R S  
V 汚染調査とウイルス浄化試験について．食品  
衛生研究， 50,97-103(2000)