

令和5年3月31日

安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進
委託事業のうち短期課題解決型研究
研究成果報告書

課題番号：20330964

カキ中のノロウイルス低減対策に関する研究

研究期間：令和2年度～令和4年度（3年間）

研究総括者名：松嶋 良次

試験研究機関名：カキ中のノロウイルス低減対策に関する研究グループ

- ・ 国立研究開発法人 水産研究・教育機構
- ・ 宮城県水産技術総合センター
- ・ 国立医薬品食品衛生研究所
- ・ 国立感染症研究所

＜別紙様式 3＞最終年度報告書

1 研究目的

ノロウイルスは、ヒトに感染し重度の腹痛、嘔吐、下痢を引き起こす食中毒原因ウイルスである。ノロウイルスを原因とする食中毒の患者数は、国内で発生した食中毒患者総数のうち最多であり、そのうちの1割以上がカキ中のノロウイルスを原因とした食中毒であると推察されている。また、カキはノロウイルスに汚染されていると消費者に広く知られていることにより、消費の低迷が懸念されている。

カキなどの二枚貝は、海水中のノロウイルスを取り込んでおり、このことから一定の割合でノロウイルスに汚染されている。カキ生産者は、出荷前のカキを清浄海水等で畜養して、組織内に蓄積された大腸菌などの病原性微生物を排出させており、近年ではこの浄化処理によるノロウイルスの浄化も試みられている。しかし、浄化処理に関する温度や畜養条件は生産者がこれまでの経験から設定しており、生産者ごとに異なっている。さらに、浄化処理が実際にノロウイルスの低減につながっているか検証した試験はほとんど行われておらず、科学的に信頼できるデータの蓄積が必要になっている。

このため、本研究では、

1. ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製方法の確立
2. カキおよび海水中の病原性微生物低減法の検討
3. ヒトノロウイルス汚染カキの作製及び病原性微生物浄化法の実証化

により、

- ・浄化効果の検討に使用するノロウイルス汚染カキ試料の作製方法を手順書にまとめる
- ・カキ中の病原性微生物が効率よく低減する浄化法を提案する

ことを目標とする。

その結果、

1. 食中毒リスクの少ない安全なカキ生産技術の開発
2. 適切なカキの衛生対策の実施

が期待される。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製法の確立（鈴木敏之・水産研究・教育機構）

カキ中のノロウイルス浄化効果を検証するためには、適切な濃度でノロウイルスに汚染されたカキ試料を安定して作製する必要がある。そこで本課題においては、ノロウイルスを含む海水中でカキを一定期間飼育することにより、ノロウイルス汚染カキ試料の作製を試みる。そして、カキのウイルス取込みに関係すると考えられる各種環境条件を変えてカキを飼育し、各条件におけるカキのノロウイルス取込み量について調査する。調査の結果から、低・中・高濃度のノロウイルスに汚染されたカキ試料を作製するための諸条件を決定する。

国立研究開発法人水産研究・教育機構が主体となって、宮城県水産技術総合センターの協力のもとカキ飼育試験を実施する。使用するウイルス検体は国立医薬品食品衛生研究所、国立感染症研究所にて調製する。また、検体中のウイルス定量は国立研究開発法

人水産研究・教育機構と国立医薬品食品衛生研究所、国立感染症研究所にて実施する。

(1) カキ飼育環境の違いがカキのノロウイルス取り込み効率に与える影響の検討

カキを飼育する海水の温度、塩分濃度、pH、餌となる植物プランクトンの有無は、カキのノロウイルス取り込み量に影響を与えると考えられる。そのため、本課題では初めにこれらの要素について複数の条件を検討し、各条件下におけるカキのノロウイルス取り込み量について調べる。また、飼育海水内のノロウイルス濃度や、ノロウイルス汚染海水とカキの暴露時間の違いによる、ノロウイルス取り込み量の違いについても検証する。

ヒトに感染するノロウイルスには、大きく二つの遺伝子群(Genogroup IおよびII)が存在し、それぞれカキ組織への蓄積機構に違いがあることが明らかにされている。よって、本課題においてはGIおよびGIIのそれぞれについて汚染カキ試料作製のための条件を検証する。ノロウイルス量の定量は、主にカキの中腸腺を対象に上間らによって開発された感染性推定遺伝子検査法を用いて実施する。

また、ノロウイルスの代替ウイルスであるサポウイルスについて、カキへの蓄積量を調べ、本事業におけるノロウイルスの代替ウイルスとしての有用性を検討する。

(2) ノロウイルス汚染カキ試料作製条件の選定

(1) において得られた結果から、低濃度、中濃度、高濃度のノロウイルスに汚染されたカキ試料の作製に必要な条件を決定し、各条件下で複数回試験を実施することで再現性を確認する。また、決定した各条件をもとに、小課題3と連携して都道府県の水産関係の研究所で実施可能な形に手法をまとめる。

2) カキおよび海水中の病原性微生物低減法の検討(鈴木敏之・水産研究・教育機構)

カキの浄化には、現在UV処理等により病原性微生物を殺菌した海水が用いられている。浄化用の海水にはノロウイルスをはじめとする病原性微生物が含まれていないが、現在行われている各処理によってヒトノロウイルスがどの程度低減されているのか、正しく評価した例はない。そこで本研究では、はじめに海水の各種殺菌処理によるノロウイルスの低減効果を検証する。

次に、カキ中の病原性微生物を低減させる浄化法について検討する。カキの生産現場では、出荷前のカキを殺菌海水などの中で畜養し、病原性微生物を排出させる浄化処理が施されている。本研究においては、生産現場で実際に利用されている浄化条件によりヒトノロウイルスに汚染されたカキを浄化し、効果を検証する。また、浄化海水の温度や塩分濃度などの違いによる浄化効率の違いも検証する。

国立研究開発法人水産研究・教育機構が主体となって、宮城県水産技術総合センターの協力のもと、海水中での病原性微生物の生残性やカキの浄化による病原微生物の低減効果を検証する。使用する微生物は、国立医薬品食品衛生研究所、国立感染症研究所および国立研究開発法人水産研究・教育機構にて調製する。また、検体中の微生物の定量は国立研究開発法人水産研究・教育機構と国立医薬品食品衛生研究所、国立感染症研究所にて実施する。

(1) 海水中のノロウイルスを含む病原性微生物低減法の検討

現在、カキ浄化用の海水から病原性微生物を取り除く方法として一般的に利用されている方法は、ろ過やUVなどによる処理であるが、これらの処理による病原性微生物低減効果を検証する。具体的には、海水に病原性微生物を人為的に接種し、

様々な処理条件によるウイルスの低減効果を調査する。本課題においては病原性微生物として、ヒトノロウイルス、サポウイルス、大腸菌、大腸菌群の細菌、腸炎ビブリオについて低減効果を調べる。細菌の数は適切な鑑別培地を用いて測定する。ノロウイルスは感染性推定遺伝子検査法を用いて定量し、サポウイルスは遺伝子定量法のほか、感染性の有無を加味した方法でも低減効果を調べる。

(2) 浄化によるカキ中の病原性微生物低減法の検討

病原性微生物により汚染されたカキを、病原性微生物に汚染されていない海水中で畜養して浄化し、浄化の前後におけるカキ中の病原性微生物量の変化から、浄化効果を検証する。具体的には、生産現場で実際に行われている浄化法について検証するほか、浄化用海水の温度やpH、塩分濃度、カキへの給餌条件を変えた場合に病原性微生物の排出効率がどのように変化するか調べる。また、浄化水槽内に、ノロウイルスの代替ウイルスへ不活化効果を示す食品添加物を添加し、カキ中のノロウイルス低減に効果があるのかも合わせて検証する。これらの検証結果から、カキの病原性微生物排出効率が高い浄化条件を明らかにする。

本課題においても(1)と同様に二枚貝を汚染する病原性微生物として、ノロウイルス、大腸菌および大腸菌群の細菌、腸炎ビブリオを調査の対象とする。実験には小課題1で検討した手法を用いて作製されたノロウイルス汚染カキを使用する。ノロウイルスの定量には、感染性推定遺伝子検査法を用い、細菌数の測定には適切な鑑別培地を使用した培養法を用いる。

3) ヒトノロウイルス汚染カキの作製および病原性微生物浄化法の実証化(藤岡博哉・宮城県水産総合技術センター)

事業において得られた研究成果は、カキ中のノロウイルス低減対策に活用すべく、都道府県の水産関係の研究所やカキの生産に関する研究を行う機関に提供することが求められている。そのため、小課題3においては小課題1にてまとめたウイルス汚染カキ試料の作製方法について、作業者が適切に試料を作製できるよう手順書にまとめる。さらに、手順書に従ってノロウイルス汚染カキ試料を作製し、再現性等を検証する。また、小課題2にて特に高い病原性微生物の低減効果が見られた手法について、カキ生産現場を考慮したより大きなスケールで試験し、その効果を調べる。

宮城県水産技術総合センターにてノロウイルス汚染カキ作製試験や、病原性微生物の浄化試験を実施する。使用する微生物は、国立医薬品食品衛生研究所および国立研究開発法人水産研究・教育機構にて調製する。また、検体中の微生物の定量は国立研究開発法人水産研究・教育機構と国立医薬品食品衛生研究所にて実施する。

(1) ノロウイルス汚染カキ試料作製法の手順書作成

小課題1でまとめた、低濃度、中濃度、高濃度のノロウイルスに汚染されたカキ試料を作製するための条件について都道府県の水産関係の研究所などで活用されるように必要な改定および手順書の作成を行う。さらに、作製した手順書に従って作業を行い、再現性を検証する。また、小課題2-(1)において、高いノロウイルス低減効果を示した手法をもとに、ウイルス汚染カキ試料作製時に生じるウイルス汚染廃液の処理法を検討し、廃液の処理方法として手順書に記載する。作製する手順書は、作業者が間違いなく安定して試料を作製できるよう、チェックボックスを入れるなどの工夫を施す。

(2) カキ中の病原性微生物を低減する効果的な浄化法の実証化試験

小課題2にて高い病原性微生物の低減効果が見られた浄化法について、実際のカキ生産者の設備、規模に近づけた環境で試験し、必要に応じて内容を改変する。本小課題において最終的にまとめた浄化効果に関する検証結果は、カキ生産現場における有効な衛生対策指導のため、カキ生産都道府県の関係者に提供する。

(2) 達成目標及び進捗目標

本研究においては、ノロウイルス汚染カキ試料作製方法の手順書化と、カキ中の病原性微生物を効率よく低減する浄化法の検討およびその提案を目標とする。

ウイルス汚染カキ試料作製方法の手順書化においては、カキ中のノロウイルス濃度が、低・中・高の3種類となるようにそれぞれ手法を検討し、確立する。これまでの研究において、海水中のノロウイルス濃度やカキとの曝露時間と、カキのノロウイルス取り込み量を検証した例は少ない。さらに、カキのノロウイルス取り込み効率が最も高くなる諸条件についても十分な検証がされていない。そのため、特定の濃度のノロウイルスに汚染されたカキ試料を作製する方法については過去に報告がなく、本事業で成果が得られれば、初めての報告例となる。

また、カキ中の病原性微生物浄化法については、大腸菌群や腸炎ビブリオに加えてノロウイルスについても浄化効果を検討する。カキ中のノロウイルスの浄化効率については、これまで代替ウイルスを用いて検証されることが多かったが、ヒトに感染するノロウイルスは従来の代替ウイルスとは異なる挙動を取ることが報告されていることから、ヒトノロウイルスを使用した検証が必要とされている。そのため本研究においては、ヒトノロウイルスを用いて浄化効果を検証する。また、浄化効率を向上させる条件については生産現場に普及しやすいようまとめて提案する。

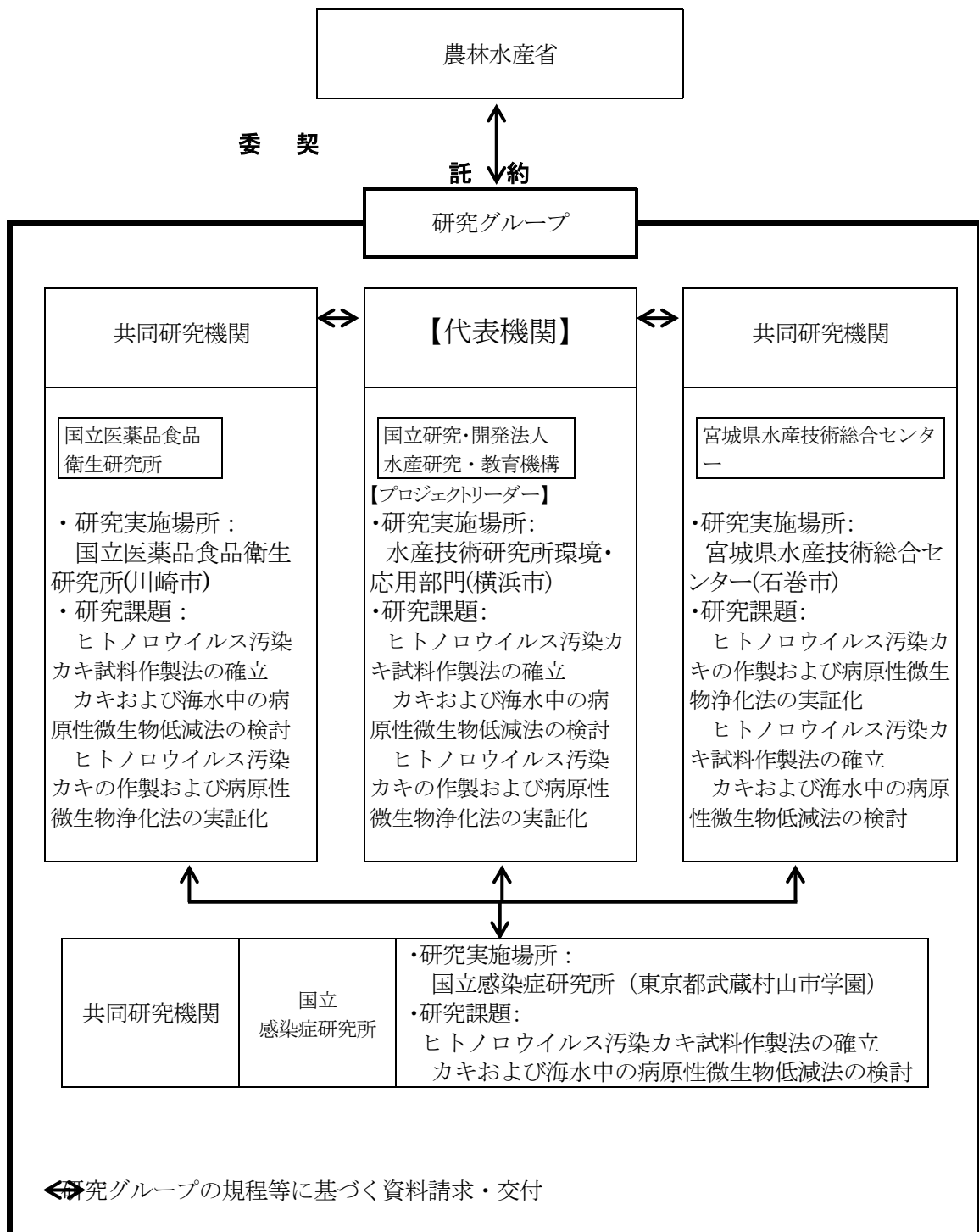
(3) 研究成果の行政施策・措置への貢献

ノロウイルス汚染カキ試料の作製方法を確立し、その手順書を都道府県の水産関係の研究所に配布することにより、カキのノロウイルス対策のための研究体制を整備することができる。さらに、それらの研究所にてカキ生産者からの試験要望に応えることで、有効なカキの衛生管理手法を検証し、普及することが可能になる。本研究においては、汚染カキ試料作製手順の確立に加え、カキ中の病原性微生物を効果的に除去する浄化法の提案も行う。これにより、病原性微生物の浄化効率が良い浄化法がカキ生産者の間で普及し、安全なカキがより多く生産されることが期待される。カキにはノロウイルスに汚染されている個体があることは、消費者にも広く知られている。これは、カキの消費を控える要因の一つともなっており、過去にはノロウイルス食中毒の流行と共にカキの風評被害が発生したケースもある。本研究の成果により、食中毒の原因となる病原性微生物に汚染されていないカキが、安定的に生産できるようになると、このような風評被害の発生を最小限に抑えることが可能となり、カキ生産者の利益増大につながると期待できる。

(4) 年次計画

研究課題	研究年度		
	令和2年度	令和3年度	令和5年度
1. ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製法の確立 (1) カキ飼育環境の違いがカキのノロウイルス取り込み効率に与える影響の検討 (2) ノロウイルス汚染カキ試料作製条件の選定	環境条件の検討 濃度別汚染試料作成法の検討		
2. カキおよび海水中の病原性微生物低減法の検討 (1) 海水中のノロウイルスを含む病原性微生物低減法の検討 (2) 浄化によるカキ中の病原性微生物低減法の検討	浄化用水中の病原性微生物低減法の検討	カキ中の病原性微生物低減効果の検証	
3. ヒトノロウイルス汚染カキの作製および病原性微生物浄化法の実証化 (1) ノロウイルス汚染カキ試料作製法の手順書作成 (2) カキ中の病原性微生物を低減する効果的な浄化法の実証化試験	スケールアップと再現性の確認 手順書にまとめる	スケールアップと再現性の確認 提案内容をまとめる	

(5) 研究体制



(6) 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者	イフォート (%)
	機関	研究室		
研究総括者	水産研究・教育機構	水産技術研究所 環境・応用部門 水産物応用開発部 安全管理グループ	前任者 鈴木敏之 (～ 2021. 3) 後任者 ◎ 松 嶋 良 次 (2021. 4～)	5 10
1. ヒトノロウイルス汚染 カキ試料作製法の確立	水産研究・教育機構	水産技術研究所 環境・応用部門	前任者 及川 寛 (～ 2021. 3) 後任者 ○ 鈴 木 敏 之 (2021. 4～)	前出
(1) カキ飼育環境の違いがカキのノロウイルス 取り込み効率に与える影響の検討	水産研究・教育機構	水産技術研究所 環境・応用部門 水産物応用開発部 安全管理グループ	△ 大島千尋 松嶋良次	20 前出
	宮城県水産技術総合センター	養殖生産チーム	前任者 伊藤 博 (～ 2021. 3) 後任者 藤岡博哉 (2021. 4 ～)	20
			前任者 藤原 健 (～ 2021. 3) 後任者 上田賢一 (2021. 4 ～)	5
	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部 第 四室	熊谷 明	10
	国立感染症研究所	安全実験管理部	新任者 十川麻衣 (2021. 4 ～)	5
			上間 匡	20
	水産研究・教育機構	水産技術研究所 環境・応用部門 水産物応用開発部 安全管理グループ	高木弘隆 (2021. 4 ～)	10
(2) ノロウイルス汚染 カキ試料作製条件の選定	宮城県水産技術総合センター	養殖生産チーム	△ 大島千尋 松嶋良次	前出 前出

2. カキおよび海水中の病原性微生物低減法の検討 (1) 海水中のノロウイルスを含む病原性微生物低減法の検討			前任者 伊藤 博 (～2021.3) 後任者 藤岡博哉 (2021.4～)	前出
	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部 第4室	前任者 藤原 健 (～2021.3) 後任者 上田賢一 (2021.4～)	前出
	水産研究・教育機構	水産技術研究所 環境・応用部門	熊谷 明 新任者 十川麻衣 (2021.4～)	前出 前出
	水産研究・教育機構	水産技術研究所 環境・応用部門	上間 匡	前出
	宮城県水産技術総合センター	水産技術研究所 環境・応用部門 水産物応用開発部 安全管理グループ	前任者 及川 寛 (～2021.3) 後任者 ○ 鈴木 敏之 (2021.4～) △ 大島千尋 松嶋良次	前出 前出 前出
	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部 第4室	前任者 伊藤 博 (～2021.3) 後任者 藤岡博哉 (2021.4～)	前出
	国立感染症研究所	安全実験管理部	前任者 藤原 健 (～2021.3) 後任者 上田賢一 (2021.4～)	前出
	水産研究・教育機構	水産技術研究所 環境・応用部門 水産物応用開発部	熊谷 明 新任者	前出

(2) 浄化によるカキ中の病原性微生物低減法の検討	宮城県水産技術総合センター	安全管理グループ	十川麻衣 (2021.4～)	前出
		養殖生産チーム	上間 匡	前出
			新任者 高木弘隆 (2021.4～)	前出
			△ 大島千尋 松嶋良次	前出 前出
	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部 第四室	前任者 伊藤 博 (～2021.3)	前出
	宮城県水産技術総合センター	養殖生産チーム	後任者 藤岡博哉 (2021.4～)	
			前任者 藤原 健 (～2021.3)	
	宮城県水産技術総合センター	養殖生産チーム	後任者 上田賢一 (2021.4～)	
			熊谷 明	
			新任者 十川麻衣 (2021.4～)	
			上間 匡	
3. ヒトノロウイルス汚染カキの作製および病原性微生物浄化法の実証化	水産研究・教育機構	水産技術研究所 環境・応用部門 水産物応用開発部 安全管理グループ	前任者 伊藤 博 (～2021.3)	前出
			後任者 ○ 藤岡博哉 (2021.4～)	
			前任者 伊藤 博 (～2021.3)	
	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部 第四室	後任者 △ 藤岡博哉 (2021.4～)	前出
	宮城県水産技術総合センター	養殖生産チーム	前任者	
(1) ノロウイルス汚染カキ試料作製法の手順書作成				

(2) カキ中の病原性微生物を低減する効果的な浄化法の実証化試験	水産研究・教育機構 国立医薬品食品衛生研究所	水産技術研究所 環境・応用部門 水産物応用開発部 安全管理グループ 食品衛生管理部 第四室	藤原 健 (～2021.3)	
			後任者 上田賢一 (2021.4～)	前出
			熊谷 明	前出
			新任者 十川麻衣 (2021.4～)	前出
			大島千尋 松嶋良次	前出 前出
			上間 匡	前出
			前任者 伊藤 博 (～2021.3)	
			後任者 △ 藤 岡 博 哉 (2021.4～)	前出
			前任者 藤原 健 (～2021.3)	
			後任者 上田賢一 (2021.4～)	前出
			熊谷 明	前出
			新任者 十川麻衣 (2021.4～)	前出
			大島千尋 松嶋良次	前出 前出
			上間 匡	前出

(注1) 研究総括者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

(注2) 代表機関及び共同研究機関並びに研究総括者の変更を行う必要が生じた場合はその理由を明記した書面を添付すること。

(7) 各年度の研究費

令和2年度 6,850,893円

令和3年度 6,400,755円

令和4年度 6,480,000円

3 研究推進会議の開催状況

別添のとおり。

4 研究成果の概要（別紙参照）

(1) 主な成果

1) 成果の内容

本課題においては、カキ中腸腺中のノロウイルス低減量をより体系的に評価できるよう、ノロウイルス汚染カキ試料の作製方法を開発した。また、検体の入手が難しいノロウイルスに代わり、細胞で増殖させることのできるサポウイルスについて、カキのノロウイルス汚染対策に関する研究への代替ウイルスとしての有用性を評価した。さらに、開発したノロウイルス汚染カキ試料作製法にならって汚染カキを作製し、浄化処理によるカキ中のノロウイルス低減効果を検証した。

2) 成果の活用

本課題において確立したノロウイルス汚染カキ作製法については、都道府県やその他の水産関係の研究機関に広く普及するよう手順書にまとめた。

(2) 各研究課題の成果

1) 小課題名：ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製法の確立

(ア) 研究目標

カキ中のノロウイルス浄化効果を検証するためには、適切な濃度でノロウイルスに汚染されたカキ試料を安定して作製する必要がある。そこで本課題においては、ノロウイルスを含む海水中でカキを一定期間飼育することにより、ノロウイルス汚染カキ試料の作製を試みる。そして、カキのウイルス取込みに関係すると考えられる各種環境条件を変えてカキを飼育し、各条件におけるカキのノロウイルス取込み量について調査する。調査の結果から、低・中・高濃度のノロウイルスに汚染されたカキ試料を作製するための諸条件を決定する。

(イ) 研究内容

(1) カキ飼育環境の違いがカキのノロウイルス取り込み効率に与える影響の検討

カキを飼育する海水の温度、塩分濃度、pH、餌となる植物プランクトンの有無は、カキのノロウイルス取り込み量に影響を与えられる。そのため、本課題では初めにこれらの要素について複数の条件を検討し、各条件下におけるカキのノロウイルス取り込み量について調べる。また、飼育海水内のノロウイルス濃度や、ノロウイルス汚染海水とカキの暴露時間の違いによる、ノロウイルス取り込み量の違いについても検証する。

ヒトに感染するノロウイルスには、大きく二つの遺伝子群(Genogroup IおよびII)が存在し、それぞれカキ組織への蓄積機構に違いがあることが明らかにされている。よって、本課題においてはGIおよびGIIのそれぞれについて汚染カキ試料作製のための条件を検証する。ノロウイルス量の定量は、主にカキの中

腸腺を対象に上間らによって開発された感染性推定遺伝子検査法を用いて実施する。感染性推定遺伝子検査法を用いてカキ中のノロウイルスを定量する際の、適切な標準DNAおよびqPCR関連試薬について複数进行评估し、本法の実施に適切な試薬を選定する。

また、ノロウイルスの代替ウイルスであるサボウイルスについて、カキへの蓄積量を調べ、本事業におけるノロウイルスの代替ウイルスとしての有用性を検討する。

(2) ノロウイルス汚染カキ試料作製条件の選定

(1) において得られた結果から、低濃度、中濃度、高濃度のノロウイルスに汚染されたカキ試料の作製に必要な条件を決定し、各条件下で複数回試験を実施することで再現性を確認する。また、決定した各条件をもとに、小課題3と連携して都道府県の水産関係の研究所で実施可能な形に手法をまとめる。

(ウ) 研究結果

1) 感染性推定遺伝子検査法に用いる試薬類の評価

定量PCRの検量線作成用標準DNA「ノロウイルスqPCR標準DNA (Ricoh Standard DNA Series)」の検討

0.2mL PCR反応チューブ等へ任意のコピー数のDNAを分注できるリコー社バイオプリンティング技術により、ノロウイルス用標準DNAの作成を実施した。GIおよびGIIのターゲット領域をタンデムにした配列をもたせ、ISO15216にも対応するように設計した。作成後、本標準DNAについてTaKaRa qPCR Norovirus (GI/GII) Typing Kitを用いて、4コピー以上が確実に検出できることを確認した。また、同様の技術で96穴プレートに任意のコピー数のDNAを分注したプレートを作成し、水産研究・教育機構にて用いるqPCR装置の検出精度を検証し、性能に問題がないことを確認した。

他社製標準DNAとの比較検討

Takara Norovirus Typing Kitに含まれるプライマーおよび酵素を用いて、Takara Norovirus Positive Control DNA、Ricoh Standard DNA、合成DNA (IDT社製および FASMAC社製) を使用した検量線を作成し、比較した。

その結果、Takara Norovirus Typing KitまたはRicoh Standard DNAのどちらかが再現性も高く、検量線作成に有用であった。合成DNAについては二本鎖DNAまたはプラスミドとして入手することとなるが、提供される重量あるいはmol数の情報から、コピー数への換算等が必要であった。(Takara Norovirus Typing Kitは、ポジティブコントロールの別売りおよび TaKaRa qPCR Norovirus (GI/GII) Typing Kit Ver. 2の販売が始まったため終売となった。)

その後、リコー社よりRicoh Standard DNAについて販売終了が発表されたため、ノロウイルス感染性推定遺伝子検査法に掲載する標準DNAは、Takara Norovirus Positive Control DNA (RR251A) が妥当と考えられた。(参考情報：ISOに準拠したバイオメリュー社CeeramToolsのノロウイルスキットも国内入手可能ではあるが、納期が長くなる可能性が高い)

ノロウイルス感染性推定遺伝子検査法に用いるqPCR試薬の性能評価

TAKARA Norovirus Positive Control DNAを用いて、Takara Premix ExTaq

(Probe qPCR)、GeneAmp Probe qPCR Mix II、KAPA Probe Force qPCR、Luna Probe qPCR Master Mix のqPCR用酵素を比較した。

その結果、ポジティブコントロールDNAから用時調整した希釈列を用いる場合、これらの試薬は良好な検量線を作成できた。しかし、一度調整した希釈系列を冷蔵保存した後に使用する場合は、Takara Premix ExTaq (Probe qPCR)のみが良好な検量線を得られた。

次に、Takara Norovirus Typing Kit とPremix ExTaq(Probe qPCR) の比較を行った。2つの定量PCR用試薬を用いてRicoch Standard DNA (0, 0.4, 4, 16, 64, 256 コピー/tube)の定量PCRを実施した。この時、ノロウイルス陰性カキ中腸腺由来RNAから合成したcDNAを添加してqPCRを実施した。その結果、どちらの試薬もともに4コピーから検出可能でありCt値に大きな差はなかったため、両者の性能は同等と思われた。

ノロウイルス感染性推定遺伝子検査法に用いる逆転写酵素の比較

Takara Norovirus Typing Kit付属のPrimeScriptとHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kitの比較を実施した。FCV(Feline calicivirus)を添加したカキ中腸腺より抽出したRNAを用いて逆転写反応を行い、Ct値の比較を行った。4検体を用いて比較を行い、Takara Norovirus Typing Kit付属のPrimeScriptを用いた場合のCt値の平均は27.4、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitを用いた場合のCt値の平均は25.1となりHigh Capacityが若干優れていた。

次に、TAKARA Norovirus Positive Control DNAを用いて、Prime Script RT Enzyme Mix、Prime Script RT Reagent kit、ReverTra Ace alpha、ReverTra Aceの4つの逆転写酵素を比較した。2 gのカキ中腸腺にFCV、HAV(Hepatitis A virus)、Mengovirusを接種したものからRNAを抽出後、dT30プライマーを用いて逆転写反応を実施した。その結果すべてのウイルスが不検出となった。一方で、ランダムプライマーを用いた場合には、ウイルスが検出された。

次に、先の実験にて中腸腺へのウイルス添加を行ったにもかかわらず各ウイルス遺伝子が不検出であったため、中腸腺の影響を無視する目的で水に各ウイルスを接種して同様に比較した。

その結果、Prime Script RT Enzyme Mix、Prime Script RT Reagent kitの二つで逆転写を行った場合には、FCVおよびMengovirusが検出された。一方でReverTra Ace alphaおよびReverTra Aceを用いた場合にはすべてウイルスが検出されなかった。HAVがすべての試薬で不検出であった理由には、HAVのqPCR検出部位がウイルスゲノムの上流に位置するためと考えられた。

次に、これまでの検証において逆転写にdT30プライマーを用いるとウイルス遺伝子が検出されなくなることから、長さの異なるdT-プライマーを用いて感染性推定遺伝子検査法の逆転写効率を比較した。逆転写酵素は、Takara Norovirus Typing Kit付属のPrimeScriptを用いた。その結果、dT12-18を用い、逆転写試薬の取扱説明書に従った反応条件で実施すると、良好な結果が得られた(表1)。dT12-18はキットに付属のプライマーであり、他社のキットにも同様のものが添付されている例が多いようであった。

表 1. dTプライマーの長さの違いによる逆転写効率の比較

	Ct値		
	FCV	Mengovirus	HAV
dT30	24.9	30.09	ND
dT20	24.8	31.1	30.8
dt12-18	24.8	30.8	30.6

本課題の検証結果より、別途作成した「ノロウイルス汚染カキ作製手順書」の別添資料「ノロウイルスの感染性推定遺伝子検査法」においては、逆転写反応推奨試薬として High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems No. 4368814) およびPrimescript RT reagent kit (タカラバイオRR037A) を掲載した。また、qPCR用推奨試薬としてNorovirus GI/GII typing kit Ver.2(タカラバイオ No. RR265A)、Premix Ex Taq probe qPCR (タカラバイオ No. RR390A)を、qPCR時の検量線作成用標準DNAとしてNorovirus (GI/GII) Positive Control DNA(タカラバイオ No. RR251A)を掲載した。

2) ノロウイルス汚染カキ試料作製法の開発

カキ飼育環境の違いがカキのノロウイルス取り込み効率に与える影響の検討

ノロウイルスをおよそ $6.0 \log$ copies/Lになるように接種した人工海水25L中で、カキ13個を飼育し、カキ中腸腺に蓄積されたウイルス量を調査した。この時、カキ飼育水槽への給餌の有無や、エアーの送り込みの有無、飼育海水の塩分濃度、温度、pH を変化させた場合に、カキに蓄積されるウイルス量がどのように変化するかを調べた。また、ウイルス接種海水とカキの暴露時間を変化させた場合の、ウイルス蓄積量の違いも調査した。カキ中腸腺からのノロウイルスの定量は、上間らの開発した感染性推定遺伝子検査法を用いて実施した。

また、この試験を始める前に、本研究課題で用いる定量法による回収率を求めた。具体的には、未汚染カキの中腸腺を取り出してFCVを接種し感染性推定遺伝子検査法¹⁾に示された方法と同一方法のRNA抽出、dTプライマーを用いた逆転写、リアルタイムPCRに供した。接種したFCV液からも、同様の条件でRNAを抽出し、逆転写反応とリアルタイムPCRに供した。カキ中腸腺からの定量値と接種したウイルス検体の定量値の差から、本課題で用いる定量法の回収率を計算した。回収率はおよそ20%であった。そのため、本課題ではカキ中腸腺中のノロウイルス量を定量する際に、回収率から補正した数字を算出した。逆転写試薬やリアルタイムPCR用試薬が変更された場合には、再度回収率を求めた。なお、ノロウイルス汚染カキ試料からノロウイルスを定量する際には、RNA抽出前に中腸腺に由来する懸濁液にFCVを接種し、FCVについても定量値を求めた。FCVのリアルタイムPCRの結果、接種したFCV量に対してカキ中腸腺検体から定量されたFCVの回収率が $20 \pm 2\%$ の場合には、抽出および定量における阻害物質の影響は少ないと考えた。

各飼育条件におけるカキのノロウイルス取り込み量を算出した結果、ノロウイルスGII遺伝子型4(GII.4)を試験に用いた場合には、給餌の有無、pH、塩分濃度、水温を変化させた場合にウイルス蓄積量に有意な差は見られなかった。また、エアーを送り込んだ時の方がウイルスの蓄積量が多かった。さらに、ウイルス接種海水への曝露時間が、24 時間より48 時間の時の方がウイルスの蓄積量が多く、48 時間と72 時間ではウイルス蓄積量に有意な差は見られなかった(図1)。ノロウイルスGI遺伝子型7(GI.7)を用い

て実施した試験では、給餌の有無、塩分濃度の違いによるカキ中腸腺へのウイルス蓄積量に有意な差は見られなかった。一方、pH8.9の海水中では、pH7.4の海水で試験を行った場合よりも、カキに蓄積されるウイルス量が少なかった（図2）。ノロウイルスGIは遺伝子型によってpH9.0で不活化されることが報告されており、試験に供したノロウイルスもpH8.9の海水で不活化されたためと考えられた。

これらの結果から、「ノロウイルス汚染カキ作製条件の選定」において検討する飼育条件を、水温は10-20℃（基本的に20℃で試験を実施した）、pHと塩分濃度は一般的な海水の範囲であれば調整しない、エアレーションは行う、給餌はしない、ウイルス汚染海水へのカキの曝露時間は48時間、と決定した。

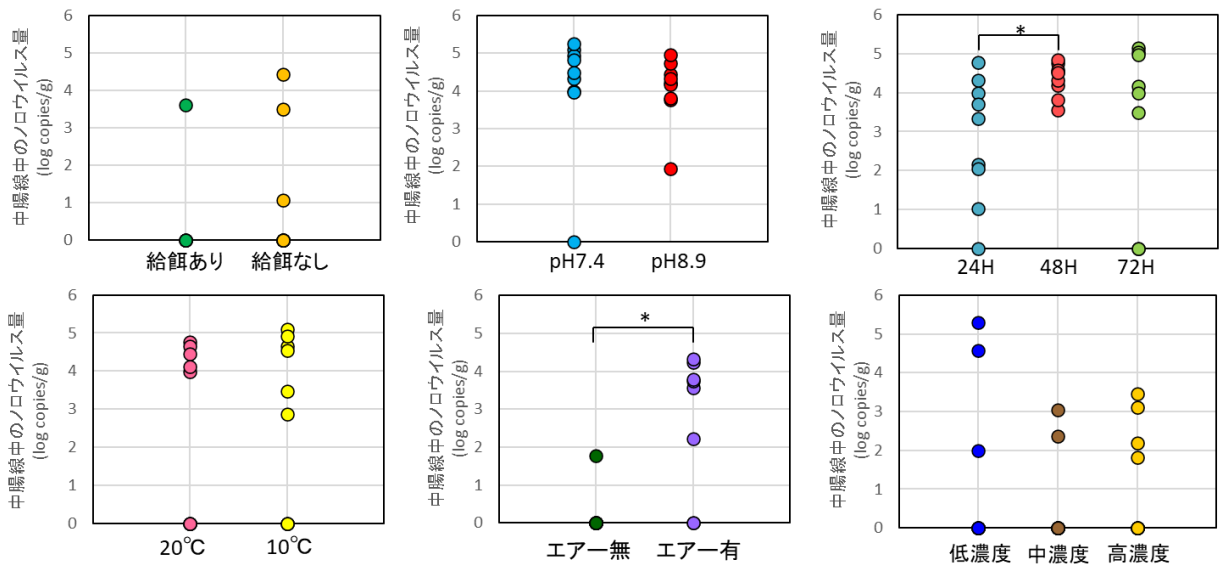


図1. 各種飼育環境下におけるノロウイルス蓄積量(GII. 4)

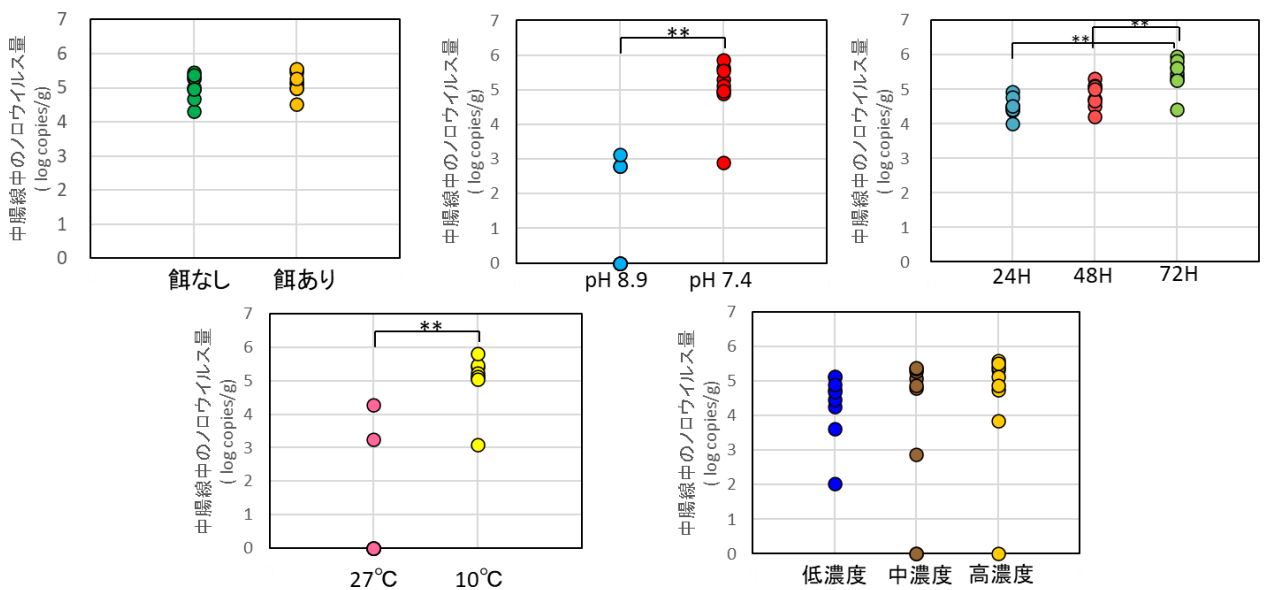


図2. 各種飼育環境下におけるノロウイルス蓄積量(GI. 7)

3) ノロウイルス汚染カキ試料作製条件の選定

高、中、低濃度のノロウイルス汚染カキ試料作製条件の検討

2) で決定した条件でカキを飼育する際に、海水に接種するウイルス濃度を変化させることで低・中濃度のノロウイルス汚染カキ試料の作製を試みた。

人工海水25Lにカキを10-13個並べ馴致後、海水中の終濃度がノロウイルスGI.7を5.3、4.3、3.8、2.8log copies/L、ノロウイルスGII.4を5.9、4.9、3.9 log copies/Lになるようにそれぞれ接種し試験を開始した。最初のウイルス接種から24時間後に再び同一濃度のウイルスを接種し、ウイルス汚染海水とカキの曝露時間が48時間になったところでカキを回収した。回収後、中腸腺を取出し、アミラーゼ処理を施したのち、感染性推定遺伝子検査法を用いて中腸腺中のノロウイルス量を定量した。中腸腺からのRNA抽出時にコントロールウイルスとしてFCVを接種し、回収率を計算して定量値に反映させた。

その結果、図3に示す通り、海水へのノロウイルス接種濃度を下げると、GI.7ではノロウイルスを取り込んだカキ中腸腺中のノロウイルス量の平均値がわずかに減少した。しかし、接種濃度の減少量に対して蓄積されたウイルスの量の減少幅が少なかった。また、ノロウイルスの接種濃度を下げると、ウイルスを取り込む個体数が減少した。

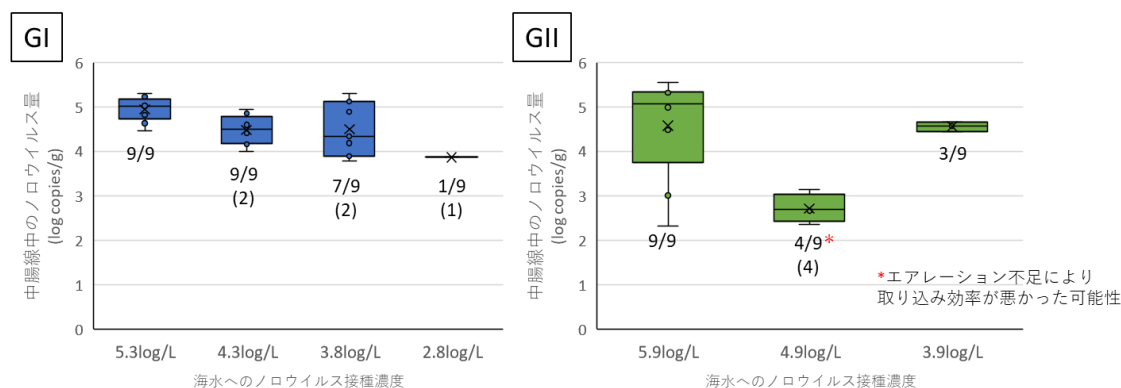


図3. 海水へのノロウイルス接種濃度別カキのウイルス取り込み量
(左 : GI.7、右 : GII.4)

これまでの試験データを、海水中へのノロウイルス接種濃度とカキ中腸腺内へのノロウイルス蓄積量に注目してまとめた(図3, 4)。その結果ノロウイルスGI.7では、中腸腺中に5 log copies/gほどのノロウイルスが蓄積される高濃度汚染カキの作製には、海水中のノロウイルス濃度を5log copies/Lに、中腸腺に4 log copies/gほどのノロウイルスが蓄積される中濃度汚染カキの作製には、海水中のノロウイルス濃度を3.5-5log copies/Lにするのが望ましいと考えられた。基本飼育条件で低濃度汚染カキを作製しようと、海水中のノロウイルス濃度を下げると、陽性個体数が減少してしまうため、低濃度汚染カキの作製条件決定にはさらなる検証が必要であった。ノロウイルスGII.4では、中腸腺中に5 log copies/gほどのノロウイルスが蓄積される高濃度汚染カキの作製には、海水中のノロウイルス濃度を6log copies/Lにするのが望ましいと考えられた。

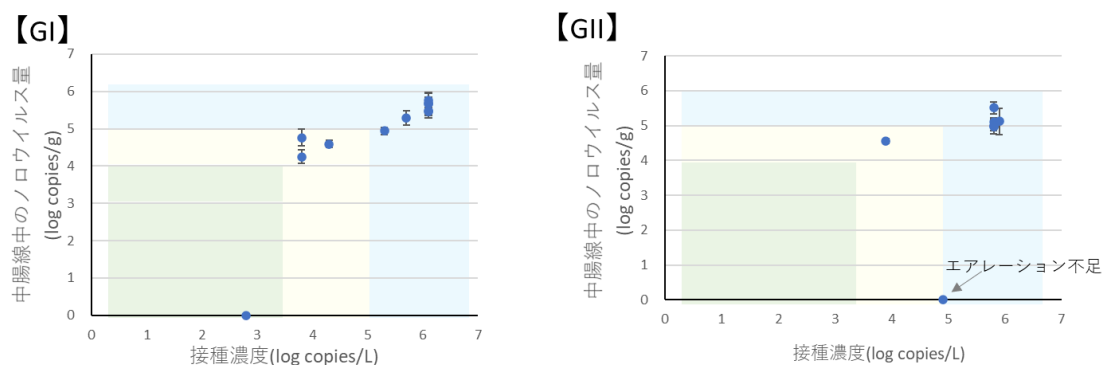


図4. 海水へのノロウイルス接種濃度とカキのウイルス取り込み量の比較

次に、中・低濃度の汚染カキを安定して作製するための条件を検討した。まず、カキがプランクトンと一緒にノロウイルスを取り込む可能性を考え、はじめに、カキの摂餌量とノロウイルス取り込み量の関係を調べた。

カキを1個体ずつ2Lの人工海水と合わせてビーカーに入れ、プランクトンとノロウイルス (GI. 7およびGII. 4) を同時に接種した。接種後、1時間半後と3時間半後に海水中に残存するプランクトンの数を計測した。また、翌日も同様の作業を行い、最初のノロウイルス接種から48時間たったところでカキを回収し、中腸腺に取り込まれたノロウイルス量を調べた。

その結果、カキ9個体のうち3個体がプランクトンをあまり摂餌しなかった(図5)。しかし、それらの個体の中腸腺からはノロウイルスが検出された(図6)。このことから、プランクトンの摂餌量と中腸腺に取り込まれるウイルス量には相関がないことが明らかとなった。また、GI. 7もしくはGII. 4の一方のみが非検出となるカキも散見されたことから、GI. 7およびGII. 4の取り込みにも相関がないことが示唆された。

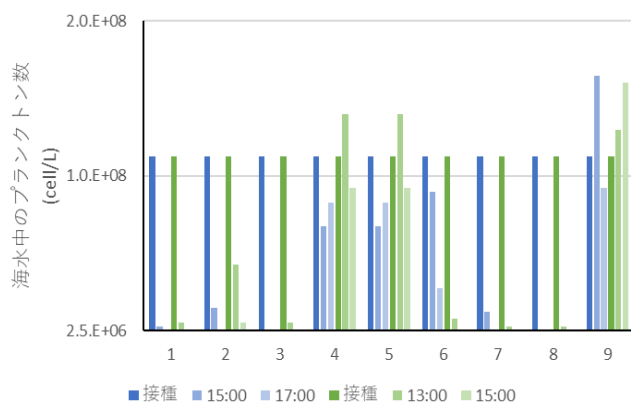


図5. 海水中のプランクトン数の経時変化

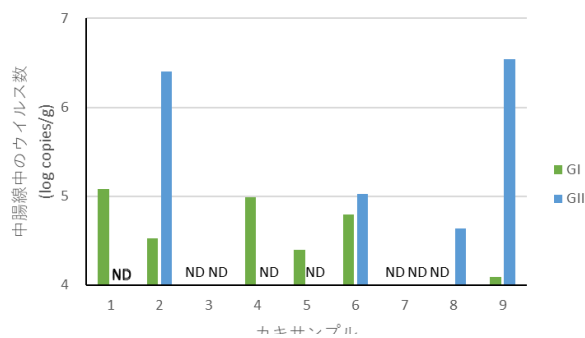


図6. 個体別カキ中腸腺中のノロウイルス量

次に、汚染カキ作製にはカキが殻を開けて水を取り込む動作が必要であると考え、汚染前にプランクトンを給餌した際に開殻したものやそうでないものでウイルス取り込み量に違いがあるのか調べた。

馴致後のカキを1個体ずつ人工海水と一緒に容器に入れ、それぞれの容器にプランクトンを接種した。その後1時間、i)海水がきれいになるか(プランクトンが減っているか)、ii)貝をあけたか、iii)偽糞をだしたか、という観点でカキの様子を観察した。観察後、25Lの大きな水槽にすべてのカキを移し、ノロウイルスGI. 7およびGII. 4をそれぞれ5.5, 5.4 log copies/Lになるように接種した。24時間後に再び同量のノロウイルスを接種し、二回目の接種から24時間後にカキを回収して中腸腺中のノロウイルス量を調べた。

その結果、i)からiii)の動作の有無と中腸腺中のノロウイルス量には相関はなかった(表2)。本試験では、プランクトン給餌後1時間のみ貝の様子を観察しているが、実際には

口をあけたか	水がきれいになったか	偽糞が出たか	GI (log copies/g)	GII (log copies/g)
○	○	○	6.1	5.3
○	○	○	5.8	6.9
○	○	○	7.2	5.5
○	○	○	6.7	6.8
○	○	○	7.2	7.7
○	○	○	7.0	6.9
○	○	○	6.8	7.0
○	○	○	4.3	ND
○	○	○	6.6	5.5
○	○	○	6.9	ND
○	○	○	6.4	7.0
○	○	○	6.6	7.0
○	○	○	7.0	4.4
○	○	○	7.1	7.3
○	○	○	6.9	7.2

その後ノロウイルスに暴露している48時間の間にカキが水を取り込んでいる可能性があると考えられた。よって、プランクトン給餌により汚染カキ試料作製に使用するカキを選抜するという方法は不適と考えられた。

次に、汚染カキ試料作製の際に高濃度のノロウイルスを1回接種することで、低濃度ノロウイルス汚染カキ試料が作製できないか検討した。先に検討した汚染カキ作製手順に従ってカキを用意し、馴致後にノロウイルスGI. 7およびGII. 4をそれぞれ5.5, 5.4log copies/Lになるように海水に接種した。接種から48時間後にカキを回収し、中腸腺中のノロウイルス量を測定した。

その結果、カキ中腸腺にはノロウイルスGI. 7が6.2 ±0.2、GII. 4が7.0 ±0.1 log copies/gの濃度で取り込まれており、低濃度汚染を再現できなかった(図7)。

表2. カキの観察結果と中腸腺中のノロウイルス量

赤字はノロウイルスが検出されているが定量下限以下を意味する。

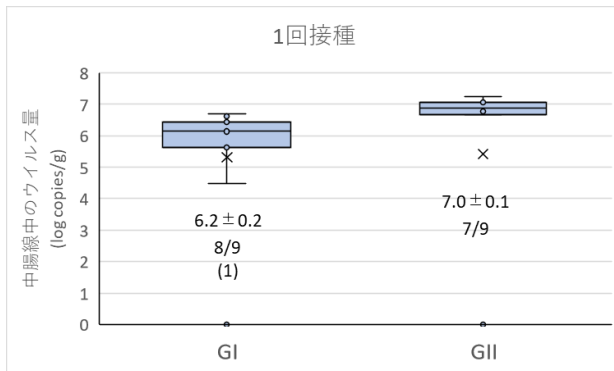


図7. 海水へのノロウイルス接種を1回にした場合のカキ中腸腺中のノロウイルス量

最後に、ノロウイルス汚染カキ試料作製試験の結果をまとめ、海水への接種量とカキ中腸腺へ取り込まれるノロウイルス量とノロウイルス陽性個体の割合を比較した(図8, 9)。その結果、ノロウイルスGIにおいては海水のノロウイルス濃度

が下がるとカキ中腸腺に取り込まれるノロウイルス量も減少した。また、海水のノロウイルス濃度が下がるとノロ

ウイルスを取り込むカキの割合が低下することがあった。ノロウイルスGIIにおいては、GIと比べると海水中のウイルス濃度が低い場合もカキ中腸腺には一定量のウイルスが取り込まれる傾向が確認された。GIIについては、GII. 4およびGII. 17の二種類をそれぞれ試験に用いた。遺伝子型別に、海水への接種量に対するカキ中腸腺へ取り込まれた量および汚染カキ作製時の陽性率を比較すると、GII. 4と比べてGII. 17の方がカキに取り込まれやすい傾向が見られた。GIおよびGIIともに、海水中のノロウイルス濃度が低いと、陽性率も低下する傾向が確認され、低濃度汚染カキの作出に適切なウイルス濃度ははっきりしなかった。また、GIおよびGIIともに、昨年度の結果と比較して中腸腺に取り込まれるウイルス量が多くなった。

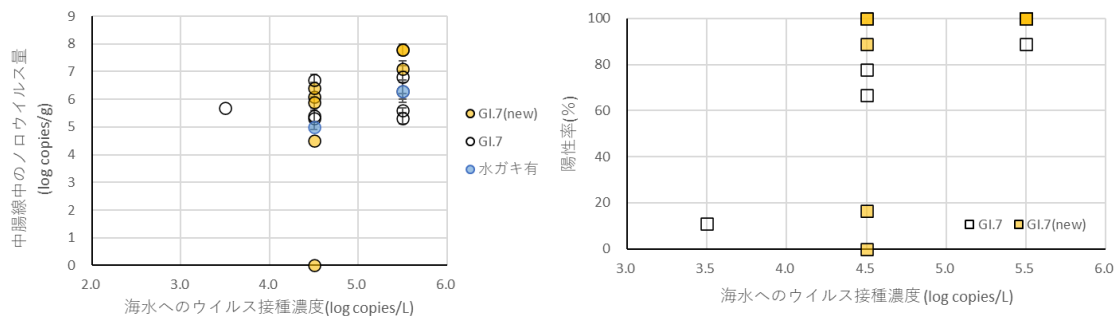


図8. 海水へのノロウイルス接種濃度別カキ中腸腺へのノロウイルスGI取込量(左)とノロウイルスGI陽性カキの割合(右)

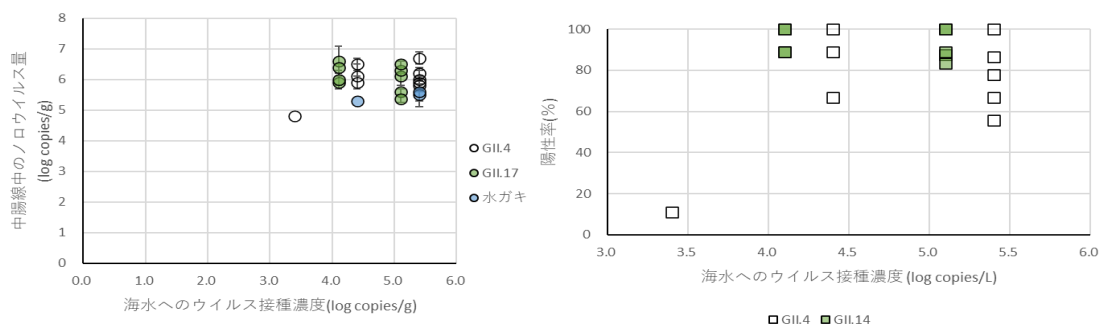


図9. 海水へのノロウイルス接種濃度別カキ中腸腺へのノロウイルスGII取込量(左)とノロウイルスGII陽性カキの割合(右)

ノロウイルス汚染カキ試料作製条件の選定

2021年3月から2022年1月まで、ノロウイルスGI. 7およびGII. 4を用いて前述の条件にてカキのノロウイルス汚染試験を実施し、中腸腺へのウイルス蓄積量を比較した。カキ畜養水槽へのノロウイルス接種濃度は、図10に示した。その結果、8月までの試験に供した個体は軟体部の形態から放卵放精が終了していない個体とみられ、ノロウイルスを蓄積した。一方、9月の試験に供した個体は軟体部の形態から”水ガキ”と呼ばれる放卵放精が終了した個体であるとみられ、ノロウイルスを蓄積しなかった（図10）。また、2022年5月から2023年1月まで毎月ノロウイルス汚染カキ作製試験を行い、その結果を試験日別に比較した（図11）。当該シーズンは、ノロウイルスGI. 7およびGII. 4を5.5 log copies/Lになるように接種した人工海水で畜養した。その結果、産卵後のカキに特徴的な“水ガキ”と呼ばれる状態のカキが出始めた8月4日の試験分から陽性率の顕著な低下が見られ、また、ノロウイルス汚染個体の中腸腺中のウイルス量の平均がわずかに減少していた。これにより、放卵放精時期のカキはノロウイルスを取り込みにくいことが明らかになり、汚染実験が可能な時期を明らかにした。よって、産卵後のカキは本課題で提案する方法ではノロウイルスを取り込みにくく、ノロウイルス汚染カキ試料の作製に不適であると言えた。

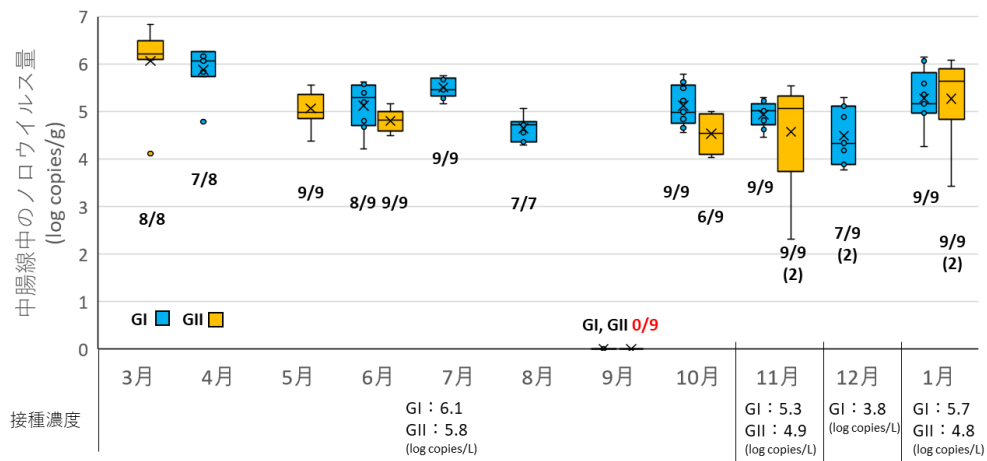


図10. 月別カキのノロウイルス蓄積量および陽性率の変化(2021-2022シーズン)

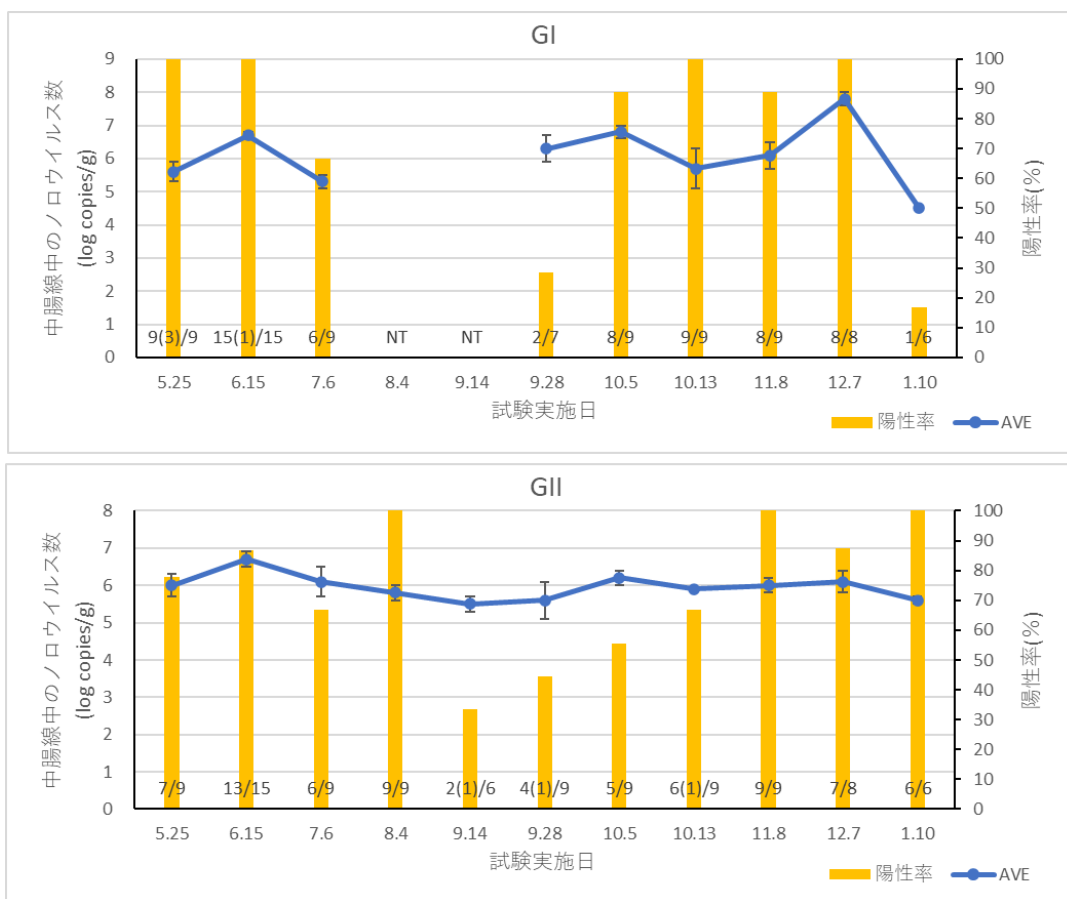


図11. 月別カキのノロウイルス蓄積量および陽性率の変化(2022-2023シーズン)

サポウイルスによる汚染カキ試料作製方法の検討

ノロウイルスの試験において決定した基本飼育条件でカキを飼育し、海水中にサポウイルス GII. 3を接種して中腸腺への取り込み量を調べた。GII. 3は細胞内に蓄積しやすい性質を有し、かつヒトでの集団感染事例においても主流となっている遺伝子型のひとつである。第一回目の試験では、 $8.9 \log \text{ copies/L}$ のウイルスを24時間毎に3回接種し、ウイルス汚染海水とカキの曝露時間が72時間になったところでカキを回収した。第二回目の試験では、 $8.9 \log \text{ copies/L}$ のウイルスを24時間毎に2回接種し、ウイルス汚染海水とカキの曝露時間が48時間になったところでカキを回収した。回収後、中腸腺を取出し、ノロウイルスの試験と同様の手順で中腸腺中のサポウイルス量を定量した。使用したサポウイルス検体は細胞で増殖させたものでありVirionを多く含むことが想定された。そのため、サポウイルスを用いた試験では、感染性推定遺伝子検査法で用いられるOligo-dTプライマーに加えてRandom primerを用いた逆転写も実施し、それぞれ定量PCRに供した。

その結果、 $8.9 \log \text{ copies/L}$ のサポウイルスを接種した海水で72時間カキを飼育することにより、カキ中腸腺内に $6.2 \pm 0.2 \text{ (SE)} \log \text{ copies/g}$ サポウイルスが蓄積された(図12)。また、接種回数を減らし、ウイルス汚染海水とカキの曝露時間を48時間とした場合、カキ中腸腺内に $5.6 \pm 0.2 \text{ (SE)} \log \text{ copies/g}$ のサポウイルスが蓄積された。サポウイルスによる汚染試験では、ノロウイルスによる汚染試験よりもカキ中のウイルス数のばらつきが少なかった。

また、カキに取り込まれたサポウイルスの排出されやすさについても検証を行った。 10^8 copies/25L になるようにサポウイルスを接種した海水でカキを飼育し、サポウイルス汚染カキ試料を作製した。汚染処理後、一部のカキは未浄化の状態で回収し、残りのカキを清浄海水にて24時間畜養し浄化処理とした。未浄化、および浄化処理後のカキは、中腸腺を切り出し、ノロウイルスと同様の手順で前処理後、RNA抽出に供した。なお、本試験においてはRNase処理は実施しなかった。抽出したRNAは、oligo-dTプライマーおよびrandom primerを両方用いる方法で逆転写し、逆転写産物を定量PCRに供した。

その結果、サポウイルス汚染後、浄化処理を施さなかったカキの中腸腺中のサポウイルス量は、 $4.2 \pm 0.3 \text{ (SE)} \log \text{ copies/g}$ であり、24時間清浄海水にて畜養したカキ中腸腺中のサポウイルス量は $4.7 \pm 0.1 \text{ (SE)} \log \text{ copies/g}$ であった(図13)。このことから、カキ中腸腺に取り込まれたサポウイルスも、ノロウイルスと同様にカキ中腸腺から排出されにくいことが示唆された。

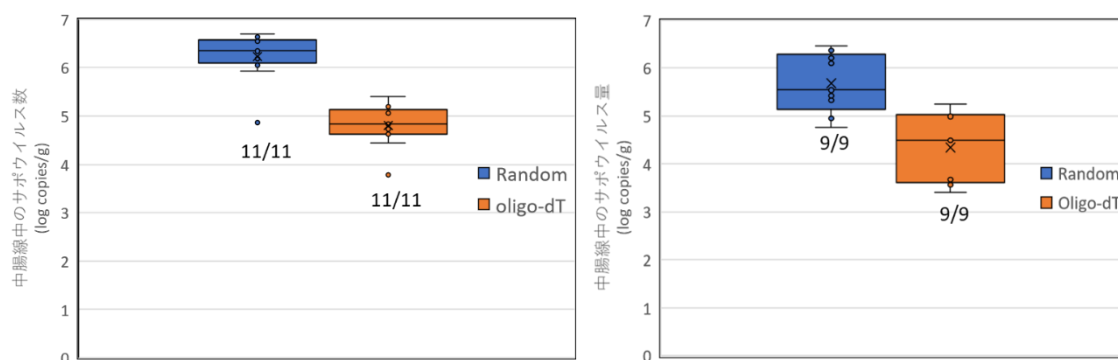


図12. サポウイルスによるカキ汚染試験結果(左：1回目試験、右：2回目試験)

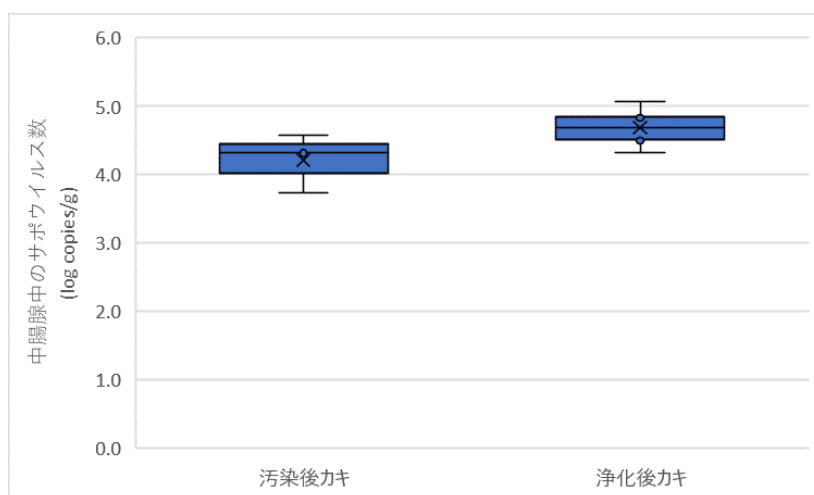


図13. サポウイルスによるカキ汚染試験結果

サポウイルスGII.3汚染ガキ中腸腺からのウイルスRNA抽出および検出の検討

水産技術研究所にてサポウイルスGII.3 4×10^8 copies/Lでサポウイルス汚染ガキを作製し、その後カキを回収、中腸腺摘出/トリミング後にDPBS(-)にて十分にホモジナイズした4サンプルを試験に用いた。従来のスピンカラム法とその前段としてパンクレアチンによる消化処理後にスピンカラム法によるRNA抽出を各々実施し、RT-PCRによる検出シグナルを比較した。その結果従来の方法に比べ、パンクレアチン処理を施したもので、RT-PCRのシグナルが顕著に増大した(図14)。

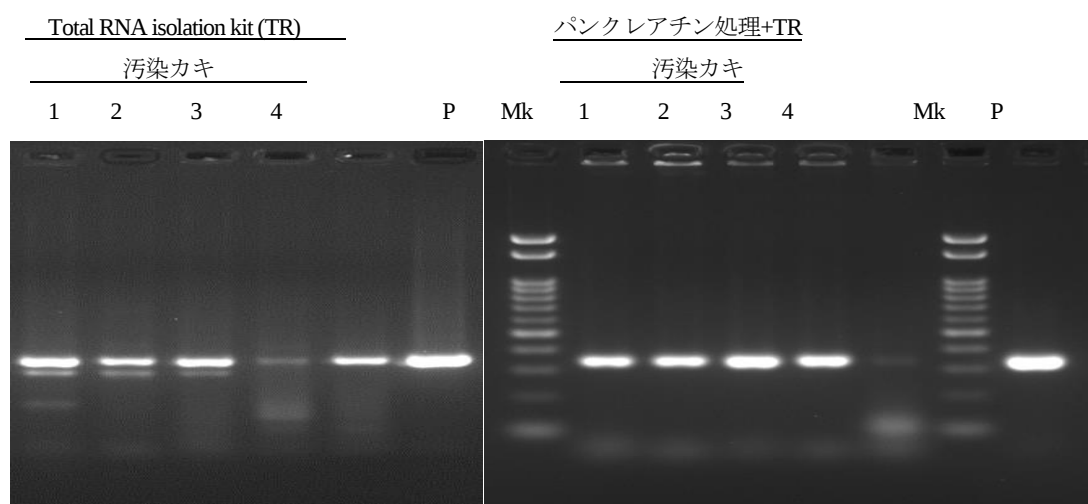


図14. サポウイルス汚染カキ中腸腺からのウイルス検出におけるパンクレアチン処理効果の検証結果

中腸腺サンプルからのウイルス培養分離；カキ中腸腺ホモジネートに添加したサポウイルスの細胞培養検出の検討

前項のウイルス遺伝子検出においても、中腸腺サンプル前処理の重要性が示唆されたため、中腸腺サンプルからの感染性ウイルスの細胞培養検出においてもいくつかの前処理法を検討した。非汚染カキ中腸腺ホモジネートに 1.2×10^6 copies/0.2mLとなるようサポウイルスGII.3を加え、①未処理②1/5容量のクロロホルムを添加し攪拌③パンクレアチン処理を施し、①～③を遠心分離して上清0.1mLをHuTu80細胞へ接種した。接種3、5、7日後の上清を回収し、抗原検出酵素抗体法(Ag-ELISA)により上清中のサポウイルス粒子の量的シグナル変化を調べた。その結果5日目において、パンクレアチン処理接種のもので、Ag-ELISAシグナルの上昇が認められた。その後7日目では未処理のものでもシグナル上昇が認められたが、パンクレアチン処理よりも弱く、またクロロホルム処理のものは7日目においても、抗原シグナルは確認されなかった(図15)。ノロウイルス培養系が汎用化された際に、これらの処理方法により、感染性ウイルスを確実に捕捉できるよう、さらに検証が必要であろう。

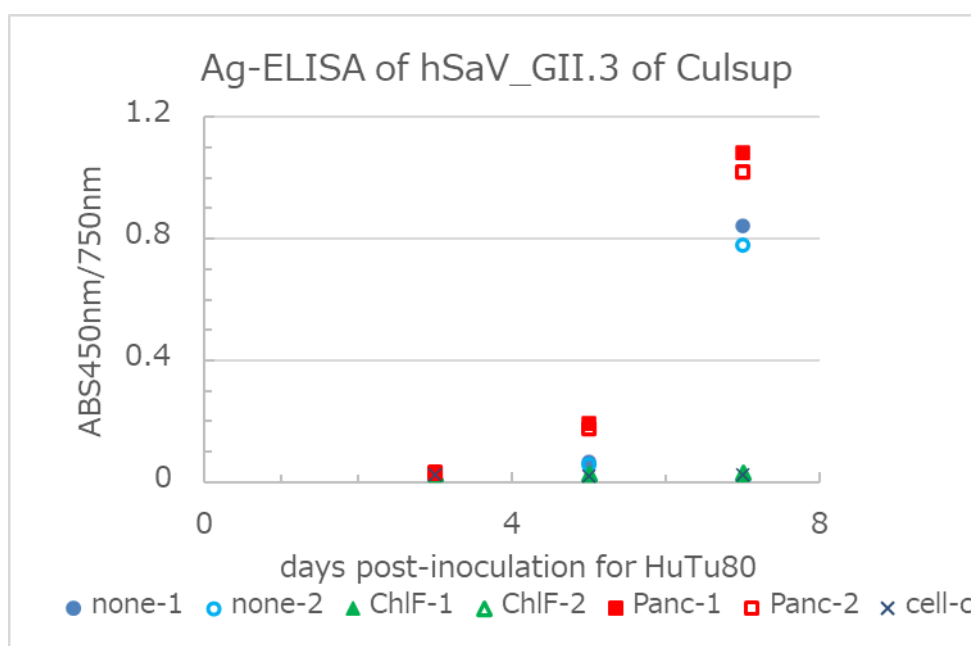


図15. 前処理法の違いによるカキ中腸腺試料に接種したサポウイルスの量的シグナル変化
 none : ①未処理 ChIF : ②クロロホルム処理 Panc : パンクレアチン処理
 各n=2で測定、未接種コントロール(cell-c)のみn=1

サポウイルスはヒトノロウイルスと同じカリシウイルス属に分類されるウイルスであり、実際にカキ中腸腺からの検出実績もある。サポウイルスは、培養法で増やすことができるため安定した供給が可能である。ノロウイルスの代替ウイルスとしての実証をさらに重ねる必要があるが、ノロウイルス代替ウイルスとしてカキのウイルス汚染対策の研究をするのに有用と考えられた。

(エ) 研究成果の活用における留意点

ノロウイルスはヒトに感染性のある食中毒ウイルスであるため、試験者の安全が守られた環境で試験を実施する必要がある。これについては、公表用の手順書に留意点を記

載して対応する。

これまでノロウイルスについて遺伝子トレースによる残存性は確認されてきているが、細胞培養系の汎用化および感染性粒子ストックなどが確保されておらず、よって感染性は「推定」の域を出ていない(陽性検体中のウイルス遺伝子コピー数≠感染性粒子)。こうしたことから中腸腺内での「ウイルスの感染性維持」については、その代替としてサポウイルスを用いた評価による考察が必要であった。今回は感染性ウイルスの添加試験にとどまったが、汚染ガキ中腸腺サンプルからの細胞培養検出について、引き続き様々な観点からの検証が必要である。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

ノロウイルスの入手について

ノロウイルスは、汎用性の高い細胞による培養法が確立されていない。そのため、ノロウイルス汚染カキ作製のためのノロウイルスは現時点では感染者の糞便検体を用いる以外に無いが、高濃度にノロウイルスを含む便検体を大量に入手することは医療倫理の面から現時点でも困難であるほか、今後もあまり期待できない。ヒトの胃腸炎ウイルスのうちノロウイルスと同様のカリシウイルス科に属するサポウイルスはin vitro培養系が確立されており、早急にサポウイルスを用いた汚染カキの作製、および汚染除去について検証をすすめるべきである。

感染性推定遺伝子検査法について

感染性推定遺伝子検査法は、通常のRT-qPCRと異なり、ウイルスゲノム末端のポリA配列から逆転写を行い、長鎖cDNAを合成することで、感染性ウイルスに由来すると推定される、より完全長に近いウイルスゲノムを選択的に検出する方法である。しかし、遺伝子検出であるので完璧に感染性ウイルスのみを検出しているわけではないことに留意する必要がある。

サポウイルスのヒトノロウイルス代替ウイルスとしての有用性について

ヒトノロウイルスの代替ウイルスとしてサポウイルスを用いるためには、サポウイルスを用いてカキを人為的に汚染させた場合に、取り込み～中腸腺内停留の過程においてノロウイルスと同様の挙動および相関性が認められるかは追加の検証が必要である。

また、ウイルス数の低減や不活性化の評価についてはより詳細な検証とノロウイルスとの相関性が確認されることが必要である。糞便由来のサポウイルスは、培養由来のサポウイルスと比較して熱や紫外線など物理的負荷に対し、高い抵抗性を有するため、カキへの汚染時に糞便成分と混合したうえで汚染させることも検討する必要があると考える。また培養細胞を用いた感染力価測定系は感度の底上げも課題である。

<引用文献>

- 1) 食品のウイルス汚染のリスク評価のための遺伝子検査法の開発と応用に関する研究
研究成果報告書

<https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=cho99920131203&fileId=1203>

2) 小課題名：カキおよび海水中の病原性微生物低減法の検討

(ア) 研究目標

カキの浄化には、現在UV処理等により病原性微生物を殺菌した海水が用いられてい

る。浄化用の海水にはノロウイルスをはじめとする病原性微生物が含まれていないが、現在行われている各処理によってヒトノロウイルスがどの程度低減されているのか、正しく評価した例はない。そこで本研究では、はじめに海水の各種殺菌処理によるノロウイルスの低減効果を検証する。

次に、カキ中の病原性微生物を低減させる浄化法について検討する。カキの生産現場では、出荷前のカキを殺菌海水などの中で畜養し、病原性微生物を排出させる浄化処理が施されている。本研究においては、生産現場で実際に利用されている浄化条件によりヒトノロウイルスに汚染されたカキを浄化し、効果を検証する。また、浄化海水の温度や塩分濃度などの違いによる浄化効率の違いも検証する。

(イ) 研究内容

(1) 海水中のノロウイルスを含む病原性微生物低減法の検討

現在、カキ浄化用の海水から病原性微生物を取り除く方法として一般的に利用されている方法は、ろ過やUVなどによる処理であるが、これらの処理による病原性微生物低減効果を検証する。具体的には、海水に病原性微生物を人為的に接種し、様々な処理条件によるウイルスの低減効果を調査する。本課題においては病原性微生物として、ヒトノロウイルス、サポウイルス、大腸菌、大腸菌群の細菌、腸炎ビブリオについて低減効果を調べる。細菌の数は適切な鑑別培地を用いて測定する。ノロウイルスは感染性推定遺伝子検査法を用いて定量し、サポウイルスは遺伝子定量法のほか、感染性の有無を加味した方法でも低減効果を調べる。

(2) 浄化によるカキ中の病原性微生物低減法の検討

病原性微生物により汚染されたカキを、病原性微生物に汚染されていない海水中で畜養して浄化し、浄化の前後におけるカキ中の病原性微生物量の変化から、浄化効果を検証する。具体的には、生産現場で実際に行われている浄化法について検証するほか、浄化用海水の温度やpH、塩分濃度、カキへの給餌条件を変えた場合に病原性微生物の排出効率がどのように変化するか調べる。また、浄化水槽内に、ノロウイルスの代替ウイルスへ不活化効果を示す食品添加物を添加し、カキ中のノロウイルス低減に効果があるのかも合わせて検証する。これらの検証結果から、カキの病原性微生物排出効率が高い浄化条件を明らかにする。

本課題においても(1)と同様に二枚貝を汚染する病原性微生物として、ノロウイルス、大腸菌および大腸菌群の細菌、腸炎ビブリオを調査の対象とする。実験には小課題1で検討した手法を用いて作製されたノロウイルス汚染カキを使用する。ノロウイルスの定量には、感染性推定遺伝子検査法を用い、細菌数の測定には適切な鑑別培地を使用した培養法を用いる。

(ウ) 研究結果

(1) 海水中のノロウイルスを含む病原性微生物低減法の検討

海水中のノロウイルスを含む病原性微生物低減法の検討

カキの浄化用海水および汚染カキ試料作製時の排水の処理方法として効果があると考えられる、次亜塩素酸ナトリウムの添加による海水中の病原微生物の低減効果を調べた。10℃もしくは20℃に調温した砂ろ過海水1Lに、およそ5.2 log cfu/Lになるように腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC17802/NCTC10885の混合) を接種した。そこに0.2, 2, 10, 50ppm になるように次亜塩素酸ナトリウムを添加して1時間静置し、その後

生残している菌数を測定した。20℃に調温した海水を0.2、2ppm の次亜塩素酸ナトリウムで処理した場合には、腸炎ビブリオはそれぞれ 4.2 ± 0.08 、 $4.9 \pm 0.2 \log \text{cfu/L}$ 減少し、10ppmの次亜塩素酸ナトリウムで処理した場合は、腸炎ビブリオが検出されなくなった。10℃に調温した海水を0.2ppm の次亜塩素酸ナトリウムで処理した場合には、腸炎ビブリオは $4.4 \pm 0.05 \log \text{cfu/L}$ 減少し、2ppmの次亜塩素酸ナトリウムで処理した場合は、腸炎ビブリオが検出されなくなった（図16）。

大腸菌*Escherichia coli* (ATCC11775, ATCC25922の混合)は、およそ $7.0 \log \text{cfu/L}$ になるように海水に接種して、先の実験と同様の条件で試験を行った。その結果、20℃に調温した海水を0.2、2、10、50ppm の次亜塩素酸ナトリウムで処理した場合には、大腸菌はそれぞれ、 4.8 ± 0.2 、 5.5 ± 0.06 、 6.2 ± 0.07 、 $6.5 \pm 0.2 \log \text{cfu/L}$ 減少した。また、200ppmの次亜塩素酸ナトリウムで処理した場合に大腸菌が検出されなくなった。10℃に調温した海水を0.2、2、10、50ppm の次亜塩素酸ナトリウムで処理した場合には、大腸菌はそれぞれ、 4.7 ± 0.06 、 5.3 ± 0.04 、 5.7 ± 0.04 、 $6.0 \pm 0.1 \log \text{cfu/L}$ 減少した。また、100ppmの次亜塩素酸ナトリウムで処理した場合に大腸菌が検出されなくなった（図16）。

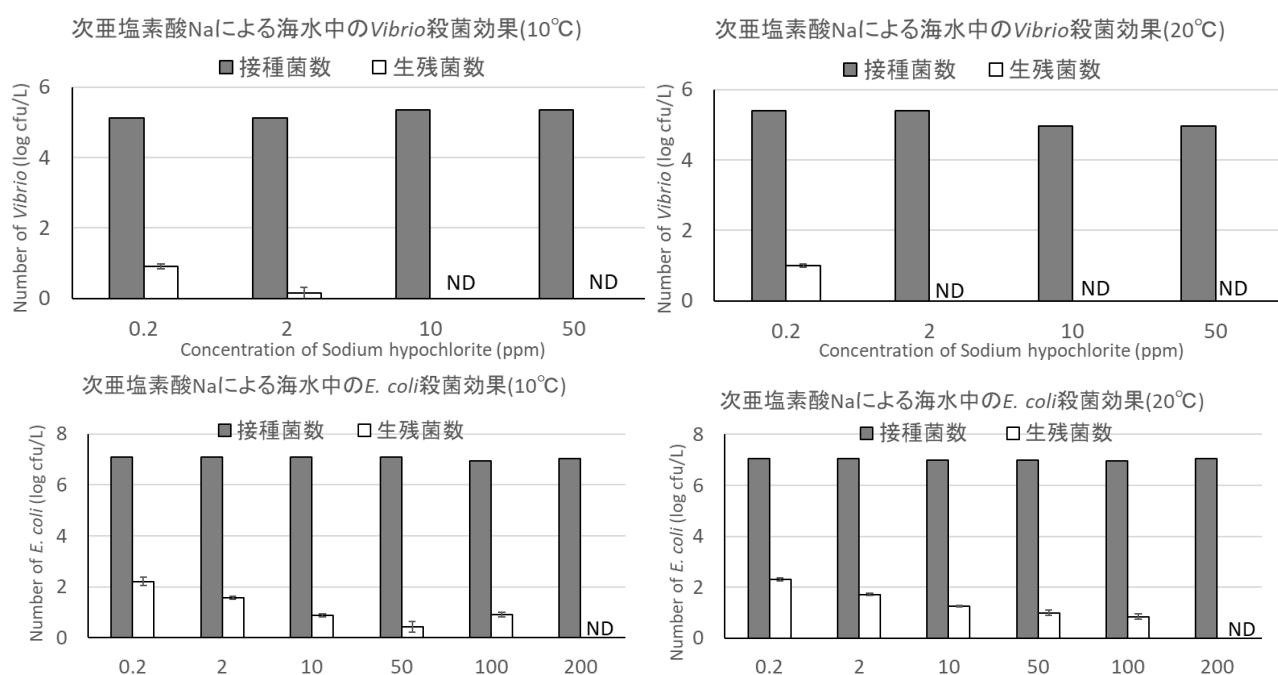


図16. 次亜塩素酸ナトリウム処理による海水中の腸炎ビブリオおよび大腸菌への殺菌効果

海水からのノロウイルス回収および検出の検討

これまで海水からのウイルス回収については有効な手法が確立されておらず、従来汎用されているポリエチレングリコール(PEG6000)による共沈法によっても、特にカリシウイルスの回収率は20%以下であった。そこで海水中のノロウイルス回収方法を検討した。その結果、PEG6000共沈にカルボキシメチルセルロース(CMC)を一定量添加することで、回収を向上させることを見出した。

さらに取水海水(水産技術研究所)にノロウイルスGI.7を一定量添加し、PEG6000/CMC共沈法による検出感度限界を確認した。30 mlの海水にノロウイルスを 1.2×10^3 、 10^4 、 10^5

copies接種し、そこに3 gのPEG6000を入れ完全に溶解するまで転倒混和した。次に、0.6 mlの1% CMC-Na(カルボキシメチルセルロースナトリウム)を加え、完全に溶けるまでよく転倒混和し、溶解後にローテーターにセットして4度で一晩混和した。オーバーナイト後、12000 x gで1時間遠心分離し、上清を除去してペレットを得た。次に、ペレットに1mlのPBSを加え、PBSがペレットを覆うようにチューブを傾け、4度で1時間インキュベートした。インキュベート後、ペレットをPBSに懸濁し、RNA抽出用サンプルとした。懸濁液からRNAを抽出し、ランダムプライマーを用いた逆転写反応に供した。その後、1st PCR : COG1F/G1SKR、2nd PCR : G1SKF/G1SKRを用いたnested-PCRに供した。PCR後、アガロースゲル電気により増幅産物の有無を確認した(図17)。その結果、RT-PCRにより30mLあたり 1.2×10^3 copiesまでの検出が可能であることが明らかになった。また、nested-PCRを行った場合にも結果は変わらなかった。

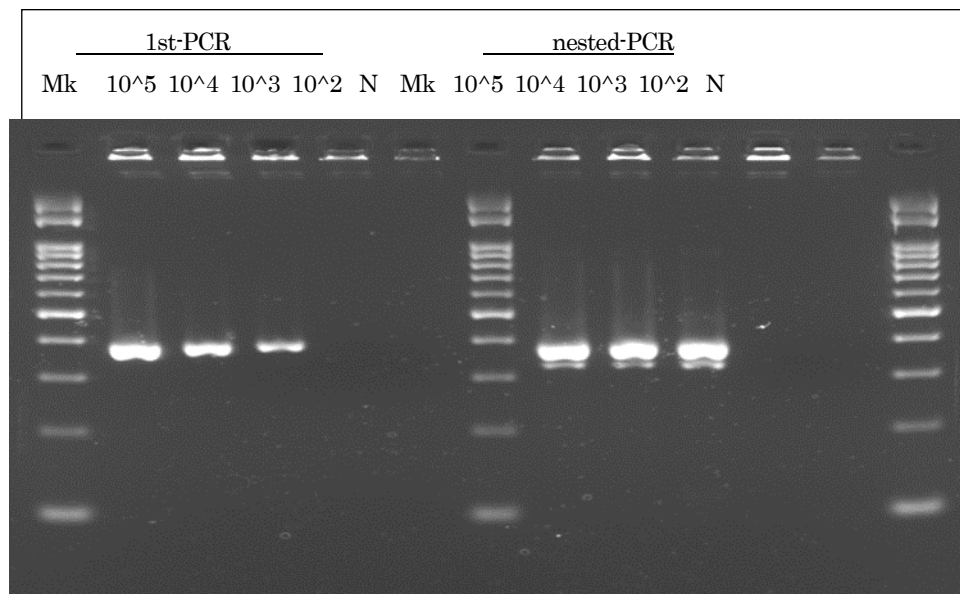


図17. PEG6000およびCMC-Naを共沈材として用いた海水からのノロウイルス回収方法の検出感度

次亜塩素酸ナトリウムによる海水中のノロウイルス低減量の検証

次に、次亜塩素酸ナトリウムによる海水中のノロウイルスの低減効果を検証した。4度に保存した海水30mlにノロウイルスGI.7を 10^5 copies/mlになるように接種し、そこへ次亜塩素酸ナトリウムを添加した。次亜塩素酸ナトリウムは、海水中の終濃度が100, 200, 500, 1000 ppmになるように添加した。次亜塩素酸ナトリウムの添加から15分後に2Mチオ硫酸ナトリウムを添加し、次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌効果を中和した。また、比較対照用に、次亜塩素酸ナトリウム0ppmの試験区を用意した。本試験区は、海水に先に2Mチオ硫酸ナトリウムを0.75 ml添加したのち、終濃度が1000ppmの試験区と同量の次亜塩素酸ナトリウムを添加した。

チオ硫酸ナトリウムの添加後、海水に3 gのPEG6000を加え完全に溶けるまでよく転倒混和した。その後は先の検討実験と同様の手順でノロウイルスを検出した。また、感染性推定遺伝子検査法に近づけた手法として、oligo-dTプライマーのみを用いて逆転写を

行い、同様にnested-PCRに供する方法でも試験を行った。サンプルはすべてn=2で評価した。その結果、次亜塩素酸ナトリウム0ppmになるように調整した試験区ではポジティブコントロールと同じ位置(340bp)に増幅産物が確認された(図18)。しかし、100ppm以上の次亜塩素酸ナトリウムで処理した場合には増幅産物が確認できなかった。この結果は、oligo-dTプライマーのみで逆転写した場合と同様であった。予備検討において、海水中のノロウイルスが 10^3 copies/mlの場合に本法の検出限界があったことから、100ppmの次亜塩素酸ナトリウムにより 10^5 copies/mlのノロウイルスが 10^3 copies/ml以下にまで減少したことが示唆された。

次亜塩素酸ナトリウムによる微生物の不活化効果は温度が高いほうが強力であることが分かっている。そのため、ノロウイルス汚染カキを作製後の海水の処理方法として、1000ppmの次亜塩素酸ナトリウムを添加する方法は妥当であると考えられた。

UVおよび生物ろ過によるノロウイルス低減量の検証には、10L以上の海水を要することからノロウイルスの残量を考えて実施しなかった。今後、より小スケールの実験系もしくはより高感度な試験系を用意して評価する必要があると考えられた。

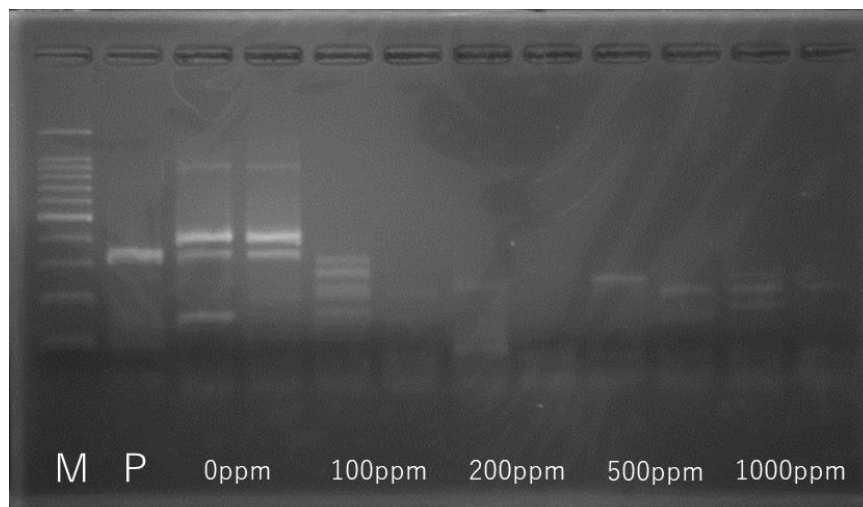


図18. 海水中のノロウイルス不活化試験の電気泳動結果

M: 100bpマーカ、P: ポジティブコントロール(340bp産物)

*各試験区の産物(n=2)を2レーンずつ流した

(2) 浄化によるカキ中の病原性微生物低減法の検討

はじめに、ノロウイルス汚染カキ試料を清浄海水で飼育し、中腸腺中のウイルス量の変化を調べた。小課題1で検討し、決定した高濃度汚染カキ作製方法にならってノロウイルスGI.7汚染カキを18個作製した。その後、9個は汚染終了時に回収し中腸腺中のノロウイルス量を測定した。残りの9個は新しいマリンアートHi（人工海水）を用意した水槽に移し6日間飼育した。6日後、汚染カキと同様の方法で中腸腺中のノロウイルス量を測定した。

その結果、汚染後未浄化のカキ中腸腺中には 5.3 ± 0.2 log copies/gのウイルスが確認された(図19)。また、9個すべてでノロウイルス量が定量可能範囲であった。6日間浄化したカキの中腸腺中には、 4.8 ± 0.2 log copies/gのノロウイルスが確認された。また、9個すべてでノロ

ウイルスが検出されたが、うち2個体でノロウイルス量が定量下限を下まわった(図19)。汚染カキを清浄海水に入れて6日間飼育すると、中腸腺中のウイルス数は約0.4 log copies/g減少した。しかし、1桁以上のウイルス数の減少はなく、カキに取り込まれたノロウイルスが中腸腺内にとどまり、清浄海水での畜養ではほとんど排出されないことが明らかとなった。

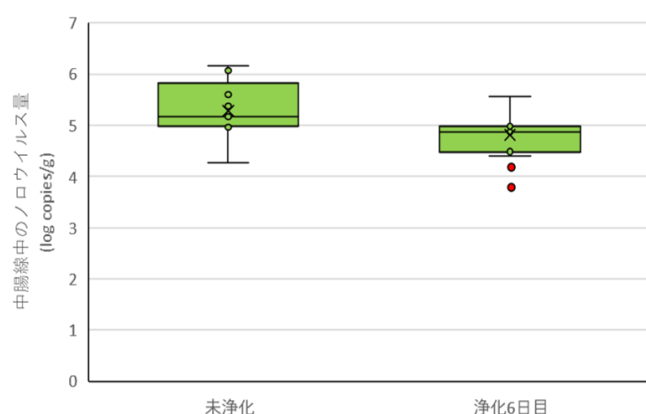


図19. 浄化(清浄海水での飼育)の前後における汚染カキ中腸腺内のノロウイルス量

次に、カキ浄化用海水の水温、pH、塩分濃度を変化させた際の、カキ中腸腺中のノロウイルス低減効果を検証した。計画にある給餌の有無の違いについては、ノロウイルスの残量に限りがあることから検証しないこととした。先の小課題で確立した高濃度ノロウイルス汚染カキの作製法に則り、高濃度汚染カキを作製した。なお、ノロウイルスGI.7およびGII.17を用いて、同時に汚染させる供汚染を行った。汚染カキは一部をそのまま回収し未浄化検体としてノロウイルスを定量した。一回目の試験では、浄化用カキを20℃および25℃の水槽に入れて24時間浄化処理を施した。25℃の水槽は循環する海水がUVランプを通過する仕様のものを使用した。浄化処理後、各水槽から5-6個を回収しノロウイルス量を定量した。

その結果、ノロウイルスGI.7は浄化用海水の温度に関わらずほとんど浄化されなかったが、GII.17は25℃で浄化した場合に中腸腺中のノロウイルスが非検出となる個体が多く、取り込まれたノロウイルスが浄化された可能性が示唆された(図20, 21)。

二回目の試験では、同様に25℃で浄化した場合に中腸腺中のノロウイルスGII.17が非検出となる個体が多く見られた。ノロウイルスGI.7は汚染濃度を下げる目的で海水への接種濃度を変更したため、汚染試料作製に失敗した(data not shown)。

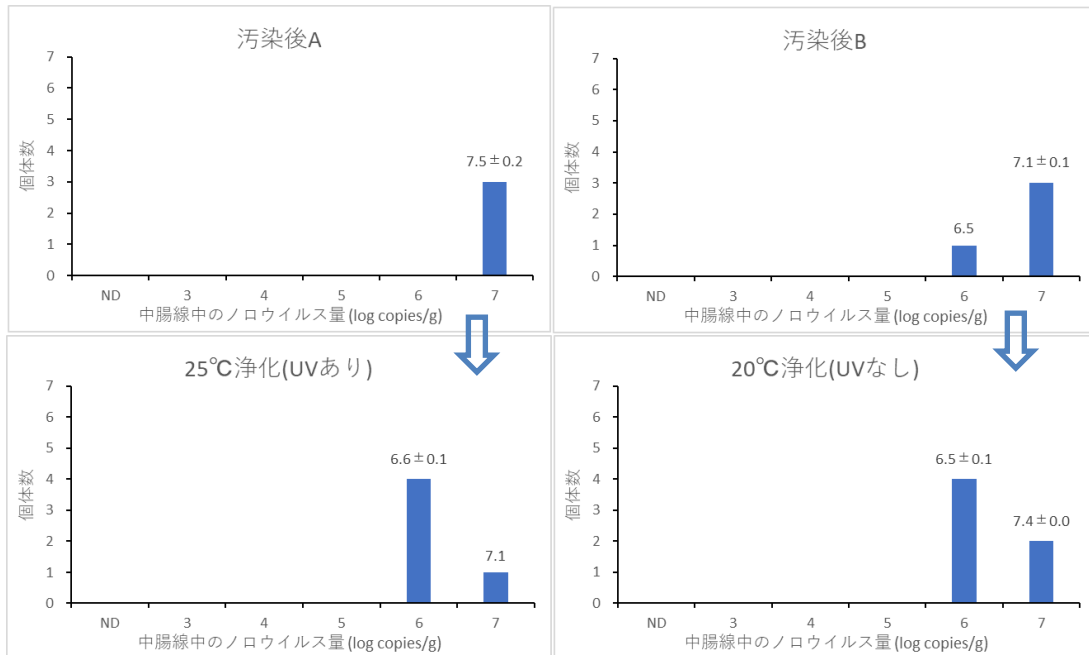


図20. 高濃度汚染後(上段)および20℃・25℃海水で浄化後(下段)のカキ中腸腺中のノロウイルスGI量

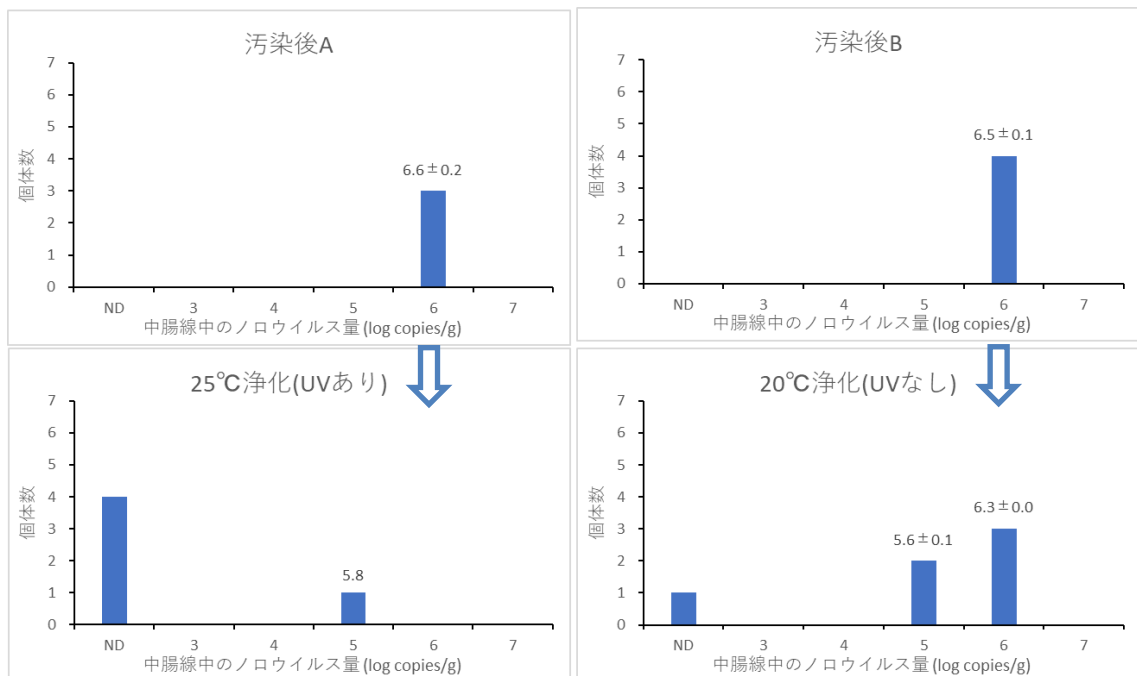


図21. 高濃度汚染後(上段)および20℃・25℃海水で浄化後(下段)のカキ中腸腺中のノロウイルスGII量

続いて、浄化用海水のpHを9.0に調製して浄化処理を施した際のカキ中腸腺中のノロウイルス量の変化を調べた。その結果、pH9.05の海水で浄化処理を施した場合に、ノロウイルスGII.17において中腸腺中のノロウイルスが非検出となる個体が多く見られた(図22)。このことから、pH9.0の海水でカキに浄化処理を施すことで中腸腺中のノロウイルスが不活化される可能性が示唆された。ノロウイルスGI.7は、汚染濃度を下げる目的で海水への接種濃度を変更したため、汚染試料作製に失敗した(data not shown)。

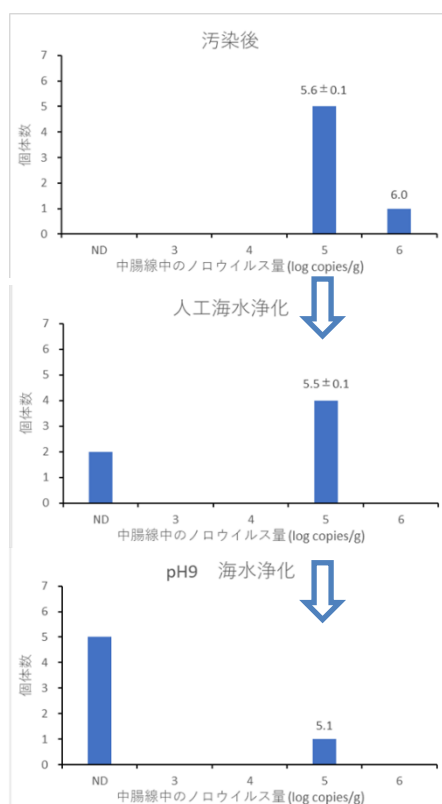


図22. 高濃度汚染後(上段)およびpH9.05・通常の人口海水で浄化後(下段)のカキ中腸腺中のノロウイルスGII量

次に、鮮魚介類に使用が認められている殺菌料(次亜塩素酸ナトリウム)を添加した海水でカキに浄化処理を施し、中腸腺中のノロウイルス量がどのように変化するか調べた。1回目の試験は次亜塩素酸ナトリウムを2ppm, 20ppm、2回目の試験は20ppm, 200ppmになるように調整した海水に、ノロウイルスGI.7およびGII.17を共汚染させた高濃度汚染カキを入れ、24時間浄化処理を施した。24時間後にカキを回収し、中腸腺中のノロウイルス量を定量した。

その結果、20ppmまでの次亜塩素酸ナトリウム濃度ではカキ中腸腺中のノロウイルス量が減少する様子は見られなかった(図23, 24)。次亜塩素酸ナトリウム濃度が200ppmの時は、浄化処理後に中腸腺中のノロウイルスが非検出となる個体が増えた(図25, 26)。しかし、200ppmの次亜塩素酸ナトリウムに暴露したカキは外套膜縁がはがれていたため、本処理方法は実用化が厳しいと考えられた。塩素系殺菌剤のカキ中のノロウイルスに対する浄化効果が低かったため、ノロウイルス検体の残量が少ないこともあり、亜塩素酸水による浄化効果の検証は見合わせた。また、そのほか浄化効果を検証予定であった食品添加物は、食品衛生法で鮮魚介類への使用が

認められていないことから、実用可能性が低いと考えられたため、検証を行わなかった。

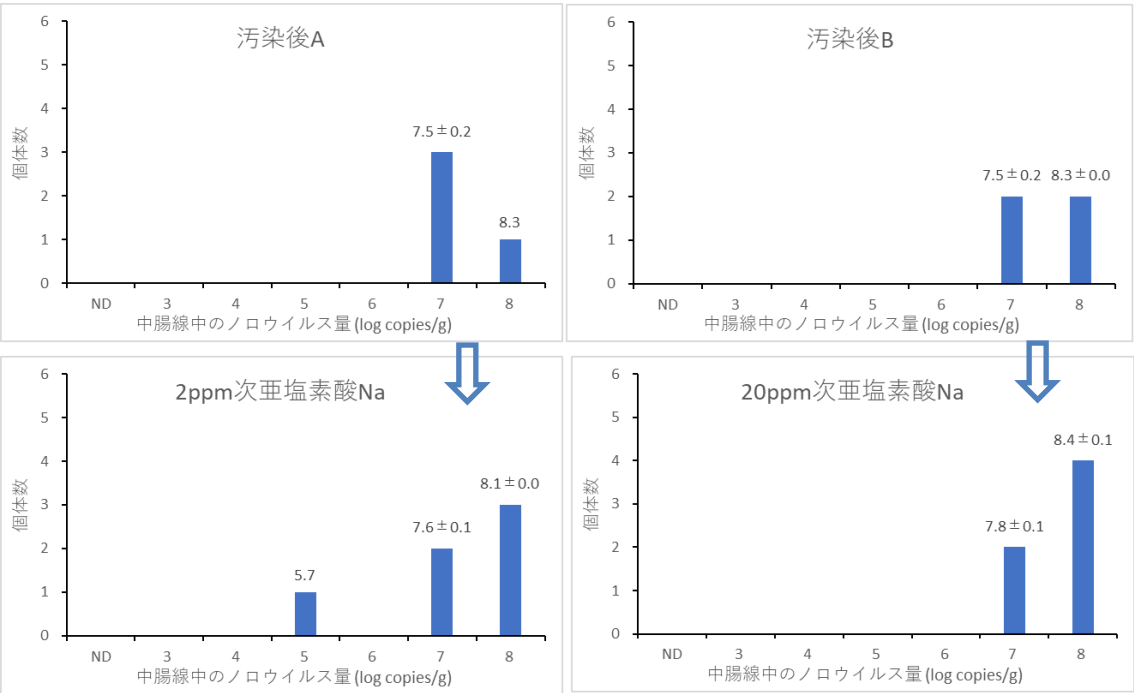


図23. 高濃度汚染後(上段)および次亜塩素酸Na添加海水で浄化後(下段)のカキ中腸腺中のノロウイルスGI量

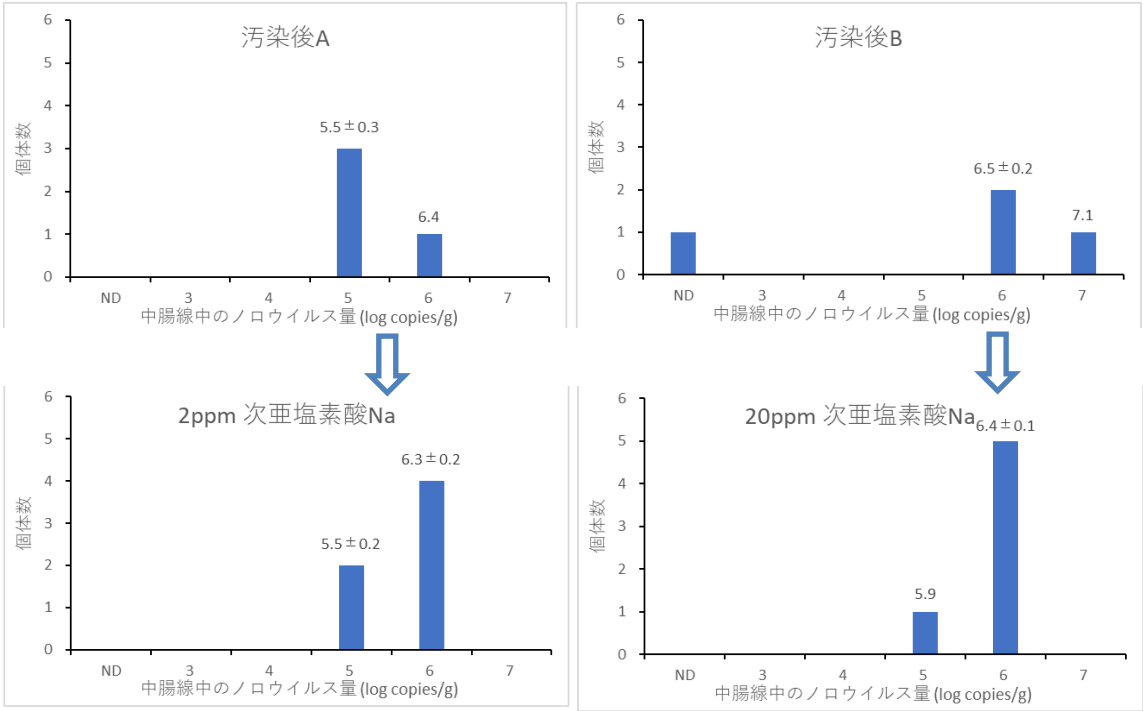


図24. 高濃度汚染後(上段)および次亜塩素酸Na添加海水で浄化後(下段)のカキ中腸腺中のノロウイルスGII量

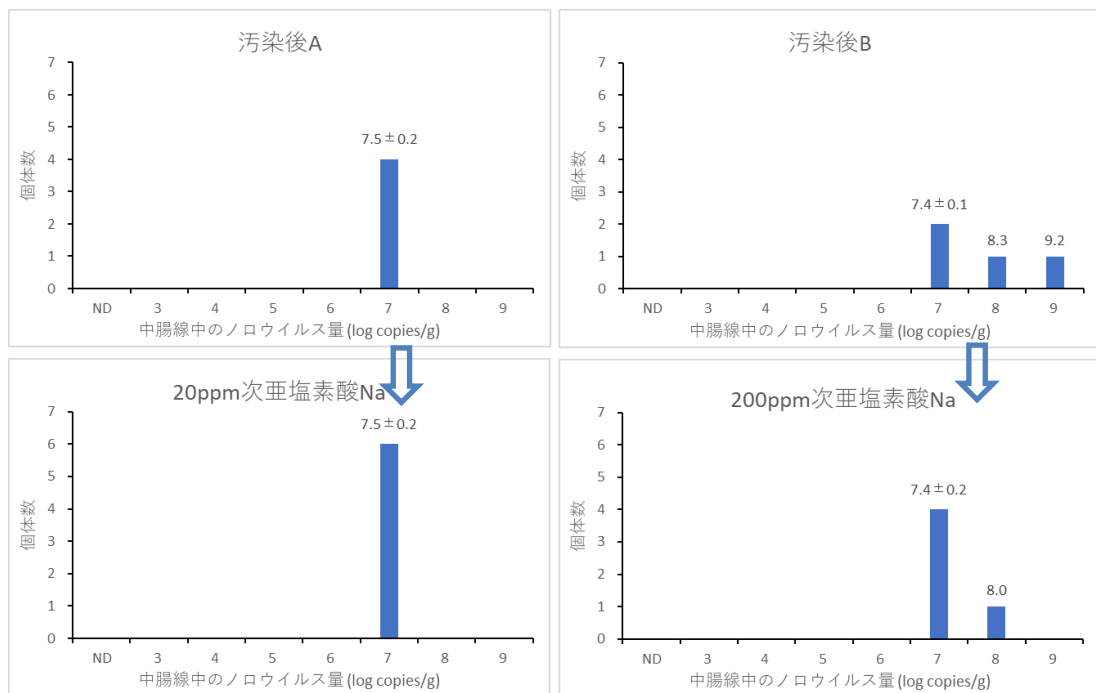


図25. 高濃度汚染後(上段)および次亜塩素酸Na添加海水で浄化後(下段)のカキ中腸腺中のノロウイルスGI量(2回目)

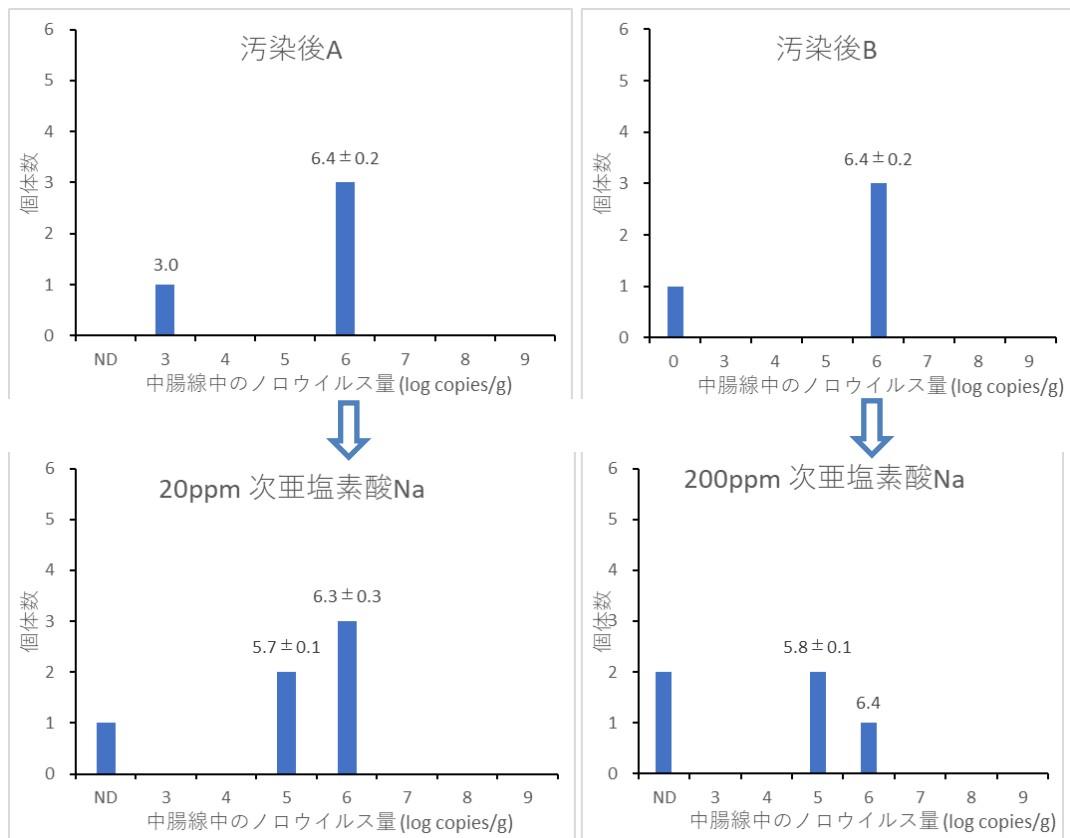


図26. 高濃度汚染後(上段)および次亜塩素酸Na添加海水で浄化後(下段)のカキ中腸腺中のノロウイルスGII量(2回目)

(エ) 研究成果の活用における留意点

海水からのノロウイルス回収法の検討において今回新たに開発したPEG6000/CMC共沈法は、予備試験結果からもCMC量を多くすることで、より回収率が上がることを示唆されている。しかしながら、添加したCMCはほぼ共沈されるため、CMCの添加量を多くすると沈査の再懸濁時に非常に粘性が強くなり、取扱が難しくなる。また、CMCは低温下で溶解しやすいことも勘案すると、扱いやすさ、もしくは回収率を優先させるかは、試験の目的に合わせ判断する必要があると考えられる。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

海水からのウイルス回収法の検討において、検出感度を考慮した場合、定量PCRによる定量値算出はその値の精度から、未だ検証が必要と考える。これまでの経験上、定量PCR感度は一般のPCRと比較して低いため、何らかの感度の底上げ方法が必要と考えられる。

<引用文献>

なし

3) 小課題名：ヒトノロウイルス汚染カキの作製および病原性微生物浄化法の実証化

(ア) 研究目標

小課題1にてまとめたウイルス汚染カキ試料の作製方法について、作業者が適切に試料を作製できるよう手順書にまとめる。さらに、手順書に従ってノロウイルス汚染カキ試料を作製し、再現性等を検証する。また、小課題2にて特に高い病原性微生物の低減効果が見られた手法について、カキ生産現場を考慮したより大きなスケールで試験し、その効果を調べる。

(イ) 研究内容

(1) ノロウイルス汚染カキ試料作製法の手順書作成

小課題1でまとめた、低濃度、中濃度、高濃度のノロウイルスに汚染されたカキ試料を作製するための条件について都道府県の水産関係の研究所などで活用されるように手順書の作成を行う。さらに、作成した手順書に従って作業を行い、再現性を検証する。また、小課題2- (1)において、高いノロウイルス低減効果を示した手法をもとに、ウイルス汚染カキ試料作製時に生じるウイルス汚染廃液の処理法を検討し、廃液の処理方法として手順書に記載する。作成する手順書は、作業者が重要なポイントをおさえつつ安定して試料を作製できるよう、チェックボックスを入れるなどの工夫を施す。

(2) カキ中の病原性微生物を低減する効果的な浄化法の実証化試験

小課題2にて病原性微生物の高い低減効果が見られた浄化法について、実際のカキ生産者の設備、規模に近づけた環境で試験し、必要に応じて内容を改変する。本小課題において最終的にまとめた浄化効果に関する検証結果は、カキ生産現場における有効な衛生対策指導のため、カキ生産都道府県の関係者に提供する。

(ウ) 研究結果

(1) ノロウイルス汚染カキ試料作製法の手順書作成

小課題1の成果から、ノロウイルスの低、中、高濃度に汚染されたカキ試料の作製

具体的には、カキ生産海域から汲み上げたろ過海水 175 L中にカキを 70個収容し、水温 10~20℃で1日以上馴致した。水温は馴致と同様にして、馴致水槽の海水中にノロウイルス GⅡ.4 を海水中の終濃度が 2.8、4.8、5.8、6.8、7.2 log copies/L、ノロウイルス GⅡ.17 を 3.8、4.8、5.8 log copies/L、ノロウイルス GⅠ.7 を 3.8、4.8、6.8log copies/Lになるようにそれぞれ接種した。接種24時間後に再び同一濃度のウイルスを接種し、更にその24時間後にカキを回収した。回収したカキから中腸腺を摘出し、前処理を施し水産技術研究所に送付した。そして、感染性推定遺伝子検査法を用いてウイルス量を定量した。

中腸腺中の平均ウイルス量
(log copies/g)

箱ひげ図の凡例:
最大値
平均値
中央値
最小値

隔性数/検体数
(定量下限値以下検体数)

0/18 (0) 2.8 ①
0/18 (0) 2.8 ②
0/18 (0) 2.8 ③
0/18 (0) 4.8 ①
0/18 (0) 4.8 ②
0/18 (0) 4.8 ③
3/18 (3) 4.8 ④
2/8 (0) 5.8 ①
1/15 (1) 5.8 ②
2/8 (2) 5.8 ③
4/8 (0) 5.8 ④
11/19 (3) 6.8 ①
12/19 (4) 6.8 ②
11/20 (0) 6.8 ③
17/20 (9) 6.8 ④
6/8 (1) 6.8 ⑤
18/18 (0) 7.2 ①
17/18 (0) 7.2 ②
7/8 (0) 7.2 ③

終濃度 (log copies/L)

ノロウイルス GII.4は、終濃度 7.2 log copies/Lで接種すると安定的にウイルスを取り込んだ。一方、6.8 log copies/Lはウイルスを取り込んだが、定量下限値以下の個体が出現し、それよりも低濃度ではウイルスの取り込みが著しく低下した(図27)。

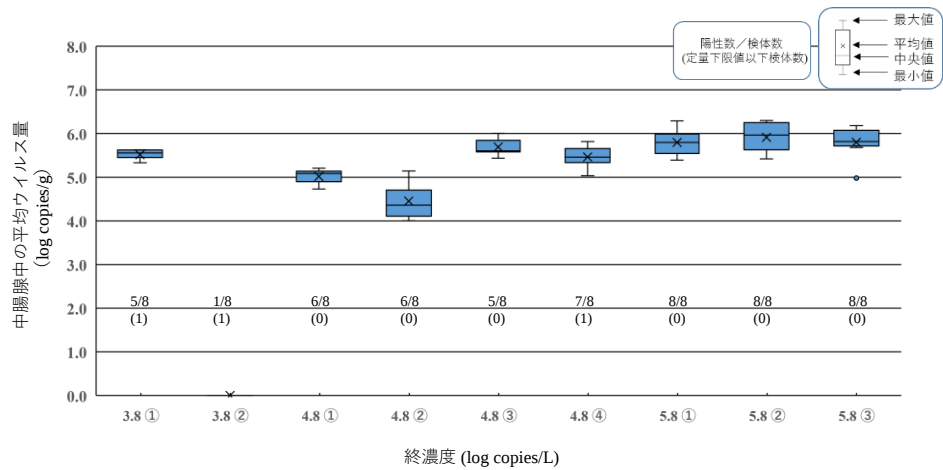


図28. ノロウイルスGⅡ.17の終濃度別のカキ中腸腺中のウイルス取込量

ノロウイルス GⅡ.17は、終濃度 4.8、5.8 log copies/Lで接種すると安定的にウイルスを取り込んだ。一方、3.8 log copies/Lは、実験1回目は取り込んだが、2回目は取り込まなかった(図28)。

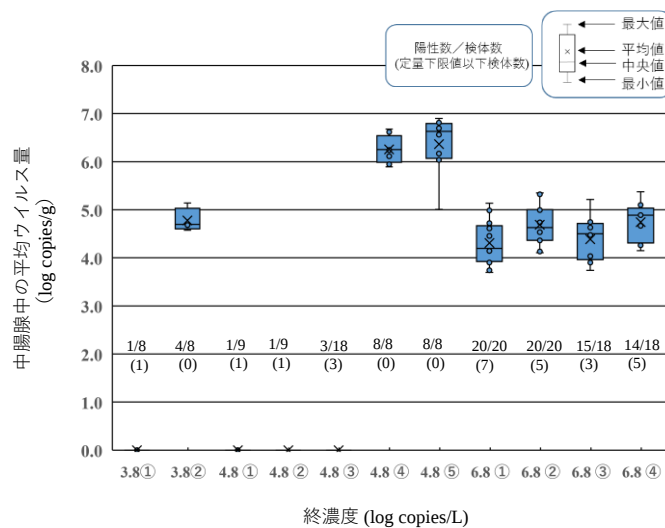


図29. ノロウイルスGⅠ.7の終濃度別のカキ中腸腺中のウイルス取込量

ノロウイルス GⅠ.7は、終濃度 6.8 log copies/Lで接種するとウイルスを取り込んだが、定量下限値以下の個体が出現した。また、終濃度 4.8log copies/Lでは、5回中2回の実験で全個体が定量下限値以上のウイルス量を取り込んだ。それ以外は安定的にウイルスを取り込まなかった(図29)。

以上より、本実験方法で安定的にノロウイルス汚染カキを作製するには、ノロウイルスGⅡ.4では終濃度 7.2 log copies/L以上、ノロウイルスGⅡ.17では終濃度 4.8 log copies/L以上、ノロウイルスGⅠ.7では終濃度 6.8 log copies/L以上のウイルスを接種

する必要がある事が明らかになった。遺伝子型によって、取込量が異なる事は既に示唆されており（Maalouf et al., 2011）、本実験もこれを反映した結果になったと考えられた。

（２）カキ中の病原性微生物を低減する効果的な浄化法の実証化試験

小課題 2にて、低減効果が見られた浄化法について、同一の条件下で大規模化した実験を行い、再現性が得られるか検討した。浄化実験は、浄化水槽の水温を調温した実験とpHを調整した実験をそれぞれ行った。

浄化実験に使用する汚染カキは、ウイルスの接種方法のみ変更し、前述と同様の方法で作製した。ウイルスの接種方法は、海水中にノロウイルス GⅠ.7、GⅡ.17を海水中の終濃度が 4.8 log copies/Lになるようにそれぞれ接種し汚染した。そして、汚染カキの一部を前述の方法でウイルスを定量し、汚染状況を確認した。尚、入手できたウイルスの濃度が低く、前述の安定的に汚染する濃度よりも低濃度となった。

水温を調整することによる浄化実験

作製した汚染カキを用いて、水温浄化実験を行った。水温 20℃と 25℃に調温した水槽に汚染カキをそれぞれ収容し、24時間後に回収した。回収したカキは前述の方法でウイルスを定量した。

[結果及び考察]

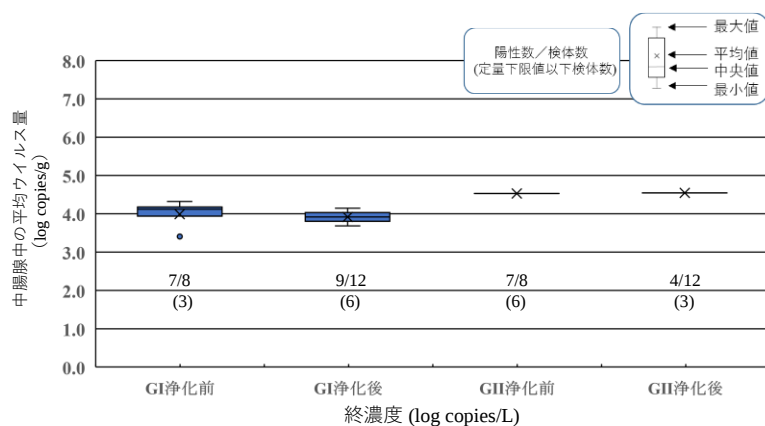


図30a. 水温 20℃浄化によるカキ中腸腺中のウイルス取込量の変化

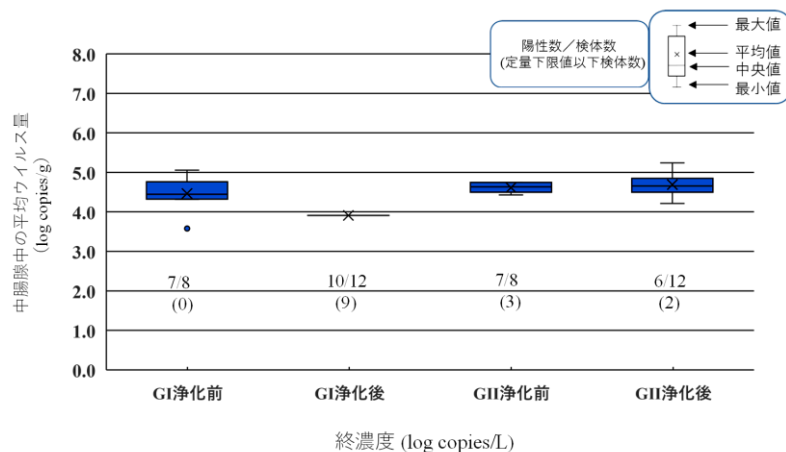


図30b. 水温 25℃浄化によるカキ中腸腺中のウイルス取込量の変化

水温 20℃および 25℃で浄化したカキは、浄化前よりもウイルス陽性カキの割合が減少したが、浄化後も陽性カキの数が多かった(図30a, 30b)。本実験では 実験装置にUV殺菌装置を組み込めなかったことから、カキが排出したウイルスを再度取り込んだ可能性が考えられた。

pHを調整することによる浄化実験

pH浄化実験は、20℃に調温し、ろ過海水を貯め、水酸化ナトリウムを用いてpHを調整した水槽 (pH9.03) とpHを調整しなかった水槽 (pH8.30) に汚染カキをそれぞれ収容し、24時間後に回収した。回収したカキは前述の方法でウイルスを定量した。

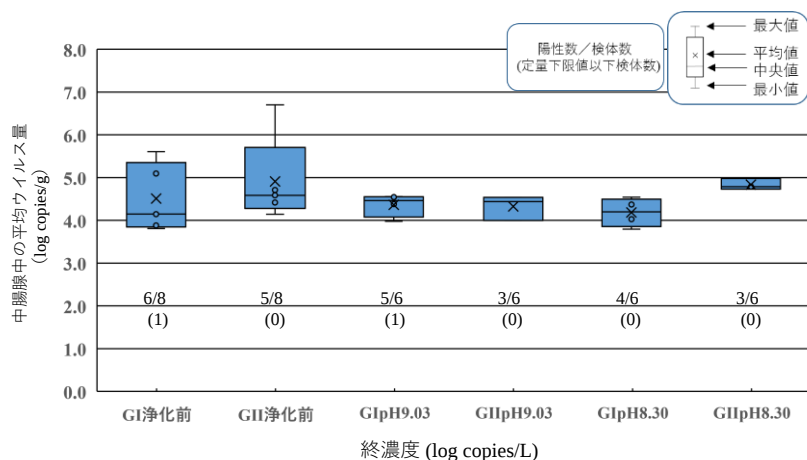


図31a. pH浄化によるカキ中腸腺中のウイルス取込量の変化 (実験 1回目)

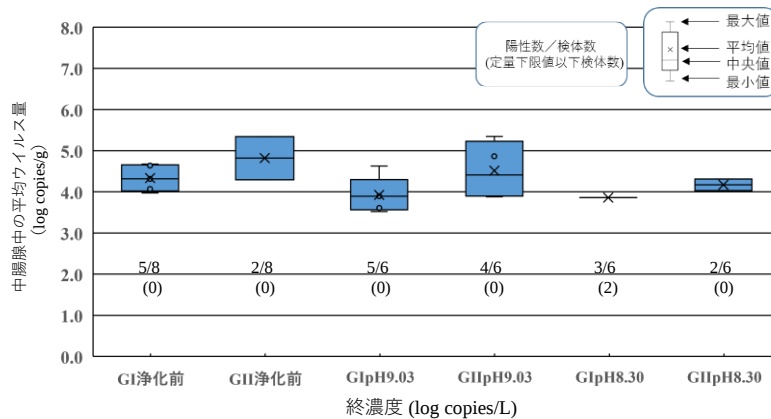


図31b. pH浄化によるカキ中腸腺中のウイルス取込量の変化
(実験 2回目)

pH9.03で浄化したカキは、浄化後も陽性カキ数が多く、効果があるか評価できなかった(図31a, 31b)。実験開始時にpH9.03に調整したものが、浄化したカキを取り上げる際に、pH8.50となっており、カキの排出物等により、pHが変動したことが実験結果に影響した可能性も考えられた。

(エ) 研究成果の活用における留意点

ノロウイルス汚染カキ試料作製法の手順書作成

今回実施した実験方法では、高濃度のウイルスを接種する事により、高濃度汚染カキを安定的に作製できた。一方で中濃度、低濃度汚染カキについては安定的に作製できなかった。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

(1) ノロウイルス汚染カキ試料作製法の手順書作成

ノロウイルスの低、中、高濃度に汚染されたカキ試料の作製方法について再現性を確認することが目標であったが、低、中濃度に汚染されたカキを安定的に作製できず課題が残った。

(2) カキ中の病原性微生物を低減する効果的な浄化法の実証化試験

実験試行回数が少なく検証が不十分であった。また、実験方法もUV殺菌装置を組み込むことやpHを維持することなど改善する必要がある。今後とも引き続き、実験方法を改良し、検証していく必要がある。

<引用文献>

Maalouf, H., Schaeffer, J., Parnaudeau, S., Le Pendu, J., Atmar, R. L., Crawford, S. E. and Le Guyader, F. S.: Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. Appl. Environ. Microbiol., 77, 3189-3196 (2011)

5 研究成果の発表

別添のとおり。

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

小課題1「ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製法の確立」

カキの飼育条件別にノロウイルスの取り込み量を調べ、カキがノロウイルスを取り込みやすい条件を明らかにしたが、接種するノロウイルスの遺伝子型、カキの産地の違いにより中腸腺への蓄積量は異なっていた。そのため、低・中・高濃度の種類のノロウイルス汚染カキ試料の作製方法を明確にすることは困難であった。小課題3において作成する手順書には、これまで実施した試験における、ノロウイルス接種量、ノロウイルス遺伝子型、試験時期を掲載し、試験者がノロウイルス接種量を判断できるようにした。

小課題2「カキおよび海水中の病原性微生物低減法の検討」

ノロウイルス検体量に制限があったため、検証に用いる海水量が増えてしまう生物ろ過およびUV照射による海水中の病原性微生物低減法の検証が行えなかった。

小課題3「ヒトノロウイルス汚染カキの作製および病原性微生物浄化法の実証化」

小課題1、2で示された方法を大規模化し、実験の再現性を確認することが本課題の目標であったが、示された条件で実験を実施しても再現性を確認出来ない実験もあった。再現性を確認できない要因がカキの個体差に起因するものか、実験方法、装置、操作に起因するものか判断できなかった。

ノロウイルス汚染カキ作製試験を実施する際には、

- ・ノロウイルスの入手（便検体を用いる場合は、倫理審査が必要となる可能性がある）
- ・感染性推定遺伝子検査法の原理への理解
- ・感染性ウイルスを用いること（BSL2実験となること＝病原体取扱教育、施設の設定等）の理解

に注意し取り組まなくてはならない。

<研究総括者の自己評価>

項目		評価結果
試験研究全体		A：順調 B：概ね順調 C：やや遅れている D：遅れている
研究 小 課 題	ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製法の確立	A：順調 B：概ね順調 C：やや遅れている D：遅れている
	カキおよび海水中の病原性微生物低減法の検討	A：順調 B：概ね順調 C：やや遅れている D：遅れている
	ヒトノロウイルス汚染カキの作製および病原性微生物浄化法の実証化	A：順調 B：概ね順調 C：やや遅れている D：遅れている
		A：順調 B：概ね順調 C：やや遅れている D：遅れている
		A：順調 B：概ね順調 C：やや遅れている D：遅れている

自己評価コメント

新型コロナウイルス感染症の蔓延により、ヒトノロウイルス検体が入手困難になり、研究の進行に差し障りとなった。想定した結果が得られないところもあったが、カキのヒトノロウイルス蓄積特性で知られていなかった知見が明らかになり、カキのウイルス浄化についても減衰が確認できた。社会実装まではまだ距離があるものの、事業開始時点に比較して科学的にも実用化に向けても大きな進捗が得られた。

研究成果一覧

2E+07

課題 番号	(1) 研究推 進会議 等開催 回数	(2) 行政が 活用し うる成果の 有無	(3)学術論文		(4)学会等発表(口 頭またはポスター)		(5) 出版 図書	(6)国内特許権等		(7)国際特許権等		(8) 報道 件数	(9) 物品購 入の有 無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
20330964	6	有	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	有

(1)研究推進会議等の開催実績

区分:①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者 数	消費・安全局担当 官の出席有無	主な議題及び決定事項
1	第一回推進会議	R2.8.19	オンライン	18	有	研究計画について確認した
1	第二回推進会議	R3.2.16	オンライン	20 (資料の 未送付1 名)	有	R2年度の実施内容とR3年度の研究計画につい て各研究機関から報告した。 国立感染症研究所の高木先生がR3年度より参 画することが認められた。
1	令和3年度第一回推進会議	R3.6.18	オンライン	20	有	R3年度研究計画について確認した
1	令和3年度第二回推進会議	R4.2.4	オンライン	17	有	R3年度の実施内容とR4年度の研究計画につい て各研究機関から報告した。
1	令和4年度第一回推進会議	R4.6.7	オンライン	16	有	R4年度研究計画について確認した
1	令和4年度第二回推進会議	R5.2.3	オンライン	18	有	R4年度の実施内容とまとめについて各研究機関 から報告した。

(2)行政が活用しうる成果

区分:①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況
②	ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製手順書	公設試験研究機関等におけるノロウイ ルス汚染カキ作製試験	ノロウイルス汚染カキ作製手順書として 公開する方向で検討中

(3)学術論文

区分:①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	タイトル	著者	機関名	掲載誌	掲載論文のDOI	発行年	発行月	巻 (号)	掲載 ページ
		該当無し								

(4)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	人工的なノロウイルス汚染カキの作製条件の検討	大島 千尋	水産研究・教育機構水産 技術研究所	日本食品衛生学会	2021	10

(5)出版図書

区分:①出版著書、②雑誌(学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
		該当無し					

(6)国内特許権等

区分:①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	出願番号	出願 年月日	取得 年月日
		該当無し						

(7)国際特許権等

区分:①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	出願番号	出願 年月日	取得 年月日	出願国
		該当無し							

(8)報道等

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

整理番号	区分	記事等の名称	機関名	掲載紙・放送社名等	掲載 年月日	備 考
		該当無し				

(9)購入物品

品 名	規格	員数	購入実績(円)		使用目的	備考
			単価	金額		
インキュベーター	Phcbi MIR-254S-PJ	1	425700	425700	検体および試薬類の保存や、特定の温度でのノロウイルスの生残性試験に使用する	
オートクレーブ	平山製作所 HG-50 II LB	1	638,000	638,000	使用器具の滅菌	
紫外線水殺菌装置	DNライティング株式会社 L-1000UA	1	201,850	201,850	カキ浄化用の海水をUV殺菌するため	
薬用冷蔵ショーケース	PHC株式会社 MPR-S300H-PJ	1	418,000	418,000	カキ、ウイルス、サンプルの保管	
デジタルpHコントローラー	ヤマト科学 NPH-690D	1	243,100	243,100	カキ飼育水槽のpHを一定に保って飼育試験を実施するため	

短期課題解決型研究「カキ中のノロウイルス低減対策に関する研究」

背景・目的：カキは海水中のノロウイルスを体内に取り込み、それがカキ体内に蓄積されることが分かっている。カキのノロウイルス汚染は食中毒の原因となるだけでなく消費の低迷や輸出の障壁になるため、カキのノロウイルス汚染対策が急務である。本研究では、浄化処理によるノロウイルスの低減効果を体系的に検証できるよう、はじめにノロウイルス汚染カキ試料の作製方法を確立する。次に、人為的なノロウイルス汚染カキ試料を用いて、カキの畜養環境の違いや、殺菌剤等を添加した場合の浄化効果を調べる。

研究成果：カキを、水温・pH・塩濃度・給餌の有無・ウイルス汚染海水とカキの曝露時間などの条件を変えた海水中で飼育してノロウイルス汚染カキを作製し、カキがノロウイルスを取り込みやすい条件を明らかにした。また、飼育海水のノロウイルス濃度によってカキ中腸腺へ取り込まれる量が異なることを明らかにした。さらに、放卵放精後のカキでノロウイルスの取り込み量および陽性率が低くなることがわかった。ノロウイルス汚染カキ試料の作製方法を水産関係の研究機関で広く利用できるよう「ノロウイルス汚染カキ試料作製手順書」にまとめた。

次に、人為的なノロウイルス汚染カキ試料を用いて、浄化効果を検証した。その結果、広く取り組まれている清浄海水中での畜養による浄化は、ノロウイルスをほとんど低減しなかった。また、次亜塩素酸ナトリウムを添加した海水にて畜養し、浄化処理を施したが、カキ組織に影響を与えない濃度では中腸腺中のノロウイルスが低減しなかった。浄化用海水の水温やpHを変化させるとノロウイルスが低減する可能性が示唆された。

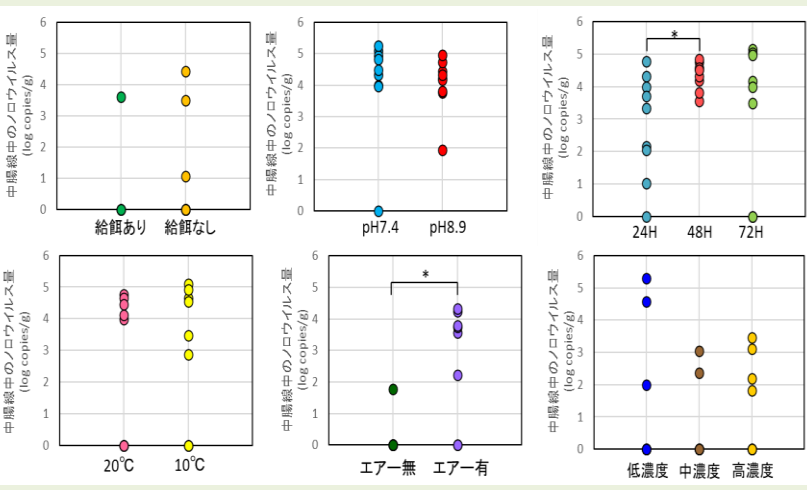


図 1. 各飼育条件におけるカキ中腸腺へ取り込まれたノロウイルス量 (遺伝子型GII.4)

給餌の有無・pH・ウイルス汚染海水とカキとの曝露時間・水温・通気の有無・塩分濃度について複数種の条件を用意し、各条件においてカキ中腸腺中に取り込まれたノロウイルス量を示す。ここから、ノロウイルス汚染カキ試料作製の際の飼育条件を選定した。

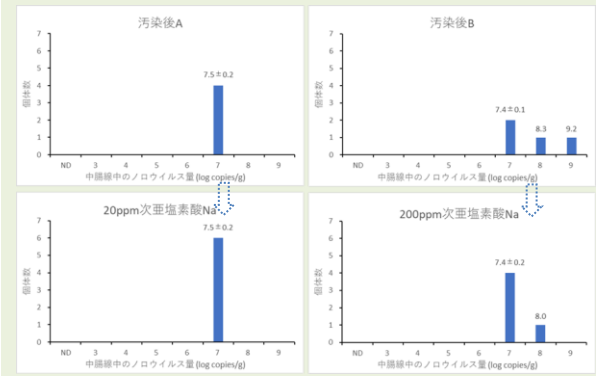


図 2. 20ppmおよび200ppmの次亜塩素酸ナトリウムを添加した海水中でカキを浄化した際の中腸腺中のノロウイルス量 (ノロウイルスGI.7)

(上段)浄化前カキ試料のノロウイルス量
(下段)浄化後のカキ試料のノロウイルス量

200ppmの次亜塩素酸ナトリウムを含む海水中で畜養しても中腸腺中のノロウイルスは低減しなかった。

成果の効果・活用：本研究によって人為的にノロウイルス汚染カキ試料を作製する方法が確立された。これにより、カキ中のノロウイルス低減対策に関する体系的な検証データを積み重ねることが可能となった。また、清浄海水や殺菌剤を用いた浄化処理はノロウイルスに対してあまり効果を示さないことが明らかとなったため、カキ中のノロウイルスの低減対策に関するさらなる研究開発が必要と考えられた。

カキ中のノロウイルス低減対策に関する研究グループ
研究機関: 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所
研究総括者: 松嶋 良次