

ノロウイルス陽性及び陰性マガキの消化管内細菌叢の差異

泉川 晃一・清水 泰子・林 浩志

Differences in the Intestinal Flora among Oysters *Crassostrea gigas*, Positive and Negative for Norovirus

Koichi Izumikawa, Yasuko Shimizu and Hiroshi Hayashi

ノロウイルスは秋から冬にかけて発生する食中毒原因ウイルスとして知られている。本ウイルスは感染した患者の糞便や嘔吐物とともに排出され、下水等を通じて環境中に放出される。その一部が海水を汚染し、やがて二枚貝類に蓄積され、食品として消費されることで再び人へと感染していく¹⁾。二枚貝類の中でも特に秋から冬にかけて主として生食で消費されるマガキ *Crassostrea gigas* (以下、カキ) において、本ウイルスが原因の食中毒事例が全国的に見られている²⁾。

本県ではカキ養殖漁期中、カキのノロウイルス汚染状況について関係漁業協同組合による自主検査、水産部局によるノロウイルス分布調査及び衛生部局による行政検査を行っており、陽性の場合には生産者が出荷自粛等の措置を講じ、本ウイルスのリスク低減策に取り組んでいる。

一方、カキのノロウイルスに関する浄化法について、砂ろ過海水による浄化^{3,4)}、紫外線殺菌法⁵⁻⁷⁾、高圧処理法^{5,7)}及びノロウイルス汚染カキを低リスク海域へ移動させる方法(いわゆる転地)⁸⁾等の研究が行われている。また、海外ではバージニアガキ *C. virginica* で浄化に関する研究⁹⁾がなされているが、いずれの方法も実用化に至っていない。近年では、機能性植物成分を含有させたマイクロカプセルをカキに取り込ませることでノロウイルス検出率を低減させる方法*が開発されているが、これら一連の研究の過程でカキ消化管内の細菌叢の違いがノロウイルス蓄積の有無に影響を与えている可能性も推察された。

そこで、2010及び'11年度に人為的にノロウイルス汚染カキを作出し、本ウイルス蓄積の有無を確認するとともに、それぞれの細菌叢を属レベルで比較したので報告

する。

材料と方法

供試カキ ノロウイルスは現在まで培養細胞での増殖が確認されていないことから、汚染海域と思われる場所にカキを垂下し、人為的に本ウイルスの検出率を高めることとした。'10及び'11年度とも岡山県瀬戸内市牛窓町地先海面で養殖されていたカキを購入し試験に供した。'10年度は12月20日に購入し、一旦水産研究所地先の試験筏に垂下後、70個体をカゴに入れ1月7日から3月8日まで県内の下水処理場排水口付近の海面(水面下約1m)に垂下した。一方、'11年度は12月5日に購入し、100個体を12月6日から2月6日まで前年度と同じ場所に同様に垂下した。取り上げ時のカキの大きさは、平均殻高、平均殻長、平均殻幅及び平均殻付き重量の順に、'10年度は120mm, 61mm, 28mm 及び94gで、'11年度は119mm, 58mm, 31mm 及び105gであった。

なお、両年とも垂下期間中カキに目立った斃死は見られなかった。

水温測定 '11年度のみカキを収容したカゴの中に水温自動観測装置(Onset社製)を設置し、垂下期間中の水温を1時間間隔で毎日24回測定した。

ノロウイルスの検出 供試カキ1個体ずつ消化管周囲のグリコーゲン部分を可能な限り取り除き、消化管をハサミを用いて切り出した。切り出した消化管を5ml容量のガラスホモジナイザーに入れ滅菌海水を3ml加えて磨砕し、3等分したものを1.5mlマイクロチューブに収容後-80℃に保存した。ノロウイルスの検出には、3等分した消化管磨砕液のうちの1つを用いた。消化管磨砕液に1%NALC含有SDS-トリス-グリシンバッファー

*山野井英夫, 2009: オレガノ成分を含有させたマイクロカプセルをマガキに摂取させることにより観察されたノロウイルス検出率の低減, 平成21年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 88 pp.

を500 μ l 加え、約30秒間激しく攪拌し、37℃、30分間加熱後、13,000rpm、10分間遠心分離し、上清をRNA抽出に用いた。RNAの抽出にはQIAamp Viral RNA Miniキット(QIAGEN社製)を使用し、抽出後はDNase処理を行った。そして、NASBA法とRT-LAMP法を組み合わせた方法¹⁰⁾に準じてノロウイルス遺伝子の増幅を行った。本ウイルス有無の判定は、反応の最終過程において肉眼でピロリン酸マグネシウムの白濁が見られたものを陽性とした。

細菌の分離 細菌分離には、上記の消化管磨砕液を3等分したもののうちの1つを原液として滅菌海水で10倍階段希釈したものを用いた。培地には、ZoBell2216e 寒天培地(ペプトン5.0g、酵母エキス1.0g、FePO₄ 0.1g、寒天15.0g、海水1,000ml、pH7.6)を用い、各希釈段階ごとに0.1ml ずつ接種後コンラージ棒で塗布し、10℃で48~72時間培養した。培地は各希釈段階ごとに2枚ずつ使用した。平板ごとにコロニー数を計数し、ノロウイルス陽性群及び陰性群別に消化管1g 当たりの一般細菌数を求めた。そして、コロニーの色及び形状を指標に、ノロウイルス陽性個体及び陰性個体ごとに分離菌のグループ分けを行い、それぞれのグループで代表的な菌を1株抽出し、簡易同定試験に供した。なお、簡易同定試験に供するまでの期間、各代表菌はマリンプロス(Difco製)4mlに接種し10℃で培養した。その後、対数増殖期に80%滅菌グリセリン液1mlを加え混合し、1ml ずつチューブに分注し-80℃に保存した。

分離菌の簡易同定試験 基礎培地として上記のZoBell2216e 寒天培地を用い、絵面・清水の簡易同定法¹¹⁾に従い、分離菌のグループごとに属レベルまで同定した。

結果と考察

水温の推移 '11年度のカキ垂下期間中の下水処理場先海面における日平均水温の推移を図1に示した。期間中の水温は、12.7~4.6℃で推移した。12月下旬までは順調に水温低下がみられたが、年末から年明けにかけて6℃前後で横ばいとなった。その後、1月中旬から下旬に一時わずかな水温の上昇が確認されたが、2月に入ると5℃を下回る日が続いた。

ノロウイルス検査結果 表1にノロウイルス検査結果及び消化管内における一般細菌数を示した。'10年度はカキ70個体中13個体(陽性率18.6%)が、'11年度はカキ100個体中16個体(陽性率16.0%)が陽性であり、両年の陽性率に大きな差はみられなかった。'08年に行った試験*では、今回と同じ場所、同じ時期に同様に垂下したカキ

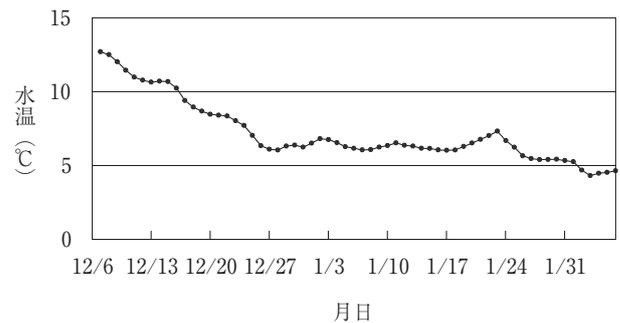


図1 下水処理場先海面における日平均水温の推移(2011年度)

表1 ノロウイルス検査結果及び消化管内における一般細菌数

	供試個体数	陽性率(%)	ノロウイルス陽性群*	ノロウイルス陰性群*
2010年度	70	18.6	4.3±0.3	4.3±0.5
2011年度	100	16.0	3.1±0.1	3.4±0.6

*平均値±標準偏差(単位 Log CFU/g)

のノロウイルス陽性率は70%程度で、今回の結果は、いずれの年もそれより低い値であった。

'10年度の一般細菌数は、ノロウイルス陽性及び陰性群とも一般細菌数は消化管1g 当たり平均10⁴ CFU レベルであった。また、'11年度は、ノロウイルス陽性及び陰性群とも平均10³ CFU レベルであった。両年度ともノロウイルス陽性カキより陰性カキの方が個体数が多かったためか、陰性群内において菌数のばらつきが大きい傾向がみられた。また、年度間の差をみるとノロウイルス陽性及び陰性群ともに'10年度の方が'11年度より一般細菌数が平均1桁多かった。過去に県内産カキの消化管内細菌数の周年変化を調査した例では、食塩濃度を3%に調整した普通寒天培地を用いて25℃及び37℃で培養した場合、冬季の一般細菌数は消化管1g 当たり平均10³及び10² CFU レベルで推移していた¹²⁾。ZoBell2216e 寒天培地は、普通寒天培地と比較して菌数が5割程度多く検出される¹²⁾ことを考慮すると、培養温度が異なるため単純に比較はできないが、今回の結果はこれとほぼ同様の菌数で推移した。また、広島県においても養殖カキの消化管内細菌叢を2年間にわたって季節ごとに調査しているが、ZoBell2216e 寒天培地を使用し25℃で培養を行った場合、12月の一般細菌数は2年とも消化管1g 当たり10⁴CFU レベルであった¹³⁾。以上のことから、冬季のカキの消化管内一般細菌数は年変動はみられるが、海況の似ている瀬戸内海域ではほぼ同レベルの細菌数が検出されるものと思われた。また、同一年においてノロウイルス陽性及び陰性群の一般細菌数を比較すると、差はみられ

表2 ノロウイルス陽性及び陰性カキの消化管内における細菌出現状況 (%)

	<i>Aeromonas</i> 属	<i>Pseudomonas</i> 属	<i>Flavobacterium</i> 属	<i>Vibrio</i> 属	<i>Pasteurella</i> 属	不明
'10年度ノロウイルス陽性群	75.0	24.5	0.6	—	—	—
'10年度ノロウイルス陰性群	77.9	17.6	4.1	0.4	—	—
'11年度ノロウイルス陽性群	53.0	7.6	—	20.5	2.3	16.7
'11年度ノロウイルス陰性群	67.7	5.5	0.2	17.8	2.9	6.0

ないことが明らかになった。

簡易同定試験及び消化管内細菌叢 分離菌はコロニーの色及び形状から'10年度は、ノロウイルス陽性群で7グループに、ノロウイルス陰性群で9グループに分けられた。同様に'11年度はノロウイルス陽性群で7グループに、ノロウイルス陰性群で12グループに分けられた。各グループの代表菌の簡易同定結果から、カキ消化管内における細菌出現状況を表2に示した。'10年度はノロウイルス陽性及び陰性群とも *Aeromonas* 属が優占し、次いで *Pseudomonas* 属, *Flavobacterium* 属の順に出現した。出現率は低いが、陰性群のみに *Vibrio* 属がみられた。一方、'11年度もノロウイルス陽性及び陰性群とも *Aeromonas* 属が優占したが、次いで *Vibrio* 属, 不明, *Pseudomonas* 属, *Pasteurella* 属の順に出現し、陰性群のみに *Flavobacterium* 属がみられた。これらのことから、今回の試験ではノロウイルス陽性及び陰性に関わらず、*Aeromonas* 属が優占したが、その他の菌の出現は年によって差が大きいことが分かった。*Aeromonas* 属は河川、下水及び海水中に生息し、カキや魚介類から高頻度に検出されている¹⁴⁾。広島県の例では、*Aeromonas* 属の出現率が冬季(12月)は夏季に比べて低く、カキ消化管内から *Vibrio* 属の出現が目立っていた¹³⁾。また、過去の本県の例では10及び11月のカキサンプルについて、細菌数の最も多かったもの及び最も少なかったものについて細菌組成を調査しているが、いずれも *Vibrio* 属が優占していた¹²⁾。これらの事例と今回の結果を比較すると、*Vibrio* 属の出現率は'10年度ではノロウイルス陰性群でわずか0.4%にとどまり、'11年度ではノロウイルス陽性及び陰性群で20.5%及び17.8%で、今回の出現率は相対的に低かった。また、本試験ではいずれの場合も *Aeromonas* 属の出現率は突出していたが、前述の2事例^{12,13)}では *Aeromonas* 属の出現率は数%程度であった。これらの原因は明らかでないが、前述の2事例^{12,13)}で用いられたカキはいずれも各県の水産試験場地先に垂下したもので、今回は処理水の影響を受けやすい下水処理場の排水口付近に垂下していることから、カキの垂下場所の違いが菌

組成に影響を及ぼしている可能性も推測された。

ところで、ノロウイルスは培養細胞を用いて増やすことができないため、現在、ノロウイルスと同じカリシウイルス科に属するネコカリシウイルスを代替ウイルスとして実験に用いることが多い。ネコカリシウイルスはノロウイルスと生化学的な性状や塩基配列が類似しており、培養細胞での培養が容易である。笠井ら⁷⁾は、カキ消化管内容物由来細菌から抗ネコカリシウイルス活性を有する細菌を見だし、これら細菌がネコカリシウイルスの不活化に寄与している可能性を示唆した。すなわち、これら細菌はノロウイルスと同属かつ性質も類似しているネコカリシウイルスを不活化させることから、カキノロウイルス対策を考慮する上で大変興味深い知見である。今回カキ消化管内の細菌叢を属レベルではあるが、ノロウイルス陽性及び陰性別に調査した。その中でノロウイルス陰性カキのみから分離された菌(*Vibrio* 属及び *Flavobacterium* 属)が得られた。冒頭で述べたようにカキ消化管内の細菌叢の違いがノロウイルス蓄積の有無に影響していることが推測されていることから、これらの細菌がカキ消化管内で本ウイルスを不活化させ、本ウイルスの蓄積に関与するか否か今後調査する必要がある。

文 献

- 1) 植木 洋・秋山和夫, 渡部 徹, 大林達夫, 2003: 遺伝子相同性にもとづく Norovirus (NV) のカキへの汚染経路の解明, 環境工学研究論文集, **40**, 607-616.
- 2) S. Inouye, K. Yamashita, S. Yamadera, M. Yoshikawa, N. Kato and N. Okabe, 2000: Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: Pediatric cases and outbreak incidents, *J. Infect. Dis.*, **181** (Suppl. 2), S270-S274.
- 3) 中 正純・岡田恵美・岡山あゆみ・南川藤雄・米奥正則・福田美和・矢野拓哉・川田一伸・櫻井悠朗, 2000: かきの養殖海域における SRSV 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.
- 4) 山本紀彦・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, 2003: 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**, 63-65.
- 5) 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—, *Oyster Research Institute, News Letter*, **16**, 14-21.
- 6) 吉水 守, 2006: 魚介類の疾病対策および食品衛生のための海水電解殺菌装置の開発, 日水誌, **72**, 831-834.
- 7) 笠井久会・稲垣奈都子・吉水 守, 2006: 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, *Top Food Techno Focus*, **10**, 1-10.
- 8) 「マガキの生産段階におけるノロウイルス・リスク低減に関する研究」プロジェクトチーム, 2009: マガキの養殖生産段階におけるノロウイルス・リスク低減に向けて, 農林水産実用技術開発事業, 16 pp.
- 9) K. J. Schwab, F. H. Neil, M. K. Estes, T. G. Metcalf and R. L. Atmar, 1998: Distribution of norovirus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J. Food Prot.*, **61**, 1674-1680.
- 10) S. Fukuda, Y. Sasaki and M. Seno, 2008: Rapid and sensitive detection of norovirus genomes in oysters by a two-step isothermal amplification assay system combining nucleic acid sequence-based amplification and reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assays. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3912-3914.
- 11) 絵面良男・清水 潮, 1990: 沿岸環境調査マニュアルⅡ [水質・微生物篇] 日本海洋学会編, 恒星社厚生閣, 東京, 357-364.
- 12) 山野井英夫, 2006: 瀬戸内市地先のマガキ及びイワガキにみられた消化管内細菌数の周年変化, 岡山水試報, **21**, 16-21.
- 13) Y. Iida, R. Honda, M. Nishihara and K. Muroga, 2000: Bacterial Flora in the Digestive Tract of Cultured Pacific Oyster, *Fish Pathol.*, **35**, 173-177.
- 14) 薩田清明・清水佳美・山本美穂・山中真由美・岡村悠夏・中村彩子・柴田真理子・秋山久美子・佐川純子・前場佐裕里, 2007: 飲食物の安全性に関する細菌学的研究 (第7報)—食用カキを対象として—, 東京家政学院大学紀要, **47**, 1-10.