

# マガキ体内および海水中におけるノロウイルスの安定性の解明

笠井久会（北海道大学大学院水産科学研究院）

## 1. 目的

カキによるノロウイルス食中毒は、周年を通して発生が見られるが、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が下水処理場に至るが、ウイルスの一部は下水処理をかくぐり、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濃縮され、このウイルスを有する、いわゆる“汚染カキ”をヒトが生そのままあるいは加熱不十分のまま食すると、ウイルスはヒトの体内に戻り、感染を引き起こす。

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、その原因として以下の要因が考えられる。1) 夏季は患者の発生等がないために、環境へのウイルス負荷が低くなり、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、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。

本研究課題では、上記2~4の検証のため、マガキ体内および海水中におけるノロウイルスの安定性の解明を試みた。

## 2. 材料と方法

ノロウイルスは人工的に培養できないため、代替ウイルスとして培養が可能なネコカリシウイルス（FCV）を供試した。マガキを用いた試験では、カキの中腸腺に等量のPBSを加え、ホモジナイズした液180  $\mu$ Lおよび14,000 rpm・20分間遠心分離し得られた上清180  $\mu$ Lに、FCV液を20  $\mu$ L添加し、20  $^{\circ}$ C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。海水を用いた試験では、未処理海水、高圧滅菌処理海水および対照としてのPBS中におけるFCVおよびノロウイルス（GI, GII）の生存性をウイルスゲノム数を指標として検討した。北海道北斗市の七重浜海岸で採水した海水を未処理のものおよび121  $^{\circ}$ Cで15分間高圧滅菌処理したものに分け、各々10 mLを50 mL遠沈管に分注した。各々に、FCVおよびノロウイルス

を 1 mL (1/10 量) 懸濁し、5 °C に静置した。この間ウイルス懸濁後、0, 1, 4, 7 および 16 日後にウイルスのゲノムコピー数を定量 PCR 法により測定した。

### 3. 結果と考察

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。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。海水中での安定性について、まず FCV のウイルス感染価で評価した場合、高圧滅菌処理水中では非常に不安定であった (Fig. 1)。この現象には再現性があり、高圧条件下で生成あるいは変性した濾過性物質の関与が疑われた。一方で、ゲノムコピー数を指標とした場合、高圧滅菌処理海水中では FCV ゲノムコピー数の減衰はみられず、安定であった。また、保持期間を通じて、ゲノムコピーの総数はウイルス感染価の  $10^2$  倍以上で推移することが示された。一般に、ウイルス培養時には、欠陥干渉 (defective interfering : DI) 粒子が産生されることが知られている。このことから、FCV 培養上清には感染性ウイルス粒子を上回る DI 粒子が存在したことで、ウイルス感染価およびゲノムコピー数に大きな差異がみられたと考えられた。

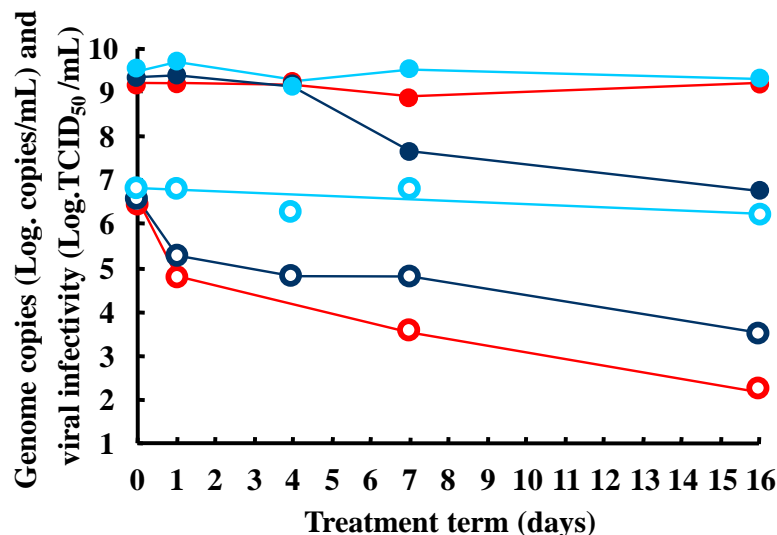


Fig. 1. Stability (copy and infectivity) of FCV in different treated sea water at 5 °C.

Genome copy      ●—PBS (Cont.), ●—Untreated, ●—Autoclaved  
 Viral infectivity      ●—PBS (Cont.), ●—Untreated, ●—Autoclaved.

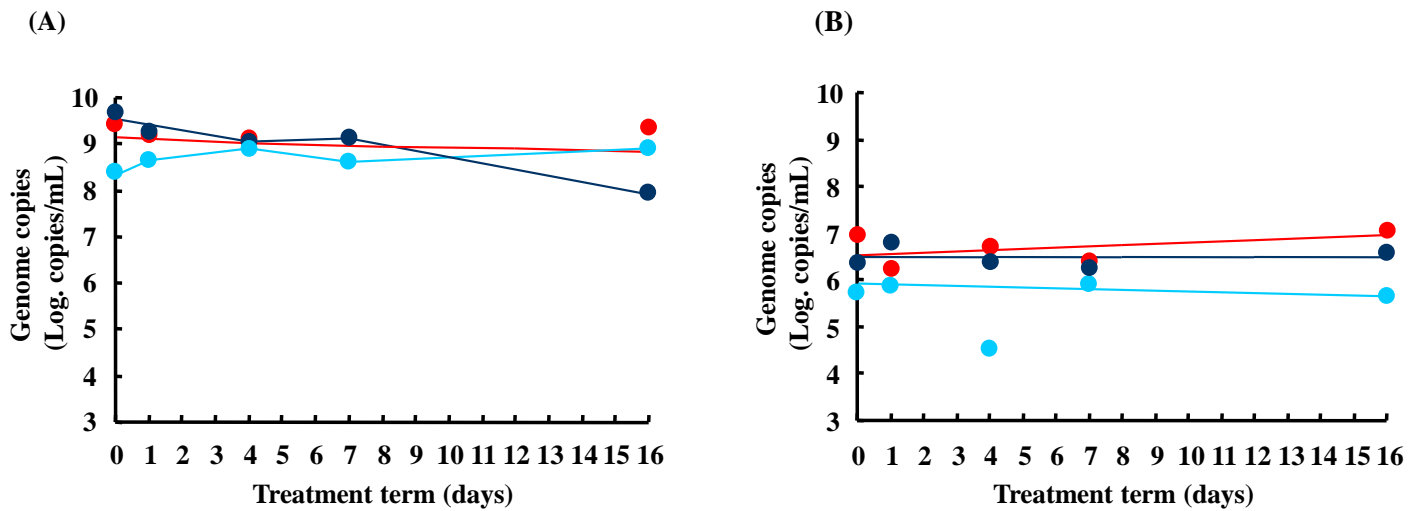


Fig. 2. Stability (copy) of *Norovirus* GI (A) and GII (B) in different treated sea water at 5 °C.

● PBS (Cont.), ● Untreated, ● Autoclaved.

未処理海水においては、ゲノムコピー数およびウイルス感染価ともに減少したことから、海水中の易熱性成分、微生物およびその菌体外代謝物により、感染性ウイルス粒子の表面構造が不活化するとともに、不活化したウイルス粒子に内包されるウイルス核酸も比較的不安定となると考えられた。未処理海水中におけるウイルス感染価およびゲノムコピー数の減少傾向は、高压滅菌処理海水中でのそれと異なる。この試験結果から、高压滅菌処理海水中のFCV不活化因子は未処理海水中の不活化因子とは異なる不活化作用を有すると示唆される。

一方で、ノロウイルス陽性試料を用いた試験では、Genotype I および Genotype II において、供試水に関わらずゲノムコピーは非常に安定であることが示された (Fig. 2)。DI 粒子を含めたウイルス粒子のカプシドが不活化されているか否かは培養系が確立されていないために科学的な裏付けが不可能であるが、ゲノムコピー数を指標としてFCVと比較すると、未処理海水中においても非常に安定であることから、長期間生残するものと考えられる。このことから、食中毒患者からウイルスが放出された場合、海水環境では長期生残し、カキなどの二枚貝に濃縮されやすい状況であることが示唆された。また、ノロウイルスによる感染性胃腸炎は数個から100個程度の感染粒子が体内に取り込まれることで感染が十分成立することが報告され (Glass *et al.*, 2000)、本病の発生は海域を中心とした環境水中でのノロウイルスの生残性に大きく影響されることが示唆された。

#### 4. 引用文献

Glass R.I., Noel J., Ando T., Fankhauser R., Belliot G., Mounts A., Parashar U.D., Bresee J.S., Monroe S.S. (2000): The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: A reassessment using new diagnostics. *J. Infect. Dis.*, 181, S254-S261.