特集 —— 高圧力科学技術の未来を拓く新発見・新技術 ——

高圧力処理によるカキ中のノロウイルスの不活化

Inactivation of Human Noroviruses in Oyster using Hydrostatic Pressure Treatment

野田 衛*

Mamoru NODA*

上間 匡

Masashi UEMA

Contamination of oysters with human noroviruses is an important issue in food safety because oysters are often consumed raw. Hydrostatic pressure treatments have been revealed to be effective for inactivation of noroviruses in oysters in other countries. We therefore confirmed the effectiveness of hydrostatic pressure treatments in inactivating noroviruses in oysters using a genetic method developed in our previous studies. To increase the application of hydrostatic pressure treatments in the fishing industry, it is necessary to understand the technique, advertise it to the public, and reach an agreement regarding the commercial or legal handling of foods processed in this manner.

[hydrostatic pressure treatment, norovirus, oyster, inactivation, genetic method distinguishing infectious and non-infectious viral particles, microbial control, food safety]

1. はじめに

従来から、「カキにあたる」として知られている食中毒は、カキに汚染したノロウイルスと呼ばれる病原ウイルスの感染による[1]。ノロウイルスはヒトの腸管細胞に感染し、大量の子孫ウイルスを産生する。大便とともにトイレに排出されたノロウイルスは下水をとおり、海水に至る[2]。カキは、繊毛をふるわせて水流を起こし、海水中のプランクトンを濾しとって食べている。その際、養殖海域に存在するノロウイルスも取り込まれ、カキの消化管（中腸腺）内に蓄積される。ノロウイルスを含むカキを生あるいは加熱不足で食べると、ノロウイルスによる食中毒となる。このノロウイルスによる食中毒を防ぐためには、ノロウイルスが汚染しないカキを生産すること、ノロウイルスに汚染されたカキの生食用としての流通を排除すること、カキに含まれるウイルスを不活化することが考えられる。近年、カキに含まれるノロウイルスの不活化に関する研究が国内外で進んでいる。本稿では高圧力処理によるカキ

中のノロウイルスの不活化について紹介する。

2. カキの衛生管理の現状と課題

現在、生食用カキの安全性を確保するために、細菌数、E. coli（糞便系大腸菌群）最確数（最確数法による菌数）、腸炎ビブリオ最確数の細菌学的基準が設定されている。しかし、細菌とウイルスは一般に海水中での挙動や生存性が異なるため、これらの細菌学的基準ではノロウイルス汚染に対する安全性を確保することはできない[1]。そのため、現在、一部の業者においては出荷前にノロウイルスの検査を実施し、陽性の場合、販売自粛や加熱調理用への転用などが行われている。しかし、検出感度が十分でない、遺伝子検査では下水処理における塩素消毒、太陽光に含まれる紫外線、その他の環境要因によって不活化したノロウイルスも検出するなどの問題点がある[1]。また、カキに含まれる微生物を浄化するために、紫外線照射殺菌や塩素殺菌された海水での蓄養などが行われているが、カキ消化管内に蓄積

〒210-9501 川崎市川崎区殿町 3-25-26 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501

* Electronic address: mamorunoda@nihs.go.jp

したノロウイルスをこれらの方法で浄化することは困難である[1]。カキ中のノロウイルスを不活化する最も有効な方法は加熱であるが、いうまでもなく生ではなくなる。そのため非加熱のノロウイルス不活化方法の確立が求められている。

3. ノロウイルスの不活化試験

一方、一般に微生物の不活化は微生物が増殖できなくなる状態を意味するが、これを調べるためには微生物が増殖（培養）できることが前提となる。細菌であれば増殖に適した温度、栄養、環境（空気を含む・含まない等）がそろえば試験管内で増殖させることができ、高圧力処理を含む物理化学的作用によって不活化されたか否かを判定することができる。インフルエンザウイルスなどのウイルスでも培養に適した細胞を試験管内で培養し、それを用いて不活化試験を実施することができる。しかし、ノロウイルスについては、この培養可能な細胞がなく、不活化試験を実施することができない（2014年にヒトB細胞（B-Jab細胞）[3]、2016年に幹細胞由来のエンテロイドと呼ばれる細胞[4]で増殖可能となったが、未だ一般の実験室では実施することができない）。そのため、ノロウイルスの不活化試験は、これまで、分類学的にノロウイルスに近縁で培養可能な代替ウイルス（ネコカリシウイルス、マウスノロウイルスなど）を用いての試験、被験者に不活化処理を行ったノロウイルス（対照として処理を行っていないノロウイルス）を喫食してもらい、発症の有無などを調べるボランティアの感染実験などが行われてきた。一方、上述のように、遺伝子検査では感染性の有無を調べることができないが、近年、遺伝子検査に種々の改良を加え、不活化したウイルスを検出しにくくした感染性推定遺伝子検査法が開発されている。高圧力処理によるノロウイルスの不活化効果判定も、現状においては、これら、①代替ウイルスを用いての評価、②ボランティアの感染実験、③感染性推定遺伝子検査法による評価、いずれかの方法で実施されている。

4. 高圧力処理による各種ウイルスの不活化

高圧力処理によるウイルスの不活化試験は、食品衛生分野、医療分野などで広く実施されている。ウイルスは宿主細胞に由来する糖脂質を含む蛋白質の

膜（エンベロープ）を持つウイルス（インフルエンザウイルス、エイズウイルスなど）とエンベロープを持たないウイルス（ノロウイルス、ポリオウイルスなど）に分けられるが、エンベロープを持たないウイルスが一般に高圧力処理に対して耐性とされている[5]。高圧力処理によるウイルスの不活化の特徴としては、分類学的に近い（ウイルスの構造が似ている）ウイルスであっても高圧力処理に対する耐性（不活化されにくさ）が大きく異なることがある。たとえば、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属するポリオウイルス（小児麻痺の原因ウイルス）やコクサッキー B5 型ウイルス（夏風邪などの原因ウイルス）は 600 MPa の処理でほとんど不活化されないが、コクサッキー A9 型ウイルス（夏風邪などの原因ウイルス）は 500 MPa の処理で $7 \log_{10} (= 10^7)$ 程度と非常に効果的に不活化される[5]（Table 1）。

5. 高圧力処理によるノロウイルスの不活化

高圧力処理によるノロウイルスの不活化に関する研究は米国を中心に数多く行われており、それらの結果を基にコーデックスの食品中のウイルスの制御に関するガイドライン（Guideline on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of Viruses in Food (CAC/GL 79-2012)）の付属文書 1（Annex I: Control of Hepatitis A Virus (HAV) and Norovirus (NoV) in Bivalve Molluscs）に二枚貝のリスク低減措置の一つとして高圧力処理が記載されている。ノロウイルスの高圧力処理に関する研究は当初は代替ウイルスを用いて実施された。ネコカリシウイルスを用いた報告では、200 MPa、4 分間の処理を -10°C あるいは 50°C で行くと $4 \sim 5 \log_{10}$ 程度減少するが、 20°C では $0.3 \log_{10}$ しか減少せず、温度条件を整えば 200 MPa で十分な不活化効果が得られることが示された[7]（Table 2）。マウスノロウイルスを用いた実験でも 350 MPa、5 分間の処理を 10°C 以下で行くと $4.77 \log_{10}$ 以上の減少となり、 $20 \sim 30^{\circ}\text{C}$ では $1.79 \log_{10}$ 以下の減少に止まることが報告された[6]。これらの報告から、ヒトのノロウイルスに対しても高圧力処理による不活化が期待されていたが、2011年に報告された Leon らのボランティアの感染実験によってその効果が実証された[8]。すなわち、遺伝子型 GI.1 のノロウイルスを接種したカキを高圧力処理した後、ボランティアに喫食

Table 1. Inactivation of representative human or animal viruses by hydrostatic pressure treatment.

Virus name	Family (Genus)	Env ^{*1}	Pressure (MPa)	Time (min)	Temp. (°C)	Reduction (log ₁₀)	Ref. no.
Poliovirus	<i>Picornaviridae</i> (Enterovirus)	No	600	60	20	<1	5
Coxsackievirus B5	<i>Picornaviridae</i> (Enterovirus)	No	600	5	21	NR ^{*2}	5
Coxsackievirus A9	<i>Picornaviridae</i> (Enterovirus)	No	500	5	21	7	5
Parechovirus 1	<i>Picornaviridae</i> (Parechovirus)	No	500	5	21	4	5
Foot-and-mouth disease virus	<i>Picornaviridae</i> (Aphthovirus)	No	240	120	-15	6	5
Hepatitis A virus	<i>Picornaviridae</i> (Hepatovirus)	No	450	5	22	7	5
Aichivirus	<i>Picornaviridae</i> (Kobuvirus)	No	600	5	21	NR	5
Feline calicivirus	<i>Caliciviridae</i>	No	275	5	22	7	5
Murine norovirus	<i>Caliciviridae</i>	No	450	5	20	7	6
Rotavirus	<i>Reoviridae</i>	No	300	2	25	8	5
Infectious bursal disease virus	<i>Birnaviridae</i>	No	230	120	0	5	5
Herpes simplex virus 1	<i>Herpesviridae</i>	Yes	400	10	25	7	5
Cytomegalovirus	<i>Herpesviridae</i>	Yes	300	10	25	4	5
Human immunodeficiency virus	<i>Retroviridae</i>	Yes	350	10	25	>3	5
Simian immunodeficiency virus	<i>Retroviridae</i>	Yes	250	60	22	5	5

*1: Env, envelope; No, non-enveloped virus; and Yes, enveloped virus.

*2: NR, no reduction.

(一人あたり 1.0×10^4 のウイルス粒子を含む) してもらい、発症の有無を調べた。その結果、600 MPa、5 分間、6°C の条件で処理したカキを喫食した群では発症者は見られなかった。一方、未処理のカキを喫食した群と比較して、400 MPa、5 分間、6°C の条件では発症率が減少し、400 MPa、5 分間、25°C の条件では発症率に違いがなかった(25°C より 6°C の冷蔵条件のほうが不活化効果が高い)。この結果は、カキに 10^4 個程度のウイルス粒子が含まれている場合、600 MPa、5 分間、6°C の高圧力処理で完全に不活化され、400 MPa、5 分間、6°C の高圧力処理で部分的にウイルスが不活化されることを示している。感染性推定遺伝子検査法を用いた研究は、近年少なからず報告されている[9-11]。感染性推定遺伝子検査法での評価は、一般に実際の不活化の程度を過小評価しているが、遺伝子型 GII.4 のノロウイルスでは 300 MPa、5 分間以下、6°C 以下の条件で 3 log₁₀ 程度の減少が認められている。一方、遺伝子型 GI.1 のノロウイルスでは 400 MPa、5 分間、1°C で約 3 log₁₀ の減少となっている (Table 2)。

6. 高圧力処理によるカキ中のノロウイルスの不活化の検証

一方、高圧力処理によるカキ中の微生物の不活化とは別に、従来から 200 MPa 程度の高圧力処理でカキの貝柱を外すことができることが知られており[12]、欧米では二枚貝の殻剥きを目的として水産業への導入が進みつつあった。高額な高圧力処理機を生産現場に導入することはわが国においては資金等の面から難しいと思われていたが、2011 年 3 月 11 日の東日本大震災という未曾有の災害を転機として、2015 年に宮城県の某地区に高圧力処理機が導入されることとなった。震災によりカキの殻剥きに従事する人材を確保することが困難となったことから、殻剥きの自動化を主たる目的としたものであったが、ノロウイルスの不活化も念頭に置かれていた。以上の学問的および社会的な背景から国立医薬品食品衛生研究所においても高圧力処理によるノロウイルスの不活化の検証実験を開始した。

Table 2. Inactivation of human norovirus and its surrogate viruses by hydrostatic pressure treatment.

Virus	Media	Time (min)	Pressure (MPa)	Temp. (°C)	Reduction* ¹ (log ₁₀)	Assay	Ref. no.	
FCV* ²	10%FBS-DMEM	4	200	− 10	5	Infectious dose	7	
				50	4			
				20	0.3			
MNV	10%FBS-DMEM	5	350	30	1.15	Infectious dose	6	
				20	1.79			
				10	4.77			
				5	5.56			
	Shucked oyster	5	400	5	4.05			
HNV (GI.1)	Shucked oyster	5	400	25	3/5* ³	Volunteer infection experiment	8	
				6	3/14* ³			
			600	6	0/10 * ³			
HNV (GII.4)	Supernatant of oyster homogenate	5	300	25	1.1	Genetic titer* ⁴	9	
				6	3.5			
			400	25	3.3			
				6	3.9			
			500	25	3.7			
				6	> 4.0			
			600	25	> 4.0			
				6	> 4.0			
	Oyster homogenate		300	25	1.7			
				6	2.9			
			400	25	3.6			
				6	3.6			
			600	6	> 4.0			
				HNV (GI.1)	300			25
			6					0.7
			400		25			1.0
6		1.3						
450		1	2.9					
	25	0.9						
500	6	2.8						
	1	4.3						
HNV (GI.1)	500	25	2.1					
		6	4.0					
	600	1	4.0					
		6	> 4.1					
	HNV (GI.1)	Oyster homogenate	2	450	25	0.7	Genetic titer* ⁴	10
					0	3.2		
				500	25	0.8		
					0	> 4.3		
300				25	0.7			
				0	3.2			
350				25	3.6			
				0	> 4.2			
HNV (GII.4)	Oyster homogenate	2	300	0	2.8	Genetic titer* ⁴ Infection to pig	11	
				25	0.9			
				35	0.5			
			350	0	3.7			
				25	3.0			
				35	1.0			
			400	0	4.0			
				25	3.8			
				450	0			4.2
			25	4.0				

Table 2 was reproduced from reference number 1 by permission of the publishing company and was translated into English.

*¹: Values in bold style express $\geq 3 \log_{10}$ reduction in *in vitro* studies or complete inactivation in the volunteer infection experiment.

*²: Abbreviations used in table 2: FCV, feline calicivirs; MNV, murine norovirus; HNV, human norovirus, and FBS-DMEM, fetal bovine serum-Dulbecco's Modified Eagle Media.

*³: No. of subjects infected/total.

*⁴: Genetic assay (quantitative real-time PCR) employing both of RNase treatment and PGM (porcine gastric mucin)-conjugated magnetic beads assay.

6.1 感染性推定遺伝子検査法の開発

検証実験は、2012 年度から 2013 年度食品健康影響評価技術研究「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」において開発した感染性推定遺伝子検査法で実施した。この検査法では、①核酸抽出操作に先立ち露出したウイルス RNA を RNA 分解酵素 (RNase) で消化する、②オリゴ (dT) プライマー (チミン (T) の 12~18 個程度の連続配列を持つ DNA 断片) を用いて逆転写反応 (逆転写酵素を用いて RNA を鋳型として相補的な DNA を合成する反応) を行うことでウイルス RNA の 3' 末端から PCR (Polymerase Chain Reaction: 最も代表的な遺伝子増殖法) 増幅部位までの間 (全ゲノムの約 30% にあたる) が損傷のないウイルス RNA から鋳型 cDNA (逆転写反応により合成された相補的 DNA) を合成する、の 2 点を改良することで、不活化したウイルスの検出を抑えている。この検査法により加熱、塩素による不活化、環境中での生存性、下水流入水と下水放流

水からのノロウイルスの検出などを行ったところ、従来の遺伝子検査 (PCR 法) と比較して、感染性粒子の存在をより反映した方法であることが確かめられた。

6.2 カキ乳剤等に接種したノロウイルスの高圧力処理による不活化

ノロウイルスの代替ウイルスであるネコカリシウイルス、高圧力処理に耐性であるコクサッキー B5 型ウイルス、および遺伝子型 GI.4 と GII.4 のノロウイルスを含むリン酸緩衝液、カキ乳剤などを 400 MPa で 5 分間あるいは 10 分間または 600 MPa で 5 分間高圧力処理 (実験の処理温度はいずれも室温、以下同様) を実施したところ、ネコカリシウイルスの感染価は 400 MPa で陰性化した (不活化された)。一方、コクサッキー B5 型ウイルスは 600 MPa でも感染価の減少は認められなかった (不活化されなかった)。両ウイルスの感染性推定遺伝子検査法による遺伝子定量値は感染価と概ね同様

Fig. 1. (Color online) Inactivation of noroviruses GI.4 and GII.4, feline calicivirus, and coxsackie virus B5 by hydrostatic pressure treatment. Copy number of viral genome were measured by both of developed PCR (real-time PCR employing both of RNase treatments before RNA extraction and reverse transcription using oligo (dT) primer) and common PCR (real-time PCR commonly used in Japan). Abbreviations used in Fig. 1 are as follows: NoV, human norovirus; CB5, coxsackie B5 virus; FCV, feline calicivirus; DT, digestive tissue (digestive diverticula) homogenate; BE, beef extracts; PBS, phosphate-buffered saline without calcium chloride and magnesium chloride; cont, control; and sea water, artificial sea water.

の傾向を示し、ネコカリシウイルスではほぼ陰性化し、コクサッキー B5 型ウイルスではほとんど変化しなかった (Fig. 1)。ノロウイルス GI.4 と GII.4 の感染性推定遺伝子検査法による定量値はネコカリシウイルスの結果と同様の傾向を示し、400 MPa、5 分間の処理ではほぼ陰性化した。このことから、ノロウイルスもネコカリシウイルスと同様に 400 MPa、5 分間の処理で不活化されている可能性が示唆された。一方、従来の遺伝子検査法では遺伝子量の低下があまり観察されなかった。

6.3 人工的にノロウイルスを汚染させたカキおよび養殖カキの高圧力処理

以上の予備実験の結果や諸外国での研究結果を背景として、農林水産省が主体となり、宮城県庁、宮城県のカキ生産者（前述の高圧力処理機を導入した事業者）などの協力を得て、人為的にノロウイルス（遺伝子型 GII.17）を汚染させたカキを対象として高圧力処理の不活化効果を検証する実験が行われた。その結果、400 MPa、5 分間処理することで、感染性推定遺伝子検査法で約 $2 \log_{10}$ のウイルス量の減少が観察された[13]。さらに、養殖カキを用いた検証実験では、未処理のカキではノロウイルスが陽性となったが、400 MPa、5 分間処理したカキでは全例が陰性となった[14]。以上の実験において高圧力処理はいずれもカキ生産現場に導入された高圧力処理機を用いて実施された。これらの結果は、高圧力処理がカキ中のノロウイルスのリスク低減に有用であることを示すとともに、実際のカキ生産現場での実用化が可能であることを示唆する。

6.4 冷凍カキの高圧力処理によるノロウイルスの不活化

また、カキ生産業者の取り組みにより、冷凍したカキをそのまま高圧力処理に供すると、凍結していない生のままのカキを処理する場合と比較して、不活化効果が高まることが実証され、特許申請がなされている。さらに冷凍カキは高圧力処理により解凍されることから、この方法を利用すれば、殻付きカキをそのまま凍結保存しておき、夏場を含め必要な時期に高圧力処理をすることで、貝柱がきれいに外れ、汚染しているノロウイルスが不活化され、解凍したカキを市場に提供することが可能となる。

7. 高圧力処理によるカキの身の変化

一方、カキを高圧力処理することによりカキの身自体にも加える圧力や処理時間等に応じて多少の変化が生じる。この点についても少なからず諸外国において研究が行われている[10,15]。これらの研究では、高圧力処理カキは未処理のカキと比較して、保存性が向上することに加えて、嗜好性においても未処理カキと比較して消費者に受け入れられやすいとの報告が少なくない。しかし、酢カキ等により生で喫食する機会の多いわが国において同様の評価が得られるとは限らない。我々も、180 MPa、10 分間あるいは 350 MPa、10 分間の高圧力処理を行ったカキと未処理のカキについて外観や食感などについて官能試験を実施した。その評価は個人で異なり、未処理カキを好む人もいれば、処理カキを好む人も認められたが、両者の区別は困難であると回答する人が多かった。

8. おわりに

以上のように高圧力処理によりカキ中のノロウイルスを不活化することができることから、本処理はカキ喫食に伴う感染リスク低減の手段として有用であると考えられる。現状においては、カキの殻剥きを目的とする場合は 200 MPa 以下、低濃度汚染のノロウイルスの不活化には 400 MPa 程度、高濃度汚染のノロウイルスの不活化には 600 MPa 程度の処理が必要と思われる。ただし、冷凍カキにおいてはより低い圧力の処理がノロウイルスの不活化に適用できる。

一方で、高圧力処理したカキは見た目や食感は生（未処理）の状態に近くても、カキ自体は死亡し、また、高圧力処理という処理を受けているため、「生カキ」と呼べるのかという問題点もある。今後、カキ生産現場への高圧力処理の導入を推進するためには、高圧力処理に関する知識を普及させるとともに、高圧力処理カキの食品流通上および行政上の取扱いについても議論し、コンセンサスを得る必要がある。

謝 辞

本稿を執筆するに際し、研究に協力をいただいた国立医薬品食品衛生研究所 三元 昌美 氏、今村

彩貴 氏をはじめとする農林水産省 消費・安全局
食品安全政策課の関係各位, 明治薬科大学健康薬学
コースおよび麻布大学の学生の皆様に深く謝意を表
します。

参考文献

- [1] 野田衛: 食衛誌, **53**, 12 (2017).
- [2] Y. Ueki, D. Sano, T. Watanabe, K. Akiyama, T. Omura: *Water Res.*, **39**, 4271 (2005).
- [3] M.K. Jones, M. Watanabe, S. Zhu, C.L. Graves, L.R. Keyes, K.R. Grau, M.B. Gonzalez-Hernandez, N.M. Iovine, C.E. Wobus, *et al.*: *Science*, **346**, 755 (2014).
- [4] K. Ettayebi, S.E. Crawford, K. Murakami, J.R. Broughman, U. Karandikar, V.R. Tenge, F.H. Neill, S.E. Blutt, X.L. Zeng, *et al.*: *Science*, **23**, 353 (2016).
- [5] S.F. Grove, A. Lee, T. Lewis, C.M. Stewart, H. Chen, D.G. Hoover: *J. Food Prot.*, **69**, 957 (2006).
- [6] D.H. Kingsley, D.R. Holliman, K.R. Calci, H. Chen, G.J. Flick: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 581 (2007).
- [7] H. Chen, D.G. Hoover, D.H. Kingsley: *J. Food Prot.*, **68**, 2389 (2005).
- [8] J.S. Leon, D.H. Kingsley, J.S. Montes, G.P. Richards, G.M. Lyon, G.M. Abdulhafid, S.R. Seitz, M.L. Fernandez, P.F. Teunis, *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 5476 (2011).
- [9] M. Ye, X. Li, D.H. Kingsley, X. Jiang, H. Chen: *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 2248 (2014).
- [10] M. Ye, T. Lingham, Y. Huang, G. Ozbay, L. Ji, M. Karwe, H. Chen: *J. Food Sci.*, **80**, 1330 (2015).
- [11] F. Lou, M. Ye, Y. Ma, X. Li, E. DiCaprio, H. Chen, S. Krakowka, J. Hughes, D. Kingsley, J. Li: *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 6679 (2015).
- [12] H. He, R.M. Adams, D.F. Farkas, M.T. Morrissey: *J. Food Sci.*, **67**, 640 (2002).
- [13] S. Imamura, H. Kanezashi, T. Goshima, A. Suto, Y. Ueki, N. Sugawara, H. Ito, B. Zou, M. Uema, *et al.*: *Foodborne Pathog. Dis.*, **14**, 518 (2017).
- [14] S. Imamura, H. Kanezashi, T. Goshima, A. Suto, Y. Ueki, N. Sugawara, H. Ito, B. Zou, C. Kawasaki, *et al.*: *Foodborne Pathog. Dis.*, doi: 10.1089/fpd.2018.2444. [Epub ahead of print] (2018).
- [15] D.H. Kingsley, D.D. Kuhn, G.J. Flick, J. Oh, L.S. Lawson, G.K. Meade, C.C. Giesecke: *Am. J. Food Technol.*, **9**, 209 (2014).

[2018 年 10 月 22 日受付, 2018 年 12 月 6 日受理]

© 2019 日本高圧力学会