

## 魚介類におけるウイルス検出法およびウイルス分布の検討

新 開 敬 行\*, 森 功 次\*, 吉 田 靖 子\*, 野 口 やよい\*, 林 志 直\*, 佐々木 由紀子\*,  
貞 升 健 志\*, 中 村 敦 子\*, 山 崎 清\*, 村 田 以和夫\*, 諸 角 聖\*\*

### The study of the virus detection method and virus distribution in the fish and shellfish.

Takayuki SHINKAI\*, Kohji MORI\*, Yasuko YOSHIDA\*, Yayoi NOGUCHI\*, Yukinao HAYASHI\*  
Yukiko SASAKI\*, Kenji SADAMASU\*, Atsuko NAKAMURA\*, Kiyoshi YAMAZAKI\*,  
Iwao MURATA\* and Satoshi MOROZUMI\*\*

**Keywords:** 小型球形ウイルス:Small round structure virus, A型肝炎ウイルス:Hepatitis A virus, 腸管系ウイルス:Enteric virus, 魚介類:Fish and shellfish

#### はじめに

近年, 小型球形ウイルス(以下SRSV)をはじめとした, 腸管系ウイルスやA型肝炎ウイルス(以下HAV)等を原因としたウイルス性疾患が増加している. これらウイルスの感染源として, 井戸水や生鮮食品および輸入食品等の関連が疑われており, 二枚貝をはじめとした生食用の魚介類の関与が最も濃厚であるといわれている<sup>1)</sup>.

平成9年5月の食品衛生法一部改訂以後, 食中毒の病因物質の一つに指定されたSRSVの検出を目的として主にカキ等の生食用魚介類についてウイルス検査を行ってきた. しかし, 食品からのSRSVや他のウイルスについての検査法は未だ確立されておらず, 改善への多くの試みが成されており<sup>2-4)</sup>, SRSV検査法にあってはしばしば改訂が繰り返されてきた. この様な状況にあって, 生食可能な魚介類におけるウイルスの汚染状況はほとんど把握されていない.

そこで, 魚介類を中心としたウイルス検査方法の確立を目的として, 食品の前処理法, ウイルスの抽出法について検出条件の検討を行った. また, 検討の結果, 有用と認められた検査法を用いて市販流通魚介類からウイルスの検出を行い, 汚染実態の一端について調査したので報告する.

#### 材料と方法

##### 1. 供試材料

ウイルス汚染実態調査として搬入された, 市販流通魚介類, 東京湾で採取された魚介類および東京湾流入河川水の計1,170検体を供試した.

##### 1) 市販流通魚介類

平成8年2月から平成12年1月までの調査期間に魚介類販売業者より購入した市販流通のカキ, アサリ, ハマガリ等の二枚貝406検体, 巻き貝76検体, 近海魚類181検体, 甲殻

類・軟体動物類・淡水魚168検体, 魚介類加工食品51検体を調査対象とした.

##### 2) 東京湾産魚介類

平成9年4月から平成12年1月までに東京湾沿岸に棲息するアサリ, バカ貝, カキ等の二枚貝を中心に計208検体を採取し, 供試した(図1).



図1. 東京湾内二枚貝採取地点

##### 3) 東京湾流入河川水

平成10年4月から平成12年1月までに都内を流れる河川水を1検体当たり20 L宛採取し, セルロース吸着凝集法<sup>5)</sup>により試料水中の有機物を濃縮処理して検体とした. 期間中, 合計80検体の試料水についてウイルスの検索を行った.

##### 2. 前処理法の検討

魚介類検体処理液として, pH9のグリシン緩衝液, pH9の3%ビーフエキストラクト溶液(1%NaCl+5M硝酸ナトリウム

\* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

\*\* 東京都立衛生研究所微生物部

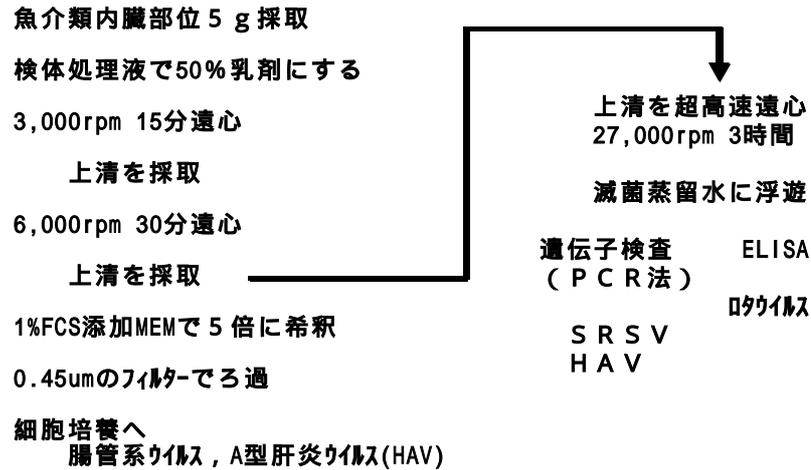


図2. 魚介類からのウイルス検出工程

添加)と2%牛胎児血清(以後FCS)を添加した最少必須培地(以後MEM)の3種類の検討を行った。

除蛋白処理液としては、フロン系溶剤(後にフロン代替溶剤HCFC-134b)およびクロロホルムの2種類について検討を行った。一方、コントロールとして除蛋白処理を行わない試料を用意し、それぞれ処理液の望ましい組み合わせを検討するため、次の方法に従って前処理を行った(図2)。

前処理方法は、魚介類の内臓部位(二枚貝の場合は中腸腺等を含む)を総量約5gを摘出し、細切したものに、検体処理液を等量加え、これを乳鉢またはストマッカーでホモジネートした。この乳剤に除蛋白処理剤を等量添加し(コントロールを除く)、溶剤による前処理を行った。全ての試料を激しくかくはんし、3,000rpm15分間遠心分離して沈渣を取り除き、上清を6,000rpm30分間遠心分離した。さらに、この上清に1%量のFCS添加MEMで5倍に希釈し、孔径0.45umのフィルターでろ過して試料とした(図2)。

### 3. ウイルス分離試験法

前処理方法の検討で試みた各種検査法を用いてウイルスの検索を行った。検索対象ウイルスは、SRSV、ロタウイルス、アデノウイルス(AD)、エコーウイルス(ECHO)、コクサッキーB群ウイルス(CB)およびHAVである。また、上記以外のウイルスが検出された場合にはその他のウイルスに区分した。

#### 1) 腸管系ウイルスの検出

5種類の株化細胞(HeLa, HEp2, RD18-S, Vero, BGM)を5% FCS添加MEMに浮遊させ、24穴の細胞培養プレートに1穴あたり0.5ml宛分注し、37℃のふらん器内で3日間培養して、単層細胞を作成した。その後、プレート内のMEMを除去し、緩衝液(PBS(-))で細胞面を洗浄後、1%FCS添加MEMを1穴あたり1ml宛分注した。これに試料を1穴あたり200ul宛接種し、37℃の炭酸ガスふらん器内で1週間培養した。この期間中の観察で細胞に変性効果が見られたものについては、同定試験を行い、ウイルスの型を決定した。細胞に変化のないものは翌週新しい細胞に植え継ぎ、観察を続行した。1週間の培養サイクルを1代として、4代までの植え継ぎを標

準行程として観察し、4代終了まで細胞が変化しなかったものを陰性とした。

#### 2) HAVウイルスの検出

日本におけるA型肝炎ワクチン作成用細胞のGL37-21細胞を10%FCS添加MEMで浮遊させ、底面積25cm<sup>2</sup>の細胞培養用フラスコに8ml宛分注し、37℃のふらん器内で、7日間培養し単層細胞を形成させた。この後、フラスコ内のMEMを捨て、2%FCS添加MEMを8ml宛分注し、これに試料を0.5ml宛接種し、2日または3日に1度の割合で新しい2%FCS添加MEMと交換し、30日間培養した。培養終了後、細胞面をPBS(-)で洗浄し、1フラスコあたりPBS(-)2mlを満たして細胞の凍結融解を繰り返し、細胞懸濁液を作成した。この細胞懸濁液を用いて、市販のA型肝炎ELISAキットでHAV抗原を測定してウイルスの増殖の有無を判定した。

#### 4. 遺伝子検出法

前処理検体を28,000rpm, 3時間遠心後、沈渣を純水で再浮遊させプロテナーゼKで酵素処理し、セチルトリメチルアンモニウムブロミドとフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1混合液によってウイルス遺伝子の抽出を行った。エタノール沈殿法で抽出した遺伝子液の濃縮を行い、少量の純水またはTE(Tris-EDTA溶液)で溶解し、遺伝子試料とした。

この試料を用いて厚生労働省の推奨するSRSV検出用RT-nested-PCR法を行った。すなわち、NV35/36プライマーを用いてcDNAの作成と遺伝子の増幅を行い、NV81/82 SM82とNV3/51のプライマーを用いてSRSV遺伝子の増幅を行った。特異的遺伝子は2%のアガロースゲル平板で増幅産物を電気泳動し、至適増幅部位の遺伝子断片である330bpまたは200bpの双方またはいずれかのバンドの証明により確認した。

また、HAVは、P17/N17プライマーを用いて、RT-PCRを行い、P15/N16プライマーによりnested-PCRを行った。遺伝子の確認はSRSVと同様に行い、368bpのバンドの有無により確認した。

5. ELISA法

遺伝子検出用に超遠心処理した検体沈渣を純水で再浮遊させた試料100 ulについて市販のロタウイルスELISAキットを用いて測定を行った。術式は、キットの添付書に従い、1時間の検体吸着・標識抗体の結合の後、洗浄、発色により目視または450 nmの吸光度測定により判定した。

結 果

1. 前処理法の検討

1) 検体前処理液

ポリオウイルスの添加回収実験結果からpH域値が中性からアルカリ性域でないウイルスの遊離の妨げになることが判っている<sup>3)</sup>。実験に供した3種の前処理液は、どれもpH域が8~9の弱アルカリ域にあり、必要条件は満たしていた。グリシン緩衝液とビーフエキストラクト溶液は、培養細胞に対する若干の障害作用が見られたが、遺伝子検出にあたっての障害作用は少なかった。一方、MEMは細胞培養法で有利な環境条件を提供し、遺伝子検出時にも何ら問題はなかった(表1)。

2) 除蛋白処理液

フロン系溶剤またはクロロホルムの使用により、腸管系ウイルスの分離試験では悪影響が出て、ほとんどウイルス分離が出来なかった。一方、遺伝子検出では、増幅効率が良好で、遺伝子の泳動像も鮮やかであった(表1)。

表1. 検体処理液と除蛋白処理の適合性

検体処理液	グリシン緩衝液	ビーフエキストラクト	MEM
細胞毒性	△	△	◎
PCR阻害	◎	○	○
脱蛋白処理	◎	○	○

◎:問題なし, ○:ふつう, △:難あり

2. ウイルス分離試験

1) 腸管系ウイルス

市販流通魚介類では、カキから、ADが4株、ECHOが5株、CBが3株分離され、その他の二枚貝では、ADが23株、ECHO

が17株、CBが13株分離された。巻き貝では、ECHOが3株、CBが1株、近海魚類では、ECHOが11株、CBが6株分離された。しかしながら、甲殻類、軟体動物類、淡水魚および加工食品からはウイルスはまったく分離されなかった(表2)。

2) HAV

その他の二枚貝で10株、巻き貝で4株、近海魚類で5株が分離された(表2)。

3. 遺伝子検出

1) 市販流通品

カキ8検体、その他の二枚貝22検体、近海魚類3検体からの計33検体からSRSVが検出された。また、カキ6検体、その他の二枚貝22検体、巻き貝4検体、近海魚類15検体、その他の魚介類4検体の計51検体からHAVが検出された(表3)。

2) 東京湾産二枚貝

3検体からHAVが、3検体からSRSVが、11検体からECHOが、11検体からCBが検出された(表4)。

3) 河川水

8検体からSRSVが、5検体からECHOが、3検体からCBが検出された(表5)。

4. ELISA法による検出

ロタウイルスは、アカガイ3検体から検出された。しかし、ELISA検出試料をロタウイルスのEndとBeg領域におけるPCR法によって再検討したところ、ロタウイルスの遺伝子増幅はなく、ELISA法による擬陽性であることが判った。

5. 魚介類からのウイルス検出

各検出法で得られた成績をまとめると、ウイルスの総合検出数(率)は、214/1,170検体(18.3%)となった。遺伝子検出を含めたカキからのウイルス陽性率は44.7%と高く、その他の二枚貝からのウイルス陽性率も30.9%と高率であった。国産品と輸入品を比較した結果、どちらもウイルス検出率に差はなかった<sup>7)</sup>。品目別では、シジミの陽性率が45.0%と高率のほか、むき身カキが34.8%、生食用カキが29.3%と高い陽性率を示した(図3)。

考 察

ウイルス検査において、ウイルスの遊離・抽出液の選定は重要であるが細胞培養を含めた他種類の検出方法に用いる試料の前処理には、細胞毒性による培養障害の心配がな

表2. 市販流通魚介類のウイルス分離成績

種類	検体数	陽性数	陽性率 (%)	検出されたウイルス			
				HAV	AD	ECHO	CB
カキ	76	20	26.3	—	4	5	3
その他の二枚貝	330	80	24.8	10	23	17	13
巻き貝	76	8	10.5	4	—	3	1
近海魚類	181	24	13.8	5	—	11	6
その他の魚介類*	168	0	0.0	—	—	—	—
加工食品	51	0	0.0	—	—	—	—
計	882	132	11.9	19	27	36	23

\*甲殻類, 軟体類, 淡水魚

表3．市販流通魚介類からPCR法によって検出された遺伝子陽性数

種類	検体数	陽性数	陽性率 (%)	検出されたウイルス	
				HAV	S R S V
力キ	76	14	18.4	6	8
その他の二枚貝	330	44	13.3	22	22
巻き貝	76	4	5.3	4	-
近海魚類	181	18	9.9	15	3
その他の魚介類 *	168	4	2.4	4	-
加工食品	51	0	0.0	-	-
計	882	84	9.5	51	33

\*甲殻類，軟体類，淡水魚

表4．東京湾産二枚貝からPCR法によって検出された遺伝子陽性数

年度	検体数	陽性数	陽性率 (%)	検出されたウイルス				
				HAV	SRSV	AD	ECHO	CB
9年度	65	10	15.4	1	1	-	3	5
10年度	66	8	12.1	-	2	-	3	3
11年度	66	10	15.2	2	-	-	5	3
12年度	11	0	0.0	-	-	-	-	-
計	208	28	13.5	3	3	0	11	11

表5．東京湾入流河川水からPCR法によって検出された遺伝子陽性数

年度	検体数	陽性数	陽性率	検出されたウイルス				
				HAV	SRSV	AD	ECHO	CB
10年度	21	5	23.8	-	-	-	4	1
11年度	23	3	13.0	-	-	-	1	2
12年度	36	8	22.2	-	8	-	-	-
計	80	16	20.0	0	8	0	5	3

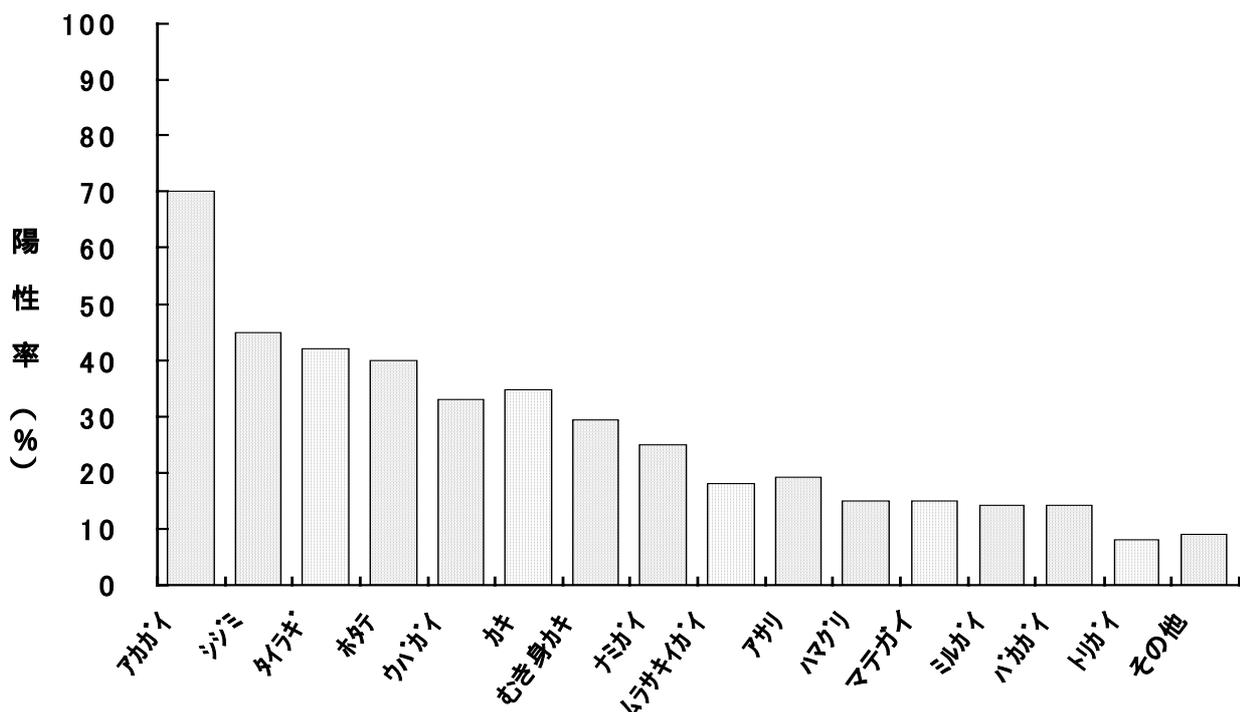


図3．品目別ウイルス検出陽性率 (1996～1997年度 - 市販流通二枚貝)

MEMの使用により良い結果が得られた。また、細胞障害が少なく遺伝子検索に有効なビーフエキストラクト溶液も十分に使用可能であった。しかし、試料の前処理工程での除蛋白処理液の使用は、分離培養等が困難になるため、PCR法等の遺伝子検索を行う場合に限り用いるのが効果的な使い方と思われる。

市販流通二枚貝からのウイルス検出状況をまとめるとヒラガイを除くすべての二枚貝から検査対象とした何れかのウイルスが検出されていたことが判った。

シジミの陽性率が40.5%と高く、ウイルス汚染が進んでいる原因として、棲息域が人家から出される生活排水の影響を受けやすいこと、また、有機物の堆積しやすい川・沼・湖の底にシジミが棲息するためウイルスを取り込みやすく、ウイルス活性も安定保存され得る可能性が高いこと等が原因と推察される。また、カキのウイルス汚染は、生産地が河口域を含む近海に多いことから河川水が養殖域へと容易に到達出来るためウイルスの汚染を受けやすいこと、カキの還水量が他の二枚貝に比べ多いためにウイルスが取り込まれやすいこと等が考えられる。

東京湾産二枚貝と東京湾流入河川水からのウイルス検出率は10から20%台と低かったが、腸管系のECHOやCBは平成12年度を除いて同規模の検出状況にあり、ウイルスが湾内に定着し、経年的に生存している結果であると考えられる。

5年間のウイルス汚染実態調査では、魚介類の産地別または棲息地域別に見てもウイルス汚染の状況に差は認められないことから<sup>7)</sup>、国内で流通する魚介類食材は等しく何らかのウイルスに汚染されているものと推測される。我が国では、カキを除き二枚貝の喫食は、ほとんどが加熱調理され、生食する機会は内蔵を除去したアオヤギ、アカガイ、タイガイ等の寿司ネタの利用に限られている。したがって、ウイルス分布が全国的に広がっているとしても直ちに問題となることは少ないが、生食用の魚介類の摂取により、ウイルス性胃腸炎や他のウイルス性疾患にかかる可能性が示唆されるので、食材の取扱には十分な注意が必要である。

今回検出されたウイルスは、主として内臓材料由来に偏っており、筋肉材料由来のものは少なかった。また、食中毒調査で特に注目されているカキに限らず、多くの魚介類からSRSV、HAVおよび腸管系ウイルスの存在が認められた。したがって、今後、SRSV以外のウイルス性食中毒が流行す

る可能性があり、検査法の統一を図り一刻も早く検査体制を整備する必要がある。また、検査によって得られた結果を基に予防対策を講じる必要もある。これらのウイルスは、季節により流行種が異なるケースもあるが、ほぼ1年中何らかのウイルスが複数の魚介類に存在していることが明らかとなった。Charlesら<sup>8)</sup>の報告によると、我々が検査対象とした以外の腸管系ウイルスや病原ウイルスも貝類から検出されたと報告されており、多くのウイルス種が貝類に蓄積されているものと推察される。

本報では、ウイルス遺伝子の検索は、SRSVとHAVを対象とした。SRSVは未だ培養不可能なウイルスであり、現在最も有効な検出手段とされるPCR法を用いたが、この方法は、死滅したウイルス遺伝子も検出してしまう。本来、食品中のウイルスは、生存しているか否かが問題となるため、生存性を証明するにはウイルス分離試験による増殖の確認や抗原量の定量測定等が必要である。培養手段が無い食品中のウイルスについて、遺伝子の確認のみで汚染を決定する現在の手法では、今後、培養系を持たないウイルスの検索に生存性の証明という難題が突きつけられる可能性があり、新たな手法を考案する必要があると思われる。

#### 文 献

- 1) Cliver, D.O., Ellender, R.D. and Sobsey, M.D.: *J. Food Protec.*, 46(4), 345-357, 1983
- 2) 吉田靖子, 矢野一好, 藪内清: 東京衛研年報, 39, 49-53, 1988
- 3) 新開敬行, 吉田靖子, 矢野一好 他: 東京衛研年報, 41, 11-15, 1990
- 4) 杉枝正明, 秋山真人, 長岡宏美 他: 静岡県衛生環境センター報告, 36, 61-64, 1993
- 5) 矢野一好, 吉田靖子, 新開敬行: 水道協会誌, 60(5), 10-23, 1991
- 6) 矢野一好, 吉田靖子, 新開敬行 他: 臨床とウイルス, 21(1), 17-21, 1993
- 7) 東京都食品環境指導センター食品機動監視第2班平成9年度先行調査報告
- 8) Charles P.G., Sagar M.G.: *J. Food Protec.*, 41(9), 743-754, 1978