

平成21年5月14日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
研究期間：2005～2008  
課題番号：17380110  
研究課題名 (和文) 安全で安心な牡蠣の周年出荷に向けた研究

研究課題名 (英文) Produce a safe and worry free oyster for whole season.

研究代表者

吉水 守 (YOSHIMIZU Mamoru)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授  
研究者番号：40122915

研究成果の概要：20℃以上に調温した0.3 mg/Lの塩素を含む電解海水あるいは中圧紫外線処理海水を用い、*V. alginolyticus* 優勢キートセロスを給餌しながら浄化すれば、カキが痩せることなく、大腸菌、ノロウイルスおよび *V. parahaemolyticus* を排除できると考えられる。さらに安全性を確保するために、2,000気圧の高静水圧をかけて脱殻を行えば、安全性はより向上する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	7,000,000	0	7,000,000
2006年度	2,500,000	0	2,500,000
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
総計	15,300,000	1,740,000	17,040,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：牡蠣、ノロウイルス、浄化、電解殺菌、抗ウイルス、細菌、FCV、

### 1. 研究開始当初の背景

現在、世界各地のカキで問題となっている小型球形ウイルス(現在その多くはノロウイルス; NV) および衛生細菌による食中毒の防止に関連して、汚染カキの効果的な浄化法を開発し、HACCP システムおよびトレーサビリティに則った安全・安心なカキの周年供給を可能にする技術を開発する。

### 2. 研究の目的

本研究は安全・安心なカキを周年出荷するための研究であり、カキを食しての健康障害のリスク評価を行い、リスクとして挙げられる初夏の貝毒と夏から秋にかけての腸炎ビブリオ菌による食中毒および冬季の NV による感染性胃腸炎を回避あるいは浄化する技術の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) マガキを浄化する際に用いる電解海水

の牡蠣に対する影響を調査し、次いで飼育用水の殺菌効果を NV と同じ科の培養可能なネコカリシウイルス ; FCV を用いて試験した。さらに海水中での FCV の生存性を 37, 25, 10, 5°C で観察した

(2) マガキ消化管内容物と FCV を混合して FCV の感染価の変化を観察すると共に、カキの消化管内生菌数を測定し抗 FCV 活性を有する細菌のスクリーニングを行った。

(3) マガキ消化管ホモジナイズ液中での NV 代替 FCV の消長を、温度別に感染価測定法にて観察した。

(4) リアルタイム PCR による FCV ゲノムの定量検出法を開発し、ウイルスゲノムを指標とした NV および FCV の海水中における消長を観察した。次いでカキの自動脱殻装置の温度・圧力下における NV 代替 FCV の生存性を、感染価測定法にて観察し、高静水圧処理後の FCV と NV のゲノム数の変化を観察した。

(5) カキを食しての健康被害に関する NV 以外の危険要因に関するリスク評価を行い、そのリスクを下げる手法について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) マガキを浄化する際に用いる電解海水のカキに対する影響を調査した結果、塩素濃度 0.2~0.3 mg/L ではカキの摂餌・排泄、外套膜に影響は認められなかった。飼育用水の殺菌効果を FCV を用いて試験したところ、FCV は電解食塩水で 0.23 mg/L、電解海水で 0.41 mg/L 濃度の残留塩素で不活化された。海水中での FCV の生存性を 37, 25, 10, 5°C で観察した結果、FCV は温度が高いほど不安定であり 10°C 以下で安定であった。カキ硝化管内容物と FCV を混合して FCV の感染価の変化を観察した場合、FCV はカキ消化管内容物中で不安定となるケースが観察され、この不活化に細菌が関与していた。カキの消化管内生菌数を測定し抗 FCV 活性を有する細菌のスクリーニングを行ったところ、カキの消化管内容物から分離した 310 株の細菌の中から 4 株の抗 FCV 活性を有する細菌が分離された。抗 FCV 活性を示した代表株 *Vibrio neptunis* が産生する抗ウイルス物質は、分子量 50~100 kDa で 60°C 10 分の加熱に安定であった。また *V. neptunis* は標準寒天培地 37°C 培養で増殖しなかった。

(2) マガキ消化管ホモジナイズ液中での NV 代替 FCV の消長を、温度別に感染価測定法に

て観察したところ、20°C 以上において感染価が有意に減少する様子が観察され、カキ個別に評価したところ、個体によって感染価の減少率に差がみられた。海水中での FCV の消長を観察結果、高圧滅菌処理海水中において FCV はウイルス感染価の減少がみられた。リアルタイム PCR による FCV ゲノムの定量検出法を開発し、ウイルスゲノムを指標とした NV および FCV の海水中における消長を観察した結果、両ウイルスゲノムの海水中での変動を比較すると、NV のゲノムは FCV のゲノムよりも安定であった。高圧滅菌海水中に含まれる不活化因子はウイルス粒子の表面構造に作用するが、ウイルス粒子に内包されるウイルス RNA は分解に至らず、安定であることが示唆された。

(3) カキの自動脱殻装置の温度・圧力下における FCV の生存性を、感染価測定法にて観察したところ、800 気圧では 1 桁程度、2,000 気圧ではほぼ検出限界以下まで減少し、加圧が有用であることが明らかとなった。自動脱殻装置の運転条件である 40°C・800 気圧・処理時間 5 分間において、実用機を用いて FCV の生存性を観察したところ、感染価は 2 桁程度減少し、実用機においても有用であることが示された。しかし、リアルタイム PCR により加圧処理後の FCV ゲノムの定量検出を行ったところ、80~4000 気圧の各条件においてほぼ一定の値を示し、不活化したウイルス粒子も検出していることが明らかとなった。NV についても同様に加圧処理し、NV ゲノムの定量検出を行ったが、FCV 同様加圧処理後も一定の値を示した。しかしながら、FCV は、800 気圧では 1 桁程度、2000 気圧ではほぼ検出限界以下まで感染価が減少していることから、加圧処理は NV に対しても有効であると考えられた。

(4) カキを食しての健康被害に関する NV 以外の危険要因を検討し、そのリスクを下げる手法について検討し、以下の成果を得た。カキの健康障害リスク評価では、初夏の貝毒と夏から秋にかけての腸炎ビブリオによる食中毒および冬季の NV による感染性胃腸炎があげられた。貝毒に関しては牡蠣の成熟期と重なり、食味の関係からこの時期は食用に供さないため HA から外れた。腸炎ビブリオ原因菌は *Vibrio* 属の *V. parahaemolyticus* であり、カキの腸管内に存在する他の *Vibrio* 同様、殺菌海水での浄化は困難であった。しかし *V. parahaemolyticus* は腸管内での *V. alginolyticus* との競合に弱く、*V.*

*alginolyticus* 存在下では分離あるいは検出できなくなる現象が明らかとなった。ところで、カキの生物餌料であるキートセロスの無菌化が可能となり、従って、*V. alginolyticus* 優勢キートセロスを給餌しながら浄化すればカキが痩せることなく *V. parahaemolyticus* を排除できると考えられる。ただし、今後詳細に検討する必要がある。*V. parahaemolyticus* も高静水圧に感受性があり、1,600 気圧以上で殺菌が可能であった。加工場での HACCP の CCP 項目に導入すれば、物理的処理により安全性が担保され、トレーサビリティの構築と相まって安心感の提供が可能となる。

以上、本研究で得られた成果を総合的に組み合わせると、20°C 以上に調温した 0.3 mg/L の塩素を含む電解海水あるいは中圧紫外線処理海水を用い、*V. alginolyticus* 優勢キートセロスを給餌しながら浄化すれば、牡蠣が痩せることなく、大腸菌、ノロウイルスおよび *V. parahaemolyticus* を排除できると考える。さらに安全性を確保するために、2,000 気圧の高静水圧をかけて脱殻を行えば、安全性はより向上すると考える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- 1) 吉水 守、笠井久会、カキのノロウイルス浄化法—ネコカリシウイルスを代替に、Proceedings of The 7<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Seminar on Fisheries Sciences, 18-23, (2008)、査読無。
- 2) 吉水 守・笠井久会、水産物の衛生管理と品質管理—漁場から構築する安心・安全な水産物の提供、アクアネット, 11, 66-73 (2008) 査読無。
- 3) Yoshimizu, M., H. Kasai, Elimination of Norovirus (NV) from oyster-Survival of Feline Calicivirus (FCV), a NV surrogate, in Marine Environments and under Inactivating Conditions. Proceedings of the 7<sup>th</sup> Joint Seminar between Japan and Korea by Core University Program on Fisheries Sciences—Local Innovation Based on Fisheries and Marine Industries—, 18-23 (2007) 査読無。
- 4) 吉水 守、安全・安心な水産物の提供を目指して—秋サケとホタテ・カキを例に—、月報 日本水産資源保護協会, 512、9-15 (2007) 査読無。
- 5) 吉水 守、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、日本水産学会誌, 72, 831-834 (2006) 査読有。
- 6) 笠井久会、稲垣奈都子、吉水 守、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 (2006) 査読無。
- 7) Kasai, H., M. Yoshimizu, K. Namba, Elimination of *Escherichia coli* from oysters using electrolyzed seawater. Proceedings of the JSPS-NRCT International Symposium Joint Seminar 2006—Innovative technology for the sustained development of fishery and aquaculture, CD, 5P (2006) 査読無。
- 8) 吉水 守、笠井久会、室越 章、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, 14-22 (2005) 査読無。
- 9) 笠井久会、吉水 守、水産用水および排水の殺菌法について、工業用水, 560, 40 (2005) 査読無。
- 10) Yoshimizu, M., H. Kasai, Creating a safe and worry-free salmon products using a HACCP system from fishing through processing to distribution. Proceedings of the 4<sup>th</sup> FiSCUP Japan-Korea Joint Seminar on Fisheries Sciences, 24-28 (2005) 査読無。
- 11) 笠井久会、吉水 守、ネコカリシウイルスを指標としたカキのノロウイルス浄化法に関する研究、日本ウイルス学会北海道支部 39 回夏季シンポジウム抄録、2 (2005) 査読無。
- 12) 吉水 守、笠井久会、魚類ウイルス病の現状と防除対策における電解水の可能性、ウォーター研究会, 第 34 回セミナー抄録, 国立感染症研究所, 19-23 (2005) 査読無。
- 13) Yoshimizu, M., H. Kasai, Disinfection of seawater for aquaculture by electrolytic apparatus and its application to fisheries sanitation. Proceedings of the JSPS-NRCT International Symposium Joint Seminar 2004, 269-277 (2005).

[学会発表] (計 12 件)

- 1) Kasai, H., M. Yoshimizu, Elimination of

- norovirus (NV) from oyster -Survival of feline calicivirus (FCV), a NV surrogate, in marine environments and under inactivating conditions -2008, Women in Marie Science & Biotechnology Academic conference and Career Development, October 27-28, 2008, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan.
- 2) Kasai, H., M. Yoshimizu, Elimination of norovirus (NV) from oyster -Survival of feline calicivirus (FCV), a NV surrogate, in marine environments and under inactivating conditions. 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress, October 20-25, 2008, Yokohama, Japan.
  - 3) Kasai, H., N. Yoshida, M. Yoshimizu, Screening of bacteria showing the anti-viral activity from aquatic environment, The 4<sup>th</sup> International Symposium on the Marine Biotechnology and Advanced Materials, June 12-13, 2008, Kangnung National University, Korea.
  - 4) 吉水 守、安全でおいしいカキの提供を目指して、カキの消費拡大フォーラム、2007年10月29日、東京。
  - 5) 笠井久会・森川奈末子・蒲谷 淳・吉水 守、カキの食中毒リスク低減を目指した研究－高静水圧処理による大腸菌・腸炎ビブリオならびにノロウイルスの殺菌・不活化、日本水産学会秋季大会、2007年10月28日、函館。
  - 6) Yoshimizu, M., H. Kasai, Elimination of Norovirus (NV) from oyster-Survival of Feline Calicivirus (FCV), a NV surrogate, in marine environments and under inactivating conditions -. The 7<sup>th</sup> Joint Seminar between Japan and Korea by Core University Program on Fisheries Sciences-Local Innovation Based on Fisheries and Marine Industries- Seminar for marine food safety, August, 27, 2007, Chonnam National University, Korea.
  - 7) Yoshimizu, M., H. Kasai, Disinfection of seawater for aquaculture by an electrolytic apparatus and its application to fisheries sanitation. Seminar for sea food safety, July 11, 2007, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, Thailand.
  - 8) 吉水 守、笠井久会、水産物の品質管

理－秋サケとホタテ・カキを例に、食の安全研究センター設立記念シンポジウム、食の安全を担う科学研究の新たな展開、2007年2月22日東京大学農学部弥生講堂一条ホール。

- 9) 笠井久会・吉水 守、ネコカリシウイルスを指標としたカキのノロウイルス浄化法に関する研究. 第55回日本ウイルス学会学術集会, 2006年10月21-23日, 札幌コンベンションセンター.
- 10) Kasai, H., M. Yoshimizu, K. Namba, Elimination of Escherichia coli from oysters using electrolyzed seawater. The JSPS-NRCT International Symposium Joint Seminar 2006 Innovative Technology for the Sustained Development of Fishery and Aquaculture, December 18-20, 2006, Bangkok, Thailand.
- 11) 笠井久会、吉水 守、難波憲二、電解海水による牡蠣の大腸菌浄化について. 第5回日本機能水学会学術大会, 2005年11月9-10日、宮城蔵王ロイヤルホテル.
- 12) Kasai, H., Y. Nakata, M. Yoshimizu, Elimination of norovirus (NV) from oyster -Survival of Feline Calicivirus (FCV), a NV surrogate, in marine environments and under inactivating conditions-. The 1st International Oyster Symposium, July 13-14, 2005, Tokyo, Japan.

〔図書〕(計1件)

- 1) 吉水 守・笠井久会、食の安全を担う科学研究の新たな展開、水産物の品質管理－秋サケとホタテ・カキを例に、東京大学大学院農学生命科学研究科附属食の安全研究センター、pp.117-127 (2007).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

- 1) 水産新聞、ノロ浄化に高静水圧、20度電解処理水と併せ効果、北大・吉水氏が考案、6面、7月25日2005.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉水 守 (YOSHIMIZU Mamoru)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授  
研究者番号：40122915

### (2) 研究分担者

田島 研一 (TAJIMA Kenichi)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授  
(平成 19 年 3 月 31 日退職)  
研究者番号：80002252

西澤 豊彦 (NISHIZAWA Toyohiko)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授  
研究者番号：10222184

澤辺 智雄 (SAWABE Tomoo)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授  
研究者番号：30241376

笠井 久会 (KASAI Hisae)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・助教  
研究者番号：50399995

### (3) 連携研究者

なし.