

VII-3

マガキによる大腸菌ファージQβの蓄積に関する研究

東京大学大学院工学系研究科	学生会員	久山哲雄
同上	正会員	大垣眞一郎
同上	正会員	大瀧雅寛
同上	正会員	片山浩之

1 はじめに

食中毒あるいは有症苦情になった胃腸炎患者の糞便から腸管系ウイルスが検出される事例が多く報告されている。この腸管系ウイルスの感染源として二枚貝、特に生食の機会の多いカキの可能性があると指摘されており、市販されているカキの3割から腸管系ウイルスが検出されたとの報告もある¹⁾。しかしながら、カキによる腸管系ウイルスの蓄積過程に関しては十分に解明されておらず、ウイルスの蓄積を定量的に評価した研究は少ない。そこで本研究においては腸管系ウイルスの代替指標として大腸菌 RNA ファージQβを用い、マガキによるQβの蓄積を経時的に定量した。

2 実験方法

マガキ：6 回の実験のうち、はじめの 2 回の実験では市販されている「殻付き生食用カキ」を使用した。4 回目以降の実験では、養殖場から輸送されてきたものを使用した。

人工海水：イオン交換水 1Lあたりに NaCl 26.75g、KCl 0.75g、CaCl₂ 0.51g、MgCl₂・6H₂O 3.42g、MgSO₄・7H₂O 4.29g、NaHCO₃ 0.21g を溶解したものをを使用した。

水槽：6 回の実験のうち、はじめの 2 回は塩化ビニル製の水槽（450×300×300mm）、3 回目はガラス製の水槽（450×300×290mm）、4 回目以降はガラス製の 10L の広口瓶を用いた。

大腸菌ファージ：腸管系ウイルスと大きさがほぼ同じであるなどの特徴を持つ大腸菌 RNA ファージQβを使用した。なお、Qβの定量は宿主菌として *Escherichia coli* K12F⁺(A/λ)を用いる重層寒天法²⁾で行なった。

抽出液：ビーフエキスを 3% になるように純水（Mill-Q 処理したもの）に溶解し、NaOH を用いて pH を 9.5 に調製した。容器に分注後高圧蒸気滅菌（121℃、15 分）して使用した。

カキに含まれる大腸菌ファージの測定法：殻を剥いたカキを家庭用ミキサーで 1 分間攪拌し、抽出液を加えて再び 1 分間攪拌した。その後遠心分離（7000rpm、4℃、10 分間）をかけ、その上澄み液を重層寒天法を用いて測定した。Qβ濃度は抽出液の体積も考慮してカキに含まれる Qβ総数を求めて、その値をカキの体積で割って求めた。なおカキの比重は 1 とした。

飼育条件：実験環境は室温とし

た。実験中の水温はほぼ 20℃ 一定に保った。人工海水の入った水槽にカキを投入し、その中に Qβ原液を添加した。経時的に海水を採取し Qβ濃度を測定した。24 時間～48 時間飼育した後カキを取出して Qβ濃度を

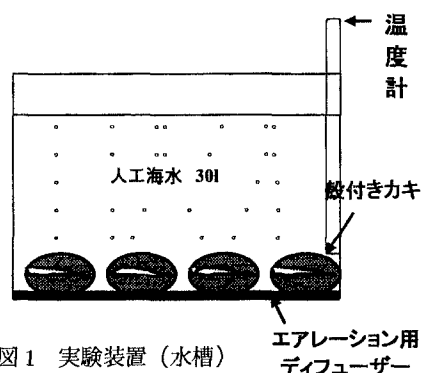


図1 実験装置（水槽）

表1 各実験における実験条件

	水槽の種類	水量 (L)	カキの個数	添加 Qβ濃度 (PFU/ml)	実験時間 (h)	ばっ気量 (L/分)
実験1	塩化ビニル製	30.0	20	4.1×10 ⁶	48	3
実験2	塩化ビニル製	30.0	20	2.6×10 ⁴	24	3
実験3	ガラス製	30.0	20	4.5×10 ³	48	3
実験4	広口瓶	7.5	5	9.0×10 ³	6	4
実験5	広口瓶	7.5	5	9.0×10 ³	24	4
実験6	広口瓶	7.5	5	9.0×10 ³	48	4

キーワード：マガキ、大腸菌ファージQβ、ウイルス、海水

連絡先：〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学大学院工学系研究科 TEL03-3812-2111(6245)FAX03-5800-6956

測定した。飼育中は散気用エアーストーンでばっ気した。その他の実験条件は表 1 に示す。また、対照実験として殻のみ投入した水槽と海水のみの水槽内での残存 Q β 濃度の経時変化も調べた。

3 結果と考察

マガキを投入した海水中的の残存 Q β 量の経時変化の結果を図 2、図 3 に示す。カキを投入した実験の対照実験としてカキ殻のみを投入した場合の経時変化を同じ図に示している（例：実験 1#）。実験中の海水の pH は 8 前後であった。カキを飼育した水槽と殻のみを投入した水槽と海水だけの水槽とでは、残存 Q β 量の経時変化に差が無かった（図 2、図 3）。なお実験 1~3 と実験 4~6 の比較から、ばっ気量を大きくすると残存 Q β 量の減少速度が大きくなるという現象が見られた。

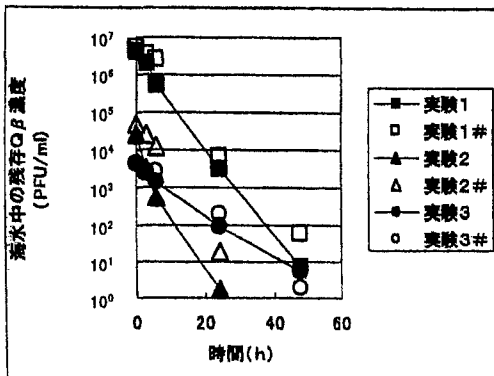


図 2 カキを投入した海水中的の残存 Q β 濃度の経時変化（実験 1~3）

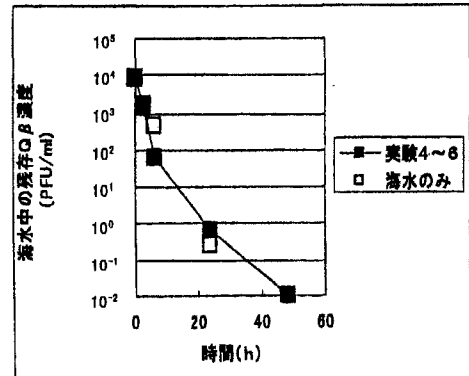


図 3 カキを投入した海水中的の残存 Q β 濃度の経時変化（実験 4~6）

図 4 は、飼育後のカキから検出された Q β 濃度と、実験後の海水中的の残存 Q β 濃度の関係を示したものである。海水中的の残存 Q β 濃度とカキから検出された Q β 濃度は数値としてほぼ同じ大きさにあるといえる。そのことから、カキから検出された Q β はカキが取り込んだ海水に含まれている Q β に相当し、カキは Q β を蓄積していないと考えられる。

ただし、海水中に濁質などの大きな粒子が存在する場合には、Q β が吸着した粒子をカキが蓄積する可能性を考慮する必要がある。

4 結論と今後の課題

濁質の全く含まない人工海水に Q β のみを投入した場合には、海水中的の残存 Q β 濃度とカキから検出された Q β 濃度は数値としてほぼ同じ大きさであった。このことからカキはほとんど Q β を蓄積しないことが分かった。今後は腸管系ウイルスで同様の結果が得られるか確かめる必要がある。

参考文献

- 1) 藤田尚、新開敬行（1997）貝類におけるウイルス分布実態調査、東京都衛生局学会誌、pp230-231
- 2) 神子直之、大垣真一郎（1993）ウイルス不活化の大腸菌ファージによる評価、土木学会衛生工学委員会、「環境微生物工学研究法」、pp233-236、技報堂出版

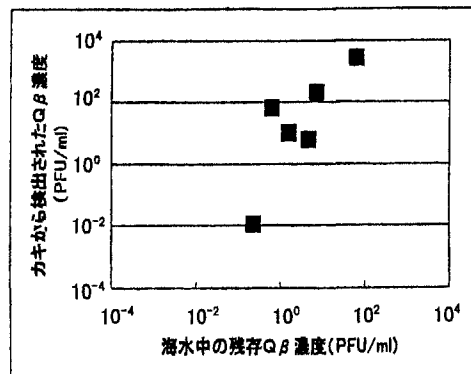


図 4 海水中的の残存 Q β 濃度とカキから検出された Q β 濃度との関係