

令和元年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

平成30年度採択
「生食用カキ類のノーワークウイルス積極的失活化
による浄化技術の研究開発」

研究開発成果等報告書

令和2年 5月

担当局 中国経済産業局
代表補助事業者 株式会社 竹中工務店

目 次

第1章	研究開発の概要	
1-1	研究開発の背景・研究目的及び目標	・・・3
1-2	研究体制	・・・5
1-3	成果概要	・・・6
1-4	当該研究開発の連絡窓口	・・・8
第2章	本論	
2-1	鶏卵抗体を用いたヒトノーワークウイルスの海水中での利用可否・条件検証	・・・9
2-2	パラミロン含有ユグレナ粉末を用いた浄化処理の可否	・・・11
2-3	カキ類の浄化工程における抗 NoV IgY・ユグレナ粉末の利用可否と効果検証	・・・13
2-4	柿渋タンニンの利用を含めた浄化、廃液処理システムと検証	・・・16
2-5	本浄化システムを用いたカキの安全性の証明のための高感度測定法の確立検討	・・・17
2-6	本浄化手順に伴うコスト評価	・・・19
2-7	低温超高压法の併用可否の検証	・・・20
2-8	本システムの市場性調査	・・・21
最終章	全体総括	・・・22

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

【背景】

カキ類は水産物のなかでも消費量の多い代表的な一種である。水産物を生で摂食する習慣のない国・地域でも、カキ類は生食を含む様々な消費形態があり非常に魅力的なマーケットを有する商材である。

従来、生食用のカキ類は安全性を担保する基準である海域特性（病因となる微生物などの密度、量など）が確認された「清浄海域」で生育されたもので、かつ、食品衛生法の規格基準、自主的な検査などにより大腸菌などが基準値以下であることが確認されたもののみが流通してきた。しかし、清浄海域はエリアが限られるばかりか、餌料微生物などが少ないことにより成長や身入りはそれほど良くない。一方、沿岸部海域で養殖されたカキ類は、栄養豊富な餌料微生物が多いため成長が早く身入りも良いが病原菌等に汚染されやすいため、この海域のカキ類は浄化処理を経るか、加熱用として流通するものが多くならざるをえない。

世界的に見てもカキ類の消費に関する近年の課題としては、ノーウォークウイルスなどの微生物に起因する食中毒が挙げられる。通常、生食用カキ類は流通単価が高く、川上の事業者（養殖業・卸業）から川下の事業者（流通・加工業者、小売店）にとって付加価値の高い商材となるが、これら病原体の感染事故リスクを確実にクリアにする技術が十分に確立していないことが、普及・拡販を妨げる原因となっている。

【研究目的及び目標】

本研究は従来の感染予防策に加え、新たなノーウォークウイルスの積極的感染性低下・除去技術を確立し、この日本発の技術を以って新たな市場創出と国内水産業の振興を後押しすることを目的とした。

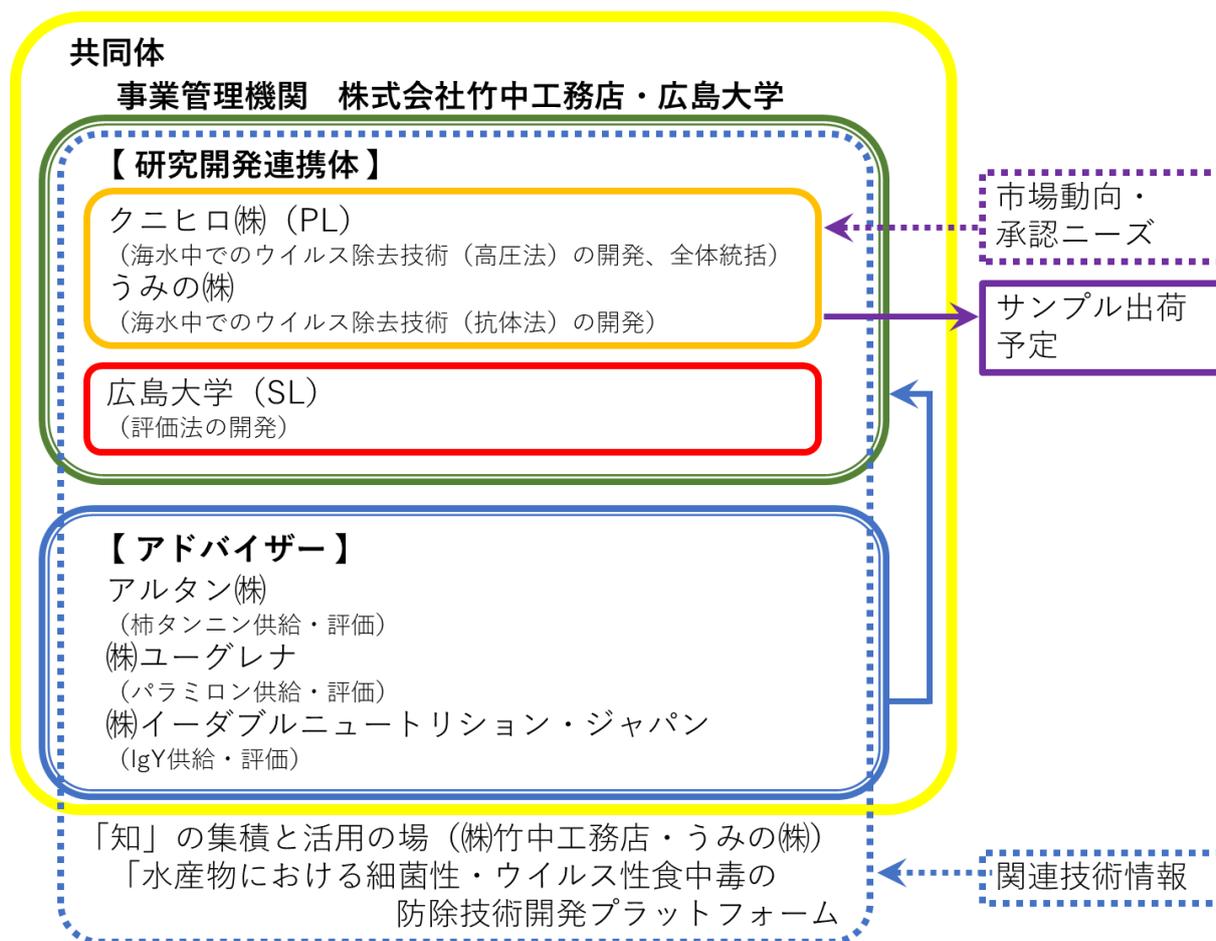
生ガキの高品質・高付加価値化のために、現状の成分規格を超えて（感染性胃腸炎の原因菌等 70%削減）、ノーウォークウイルス（通称ノロウイルス）を生ガキとしての商品価値を保ちながら、カキ体内、及び、浄化環境水中、開殻・脱殻プロセスにおいて物理的・化学的に失活化・除去する積極的浄化システムを構築し、新たな安全基準に到達することを目標とした。

また、広島大学において新たな安全基準の正確な評価を実施するためのノーウォークウイルス失活化評価法の確立と培養法の検討も目標とした。

実施項目等

- 1) 鶏卵抗体を用いたヒトノーウォークウイルスの海水中での利用可否・条件検証
海水中における抗ノーウォークウイルス（NoV）鶏卵抗体（IgY）の使用条件を検証し、カキ類の浄化工程において想定される海水濃度、水温、pH、さらに食用に供した場合を想定した加熱後の条件においても活性を有するか、また使用量の十分条件の検証を行った。
- 2) パラミロン含有ユーグレナ粉末を用いた浄化処理の可否
カキの浄化工程において利用実績がなく、食用に供され工業的に生産可能なユーグレナ粉末（パラミロン含有）を用いて、カキ腸管内の物理的洗浄の可否および IgY の担体としての活用可否を検証した。
- 3) カキ類の浄化工程における抗 NoV IgY・ユーグレナ粉末の利用可否と効果検証
実際の浄化工程を模した施設における両材の試験利用により、使用時の課題・条件と効果を明らかにした。また、試験がいつでも実施できるようにするため、NoV を蓄積していないカキに NoV を取り込ませる技術を確立した。
- 4) 柿渋タンニンの利用を含めた浄化、廃液処理システムと検証
泡沫分離機を用いたカキ代謝物の濃縮回収と、柿渋タンニンによる回収廃液の凝集無害化を目指し試験を実施した。
- 5) 本浄化システムを用いたカキの安全性の証明のための高感度測定法の確立検討
偽陽性の解消と従来法の 1/10 の高感度化を目指し、新たにブタ胃ムチンとマイクロビーズを用いた in situ capture qRT-PCR の確立を目指し手法の確立と実証データの収集を試みた。
- 6) 本浄化手順に伴うコスト評価
一連の新たな浄化工程におけるランニングコストを算出し、実用に耐えられるか検証した。
- 7) 低温超高压法の併用可否の検証
本開発手法に加え、クニヒロ株式会社が有する低温超高压処理によるカキ類の滅菌処理の併用が商用利用が可能か検証した。
- 8) 本システムの市場性調査
本開発システムについて、国内外の浄化設備を有する拠点で導入可能性があるか検証した。

1-2 研究体制



【研究者】

PL：クニヒロ株式会社 商品開発室 林 弘己 室長

SL：国立大学法人 広島大学 大学院統合生命科学研究科 島本 整 教授
うみの株式会社 中村 智治 代表取締役社長

【協力者】

アルタン株式会社 マーケティング室 辻 徹 取締役

株式会社イーダブルニュートリション・ジャパン 開発部 梅田 浩二 部長

株式会社ユーグレナ 研究開発担当 鈴木 健吾 執行役員

1-3 成果概要

- 1) 鶏卵抗体を用いたヒトノーワークウイルスの海水中での利用可否・条件検証
(達成率 100%)

海水中における抗ノーワークウイルス (NoV) 鶏卵抗体 (IgY) の使用条件を検証し、カキ類の浄化工程において想定される海水濃度、水温、pH、さらに食用に供した場合を想定した加熱後の条件においても活性を有すること、使用量の十分条件の検証を行い、カキの浄化に用いることができることを確認した。

- 2) パラミロン含有ユーグレナ粉末を用いた浄化処理の可否 (達成率 100%)

カキの浄化工程において利用実績がなく、食用に供され工業的に生産可能なユーグレナ粉末 (パラミロン含有) を用いて、カキ腸管内の物理的洗浄の可否および IgY の担体としての活用可否を検証し、いずれも利用可能であることを確認した。

- 3) カキ類の浄化工程における抗 NoV IgY・ユーグレナ粉末の利用可否と効果検証
(達成率 100%)

実際の浄化工程を模した施設における両材の利用試験により、使用時の課題・条件と効果を明らかにし、利用できることを確認した。また、NoV を蓄積したカキが手に入らない時期でも試験が実施できるようにするため、予め NoV が検出されたカキを冷凍しておき、これを用いて NoV を蓄積していないカキに取り込ませる技術を確立した。

- 4) 柿渋タンニンの利用を含めた浄化、廃液処理システムと検証 (達成率 70%)

泡沫分離機を用いたカキ代謝物の濃縮回収と回収液の凝集無害化を目指し試験を実施したが、濃縮回収までは成功し実用面では大きく効果があることを確認できたものの、柿渋タンニンによる凝集無害化についてはその物性から検証方法が見いだせず、今後の研究課題として残った。

- 5) 本浄化システムを用いたカキの安全性の証明のための高感度測定法の確立検討
(達成率 50%)

偽陽性の解消と従来法の 1/10 の高感度化を目指し、新たにブタ胃ムチンとマイクロビーズを用いた in situ capture qRT-PCR の確立を目指し手法として確立したが、カキ中腸腺懸濁物中に阻害物質が含まれる、という新たな課題が浮上し、実用化にはさらなる検討が必要となった。

- 6) 本浄化手順に伴うコスト評価 (達成率 100%)

一連の浄化工程におけるランニングコストを算出した結果、カキ 1 個あたり最大で 7.6 円の原材料費増に抑えられることを確認し、これは殻付き生ガキの出荷単価の約 4%と実用に耐える水準であることを確認した。

7) 低温超高压法の併用可否の検証（中止）

クニヒロ株式会社の有する低温超高压処理は元来殻と貝柱の切除の簡易化を目的として確立した技術だが、これを本浄化処理と組み合わせ、より確実に滅菌した商品開発ができないか検証することを計画した。しかし、コスト面や商品化した際の特徴に乏しく商用的魅力に欠けるとして事前検証にて試験を終了した。

8) 本システムの市場性調査（達成率 50%）

クニヒロ株式会社は現在国内外の様々な企業・団体からカキ類の買い付けを行っている。そこで各取引先やカキ類を扱う展示会等に赴き浄化システムの導入可能性や、そうした処理を経たカキ類の購入に興味があるか確認した。その結果、一定程度の国内外需要が見込まれる返答が回収できた。ただし、具体的な商談には至らなかった。また、浄化したカキのサンプル出荷についても今後の課題として残った。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

補助事業者	株式会社 竹中工務店	環境エンジニアリング本部 副部長	尾身 武彦
	TEL:080-6720-6183	FAX:03-6660-6169	omi.takehiko@takenaka.co.jp
補助事業者	国立大学法人 広島大学	東広島地区運営支援部 共通事務室	日置 勝重
	TEL:082-424-6062	FAX:082-424-6070	kyoutu-east3@office.hiroshima-u.ac.jp
PL	クニヒロ 株式会社	商品開発室 室長	林 弘己
	TEL: 0848-46-3994	FAX:0848-46-3970	hayashi@kunihiro-inc.com
SL (委員長)	国立大学法人 広島大学	大学院 生物圏科学研究科 食資源科学講座 教授	島本 整
	TEL:082-424-7897	FAX:082-424-7916	tadashis@hiroshima-u.ac.jp
委員	うみの 株式会社	代表取締役 社長	中村 智治
	TEL:0884-77-1117	FAX:0884-77-1119	t-nakamura@umi-no.jp

第2章 本論

2-1 鶏卵抗体を用いたヒトノロウイルスの海水中での利用可否・条件検証

2-1-1 鶏卵抗体の効果検証方法の確認

試験を進めるうえで効果検証方法を確保することを目的に、ヒト体外診断用医薬品ノロウイルス抗原キット「イムノキャッチーノロ」(栄研化学：以下イムノクロマトキット)および抗NoV VLP ニワトリIgGと抗NoV VLP モルモットIgGの2種類の抗体を用いたサンドイッチELISAによる検出限界の確認、サンプル調製法の確認を行った。その結果、イムノクロマトキットにおける検出限界はNoV GII/4 VLPの濃度が0.1ng/mlであるが、サンプルが海水の場合純水で10倍希釈しなければならないこと、ELISAでは粒子数で 5.5×10^5 /mlであることを確認した。



イムノクロマトキットによるNoV GII/4 VLP 検出限界確認

2-1-2 抗原および抗体の基準量の設定

実際に養殖カキ類が含有しうるNoV量にできる限り近く、かつイムノクロマトキットやELISAで検出できる濃度で検証を進めるため、抗原量と抗体量の基準量を検証した。その結果、NoV GII/4 VLPが終濃度5ng/mL(2.75×10^8 /mL)含まれるサンプルに対し、完全に検出限界以下にするために必要な抗NoV VLP IgYは、イムノクロマトキットにおいては終濃度5 μ g/ml、ELISAにおいては50 μ g/mlのものが必要であることを確認した。

2-1-3 異なる海水性状下における鶏卵抗体と抗原の反応性の検証

前項の抗体および抗原量を基準に、実際にカキ類の浄化を行う際に変動しうる海水条件（pH、比重（塩濃度）、水温、反応時間）下で IgY が機能するかを検証した。各変動要素は、pH は 8.0、7.0、6.0 の 3 段階、比重は 30‰、20‰、10‰の 3 段階、水温は 15℃、20℃、25℃の 3 段階、反応時間は 1h、3h、6h の 3 段階とし、これにポジティブ（陽性）コントロールを加えた計 90 通りの条件下において抗体が抗原を完全に捕捉するか（検出限界以下にするか）、イムノクロマトキットおよび ELISA により定性的、定量的に検証した。その結果、イムノクロマトキットにおいては、いずれの条件下においても陽性は検出されず、また ELISA でも検出限界以下（0.01ng/mL：粒子濃度 5.5×10^5 /mL）であることを確認し、少なくとも本試験条件においてはいずれの条件下においても IgY は有効に機能することが確認された。

2-1-4 抗原との結合維持力の検証

前項の試験で得られた結果を基準とし、IgY により感染性を失ったノーウォークウイルスが摂食後や加工後に再び感染性を取り戻す事がないかどうかを検証する為、NoV VLP-IgY 反応物に対し pH 処理および温度処理を施し、免疫反応性を取り戻す事がないか検証した。各変動要素は、pH は 3.0、5.0、7.0、9.0、10.5 の 5 段階、温度は 20℃、40℃、70℃の 3 段階とし、これにポジティブ（陽性）およびネガティブコントロールを加えた計 17 通りの条件下において、イムノクロマトキットおよび ELISA による検証を行った。

その結果、IgY 添加前のポジティブコントロールを除いた全ての試験区において陽性反応は確認されなかったことから IgY は本試験で設定した条件を経てもその機能性は維持しており、イムノクロマトキットで検出できる濃度範囲において失活能を維持することが確認された。

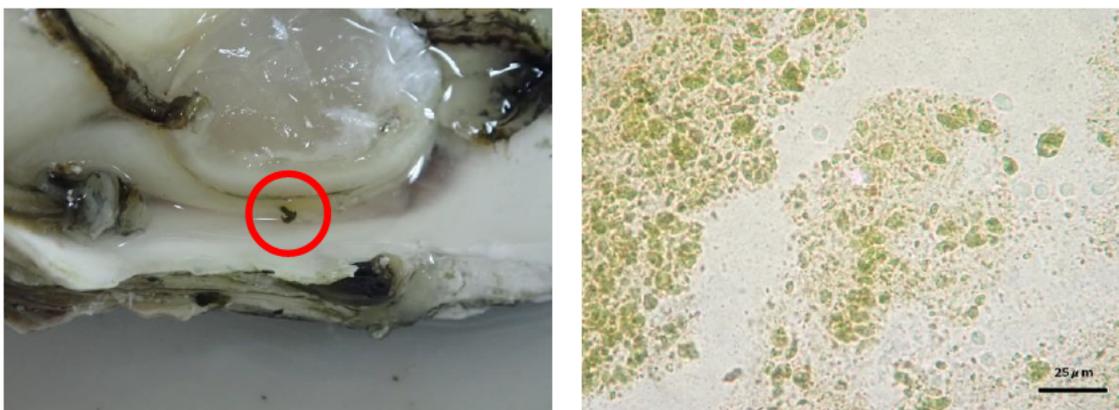
2-2 パラミロン含有ユーグレナ粉末を用いた浄化処理の可否

2-2-1 カキによるユーグレナ粉末の摂食確認

本件では IgY によるカキ腸管内の NoV の不活化だけではなく、IgY-NoV 反応物をカキ類腸管内から物理的に洗浄（掻き出す）し残留 NoV を排出させる目的で、食物繊維である β グルカンに属するパラミロンを含有したユーグレナ粉末を用いた浄化法を検証した。まず初めにカキがユーグレナを摂食するかを検証した。その結果、カキは海水に懸濁したユーグレナ粉末を摂食し、総排出口から糞として排出する事、また 24 時間であればほぼ未消化の状態での排出されることを確認した。



左：ユーグレナ粉末添加直後 右：24 時間後



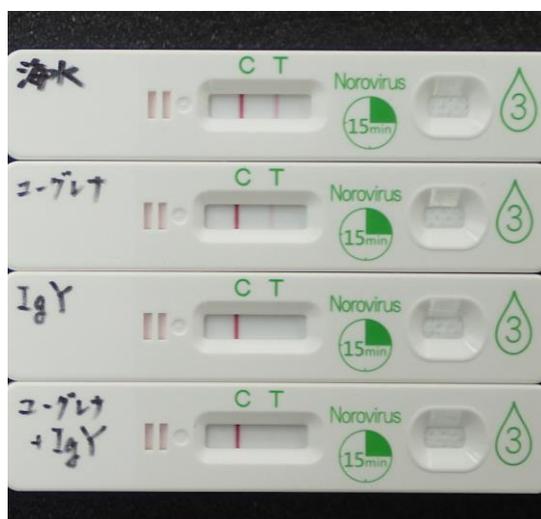
左：総排出口から排出される糞 右：糞の顕微鏡画像（10×40 倍）

2-2-2 ユーグレナ粉末を用いた浄化処理の可否

続いて浄化処理に用いる際の時間や分散性を検証するため、摂食から糞が排出されなくなるまでの時間を確認した。その結果、摂餌開始から 1~2 時間程度で糞は排出され始め、摂餌終了後少なくとも 24 時間は排出され続けること、またユーグレナ粉末は凝集して排出さ

れることが確認された。以上の結果、カキの浄化処理時、IgY を取り込ませるとともにユーグレナ粉末も 2 時間程度摂食させることで効果的に腸管内容物を排出させ、かつ排出物が浄化水中に再懸濁することをある程度防ぐ効果があることが確認された。

また、ユーグレナ粉末単体による NoV 不活化能があるか、あるいは IgY とユーグレナが結合するか、結合した場合不活化能が減衰しないかどうかを検証するため、固相化処理を施したサンプルを調製し抗原と反応させてイムノクロマトキットによる判定を行った。その結果、ポジティブコントロールおよびユーグレナ粉末を単独で懸濁した場合は陽性となり、IgY 単独添加とユーグレナ粉末に IgY を固相化処理したものを添加した区は陰性となった。



ユーグレナ粉末を用いた抗原抗体反応後のサンプルのイムノクロマト像

上から海水区（ポジティブコントロール）、ユーグレナ粉末単独添加区、IgY 添加区、固相化処理サンプル添加区

以上により、ユーグレナ単独では NoV の不活化能はわずかにあり得る程度であるものの、固相化処理したものは IgY の単独添加と同等の NoV 不活化能を有していることが確認され、浄化処理に有効であることが確認された。

2-3 カキ類の浄化工程における抗 NoV IgY・ユーグレナ粉末の利用可否と効果検証

2-3-1 カキが IgY を腸管内に取り込むかの検証

カキが IgY を腸管内に取り込むかを ELISA により検証した。NoV G II.4 VLP を 0.01ng/mL (ウイルス粒子 5.5×10^5 個/mL 相当) となるように添加してよく攪拌した人工海水を用意し、そこにマガキを収容して NoV G II.4 VLP を取り込ませた後、一方の水槽には抗 NoV VLP IgY を、他方の水槽には陰性コントロール IgY を添加して飼育した。飼育終了後、マガキ中腸腺を採材して乳化し、分析サンプルとして ELISA に供し、含有抗体量を測定した結果、全てのカキの中腸腺内容物から IgY が検出された。また、陰性コントロール IgY を添加した海水で飼育した区のカキ中腸腺からは抗原性を有する NoV VLP が検出された一方、抗 NoV VLP IgY を添加した試験区のカキ中腸腺からは NoV VLP は検出されず検出限界以下であった。このことから、IgY は本試験の添加量・濃度であればカキ類に取り込まれること、また取り込まれた IgY は抗体力価を有し、NoV の不活化に効果があることが確認された。

検体	試験区 抗ノロウイルス抗体 添加海水飼育		対照区 陰性コントロール抗体 添加海水飼育	
	総 IgY 濃度 (μg /中腸腺 1g)	NoV VLP 濃度 (ウイルス粒子 数/中腸腺 1g)	総 IgY 濃度 (μg /中腸腺 1g)	NoV VLP 濃度 (ウイルス粒子 数/中腸腺 1g)
	カキ中腸腺 No.1	5.99	検出限界以下	11.35
カキ中腸腺 No.2	66.20	検出限界以下	13.05	1.96×10^6
カキ中腸腺 No.3	8.79	検出限界以下	35.15	9.70×10^5
カキ中腸腺 No.4	7.87	検出限界以下	2.09	5.23×10^5
カキ中腸腺 No.5	140.11	検出限界以下	0.83	検出限界以下
カキ中腸腺 No.6	2.00	検出限界以下	2.31	1.29×10^6
カキ中腸腺 No.7	20.95	検出限界以下	6.44	検出限界以下
カキ中腸腺 No.8	2.15	検出限界以下	40.13	4.81×10^5
カキ中腸腺 No.9	74.25	検出限界以下	41.20	1.59×10^6
カキ中腸腺 No.10	14.35	検出限界以下	6.60	検出限界以下
カキ中腸腺 No.11	20.05	検出限界以下	34.20	2.54×10^6

カキ体内に取り込まれた NoV VLP 及び総 IgY 定量結果

2-3-2 実際の浄化工程を模した設備における実証

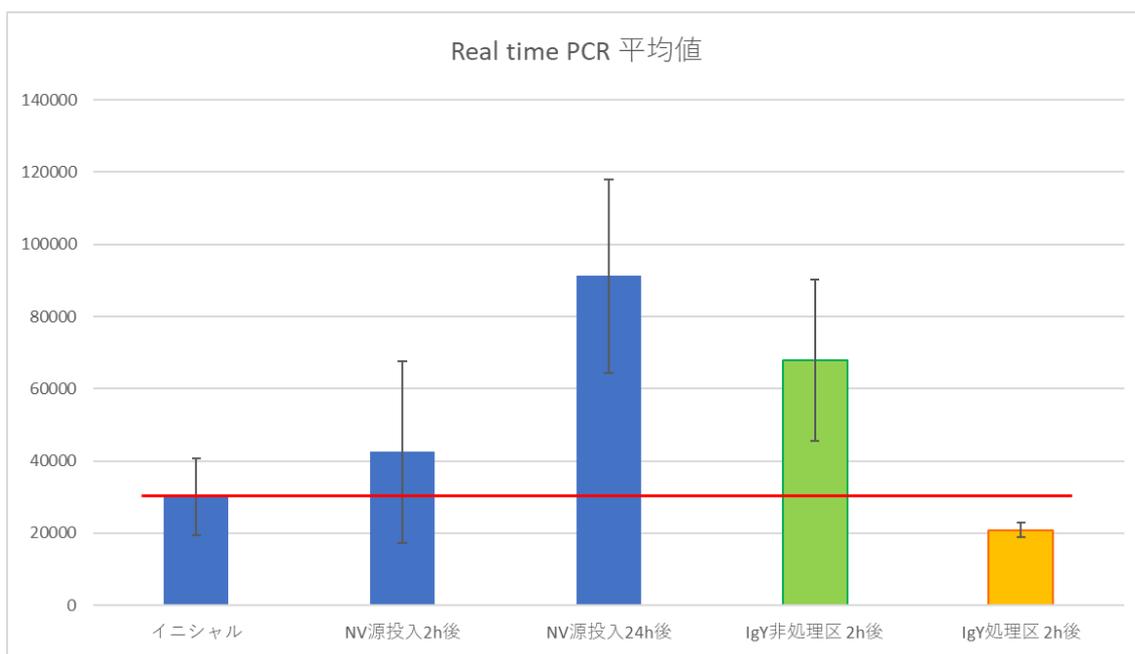
通常のカキの浄化設備と同様の処理が行え、かつ比較することができる仕様の設備一式を設置し、IgY およびユーグレナ粉末を用いた浄化処理の検証を行った。



設置した浄化試験設備と稼働時

ただし、NoV を含有する養殖カキは通年で入手できるものではないため、まずは人為的に NoV を含有するカキの調製法を新たに確立した。NoV が高濃度で検出された養殖カキを採取、冷凍保管しておき、試験前にこれを解凍、海水に懸濁してカキ摩砕液を調製した。次に被験用のカキ類の飼育水槽にこの摩砕液を懸濁し、取り込みを誘導した。この摩砕液の取り込みが完了したカキの中腸腺について Real time PCR 法による NoV の検出を行った結果、確かに NoV が検出されることを確認し、これにより NoV が天然海域で検出されない夏季においても検証試験ができることとなった。

実際に IgY およびユーグレナ粉末を用いた浄化試験を以下の手順にて行った。すなわち、常法に従い水揚げされたカキを施設内水槽 1 基に移送し、馴致したあと、上述した天然の NoV を含有するカキ摩砕液を飼育水に懸濁し、被験カキを調製した。その後、半数を別の水槽に移し、IgY 粗抽出液（エコロゲン：EW ニュートリションジャパン）とユーグレナ粉末を規程量添加し、止水条件で一定時間取り込ませたのち、バルブを開いて 24 時間、通常の浄化処理を施した。サンプリングは各工程で行い、中腸腺中の NoV 量を real time PCR 法により測定した。この工程を繰り返し試験した結果、カキ摩砕液を取り込ませる前後で NoV の検出値は大幅に上昇していること、不活化処理開始から 2 時間後には、非添加区では NoV 量がそれほど低下していない一方で添加区においてはイニシャルよりも低い値まで低下する事が確認された。通常の浄化処理が完了する 24 時間時点ではいずれの区においてもイニシャルより低値を示すことが確認された。



工程、試験区別のカキ中腸腺中のNoV Real time PCR 測定値

赤い線はイニシャルの値

また、本試験を実施する上で明らかになった課題・注意点として、当然であるが浄化槽内でカキが重ならないように、開口できる状態で収容しなければならないことや、排出されたユーグレナ粉末を含む代謝物含有水をできるかぎり分散させず効率的に泡沫分離機に移送する仕様を水槽に組み込むこと、添加した各材を水槽内でムラなくいきわたるように分散させる攪拌仕様にする必要があることなどを見出した。

以上の結果、両材を用いた浄化処理は従来法と比べ明らかに早期にNoVの不活化、除去を実現でき、食の安全だけでなく作業従事者の健康被害リスクの低減にもつなげられることが確認できた。

2-4 柿渋タンニンの利用を含めた浄化、廃液処理システムと検証

本浄化システムは、カキ由来の NoV を含む可能性のある廃液を処理設備外に出さず、効率的に回収し安全に処分できるようにすることで二次汚染を防ぐだけでなく、浄化効率を改善する機能も付加することを目的としている。通常の浄化処理設備では、カキ代謝物は生物濾過槽で捕捉、分解を待つが処理設備から投棄されているのが現状であり、これは作業者の安全確保や地先沿岸海域における二次汚染の発生を誘導しうる。

そこで本システムにおいては、カキを収容する浄化水槽に泡沫分離機を設置導入し、カキ代謝物を浄化水から効率よく、高濃度に濃縮して回収することで生物濾過槽において処理される代謝物量を減らす仕様にすると共に、NoV を凝集沈殿し不活化能があることが証明されている柿渋タンニンを用いて回収された代謝物等濃縮液を処理し、安全な形にして廃棄できるシステムを組み上げた。その結果、泡沫分離機による代謝物の濃縮回収は非常に有効で、目視では確認できない代謝物やその他の有機物もまとめて回収でき、しかも 2000L の水槽からわずか 1L 程度の濃縮液の回収で終わられた。次に柿渋タンニンによる不活化凝集は、柿渋タンニン溶解液を泡沫分離機回収濃縮液に添加し、凝集物を得ることができた。ただし、濃縮液中のすべての有機物等が凝集できたか、含有されるであろう NoV が不活化できているか、等を確認することができなかつたため、今後の検討課題として残った。

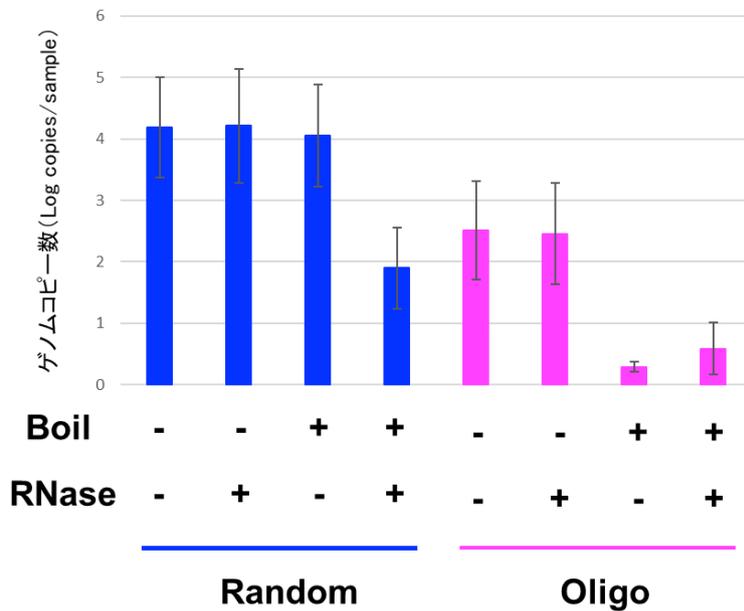


泡沫分離機により回収した代謝物液（左）と柿渋タンニン添加後に確認された沈殿（右）

2-5 本浄化システムを用いたカキの安全性の証明のための高感度測定法の確立検討

NoV は培養法が確立していないことから感染価測定できず、PCR による NoV RNA の検出により有無を確認する方法がとられている。しかしこの既存の PCR 法は感染性を失ったウイルスやカプシド（殻に当たる部位）が破壊されたあとの RNA 断片をも検出してしまふ。これは偽陽性が一定程度発生してしまうだけでなく、検出限界値が高くなり、最小発症ウイルス数を上回ってしまうため一部検査漏れを生んでしまふ、つまり陰性と判定されても発症する場合がある、という問題点を有する。一方本研究における IgY やユーグレナ粉末を用いた NoV 不活化処理は、従来法とは異なる原理による安全対策であり、仮にウイルスが残存したとしても不活化できているため感染・発症を防ぐことができると期待され、その評価法は別に用意しなければ正しい評価はできないと考えられた。そこで本研究では実際に感染性を有するウイルス粒子のみを検出でき、さらに効果検証のため従来法よりも高感度な検出法を新たに確立することを目指した。具体的な手法としては、①RNase による事前処理によりカプシドが壊れた粒子由来の RNA を除去し、②活性型 NoV のみが吸着するブタ胃ムチンを固相したマイクロビーズで捕捉濃縮し、③オリゴプライマーにより RNA 断片を検出しない、という形で実現できないかを検証した。当初は感染価測定が可能な代替ウイルス（MS2 ファージ）で①と③について検証し、この手法は有効であることが確認できた。そこで②を組み込み（ただしマイクロビーズはこの時点では用いず）精製 NoV を対象にした検証を行った結果、従来法と比較し 10 倍以上測定値の低下を実現し、つまり偽陽性を大幅に低減することに成功した。

ヒトノロウイルスの検出におけるRNaseの影響



RNase 処理とオリゴ dT プライマー利用による擬陽性の低減化

(Boil は熱処理によるカプシドを意図的に破壊する処理、+は実施もしくは添加、-は未処理の意)

以上により本手法の有効性が確認されたことから、実際のカキに精製 NoV を取り込ませ、本手法の実用性の検証を試みた。しかし測定値の再現性が著しく悪く、確立には至らなかった。この原因について調査したところ、カキ中腸腺に存在する特定の成分が阻害要因となっており、この点について更なる検証を必要とする結果となった。

2-6 本浄化手順に伴うコスト評価

本浄化法を用いた場合のランニングコストについて算出した。設備費を除いたコスト増要因は IgY 溶液とユーグレナ粉末の購入費のみで、作業時間の著しい増加はなかったことから本件ではこの原材料費のみで算出した。実際に浄化する際の基準となる貝の収容量に対し、現実的に含有しうる NoV を不活化するために十分量と思われる IgY 溶液およびユーグレナ粉末の添加量と、これら原材料の仕入単価からカキ 1 貝あたりの平均値を算出すると、1 貝あたり約 7.6 円以下ですむ結果であった。殻付き生ガキの出荷時単価はサイズや重量、時期や販売先等様々な要因によって変動するため一概には言えず、60 円～500 円の間で推移する。その中でオイスターバー向けの出荷では 200 円前後がボリュームゾーンとすると、原材料費は販売単価の約 4% であり、十分現実的な価格帯での提供が可能な額であることが確認された。

2-7 低温超高压法の併用可否の検証

二枚貝の貝柱は十分に加熱すると殻から剥離されるが、カキは加熱すると生とは全く違った食感、呈味となるし当然生ガキとは呼べず、付加価値の高い商品ともならない。そこでクニヒロ株式会社では、工業的に生産提供でき、殻と貝柱が事前に剥離したカキを限りなく生に近い状態で提供するための方法として、低温超高压処理法を開発した経緯がある。そこでこの技術・商品とIgYやユーグレナ粉末を用いた浄化处理とを組み合わせ、より付加価値の高い商品開発ができないか検討を行った。まず初めに低温超高压処理単独でどこまでNoVが不活化できるか事前検証を行った。被験物としてヒトNoVに性状に近いマウスNoV培養液を用い、圧力や温度、時間等に条件を設け処理し、処理後の培養液の感染価を確認した。その結果、特定の条件下において感染価が検出限界以下になることを見出した。ただし、本条件を殻付きのカキで実現しようとした場合、前処理に大幅なコスト増が見込まれること、高压処理機の仕様を改変強化しなければ到底工業的な生産は実現できないことから、本手法の併用を断念した。

2-8 本浄化システムの市場性調査

IgY とユーグレナ粉末を用いた NoV の不活化および廃液回収処理を含む一連のカキ浄化システムについて、国内外のカキ生産者や流通業者に対し、展示会や営業訪問を行いニーズについてのヒアリングを行った。その結果、NoV 被害について程度の差はあるもののいずれの相手も関心を持っており、実用化を期待する声が聞かれた。ただし、導入については本システムの実用化、実証データの蓄積がなければ判断しにくいこと、また不活化についてゼロリスクを要求する消費者に対し、公的な認証等のお墨付きがなければ単価に反映しにくい、といった課題も聞かれ、今後の展開を期待されるにとどまる結果であった。また最終的に浄化したカキ類のサンプル出荷も期間内には実現できず、今後の課題となった。

最終章 全体総括

ノーウォークウイルス被害を減らすだけでなく、消費喚起を促すことでカキ類生産業の振興に貢献する事を最終目的とし、浄化工程にとって未利用の素材である鶏卵抗体およびユーグレナ粉末を用いた日本発の新技术の確立と、柿渋タンニン等を組み合わせた環境に配慮しリスクを減らした浄化設備仕様の有用性を検証するとともに、現在検出感度等に課題を抱えるノーウォークウイルスの新たな検出・定量法の確立を目指して研究開発を進めたが、おおむね基礎仕様を固めるまでに成果を得ることができたと考えている。ただし、実用化については新たにいくつか課題が見いだされ、今後この課題解決に取り組まなければならない。

一つ目の課題は、ノーウォークウイルスの測定法について、カキを対象として感染性を有するウイルスのみを特異的に、かつ最低発症ウイルス量以下の濃度まで測定できる方法を確立し、またこの定量法について公的な認証を得て安全性担保の証左と認知されるまでにしなければならない点である。この測定法が確立しなければ、本浄化法の正しい有効性の証明ができない。この点については今後他の研究者らとの情報交換等を経て実用化に向けて取り組みたいと考えている。

二つ目の課題はどのように普及させるか、である。既存の浄化設備を有する各業者にとって、一から入れ替えるだけのメリットを提示することができれば早急に普及すると思われるが、現実にはそれほどのメリットは考えにくい。この点については、既存設備を活かしつつ、仕様変更で十分な効果が得られるようにすることで解決できるのではないかと考えている。例えば泡沫分離機等の機器や水槽内で浄化水を正しく攪拌する仕様について臨床的ノウハウを蓄積し、知財化し、これに基づき指導を行う体制を構築することを考えている。

三つ目の課題は浄化に用いる原材料の供給体制や、浄化済みカキの安全性を担保するための検査体制の構築である。IgY やユーグレナ粉末といった浄化原材料は工業的な生産法がすでに確立しているため、需要の増進とともに供給体制を構築できると考えているが、一方で一度の使用量がそれほど多くないため、数件の企業が導入したからと言って供給者にとっての事業的な魅力に乏しく投資案件となりにくい。ゆえに普及には公的な機関による指導等、包括的な枠組みの中で需要を大きくする仕組みが必要だと考える。また、検査体制については定量法の確立が前提とはなるが、各地の保健所や民間の検査機関が連携し、実施機関を増やすとともにこの結果が早く公証データとして認知されるようにしていく必要がある。

我が国のカキ類生産量は世界第4位であり、近年では国外への輸出も増加傾向にある。本事業成果は、我が国カキ産業の国際競争力の強化に貢献できるものと考えている。