

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

低温加熱によるノロウイルスの不活化

研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	小菅 大嗣	麻布大学 環境保健学研究科
研究協力者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ノロウイルス (NoV) による食中毒の予防には、本ウイルスに対する不活化法を確立することが重要である。本研究では、汚染物質存在下での低温加熱による不活化の条件を明らかにすることを目的とした。NoV GI, GII, ネコカリシウイルス (FCV) およびコクサッキーウイルス B 群 5 型 (CB5) を 10% Beef extract 加 PBS(-) 溶液で希釈したものを 35°C~60°C の各温度で、1 時間~一夜加熱を行い、感染価および遺伝子定量値の測定によって評価した。感染価は FCV で、45°C 一夜、50°C 6 時間、55°C 2 時間、60°C 1 時間、CB5 で、55°C 一夜、60°C 1 時間の条件で検出限界以下となった。感染性推定法による NoV の遺伝子定量値は FCV や CB5 の定量値と類似した動きを示したことから、NoV も概ね同様に不活化されているものと推定された。そのため、60°C の場合 1 時間の加熱でノロウイルスが不活化されているものと考えられた。低温加熱はウイルスの簡便な不活化法として有用と考えられた。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) の食中毒を予防するためには、NoV に汚染した食品あるいは糞便や嘔吐物によって汚染した環境中の NoV を不活化することが重要であり、その不活化法として加熱は有効な手段である。NoV 汚染のおそれのある二枚貝などの食品の場合は中心部温度が 85°C~90°C 90 秒以上、調理器具等の消毒には、85°C 1 分以上の加熱が推奨されているが、食品の低温調理の場合や、嘔吐物等で汚染された絨毯や布団などの大型なものは煮沸

消毒等での高温加熱による不活化が困難である場合がある。そこで今回、NoV 不活化に対する温度と時間の関係について把握することを目的とし、60°C 以下の低温条件で長時間加熱することによる NoV 不活化効果を検討した。

B. 研究方法

1. 材料

ウイルスは NoV GI (5.88×10^5 コピー/25 μ L) および NoV GII (1.75×10^6 コピー/25 μ L)、培養可能なネコカリシウイル

ス F9 株 (FCV) (3.16×10^8 TCID₅₀/mL) およびコクサッキーウイルス B 群 5 型 (CB5) (4.4×10^7 TCID₅₀/mL) を用いた。NoV と培養可能なウイルスを一組として、NoV GI と FCV, NoV GII と CB5 の組み合わせでウイルス液を調製した。ウイルス液は 10% Beef extract 加 PBS(-) 14.4 mL にウイルスの保存液を各 300 μ L 添加した後に、0.5mL チューブに 350 μ L ずつ分注して、試験時まで -80°C で凍結保存した。

2. 加熱方法

加熱は恒温水槽を用いて行った。各温度 (35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C) で一定時間 (0 時間 (対照), 1 時間, 2 時間, 4 時間, 6 時間, 一夜 (23 時間)) 加温後、定量試験時まで -80°C で保存した。

3. 感染価定量

加熱したウイルス液 50 μ L を 2% FCS 加 DMEM 450 μ L にて 10 倍希釈し、さらに 10^{-8} まで段階希釈した。96 穴プレートに FCV 用に CRFK 細胞または CB5 用に HEP-2 細胞を播種し、そこへ希釈液 100 μ L ずつ 4 ウェルに接種し 37°C 5% CO₂ 条件で 4~5 日程度培養後、細胞変性効果 (CPE) を指標として 50% 感染終末点法 (TCID₅₀/mL) で感染価を定量した。

4. 遺伝子定量

感染性推定遺伝子検査法 (推定法) と従来法で評価した。推定法は加熱したウイルス液 70 μ L を RNase による消化を 60 分間行い、Roche High Pure Viral RNA Kit にて核酸抽出後、Oligo d(T) プライマーで逆転写反応を行った。従来法は、加熱ウイルス液 70 μ L を RNase 処理を行わず、逆転写にはランダムプライマーを用いた。得られた cDNA からリアルタイム PCR にて

ウイルスゲノムコピー数/2.5 μ L を定量した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 感染価定量

対照 (0 時間) と比較して FCV は、45°C 一夜, 50°C 6 時間, 55°C 2 時間, 60°C 1 時間で感染価が検出限界以下となり、50°C 1 時間~4 時間, 55°C 1 時間では概ね 3 log₁₀ 程度の感染価減少がみられた (図 1)。CB5 では 55°C 一夜, 60°C 1 時間で感染価が検出限界以下となり、55°C 6 時間では 3.37 log₁₀ の感染価減少がみられた (図 3)。

2. 遺伝子定量

対照 (0 時間) の定量値と比較して、推定法では、FCV で 50°C 一夜で 1.08 log₁₀, 55°C 一夜で 1.55 log₁₀, 60°C では 1.86 log₁₀ の遺伝子量の減少がみられた (図 1)。CB5 では 55°C 一夜で 4.01 log₁₀, 60°C 1 時間で 3.11 log₁₀, 2 時間~一夜で 4 log₁₀ 程度の遺伝子量の減少がみられた (図 3)。NoV GI は 55°C 一夜で 1.53 log₁₀ の遺伝子量の減少がみられ、一夜で検出限界以下となった (図 4)。NoV GII は 50°C, 55°C の一夜 加熱で 1 log₁₀ 程度, 60°C 一夜で 2 log₁₀ の遺伝子量の減少がみられた (図 2)。

従来法では FCV と NoV GII では遺伝子量の大きな減少はみられなかった。CB5 では 55°C 一夜, 60°C 2 時間で 1.8 log₁₀, 60°C 一夜で 2 log₁₀ の遺伝子の減少がみ

られ、NoV GI では 60℃ 一夜で 1.17 log₁₀ の遺伝子量の減少がみられた。

FCV と CB5 の遺伝子定量において推定法と従来法を比較すると、推定法は従来法より感染価の減少を反映した。また、遺伝子量の減少曲線は、FCV と NoV GII, CB5 と NoV GI が類似した動きを示した。

D. 考察

FCV および CB5 の遺伝子量と感染価定量の結果と、NoV GI, GII の遺伝子量の定量結果の関係を比較すると、FCV と NoV GII, CB5 と NoV GI の遺伝子量減少が同様な動きを示していることから、FCV または CB5 の感染価と同様に NoV においても感染性が失われている可能性が考えられた。

FCV と CB5 の感染価を比較すると、55℃ の加熱で FCV は 2 時間で検出限界以下となったが、CB5 では検出限界以下まで一夜を要した。50℃ の加熱によって FCV は一夜で検出限界以下となったが、CB5 の一夜では 2.5 log₁₀ 程度の減少にとどまり、CB5 は FCV (F9 株) より温度抵抗性が強い傾向にあった。そのため NoV の加熱による不活化に関して安全性を担保する場合、CB5 を用いた評価を行うことが望ましいと考えられた。

以上のことから CB5 の感染価が検出限界以下に減少した 55℃ 一夜加熱および 60℃ 1 時間以上の加熱で NoV GI, GII が不活化できる可能性が示唆された。また 50℃ の加熱では CB5 の感染価減少は一夜で 2.5 log₁₀ の減少にとどまったことから、十分な不活化効果は期待できないことが示唆された。

NoV によって汚染された絨毯や布団等

の大型で、煮沸消毒等の高温での加熱が困難な物に対するウイルスの不活化について、電気毛布、布団乾燥機等の加熱用電気機器を活用できる可能性が考えられた。

2016 年の Ettayebi らの NoV の培養に成功した論文では、60℃ 15 分の加熱で NoV の不活化が可能であったと報告されている。一方、加熱による不活化は一般に有機物存在下ではウイルスに対する保護作業が認められ、清浄環境と比較して不活化はされにくいとされている。そのため、本試験では汚染環境を想定し、ウイルス液に 10%Beef extract を添加した環境で不活化試験を実施したが、上記報告のようにより短時間でもウイルスが不活化される可能性がある。本試験では 1 時間より短い時間では検討していないことから、今後検討が必要である。

E. 結論

FCV は、45℃ 一夜、50℃ 6 時間、55℃ 2 時間、60℃ 1 時間で感染価が検出限界以下となり、CB5 では 55℃ 一夜、60℃ 1 時間で感染価が検出限界以下となった。遺伝子定量の減少値が FCV と GII, CB5 と GI で似た傾向を示したことから、55℃ 一夜、60℃ 1 時間で NoV も不活化できる可能性が示唆された。NoV の不活化に低温長時間加熱は有効である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

小菅大嗣，三元昌美，上間匡，小林直樹，小西良子，野田衛：低温加熱試験によるノロウイルスの不活化，第 112 回日本食品衛生学会学術講演会，2016，函館

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

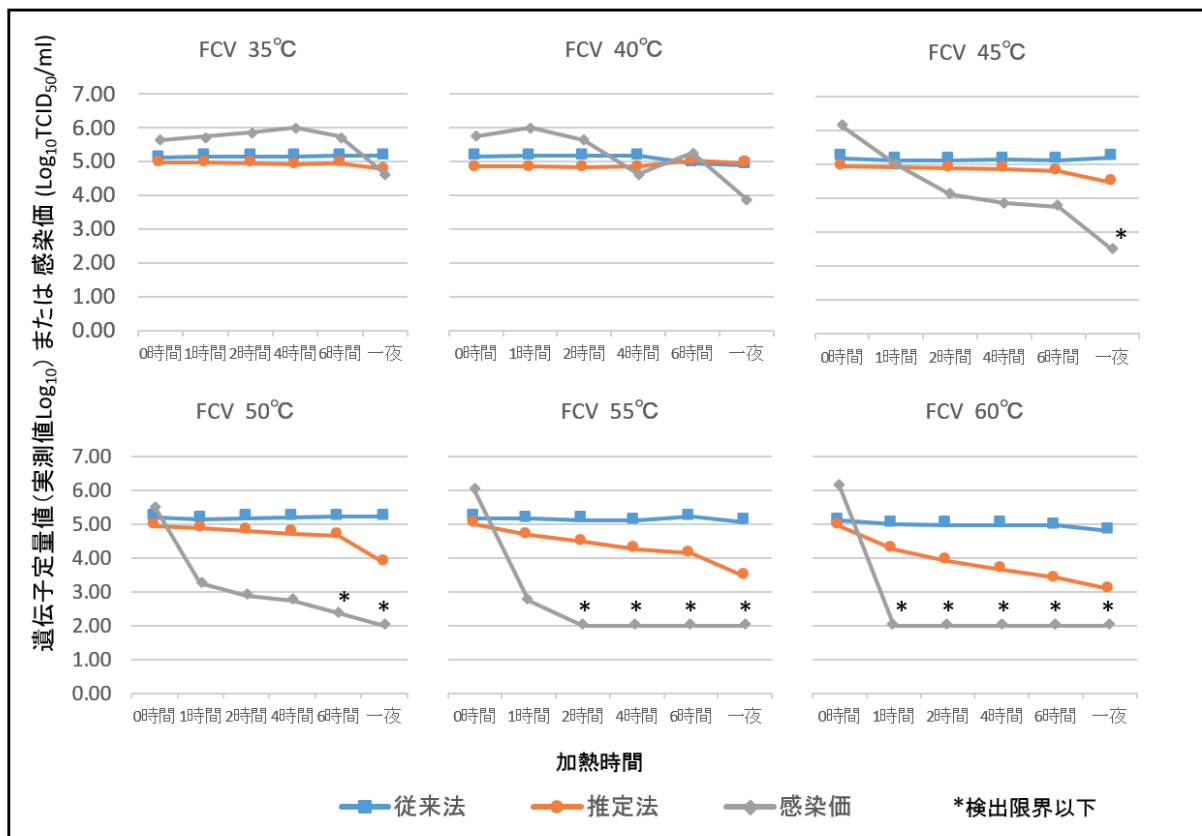


図1 各加熱温度における遺伝子定量値または感染価の変化(FCV)

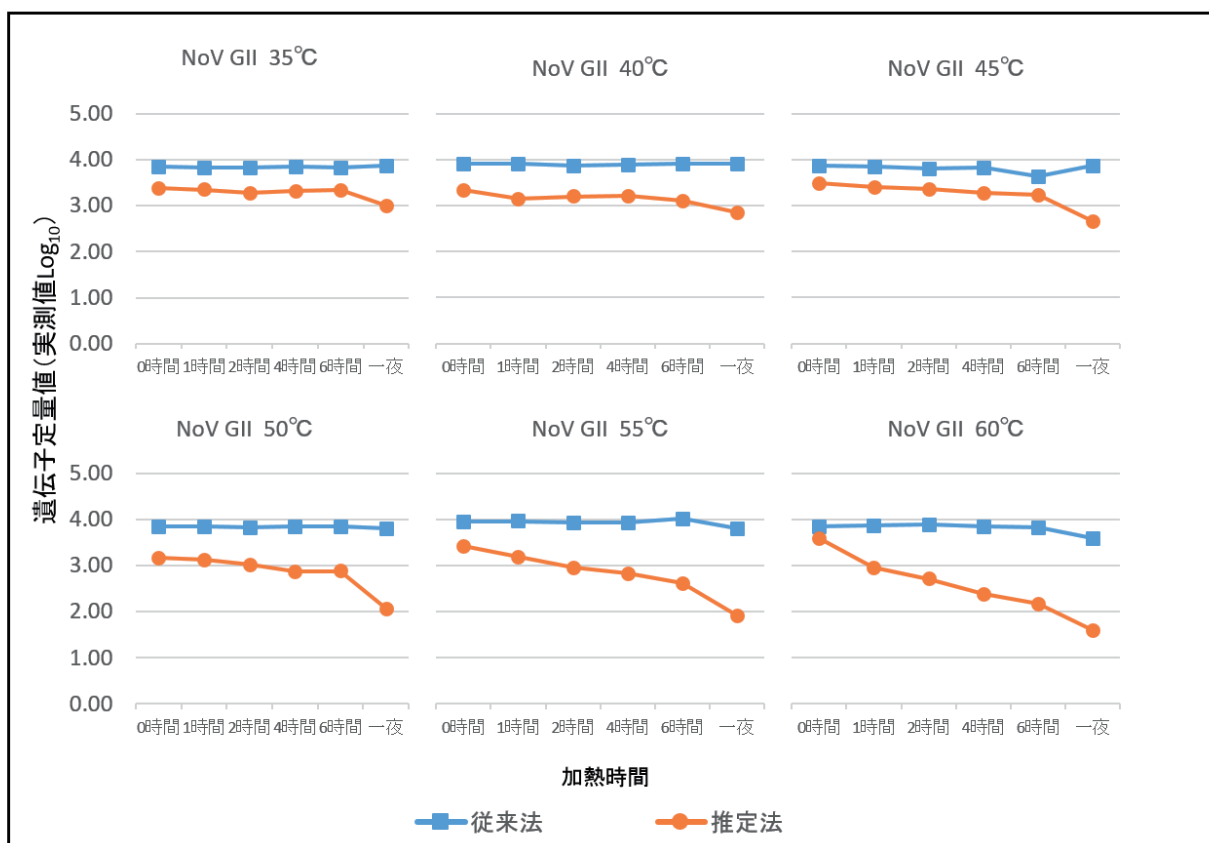


図2 各加熱温度における遺伝子定量値の変化(NoV GII)

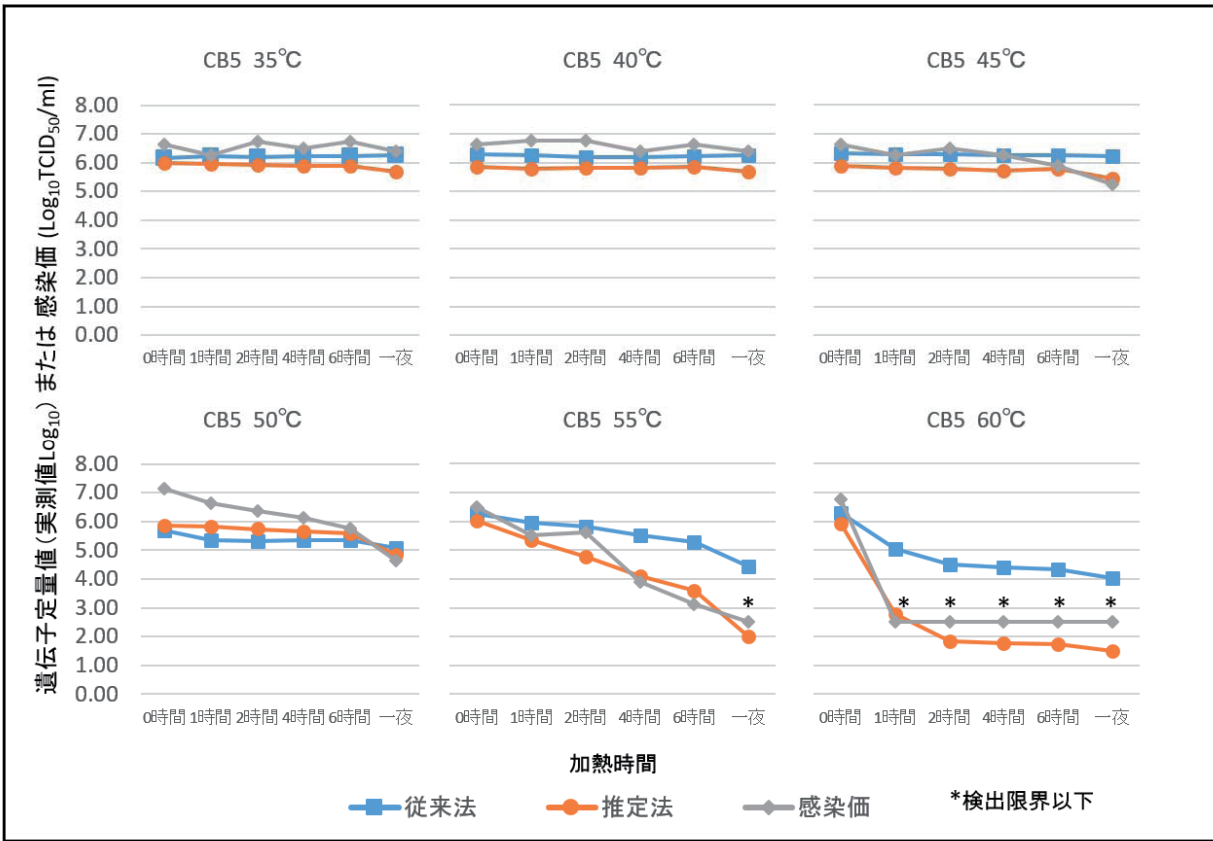


図3 各加熱温度における遺伝子定量値または感染価の変化(CB5)

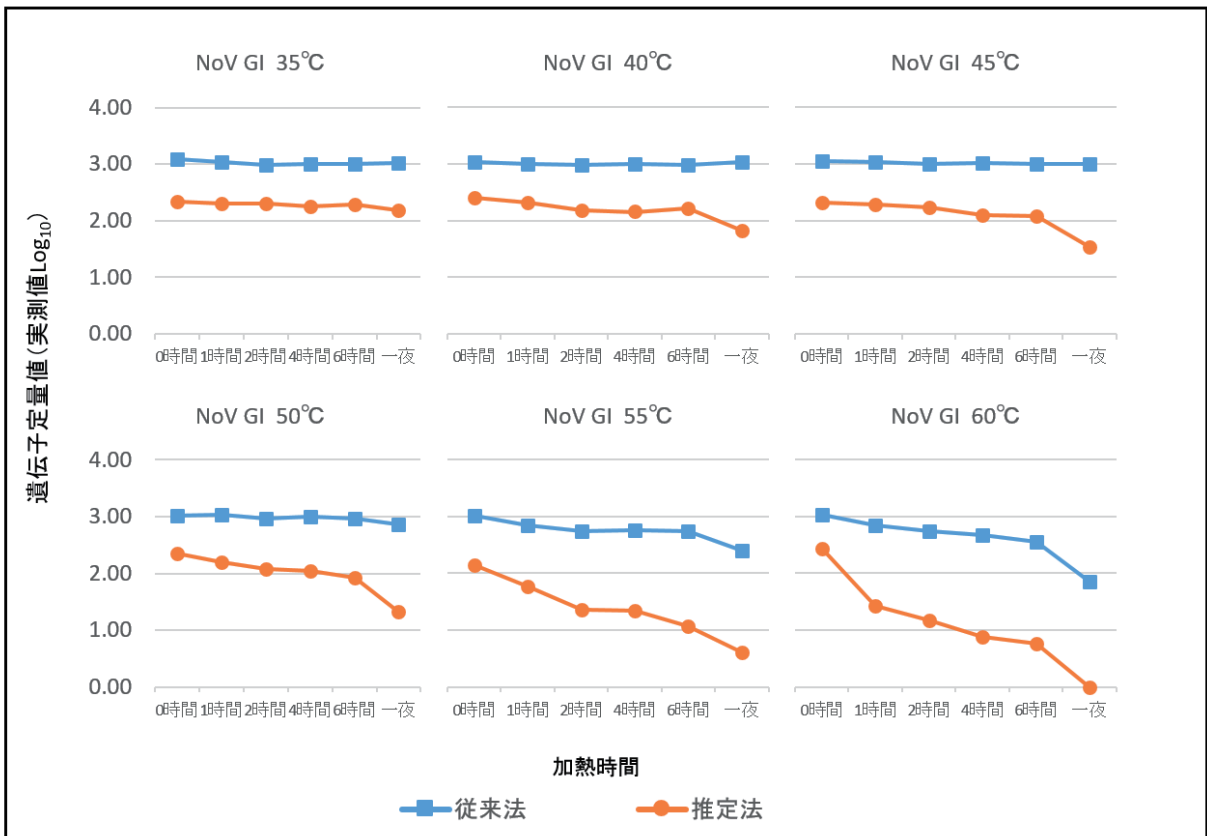


図4 各加熱温度における遺伝子定量値の変化(NoV GI)