

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」
研究分担報告

ノロウイルスの不活化に関する研究

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	永田 文宏	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

現場に応じた各種のノロウイルス(NoV)の不活化法を確立することを目的として、消毒剤(各種の電解水およびファインバブル(FB))およびペットシートを用いた加熱方法を検討した。

NoV の代替としてネコカリシウイルス(FCV)とマウスノロウイルス(MNV)の系を用いて、電解水(微酸性、弱酸性、アルカリ性)およびFBの不活化効果を検討した。FCVではいずれの電解水も不活化効果が認められたが、FB単独では不活化効果は認められず、FBと弱酸性電解水の組み合わせによる相乗効果も認められなかった。一方、MNVではFBと酸性電解水の併用が最も不活化効果が高く、次いで、酸性電解水であった。両ウイルスの結果が乖離したこともあり、さらなる検討が必要である。

市販のペットシートに温水を含ませた場合に、どれくらい温度が保持されるかを検討した。その結果、卓上、床であれば、本法によるウイルスの不活化は期待できるが、カーペットでは十分な効果は期待できない結果であった。ペットシート中心部と比較して、端では高温の持続は難しく、汚染範囲が広い場合にはペットシートの敷き方に注意が必要である。

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る。

電解水は、食塩や塩酸等を電気分解することによって得られる水溶液であり、食品の洗浄・殺菌等に用いられている。電解水には、原水や生成方法の違いによ

り強酸性、弱酸性、微酸性、強アルカリ性などの電解水がある。このうち酸性の電解水は殺菌料として食品添加物として認可されている。一方、ファインバブル(FB)とは、水中で発生する気泡のうち発生時の直径が100 μ m以下の微細な気泡のことで、従来マイクロバブルやナノバブルと呼ばれていたものが統一された。直径が1 μ m以下のものは、特に、ウルト

ラファインバブルと呼ばれており、有害物質の分解除去技術や殺菌技術の一つとして注目されている。本研究では、不活化試験で NoV の代替としてよく用いられている、ネコカリシウイルス (FCV) とマウスノロウイルス (MNV) の系を用いて、各種の電解水および FB 水について、不活化効果を検討した。

一方、おう吐物の汚染があった床等の環境の NoV の汚染除去方法として、ペットシートに熱湯をかけ、レジャーシートとタオル 2 枚で上から覆い保温することにより、ノロウイルスの不活化が可能であるという報告がある。そこで、市販のペットシートを用いた場合に、どれくらい温度を保持することが可能なのかを検討した。

B. 研究方法

1. 電解水および FB による不活化

試験には FCV F9 株とネコの腎臓由来の CRFK 細胞、MNV とマウスのマクロファージ由来の RAW 細胞を用いた。被検液は、供与された微酸性電解水、弱酸性電解水、アルカリ性電解水、弱酸性電解水に FB を含ませたもの (FB+弱酸性電解水)、水道水に FB を含ませたもの 5 種類と対照として PBS (-) を用いた。

ウイルス液と被検液を 1:9 の割合で混合後、3 分間反応させ、10 倍段階希釈し、あらかじめ用意しておいた細胞に接種し、37°C で数日間 (~6 日程度) 培養・観察を行い、50% 感染終末点法 (TCID₅₀) で感染価を求めた。

2. ペットシートの保温試験

ペットシート (レギュラーサイズ: 44×32cm)、熱湯 (1.5L)、アルミホイル、温度ロガーを用い、卓上 (実験台)、床 (実験室=リノリウム)、タイルカーペットの上で実施した。

ペットシートの下に温度ロガーを中心と端の 2 か所設置し、熱湯をかけた後、アルミホイルで保温し、1 分間隔で温度を計測、記録した。

(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. 電解水および FB による不活化

FCV では、微酸性電解水で 3log、弱酸性電解水・アルカリ性電解水および FB+弱酸性電解水で 4log 程度感染価が低下した。(図 1) 一方、MNV では、微酸性電解水で 1log、弱酸性電解水で 3log、FB+弱酸性電解水で 4log 程度感染価が低下した。(図 2)

2. ペットシートの保温試験

ペットシートに温水を含ませた後の温度保持時間を図 3 に示した。黄色で示した部分は、各温度が 1 分間以上保持されたものを示している。床および卓上ではある程度の温度保持が確認された。一方、カーペットでは深部の温度を測定していたため、温度の上昇はほとんど認められなかった。そこで、カーペット表面の温度で測定しなおしたところ、卓上や床と同様の温度保持が確認された。

FCV および MNV で報告されている加熱

によるD値から算出された不活化条件(巻末の表参照)と比較すると、 10^{10} のウイルスの不活化に必要な63℃、5分あるいは72℃、2分の条件は概ね満たしていた。

中心部と端部について比較すると、中心部の温度保持が高い傾向にあった。

D. 考察

1. 電解水およびFBによる不活化

今回、各種の電解水およびFB水についてFCVおよびMNVに対する不活化効果を検討した。電解水については、FCVでは微酸性、弱酸性およびアルカリ性電解水で3log以上の不活化効果が認められたが、MNVでは微酸性電解水で1log、弱酸性電解水で3logの低下が認められたが、アルカリ性電解水では不活化効果は認められなかった。MNVはFCVに比べて、pH安定性が高いと報告されており、反応時間が3分間と短いことから、この結果は妥当であるといえる。

FBについては、FB+水道水ではFCVおよびMNVで不活化効果は観察されなかったことから、FB自体によるウイルス不活化効果は期待できないものと思われた。一方、FB+弱酸性電解水では、弱酸性電解水と概ね同等の不活化効果を示したが、この不活化効果は、弱酸性電解水によるものと思われる。なお、FCVは弱酸性電解水単独と同程度であったが、MNVでは若干、FBを含むものの不活化効果が高く、FBと微酸性電解水の併用により相乗/相加効果が生じる可能性は否定できない。一方、今回の実験において、出荷時の被検液に含まれるFBの数は一定量以上入っていることがメーカーによって確認されている

が、試験時のFBの数を計ることができないため、FBの効果がないとは言い切れない状況である。それらのことを含めて、今後詳細に検討する必要がある。

また、以上のように、被検液のFCVやMNVに対する不活化効果は必ずしも同じではなかったことから、消毒剤等の不活化効果の判定には複数のウイルスを用いて評価を行う必要がある。

2. ペットシーツの保温試験

おう吐物の汚染があった床等の環境のNoVの汚染除去方法として、ペットシーツに熱湯をかけ、レジャーシートとタオル2枚で上から覆い保温することにより、ノロウイルスの不活化が可能であるという報告があることから、同様の試験を実施し、温度変化等について検証した。ノロウイルスの加熱による不活化に関しては、従来はボランティアの感染実験により、60℃、30分で完全には不活化されないと報告されていたが、2016年に発表されたヒト腸管エンテロイドによるノロウイルスの培養に成功した論文では60℃、15分で不活化されたと報告されている。ウイルスの不活化はウイルスが存在する環境(有機物の有無等)やウイルス汚染量等により変化するため、上記のデータは必ずしも直接比較できるものではない。一方、FCVやMNVについてはD値(ウイルス量を1/10に減少させるのに必要な時間)が報告されており、参考に巻末に示した。そのデータに基づくと、 10^{10} のウイルスを1に減少させるためには56℃で35分(MNV)から68分(FCV)、63℃で5分、72℃で2分が必要となる。我々のFCVを用い

た汚染環境(10%Beef extract 加 PBS(-))における不活化実験では、75℃、2分、70℃、3分で不活化できている。今回のペットシートに熱湯を加えた場合の温度の保持時間は、卓上や床のように表面が平滑な環境では概ね上記の不活化条件を満たしており、汚染量を低減させる手段としては利用可能であると考えられた。一方、カーペット(絨毯)については、表面では不活化が期待できる温度が保持されたが、深部では60℃以上の温度には多くの場合達することはなかった。そのため、カーペット等の表面に凹凸を持つものに対しては、本方法の適応は困難であると思われる。

また、ペットシートの中心部と端の部分では端の部分の温度低下が早い傾向にあった。汚染が広範囲に及ぶ際には、そのことを考慮した上で、シートの覆う場所を変えて複数回処理を行うなどの対応が必要と思われた。

E. 結論

FCVにおいては、電解水のpHによる不活化効果が認められたが、FBの有無による有意な差は認められなかった。MNVにお

いては、FB酸性で最も高い不活化効果が認められたが、さらなる検討が必要である。代替ウイルスによって、pH安定性が異なるため、両方のウイルスを用いて評価試験を実施することが望ましい。今回の結果では、電解水とFBの明らかな相乗効果は認められなかった。

ペットシートに熱湯を加えて加熱する方法は、床や卓上などの表面が平滑な環境では汚染したノロウイルスの不活化が期待できる。ただし、カーペット(絨毯)などの表面に凹凸があるものは不活化効果は期待できない。また、ペットシートの端では高温の持続は難しいため、広範囲にペットシートを敷き詰める際は注意が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

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

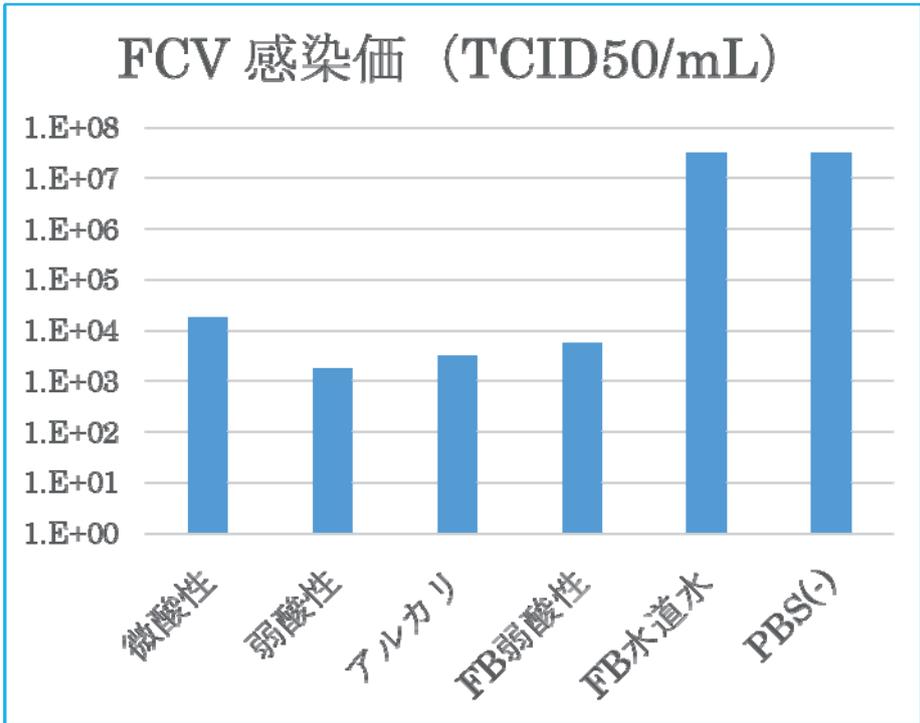


図 1：各種消毒剤等による FCV の不活化

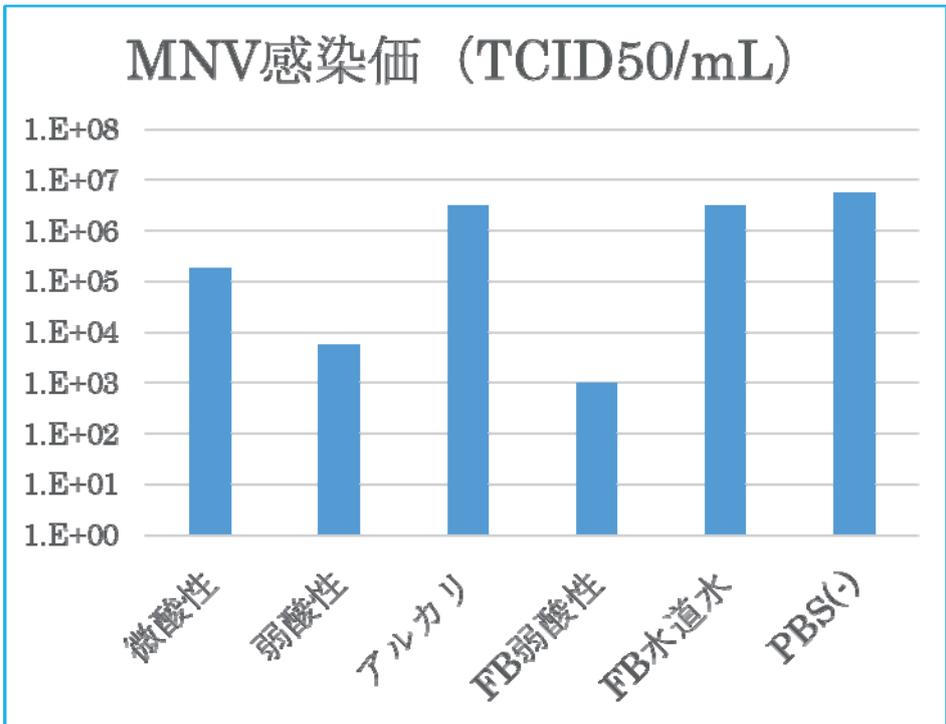


図 2：各種消毒剤等による MNV の不活化

日付	9月7日		9月8日												9月27日			
測定間隔(分)	1																	
シートサイズ(cm)	44×32																	
湯量(L)	1.5																	
ホイル	有																	
測定場所	卓上						床		絨毯		床		絨毯		床		絨毯	
測定チャンネル	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2
85℃以上(回数)	0	1	0	9	1	7	1	2	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
80℃以上	2	17	0	20	3	17	2	4	0	0	3	3	0	0	2	0	0	0
75℃以上	9	31	7	34	8	28	3	7	0	0	6	7	0	0	4	1	0	0
70℃以上	15	47	14	50	13	42	6	12	0	0	9	14	0	0	6	4	0	0
65℃以上	24	63	22	68	19	58	9	18	5	0	12	23	0	0	10	11	0	0
60℃以上	35	82	32	91	28	78	12	25	14	0	17	33	0	8	15	21	0	0
85℃以上(分)	0	0	0	8	0	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80℃以上	1	16	0	19	2	16	1	3	0	0	2	2	0	0	1	0	0	0
75℃以上	8	30	6	33	7	27	2	6	0	0	5	6	0	0	3	0	0	0
70℃以上	14	46	13	49	12	41	5	11	0	0	8	13	0	0	5	3	0	0
65℃以上	23	62	21	67	18	57	8	17	4	0	11	22	0	0	9	10	0	0
60℃以上	34	81	31	90	27	77	11	24	13	0	16	32	0	7	14	20	0	0

図3：ペットシートに熱湯を加えた後の加熱の持続時間（卓上、床、カーペット深部）

日付	9月30日				10月3日	
測定間隔(秒)	10					
シートサイズ(cm)	44×32					
湯量(L)	1.5					
ホイル	有					
測定場所	カーペット表面					
測定チャンネル	B1	B2	B1	B2	B1	B2
85℃以上(回数)	0	19	0	17	0	13
80℃以上	0	54	0	54	8	41
75℃以上	7	96	9	99	21	88
70℃以上	32	144	34	149	38	143
65℃以上	61	200	65	208	60	204
60℃以上	94	268	101	281	88	278
85℃以上(分)	0	3	0	2	0	2
80℃以上	0	8	0	8	1	6
75℃以上	1	15	1	16	3	14
70℃以上	5	23	5	24	6	23
65℃以上	10	33	10	34	9	33
60℃以上	15	44	16	46	14	46

図4：ペットシートに熱湯を加えた後の加熱の持続時間（カーペット表面）

(参考) 表 FCV および MNV の各種ウイルス量における不活化に必要な時間

加熱 温度	供試 ウイルス	D 値	各ウイルス量(log ₁₀)を 1 に減少させるのに必要な時間(分)							
			3	4	5	6	7	8	9	10
56°C	FCV	6.715	21.0	27.0	34.0	41.0	48.0	54.0	61.0	68.0
	MNV	3.473	11.0	14.0	18.0	21.0	25.0	28.0	32.0	35.0
63°C	FCV	0.406	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0	4.0	4.0	5.0
	MNV	0.435	2.0	2.0	3.0	3.0	4.0	4.0	4.0	5.0
72°C	FCV	0.118	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0
	MNV	0.166	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0

文献(Cannon JL, et al.:J Food Prot. 69:2761-2765(2006))の D 値を基に作成