

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

ウイルス不活性化評価ガイドライン策定に向けた
ヒトノロウイルス(hNoV)代替法の検討

研究分担者 高木 弘隆 国立感染症研究所
バイオセーフティ管理室

研究要旨

hNoV を中心とした食品媒介性下痢症の感染・拡大の制御における有用手段として化学的除染が期待されるが、hNoV を用いた培養系評価が困難であり、評価方法も統一されていないことから代替ウイルスでの結果も比較ができていない。これを踏まえ評価ガイドラインの策定を目指し、供試候補 non-envelope virus を用いてエタノール製剤や NaClO、酸化剤などによる不活性化効果比較を行った。製剤の有効成分濃度、組成などでウイルス間・ウイルス株間で不活性化効果に顕著な差が認められ、一部の結果のみならず、総合的な評価による実効性・使用場面の判断が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

食品媒介あるいは介在を起因と下痢症ウイルス感染及びその拡大防止は社会的ダメージが深刻であり、より汎用的かつ実効性の高い手法が渴望されている。これには「推定されうる要因物質・汚染箇所迅速・局所的除染」が効果的であり、その一手段として化学的除染、いわゆる化学製剤を用いた除染が挙げられ、その一端は予防にも繋がる可能性がある。しかしながら対象ウイルスの対環境耐性等の性質を鑑みると容易ではなく、使用可能な製剤はかなり限定されている。また hNoV についてはある程度培養が可能になっているが、操作性・コストの面で汎用性は低く、巷にある多くの製剤を検証

するには非常に困難である。

加えて現在これら製剤に関する評価系のガイドラインは国内に存在せず、諸外国のガイドラインを参照して、企業単位で検証結果を提示するケースが多く、データの比較も非常に困難な状況にある。

こうした状況を踏まえ、現場において実際の除染・感染制御における適切な手法選択が可能となるよう、その科学的根拠となる評価方法の適正化を図るべく、評価ガイドラインの策定を目指すこととした。今回は hNoV 代替法として、代替ウイルスの選定とその特性について検証した。

B. 研究方法

1. 供試材料

a) ウイルス

- ①FCV* F9 株(ATCC VR-782)
 - ②FCV ym3 株(臨床分離株、化学剤抵抗性)
 - ③MNV** S7-PP3 株(日大・遠矢氏供与)
 - ④Enterovirus type71(EV71); Shiga1095 株
 - ⑤human poliovirus type-sabin I(hPoV-I)
- ④⑤はウイルス二部・清水氏より供与
*feline calicivirus **murine norovirus

b) 使用培養細胞

- ①CRFK 細胞(JCRB9035)
 - ②RAW264.7 細胞(ATCC TIB-71)
 - ③VERO 細胞(ATCC CCL-81)
 - ④HEp2 細胞(ATCC CCL-23)
- ①は FCV、②は MNV、③は EV71、④は hPoV の各培養用として使用した。

c)使用培地

- ①2~5%FBS_EMEM
 - ②5%FBS_DMED(high-glucose)
- ①は CRFK、VERO、HEp2 用、②は RAW 用

2. 方法 1) エタノール製剤による供試ウイルス不活性化の比較検討

自家調整エタノールは終濃度が 50~80%となるよう溶液を調製する。市販局方消毒用エタノール(消毒用エタノール IP ; 健栄製薬)は原液のまま使用した。エタノール(Et)溶液と供試ウイルスの混合比を 9:1 とし、マイクロチューブ内にて混合した。反応後 15~最長 300 秒まで経時的に採取し、ただちに各培地にて 7 倍希釈し反応を停止する。96well-microplate にて 7 倍段階希釈系(7^{-1} ~ 7^{-8})を作成し、これを予

め用意した培養細胞 96well-micro-plate に 50 μ l/well で接種した。36°C・5%CO₂にて 4~6 日間培養後、10%ホルマリン-PBS(-)で一晩固定し、固定液を捨て methylene-blue にて染色後に CPE 観察により感染価を算出(Behrens-karber 法)した。

方法 2) 次亜塩素酸ナトリウム液による供試ウイルス不活性化の比較検討
有効塩素 5%以上の次亜塩素酸ナトリウム液より、有効塩素 200ppm(0.02%)±を滅菌精製水にて希釈調製した(試験用 NaClO)。試験用 NaClO と供試ウイルスの混合比を 9:1 として、マイクロチューブ内にて混合した。反応後 20~180 秒まで経時的に採取し、ただちに中和用培地液 1*にて 7 倍希釈し反応を停止する。

96well-microplate にて 7 倍段階希釈系(7^{-1} ~ 7^{-8})を作成し、これを予め用意した培養細胞 96well-microplate に 50 μ l/well で接種した。36°C・5%CO₂にて 4~6 日間培養後、10%ホルマリン-PBS(-)で一晩固定し、固定液を捨て methylene-blue にて染色後に CPE 観察により感染価を算出(Behrens-karber 法)した。

方法 3) 炭酸ナトリウム、過酸化水素及び過炭酸ナトリウムの各溶液による FCV 及び MNV 不活性化の比較検討

炭酸ナトリウム(Na₂CO₃)、過酸化水素水(H₂O₂)、及び過炭酸ナトリウム(Na₂CO₃・H₂O₂)は各々強アルカリ(pH11 以上)、酸化剤、強アルカリ+酸化、という性質を持ち、この 3 者を調べることにより、個々の感受性と両者の相乗効果を図ることができると考えられる。代替ウイルスの代表格である FCV・

MNV の性状を確認する上で重要なファクターとなり得る。

炭酸ナトリウム及び炭酸ナトリウムについては各 1%溶液を、過酸化水素水については 30%原液を希釈し、0.25~2%液を調製した。各試験液と供試ウイルスの混合比を 4:1 とし、マイクロチューブ内にて混合した。炭酸ナトリウム及び炭酸ナトリウムは反応後 2~15 分まで、過酸化水素水反応後 5~60 分まで経時的に採取し、ただちに中和用培地液 2**にて 7 倍希釈し反応を停止する。

96well-microplate にて 7 倍段階希釈系 (7^{-1} ~ 7^{-8})を作成し、これを予め用意した培養細胞 96well-microplate に $50 \mu\text{l/well}$ で接種した。36°C・5%CO₂にて 4~6 日間培養後、10%ホルマリン-PBS(-)で一晩固定し、固定液を捨て methylene-blue にて染色後に CPE 観察により感染価を算出 (Behrens-karber 法)した。

*中和用培地液 1 :

20mM Na₂S₂O₃ 含有各使用培地

**中和用培地液 2 :

・H₂O₂ 用 : 20 $\mu\text{g/ml}$ Catalase 含有各使用培地

・炭酸 Na 用 : 重炭酸 Na 不含、10mM HEPES 含有各使用培地

・過炭酸 Na 用 : 20 $\mu\text{g/ml}$ Catalase、10mM HEPES 含有、重炭酸 Na 不含各使用培地

(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. 結果 1 エタノール製剤による各ウイルスの不活性化

FCV においては 60-70%v/v で感染価減衰が最大となり反応時間 60-120 秒以降で顕著な減衰が認められた。これに対し局方濃度 80%v/v 士では感染価減衰が非常に弱くなる傾向もみられた(図 1-a)、1-b))。MNV は 50~80%v/v まで速やかな感染価減衰を示す。EV71 では局方濃度 80%v/v においても 3 分まで感染価減衰はほとんど認められず(図 2)、hPoV-I では同様の濃度で反応時間 60 秒以降に顕著な感染価減衰が認められた(図 3)。

2. 結果 2 NaClO 200±10ppm による各ウイルスの不活性化

FCV、MNV、EV71、hPoV-I はいずれも反応 20-40 秒後に検出限界となり、4~5log₁₀TCID₅₀の感染価減衰となった(表 1)。

3. 結果 3 H₂O₂、Na₂CO₃、及び Na₂CO₃・H₂O₂による FCV、MNV の不活性化

まず H₂O₂ について、FCV-F9 と MNV-S7 の不活性化効果を比較したところ、FCV-F9 で 2%、MNV-S7 で 0.5%の感染価減衰の傾きがほぼ一致した。すなわち FCV に比べ、MNV のほうが H₂O₂ に対する感受性が約 4 倍高かった。また 2%濃度では約 20 分で 4log₁₀TCID₅₀の感染価減衰がみられた(図 4-a)、4-b))。

次に Na₂CO₃ 及び Na₂CO₃・H₂O₂ について、FCV では反応 2 分後で速やかな感染価減衰がみられ、反応後 5-7 分には 5log₁₀TCID₅₀ まで感染価が減衰した(図 5-a))。MNV では Na₂CO₃ で反応 15 分後でも 1log₁₀TCID₅₀ 程度の感染価減衰にとど

まったが、 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ においては反応後10分で検出限界以下となり、 $4\log_{10}\text{TCID}_{50}$ の感染価減衰が認められた(図 5-b))。この際1% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ 中の過酸化水素濃度は0.16-0.18%で、5時間までは安定であった。

D. 考察

エタノール製剤については calicivirus と enterovirus で、その感受性濃度がかなり異なることが明らかになり、enterovirus 同士でも hPoV-I と EV71 では感染価減衰の有無に至る相違が認められた。hPoV-I の感染価減衰パターンは EtOH50-60%における FCV-F9 と酷似するものでもあった。hPoV-sabin III も 80%エタノール製剤で同時に検証したところ、感受性が高く反応 60 秒後には検出限界に至るほどであった(図 3)。また non-envelope virus 対応のエタノール製剤について、いくつかピックアップ検証を行ったが、EV71 に対する不活性化効果は様々であり、感染価減衰はするが、実効性に関して極端に良いとは言いがたかった(図 6)。加えて雑品として販売されている除菌用エタノール剤 (EtOH-compA; pH3.7、62.5%v/v)は FCV に対しては速効性を示した(図 7-a))ものの、EV71 や hPoV-I に対して不活性化効果は全くなかった(図 7-b)、7-c))。おそらく FCV に対しては含有成分である有機酸が主に作用しているものと考えられ、さきの結果と合わせて、酸性条件下でのエタノール製剤のウイルス不活性化効果は成分依存的に限定されると考える。

次に NaClO について、NaClO 200ppm による除染処理はノロウイルス対策 Q&A にも推奨されており、calicivirus はもちろ

ん、今回供試した enterovirus にたいしても即時的な不活性化を示した。更に NaClO100ppm で行った FCV-ym3 と EV71 の不活性化試験では FCV-ym3 で顕著な virion 残存が認められるが、EV71 では反応 20 秒以降、ほとんど検出できなくなっている(表 2)。よって「non-envelope virus が全て塩素系に強い」のではないことが明確に示された。FCV-ym3 の塩素抵抗性は「次亜塩素酸水(ほとんどが電解水)」などでも確かめられており、今後塩素系製剤評価をカバーする上で、やはり『感受性差』は留意が必須である。Enterovirus の中では human parechovirus が NaClO に対して抵抗性を示す傾向があるため、評価用ウイルスとしての採用も含め、目下検証中である。またエタノール製剤と NaClO の不活性化効果の結果より、hPoV は他の enterovirus でも十分に代替が可能であり、流行状況や WHO 推進の GAP3 を鑑みても、評価用として継続使用することは適切でないと考える。

最後に H_2O_2 、 Na_2CO_3 、及び $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ についてだが、これらは日常雑品の成分として汎用されているが、ウイルスに対する不活性化効果の報告例は極端に少ない。現在では単品入手も容易であり、NaClO と比較しても物性的に安定であるため、今後の検証結果によっては使用場面が増える可能性がある。しかしながら、雑品ゆえに効能・効果は示せないということもあり、得られた結果をどのように示してゆくかに課題を残すところである。Na₂CO₃ 単体では同じ calicivirus でも FCV と MNV で感受性が極端に異なること、envelope-virus である influenza virus に対し

でも不活性化効果が極端に低い(data not shown)こともあり、単独での使用はかなり限定されるであろう。Na₂CO₃・H₂O₂ においては相乗的な不活性化効果が MNV で認められており、他の non-envelopoe virus についても同様の効果を期待し、現在検証を進めている。

以上の検証より、化学製剤に対する感受性はウイルスにより、また株により様々であり、もちろん hNoV も同じ土俵に上がることを踏まえても、各種ウイルスを用いた総合的な評価が望まれることは必定である。

E. 結論

今回「ウイルス不活性化評価ガイドライン」策定の検証において、基本的な製剤であるエタノール、NaClO に対し、供

試ウイルス間・ウイルス株間で不活性化効果に明らかな差が生じることが示された。また H₂O₂、炭酸 Na 及び過炭酸 Na に対しては calicivirus 内で不活性化効果に顕著な差が認められた。hNoV の対化学製剤感受性が不明確である以上、これらを駆使して、総合的な判断が可能となるよう当該ガイドライン策定を目指す。

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.

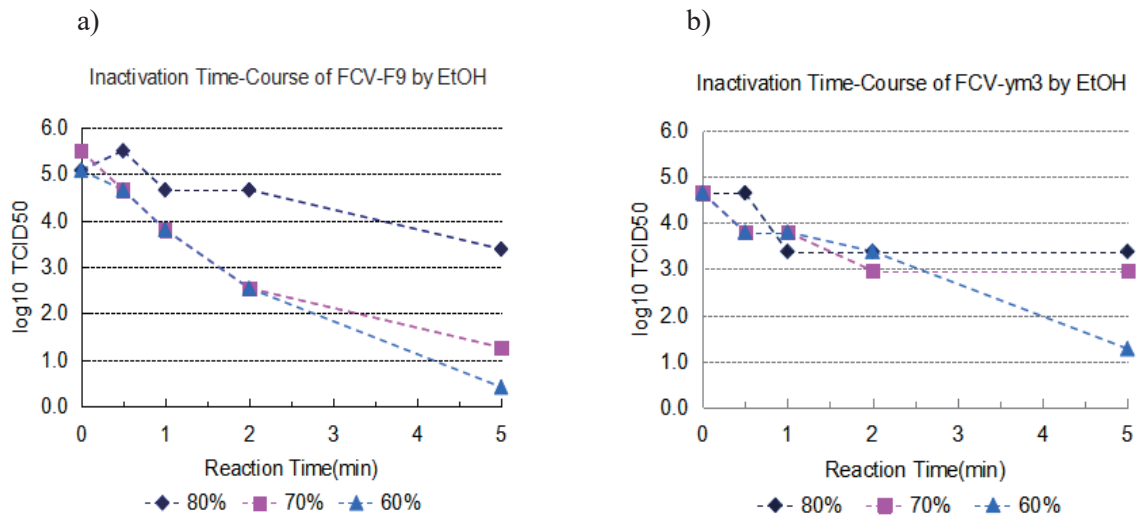


図 2. 局方消毒用エタノール IP(EtOH-IP)による EV71 不活性化効果

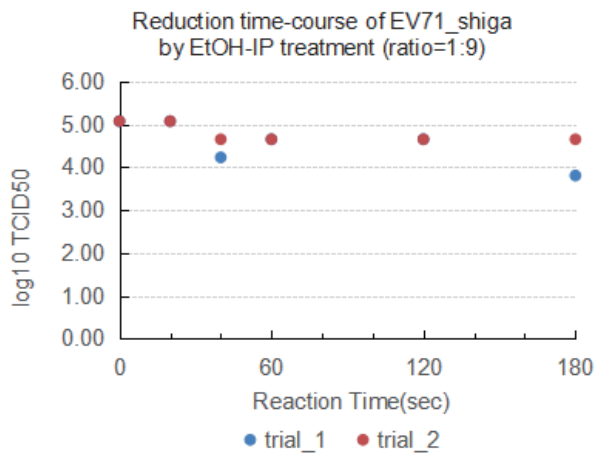


図 3. 局方消毒用エタノール IP(EtOH-IP)による hPoVs 不活性化効果

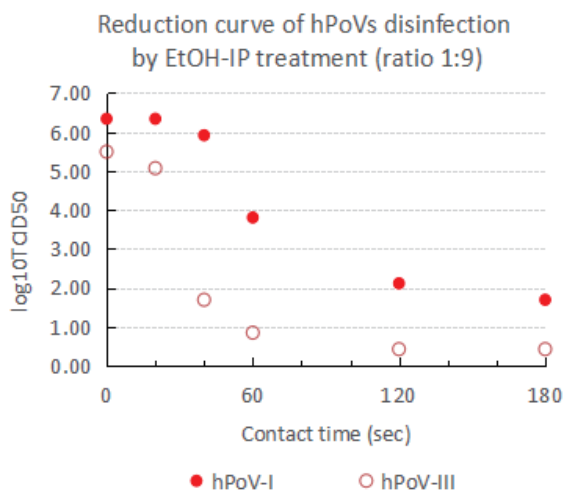


図4. H₂O₂ 溶液による FCV 及び MNV の不活性化効果

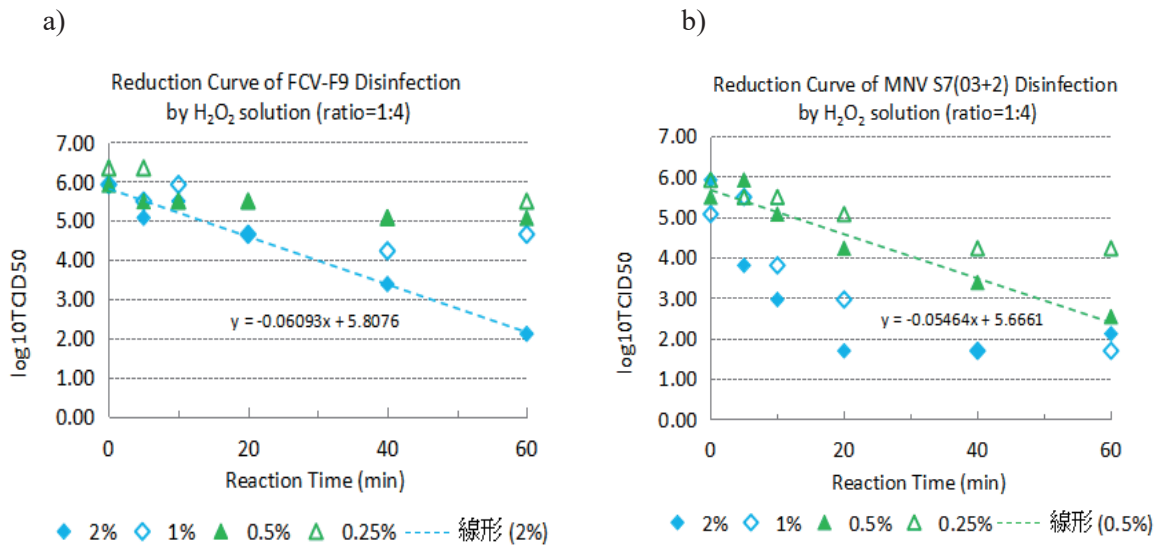


図5. Na₂CO₃ 及び Na₂CO₃・H₂O₂(perCO₃Na₂)による FCV 及び MNV の不活性化効果

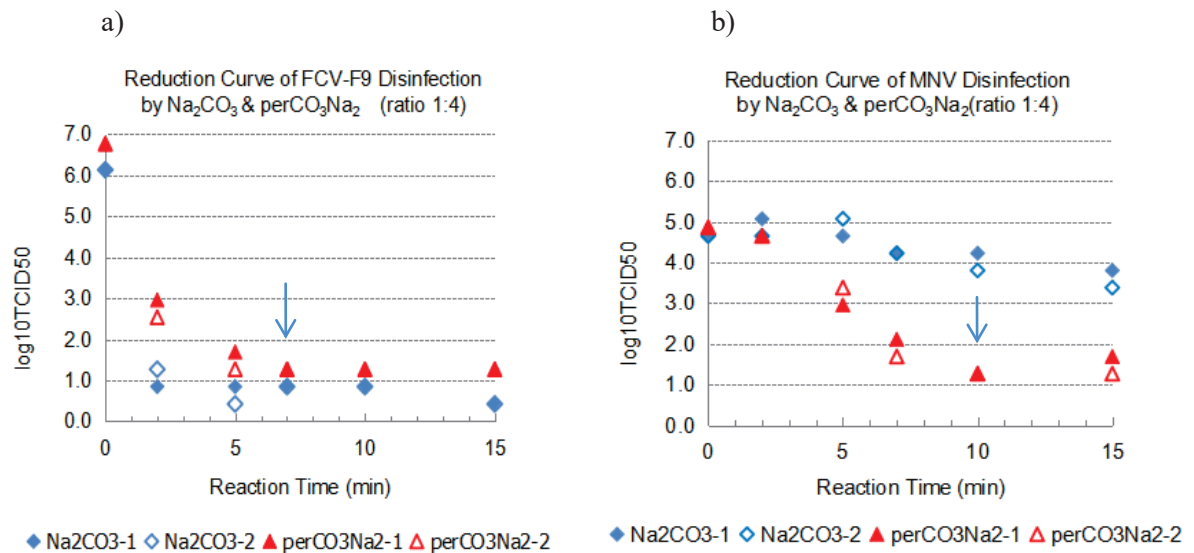


図6. 各種エタノール製剤(non-envelope virus 対応品)による EV71 の不活性化効果

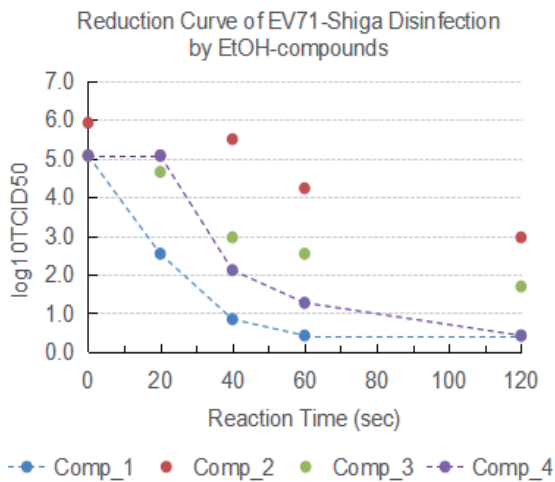


図 7. 除菌用エタノール製剤(雑品、pH3.7、EtOH 62.5%v/v)による各種ウイルスの不活性化効果

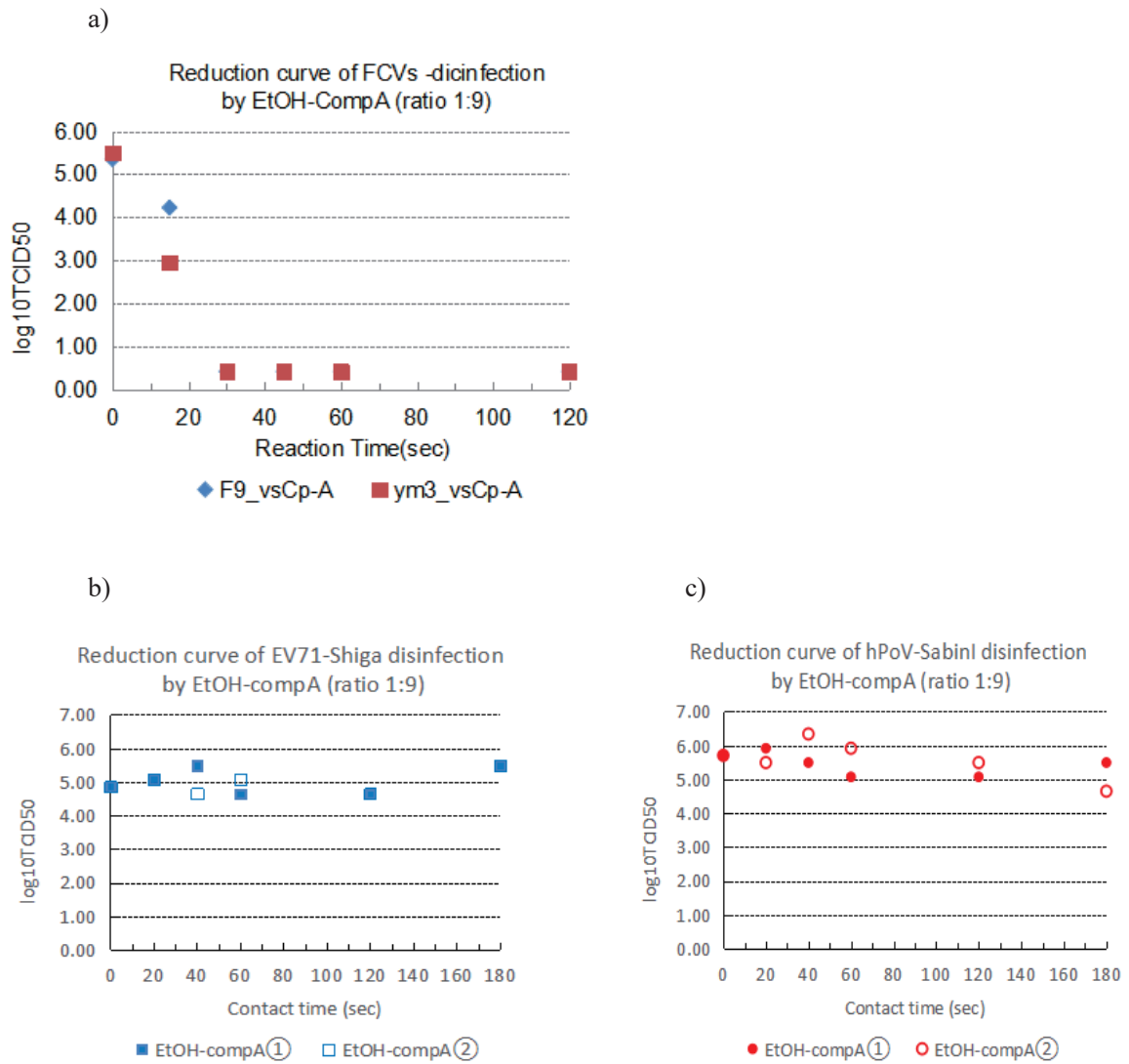


表 1. NaClO 200±ppm 処理による供試ウイルス感染価の経時的変化

ウイルス 反応時間	FCV-F9	FCV-ym3	MNV-S7	EV71_Shiga	hPoV_SabI
0 (sec)	4.65	5.63	5.92	4.96	5.49
20	2.11	0.84	≦0.42	≦0.42	≦0.42
40	≦0.42	≦0.42	≦0.42	≦0.42	≦0.42
60	≦0.42	≦0.42	≦0.42	≦0.42	≦0.42

反応比率 NaClO : virus=1:9 単位 : log₁₀TCID₅₀

表 2. NaClO100ppm±ppm による供試ウイルス感染価の経時的変化

ウイルス 反応時間	FCV-ym3	EV71_Shiga
0 (sec)	5.63	4.96
20	4.22	≦0.42
40	4.22	0.84
60	3.80	0.84
120	3.80	≦0.42

反応比率 NaClO : virus=1:9 単位 : log₁₀TCID₅₀