

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

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 不活性化評価用の代替候補ウイルス 6 種類からの絞込みとそのための評価用基本製剤 4 種類による経時的感染価減衰を検討した。その結果 FCV-F9 を基準株として比較し、臨床分離株である FCV-ym3、human coxsackievirus type A6(hCox-A6)が基本製剤に対し、広く抵抗性を示した。相乗効果的な新規製剤などを評価する上で前記 3 種類のウイルスが有力なツールとなりうることが示唆された。

A. 研究目的

冬季のノロウイルス流行に伴う食中毒等を制御すべく、その不活性化評価に関するガイドライン策定を目指しており、前年度には代替候補となるウイルスについて様々な観点からアプローチし、その特性について検討した。今年度はこれらを元に「代替ウイルスの絞込み」を踏まえ、その特性評価の薬剤選定と候補ウイルスの反応特性を検証することとし、特にこれまでの検証でノロウイルス対策品として挙げられる塩素系薬剤(NaClO)や汎用されるエタノール製剤の実効性検証に効果的な複数のウイルス種の抽出・選定に注力することとした。加えて、このことによる試験用ウイルスや培養細胞、試験方法などの集約化・簡便化も図った。

B. 研究方法

1. 材料

a) ウイルス

- ①FCV ym3 株(臨床分離株、化学剤抵抗性)
- ②Enterovirus type71(EV71); Shiga1095 株
- ③human paechovirus-1(hPeV-1)
: 旧 echovirus-22/Harris 株
- ④Human coxsackievirus typeA6(hCox-A6)
: Gdula 株 ATCC VR-1801
- ⑤Human coxsackievirus typeB3(hCox-B3)
: Nancy 株 ATCC VR-30
- ⑥Human coxsackievirus typeB5(hCox-B5)
: Fanllher 株 ATCC VR-185

→②～⑥はウイルス二部・清水先生より
供与

*feline calicivirus

b) 使用培養細胞

- ①CRFK 細胞(JCRB9035)
- ②VERO 細胞(ATCC CCL-81)
- ③HCT-8 細胞(ATCC CCL-244)
- ④RD-A 細胞 (ウイルス 2 部より)

①は FCV、②は EV71、③は hPeV、④は Cox-A・B の各培養用として使用した。

c)使用培地

- ①2~5%FBS_EMEM
 - ②2~5%Horse serum_RPMI1640
- ①は CRFK、VERO、RD-A、②は HCT-8 に用いた。

d)使用薬剤

- ①NaClO (原液有効塩素 5%)
 - ②エタノール(EtOH 99.5%)
 - ③過酸化水素(H₂O₂、原液 30%)
 - ④炭酸ナトリウム(Na₂CO₃、0.5-1%)
- ①は花王株式会社製、②~④和光純薬製のものを精製水にて適宜希釈して供試した。

e)中和用培地：

- ①ClO 用：20mM Na₂S₂O₃ 含有各使用培地
- ②H₂O₂ 用：20 μg/ml Catalase 含有各使用培地
- ③炭酸 Na 用：重炭酸 Na 不含、10mM HEPES 含有各使用培地

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混合時の終濃度が 60%あるいは 80%となるよう調製する(実濃度は 66.7%あるいは 88.9%)。供試ウ

イルス①~③について、エタノール製剤：ウイルス液の混合比を 9:1 とし、マイクロチューブ内にて混合・反応を開始した。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(これを 7⁻¹ と)する。

希釈用 96well-microplate にて 7 倍段階希釈系(7⁻²~7⁻⁸)を作成し、これを予め用意した培養細胞 96well-microplate に 50 μl/well で接種した。36℃・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. 炭酸ナトリウム(Na₂CO₃)および過酸化水素(H₂O₂)の各溶液によるウイルス不活性化の比較検討

Na₂CO₃ は 0.5-1%溶液(1%=約 0.1M)を、H₂O₂ については 30%原液を希釈し、0.5~2%液を調製した。供試ウイルス②及び③と各調製液の混合比を Na₂CO₃、H₂O₂ 共に 1:9 とし、マイクロチューブ内にて混合・反応を開始した。反応は最大 60 分までとし、反応液を経時的に採取し、ただちに中和用培地液②あるいは③にて 7 倍希釈し反応を停止(これを 7⁻¹ と)した。

期借用 96well-microplate にて 7 倍段階希釈系(7⁻²~7⁻⁸)を作成し、これを予め用意した培養細胞 96well-microplate に 50 μl/well で接種した。36℃・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. Human coxsackievirus(hCox-A、-B)による各種薬剤での不活性化比較検討

これまで hNoV 代替として検討してきた enterovirus を補完するものとして、NaClO に対して抵抗性を示す hCox-A および hCox-B が候補に挙げられたため、当所ウイルス第 2 部より 3 株を分与いただき、これらについて、定法に従って NaClO、エタノール(終濃度 80%)の不活性化効果を検討した。加えて hCox-A6 については 1%Na₂CO₃ および 2%H₂O₂(反応比 1:9)の不活性化効果についても、定法に従い検討した。

(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

結果 1. エタノール製剤によるウイルス不活性化について

FCV-ym3 株では FCV において EtOH の不活性化効果が最も高くなる 60%濃度においても、感染価減衰は反応 2 分以降ほぼ横ばいとなり 5 分後でも 3log₁₀TCID₅₀ の減衰に留まった(Fig.1)。これに対し、EV71 および hPeV-1 ではほぼ直線的に感染価減衰が起こり、EV71 では4~5分で、hPeV では約 5 分で 4log₁₀TCID₅₀ の感染価減衰に至った(Fig.2 および 3)。

結果 2. Na₂CO₃ および H₂O₂ の各溶液によるウイルス不活性化について

1%Na₂CO₃ による不活性化について、EV71 では反応 10 分までに急激に感染価が減衰し、反応 20 分後には検出限界

(4log₁₀TCID₅₀ 以上の減衰)となった(Fig.4)。HPeV-1 では反応 60 分後まで感染価減衰は全く起こらなかった(Fig.5)。

H₂O₂ による不活性化については、EV71 では 1%以上で反応 20 分以降からわずかに感染価が減衰するに留まった(Fig.6)。hPeV-1 では 0.5%から感染価減衰が認められ、1%で反応 40 分後、2%で反応 20 分後に 4log₁₀TCID₅₀ 以上の感染価減衰に至った(Fig.7)。参考までに FCV-ym3 の 2%H₂O₂(反応比 1:4)による感染価減衰を Fig.8 に示す。

結果 3. hCox-A6、-B3 および-B5 の各種製剤による不活性化について

最初に NaClO 150ppm での hCox-A6 と hCox-B5 の不活性化効果について検討したところ、hCox-A6 で若干の抵抗性が認められた(Fig.9)。次にエタノール終濃度 80%での hCox3 種類の不活性化効果を比較したところ、hCox-B3 および B5 は反応 20 秒で 4log₁₀TCID₅₀ 以上感染価が減衰したが、hCox-A6 は反応 5 分後でも 2log₁₀TCID₅₀ 以内の減衰のとどまった(Fig.10)。

これらの結果より hCox-B2 種は候補より外し、hCox-A6 の各種製剤による不活性化を確認したところ、NaClO については 50-100ppm では FCV-ym3 同様に反応 5 分でも全く感染価は減衰せず、200ppm でも反応 1 分後でわずかな感染価残存が認められた(Fig.11)。2%H₂O₂ では反応 60 分でも感染価は減衰せず(Fig.12)、1%Na₂CO₃ では反応 5 分以降ではほぼ直線的な感染価減衰がみられ、40 分以降で 4log₁₀TCID₅₀ 以上の減衰に至った(Fig.13)

D. 考察

代替候補ウイルスによる 4 種類の製剤を用いた不活性化効果について、前年度及び今年度のデータを表にまとめてみると (Table.1)、これまで汎用されてきた FCV-F9 に対して、供試製剤により抵抗的なものは FCV-ym3 と hCox-A6 であった。ノロウイルスと同属であるということで、汎用されてきたマウスノロウイルス (MNV) については各種製剤すべてに高い感受性を示している。またこれまで FCV-ym3 及び MNV は Na_2CO_3 に対して抵抗性であるとしてきたが、その後のデータ解析の結果、1 次線形解析が可能であり、各々高い感受性を有することが示唆された (追補データ参照)。

ヒトノロウイルスに関して集団発生事例から散見されるように、その感染制御はかなり困難であり、今後これを目的とした製剤には高い不活性化能が求められることは現時点で必然的である。hCox-A6 は流行疫学的にも近年初夏でのヘルパンギーナ・手足口病からの主たる分離株であり、大きな意義を持つと考える。また本ウイルスはクエン酸・リンゴ酸などの有機酸に対しても抵抗性を示すことがわかっている (データ示さず)。よって有機酸に対して高い感受性を示す FCV の補完ウイルスとしても重要な役割をなすこととなる。しかしながら今回供試した Gdula 株は 1949 年に分離された株でもあり、近年の分離株との特性比較は確認しておくことが望ましいと考える。

評価ガイドラインに使用する代替ウイルスは、これまでの不活性化に関する報

告実績も鑑み、基準株として FCV-F9、「相乗効果」を狙った合剤など評価用として FCV-ym3 及び hCox-A6 の 3 種類とすることを考えている。今後この 3 種類により評価手法およびその妥当性や再現性について検証を行う。

E. 結論

2 年にわたり、hNoV 不活性化評価にかかる代替ウイルスの選定およびその方法について検討し、今回 3 種類のウイルス、FCV-F9、FCV-ym3、hCox-A6 に絞り込んだ。今後これらを用いての評価条件設定や市販製剤などによる評価の妥当性・再現性について検証する。

【謝辞】

本研究の実施にあたり、ウイルス株及び培養細胞の分与を賜りました国立感染症研究所・ウイルス第 2 部 清水博之室長に深謝いたします。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
・食品媒介性ウイルス及び介在性ウイルスに関する不活性化評価手法の策定に向けた検討(1) 第 38 回日本食品微生物学会学術総会 2017 年 10 月 徳島

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

Fig.1)

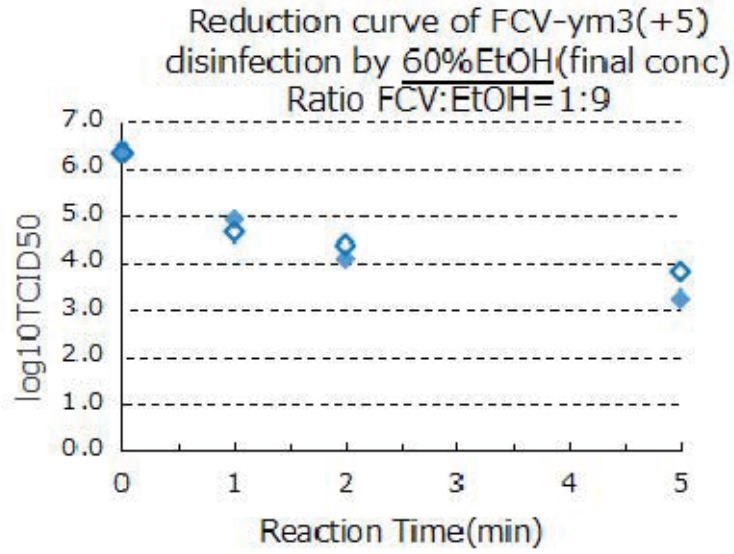


Fig.2)

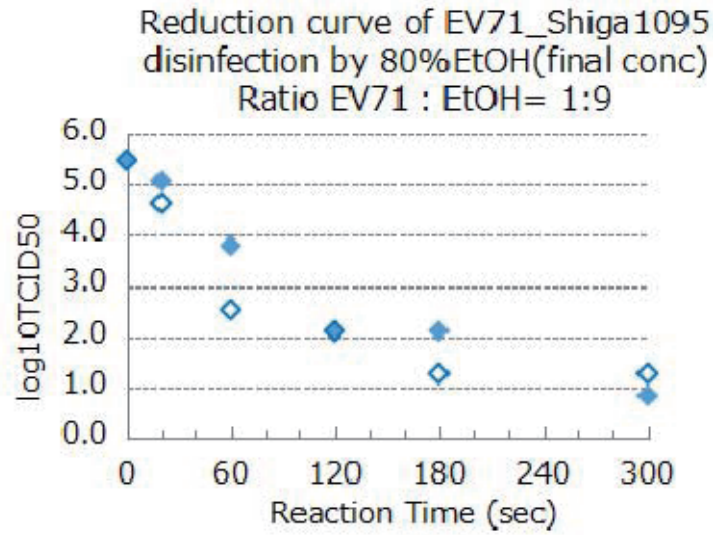


Fig.3)

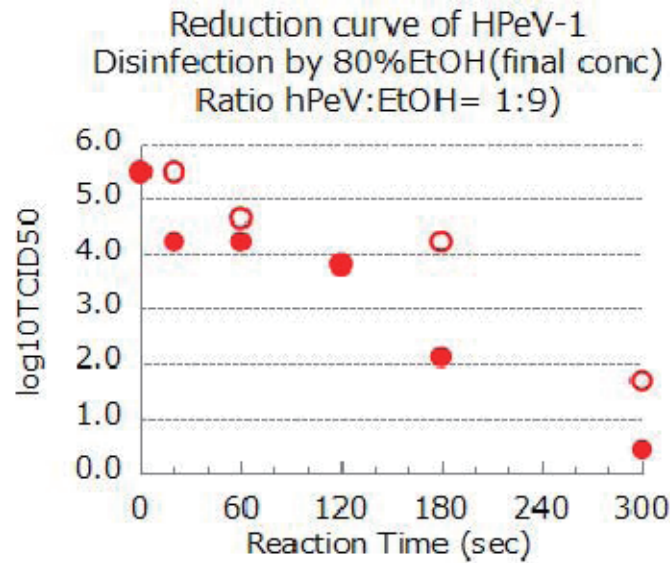


Fig.4)

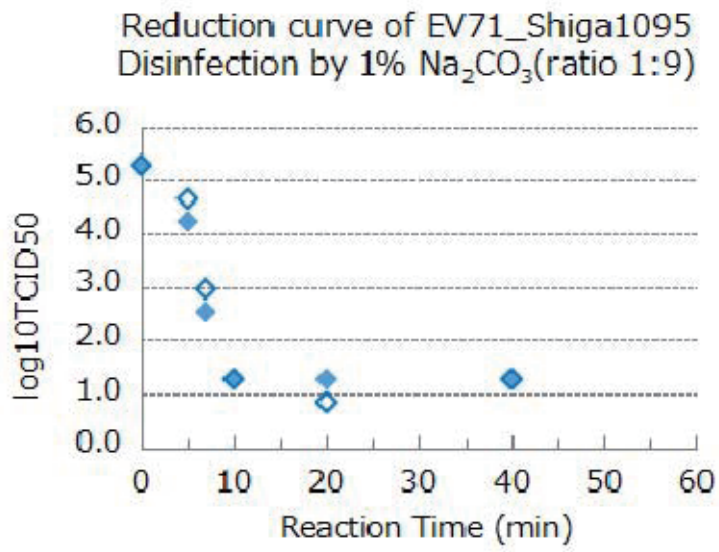


Fig.5)

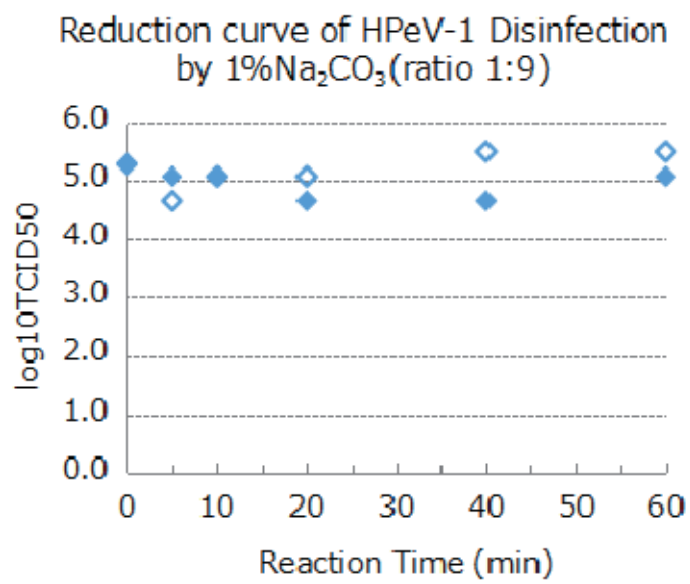


Fig.6)

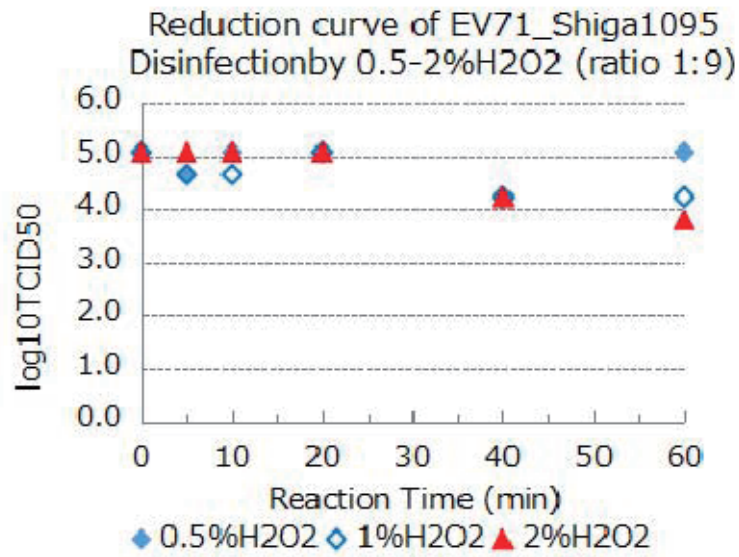


Fig.7)

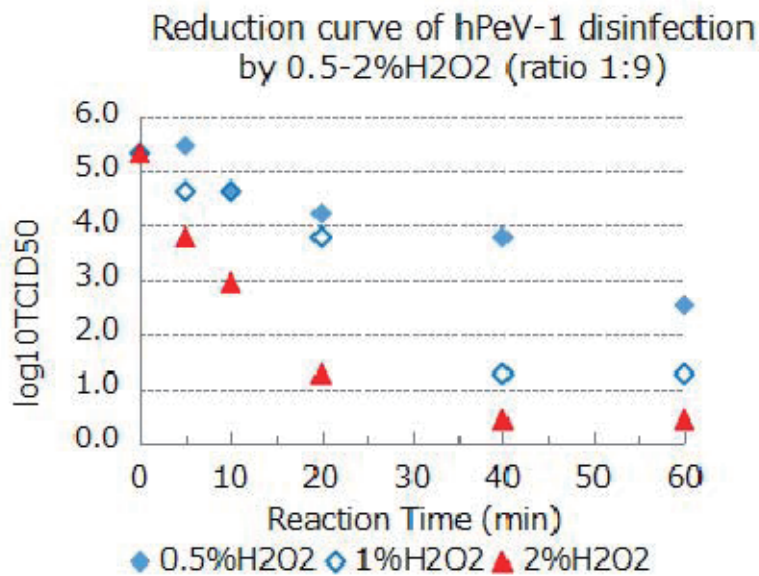


Fig.8)

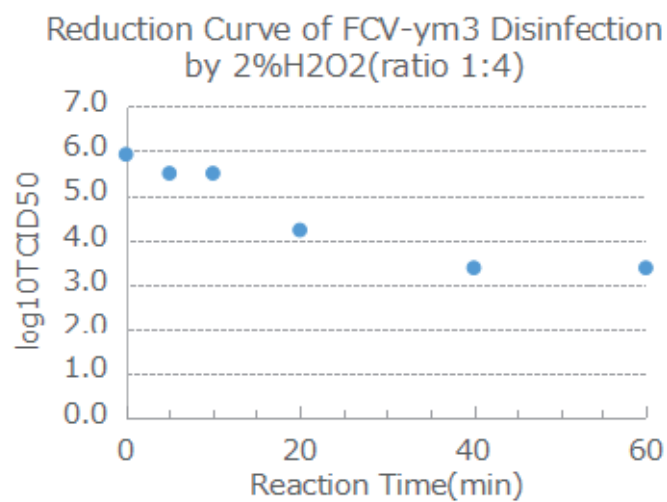


Fig.9)

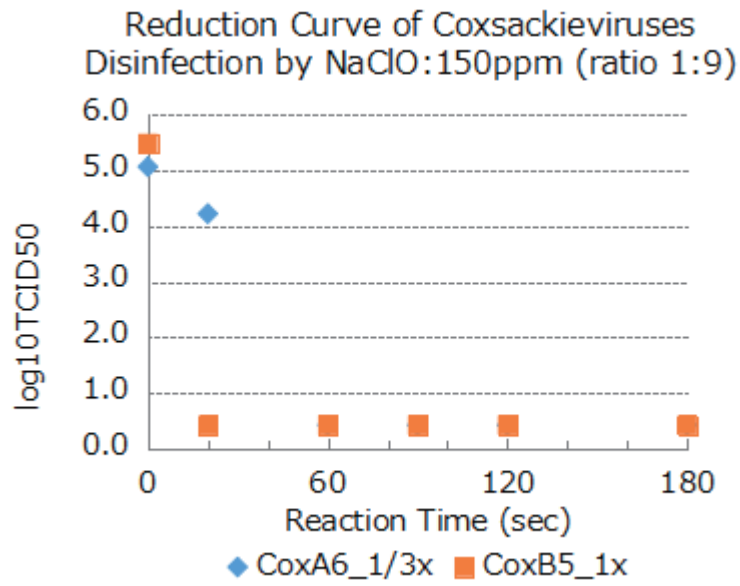


Fig.10)

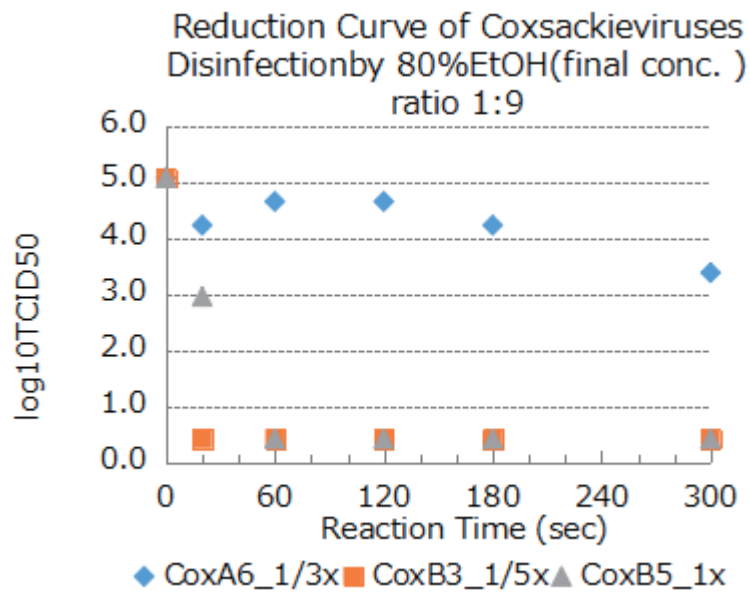


Fig.11)

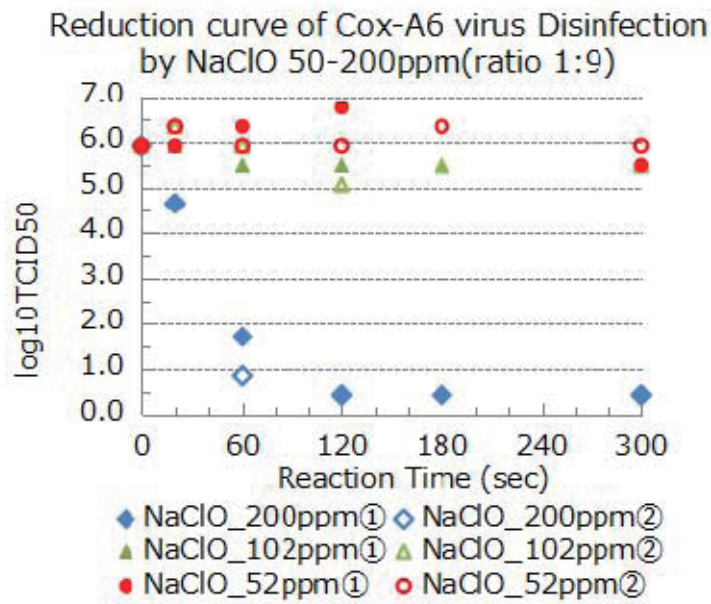


Fig.12)

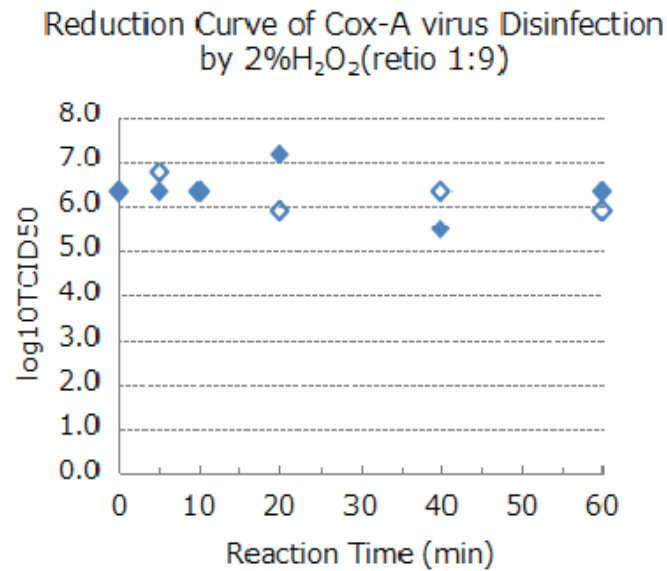
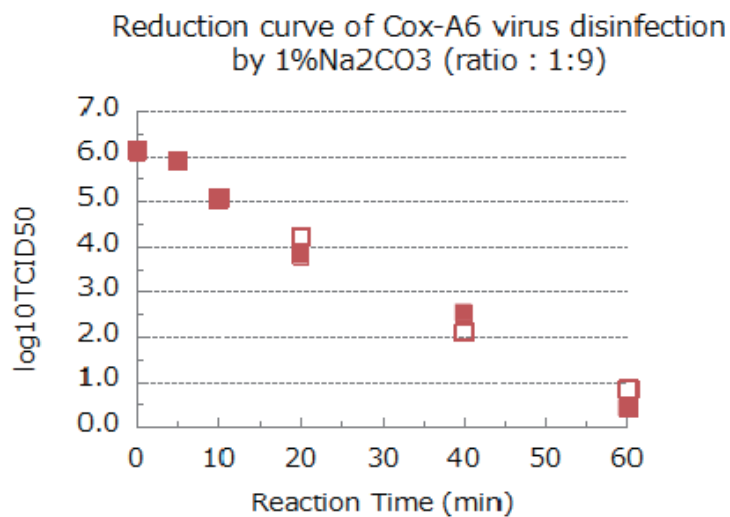


Fig.13)



	NaClO	Ethanol	H ₂ O ₂	Na ₂ CO ₃
FCV-F9	100ppm 20sec	F50% 5min	2% ~60min	0.5% ~1min
FCV-ym3	200ppm 20sec	F60% LE	2% LE	0.5% ~3min
MNV-S7	100ppm 60sec	F50% 40sec	0.5% ~60min	0.5% 25-30min
hPeV-1	100ppm 40-60sec	F80% ~5min	1% ~40min	1% LE
EV71	100ppm 20sec	F80% 4-5min	2% LE	1% 10-20min
hCox-A6	200ppm 60sec	F80% LE	2% LE	1% ≥40min

Table.1)

LE : low effective (最大反応時間で $<3\log_{10}TCID_{50}$ の減衰) F : 反応時終濃度

《追補データ》

