

平成 29 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

ノロウイルス代替ウイルスとしての  
コクサッキーウイルス B5 型のエタノール感受性の再評価

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

消毒剤によるノロウイルスの不活化試験の評価は、ノロウイルスの培養が困難なために、培養細胞を用いてウイルス力価を測定できるネコカリシウイルスなどの代替ウイルスを用いて実施される。これまで、当所ではウイルスの長期生存試験や、加熱、紫外線、高圧処理等によるウイルス不活化試験の評価に主にネコカリシウイルスとコクサッキーウイルス B5 型(CB5)を用いてきた。近年エンベロップを持たないウイルスに対しても不活化効果を持つとされる様々なエタノール系消毒剤が市販されており、これらエタノール系消毒剤のなかには、3 分間の反応で CB5 を不活化できるものを確認している。しかしながら、CB5 のエタノール自体に対する感受性については試験されていなかった。そこでエタノール系消毒剤に対する感受性試験に用いる代替ウイルスとして CB5 が適切であるか否かについてデータを得るために、エタノールによる CB5 の不活化試験を実施し、CB5 が代替ウイルスとして適当か再評価を行った。その結果、局方エタノール、終濃度 80%(ウイルスと混合した時に 80%)のエタノールは、反応時間 60 秒で速やかに CB5 を 4log<sub>10</sub> 程度不活化し、CB5 がエタノールに対して高感受性であることが示された。このことから、市販消毒剤のウイルス不活化試験法の標準化にむけ、CB5 はエタノール系消毒剤の評価には適さないことが示された。

#### A. 研究目的

現在さまざまなエタノール系消毒剤が市販され、ノロウイルス等のエンベロップを持たないウイルスに対しても、消毒・殺菌効果があるとするものも多く市販され、誰でも入手しやすい状況となってい

る。

これらのエタノール系消毒剤だけでなく、市販されるさまざまな消毒・殺菌剤のウイルス不活化効果については、国内での試験方法の標準化がされていないために、製造者等が独自に評価試験を行って

おり、データを示しているのが現状であり、標準的な試験方法の整備が課題となっている。

研究班では、食品媒介性の病原ウイルス、とくにノロウイルスに対する消毒剤の標準試験法の策定にむけ、代替ウイルスであるネコカリシウイルスやマウスノロウイルス、コクサッキーウイルス B5 型 (CB5) などを用いた不活化試験法を検討してきた。この中で、市販エタノール系消毒剤に対して、CB5 が 3 分の反応時間で  $4\log_{10}$  程度不活化され、感受性が比較的高いことが考えられた。

ノロウイルスの実際のエタノール感受性は培養系が無いために評価は困難であるが、CB5 がノロウイルスよりもエタノール感受性が高い場合、エタノール系製剤のウイルス不活化試験の評価は実際よりも過大評価されるリスクが生じる。

今回、CB5 のエタノール感受性の再評価のために、局方エタノール、終濃度(ウイルスと混合時)80%エタノール、次亜塩素酸ナトリウムによる不活化試験を実施し、CB5 の代替ウイルスとしての適正を評価した。

## B. 研究方法

### 1. ウイルス

国立感染症研究所より分与された CB5 を HEp-2 細胞にて増殖させ、培養上清をウイルス液として用いた。

### 2. 細胞

HEp-2 細胞を感受性細胞として用いた。増殖培地には 5%FBS-DMEM、維持培地には 2%FBS-DMEM を用いた。

### 3. 消毒剤

局方エタノール、エタノール(特級、99.5%)、次亜塩素酸ナトリウムを用いた。

局方エタノールは直接ウイルス液と混合し、特級エタノールは 88.8%に調整後、ウイルス液と混合した。

次亜塩素酸ナトリウムは 50、100、200ppm に調整して使用した。

### 4. 不活化試験

ウイルス液：消毒剤=1：9 の割合で混合後、エタノールの場合は経時的に希釈を行って反応停止とし、その後 7 倍階段希釈を行って HEp-2 細胞を用いて力価測定を行った。

ウイルス液：50、100、200ppm に調整した次亜塩素酸ナトリウム=1：9 で混合後、経時的に 0.1N チオ硫酸ナトリウムを加えて反応停止後、7 倍階段希釈を行って HEp-2 細胞にて力価測定を行った。

### 5. 反応時間

エタノールは 0、20、60、120、180、300 秒の 6 点で測定した。

次亜塩素酸ナトリウムは 0、20、40、60、120、180 秒で測定した。

(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. 結果

### 1. 局方エタノール(図 1)

6 回試験を実施し、反応時間 60 秒で速やかに  $4\log_{10}$  程度不活化された。

### 2. 80%エタノール(図 2)

局方エタノールと同様に、60 秒の反応時間で速やかに  $4\log_{10}$  程度不活化された。

### 3. 次亜塩素酸ナトリウム(図 3)

50、100ppm では 180 秒反応後でも  $1\log_{10}$  程度の不活化であったのに対し、200ppm では 20 秒で  $3\log_{10}$  程度、60 秒反応後に  $6\log_{10}$  程度不活化された。

## D. 考察

CB5 は終濃度 80%エタノール溶液によって直接不活化されることが示された。市販消毒剤には、有機酸や pH 調節剤等が添加されているが、それらの添加物がなくても速やかに不活化されていた。

今回は、ビーフエキストラクトやペプトンなどの消毒剤に効果を低減する役割をもつ負荷剤を使用せずに、ウイルスを直接消毒剤と反応させたので、実際のキッチンの汚染などよりも、消毒剤の効果は高くなると考えられたが、次亜塩素酸ナトリウム 200ppm に近い不活化効果が認められた。

エタノールそのものに非常に高い感受性を示したことから、市販のエタノール系消毒剤に対しても、特にエタノール濃度が高い消毒剤に対して高い感受性を示すことが推察され、ウイルスの不活化試

験の評価では、消毒剤の効果を過大に評価する可能性が示唆された。

今後整備されることが期待されるウイルス不活化試験法の標準化において、CB5 はノロウイルスの代替ウイルスとして使用する場合、エタノール系消毒剤の試験ウイルスとしては適切でないことが示唆され、CB5 とは別の非エンベロープウイルスを利用する必要がある。

## E. まとめ

CB5 ウイルスはエタノールに対し高感受性であることから、エタノール系消毒剤に評価におけるノロウイルスの代替ウイルスとしては不適切であることと考えられた。

## 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 : 局方エタノールによる CB5 不活化効果 (n=6)

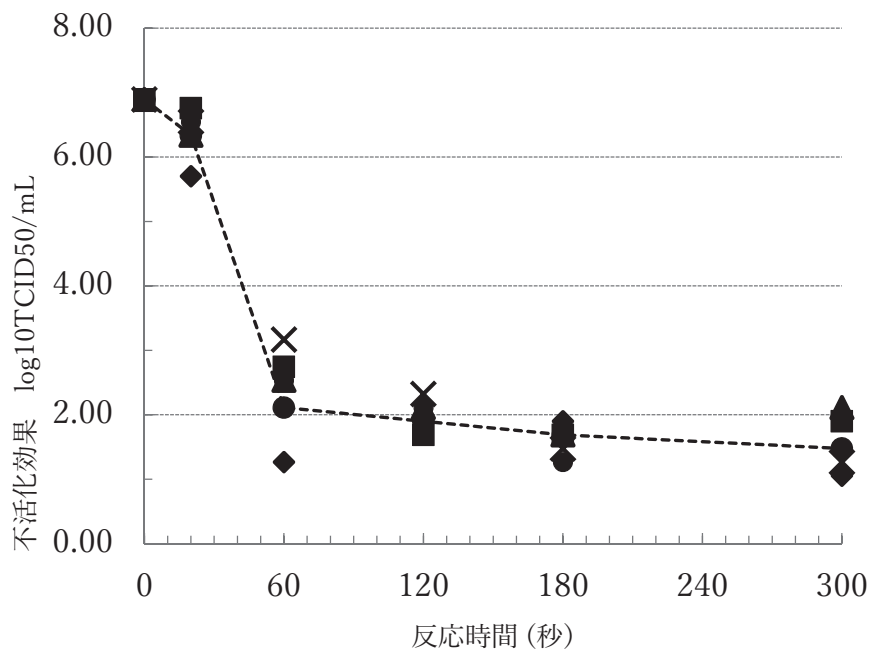


図 2 : 80% (ウイルス液と混合時) エタノールによる不活化効果 (n=6)

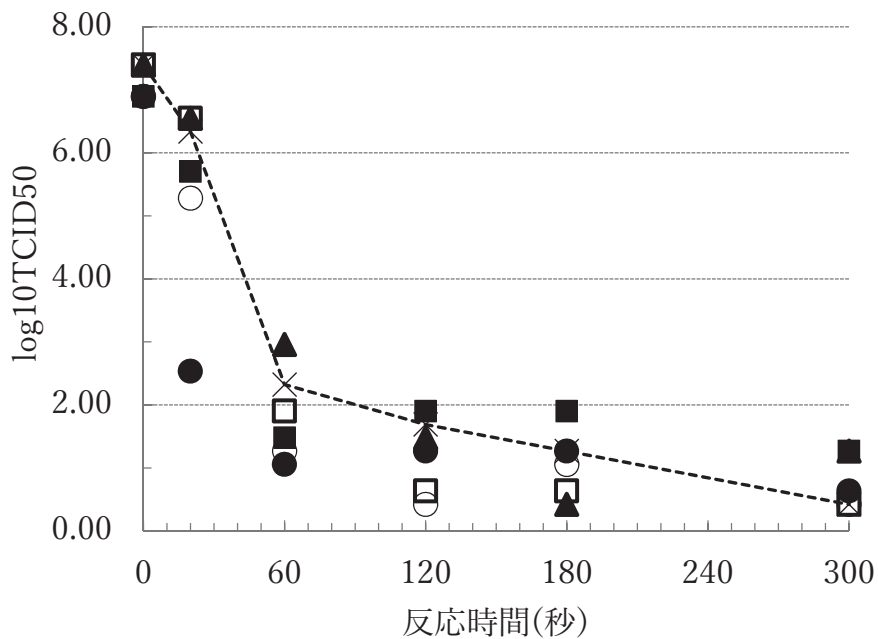


図 3 : 次亜塩素酸ナトリウムによる不活化効果(■50ppm, ●100ppm, ◆200ppm)

