

食品のデリバリーやテイクアウト用の容器等における 新型コロナウイルスのモデルウイルスを用いた生残性評価

研究分担者 渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長)
研究協力者 工藤 由起子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長)

研究要旨

新型コロナウイルス感染症のウイルス感染経路には、主にウイルス粒子を含む飛沫等の吸入による直接感染が広く知られるが、その他に生活用品等を介したウイルスへの接触による非直接感染があると考えられている。フードデリバリーやテイクアウトに使用される食品の容器および包装には、運搬中に表面に感染性ウイルスが付着する恐れがあり、付着ウイルスがどの程度の時間感染性を持つのか、これが感染源となり得るのかは、消費者および食品事業者にとって、重大な関心事となっている。そこで本研究では、そこで本研究では、食品のデリバリーやテイクアウト用の容器や包装等における感染性の新型コロナウイルス粒子の残存性を評価する目的で、新型コロナウイルスのモデルウイルスとしてウシコロナウイルスを用いて、実際の食品用容器および包装6種類へのウイルス接種・回収実験を行った。その結果、感染性を有するウシコロナウイルスの残存性は食品用容器・包装の種類によって異なること、野菜用包装袋および発泡スチレンボックスの表面では、他の4種類の容器・包装と比較して残存性が低い可能性が有ることが示された。

A. 研究目的

新型コロナウイルス感染症のウイルス感染経路には、主にウイルスを含む飛沫・エアロゾルの吸入による飛沫感染や空気感染による直接感染が知られるが、その他にウイルスを含む飛沫などが汚染した食品や生活用品に触れた手でウイルスに接触することによる非直接感染があると考えられている。新型コロナウイルスは患者周辺の生活環境表面に付着し、これがRNAとしてPCRで検出されたという報告がある¹⁾。さらに、実際に、直接感染が否定できる環境において、環境表面を介した非直接感染が疑われる事例も報告されている^{2,3)}。

フードデリバリーやテイクアウトは、昨今の

コロナ禍での行動様式の変化に関連して、多様に発展してきたサービス形態である。その際に使用される食品の容器および包装には、運搬中に感染性ウイルスが付着する恐れがあり、付着したウイルスがどの程度の時間感染性を持つのか、これが感染源となり得るのかは、消費者および新型コロナウイルス感染症対策に取り組む食品事業者にとって、重大な関心事となっている。過去には、主にプラスチック、金属、紙や木といった有機物質の素材片や、一部の生活用品試料片上に新型コロナウイルスを接種し、気温条件および経過時間による感染性ウイルスの残存性を検討した研究が複数実施されている⁴⁻⁶⁾。それらは、感染性ウイルスの保持時間

は、プラスチック製樹脂表面上では比較的長く、金属表面では比較的短いこと、材質の種類や室温によっては日単位で生存する可能性があることを示唆した。しかし食品の容器および包装を扱った検討はなされておらず、それらの表面上での感染性ウィルスの残存性は不明である。

そこで本研究では、食品のデリバリーやテイクアウト用の容器や包装等における感染性の新型コロナウイルス粒子の残存性を評価する目的で、実験の利便性を考慮し、新型コロナウイルスと最も近縁なウィルス的一种であるウシコロナウィルスをモデル系として用いて、実際の食品用容器および包装へのウィルス接種・回収実験を行ったので、その結果を報告する。これによって、フードデリバリーやテイクアウトサービスの容器および包装による新型コロナウイルス感染拡大の影響を評価することができる。

B. 研究方法

食品用容器および容器等の素材片へウィルス液を接種し、一定時間静置後に回収し、接種時・回収時の比較によって、素材ごとの感染力を持つウィルスの残存性を試験した。ウィルスの残存性は接種時および回収時のウィルス液中のウィルス力価を細胞への感染力を指標用いる TCID₅₀法により力価を測定し、添加前のウィルス力価と比較して感染能を持つウィルス残存性を算出した。本実験系の流れ図を図1に示した。この際には、実験での安全性・効率性を考慮し、実験用モデルウィルスとして新型コロナウイルスと同属のベータコロナウィルス属に属するウシコロナウィルスであるウシ呼吸器症状由来のウシコロナウィルス株 CS5を使用した。ウシコロナウィルス添加・回収試験は以下の手順で実施した。

(1) 使用したウィルスおよび細胞株とウィルス接種液の調整

ウシコロナウィルスの CS5 株は過去の研究に

おいて、獣医臨床領域におけるウシ呼吸器疾患事例から分離された⁷⁾。本ウィルス株の培養にはヒト結腸癌由来細胞株 HRT-18G を用いた。ウシコロナウィルスは培養後、シヨ糖密度勾配法での超遠心で濃縮・精製し、これを FBS 等を添加しない Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose (DMEM-high glucose, gibco) で 10 倍に希釈し、ウィルス接種液とした。

(2) 使用する試料片

食品のデリバリーで使用される容器包装に関する情報を収集し、包装製品の素材による分類を行い、供試する包装製品の素材の選定を行った。供試した容器包装は、以下の 6 種類とした(括弧内は原材料、表 1)；野菜用包装袋(ポリプロピレン)、食品用ラップ(ポリエチレン)、食品用耐油耐水紙(片側のみ耐油耐水加工)、レジ袋(高密度ポリエチレン)、耐熱プラスチックボックス蓋(高透明ポリプロピレン)、および発泡スチレンボックス(ポリスチレン)。包装製品の素材の試料片を作製した。この際、流通する食品用包装資材(レジ袋のみ小売りでの汎用品)を購入し、配達者が触れる面をウィルス接種に使用することとした。

(3) 試料片へのウィルス添加回収実験の手順

以下の手順の実験を、1 種類の試料について繰り返し 3 回行った。

- ①滅菌ガラスシャーレ中に、食品用耐油耐水紙では 1 cm 四方に切った試料片を 3 枚、それ以外の 5 種類では 5 cm 四方に切った試料片 1 枚を置いた。試料片上に 6~12 スポットに分けた合計 60 μ l のウィルス液を滴下し、安全キャビネット内でシャーレのフタを開け、約 60 分間、乾くまで静置した。
- ②恒温恒湿インキュベーター内に、ガラスシャーレに入れて決められた時間静置した。
- ③ウィルススポット部位に 1% FBS/D-MEM を 300

μl 滴下し、1 分間ピペティングで混合した後チューブに全量回収する。これを2回繰り返し、合計 600μl の回収液を得た。この際に使用する D-MEM は、パンクレアチン 2.5 μg/ml 含有 1% FBS/D-MEM-high glucose を用いた。

④ウイルス添加後の静置の条件検討として、静置時の気温および相対湿度は、気温が高いほどウイルス残存性は低下する、湿度は比較的影響が少ないことが過去の研究からすでに示されていたため、今回は気温 25°C、湿度 70% (気象庁発表の 2018 年および 2019 年東京における年平均外気湿度、Japan Meteorological Agency、<https://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>) に固定した。この温湿度条件に設定した恒温恒湿インキュベーター内に、ガラスシャーレに入れて静置した。0 (ウイルス添加後 1 時間の乾燥直後)、6、18、30、48 時間後でそれぞれ回収した。

⑤試料片からのウイルス回収液のウイルス力価測定は、回収に用いた D-MEM を使用して回収液を 10 倍段階希釈した後、細胞単層シートが形成されている 96 well 平底プレートに接種し、TCID₅₀ アッセイによる力価測定を行った。96 well 平底 plate の well 底で単層シートを形成した HRT-18G にウイルス液を接種し、6 over night の培養後、CPE 判定を行った。経時的に採取したウイルス回収液の力価を比較し、減少度を評価した。ウイルス力価の定量下限値は 1.0 log₁₀_TCID₅₀/mL とした。

(倫理面への配慮)

本研究において、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮には該当しない。

C. 研究結果

新型コロナウイルスのモデルウイルスとしてウシコロナウイルスを使用した実験系を用いて、6 種類の食品用容器・包装で作製した試料片にウ

シコロナウイルスを接種して、残存性を経時的に確認した。図 2 に、食品用容器・包装の種類ごとに、感染性を有するウシコロナウイルス残存性の試料片上での経時的变化を示すため、回収液中のウイルス力価の漸減の様子をグラフとして示した。ここでは、ウイルス力価の実験値は繰り返し実験における平均値および標準偏差で示し、さらに経時的に採取した測定値漸減グラフの近似直線を示した。発泡スチレンボックスのグラフにおいては、ウイルス力価の測定値は接種・乾燥後 0 時間目のみでしか検出できなかったため、近似曲線は描けなかった。ウイルス力価の定量下限値は 1.0 log₁₀_TCID₅₀/mL とした。また表 2 は、ウイルス力価漸減の近似直線の傾きをまとめた。その結果、0 (ウイルス添加後 1 時間の乾燥直後)、6、18、30、48 時間後での試料片上から検出されたウイルス力価の 3 回の試験からの平均値はそれぞれ、野菜用包装袋では 3.5、2.4、1.2 log₁₀_TCID₅₀/mL、30 時間後以降は非検出、食品用ラップでは 2.8、1.9、1.4、0.9 log₁₀_TCID₅₀/mL、48 時間後は非検出、食品用耐油耐水紙では 3.2、1.6、1.1、1.0 log₁₀_TCID₅₀/mL、48 時間後は非検出、レジ袋では 3.3、2.3、1.4、1.2 log₁₀_TCID₅₀/mL、48 時間後は非検出、耐熱プラスチックボックス蓋では 4.0、2.4、1.7、1.8 log₁₀_TCID₅₀/mL、48 時間後は非検出、発泡スチレンボックスでは 2.5 log₁₀_TCID₅₀/mL、6 時間後は非検出であった。ウイルス力価漸減の近似直線傾きは、野菜用包装袋では -0.1253、食品用ラップでは -0.0585、食品用耐油耐水紙では -0.0643、レジ袋では -0.0693、耐熱プラスチックボックス蓋では -0.0645、発泡スチレンボックスでは接種後 0 時間目でのみウイルスが検出されそれ以降は非検出となったため近似曲線は描けなかった。以上の結果から、発泡スチレンボックス表面のみ 6 時間後以降では非検出と

なり、発泡スチレンボックス以外の試料表面上では 18 時間程度は残存するが、その中でも野菜用包装袋表面上では残存性が比較的低いことが示された。

D. 考察

感染性ウイルスの残存性は食品用容器・包装の種類によって異なること、野菜用包装袋および発泡スチレンボックスの表面では、他の 4 種類の容器・包装表面と比較して残存性が低い可能性が有ることが明らかとなった。接種時液中の感染性ウイルスが全量回収されない要因としては、ウイルスが試料表面で感染能を保持していたとしても試料片上また試料片中で粒子が捕捉され回収液中に回収されず検出されなかったことが考えられる。または、ウイルス粒子は回収されていたとしても、ウイルスが物質表面上で、添加物を含む試料の含有物質や表面の立体構造等の影響を受け化学的または物理的に構造変化または破壊されるなどして感染性を失った可能性も考えられた。容器・包装の種類によって感染性ウイルスの回収量が経時的に漸減していく要因は、これらの試料片がウイルス粒子へ及ぼす影響の発生する量および比率が試料によって異なるからと考えられた。

今後、野菜用包装袋および発泡スチレンの複数の容器包装製品で試験を行い再現性を観察する、野菜用包装袋および発泡スチレンとそれらの素材であるポリプロピレンおよびポリスチレンの素材片を用いた比較検討等を行う、加えてそれぞれの製品の添加物や溶出する含有物質、表面の立体構造等、化学的・物理的性状の情報を収集し考察することによって、残存性が低くなる要因を解明できる可能性が有り、検討を継続する必要がある。

E. 結論

感染性を有するウシコロナウイルスの残存性は、発泡スチレンボックス表面のみ 6 時間後以降では非検出となり、発泡スチレンボックス以外の試料表面上では 18 時間程度は残存するが、その中でも野菜用包装袋表面上では残存性が比較的低いことが示された。感染性ウイルスの残存性は食品用容器・包装の種類によって異なること、野菜用包装袋および発泡スチレンボックスの表面では、他の 4 種類の容器・包装表面と比較して残存性が低い可能性が示唆された。今後、容器・包装それぞれの化学的・物理的性状の情報を収集し考察することによって、残存性が低くなる要因を解明できる可能性が有り、検討を継続する必要がある。

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

H. 参考論文

- 1) Guo, Z. D. et al. Aerosol and surface distribution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in hospital wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg Infect Dis* 26, 1583-

1591 (2020).

- 2) Cai, J. et al. Indirect virus transmission in cluster of COVID-19 cases, Wenzhou, China, 2020. *Emerg Infect Dis* 26, 1343-1345 (2020).
- 3) Brlek, A., Vidovič, Š., Vuzem, S., Turk, K. & Simonović, Z. Possible indirect transmission of COVID-19 at a squash court, Slovenia, March 2020: case report. *Epidemiol. Infect.* 148, e120 (2020).
- 4) Chin, A. W. H. et al. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe* 1, e10 (2020).
- 5) van Doremalen, N. et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* 382, 1564-1567 (2020).
- 6) Hirose, R. et al. Survival of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and influenza virus on human skin: importance of hand hygiene in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* 73, e4329-e4335.
- 7) Fahkrajang, W. et al. Bovine respiratory coronavirus enhances bacterial adherence by upregulating expression of cellular receptors on bovine respiratory epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 255, 109017 (2021).

表 1. 供試した食品の容器・包装の一覧

容器包装種類	材質等	メーカー、製品名等
野菜用包装袋	ポリプロピレン	アイアグリ株式会社、三角袋
食品用ラップ	低密度ポリエチレン	宇部フィルム株式会社、New ポリラップ
食品用耐水耐油紙	片側のみ耐油耐水加工	三菱製紙株式会社、N 三菱耐水耐油
レジ袋	高密度ポリエチレン	ワタナベ工業株式会社、サービスバック
耐熱プラスチックボックス蓋	高透明ポリプロピレン	中央化学株式会社、SD ビストロ
発泡スチレンボックス	ポリスチレン	シーピー化成株式会社、PSP 発泡容器

表 2. 各容器包装の表面におけるウィルス力価漸減程度の比較

食品用容器・包装種類	ウィルス力価漸減の 近似直線傾き
野菜用包装袋	-0.1253
食品用ラップ	-0.0585
食品用耐油耐水紙	-0.0643
レジ袋	-0.0693
耐熱プラスチックボックス蓋	-0.0645
発泡スチレンボックス	接種後 0 時間目でのみウィルスが 検出され、それ以降は非検出となったた め計算不可

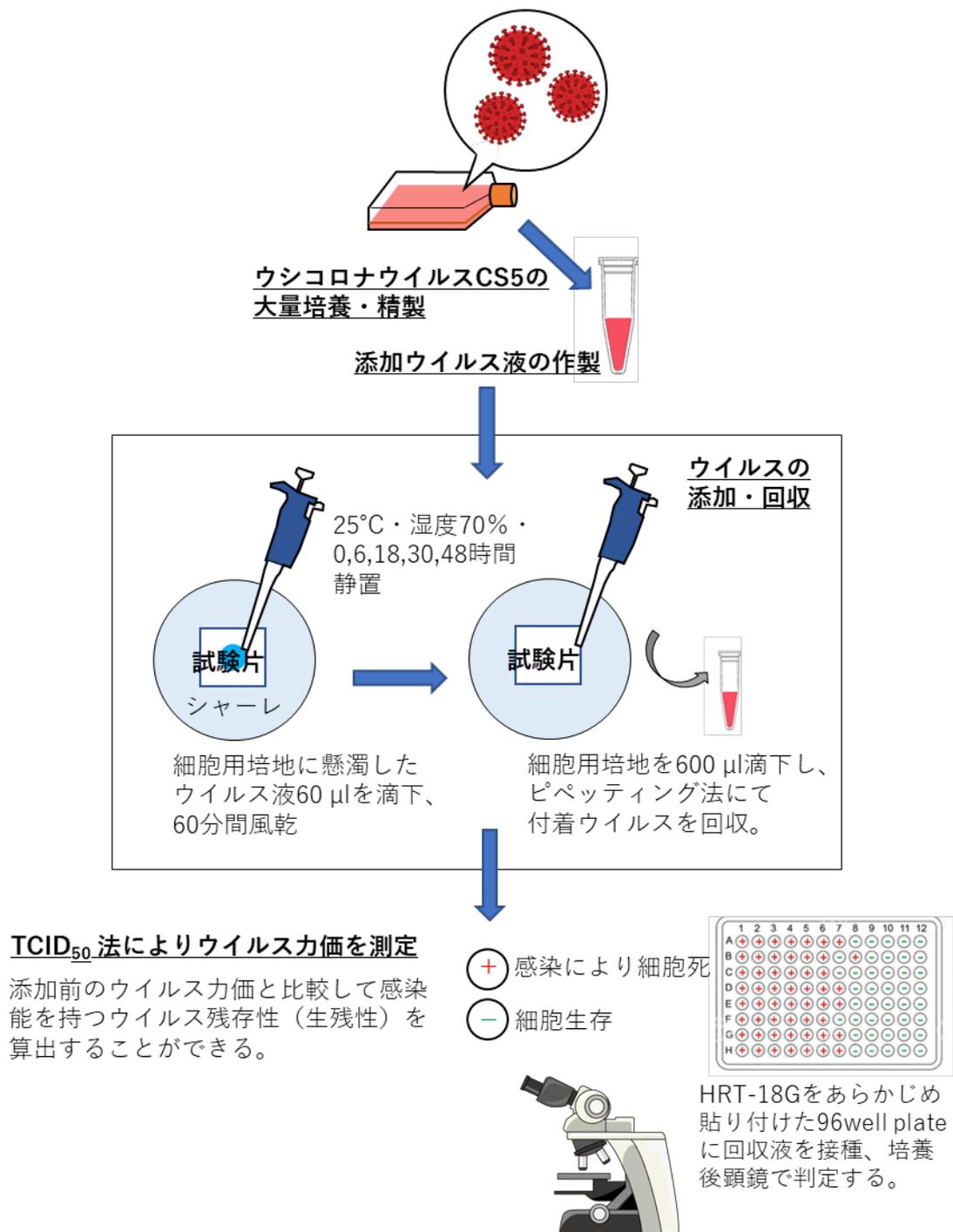
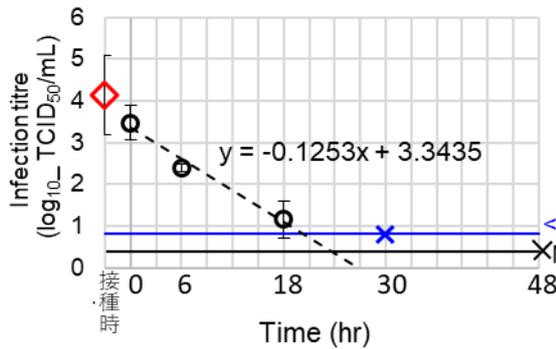
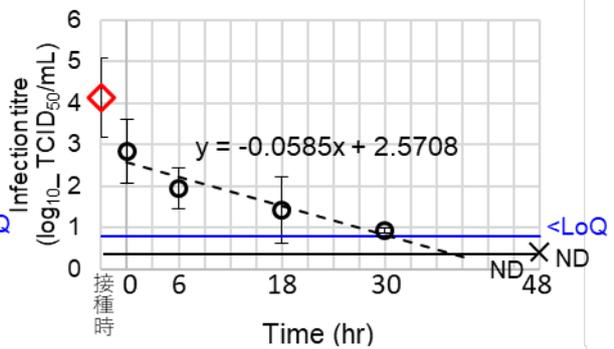


図1. 試験片へのウイルス添加回収試験の方法の流れ図

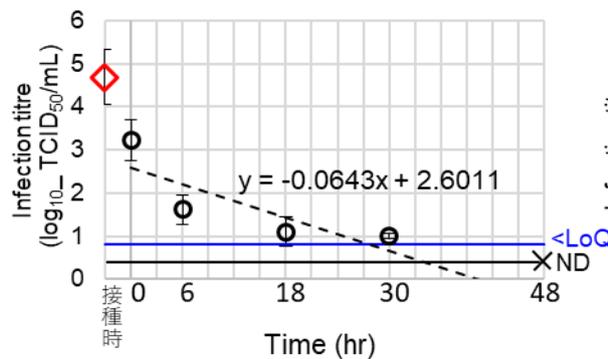
A. 野菜用包装袋



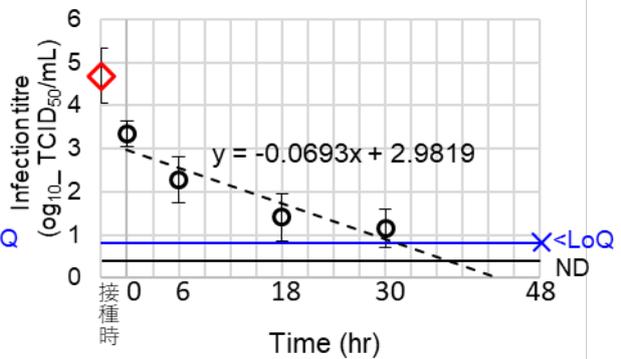
B. 食品用ラップ



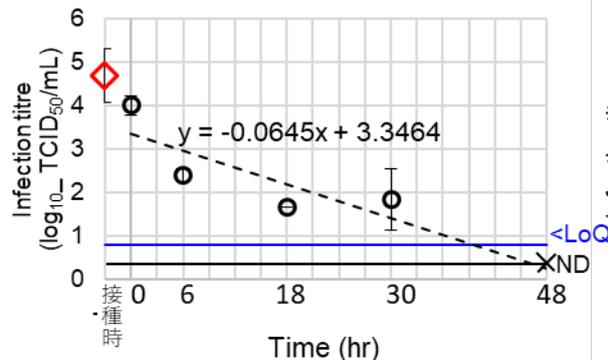
C. 食品用耐油耐水紙



D. レジ袋



E. 耐熱プラボックス蓋



F. 発泡スチレンボックス

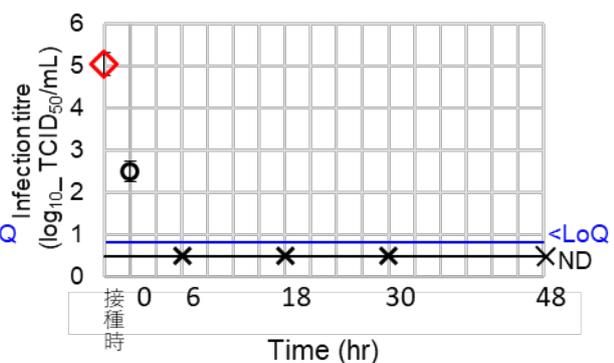


図2. 感染性を有するウシコロナウイルス残存性の試料片上での経時的変化

1 種類の試料について繰り返し3回行った。本測定系でのウィルス力価の定量限界値 $1.0 \log_{10}\text{-TCID}_{50}/\text{mL}$ とした。グラフ上での各マーカーが表す内容は以下の通り；赤い四角マーカーは試験片へのウィルス接種液におけるウィルス力価の平均値および標準偏差、黒丸マーカーは 0、6、18、30、48 時間目のウィルス回収液におけるウィルス力価の平均値および標準偏差、青バツ印マーカーは検出限界値以下 (<LoQ) での検出、黒バツ印マーカーは非検出 (ND) であったことを示した。青い直線は本検出系での <LoQ で検出された場合のグラフ上での位置、黒い直線は本測定系での ND のグラフ上での位置、破線は経時的に採取したウィルス回収液におけるウィルス力価測定値の近似直線をそれぞれ示した。発泡スチレンボックスのグラフにおいては、ウィルス力価の測定値は接種・乾燥後 0 時間目のみでしか検出できなかったため、近似曲線は描けなかった。