

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)

「食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と

制御を目的とした失活法の開発のための研究」

総合研究分担報告(令和4~6年度)

ノロウイルス, サポウイルスの不活化条件に関する情報収集

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	遠矢 真理	国立医薬品食品衛生研究所
	岡 智一郎	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品の調理工程においてノロウイルスを制御するための具体的な条件については、従来ノロウイルス代替ウイルスに対するデータのみが示されていた。

2016年に Ettayebi らがヒト腸管由来のオルガノイドを用いたノロウイルスの *in vitro* 培養系を発表以降、ヒトノロウイルスを用いて、直接不活化条件を検討することが可能となり、iPS細胞由来腸管上皮細胞を用いた系(佐藤ら)など、複数の培養系が報告されている。

HACCPの考え方に基づく衛生管理においてウイルス対策を講じることが可能となるよう、現在入手可能な報告から、ノロウイルスの不活化条件について情報収集を行い、まとめた。

また、ノロウイルスと同じくカリシウイルスに属するサポウイルスについても情報収集を行った。

A. 研究目的

食中毒発生防止のため、ノロウイルス等の原因ウイルスを食品の製造工程で制御することは大きな課題となっている。これまで、ヒトノロウイルスの実用的な *in vitro* 培養系が存在しなかったため、ネコカリシウイルスなどのノロウイルス代替ウイルスを用いた不活化条件が示されるのみであり、具体的なノロウイルス対策を講じる上で大きな障害となっていた。

2016年に Ettayebi らがヒト腸管由来のオルガノイドを用いたヒトノロウイルスの *in vitro* 培養系を発表後は、複数の研究グループにおいてヒトノロウイルスの実験室内増殖系が開発され、ヒトノロウイルスを直接用いた

不活化条件が提示される状況となっている。

本研究では HACCP の考え方に基づく食品製造工程での食中毒原因ウイルスの制御に向けて、ヒトノロウイルスを用いて示された不活化条件をとりまとめることを目的に、情報収集をおこなった。

B. 研究方法

PubMedにてヒトノロウイルス、および近縁のヒトサポウイルスを用いて示された不活化条件等について情報収集を行った。

C. 研究結果

1. ヒトノロウイルスの不活化条件(表1)

1-1. 次亜塩素酸ナトリウム

ヒト腸管由来の培養系では 50ppm 以上の濃度で 1 分間反応させることで感染後のウイルス増殖がなくなった。一方で、iPS 由来腸管上皮を用いた培養系では 1000ppm5 分間の反応で不活化された。

1-2. エタノール

汎用的な消毒剤として用いられる 70%エタノールでの処理により GII.4 は不活化されたものの、GII.3, GII.6, GI.7 など是不活化されなかった。ただし、有機酸を添加して pH を下げた場合に不活化効果が見られた。

1-3. 加熱

2022 年度の情報では、少なくとも 60 度 15 分の処理が必要であったが、2024 年に 50 度 20 分で 2log 程度のウイルス増殖の減少が起きると報告されていた。

1-4. 紫外線

ゼブラフィッシュを用いた実験系にて、6.0 mJ/cm² の処理で 2log の感染性減少が確認された。

1-5. 塩素、二酸化塩素、過酢酸によるノロウイルスの不活化が報告されていた。

2. ヒトサポウイルスの不活化条件 (表 2)

1-1. 塩素

0.02 mg・Cl₂・min/L の反応で GI.1 のサポウイルスが不活化された。

1-2. 加熱

少なくとも 70 度 10 分以上の加熱がサポウイルスの不活化に必要であった。

60 度 30 分では GII.3 型のサポウイルスは不活化されなかった。

1-3. 紫外線

5.4mJ/cm² の反応ではサポウイルスは不活化されなかった。

D. 考察

ヒト腸管由来、iPS 細胞由来、ゼブラフィッシュなど複数の in vitro ヒトノロウイルス培養系が開発され、研究が進行しており、さまざまなウイルス不活化方法についてデータが報告されつつある。

ノロウイルスを用いた実験系では、本研究班でも検証しているように、細胞へインプットする際のウイルス量、感染後に増殖したウイルス量ともに RNA コピー数で計測し判断するしかない。

さらに in vitro 培養系では基本的に、感染直後と感染 72 時間後のウイルス RNA コピー数を比較し、72 時間後に RNA コピー数が増加するかどうか、さらに増加した RNA レベルが対象群と比べてどの程度かで感染性ウイルスがどの程度残存していたかを判断している。

RNA コピー数は感染性ウイルス量を必ずしも示さないため、現状で報告される加熱温度等による不活化条件は、定量的なウイルスクリアランスを示すことができていないことに注意が必要である。

また、不活化処理によってごくわずかに残存する感染性ウイルスが増殖するには 72 時間以上の時間を要する可能性もあり、現状のノロウイルス in vitro 培養系では判断できない。

サポウイルスは、ノロウイルスに比較して非常に効率よく増殖する培養系が確立されており、ストックウイルスの作成も進んでいる。ノロウイルスに近縁なヒト腸管系病原ウイルスとして食品中のウイルス制御・安全性確保に向けた検証にサポウイルスを有効に利用していく必要がある。

E. 結論

HACCP の考え方に基づいたウイルス制御に

むけ、具体的なノロウイルスの不活化条件はすでにいくつか示されているものの、実際の食品製造工程にて実施するためにはさらに細かい条件での提示が必要と思われる。

また、調理工程のみならず、食品の洗浄工程や、従事者の手指・食品取り扱い環境の消毒を視野に入れた、実用的な消毒剤等による不活化条件、とくに食品添加物として認められている電解水などによる不活化条件について、多くのデータを示していくことは食品製造工程における衛生管理に大きく貢献するものと思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

なし

2. 学会発表：

なし

H. 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

表 1 ノロウイルスの不活化条件

次亜塩素酸Na					
遺伝子型	濃度	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	50ppm以上	1min	Inactivated 50ppmだとinput titerの減少なし。ただし細胞内での増殖なし。	Human intestinal enteroids (HIEs)	Costantini V, et. al., Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. <i>Emerg Infect Dis.</i> 2018 Aug;24(8):1453-1464.
GII.4	0.1% (1000 ppm)	5 min	Inactivated 約3 logの減少	human iPSC-derived IECs	Sato S, et. al., Alcohol abrogates human norovirus infectivity in a pH-dependent manner. <i>Sci Rep.</i> 2020 Sep 28;10(1):15878.
GII.3, GII.6, GII.17	0.1% (1000 ppm)	5 min	Inactivated 約2-3 logの減少		
エタノール					
遺伝子型	濃度	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	70%エタノール	5min	1.3-2.9 log: input titerの減少値、 up to 0.7 log: replication level	Human intestinal enteroids (HIEs)	Costantini V, et. al., Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. <i>Emerg Infect Dis.</i> 2018 Aug;24(8):1453-1464.
GII.4	70%エタノール	1min	1.3-2.9 log: input titerの減少値		
GII.4	70%エタノール	5min	Inactivated 約 3 log の減少: replication level (72 hpi)	human iPSC-derived IECs	Sato S, et. al., Alcohol abrogates human norovirus infectivity in a pH-dependent manner. <i>Sci Rep.</i> 2020 Sep 28;10(1):15878.
	70%エタノール+1%クエン酸	20sec	Inactivated 約 2.5 log の減少: replication level (72 hpi)		
GII.3, GII.6	70%エタノール	5min	減少なし		
	70%エタノール+1%クエン酸	5min	約 2 log の減少: replication level (72 hpi)		
GII.7	70%エタノール	5min	減少なし		
	70%エタノール+1%クエン酸	5min	約 1 log の減少: replication level (72 hpi)		
GII.17	70%エタノール	5min	減少なし		
	70%エタノール+1%クエン酸	5min	約 2 log の減少: replication level (72 hpi)		
	70%エタノール+15%レモンジュース	5min	約 3 log の減少: replication level (72 hpi)		
GII.17	70%エタノール	60 sec	減少なし	Human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal	Hiraishi E, et al., In Vitro Differential Virucidal Efficacy of Alcohol-Based Disinfectants Against Human Norovirus and Its Surrogates. <i>Microorganisms.</i> 2025 Feb 8;13(2):368.
熱					
遺伝子型	反応温度	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	60℃	15min	Inactivated 約2.5-3 logの減少	Stem cell-derived human enteroids	Ettayebi K, et. al., Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. <i>Science.</i> 2016 Sep 23;353(6306):1387-1393.
GII.4	90℃	1min	Inactivated 約1.5 logの減少	Human intestinal enteroids (HIEs)	Hayashi T, et. al., Human Norovirus in Freshwater Clams Using Human Intestinal Enteroids. <i>Viruses.</i> 2022 May 10;14(5):1014.
GII.4	50℃	20min	Inactivated 約2logの減少	Human intestinal enteroids (HIEs)	Shaffer M, et al., Heat inactivation of aqueous viable norovirus and MS2 bacteriophage. <i>J Appl Microbiol.</i> 2024 Feb 1;135(2):xae033.
	60℃	7min 30sec			
	70℃	5 min			
紫外線					
遺伝子型	反応条件		Log reduction	培養細胞系	文献
GII.2, GII.4, GII.17	6.0mJ/cm ²		Infectivity が2 log以上減少	Zebra fish embryo	Tan MTH, et. al., Use of Zebrafish Embryos To Reproduce Human Norovirus and To Evaluate Human Norovirus Infectivity Decay after UV Treatment. <i>Appl Environ Microbiol.</i> 2023 Mar 21:e0011523.
塩素					
遺伝子型	反応条件	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	20ppm	1min	Inactivated 約3 logの減少	Human intestinal enteroids (HIEs)	Allende A, et. al., Human intestinal enteroids and predictive models validate the operational limits of sanitizers used for viral disinfection of vegetable process wash water. <i>Int J Food Microbiol.</i> 2024 Mar 2;413:110601.
二酸化塩素					
遺伝子型	反応条件	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	3ppm	5min	Inactivated 約3 logの減少	Human intestinal enteroids (HIEs)	Allende A, et. al., Human intestinal enteroids and predictive models validate the operational limits of sanitizers used for viral disinfection of vegetable process wash water. <i>Int J Food Microbiol.</i> 2024 Mar 2;413:110601.
過酢酸					
遺伝子型	反応条件	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	80ppm	5min	Inactivated 約4 logの減少	Human intestinal enteroids (HIEs)	Allende A, et. al., Human intestinal enteroids and predictive models validate the operational limits of sanitizers used for viral disinfection of vegetable process wash water. <i>Int J Food Microbiol.</i> 2024 Mar 2;413:110601.

表 2 サポウイルスの不活化条件

塩素

遺伝子型	反応条件	Log reduction	培養細胞系	文献
GI.1	0.02 mg-Cl ₂ -min/L	3.8-4.0 logの減少	Human intestinal cell	Shirakawa D, et. al., Investigation of removal and inactivation efficiencies of human sapovirus in drinking water treatment processes by applying an in vitro cell-culture system. Water Res. 2023 Apr 7;236:119951.

熱

遺伝子型	反応温度	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GI.1	70°C	10-30min	約4-4.5 logの減少 30分処理で inactivated	Human intestinal cell	Takagi H, et. al., Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Dec 15;117(50):32078-32085.
	60°C	10-30min	約3.5-4 logの減少		
	50°C	10-30min	ほとんど減少せず		
GII.3	70°C	10-30min	約4.5 logの減少 10分処理で inactivated		
	60°C	10-30min	ほとんど減少せず		
	50°C	10-30min	ほとんど減少せず		

紫外線

遺伝子型	反応条件	Log reduction	培養細胞系	文献
GI.1, GII.3	5.4mJ/cm ²	ほとんど減少せず	Human intestinal cell	Takagi H, et. al., Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Dec 15;117(50):32078-32085.