

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）
「食品取扱現場における効果的なウイルス汚染対策の策定のための研究」
分担報告書

効率的な培養系による感染性ウイルスの定量評価系構築に関する研究

研究分担者	白崎伸隆	北海道大学 大学院工学研究院
研究協力者	松下 拓	北海道大学 大学院工学研究院

研究概要

本研究では、殺菌・洗浄工程におけるウイルスの不活化効果・洗浄効果を定量的に評価するため、培養法を活用した ICC-PCR 法を検討した。その結果、定量対象の試料水にウイルスが 10^4 copies/mL 程度以上存在する場合には、感染性の有無の判定が可能であることが確認された。また、ICC-PCR 法にて評価した塩素消毒におけるウイルスの不活化率は、感染性ウイルスの定量評価系として広く用いられているブラック形成法にて評価した不活化率と同程度となったことから、ブラック形成法の代替としての ICC-PCR 法の有用性が示された。従って、ブラック形成法の実施が困難なサポウイルスや E 型肝炎ウイルスについては、ICC-PCR 法を適用することにより、感染性ウイルスの定量評価が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

ノロウイルスやサポウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス等によるウイルス性食中毒の発生低減のためには、殺菌・洗浄工程におけるウイルスの不活化効果・洗浄効果を定量的に評価し、食品取扱現場において適切なウイルス汚染対策を講じる必要がある。

そこで、本研究では、効率的な培養法が見出されたサポウイルス (Takagi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117(50), 32078-32085, 2020 ; Oka *et al.*, *J. Virol.* 98(9), e00639-24, 2024) に着目し、培養法を活用した感染性ウイルスの定量評価系、すなわち、宿主細胞を用いたウイルス培養と PCR 法によるウイルス定量を組み合わせた Integrated cell culture-PCR 法 (ICC-PCR 法) を構築することを目的とした。また、効率的な培養が可能であり、培養法を活用し

た感染性ウイルスの定量評価系であるブラック形成法（ウイルス感染時に宿主細胞が形態変化する性質 [細胞変性効果] を利用した手法）が確立されている A 型肝炎ウイルス (Richards and Watson, *J. Virol. Methods* 94(1-2), 69-80, 2001 ; Shirasaki *et al.*, *J. Hazard. Mater.* 326, 110-119, 2017) についても着目し、ICC-PCR 法を構築すると共に、塩素消毒におけるウイルスの不活化効果の評価に適用することにより、ブラック形成法を用いた評価結果と ICC-PCR 法を用いた評価結果を比較した。これにより、ブラック形成法の代替としての ICC-PCR 法の有用性を議論した。

B. 研究方法

1) 使用したウイルス

本研究では、ヒトに感染するサポウイルスとしてサポウイルス GV.1 型 D3302 株を使用した。また、ブラック形成法による感染性ウイルスの定量が可能な A 型肝炎ウイルス IB 型 HM175/18f 株についても対象とし、実験に使用した。サポウイルス及び A 型肝炎ウイルスは、それぞれの宿主細胞である HuTu 80 細胞（ヒト十二指腸癌由来細胞）、FRhK-4 細胞（アカゲザル胎児腎細胞）を用いて培養した後、培養液を限外ろ過膜にて精製することにより、ウイルス精製溶液を得た。

2) 感染性ウイルスの定量評価系

本研究では、ICC-PCR 法を構築・適用することにより、感染性ウイルスを定量した。宿主細胞に接種したウイルスが感染性を有する場合、培養日数の経過と共に細胞内でウイルスが増殖することから、培養前後のウイルス濃度を測定することにより、増殖の有無、すなわち、感染性の有無を判定できる。定量対象の試料水を段階希釈し、各段階希釈において 3 連でウイルス感染・培養を実施した後、培養前後のウイルス濃度を測定することにより、培養前に比べてウイルスの増殖が確認された試料水を陽性（感染性有り）と判定する。各希釈段階における陽性率を基に、最確数（MPN: Most Probable Number）を算出することにより、感染性ウイルスの濃度（MPN/mL）を求めることが可能となる。

ICC-PCR 法においては、どの程度のウイルス濃度を宿主細胞に接種した場合に、培養前に比べてウイルスの増殖が確認できるか、すなわち、感染性の有無を判定できるかを評価するため、サポウイルスあるいは A 型肝炎ウイルスの精製溶液を 10^{2-9} copies/mL 程度になるように培地にて段階希釈した後、それぞれ

の宿主細胞に接触し、ウイルス感染・培養を実施した。この後、培養前の培地及び培養後の培養液のウイルス濃度を PCR 法にて測定することにより、ウイルス接種濃度がウイルス増殖に与える影響を評価した。

3) 塩素消毒実験

本研究では、A 型肝炎ウイルスを用いた塩素消毒実験を実施し、ブラック形成法及び ICC-PCR 法にて不活化効果を評価することにより、ブラック形成法の代替としての ICC-PCR 法の有用性を議論した。

約 5 °C に調整した pH 7.0 の 0.01 M リン酸バッファーに、A 型肝炎ウイルスの精製溶液を 10^6 copies/mL (10^3 PFU/mL) 程度になるように添加したものを実験原水とした。ここに、初期塩素濃度が 0.2 mg-Cl₂/L 程度になるように次亜塩素酸ナトリウムを添加し、攪拌子を用いて攪拌した。塩素添加前の原水及び塩素添加後の塩素処理水を経時的に採水し、チオ硫酸ナトリウムにより残留塩素を中和した後、それぞれの試料水の感染性を有する A 型肝炎ウイルス濃度をブラック形成法及び ICC-PCR 法にて測定することにより、塩素処理における A 型肝炎ウイルスの不活化率（Log 不活化率）を算出した。なお、塩素処理水（中和後）については、必要に応じて限外ろ過膜によるウイルス濃縮を実施した後にウイルス濃度の測定に供した。また、ICC-PCR 法については、処理前後の試料水を段階希釈した後、各段階希釈において 3 連でウイルス感染・培養を実施し、各希釈段階における陽性率を基に最確数を算出することにより、感染性ウイルスの濃度を求めた。

C. 研究結果

サポウイルス GV.1 型 D3302 株については、初期濃度 10^4 copies/mL 程度及び 10^5 copies/mL 程度においては、いずれの場合も培養によりウイルス濃度（核酸濃度）が増加し、培養日数 10 日で 10^{8-10} copies/mL 程度に達した。一方、初期濃度 10^2 copies/mL 程度及び 10^3 copies/mL 程度においては、培養によるウイルス濃度の増加は見られなかった。これらの結果は、研究分担者らがこれまでに実施してきたサポウイルス GI.1 型 AK20 株を用いた場合（Shirakawa, *et al.*, *Water Res.* 236, 119951, 2023）と同じ傾向であった。

同様の検討を A 型肝炎ウイルスについても実施したところ、サポウイルスの場合と同様に、初期濃度 10^4 copies/mL 程度以上の場合には、培養によりウイルス濃度が増加し、培養日数 14 日で 10^9 copies/mL 程度に達した。一方、初期濃度 10^3 copies/mL 程度以下においては、培養によるウイルス濃度の増加が見られない場合もあった。

塩素消毒における A 型肝炎ウイルスの不活化効果をブラック形成法にて評価したところ、遊離塩素濃度（mg- Cl_2 /L）と接触時間（min）の積で表される CT 値（mg- Cl_2 ·min/L）の増加と共に不活化率の増加が確認され、CT 値 0.4 mg- Cl_2 ·min/L において 1 log 程度、CT 値 3.2 mg- Cl_2 ·min/L において 4–5 log 程度の不活化率となった。また、A 型肝炎ウイルスの不活化効果を ICC-PCR 法にて評価した場合においても、ブラック形成法にて評価した場合と同程度の不活化率となった。

D. 考察

サポウイルス及び A 型肝炎ウイルスを対象とした ICC-PCR 法において、定量対象の試料水に感染性ウイルスが 10^4 copies/mL 程度以上

存在する場合には、宿主細胞を用いた培養によりウイルス濃度の増加が確認できることが明らかとなった。また、ウイルス濃度の増加が確認できる場合においては、初期濃度に関わらず 10^{8-10} copies/mL 程度までウイルス濃度が増加することから、増殖の有無、すなわち、感染性の有無の判定が容易であることが確認された。これらのことから、ICC-PCR 法を実施することにより、感染性ウイルスの定量評価が可能であることが示唆された。

A 型肝炎ウイルスを対象とした塩素消毒において、ICC-PCR 法にて評価した不活化率は、ブラック形成法にて評価した不活化率と同程度となることが確認された。これらのことから、ブラック形成法の代替としての ICC-PCR 法の有用性が示された。

E. 結論

感染性ウイルスの定量評価系として ICC-PCR 法を検討したところ、定量対象の試料水にウイルスが 10^4 copies/mL 程度以上存在する場合には、感染性の有無の判定が可能であることが確認された。また、ICC-PCR 法を塩素消毒におけるウイルスの不活化効果の評価に適用したところ、感染性ウイルスの定量評価系として広く用いられているブラック形成法にて評価した不活化率と同程度の不活化率となった。従って、ブラック形成法の代替としての ICC-PCR 法の有用性が示され、ブラック形成法の実施が困難なサポウイルスや E 型肝炎ウイルスについては、ICC-PCR 法を適用することにより、熱消毒や塩素消毒、オゾン消毒等の殺菌工程におけるウイルスの不活化効果、更には、洗浄工程におけるウイルスの洗浄効果を定量的に評価できることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 山口耕平, 白崎伸隆, 松下拓 (2026). 病原ウイルスのオゾン処理耐性の把握とトウガラシ微斑ウイルスを指標とした実浄水場におけるオゾン処理強度の推定. 第 60 回日本水環境学会年会, 東京, 2026/3/9-11.
- 2) 佐々木有那, 白崎伸隆, 松下拓, 李天成

(2026). E 型肝炎ウイルスの塩素処理性評価: 細胞増殖系を活用した感染力評価手法の構築と適用. 第 60 回日本水環境学会年会, 東京, 2026/3/9-11.

G. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし