

In vitro培養系を用いたヒトノロウイルスに対する消毒薬の有効性評価方法に関する検討

○大西 由美, 鈴木 仁, 嶋根 和毅, 水永 真吾

富士フイルム富山化学株式会社 富山研究開発センター バイオ解析研究部

FUJIFILM
富士フイルム 富山化学株式会社

背景・目的

ヒトノロウイルス (HuNoV) は感染性胃腸炎の主要原因ウイルスである。HuNoVの感染力は極めて強く、環境中でも長時間生存するため、消毒剤等による環境清掃が感染防止対策として重要である。しかしながら、HuNoVの安定的かつ汎用的な*in vitro*培養方法に関する研究は発展途上であり、HuNoVに対する消毒薬の有効性はネコカリシウイルス (FCV) やマウスノロウイルス等の代替ウイルスを用いた評価により推測されているのが現状である。このため、HuNoVに対する消毒剤の有効性評価に関する公的な標準試験方法及び基準は未だ確立されていない。近年、ヒト腸管幹細胞由来オルガノイドを用いたHuNoV培養成功の報告があり、本培養系は感染、増殖に関する基礎的研究及びワクチンや治療薬等の評価へ応用されつつある。今回、我々はヒトIPS細胞由来腸管上皮細胞F-hiSIEC™を用いたHuNoV培養系を構築、種々の消毒薬の評価を実施し、FCVに対する効果と比較した。

まとめ

- ✓ F-hiSIEC™にHuNoV陽性便検体溶液を接種・培養することにより、HuNoV RNAコピー数の増加が認められ、HuNoVの複製が示唆された (図2)。
- ✓ ウイルスRNAの分解がおこらない条件で熱処理したHuNoV陽性便検体溶液を接種・培養した結果、培養後のRNAコピー数は非熱処理群と比較して有意に低く、本培養系では感染性を有するウイルス粒子が増幅していることが推察された (図4)。
- ✓ 遺伝子型 GII.3 [P12] 及び GII.4 [P31] のHuNoVに対して、0.1% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液、10% ポビドン-よう素水溶液、1%クエン酸添加 75%エタノール水溶液、製品B、製品C及び製品Dは、有効性を示した。一方、75%エタノール水溶液の消毒効果は遺伝子型間で差が認められた (図7)。
- ✓ HuNoVと代替ウイルスであるFCVでは、消毒成分に対する感受性は同一ではなかった (図7)。

【結語】 *In vitro* HuNoV培養系を用いることで、実環境でのHuNoVへの消毒効果の予測精度の向上が期待される。

◆表1. 消毒効果評価結果一覧

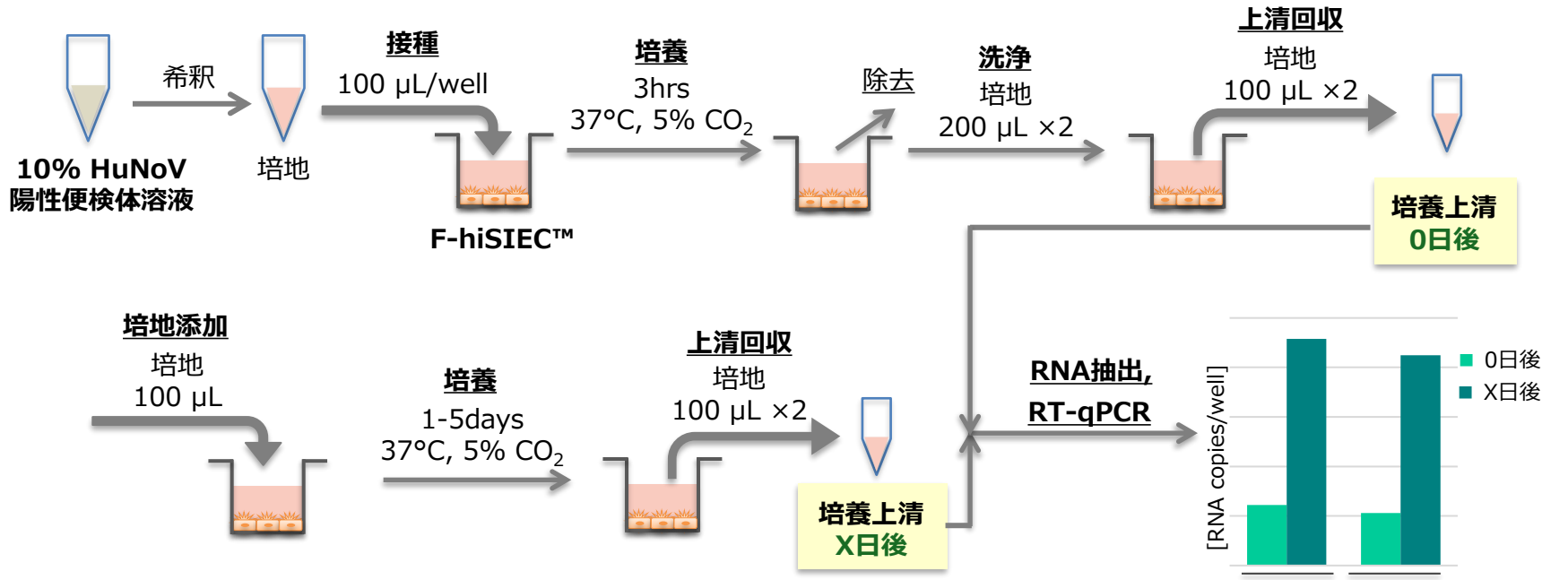
被験物質はFCVに対する有効性が報告されている成分及び製品から選定した。controlとして注射用水を設定した。HuNoVについては、RNAコピー数が定量下限未満の場合「○」、定量下限以上の場合「×」。FCVについては、ウイルス力価 (log TCID₅₀/mL) がコントロールに対して3 log以上低下した場合「○」、3 logより低下していない場合「×」。a):細胞毒性による検出下限未満であったため、判定不能

No.	被験物質名	pH	HuNoV		FCV
			GII.3 [P12]	GII.4 [P31]	
1	75% エタノール水溶液	7	×	×	×
2	0.1% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液	-	○	○	○
3	10% ポビドン-よう素水溶液	-	○	○	○
4	0.1% 塩化ベンザルコニウム水溶液	7	×	×	×
5	重炭酸緩衝液	11	×	×	○
6	0.1% 塩化ベンザルコニウム添加 重炭酸緩衝液	11	×	×	— ^{a)}
7	1% クエン酸水溶液	1	×	×	×
8	1% クエン酸添加 75% エタノール水溶液	1	○	○	○
9	製品A (クロルヘキシジングルコン酸塩エタノール製剤)	7	×	×	— ^{a)}
10	製品B (エタノール含有塩化ベンザルコニウム製剤)	11	○	○	○
11	製品C (酸性エタノール製剤)	1	○	○	○
12	製品D (酸性エタノール製剤)	1	○	○	○

HuNoV培養系の検討

◆図1. 試験方法

試験便検体溶液：HuNoV陽性便検体溶液 (遺伝子型 GII.3 [P12] 及び GII.4 [P31])
細胞：ヒトIPS細胞由来腸管上皮細胞 F-hiSIEC™



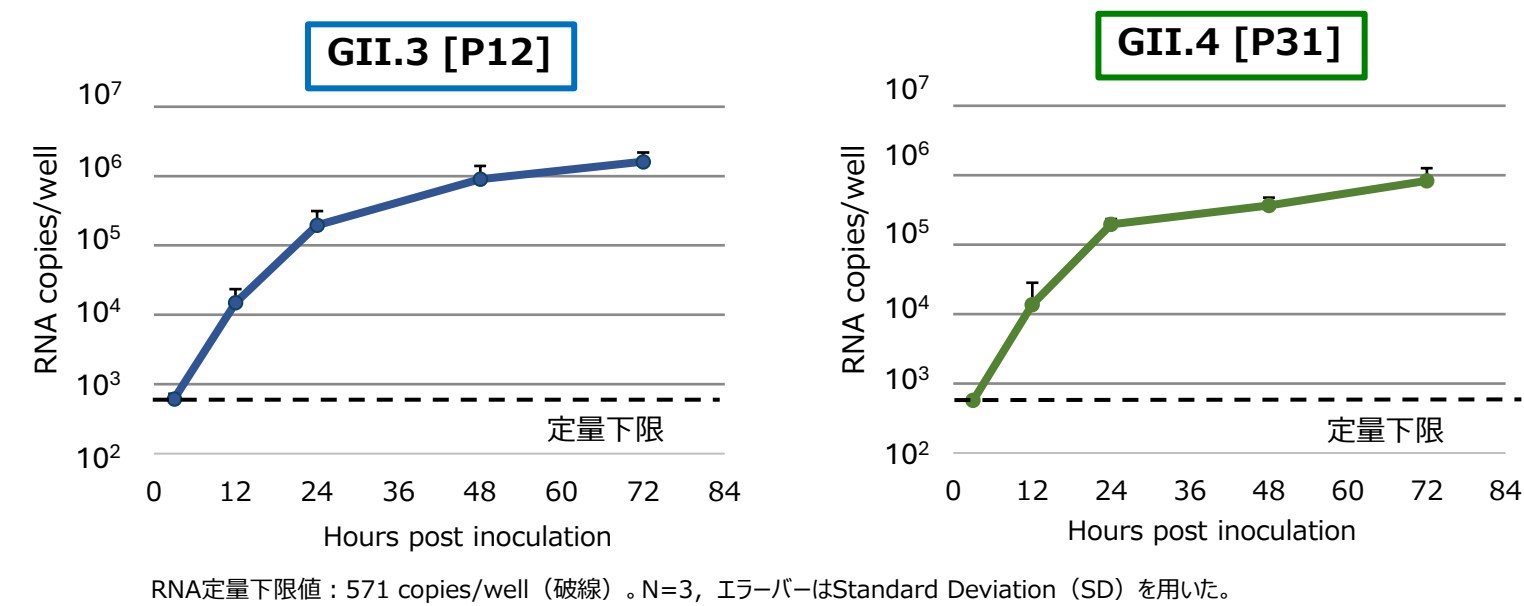
RNA extraction: QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

DNase treatment, RT reaction: Recombinant DNase I (TaKaRa), PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa)

qPCR: 「ノロウイルスの検出法」の「Ⅲ リアルタイムPCR法によるノロウイルスの定量的検出法」の項に準じて実施 (厚生労働省医薬品部食品安全部監視安全課長、平成15年11月5日付食安監発第1105001号別添、最終改正平成19年5月14日食安監発第0514004号)
<https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/dl/Q31105-1a.pdf>

◆図3. ウイルス増幅曲線

HuNoV陽性便検体溶液をF-hiSIEC™へ接種後、経時的 (3hr, 12hr, 24hr, 48hr, 72hr後) に培養上清を回収し、RNAコピー数を定量した。

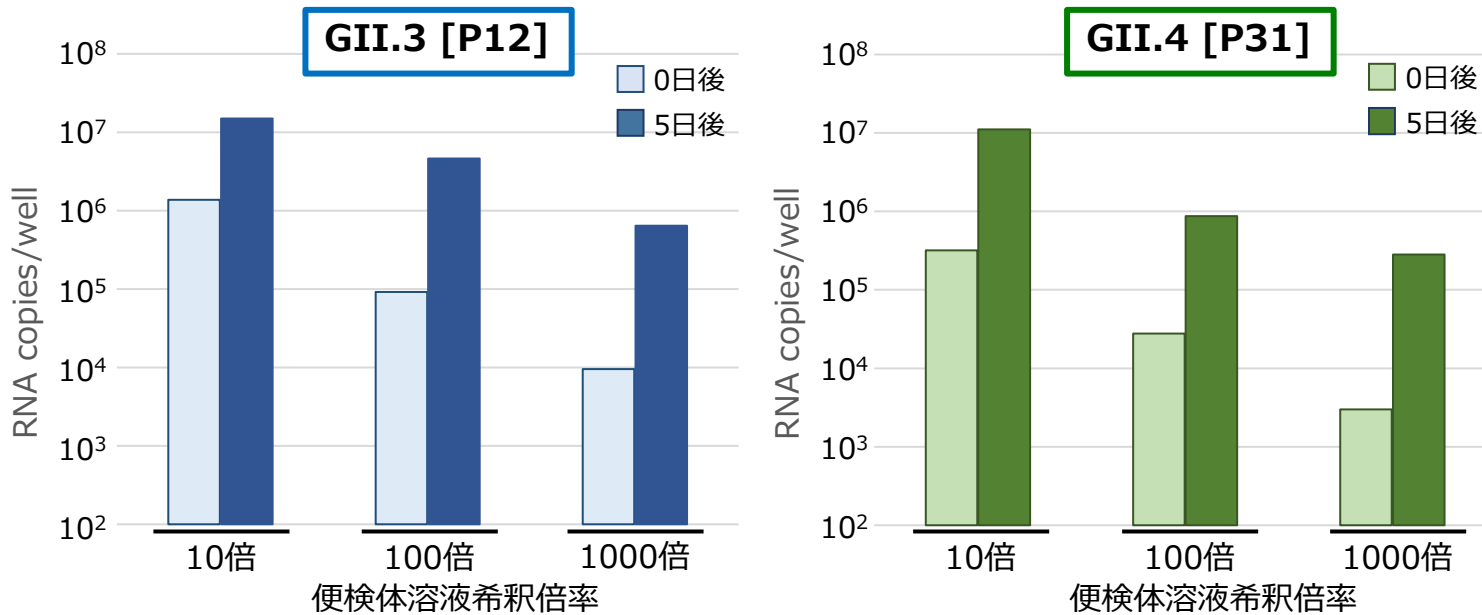


RNA定量下限値：571 copies/well (破線)。N=3, エラーバーはStandard Deviation (SD) を用いた。

- ✓ 両遺伝子型のウイルスRNAコピー数は、接種3時間後から24時間後までに顕著に増加した。

◆図2. ウイルス増幅の確認

F-hiSIEC™へHuNoV陽性便検体溶液を接種し、培養0日後及び5日後の培養上清中のRNAコピー数を定量した。

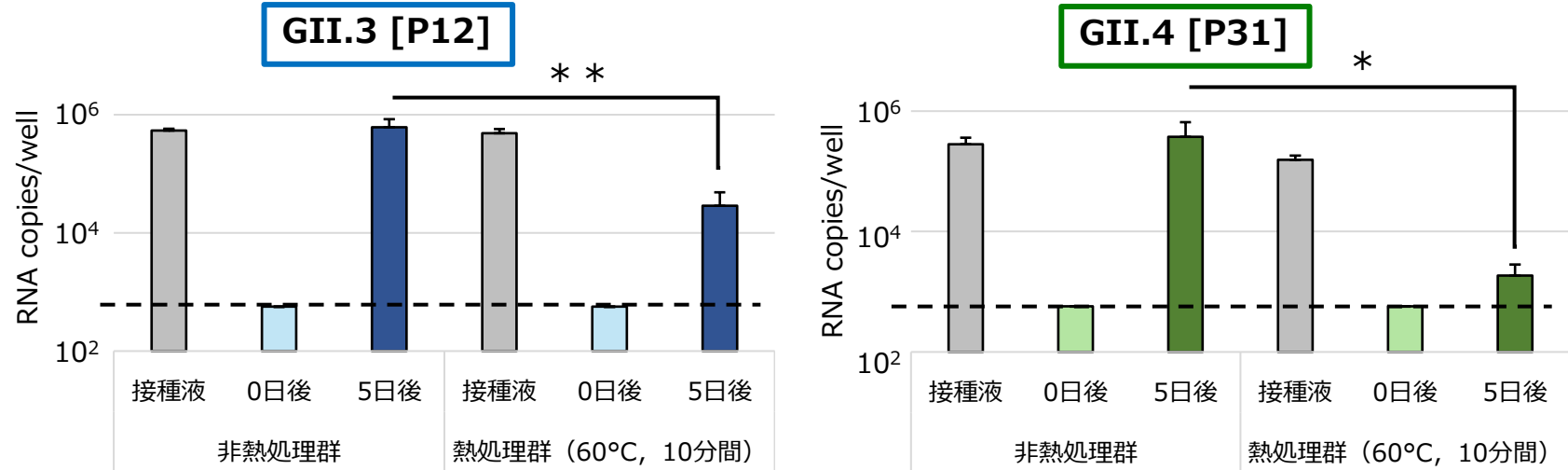


接種RNAコピー数 (100倍希釈)：GII.3 [P12] 2.3×10⁷ copies/well, GII.4 [P31] 8.4×10⁶ copies/well
棒グラフはN=2 (well) の平均を示す。

- ✓ F-hiSIEC™にHuNoV陽性便検体溶液を接種・培養した結果、HuNoV RNA コピー数の増加が認められ、本培養系でのHuNoVの複製が示唆された。

◆図4. 熱処理によるウイルス不活化の検出

HuNoV陽性便検体溶液を熱処理 (60℃, 10分間, RNAが分解しない条件) 後、F-hiSIEC™へ接種し、培養0日後及び5日後のRNAコピー数を定量した。



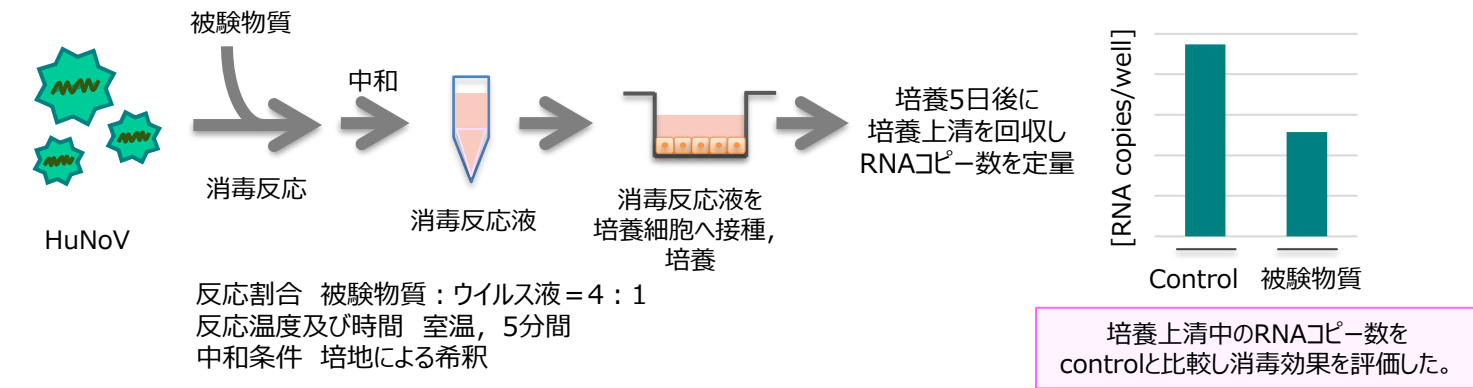
培養0日後の培養上清中のRNA定量下限値 (培養0日後の培養上清)：571 copies/well (破線)。N=5, student's t-test * = p < .05, ** = p < .001. エラーバーはSDを用いた。

- ✓ 両遺伝子型にて、熱処理群の培養5日後のRNAコピー数は非熱処理群に対して有意に低かった (student's t-test p < .05)。
- ✓ 接種液中のRNAコピー数が減少していないに関わらず、培養5日後のRNAコピー数が低下していることから、60℃, 10分間の熱処理はウイルスの感染性を低下させていると考えられる。
- ✓ 本培養系においては、感染性を有するウイルス粒子が感染、増幅していることが示唆された。

HuNoV及びFCVに対する消毒効果の評価

◆図5. HuNoVに対する消毒効果の評価方法

試験ウイルス：HuNoV陽性便検体溶液 (遺伝子型 GII.3 [P12] 及び GII.4 [P31])
細胞：ヒトIPS細胞由来腸管上皮細胞 F-hiSIEC™

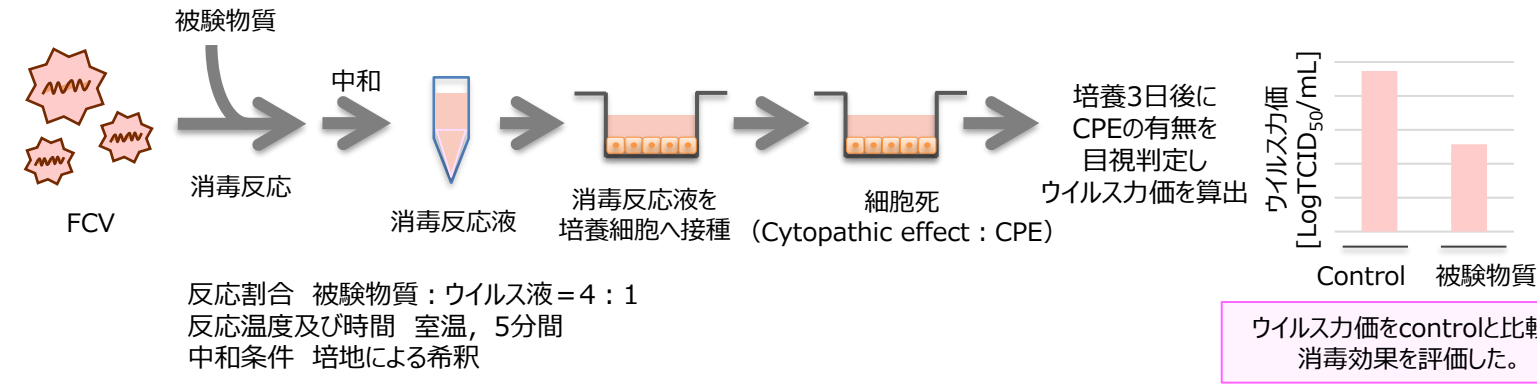


反応割合 被験物質：ウイルス液 = 4 : 1
反応温度及び時間 室温, 5分間
中和条件 培地による希釈

培養上清中のRNAコピー数をcontrolと比較し消毒効果を評価した。

◆図6. FCVに対する消毒効果の評価方法

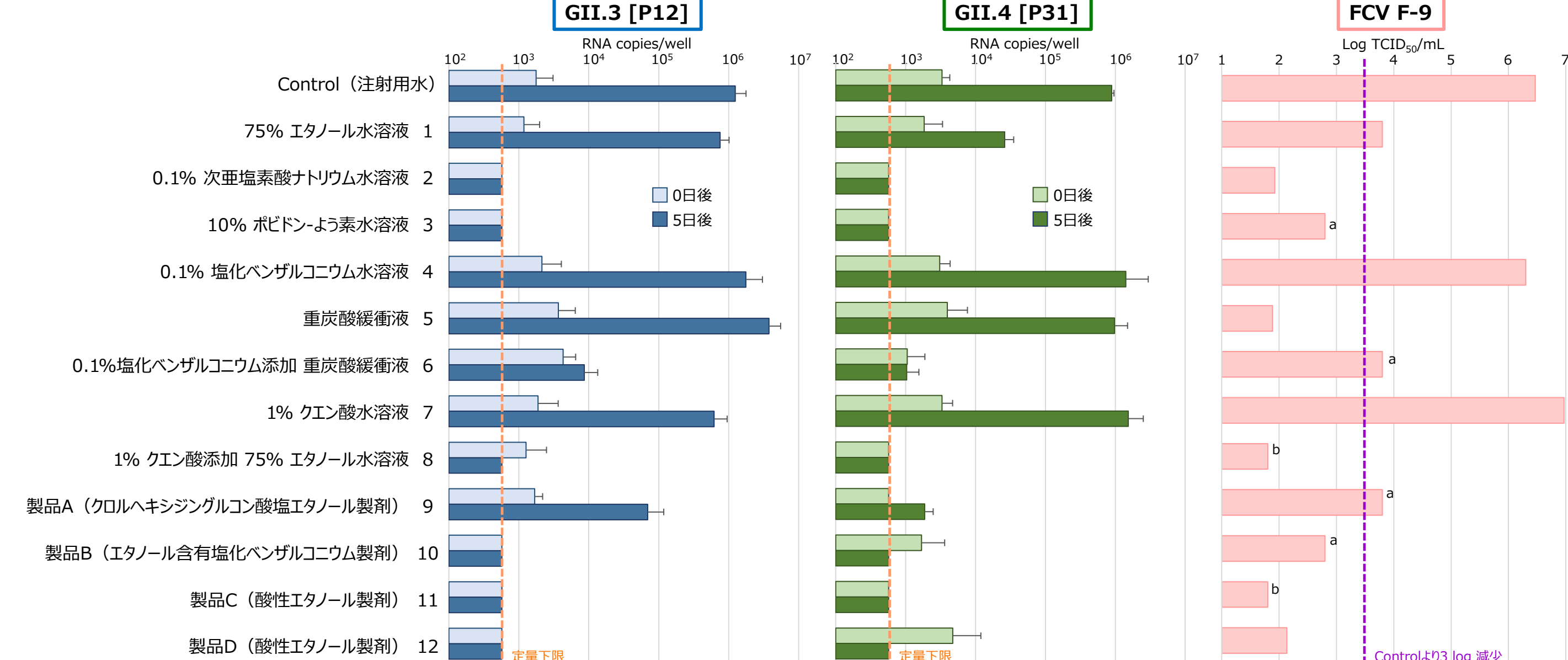
試験ウイルス：ネコカリシウイルス (FCV F-9)
細胞：ネコ腎由来株化細胞 (CRFK)



反応割合 被験物質：ウイルス液 = 4 : 1
反応温度及び時間 室温, 5分間
中和条件 培地による希釈

ウイルス力価をcontrolと比較し消毒効果を評価した。

◆図7. HuNoV及びFCVに対する消毒効果の評価結果



【HuNoV】被験物質濃度は消毒反応時の濃度を示す (製品を除く)、消毒反応時のRNAコピー数：GII.3 [P12] 4.5×10⁶ copies/μL, GII.4 [P31] 1.7×10⁶ copies/μL. 培養0日後、培養5日後の培養上清中のRNA定量下限値は571 copies/well (破線)。N=3, エラーバーはSDを用いた。
【FCV】被験物質濃度は消毒反応時の濃度を示す (製品を除く)、初発ウイルス濃度：8.0×10⁷ TCID₅₀/mL, 実験回3回分の平均を示した。a) 細胞毒性発現による検出下限値未満, b) ウイルス力価測定における検出下限値未満

- ✓ 本培養系を用いた評価系により、種々の成分、製品のHuNoVに対する消毒効果の評価が可能であった。
- ✓ 0.1% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液、10% ポビドン-よう素水溶液、1% クエン酸添加 75% エタノール水溶液、製品B、製品C及び製品Dは、両遺伝子型のHuNoV に対して有効性を示した。一方、75% エタノール水溶液の消毒効果は遺伝子型間で差が認められた。
- ✓ FCVに対しては、0.1% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液、10% ポビドン-よう素水溶液、重炭酸緩衝液、1% クエン酸添加 75% エタノール水溶液、製品B、製品C及び製品Dを作用させることにより、3 log以上のウイルス力価の減少が認められた。HuNoVに対して効果が認められなかった「重炭酸緩衝液」にも消毒効果が認められた。
- ✓ HuNoVと代替ウイルス (FCV) では、消毒成分に対する感受性は同一ではなかった。

富士フイルム富山化学では、
ヒトノロウイルスに対する
消毒効果を評価するサービス
を実施しております。
サービス詳細はこちら↓

