

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培養系を構築し、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。

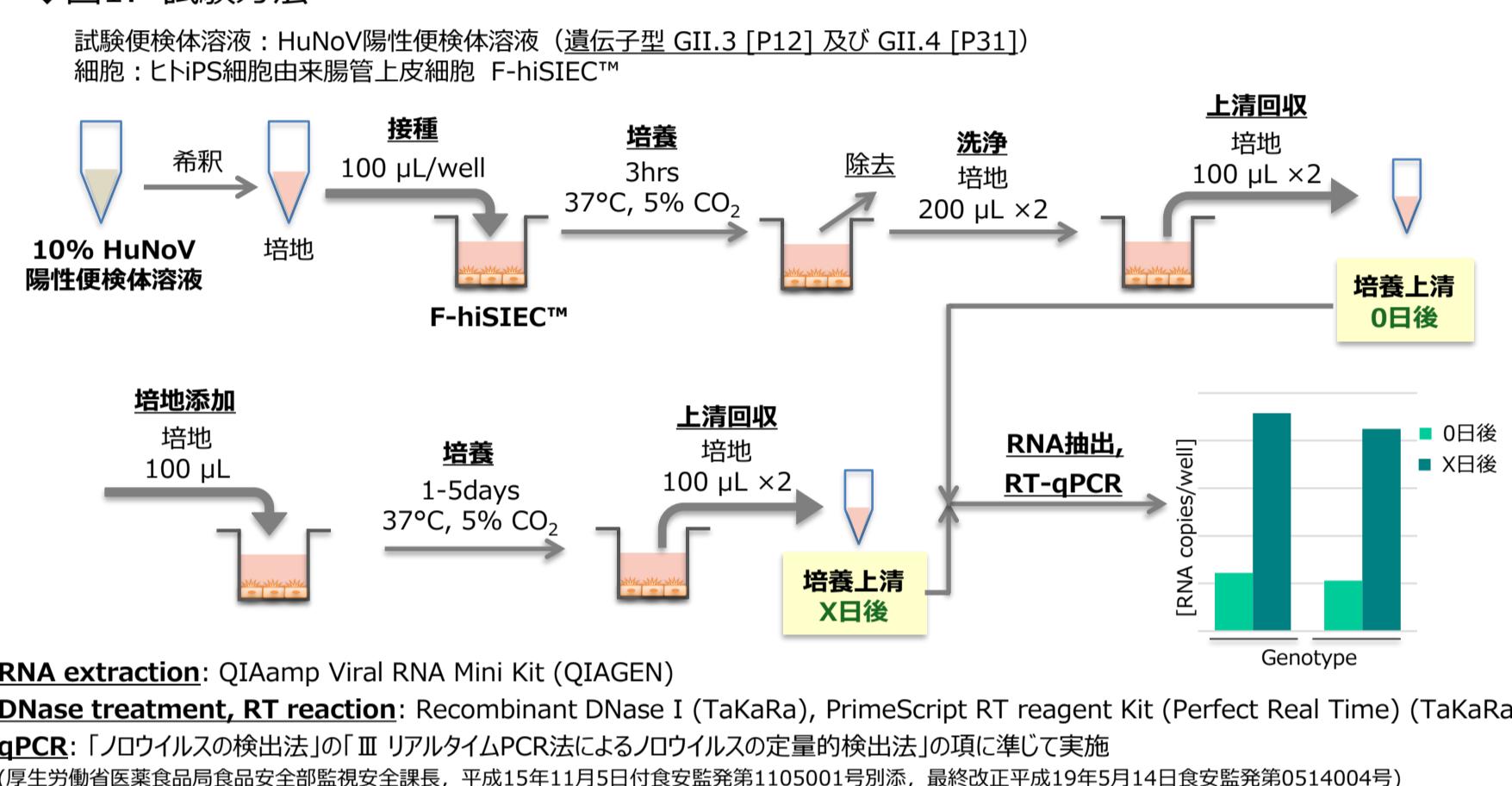
◆表1. 消毒効果評価結果一覧

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、ウイルスカ培地 (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



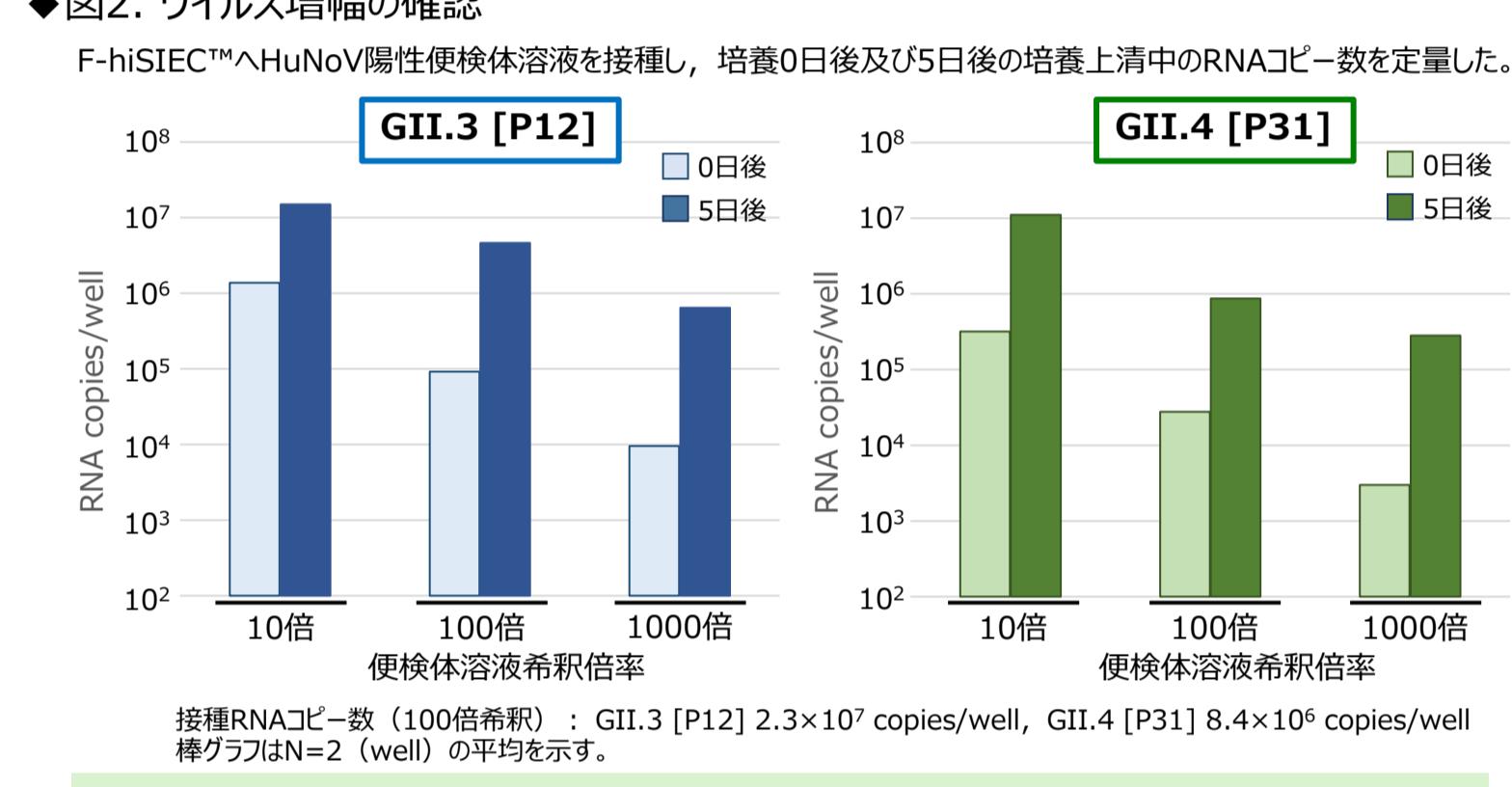
RNA extraction: QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
DNase treatment, RT reaction: Recombinant DNase I (TaKaRa), PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa)

qPCR: 「ワイルスの検出法」の「3 リアルタイムPCR法によるワイルスの定量的検出法」の項に準じて実施

(厚生労働省医薬食品局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、最終修正平成19年5月14日食安監発第0514004号)

<https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kansen/kanshi/dl/031105-1a.pdf>

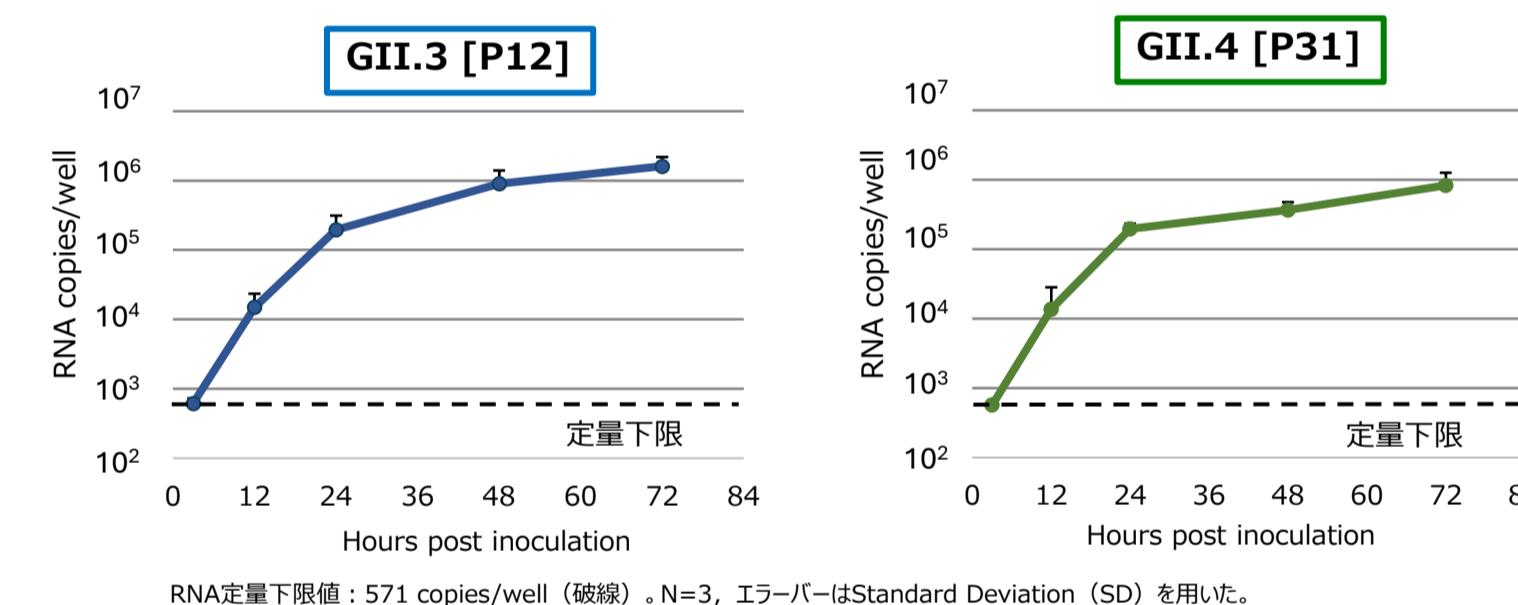
◆図2. ワイルス増幅の確認



✓ 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

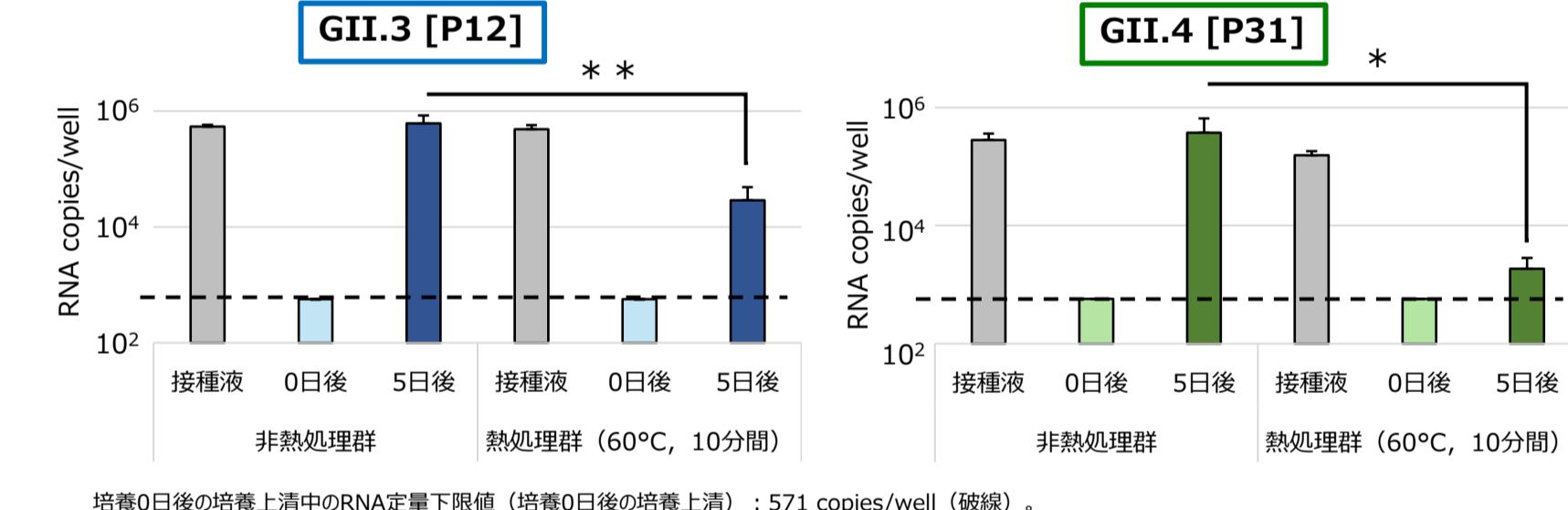
HuNoV陽性便検体溶液をF-hiSIEC™へ接種後、経時的 (3hr, 12hr, 24hr, 48hr, 72hr後) に培養上清を回収し、RNAコピー数を定量した。



✓ 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4. 热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°C, 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日のRNAコピー数を定量した。



✓ 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も関わらず、培養5日後のRNAコピー数が低下していることから、60°C, 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。

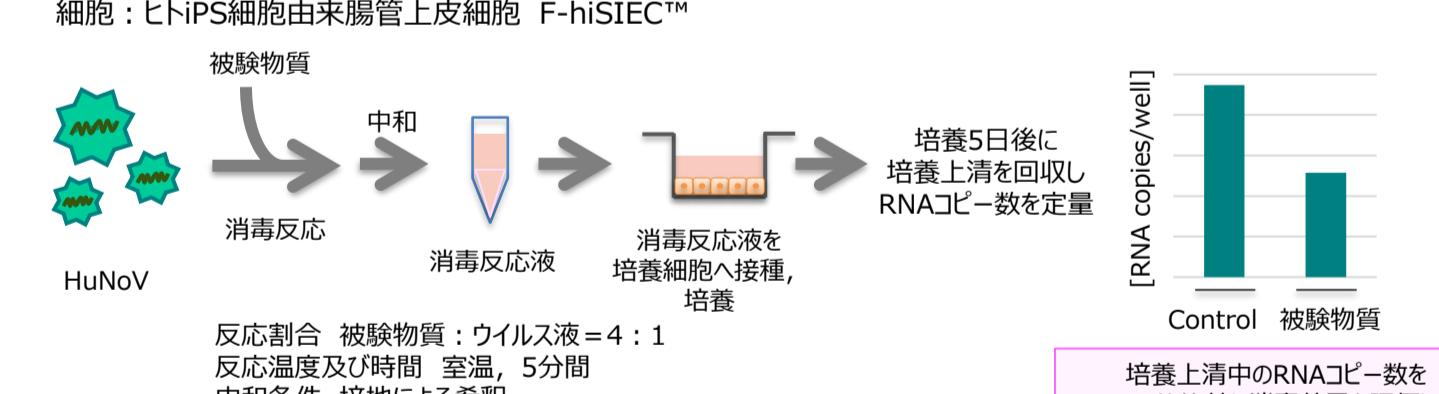
✓ 本培養系においては、感染性を有するウイルス粒子が感染、増幅していることが示唆された。

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™



◆図6. FCVに対する消毒効果の評価方法

試験ウイルス: ネコカリウイルス (FCV F-9)

細胞: ネコ腎由来株細胞 (CRFK)

◆図7. HuNoV及びFCVに対する消毒効果の評価結果

◆図5. HuNoVに対する消毒効果の評価方法

◆図6. FCVに対する消毒効果の評価方法

◆図7. HuNoV及びFCVに対する消毒効果の評