演題番号

P2-114

*In vitro*ヒトノロウイルス（HuNoV）培養系を用いた消毒効果の評価方法と代替ウイルスを用いた従来法との比較

○鈴木 仁[1)], 嶋根 和毅[1)], 大西 由美[1)], 水永 真吾[1)],
岡本 孝史[2)], 片岡 悠輝[2)], 辻谷 久美子[2)]

1） 富士フイルム富山化学（株）富山研究開発センター バイオ解析研究部
2） 丸石製薬（株）研究本部

FUJIFILM 富士フイルム富山化学株式会社

丸石製薬株式会社

背景・目的

ヒトノロウイルス（HuNoV）は感染力が強く，環境中でも長時間生存するため，感染防止対策として消毒剤による環境清掃が重要である。近年まで，HuNoVの*in vitro*培養系は確立しておらず，消毒剤の評価は類縁のネコカリシウイルス（FCV），マウスノロウイルス（MNV）を代替とする方法が主流であった。
本研究では，ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞（F-hiSIEC™）及びHuNoV陽性ヒト便検体を用いて，「*in vitro* HuNoV培養系」を検討した。さらにこの培養系を用いて，ノンエンベロープウイルスへの有効性が報告されている被験物質（消毒剤及び成分）のHuNoVに対する消毒効果を検討し，「FCV，MNVを用いた消毒剤の評価」と比較することで，*in vitro* HuNoV培養系での評価の有用性を考察した。

まとめ

✓ FCVは塩基性条件，MNVは75%エタノール作用により感染性が低下した。（塩基性条件と75%エタノール作用はHuNoVに対しては有効ではなかった。）

✓ 本検討に用いた被験物質は，FCV, MNV両方に有効である場合，HuNoVに有効であった。

✓ FCV, MNV両方に有効であるウエルセプト®は，HuNoVに有効であった。

✓ HuNoV培養系の検討から，ウイルス増殖曲線及び熱処理による不活化が確認され，本培養系でのウイルス複製が示唆された。

〔結語〕 FCV，MNVに対する評価系に加え，F-hiSIEC™の*in vitro* HuNoV培養評価系を用いることで実環境でのHuNoVへの消毒効果予測の精度が高まることが期待される。

◆表1．評価結果一覧

被験物質はFCV及びMNVに対する有効性が報告されている成分及び既販品から選定した。コントロールとして大塚蒸留水を設定した。

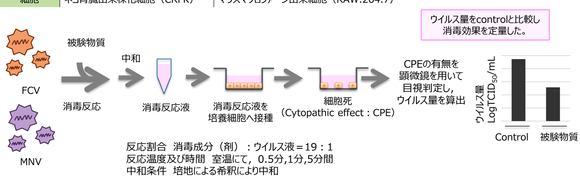
HuNoVの評価はRNAコピー数が定量下限未満の場合「○」，定量下限以上の場合「×」
FCV,MNVの評価はウイルス力価（logTCID$_{50}$/mL）が大塚蒸留水に対してΔ3log以上低下の場合「○」，Δ3logより低下していない場合「×」
FCV,MNVの評価は消毒反応時間が5分の評価結果を記載した。　注釈 a)：細胞毒性による検出下限未満であったため，判定不能

No.	被験物質名	pH	溶媒	FCV	MNV	HuNoV GII.3 [P12]	HuNoV GII.4 [P31]
1	75%エタノール水溶液	7	エタノール	×	○	×	×
2	0.1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液	-	大塚蒸留水	○	○	○	○
3	10%ポビドン-よう素水溶液	-	大塚蒸留水	○	○	○	○
4	0.1%塩化ベンザルコニウム水溶液	7	大塚蒸留水	×	×	×	×
5	重炭酸緩衝液	11	大塚蒸留水	○	×	×	×
6	0.1%塩化ベンザルコニウム添加重炭酸緩衝液	11	大塚蒸留水	○	-a)	×	×
7	1%クエン酸水溶液	1	大塚蒸留水	×	×	×	×
8	1%クエン酸添加75%エタノール水溶液	1	エタノール	○	○	○	○
9	1%クエン酸及び0.1%亜鉛添加水溶液	1	大塚蒸留水	×	×	×	×
10	ウエルセプト®	–	–	○	○	○	○

消毒評価方法

◆図1．FCV, MNVに対する消毒剤の評価方法

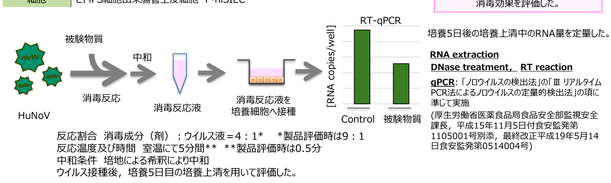
試験ウイルス	ネコカリシウイルス（FCV）	マウスノロウイルス（MNV S99）
細胞	ネコ腎臓由来株化細胞（CRFK）	マウスマクロファージ由来細胞（RAW.264.7）



反応割合　消毒成分（剤）：ウイルス液＝19：1
反応温度及び時間　室温にて，0.5分,1分,5分間
中和条件　培地による希釈により中和

◆図2．HuNoVに対する消毒剤の評価方法

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™

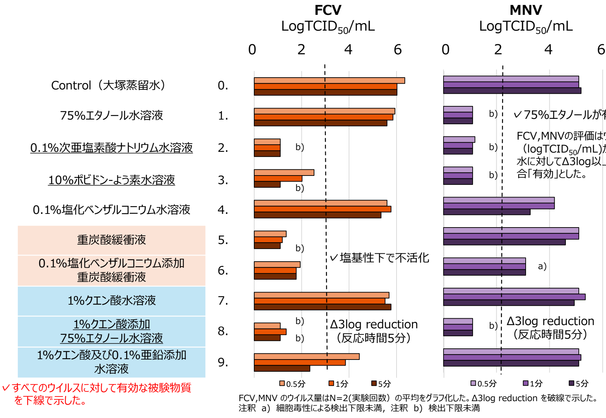


培養5日後の培養上清中のRNA量を定量した。

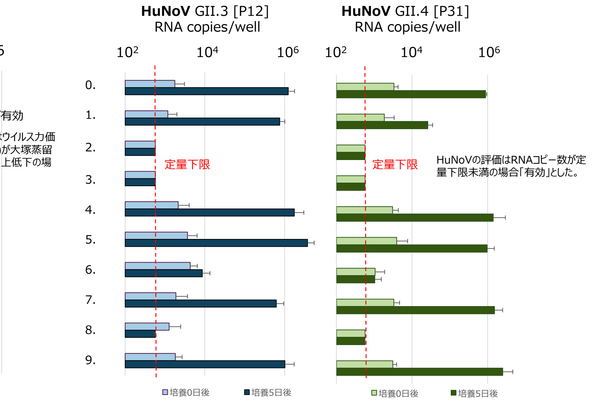
RNA extraction
DNase treatment，RT reaction
qPCR：「ノロウイルスの検出法」の「Ⅲ リアルタイムPCR法によるノロウイルスの定量的検出法」の項に準じて実施
（厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長，平成15年11月5日付食安監発第1105001号別添，最終改正平成19年5月14日食安監発第0514004号）

反応割合　消毒成分（剤）：ウイルス液＝4：1*　*製品評価時は9：1
反応温度及び時間　室温にて5分間**　**製品評価時は0.5分
中和条件　培地による希釈により中和
ウイルス接種後，培養5日目の培養上清を用いて評価した。

各種消毒成分の評価結果



FCV,MNV のウイルス量はN=2(実験回数）の平均をグラフ化した。Δ3log reduction を破線で示した。
注釈 a）細胞毒性による検出下限未満，注釈 b）検出下限未満

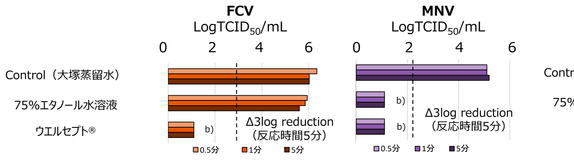


培養0日後，培養5日後の培養上清中のRNA定量下限値は571 copies/well（破線）。N=3，エラーバーはStandard Deviation（SD）を用いた。

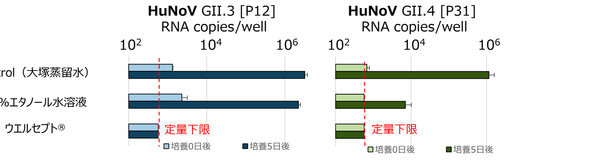
FCVに対してはすべてのウイルスで効果のあった被験物質に加え，重炭酸緩衝液，0.1%塩化ベンザルコニウム添加重炭酸緩衝液が有効であった。MNVに対してはすべてのウイルスで効果のあった被験物質に加え，75%エタノール水溶液が有効であった。
✓ FCVは塩基性条件，MNVは75%エタノール作用で感染性が低下する。

HuNoVに対してはすべてのウイルスで効果のあった，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%エタノール水溶液が有効であった。
✓ FCV, MNV両方に有効である場合，HuNoVに有効である可能性が高い。

製品評価結果



FCV,MNV のウイルス量はN=2(実験回数）の平均をグラフ化した。
注釈 b）検出下限未満

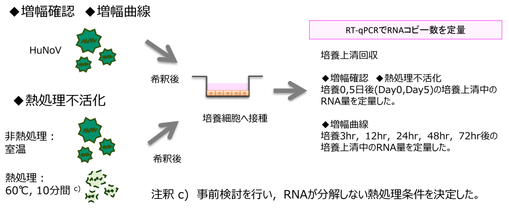


培養0日後，培養5日後の培養上清中のRNA定量下限値は571 copies/well（破線）。N=3，エラーバーはStandard Deviation（SD）を用いた。

✓ FCV, MNV両方に有効であるウエルセプト®は，HuNoVに有効であった。

HuNoV培養系の検討

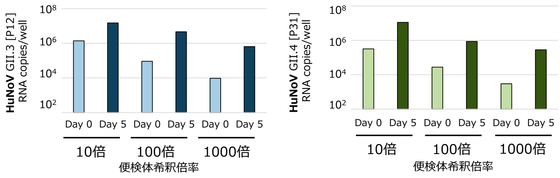
◆図3．増幅曲線及び熱処理による不活化の検討概要



注釈 c）事前検討を行い，RNAが分解しない熱処理条件を決定した。

◆図4．増幅確認

F-hiSIEC™へ10倍，100倍，1000倍に希釈したHuNoV陽性便検体を接種し，培養0日後及び5日後の培養上清中のRNAを定量した。



便検体100倍希釈の感染液は2.3×10^{7} copies/well　　便検体100倍希釈の感染液は8.4×10^{6} copies/well

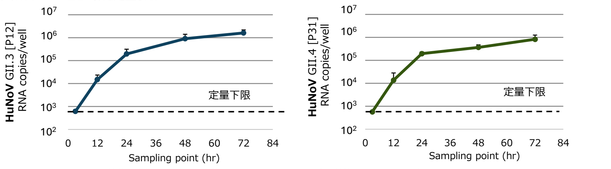
両遺伝子型ともにN=2（well）の平均をグラフ化した。

各希釈倍率において，培養0日後から培養5日後にかけてHuNoV RNAコピー数が増加していることを確認した。

✓本培養系でのHuNoVの複製が示唆された。

◆図5．増幅曲線

ヒトノロウイルス陽性便検体をF-hiSIEC™へ感染後，経時的（3hr，12hr，24hr，48hr，72hr後）に培養上清を回収し，ウイルスのRNAコピー数を定量した。



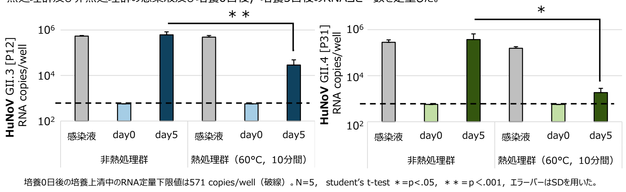
培養上清中のRNA定量下限値は571 copies/wellである（黒破線）。N=3，エラーバーはSDを用いた。

両遺伝子型にて3hrから24hrまでに急激にRNAコピー数が増加していることを確認した。

✓経時的なウイルスRNAコピー数の増加を確認し，ウイルスの生活環を示す増幅と考えられた。

◆図6．熱処理による不活化

熱処理群及び非熱処理群の感染液及び培養0日後，培養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定量下限値は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。

両遺伝子型にて非熱処理群に対して熱処理群の培養5日後のRNAコピー数の有意な低下を確認した（student's t-test p<.05）。

✓熱処理によるRNAコピー数の低下はウイルスの感染性低下に起因すると考えられた。

非熱処理群に対して熱処理群の感染液中のウイルスのRNAコピー数が10分の1も減少していないにも関わらず，培養5日後のRNAコピー数において非熱処理群に対して熱処理群が有意な低下を示すことから，RNA分解に至らない熱処理条件でも，ウイルスの表面タンパク質の変性などで感染性が損なわれ，不活性化が起きていることが示唆された。

✓RNA分解の起こらない熱処理条件でも，ウイルスの不活性化が起こることを確認した。

富士フイルム富山化学では、ヒトノロウイルス（HuNoV）に対する消毒効果を評価するサービスを実施いたします。 サービス詳細はこちら⇒