

平成 21 年度

ノロウイルスの不活化条件に関する調査

報告書

国立医薬品食品衛生研究所

食品衛生管理部

山本 茂貴

野田 衛

I 背景

近年、ノロウイルスによる食中毒・感染症が増加し、国民の健康に大きな被害をもたらしている。過去数年間の食中毒統計によると、ノロウイルスによる食中毒は、事例数ではカンピロバクターに次いで第二位、患者数では第一位を占めていたが、2006 年末の未曾有の大流行により、2006 年は患者数、事例数とも第一位となり、事例数で全食中毒事例の半数近く、患者数では 3/4 近くを占めた。このノロウイルスの大流行を受け、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会において、平成 19 年 10 月 12 日に「ノロウイルス食中毒対策について(提言)」が取りまとめられるなど、ノロウイルス対策は食中毒、感染症の両面から厚生労働行政上重要な課題のひとつとなっている。

ノロウイルスによる食中毒・感染症の未然予防および発生後の拡大防止のためには、汚染環境等に存在するノロウイルスを加熱あるいは消毒・殺菌剤等により不活化(死滅)させることが極めて重要である。厚生労働省はノロウイルスを不活化させる方法として、85℃・1 分以上の加熱および次亜塩素酸ナトリウムによる処理が有効であるとして、その適用を推奨している。しかしながら、すべての汚染物に加熱あるいは次亜塩素酸ナトリウムによる消毒が適用できるわけではなく、特に、次亜塩素酸ナトリウムは、金属に対する腐食作用、皮膚等に対する刺激作用、衣類に対する漂白作用等があるため、その使用が制限される場合が多く、次亜塩素酸ナトリウムに替わる有効な消毒剤等の開発が強く求められている。また、実際の現場において、ノロウイルスは有機物とともに存在する場合が多いため、試験管内の不活化効果は実際の現場での有効性とは必ずしも一致せず、現場に即した環境(有機物存在下)での有効性評価も必要とされている。さらに、近年、ノロウイルスに有効とされる消毒剤等が開発、販売されているが、それらについての有効性評価はあまり行われていない。一方、ノロウイルスに有効な消毒剤等に関するデータについて多くの文献的報告があり、消毒剤等の有効性に関する情報整理も必要とされている。

II 目的

以上の背景を踏まえて、ノロウイルスの不活化に関し実験的に各種消毒剤等の有効性を検証すること、およびこれまで得られている科学的データを取りまとめ、ノロウイルスの不活化条件等について情報を整理することを目的として、本調査を行った。

今年度は、下記の事項について実施した。

1. ノロウイルスの代替ウイルスであるネコカリシウイルスを用いての市販消毒剤等を中心とした、有機物存在下での不活化効果の有効性の効果判定試験
2. ノロウイルス等の不活化等に関する文献情報の収集および取りまとめ

III 各種消毒剤等のネコカリシウイルスに対する不活化効果試験

1. 方法

(1) 供試ウイルス

ネコカリシウイルス(FCV) F9 株を CRFK 細胞に接種し、37℃、1 時間吸着、PBS(-)で 3 回洗浄後、血清不含イーグル MEM 培地で、37℃、CO₂ フラン器内で静置培養した。全ての細胞に細胞変性効果(CPE)が生じた時点(培養後約 2 日目)で、培養液および細胞を回収し、凍結融解を 3 回繰り返した後、3,000rpm、30 分、遠心分離した上清を試験用ウイルス原液とした。試験用ウイルス原液は少量

に小分けし、使用時まで-80℃で保存した。

試験時に、試験用ウイルス原液を、PBS(-)、0.2%牛血清アルブミン(Sigma A7979-50ML)加 PBS(-)、あるいは 20%牛血清アルブミン加 PBS(-)を等量加え、有機物を含まないウイルス液(FCV-PBS(-))、有機物(牛血清アルブミン)を 0.1%(FCV-0.1%牛血清アルブミン)あるいは 10%(FCV-10%牛血清アルブミン)含むウイルス液の 3 種類のウイルス液を調製し、それぞれ不活化試験に供した。なお、供試ウイルス液は不活化試験時に等量の消毒剤等と混合されるため、不活化試験時に FCV-0.1%牛血清アルブミンは 0.05%、FCV-10%牛血清アルブミンは 5%の牛血清アルブミンを含むことになる。

(2) 供試消毒剤等

不活化試験に供した消毒剤等およびそれらの調整方法の概要を表 1 に示した。

(3) 不活化試験

3 種類のウイルス液各 25 μ l と各消毒剤等 25 μ l を混和し、室温で 3 分間静置した。その後、0.1N チオ硫酸ナトリウム 5 μ l を加え混合した後、速やかに反応液 20 μ l を 2%牛胎児血清加イーグル MEM 培地 900 μ l で希釈混和した。不活化試験は消毒剤等ごとに 3 回繰り返した。

5%牛血清存在下でも不活化作用が認められるなど、消毒剤として有用と思われる試験液については作用時間を 15 秒、30 秒、1 分、2 分、3 分、5 分、10 分とする不活化効果の経時的変化や、試験液に含まれる成分のうちどの成分が不活化に効果を示しているかなど、詳細に分析した。また、消毒薬の pH が強酸性あるいは強アルカリ性を示すものについては、塩酸あるいは水酸化ナトリウムを用いて試験液を中和した後、速やかに反応液 20 μ l を 2%牛胎児血清加イーグル MEM 培地 900 μ l で希釈混和した。

(4) 不活化試験後の生存ウイルスの定量

血清不含イーグル MEM 培地で希釈した反応液を、さらに血清不含 MEM 培地で 10 倍階段希釈し、各希釈液 25 μ l を 96 穴マイクロプレートに培養した CRFK 細胞に接種し(各希釈液につき 4 穴を使用)、2%牛胎児血清加イーグル MEM 培地で 37℃、CO₂ 加フラン器内で培養した。接種後 7 日～8 日目に CPE の有無を観察し、50%以上の細胞に CPE が認められた場合、CPE 陽性(不活化されていない)とした。生存ウイルス量は不活化試験に供したウイルス液 25 μ l 中の生存ウイルス量(TCID₅₀)で示した。定量試験の結果、生存ウイルスがまったく確認できない場合、32TCID₅₀/25 μ l 以下の生存ウイルス量となる。

表 1 供試消毒剤およびその調製法

消毒剤等	試験液の調整法	備考
ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム 10,000ppm 2,000ppm 1,000ppm 400ppm 200ppm	ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム(粉末)を MilliQ 水に溶解して調製。	試験時の濃度: 5,000ppm 1,000ppm 500ppm 200ppm 100ppm
90%エタノール + 0.4%SDS + 0.6%水酸化ナトリウム	MilliQ 水、99.5%エタノール、10%SDS、10%水酸化ナトリウムを用いて、調製。	試験時の濃度: 45%エタノール+0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム 25%エタノール+0.1%SDS+0.15%水酸化ナトリウム
60% 1-プロパノール + 0.4%SDS + 0.6%水酸化ナトリウム	MilliQ 水、99.5% 1-プロパノール、10%SDS、10%水酸化ナトリウムを用いて、調製。	試験時の濃度: 30% 1-プロパノール+0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム 15% 1-プロパノール+0.1%SDS+0.15%水酸化ナトリウム
40% 1-プロパノール + 0.4%SDS + 0.6%水酸化ナトリウム	MilliQ 水、99.5% 1-プロパノール、10%SDS、10%水酸化ナトリウムを用いて、調製。	試験時の濃度: 20%1-プロパノール+0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム 10%1-プロパノール+0.1%SDS+0.15%水酸化ナトリウム
市販品 Y	購入品を直接使用	[用途]除菌・消臭 [主成分] 二酸化塩素液、界面活性剤、シリコン系消泡剤
市販品 Z	購入品を直接使用	[用途]除菌・消臭・除カビ [主成分]二酸化塩素液・界面活性剤・シリコン系消泡剤
市販品 AA	購入品を直接使用	[用途]明記なし [主成分]二酸化塩素液
市販品 AB	購入品を直接使用	[用途]除菌・消臭 [主成分]安定化二酸化塩素、精製水
市販品 AC	購入品を直接使用	[用途]殺菌・消臭・防カビ [主成分]安定化二酸化塩素 320cc、活性化剤 30cc
市販品 AD	購入品を直接使用	[用途]除菌・除ウイルス・消臭 [主成分]二酸化塩素系
市販品 AE	購入品を直接使用	[用途]除菌・消臭 [主成分]水、次亜塩素酸ナトリウム、希塩酸
市販品 AF	購入品を直接使用	[用途] 除菌・抗菌・消臭・防カビ [主成分] 穀物抽出液(大豆アミノ酸)、アミノ酸、アルコール 2.7%、界面活性剤、EDTA-2Na
市販品 AG	購入品を直接使用	[用途]除菌・消臭 [主成分] アンチウム・デジオキサイド、純水
市販品 AH	購入品を直接使用	[用途] 除菌・除カビ・除ウイルス・消臭 [主成分]明記なし
市販品 AI	購入品を直接使用	[用途]除菌・消臭 [主成分] 次亜塩素酸ナトリウム、希塩酸、水
市販品 AJ	購入品を直接使用	[用途]除菌・消臭 [主成分]次亜塩素酸、次亜塩素酸イオン、水
市販品 AK	購入品を直接使用	[用途]医療従事者の手指消毒 [主成分] 100ml 中 ベンザルコニウム塩化物 0.2g、および添加物としてプロピレングリコール、ミリスチン酸イソプロピル、エタノール、その他 4 成分含有
市販品 AL	購入品を直接使用	[用途]手指・皮膚の洗浄・消毒 [主成分]ベンザルコニウム塩化物 0.05w/v%、および添加物としてエタノール、ポリオキシエチレンラノリン、その他 2 成分含有
市販品 AM	購入品を直接使用	[用途]インフルエンザ・ノロウイルス対策、食中毒予防 [主成分]エタノール 57.22%、グリセリン脂肪酸エステル 0.4%、クエン酸 0.3%、クエン酸ナトリウム 0.2%、乳酸 0.375%、乳酸ナトリウム

		ム 0.07%、グレープフルーツ種子抽出物 0.1%、精製水 41.335%
市販品 AN	購入品を直接使用	[用途]抗菌・食品保存・防カビ・(高純度の緑茶カテキン配合により長時間細菌の増殖を抑制する) [主成分]発酵アルコール 70.13w/w%、緑茶抽出物 0.01w/w%、乳酸ナトリウム 0.01w/w%、グリセリン脂肪酸エステル 0.01w/w%、シヨ糖脂肪酸エステル 0.01w/w%、精製水 29.83w/w%
市販品 AO	購入品を直接使用	[用途]除菌・消臭 [主成分]安定化二酸化塩素、精製水
市販品 AP	購入品を直接使用	[用途]除菌 [主成分] 次亜塩素酸ナトリウム(低臭素酸タイプ)、pH 調整剤
市販品 AQ	購入品を直接使用	[用途]除菌 [主成分]エタノール 55.0w/w%、リン酸 2.13w/w%、リン酸三ナトリウム 0.47w/w%、グリセリン脂肪酸エステル 0.25w/w%、水 42.15w/w%
市販品 AR	購入品を直接使用	[用途]除菌・消臭 [主成分]明記なし (アルカリ性)
市販品 AS	購入品を直接使用	[用途]除菌・洗浄・消臭 [主成分] 水・除菌消臭液(pH:5.5~6.5)
市販品 AT	購入品を直接使用	[用途]除菌 [主成分]次亜塩素酸ナトリウム(低臭素酸タイプ)、pH 調整剤
市販品 AU	購入品を直接使用	[用途]手指・皮膚の洗浄・消毒 [主成分]有効成分:グルコン酸クロルヘキシジン液(グルコン酸クロルヘキシジンとして 0.1%)/その他の成分:ハアセチルしょ糖変性アルコール、ユーカリ油、中鎖脂肪酸トリグリセリド
市販品 AV	購入品を直接使用	[用途]除菌・消臭 [主成分]次亜塩素酸ナトリウム、水、酸性溶液、(残留塩素濃度:50ppm)
市販品 AW	購入品を直接使用	[用途]除菌・消臭 [主成分]アンチウム・デジオキサイド(4NaClO ₂)、純水
市販品 AX	購入品を直接使用	[用途]除菌・消臭・除ウイルス [主成分]次亜塩素酸ナトリウム、希塩酸(共に厚生労働省認定食品添加物)
市販品 AY	購入品を直接使用	[用途]殺菌・除菌・静菌 (エタノールと pH コントロールの W 効果で食中毒菌を抑制) [主成分]エタノール 48.23%、グリセリン脂肪酸エステル 0.4%、クエン酸 0.3%、クエン酸ナトリウム 0.2%、乳酸ナトリウム 0.07%、グレープフルーツ種子抽出物 0.1%、精製水 50.325%
市販品 AZ	購入品を直接使用	[用途]手指の消毒 [主成分]有効成分として本剤 100ml 中に、クロルヘキシジングルコン酸塩 0.2g、溶剤としてエタノール、その他添加物としてアジピン酸ジイソブチル、アラントイン、ポリオキシエチレンヤシ油脂肪酸グリセリルを含有
市販品 BA	購入品を直接使用	[用途]食品に接触する手、まな板、食材そのものの除菌 [主成分]乳酸ナトリウム(60%)10.0%、エタノール 9.9%、水酸化カルシウム 0.26%、乳酸 0.01%、純水 79.83%

2. 結果

今年度実施したネコカリシウイルスを用いた不活化試験の結果を図 1 に取りまとめた。

(1) ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム

ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムによる微生物に対する不活化効果の有効性が報告されている(1、2)ことから、検証試験を実施した。最終濃度 5,000ppm、1,000ppm、500ppm、200ppm および 100ppm の各ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムを用いた結果、500ppm 以上の濃度で PBS(-)中で検出限界以下 ($4\log_{10}$ 以上減少)、0.05%牛血清アルブミン存在下で $4\log_{10}$ 程度の減少となった。一方、5%牛血清アルブミン存在下では 5,000ppm 濃度で $3\log_{10}$ 程度を示し、1,000ppm 以下の濃度では不活化効果はほぼ認められなかった。この不活化の程度は 5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムには及ばないまでも、1,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムと同等以上の不活化効果であった。

(2) SDS,NaOH 存在下でのアルコール

Beekes ら(3)は、SDS、水酸化ナトリウム、1-プロパノール(n-プロパノール)を含む配合物の不活化効果をプリオン、ポリオウイルス、A 型肝炎ウイルス、カリシウイルス類(マウスノロウイルスを含む)、細菌(*E. faecium* および *M. avium*)、真菌(*Aspergillus niger* 芽胞)を用いて調べた結果、0.2% SDS と 0.3% NaOH を 20% 1-プロパノールで溶解したものが、多くの微生物の殺菌に有効であると結論している。そこで、それを含む Beekes が用いた下記の 3 種類の配合物について、不活化効果を検証した。

a) 0.2%(w/v) SDS、0.3%(w/v) 水酸化ナトリウム、45%(v/v) エタノール

b) 0.2%(w/v) SDS、0.3%(w/v) 水酸化ナトリウム、30%(v/v) 1-プロパノール

c) 0.2%(w/v) SDS、0.3%(w/v) 水酸化ナトリウム、20%(v/v) 1-プロパノール

その結果、3 つの配合物とも、PBS(-)中、0.05%牛血清アルブミン存在下および 5%牛血清アルブミン存在下の条件で検出限界以下となった。この不活化の程度は 5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムと同等の効果であることから、200ppm 次亜塩素酸ナトリウムおよび 5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムを対照として、0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム+45%エタノールおよび 0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム+30% n-プロパノールの 2 つの配合物について 5%牛血清アルブミン存在下での不活化効果を経時的に調べた(図 3)。その結果、作用時間 15 秒から 1 分の間では次亜塩素酸ナトリウムの不活化効果が高く短時間では 5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムに及ばないものの、1 分以上では 5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムでは生存するウイルスが観察される場合があったのに対して、2 つの配合物とも完全に不活化された。

また、試験液の濃度を 1/2 に減らした場合、不活化効果は多少減少したが、0.2%SDS、0.3%水酸化ナトリウム、30% 1-プロパノールでは 5%牛血清アルブミン存在下でもほぼ完全に不活化された。

なお、a)の 0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム+45%エタノールについては文献では 50%エタノールを使用しているが、試薬調製の簡便化から 10%SDS 溶液および 10%NaOH 溶液を用いて 2 倍量の試験液を作成したためエタノールを 45%で使用した。

(3) 市販消毒剤等

住宅用又は家庭用除菌合成洗剤、スプレータイプ除菌・消臭剤、除菌用ハンドソープ等 29 種類の市販消毒剤等について不活化効果を調べた。本試験ではすべての市販消毒剤等は、等量のウイルス液と混合して試験されているため、市販されている状態(使用濃度)の 1/2 濃度で試験されている。

PBS(-)中の有機物がほぼ存在しない環境でネコカシウイルスに対して、接種ウイルスが完全に不活化されたものは 2 種類、 $4\log_{10}$ 程度の不活化が認められたものは 1 種類、 $3\log_{10}$ 程度の不活化が認められたものは 6 種類、 $2\log_{10}$ 程度の不活化が認められたものは 2 種類であった。PBS(-)中では供試 29 試験液のうち 11 種類(38%)が $2\log_{10}$ 以上の不活化効果が認められた。

0.05%の牛血清アルブミン存在下の有機物が少量存在する環境でネコカシウイルスに対して、接種ウイルスが完全に不活化されたものは 2 種類、 $3\log_{10}$ 程度の不活化が認められたものは 6 種類、 $2\log_{10}$ 程度の不活化が認められたものは 2 種類であった。0.05%の牛血清アルブミン存在下では供試 29 試験液のうち 10 種類(34%)が $2\log_{10}$ 以上の不活化効果が認められた。

5%の牛血清アルブミン存在下の有機物が多く存在する環境でネコカシウイルスに対して、接種ウイルスが完全に不活化されたものはなく、 $3\log_{10}$ 程度の不活化が認められたものは 1 種類、 $1\log_{10}$ 程度の不活化が認められたものは 1 種類であった。

試験液 AQ は 5%牛血清アルブミン存在下で $3\log$ 程度の不活化効果が認められたことから、経時的な不活化効果および成分表に記載されている成分ごとに不活化効果を調べた。経時的な検討(図 4)では、5%牛血清アルブミン存在下では 5 分以内では 1~ $2\log$ 程度の減少であったが 10 分の作用で検出限界以下になった。0.05%牛血清アルブミン存在下では作用時間 15 秒で検出限界以下となった。成分表に基づき自家調整した試験液は市販品 AQ と同等の不活化効果が認められた(図 5)。また、成分ごとの結果から、pH3.0 の酸性条件が主要な不活化効果を示し、それにエタノールが相乗的に作用しているものと思われた。

図1 各種消毒薬等によるネコカリシウイルスに対する不活化作用

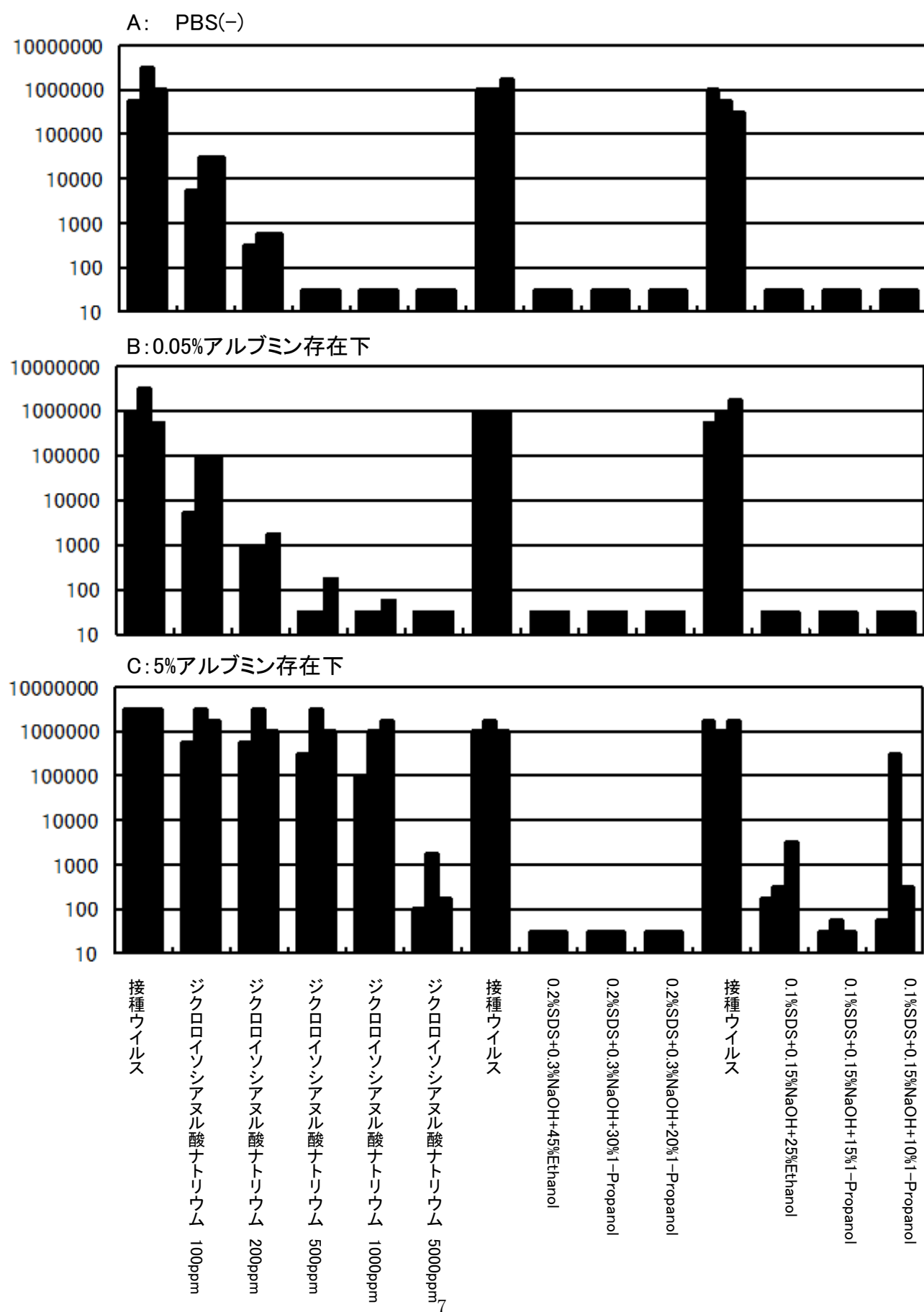
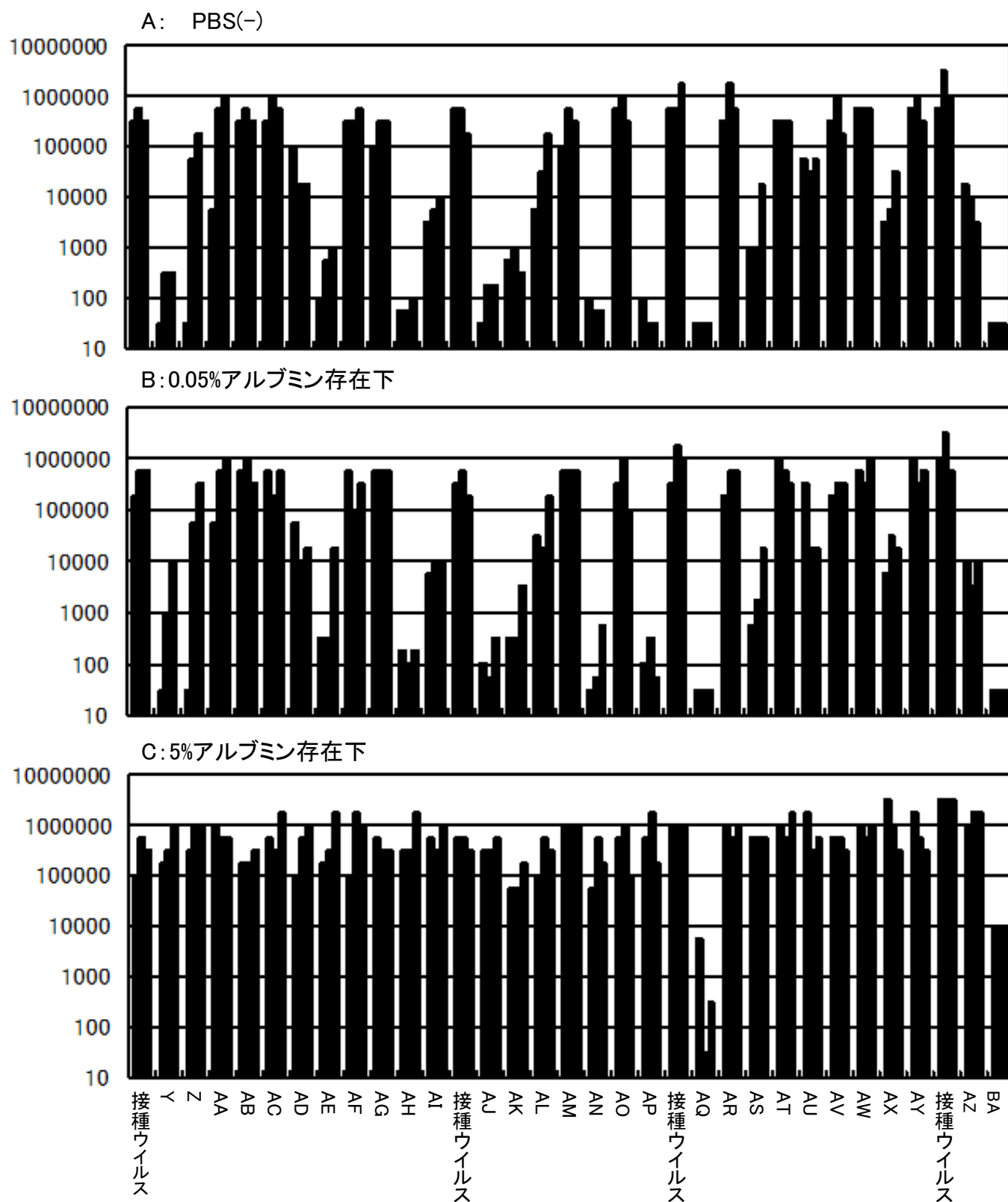


図2 各種市販消毒薬等によるネコカリシウイルスに対する不活化作用



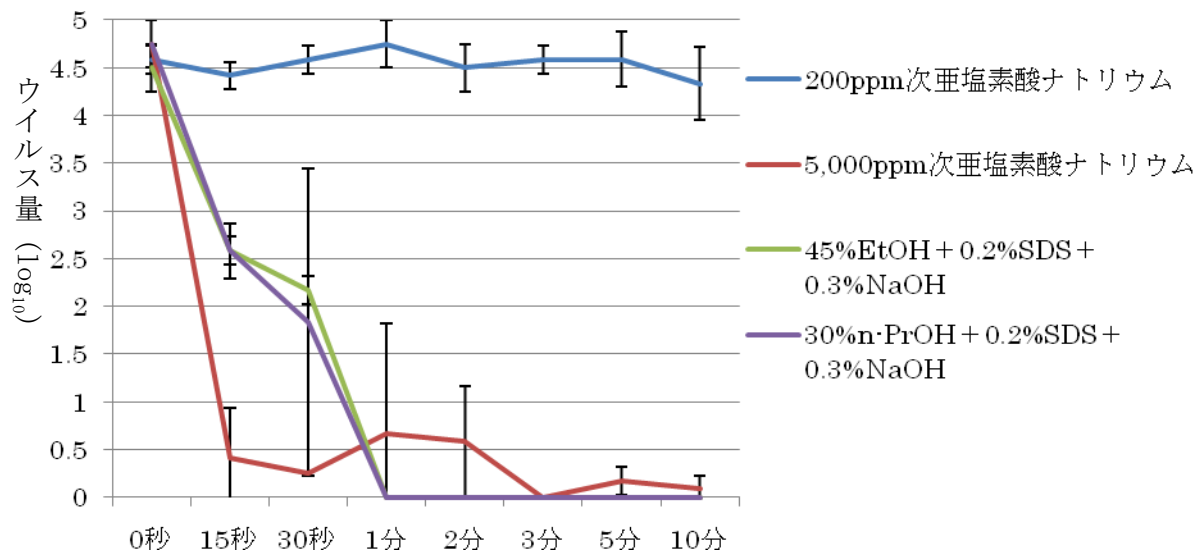


図3 SDS、水酸化ナトリウム、アルコール配合物の経時的不活化効果

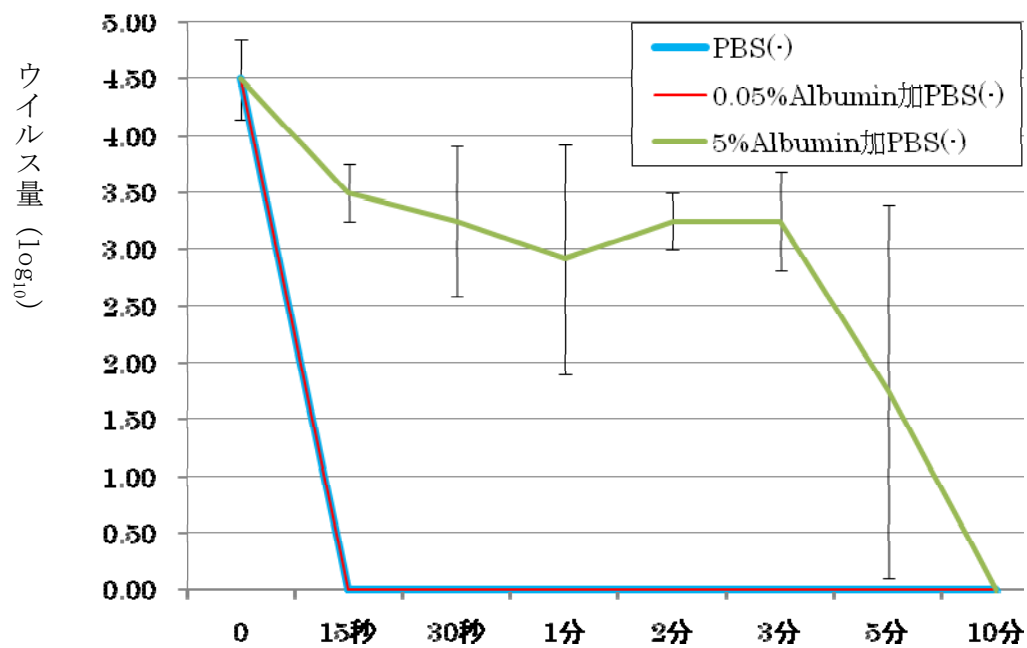
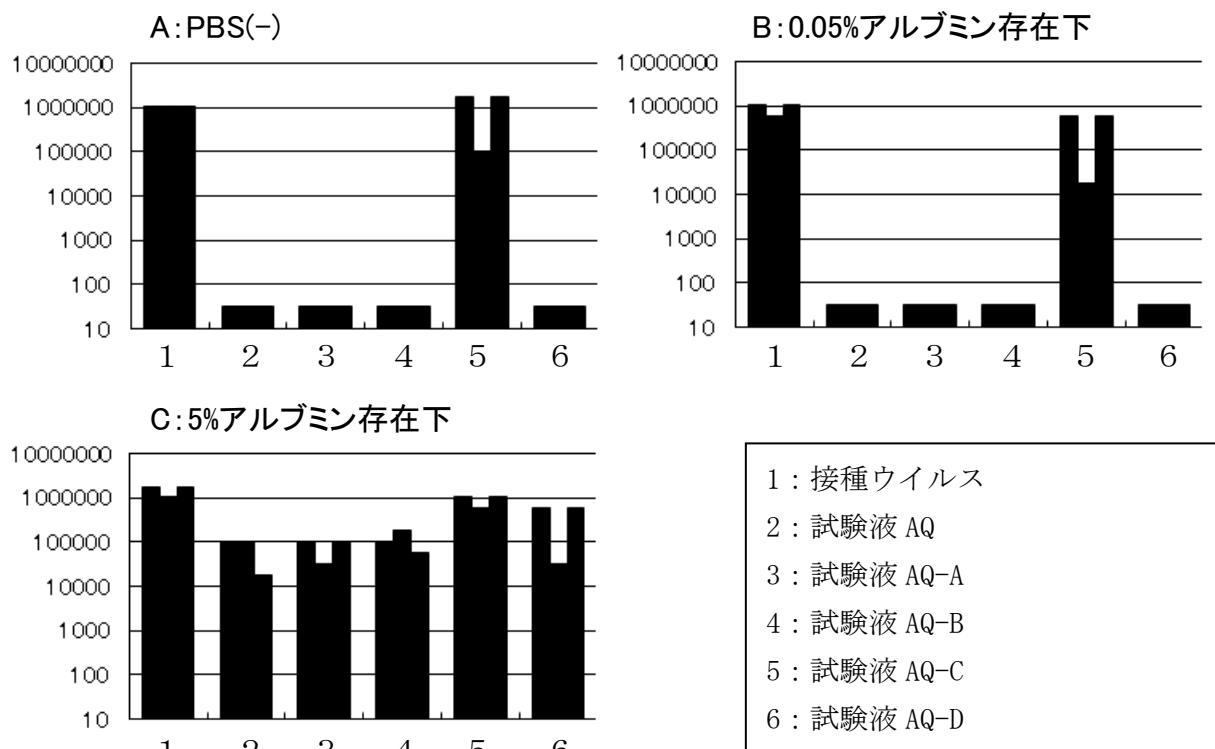


図4 試験液AQの経時的不活化効果



試験液 AQ: 市販品

試験液 AQ-A: 市販品の成分記載表を基に自家調整したもの(含有成分のうち、リン酸は食品添加物用を使用)

試験液 AQ-B: 市販品の成分記載表を基に自家調整したもの(含有成分のうち、リン酸試薬特級を使用)

試験液 AQ-C: 試験液 AQ からリン酸緩衝液成分を除いたもの

試験液 AQ-D: 試験液 AQ からエタノール成分を除いたもの

図5 試験液 AQ に関する検討

3. 考察

昨年に引き続き、嘔吐物、糞便等の有機物が多量に存在する場合のノロウイルスの不活化を想定し、5%牛血清アルブミン存在下での各種消毒剤等の有効性を調べた。今年度実施した試験液で、最も不活化効果が高かったものは、Beekesら(3)が報告した、SDS、NaOH、1-プロパノール(n-プロパノール)を含む配合物であった。5%牛血清アルブミン存在下で経時的な不活化効果を調べた結果5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムと比較して不活化作用に多少時間を必要とするものの1分間以上の作用時間では完全に不活化され5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウム以上の不活化効果が認められた。至適濃度の半分の濃度においても清浄環境では十分な不活化効果が認められ、5%牛血清アルブミン存在下でも0.2%SDS、0.3%水酸化ナトリウム、30% n-プロパノールではほぼ完全に不活化することができた。これらの結果から、SDS、NaOH、1-プロパノール(n-プロパノール)を含む配合物は有用な

殺菌剤となることが確かめられた。

それら以外で、5%牛血清アルブミン存在下での不活化効果が認められたものは、5000ppm のジクロロイソシアヌル酸ナトリウムおよび市販の除菌消臭剤である試験液 AQ の 2 種類でおよそ $3\log_{10}$ 程度減少した。この不活化の程度は 5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムには及ばないまでも、1,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムと同等以上の不活化効果であった。

ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムは米国疾病管理センターの医療施設における消毒法のガイドラインに関するホームページ⁽¹⁾において、偽膜性大腸炎の原因菌である *Clostridium difficile* は偽膜性大腸炎の原因菌の殺菌剤として紹介され、ウイルスではアヒル B 型肝炎ウイルス(B 型肝炎ウイルスの代替ウイルス)において不活化効果が報告されている⁽²⁾。ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムの殺菌作用の本体は次亜塩素酸ナトリウムと同様に塩素であり、プールでの消毒等に使用されている。

市販の除菌消臭剤である試験液 AQ は、その成分にエタノールを含有するものであった。エタノール単独のものより、不活化効果が認められたことから、エタノールと製品に含まれるエタノール以外の成分との相乗効果により不活化効果が高くなっていると考えられた。そこで同製品に含まれるどの成分が不活化に効果があるかを検討した結果、pH が酸性であることが不活化に重要であると考えられた。ただし、試験に供したネコカリシウイルスは呼吸器ウイルスであり酸性条件で不活化されやすい。一方ヒトノロウイルスは消化器系ウイルスで pH3 程度の酸性条件に耐性であることから、本結果がヒトノロウイルスに当てはまるかは不明である。

0.05%牛血清アルブミン存在下では、5000ppm ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム、市販品 AQ および BA でネコカリシウイルスが完全に不活化され、その他、5 種類の市販品で $3\log_{10}$ 程度の不活化効果が観察された。この不活化効果は 100ppm 次亜塩素酸ナトリウムとほぼ同等の効果であり、有機物の少ない環境でのノロウイルスの不活化に次亜塩素酸ナトリウムの代替え消毒剤として利用することができる可能性があると考えられた。

その他の市販消毒剤等ではネコカリシウイルスに対して明瞭な不活化効果は観察されなかった。なお、本試験では使用に指示されている 1/2 濃度で試験されていることからこれらの市販消毒剤が必ずしも不活化効果をまったく持たないことを示すものではない。

過去 3 年間で調査した試験液の結果を表 2 に、また、その中で清浄環境(0.05%牛血清アルブミン存在下)で $3\log_{10}$ 以上の不活化効果または汚染環境(5%牛血清アルブミン存在下)で $2\log_{10}$ 以上の不活化効果の認められた試験液を表 3 に取りまとめた。

汚染環境で $4\log_{10}$ 以上の不活化効果が認められた試験液は 5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウム、0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム+45%エタノール、0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム+30%1-プロパノールおよび 0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム+20%1-プロパノールのみであった。 $2\log_{10}$ ～ $3\log_{10}$ 程度の不活化効果の認められた試験液は 1.25%炭酸ナトリウム、2.5%過炭酸ナトリウム、5000ppm ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム、30%1-プロパノール、70%エタノール、エタノールを含有し酸性条件を持つ除菌剤である市販品 AQ、ヨード系消毒剤の市販品 F であった。

それらのことから、嘔吐物や糞便等の高濃度のノロウイルス汚染の除去に際しては、汚染物を可能な限り物理的に取り除いた上で、5,000ppm 以上の濃度の次亜塩素酸ナトリウムの使用あるいは上記 SDS、水酸化ナトリウム、アルコールの配合物が推奨される。有機物が少ない施設環境の清浄・除

菌や手指の消毒等を目的とする場合はそれら以外にも有効性が確認される消毒剤が存在するので、使用目的に応じて使い分けられると考えられる。

表 2 各種消毒剤等のネコカリシウイルスに対する不活化効果

試験試薬	有機物の存在											
	対照(PBS(-))				0.05%アルブミン				5%アルブミン			
	平均	±	SD	減少	平均	±	SD	減少	平均	±	SD	減少
5000ppm 次亜塩素酸 Na	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4
1000ppm 次亜塩素酸 Na	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	2.75	±	0.00	1
200ppm 次亜塩素酸 Na	0.00	±	0.00	≥4	0.08	±	0.14	4	3.92	±	0.14	0
100ppm 次亜塩素酸 Na	0.75	±	0.75	3	0.42	±	0.52	3	4.00	±	0.25	0
最終濃度 70%エタノール	0.75	±	0.25	3	0.75	±	0.90	3	2.00	±	0.25	2
最終濃度 60%1-プロパノール	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	2.42	±	0.14	1
最終濃度 35%エタノール	2.92	±	0.76	1	2.83	±	0.63	1	3.83	±	0.14	0
最終濃度 30%1-プロパノール	0.00	±	0.00	≥4	0.08	±	0.14	4	2.00	±	0.25	2
市販エタノール (最終濃度 38.5%~40.7%)	0.42	±	0.52	3	0.83	±	0.29	3	4.17	±	0.29	0
最終濃度 1.25% 炭酸ナトリウム	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	0.33	±	0.38	3
最終濃度 0.25% 炭酸ナトリウム	0.25	±	0.25	4	0.33	±	0.29	4	3.92	±	0.14	0
最終濃度 2.5% 過炭酸ナトリウム	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	0.25	±	0.25	3
最終濃度 0.5% 過炭酸ナトリウム	0.50	±	0.66	3	0.42	±	0.38	3	4.08	±	0.38	0
5000ppm ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	1.00	±	0.66	3
1000ppm ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	0.00	±	0.00	≥4	0.08	±	0.14	4	4.25	±	0.66	0
500ppm ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	0.00	±	0.00	≥4	0.25	±	0.43	4	4.50	±	0.50	0
200ppm ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	1.17	±	0.14	3	1.58	±	0.14	2	4.58	±	0.38	0
100ppm ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	2.75	±	0.43	1	3.08	±	0.72	1	4.67	±	0.38	0
45%エタノール+0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4
30% 1-プロパノール+0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4
20% 1-プロパノール+0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4
市販品 A(次亜塩素酸 Na/消毒)	0.17	±	0.14	4	0.17	±	0.29	4	3.75	±	0.50	0
市販品 B(次亜塩素酸 Na/漂白剤)	0.17	±	0.29	4	0.00	±	0.00	≥4	2.83	±	0.76	1
市販品 C(安定化次亜塩素酸/消臭除菌)	1.67	±	1.15	2	1.50	±	1.32	2	3.92	±	0.38	0
市販品 D(エタノール/清浄)	1.25	±	0.90	3	1.83	±	0.95	2	3.58	±	0.52	0
市販品 E(エタノール/洗浄・食品添加物)	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	4.08	±	0.29	0
市販品 F(ポピオンヨード/殺菌消毒)	2.00	±	0.14	≥2	2.00	±	0.00	≥2	2.00	±	0.00	≥2

市販品 G	4.08 ± 0.14	0	4.08 ± 0.38	0	4.08 ± 0.52	0
市販品 H	3.83 ± 0.52	0	4.00 ± 0.50	0	4.58 ± 0.29	0
市販品 I	4.08 ± 0.38	0	4.50 ± 0.25	0	4.42 ± 0.14	0
市販品 J	4.50 ± 0.50	0	4.42 ± 0.14	0	4.67 ± 0.38	0
市販品 K(二酸化塩素/除菌消臭)	0.00 ± 0.00	≥4	0.08 ± 0.14	4	4.50 ± 0.00	0
市販品 L(二酸化塩素/除菌防かび消臭)	0.00 ± 0.00	≥4	0.00 ± 0.00	≥4	4.17 ± 0.14	0
市販品 M	2.67 ± 0.63	1	2.92 ± 0.14	1	4.33 ± 0.14	0
市販品 N	4.08 ± 0.38	0	4.25 ± 0.25	0	4.33 ± 0.38	0
市販品 O	3.50 ± 0.00	0	3.75 ± 0.25	0	4.25 ± 0.25	0
市販品 P	4.58 ± 0.14	0	4.42 ± 0.14	0	4.75 ± 0.43	0
市販品 Q	4.33 ± 0.14	0	4.50 ± 0.25	0	4.08 ± 0.29	0
市販品 R	4.42 ± 0.38	0	4.08 ± 0.38	0	4.58 ± 0.14	0
市販品 S	4.42 ± 0.14	0	4.42 ± 0.29	0	4.33 ± 0.14	0
市販品 T	4.08 ± 0.29	0	3.92 ± 0.29	0	4.08 ± 0.14	0
市販品 U	4.08 ± 0.63	0	4.08 ± 0.14	0	4.00 ± 0.25	0
市販品 V	4.08 ± 0.38	0	4.17 ± 0.14	0	4.33 ± 0.29	0
市販品 W	4.17 ± 0.14	0	4.00 ± 0.25	0	4.00 ± 0.25	0
市販品 Y(二酸化塩素/除菌消臭)	0.67 ± 0.58	3	1.33 ± 1.26	3	4.08 ± 0.38	0
市販品 Z	2.33 ± 2.04	1	2.42 ± 2.13	1	4.33 ± 0.29	0
市販品 AA	3.67 ± 1.23	0	4.00 ± 0.66	0	4.33 ± 0.14	0
市販品 AB	4.08 ± 0.14	0	4.25 ± 0.25	0	3.83 ± 0.14	0
市販品 AC	4.25 ± 0.25	0	4.08 ± 0.29	0	4.33 ± 0.38	0
市販品 AD	3.00 ± 0.43	1	2.83 ± 0.38	1	4.08 ± 0.52	0
市販品 AF(穀物抽出液/除菌抗菌等)	1.08 ± 0.52	3	1.58 ± 1.01	2	4.17 ± 0.52	0
市販品 AF	4.08 ± 0.14	0	3.92 ± 0.38	0	4.25 ± 0.66	0
市販品 AG	3.83 ± 0.29	0	4.25 ± 0.00	0	4.08 ± 0.14	0
市販品 AH(記載なし/除菌除カビ)	0.33 ± 0.14	3	0.67 ± 0.14	3	4.25 ± 0.43	0
市販品 AI(次亜塩素酸ナトリウム/除菌・消臭)	2.25 ± 0.25	2	2.42 ± 0.14	1	4.25 ± 0.25	0
市販品 AJ(次亜塩素酸/除菌臭)	0.50 ± 0.43	3	0.58 ± 0.38	3	4.08 ± 0.14	0
市販品 AK(ベンザルコニウム塩化物/手指消毒)	1.25 ± 0.25	3	1.33 ± 0.58	3	3.42 ± 0.29	0
市販品 AL	3.00 ± 0.75	1	3.17 ± 0.52	1	3.92 ± 0.38	0
市販品 AM	3.92 ± 0.38	0	4.25 ± 0.00	0	4.50 ± 0.00	0
市販品 AN(発酵アルコール/抗菌)	0.33 ± 0.14	3	0.50 ± 0.66	3	3.75 ± 0.50	0
市販品 AO	4.25 ± 0.25	0	4.00 ± 0.50	0	4.08 ± 0.52	0
市販品 AP(次亜塩素酸ナトリウム/除菌)[用途]	0.17 ± 0.29	4	0.58 ± 0.38	3	4.25 ± 0.50	0
市販品 AQ(エタノール/除菌)	0.00 ± 0.00	≥4	0.00 ± 0.00	≥4	1.08 ± 1.13	3
市販品 AR	4.33 ± 0.38	0	4.08 ± 0.29	0	4.42 ± 0.14	0

市販品 AS(除菌消臭液/除菌・洗浄・消臭)	1.92 ± 0.72	2	1.92 ± 0.76	2	4.25 ± 0.00	0
市販品 AT	4.00 ± 0.00	0	4.25 ± 0.25	0	4.50 ± 0.25	0
市販品 AU	3.17 ± 0.14	1	3.17 ± 0.72	1	4.33 ± 0.38	0
市販品 AV	4.08 ± 0.38	0	3.92 ± 0.14	0	4.17 ± 0.14	0
市販品 AW	4.25 ± 0.00	0	4.25 ± 0.25	0	4.42 ± 0.14	0
市販品 AX	2.42 ± 0.52	1	2.67 ± 0.38	1	4.50 ± 0.50	0
市販品 AY	4.25 ± 0.25	0	4.25 ± 0.25	0	4.33 ± 0.38	0
市販品 AZ	2.42 ± 0.38	1	2.33 ± 0.29	1	4.67 ± 0.14	0
市販品 BA(乳酸ナトリウム/除菌)	0.00 ± 0.00	≥4	0.00 ± 0.00	≥4	2.50 ± 0.00	1

()主成分/主用途

結果はlog₁₀で示した。

表 3 不活化効果の認められた試験液の一覧表

試験液*1	主要不活化効果*2	主要用途*3	減少(log ₁₀)	
			0.05%アルブミン	5%アルブミン
5%牛血清存在下で特に有効(4log ₁₀ 以上)な効果が認められる消毒剤等				
5000ppm 次亜塩素酸ナトリウム	塩素		≥4	≥4
45%エタノール+0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム	SDS、NaOH、アルコールの相乗作用		≥4	≥4
30% 1-プロパノール+0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム			≥4	≥4
20% 1-プロパノール+0.2%SDS+0.3%水酸化ナトリウム			≥4	≥4
5%牛血清存在下で中程度(2～3log ₁₀)の効果が認められる消毒剤等				
1.25% 炭酸ナトリウム	炭酸ナトリウム		≥4	3
2.5% 過炭酸ナトリウム	過炭酸ナトリウム		≥4	3
5000ppm ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム		≥4	3
市販品 AQ	エタノール+酸性	食器・調理器具・ドアノブ等の除菌	≥4	3
市販品 F	ヨード	手指の消毒	≥2	≥2
30%1-プロパノール	プロパノール		4	2
70%エタノール	エタノール		3	2
清浄環境(0.05%牛血清アルブミン存在下)で特に有効(4log ₁₀ 以上)な効果が認められる消毒剤等				
1000ppm 次亜塩素酸ナトリウム	塩素		≥4	1
60%1-プロパノール	プロパノール		≥4	1
市販品 B	塩素	漂白剤	≥4	1
市販品 BA	エタノール+アルカリ性	まな板・手・機械器具・食材の除菌	≥4	1
市販品 E	エタノール	調理器具、厨房、施設、食品の衛生管理	≥4	0
市販品 L	二酸化塩素	冷蔵庫等調理環境の除菌	≥4	0
清浄環境(0.05%牛血清アルブミン存在下)で有効(4log ₁₀ 程度)な効果が認められる消毒剤等				
200ppm 次亜塩素酸ナトリウム	塩素		4	0
0.25% 過炭酸ナトリウム	過炭酸ナトリウム		4	0
1000ppm ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム		4	0
500ppm ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム		4	0

市販品 A	塩素	器具・環境・設備等の殺菌消毒剤	4	0
市販品 K	二酸化塩素	環境・設備等の除菌消臭剤	4	0
清浄環境(0.05%牛血清アルブミン存在下)で効果(3log ₁₀ 程度)が認められる消毒剤等				
100ppm 次亜塩素酸ナトリウム	塩素		3	0
市販エタノール(38.5%~40.7%)	エタノール		3	0
0.5% 過炭酸ナトリウム	過炭酸ナトリウム		3	0
市販品 Y	塩素	環境・設備・食器等の除菌消臭剤	3	0
市販品 AJ	塩素	除菌消臭剤	3	0
市販品 AP	塩素	調理器具・施設等の除菌剤	3	0
市販品 AK	塩化ベンザルコリウム	手指の消毒	3	0
市販品 AN	アルコール	調理器具・手指・食品等の除菌防カビ剤	3	0
市販品 AH	不明	食材・調理器具・手指等の除菌消臭剤	3	0

*1:試験液の%や ppm は試験時の最終濃度を示す

*2: 商品に記載されている成分表示による推定のものを含む

*3: 商品に記載されているものを要約

V ノロウイルス等の不活化等に関する文献情報の収集および取りまとめ

1. 調査方法

インターネット等を通じて、ノロウイルスおよび関連ウイルス等に関する不活化、生存性等に関する論文を収集し、その情報を整理した。

2. 調査結果

(1) ノロウイルスの不活化条件等に関する研究の現状の概要

今年度は、前年度の取りまとめ以降に発表された論文を中心に情報を収集した。不活化に関しては、単に消毒剤等を試験管内で反応させて効果を判定するのではなく、実際にノロウイルス等の汚染が問題となる食品や環境中における効果判定を行う報告が多くみられた。また、ヒトノロウイルスは依然培養できていないが、マウスノロウイルスが培養可能となったことから代替ウイルスとしてマウスノロウイルスを使用して不活化効果を検討している報告が増加した。

さらに、遺伝子検査がウイルスの生存性や不活化効果の判定に利用可能かを検討している報告も少なからずみられ、今後の研究動向が注目される。

(2) 感染性試験法以外の代替え法を用いたウイルスの不活化評価法

Rudi ら(4)は、細胞の生死の判定に利用するエチジウムモノアザイドとリアルタイム PCR 法を組合せた生きた細胞のみを検出する方法を報告した。この方法はエチジウムモノアザイドが死滅した細胞のみで細胞内に侵入し、侵入後 DNA に結合し、光照射処理によりエチジウムモノアザイドと DNA が共有結合し、PCR 法による DNA 増幅が阻害されるのに対して生きた細胞ではエチジウムモノアザイドが細胞内に侵入されないため DNA 増幅が阻害されないことを原理としている。Rudi らは *Campylobacter* を用いて実験を行っているが、Soejima ら(5)は大腸菌や *Klebsiella oxitica* を用いて同様のことを報告している。同手法を用いてノロウイルスなどウイルスについての感染性粒子か否かの識別に応用可能か、今後の報告が期待される。

(3) 水環境中における生存性

Katz ら(6)は下水汚泥のアルカリ処理による不活化において雄菌特異的バクテリオファージ 2 (MS2) が、A 型肝炎ウイルス(HM-175/18f 株)あるいはレオウイルス(T1 Lang 株)の指標になるかを調べた。4℃におけるレオウイルス、28℃におけるレオウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの不活化率は、すべての計測時点において MS2 の不活化率とほぼ同じであった。4℃の場合 0.1 時間および 2 時間の処理では MS2 は A 型肝炎ウイルスよりも速く不活化されたが、12 時間および 24 時間の処理ではほぼ同じように不活化された。この結果から MS2 のようなファージが、腸内ウイルスの 28℃におけるアルカリ安定化処理時の残存性をモニタリングする指標となりうると考察している。

Charles ら(7)は、地下水におけるヒトの腸管系ウイルス(アデノウイルス、エンテロウイルス、ノロウイルス)の汚染指標としての大腸菌ファージの有用性を評価するため、感染価およびリアルタイム PCR 法による RNA 定量値を比較した。12℃の地下水において、感染価に基づくウイルスの安定性は、安定性の高い順に大腸菌ファージΦX174>アデノウイルス 2 型>大腸菌ファージ PRD1>ポリオウイルス 3 型>コクサッキーウイルス B1 型であった。PCR による RNA 検出による順序は、GII ノロウイルス

>アデノウイルス>GI ノロウイルス>エンテロウイルスであった。これらの結果から、地下水のヒト腸管系ウイルスの汚染指標としては安定性の高い大腸菌ファージやアデノウイルスが適していると考察している。

(4) 食品における生存性

近年、汚染されたベリーや野菜の喫食による A 型肝炎ウイルスおよびノロウイルスの感染事例が報告されている。Butot ら(8)らは、ベリーおよびハーブの表面に存在する可能性がある腸管系ウイルスの不活性化に関するフリーズドライ、フリーズドライ+加熱、スチームブランチングの有効性を判定するためにモデル実験を行った。A 型肝炎ウイルスおよびネコカリシウイルスの不活性化は、ウイルス培養および定量的逆転写 PCR で評価し、ノロウイルスの生残性は定量的逆転写 PCR のみで評価した。ブラックベリー、ブルーベリー、ラズベリー、イチゴ、バジル、パセリを用いて最適化された条件でフリーズドライ処理を行った結果(表 4)、供試した野菜において A 型肝炎ウイルス RNA の定量値はほとんど減少しなかった($<1.3 \log_{10}$ units)が、HAV の感染性は $1.2 \sim 2.4 \log_{10}$ 程度減少した。ノロウイルスでは全体に、バジルの場合を除いて、GI よりも GII のノロウイルスに対して有意に($P < 0.05$)有効であった。HuNoV GII の場合、最も不活性化の程度が大きかったのはフリーズドライのハーブ(バジル、パセリ)とブルーベリーであり、平均で $2.7 \log_{10}$ unit 減少した。

リアルタイム RT-PCR 検出結果に基づく、ノロウイルスと比較して A 型肝炎ウイルスが定量値の減少が少ない傾向にあった。

表 4. フリーズドライ後の冷凍農産物における HAV および HuNoV の不活性化^a
(文献 8 から引用)

製品	不活性化			
	HAV RNA コピー数	TCID ₅₀	HuNoV GI (PCRU)	HuNoV GII (PCRU)
ブラックベリー	-0.61 +/- 0.19	-1.79 +/- 0.08	-0.71 +/- 0.09	-1.71 +/- 0.26
ブルーベリー	-0.98 +/- 0.16	-2.42 +/- 0.25	-1.29 +/- 0.14	-2.67 +/- 0.18
ラズベリー	0.29 +/- 0.11	-1.50 +/- 0.35	-0.63 +/- 0.23	-1.21 +/- 0.07
イチゴ	-0.85 +/- 0.35	-1.42 +/- 0.22	-0.84 +/- 0.27	-1.47 +/- 0.03
バジル	-0.35 +/- 0.18	-1.71 +/- 0.18	-2.00 +/- 0.24	-2.06 +/- 0.16
パセリ	-1.24 +/- 0.19	-1.24 +/- 0.14	-2.07 +/- 0.12	-3.52 +/- 0.39

^a 不活性化はリアルタイム RT-PCR (PCRU および RNA コピー数) およびウイルス培養 (TCID₅₀) で決定した。数値は $\log_{10}$ (N_x/N_0) の平均±標準誤差で表した。ここで N_0 はフリーズドライ前のウイルス力価であり、 N_x はフリーズドライ後の力価である。

ブルーベリー、ラズベリー、ブラックベリーおよびイチゴを用いてフリーズドライ処理の後、80℃、100℃、120℃で20分間、オーブンによる仕上げの乾燥の影響を調べた。A型肝炎ウイルスの感染性は、80℃の加熱では $2 \log_{10}$ 未満の減少、100℃ではブルーベリーで検出された他は、検出限界以下となり、120℃では全て検出限界となった。RNA を指標にすると、80℃では A 型肝炎ウイルス、ノロウイルスとも $1 \log_{10}$ 未満の減少、100℃では A 型肝炎ウイルスと GII ノロウイルスは検出されたが、GI ノロウイルスは検出されなかった。120℃では GI ノロウイルスに加えイチゴを除き A 型肝炎ウイルスも検出限界以下となったが、GII ノロウイルスは依然検出された。

バジル、チャイブ、ミントおよびパセリを用いて95℃あるいは75℃で2.5分間のスチームブランチン

グによる効果を調べた。95℃では A 型肝炎ウイルス、ノロウイルスとも対照と比べて有意に ($P < 0.05$) 減少し(表 5)、パセリでの A 型肝炎ウイルス、チャイブでのネコカリシウイルスを除き、A 型肝炎ウイルスおよびネコカリシウイルスの感染価は $3 \log_{10}$ 以上減少した。ノロウイルスの RNA 定量値はハーブの種類により異なり、最も大きく減少したのはミントであり、ウイルス力価は $3 \log_{10}$ unit 以上減少した。75℃の条件では A 型肝炎ウイルスの不活性化の程度はかなり小さくなり(表 6)、チャイブの場合を除いて平均で $2 \log_{10}$ の減少あった。GI ノロウイルスの RNA の減少幅は、ミントを除いて 95℃の場合とほとんど同じであった。

表 5. 95℃で 2.5 分間スチームブランチングしたハーブにおける HAV、FCV、HuNoV の不活性化^a(文献 8 から引用)

製品	不活性化					
	HAV		FCV		HuNoV GI (PCR _U)	HuNoV GII (PCR _U)
	RNA コピー数	TCID ₅₀	PCR _U	TCID ₅₀		
バジル	-3.17 +/- 0.29	>-3.00	-1.75 +/- 0.06	>-4.00	-0.51 +/- 0.11	-1.61 +/- 0.22
チャイブ	>-4.00	>-3.00	-3.58 +/- 0.25	>-2.94	>-3.00	-2.31 +/- 0.46
ミント	>-4.00	>-3.00	-5.27 +/- 0.59	-3.17 +/- 0.04	>-3.00	>-3.00
パセリ	-3.30 +/- 0.23	>-2.41	-1.40 +/- 0.04	>-4.00	-1.57 +/- 0.19	-2.79 +/- 0.19

^a 不活性化はリアルタイム RT-PCR(PCR_U および RNA コピー数)およびウイルス培養(TCID₅₀)で決定した。数値は $\log_{10}(N_x/N_0)$ の平均±標準誤差で表した。ここで N_0 はスチームブランチング前のウイルス力価であり、 N_x はスチームブランチング後の力価である。

表 6. 75℃で 2.5 分間スチームブランチングしたハーブにおける HAV、FCV、HuNoV の不活性化^a(文献 8 から引用)

製品	不活性化					
	HAV		FCV		HuNoV GI (PCR _U)	HuNoV GII (PCR _U)
	RNA コピー数	TCID ₅₀	PCR _U	TCID ₅₀		
バジル	-1.54 +/- 0.33	-1.87 +/- 0.11	-1.63 +/- 0.21	-3.98 +/- 0.04	-0.48 +/- 0.08	-1.46 +/- 0.26
チャイブ	-1.26 +/- 0.13	>-3.00	-2.01 +/- 0.13	>-4.00	>-3.00	-1.35 +/- 0.12
ミント	-1.86 +/- 0.13	-1.71 +/- 0.06	-1.26 +/- 0.15	>-4.00	-0.97 +/- 0.07	-1.58 +/- 0.12
パセリ	-2.10 +/- 0.38	-2.07 +/- 0.15	-3.09 +/- 0.15	-3.65 +/- 0.08	-1.60 +/- 0.19	-1.52 +/- 0.08

^a 不活性化はリアルタイム RT-PCR(PCR_U および RNA コピー数)およびウイルス培養(TCID₅₀)で決定した。数値は $\log_{10}(N_x/N_0)$ の平均±標準誤差で表した。ここで N_0 はスチームブランチング前のウイルス力価であり、 N_x はスチームブランチング後の力価である。

Mormann ら(9)は、各種の食品の表面あるいは内部にノロウイルスを接種し通常の調理のための熱処理、食品の貯蔵・保存のための冷蔵、冷凍、酸性化、および中程度の熱処理によるノロウイルスの不活化効果をRNase処理後の定量PCR法で調べた。食品を調理するために消費者によって普通に行われるような熱処理(ベーキング、クッキング、ロースティング)では、ウイルスRNA定量値の有意な減少が起こったが、一般に、貯蔵および保存のために行われる処理(例:冷蔵、冷凍、酸性化($\geq$ pH 4.5))および中程度の熱処理(パストリゼーション)ではウイルスRNA定量値の減少はほとんど観

察されなかった(表 7)。

表 7. 各種の物理化学的処理によるノロウイルスの不活性化(文献 9 から引用)

処理方法	食品	NV 減少量 [$\log_{10}$] ^a $\pm$ SEM	P 値 ^b
加熱(ベーキング)	冷凍ピザ	$> -4 \pm 0.36$	0.0001
加熱(ベーキング)	ピザバゲット	-3 ± 0.60	0.001
加熱(パストリゼーション)	スパイス入りトマトソース	-0.4 ± 0.51	0.148
加熱(ロースティング)	ひき肉	-1.6 ± 1.31	0.05
加熱(クッキング)	ひき肉	$> -7 \pm 0.29$	0.021
酸性化/冷蔵	トマトケチャップ	-0.5 ± 1.32	0.394
酸性化/冷蔵	ポテトサラダ	-1.7 ± 0.83	0.01
酸性化/冷蔵	ヌードルサラダ	-0.5 ± 1.07	0.412
冷蔵	ひき肉	0.0 ± 0.61	0.740
冷蔵	リンゴ	-0.2 ± 0.76	0.650
冷蔵	アイスバーグ・レタス	0.1 ± 0.15	0.272
冷凍保存(7 日間)	冷凍ピザ	-0.4 ± 0.41	0.100
冷凍保存(14 日間)	冷凍ピザ	-1.1 ± 0.92	0.174
冷凍保存	ひき肉	0.0 ± 3.06	0.856

^a ノロウイルス力価の減少量であり $\log_{10}$ unit で表記; 未処理(処理前)と処理済み(処理後)の食品サンプルで比較

^b 比較サンプル間の有意差の算出は Student の t 検定を用いて行った

Baert ら(10)はみじん切りにした Iceberg lettuce(日本の通常のレタス)に接種したマウスノロウイルスおよび B.fragilis 感染ファージ B40-8 の次亜塩素酸ナトリウム(図 6)および過酢酸(図 7)の不活化効果を調べた。マウスノロウイルスに対して、水道水による洗浄と比較して、さらに $1 \log_{10}$ の減少をもたらすためには 200 ppm の次亜塩素酸ナトリウムあるいは 250ppm の過酢酸が必要であった。B40-8 に対してはどの処理によっても $1 \log_{10}$ の減少は見られなかった。B40-8 ファージはマウスノロウイルスと比較して耐性が強いため、次亜塩素酸ナトリウムまたは過酢酸によるみじん切りレタスの汚染除去の指標として有用としている。

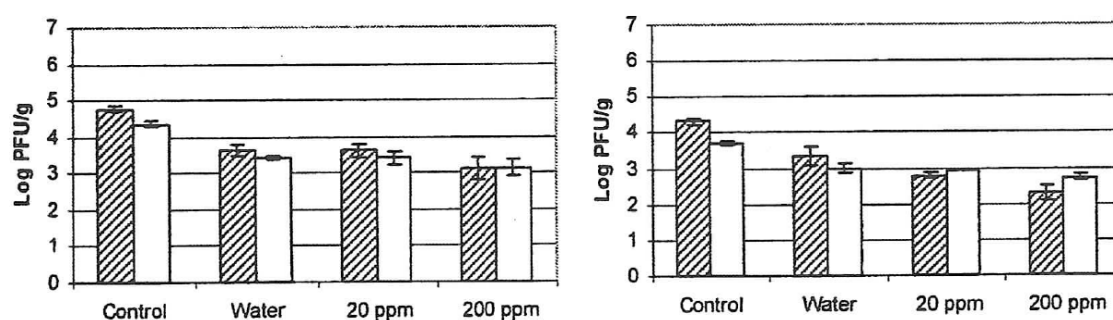


図 6. マウスノロウイルス(斜線のバー)および B40-8(白色のバー)に対する次亜塩素酸ナトリウムの不活化(文献 10 から引用)

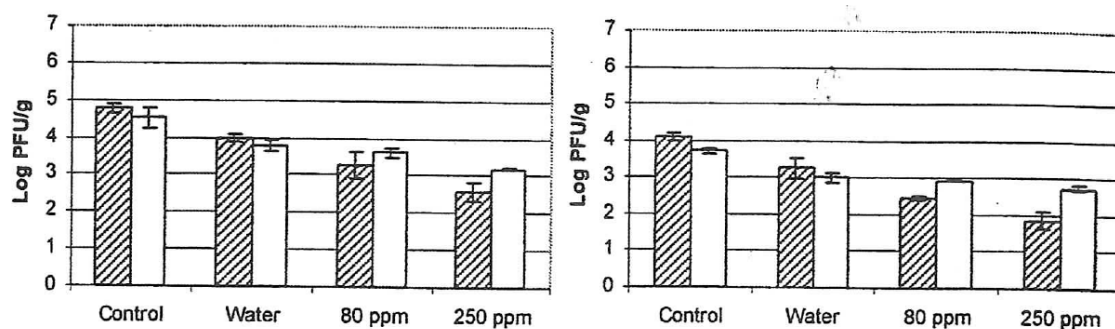


図 7. マウスノロウイルス(斜線のバー)および B40-8(白色のバー)に対する過酢酸の不活化(文献 10 から引用)

Casteel ら(11)は、イチゴ、チェリートマトおよび結球レタスに接種した A 型肝炎ウイルスおよび指標ウイルスである大腸菌ファージ MS2 の塩素による不活化効果を調べた。これらの野菜を約 10ppm～20ppm の塩素で作用すると、A 型肝炎ウイルスおよび大腸菌ファージ MS2 は 90～99% 程度が不活化され、99% 以上の場合もみられた(表 8、9)。イチゴに両ウイルスを接種し約 200 ppm の遊離塩素溶液で作用すると、A 型肝炎ウイルスは 5 分、大腸菌ファージ MS2 は 3 分で $2\log_{10}$ 以上の感染価の減少が見られた(表 10)。MS2 と A 型肝炎ウイルスの不活性動態は近似していたことから、実験室または実際の現場において殺菌の有効性を測定する際の処理指標および代替ウイルスとして使用できる可能性があることを述べている。

表 8. イチゴ、チェリートマト、結球レタスにおける A 型肝炎ウイルスおよび大腸菌ファージ MS2 の 10 ppm 塩素による不活化効果(文献 11 より引用)

時間 (分)	イチゴ ^a			チェリートマト ^a			結球レタス ^a		
	遊離塩素 (ppm)	MS2	HAV	遊離塩素 (ppm)	MS2	HAV	遊離塩素 (ppm)	MS2	HAV
		残留ウイルス量 ($\log_{10}$)			残留ウイルス量 ($\log_{10}$)			残留ウイルス量 ($\log_{10}$)	
0	10.6±1.1	4.3±0.5 ^b	3.6±0.3 ^b	10.9±1.5	1.9±0.6 ^b	2.7±0.3 ^b	10.3±0.2	2.2±0.4 ^b	2.6±0.6 ^b
0.5	5.4±2.7	4.0±0.5	2.9±0.3	10.6±0.4	1.5±0.5	2.1±0.2	10.0±0.3	1.3±0.3	1.8±0.5
1	0 ^c	3.5±0.6	2.2±0.8	10.0±0.8	1.1±0.8	1.4±0.2	10.2±0.3	1.5±0.4	1.3±0.5
3	3.5±0.6	2.9±0.8	1.9±0.4	10.3±0.2	<0.7 ^d	1.6±0.3	10.0±2.5	1.0±0.7	1.2±0.3
5	1.7±0.8	2.8±0.3	2.1±0.3	10.3±0.8	<0.7 ^d	<0.4 ^d	5.8±2.3	<0.7 ^d	<0.4 ^d
10	0 ^c	2.4±0.8	1.4±0.2	10.6±1.9	<0.7 ^d	<0.4 ^d	7.3±2.4	<0.7 ^d	<0.4 ^d

^a イチゴ、チェリートマト、および結球レタス重量の平均(±SD)はそれぞれ 21.93±4.09 g、17.21±2.51 g、1.33±0.40 g であった。

^b 農産物から回収された微生物の初期濃度。

^c 遊離塩素は 3 実験中すべてにおいて検出不可能であった。

^d 分析の検出限界。

表 9. イチゴ、チェリートマト、結球レタスにおける A 型肝炎ウイルスおよび大腸菌ファージ MS2 の 20 ppm 塩素による不活化効果(文献 11 より引用)

ppm 塩素による不活化効果(文献 11 より引用)									
時間 (分)	イチゴ ^a			チェリートマト ^a			結球レタス ^a		
	遊離塩素 (ppm)	MS2	HAV	遊離塩素 (ppm)	MS2	HAV	遊離塩素 (ppm)	MS2	HAV
		残留ウイルス量 (log ₁₀)			残留ウイルス量 (log ₁₀)			残留ウイルス量 (log ₁₀)	
0	20.3±1.0	4.5±0.5 ^b	3.7±0.6 ^b	20.5±0.5	2.3±0.3 ^b	2.8±0.6 ^b	20.8±0.7	2.5±0.5 ^b	2.1±0.7 ^b
0.5	16.9±1.3	4.0±0.7	3.1±0.4	20.0±1.1	2.1±0.4	2.0±0.7	18.4±1.2	2.2±0.6	1.3±0.5
1	18.6±0.7	3.3±0.4	3.0±0.3	20.0±1.3	1.7±0.2	1.4±0.8	19.7±1.2	1.4±0.8	1.1±0.4
3	12.0±0.6	3.5±0.5	2.7±0.5	20.3±0.8	1.0±0.9	<0.4 ^c	17.3±0.7	<0.7 ^c	1.3±0.3
5	5.5±0.6	2.8±0.7	2.5±0.5	19.2±0.3	<0.7 ^c	<0.4 ^c	13.5±2.1	<0.7 ^c	<0.4 ^c
10	10.4±0.4	2.4±1.1	1.4±0.6	19.1±0.3	<0.7 ^c	<0.4 ^c	11.0±1.1	<0.7 ^c	<0.4 ^c

^a イチゴ、チェリートマト、および結球レタス重量の平均(±SD)はそれぞれ 18.95±2.25 g、16.57±3.61 g、1.23±0.32 g であった。

^b 農産物から回収された微生物の初期濃度。

^c 分析の検出限界。

表 10. イチゴ^aを遊離塩素約 200 ppm に曝露後の各時点(分)における HAV および MS2 の残留量(log₁₀)および減少量(log₁₀)の平均(±SD)、(文献 11 より引用)

時間(分)	遊離塩素(ppm)	MS2	HAV
		残留ウイルス量(log ₁₀)	
0	202.2±2.8	4.3±0.3 ^b	4.0±1.2 ^b
0.5	199.5±1.7	2.9±0.5	3.5±1.1
1	198.0±2.6	2.4±1.2	3.4±0.9
3	197.0±4.3	2.0±0.6	2.8±1.4
5	195.0±4.4	1.1±0.3	1.4±0.5

^a イチゴの重量の平均(±SD)は 22.84±4.37 g であった。

^b イチゴから回収されたウイルスの初期濃度。

サンプル数=3

Shieh ら(12)は、低温保存中のホレンソウにおける A 型肝炎ウイルスの生存性を調べた。ホレンソウに A 型肝炎ウイルスを接種し、5℃で 4 週間保存した結果、1log₁₀ 以上減少し、接種量の 6.75%が残存した。D 値(1log₁₀ 低下をもたらす日数)は 28.6 日と計算された。一方、2%血清加 PBS 中の A 型肝炎ウイルスは、同じ保存条件下において、7 週間にわたって一定の状態に残存した(表 11)。

表 11. 冷蔵保存下のホウレンソウおよび PBS における A 型肝炎ウイルスの生存性(文献 12 から引用)

保存時間	ホウレンソウ ^a		2%血清加 PBSV	
	PFU/葉 ^b	生残率(%)	PFU/10 mL ^b	生残率(%)
0 時間	(6.1±1.3)×10 ⁴	— ^c	(3.7±0.2)×10 ⁴	100
1 時間	(3.5±1.5)×10 ⁴	100	—	—
1 日	(9.2±4.5)×10 ³	26	—	—
1 週間	(1.1±0.4)×10 ⁴	31	(7.6±1.9)×10 ³	21
2 週間	(3.0±0.5)×10 ³	9	(8.2±1.2)×10 ³	22
4 週間	(1.7±0.3)×10 ³	5	—	—
6週間	(7.7±1.5)×10 ²	2	(7.9±2.8)×10 ³	21
7 週間	—	—	(1.1±0.2)×10 ⁴	29

^a データは保存試験 2 のもの。サンプリング時期ごとに、6~10 件のサンプルをそれぞれ 6 ウェル培養プレートで分析した。

^b PFU/葉(平均±標準偏差)は6～10件のデータ点を平均して得た。

^c –はデータなしを表す。

Casteel ら(13)は商業ベースにおけるイチゴ表面に付着したウイルスの不活化を目的として、代替ウイルスとして大腸菌ファージ MS2 を接種したイチゴを、次亜塩素酸ナトリウムの添加有りまたは無しで稼動させた水洗浄ユニットによる不活化効果を調べた。イチゴに付着した MS2 は、洗浄水中の遊離塩素濃度が ≤ 2 、20、200 ppm の条件でそれぞれ 68%、92%、96% 不活化された(表 12)。また、遊離塩素濃度が ≤ 2 ppm の洗浄水中で MS2 が検出されたが、20 または 200 ppm の遊離塩素濃度を含む水では検出されなかった(表 13)。

表 12. 商業ベースの水洗装置によるイチゴの塩素による大腸菌ファージ MS2 の不活化効果:イチゴ溶出液中の MS2 定量値(文献 13 から引用、一部改変)

サンプル	イチゴからの回収ウイルス量			
	1 mL あたりの $\log_{10}$ PFU MS2、実験 1 の誘出液	1 mL あたりの $\log_{10}$ PFU MS2、実験 2 の誘出液	平均±SD (1 mL あたり の $\log_{10}$ PFU MS2)	不活化率 (%)
対照 ^{*1}	4.3	4.2	4.3±0.07	–
遊離塩素濃度 ≤ 2 ppm	3.9	3.6	3.8±0.21	68
遊離塩素濃度 20 ppm	3.2	3.2	3.2±0	92
遊離塩素濃度 200 ppm ^{*2}				96

*1: 洗浄機を通していないイチゴ

SD=標準偏差

*2: 文献には 200ppm の結果は表中に記載されていない

表 13. 商業ベースの水洗装置によるイチゴの塩素による大腸菌ファージ MS2 の不活化効果: 洗浄液からの MS2 の検出(文献 13 から引用、一部改変)

水サンプル	イチゴ洗浄水からの回収	
	MS2 の有無(+または–)、実験 1	MS2 の有無(+または–)、実験 2
遊離塩素濃度 ≤ 2 ppm	+	–
遊離塩素濃度 20 ppm	–	–
遊離塩素濃度 200 ppm	–	–

(5) 手指、環境中における不活化

Liu ら(14)は、ノロウイルスを用いて、ノロウイルスを汚染させた手指でのエタノール、液体抗菌石けん、および水洗いによる不活化および除去効果を調べた。不活化の効果は、RNase 処理後の定量 PCR 法(Topping JR, et al.: Temperature inactivation of Feline calicivirus vaccine strain FCV F-9 in comparison with human noroviruses using an RNA exposure assay and reverse transcribed quantitative real-time polymerase chain reaction-A novel method for predicting virus infectivity, J Virol Methods; 156(1-2):89-95, 2009)で評価した。試験管内での実験で濃度 160 ppm 以上の次亜塩素酸ナトリウムは効果的に定量 PCR で定量値の減少が認められたが、エタノールは濃度にかかわらず効果が低く、0.5 $\log_{10}$ 程度の減少にとどまった。ASTM(米国材料試験協会)の標準手指法(fingerpad method)、およびその改良法(手こすりを行う)で、指に付着させたノロウイルスは液体抗菌石けん処理(減少量は 0.67～1.20 $\log_{10}$)および水洗いのみ(減少量は 0.58～1.38 $\log_{10}$)で最も比較的大きく定量値が減少したのに対し、アルコール性手指用消毒剤は比較的低効果で、0.14～0.34 $\log_{10}$ の減少に止まったとし、従来からのアルコール性手指用消毒剤はノロウイルスに対しては

比較的低効果であることを確認した(表 14)。

表 14. 標準的 ASTM 法および改変 ASTM 法による NV に対する手指用衛生用品の *in vivo* 有効性の評価(文献 14 から引用)

曝露対象	N	標準的 ASTM 法 平均 log 減少量(±STD)		N	改変 ASTM 法 平均 log 減少量(±STD)	
		RNase なし	RNase あり		RNase なし	RNase あり
乾燥対照(DC)	20	0.20 (±0.28) ^a	0.16 (±0.06) ^x	20	0.22 (±0.25) ^a	0.20 (±0.24) ^x
手指用消毒剤(HS)	20	0.14 (±0.31) ^a	0.27 (±0.12) ^x	10	0.22 (±0.22) ^a	0.34 (±0.22) ^x
液体石けん(LS)**	20	0.94 (±0.46) ^b	0.67 (±0.47) ^y	10	1.20 (±.64) ^b	1.10 (±0.49) ^y
水洗い(WR)*	20	0.75 (±0.63) ^b	0.58 (±0.37) ^y	20	1.58 (±0.48) ^b	1.38 (±0.49) ^y

Magulski ら(15)は、医療器具等の表面に存在するノロウイルスの不活化のモデルとしてステンレス表面に接種したマウスノロウイルスを用いて、過酢酸、グルタルアルデヒド、種々のエタノール、炭酸カルシウム(300ppm、pH7.0)の不活化効果を調べた。

清浄な条件下で、各種濃度の過酢酸あるいはグルタルアルデヒドの作用の結果、過酢酸では 1000 ppm、1500ppm で、グルタルアルデヒドでは 2500ppm で 4 log₁₀ 以上の感染価の減少が認められた(図 8)。

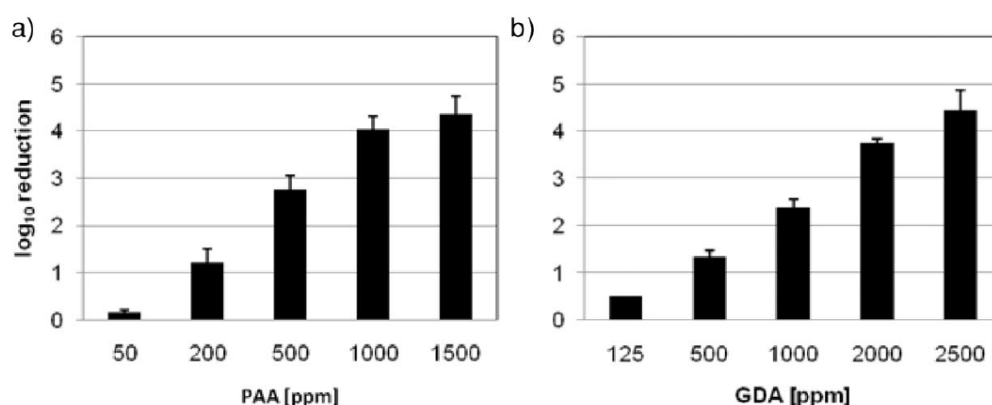


図 8. マウスノロウイルスに対する過酢酸およびグルタルアルデヒドの不活化効果(文献 15 から引用)

エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールについて、清浄条件下(不活化試験時の濃度で 0.03%の牛血清アルブミンを含む)での不活化効果には差が認められた(図 9)。最も有効なアルコールは 1-プロパノールで、30% の 1-プロパノールは 5 分間の作用で 4log₁₀ 程度、40%、50%、60% の 1-プロパノールは 6 log₁₀ 程度の感染価の減少が見られた。エタノールは、50%で 4log₁₀ 程度、55%、60%で 6log₁₀ 程度の減少であった。2-プロパノールは、使用した最高濃度である 60%で 3 log₁₀ 程度の減少に止まった。

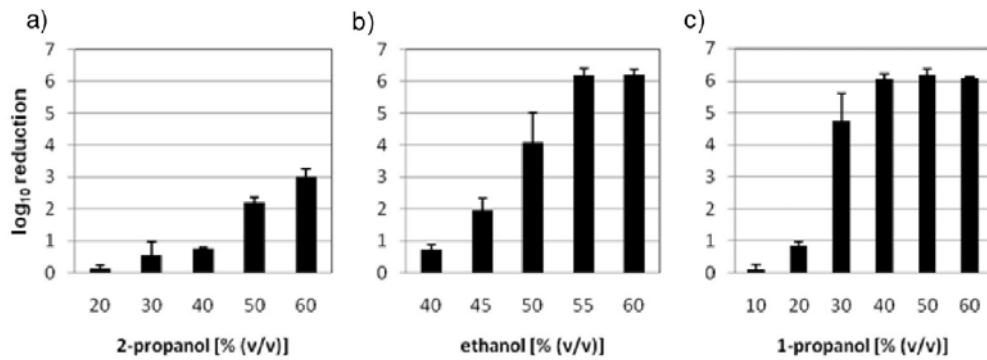


図 9. マウスノロウイルスに対する種々の濃度の 2-プロパノール、エタノール、1-プロパノールの不活化効果 (文献 15 から引用)

有機物汚染の影響を比較するため、清浄条件と不浄条件(不活化試験時で 0.15%の牛血清アルブミンと 0.15%の赤血球を含む)の両方で、3 種類のアルコールの不活性化効果を比較した結果、40%および 60%の 2-プロパノール、エタノール、1-プロパノールの不活化効果はそれぞれほぼ同様であった(図 10)。

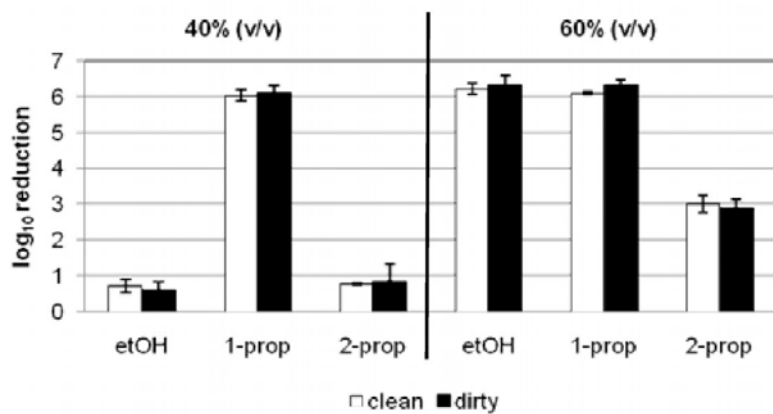


図 10. 清浄条件および不浄条件下での種々のアルコールの不活化効果の比較 (文献 15 から引用)

Beekes ら(3)は、SDS、NaOH、1-プロパノール(n-プロパノール)を含む配合物の不活化効果をプリオン、ポリオウイルス、A 型肝炎ウイルス、カリシウイルス類(マウスノロウイルスを含む)、細菌(*E. faecium* および *M. avium*)、真菌(*Aspergillus niger* 芽胞)を用いて調べた。ウイルスについて効果をみると(表 15)、20 分の作用で単体のエタノールまたはプロパノールはこれらのウイルスに対して有意な不活化効果が見られなかったが、20% n-プロパノールあるいは 50%エタノールを SD および NaOH の混合物として使用したところ、カリシウイルス、A 型肝炎ウイルス(追加の有機負荷物として 10% FCS を添加)、ポリオウイルス(追加の有機負荷物として 10% FCS を添加、または添加なし)に対して 4 log₁₀ 以上の不活化効果が観察された。これらの結果およびプリオンや細菌に対する不活化試験の結果、0.2% SDS と 0.3% NaOH を 20% n-プロパノールで溶解したものが優れていると結論している。

表 15. 各種配合物のウイルスに対する不活化効果(文献 3 から引用、一部改変)

配合物	濃度	時間 (分)	温度 (°C)	ポリオ		A 型肝炎		カリシ ^{*1}
				A ^{*2} ・B ^{*3}	C ^{*4}	A	B	
SDS/NaOH	0.2%／ 0.3%	20	20	>4 ^{*5}	≤4	≤3	ND	>4
エタノール	50%	20	20	<1	<1.5	<1	ND	<2 [†]
エタノール 中	50%中	20	20	>4	>4	≥4	>4	>5
SDS/NaOH	0.2%/0.3%							
n-プロパノール	30%	20	20	<0.5	ND	<1	ND	>4
	20%	20	20	<0.5	<1.5	<1	ND	<1
n-プロパノール	30%中	20	20	>4	ND	≥4	ND	>5
中 SDS/NaOH	0.2%/0.3%							
	20%中	20	20	>4	>4	>3～	>4	>5
	0.2%/0.3%					<4		

*1: ネコカリシウイルスとマウスノロウイルスを含む(抵抗性の強い結果を表示)

*2: ウイルス 1 容に対し試験消毒液 9 容

*3: 凝固血液存在下

*4: 10%ウシ胎児血清存在下

*5: log₁₀ で表示

Terpstra ら(16)は、表面で乾燥したウイルスの生存性と不活化方法を検討した。エンベロープウイルス(ヒト免疫不全ウイルス、ウシウイルス性下痢症ウイルス、仮性狂犬病ウイルス)、およびエンベロープを持たないウイルス(イヌパルボウイルス、A 型肝炎ウイルス)を、培地中あるいは血漿中で 4 時間をかけ乾燥させた結果、A 型肝炎ウイルス、イヌパルボウイルスのエンベロープを持たないウイルスの感染価はほとんど低下しなかった(図 11-A)。その後、28 日間、室温で放置すると、7 日目までは約 1log₁₀ の減少に止まったが、28 日目では 4～5log₁₀ 程度感染価が減少した(図 11-B、C)。

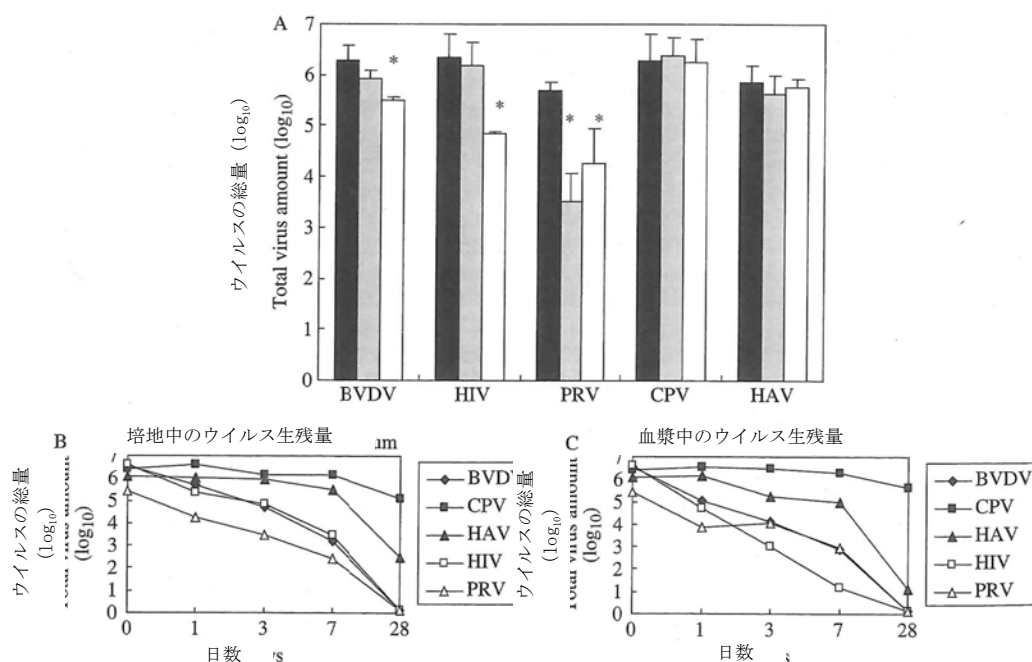


図 11. 培地または血漿中で乾燥させたウイルスの安定性および生残性の動態。培地または血漿中で乾燥さ

せ、その後に培地に再懸濁させた、ウシウイルス性下痢症ウイルス(BVDV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、仮性狂犬病ウイルス(PRV)、イヌパルボウイルス(CPV)、A型肝炎ウイルス(HAV)の回収量($\log_{10}$)を示している。(A)培地(グレー)または血漿(白)中で4時間にわたり表面で乾燥させたウイルスを再懸濁し、感染力を調べた。添加したウイルスの総量は黒のバーで示す。各条件の平均値およびSDを示す(N=2~6)。アスタリスクは、添加したウイルスの総量との比較において、Studentのt検定で有意差があるものを示している。(B、C)培地(B)または血漿(C)中で4時間にわたり表面で乾燥させたウイルスを、1、3、7、28日後に再懸濁して感染力を調べた。各ウイルスは別々の線で示されている。(文献16から引用)

一般的な消毒剤として使用されている80%エタノール(エンベロープウイルスのみ試験されている)、0.1N NaOH、0.1%次亜塩素酸塩の不活化効果を培地および血漿中で調べた結果、A型肝炎ウイルスに注目すると、いずれの条件でも検出限界以下になることはなかった。培地中では0.1%次亜塩素酸塩の不活化効果が高く1分間の作用で、 $5\log_{10}$ 以上の不活化が認められた(図12)。血漿中でも0.1%次亜塩素酸塩の不活化効果が高かったが、1分間の作用ではほとんど効果はなく、10分間の作用で $5\log_{10}$ 程度の不活化が認められた。

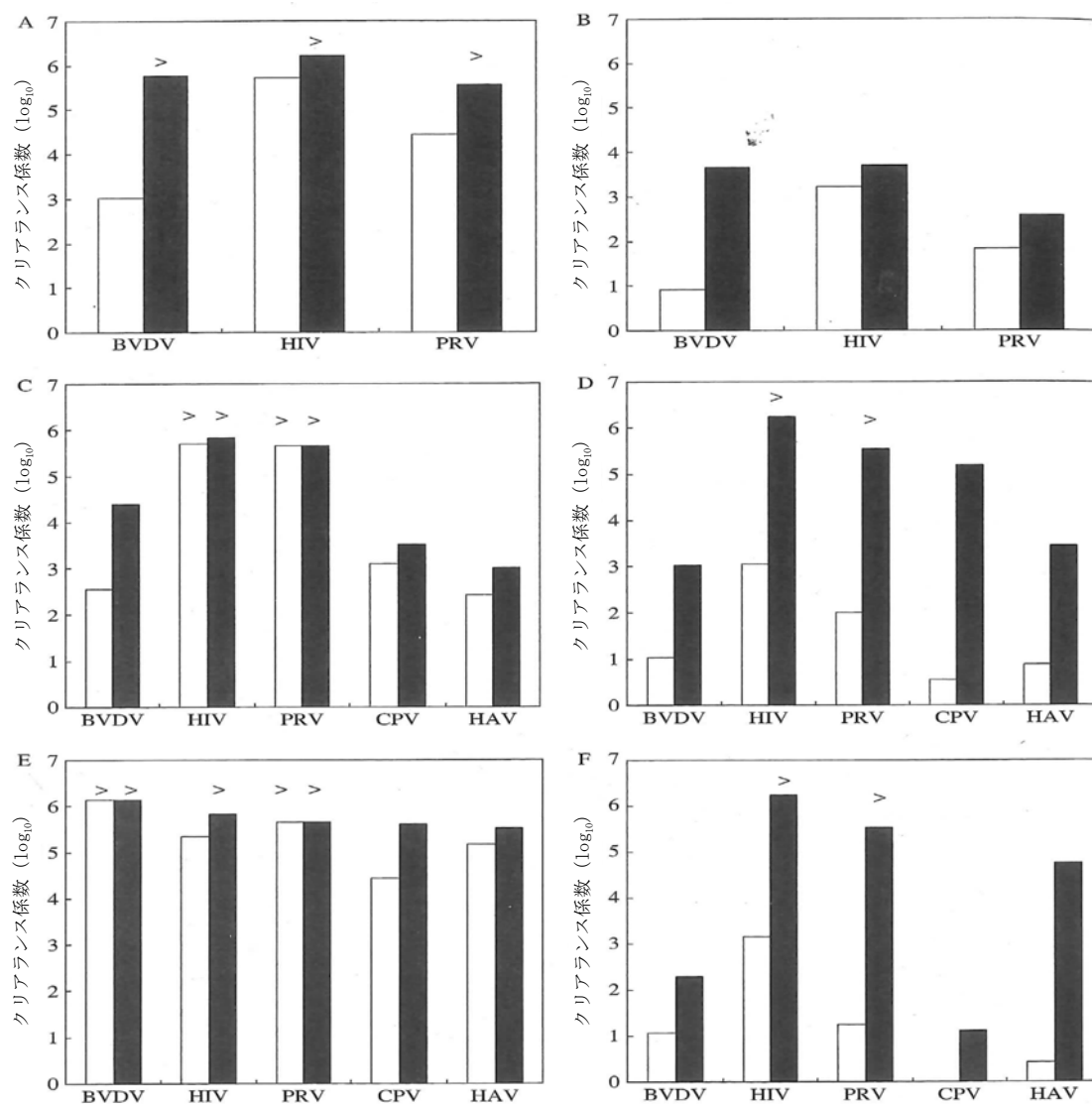


図12 表面乾燥ウイルスの不活化に関する一般的に用いられる消毒剤3種の有効性。ウイルスは培地(A、C、E)または血漿中(B、D、F)で乾燥させてから、80%エタノール(A、B)、0.1 N NaOH(C、D)、0.1%次亜塩素酸

塩(E、F)で1分間または10分間処理し、培地に再懸濁し、感染価を測定した。「>」はウイルス不検出を意味している。図は平均値。□=1分間；■=10分間。

(文献16から引用)

(6) 食物成分

Iwasawa(17)らは、ぶどうの皮や種子に含まれるポリフェノールの一種であるプロアントシアニジンの抗ウイルス活性をネコカリシウイルスおよびコクサッキーウイルスA7型を用いて調べた。10秒間の作用で、 $2\log_{10}$ 以上のウイルス不活性化効果を示すためにはネコカリシウイルスに対して1 mg/ml、コクサッキーウイルスA7型に対して10 mg/ml以上のプロアントシアニジンが必要であった(表16)。

表16. プロアントシアニジンのネコカリシウイルスおよびコクサッキーウイルスA7型に対する不活性化効果

プロアントシアニジンの濃度 (mg/ml)	ネコカリシウイルス	コクサッキーウイルスA7 型
0(蒸留水)	5.09	5.85
0.1	4.92	5.42
0.5	4.09	5.42
1	2.92	5.50
5	1.83	4.75
10	2.25	3.92
30	2.67	3.67

各数値は感染価(TCID₅₀/10 μl)を2回測定した平均値

(文献17から引用)

(7) 加熱・高圧処理・高圧ホモジナイゼーション

Shimazakiら(18)は異なる4種類のA型肝炎ウイルスを用いて加熱および高圧処理による不活性化効果を調べた。細胞順化したKRM238(サブゲノタイプIIIB)、KRM003(IIIB)、KRM031(IA)、TKM005(IB)のHAV株を使用し、60℃で最長10時間の加熱処理した結果、3~5 log₁₀感染価が減少した。KRM238およびTKM005は他の2株よりも不活性化されにくかった。420 MPa(25℃~30℃で1分加圧し、直ちに除圧するサイクルの3回繰り返し)の高静水圧処理では3~5 log₁₀減少し、KRM031が他の株と比較して不活性化されやすかった(表17)。

表17. 加熱および高圧処理によるA型肝炎ウイルスの不活性化(文献(T8)より引用)

株名	感染力の減少(log ₁₀)		
	60℃10時間の加熱	420 MPaの高静水圧	加熱と高静水圧の組み合わせ ^b
KRM238	3.1 (±0.32) ^a	3.0 (±0.25)	6.1
KRM003	4.7 (±0.45)	3.4 (±0.22)	8.1
KRM031	5.1 (±0.61)	4.7 (±0.56)	9.8
TKM005	3.3 (±0.35)	3.2 (±0.52)	6.5

^a かつこ内の数値は95%信頼限界を表す。

^b 加算法で算出された期待値。

Hewittら(19)は、ノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスの加熱による不活化試験の代替ウイルスとしてのマウスノロウイルスの有用性を検討した。感染価およびリアルタイムPCR法によるRNA定量値を指標としたマウスノロウイルスとA型肝炎ウイルスの比較では、水およびミルクにおいて、63℃および72℃での熱感受性はD値(値が $1\log_{10}$ 低下するのに必要な時間)および経時的な感染価の推移において同様な傾向を示した(表18、表19)。

表18. マウスノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスの水中およびミルク中における63℃および72℃での不活化時間(D値)(文献19から引用)

マトリックス	温度	D値(分)	
		MNV	HAV
水	63℃	0.9	0.6
	72℃	≤ 0.3	≤ 0.3
乳	63℃	0.7	1.1
	72℃	0.5	≤ 0.3

表19. マウスノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスの水中およびミルク中における63℃および72℃での感染価およびRNA定量値におけるlog減少量(±SD)の比較(文献19から引用)

時間(分)	63℃		72℃					
	感染力のlog減少量		RT-PCR力価のlog減少量		感染力のlog減少量		RT-PCR力価のlog減少量	
	MNV	HAV	MNV	HAV	MNV	HAV	MNV	HAV
(a)水								
0	0.00±0.04	0.00±0.05	0.00±0.13	0.00±0.25	0.00±0.01	0.00±0.20	0.00±0.21	0.00±0.02
1	1.09±0.04	1.26±0.19	-0.01±0.06	0.39±0.04	≥ 3.5	≥ 3.5	0.21±0.06	0.46±0.02
2	3.43±0.30	2.34±0.22	0.18±0.10	0.49±0.15	≥ 3.5	≥ 3.5	0.44±0.20	0.57±0.03
5	3.13±0.78	≥ 3.5	0.41±0.05	0.45±0.02	≥ 3.5	≥ 3.5	0.88±0.04	0.67±0.01
10	3.28±0.04	≥ 3.5	0.99±0.11	0.50±0.03	≥ 3.5	≥ 3.5	1.02±0.11	1.00±0.09
(b)乳								
0	0.00±0.02	0.00±0.19	0.00±0.03	0.00±0.02	0.00±0.02	0.00±0.42	0.00±0.04	0.00±0.10
1	1.35±0.34	1.60±0.39	0.47±0.15	0.54±0.09	≥ 3.5	2.22±0.06	0.35±0.20	0.47±0.05
2	1.85±0.27	2.72±0.03	0.52±0.12	0.60±0.06	≥ 3.5	≥ 3.5	0.67±0.04	0.50±0.05
5	≥ 3.5	3.35±0.20	0.38±0.07	0.65±0.04	≥ 3.5	≥ 3.5	0.82±0.06	0.57±0.03
10	≥ 3.5	≥ 3.5	1.03±0.07	0.65±0.06	≥ 3.5	≥ 3.5	0.91±0.02	0.72±0.02

一方、ノロウイルスを含め、RNA定量値を指標として、加熱による経時的变化を見ると(図13)、ノロウイルスは、マウスノロウイルスやA型肝炎ウイルスと比較して定量値の低下が少なく、特に63℃の水においてその傾向が顕著であった。これらの結果から、HewittらはヒトノロウイルスはマウスノロウイルスやA型肝炎ウイルスと比較して、熱に対して抵抗性が強く、代替ウイルスを用いての評価は注意する必要があると考察している。

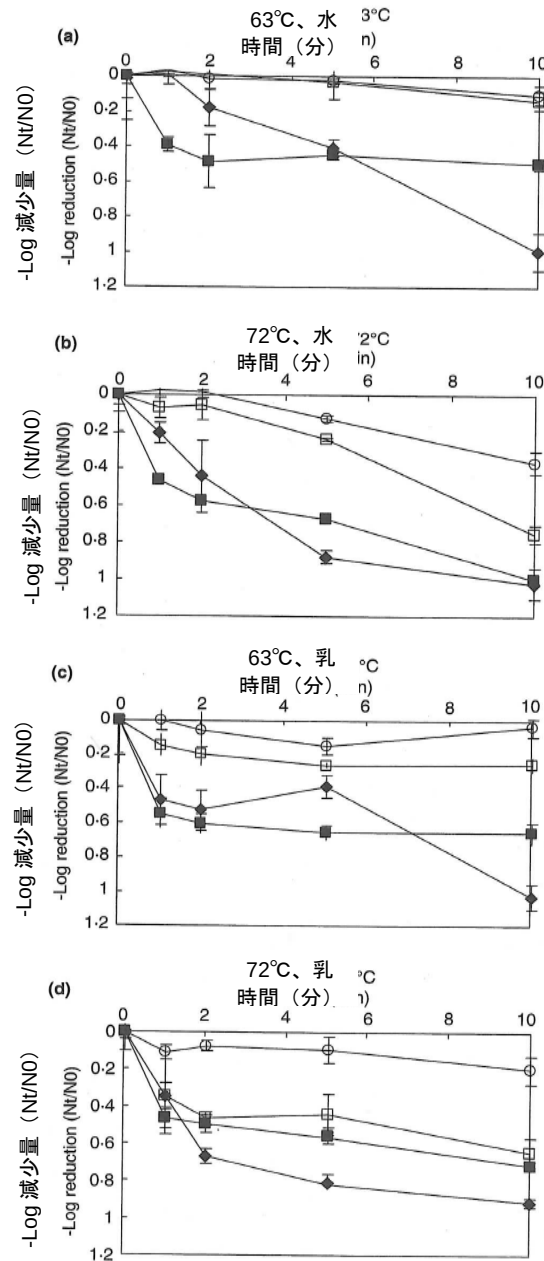


図 13. (a) 63°Cの水、(b) 72°Cの水、(c) 63°Cのミルク、(d) 72°Cのミルクにおける GI ノロウイルス(○)、GII ノロウイルス(□)、マウスノロウイルス(◆)、A 型肝炎ウイルス(■)の RNA 定量値の経時的変化(文献 19 から引用)

Grove ら(20)は、塩分を含む緩衝液中の A 型肝炎ウイルスの高圧処理による不活化のデータを基に、モデル化を試みた。不活化のデータにはバラツキがみられたが、対数線形モデルを用いることにより、特定の処理条件で補間が可能で、モデル式を作成できた。そこで、塩分濃度を 15g/l または 30g/l の調整したマガキ乳剤に A 型肝炎ウイルスを接種して、そのモデルを評価した。37MPa 以上の高圧処理の場合、マガキ乳剤中では緩衝液中と比較して、A 型肝炎ウイルスは不活化されやすく、そのため、375MPa 以上の高圧処理においては、本モデルは安全性が担保できるフェールセーフ(実際の不活化の程度より少ない不活化であると予測する)の結果を予測した。このことから、本モデル式は、高圧処理によるカキの安全性を把握するための有益なモデルになる可能性があると考えし

ている。塩分に関しては、30g/l の濃度と比較して、15g/l の濃度において A 型肝炎ウイルスの不活化効果は高い傾向にあり、特に緩衝液中で顕著であった。

高圧ホモジナイゼーションとは、近年開発した殺菌処理の 1 手法で、高圧処理(高静圧処理)とは異なるものであり、元々バルブ式ホモジナイゼーションに由来する。バルブ式ホモジナイゼーションは非熱的処理法の 1 つで、液体食品を強制的に狭い管(オリフィス)に通す方法である。20 MPa 以下の低圧ホモジナイゼーションは、1900 年に Auguste Gaulin によって発明されて以来、牛乳の脂肪分離(クリーミング)を防止する目的で、乳業界で広く用いられてきた。1900 年代の初期には約 150 MPa に達するホモジナイザーが開発され、さらに現在の技術では 400 MPa というホモジナイズ圧が可能となっている(高圧ホモジナイゼーション)。高圧ホモジナイゼーションにかけられた液体食品には、高静水圧、剪断応力、乱流、キャビテーション、衝突、温度といった複数の物理現象が加わる。高静圧処理が比較的低压(<400 MPa)での連続処理法で分単位の長い作用時間を要するバッチ処理法であるのに対して、曝露時間が秒単位と短い。高静圧処理によるウイルス等の不活化のデータは多く認められるが、高圧ホモジナイゼーションによる不活化の報告はこれまでなかった。D'Souza ら(21)はヒト腸管系ウイルスの代替えウイルスとしてのマウスノロウイルスおよび MS2 大腸菌ファージについて、高圧ホモジナイゼーション処理に対する影響を調べた。ホモジナイゼーション圧力を 0、100、200、250、および 300 MPa(ホモジナイザーの最大圧力)として処理を行ったところ、曝露温度はそれぞれ 24、46、63、70、75℃となった(時間は 2 秒未満)。MS2 が接種量(約 6 log PFU)から約 3 log PFU 不活化されたのは、ホモジナイゼーション圧 300 MPa、75℃という条件だけであった。また、マウスノロウイルスは 300 MPa で約 0.8 log PFU 不活化された(表 20)。

表 20. 高圧ホモジナイゼーションが MS2 バクテリオファージおよびマウスノロウイルスの不活化に及ぼす効果^a(文献 21 から引用)

試験圧力 (MPa、滞留時間は 2 秒間)	回収 MS2 濃度 (log PFU/mL)	回収 MNV-1 濃度 (log PFU/mL)
0	6.52±0.21 ^A	5.78±0.07 ^A
100	6.42±0.2 ^A	5.78±0.01 ^A
200	6.58±0.23 ^A	5.75±0.11 ^{AB}
250	6.55±0.19 ^A	5.63±0.07 ^B
300	3.21±0.82 ^B	4.98±0.04 ^C

^a 列内の同じ添字は、処理結果に有意差がないことを意味する($P>0.05$)。列内の異なる添字は、処理結果に有意差があることを意味する($P<0.05$)。

また、これらの結果を既報の高静圧処理による不活化の結果と比較すると、MS2 バクテリオファージは 600MPa、2℃、5 分間の処理と同等以上であったが、マウスノロウイルスは 350MPa、2℃、5 分間での高静圧処理よりも不活化の程度は低かった(表 21、22)。

表 21. MS2 の不活化における 2℃、5 分間の高静水圧処理と高圧ホモジナイゼーション処理の比較(文献 21 から引用)

圧力 (MPa)	HHP による減少 (5 分間) (log PFU) ^a	HPH による減少 (2 秒間) (log PFU)
250	ND ^b	0
300	ND	3.31
350	0.5	ND
550	1.5	ND
600	3.3	ND

^a データは Guan ら (Guan, D., K. Kniel, K. R. Calci, D. T. Hicks, L. F. Pivarnik, and D.G. Hoover. 2006. Response of four types of coliphages to high hydrostatic pressure. Food Microbiol. 23:546-551)からの引用。

^b ND は測定なしを表す (高圧ホモジナイゼーションが対応している圧力は最大 300 MPa であった)。

表 22. マウスノロウイルスの不活化における 20℃、5 分間の高静水圧処理と高圧ホモジナイゼーション処理の比較(文献 21 から引用)

圧力 (MPa)	HHP による減少 (5 分間) (log PFU) ^a	HPH による減少 (2 秒間) (log PFU)
250	ND ^b	0.22
300	ND	0.89
350	1.5	ND
400	4	ND
450	6.85	ND

^a データは Kingsley ら (Kingsley, D. H., D. R. Holliman, K. R. Calci, H. Chen, and G. J. Flick. 2007. Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. Appl. Environ. Microbiol. 73:581-585.)からの引用。

^b ND は測定なしを表す (高圧ホモジナイゼーションが対応している圧力は最大 300 MPa であった)。

IV 参考文献

- 1) http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection_Sterilization/3_2contaminatedDevices.html
- 2) Tsiquaye KN, Barnard J. Chemical disinfection of duck hepatitis B virus: A model for inactivation of infectivity of hepatitis B virus. J Antimicrob Chemother. 32:313-323(1993)
- 3) Beekes M, Lemmer K, Thomzig A, Joncic M, Tintelnot K, Mielke M.: Fast, broad-range disinfection of bacteria, fungi, viruses and prions. J Gen Virol. 91:580-589(2010).
- 4) Rudi K, Moen B, Dromtorp SM, Holck AL.: Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. Appl Environ Microbiol. 71:1018-1024(2005).
- 5) Soejima T, Iida K, Qin T, Taniai H, Seki M, Takade A, Yoshida S.: Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria. Microbiol Immunol. 51:763-775(2007).
- 6) Katz BD, Margolin AB.: Inactivation of hepatitis A HM-175/18f, reovirus T1 Lang and MS2 during alkaline stabilization of human biosolids. J Appl Microbiol. 103:2225-2233(2007).
- 7) Charles KJ, Shore J, Sellwood J, Laverick M, Hart A, Pedley S.: Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. J Appl Microbiol. 106:1827-1837(2009).
- 8) Butot S, Putallaz T, Amoroso R, Sanchez G.: Inactivation of enteric viruses in minimally

- processed berries and herbs. *Appl Environ Microbiol.* 75:4155–4161(2009).
- 9) Mormann S, Dabisch M, Becker B.: Effects of technological processes on the tenacity and inactivation of norovirus genogroup II in experimentally contaminated foods. *Appl Environ Microbiol.* 76:536–545(2010).
 - 10) Baert L, Vandekinderen I, Devlieghere F, Van Coillie E, Debevere J, Uyttendaele M.: Inactivation of murine norovirus 1 and *Bacteroides fragilis* infecting phage B40–8 by the use of sodium hypochlorite and peroxyacetic acid as decontaminating agents for shredded iceberg lettuce. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 73:97–101(2008).
 - 11) Casteel MJ, Schmidt CE, Sobsey MD.: Chlorine disinfection of produce to inactivate hepatitis A virus and coliphage MS2. *Int J Food Microbiol.* 125:267–273(2008).
 - 12) Shieh YC, Stewart DS, Laird DT.: Survival of hepatitis A virus in spinach during low temperature storage. *J Food Prot.* 72:2390–2393(2009).
 - 13) Casteel MJ, Schmidt CE, Sobsey MD.: Chlorine inactivation of coliphage MS2 on strawberries by industrial-scale water washing units. *J Water Health.* 7:244–250(2009).
 - 14) Liu P, Yuen Y, Hsiao HM, Jaykus LA, Moe C.: Effectiveness of liquid soap and hand sanitizer against Norwalk virus on contaminated hands. *Appl Environ Microbiol.* 76:394–399(2010).
 - 15) Magulski T, Paulmann D, Bischoff B, Becker B, Steinmann E, Steinmann J, Goroncy-Bermes P, Steinmann J.: Inactivation of murine norovirus by chemical biocides on stainless steel. *BMC Infect Dis.* Jul 7;9:107(2009).
 - 16) Terpstra FG, van den Blink AE, Bos LM, Boots AG, Brinkhuis FH, Gijzen E, van Remmerden Y, Schuitemaker H, van 't Wout AB.: Resistance of surface-dried virus to common disinfection procedures. *J Hosp Infect.* 66(4):332–338(2007).
 - 17) Iwasawa A, Niwano Y, Mokudai T, Kohno M.: Antiviral activity of proanthocyanidin against feline calicivirus used as a surrogate for noroviruses, and coxsackievirus used as a representative enteric virus. *Biocontrol Sci.* 14:107–111(2009).
 - 18) Shimasaki N, Kiyohara T, Totsuka A, Nojima K, Okada Y, Yamaguchi K, Kajioaka J, Wakita T, Yoneyama T.: Inactivation of hepatitis A virus by heat and high hydrostatic pressure: variation among laboratory strains. *Vox Sang.* 96:14–19(2009).
 - 19) Hewitt J, Rivera-Aban M, Greening GE.: Evaluation of murine norovirus as a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies. *J Appl Microbiol.* 107:65–71(2009).
 - 20) Grove SF, Lee A, Stewart CM, Ross T.: Development of a high pressure processing inactivation model for hepatitis A virus. *J Food Prot.* 72:1434–1442(2009).
 - 21) D'Souza DH, Su X, Roach A, Harte F.: High-pressure homogenization for the inactivation of human enteric virus surrogates. *J Food Prot.* 72:2418–2422(2009).