

2006年1月13日

研究報告書

「次亜塩素酸精製水による ノロウイルス不活化作用の検討」

北里大学医療衛生学部

微生物学研究室

教授 北里 英郎

助教授 滝 龍雄

講師 原 和矢

目的：

ノロウイルスはヒトでは小児の感染性胃腸炎や冬季に多い食中毒の主要な原因因子として知られている。特に近年は生カキ等の海産物の生食により、大規模な食中毒の発生が報告され、高齢者を中心に死亡例も報告されていることから、ノロウイルスによる食中毒の予防法を早急に確立する事が求められている。その方法として、経口的に摂取しても安全で、食品の生の風味を損なわない消毒法の開発が期待されている。しかし、ヒトのノロウイルスは、培養可能な適当な培養細胞が知られては無く、又、実験動物では培養できないことから、ヒトのノロウイルスに対して消毒剤がどの程度有効であるかといった不活化(死滅)の条件はほとんど調べられていない。ネコカリシウイルスはヒトのノロウイルスと同属で、ネコ腎臓細胞である CRFK 細胞で増殖することが知られ、ヒトのノロウイルスの代替実験系として用いることが出来、ブラック感染価測定が可能である。

今回は、ノロウイルスに類似したネコカリシウイルスを用いて塩素系消毒剤(次亜塩素酸水)による不活化(安定性)を検討した。

材料と方法

ウイルス：ネコカリシウイルス

細胞：ネコ腎臓細胞由来 CRFK 細胞

使用した消毒薬；次亜塩素酸水

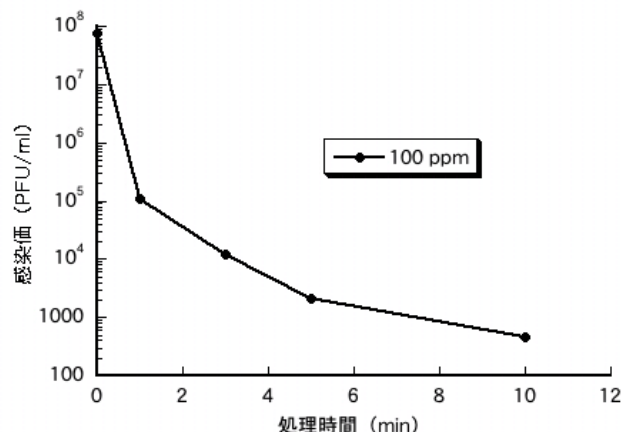
ネコカリシウイルス感染価の測定：培養 CRFK 細胞を用いたブラック感染価測定法を行った。

消毒剤(次亜塩素酸水)の不活化効果の検定：

- ① ネコカリシウイルスを 100ppm の次亜塩素酸水存在下で 1～10 分間処理した。
- ② 10%(W/V)チオ硫酸ナトリウムを加え次亜塩素酸水を中和後、PBS で 10 倍階段希釈し、その適当な希釈液 0.1 ml ずつをそれぞれ 4 ウェルの培養 CRFK に加え、37℃、60 分間吸着させた。
- ③ 吸着後、CRFK 細胞に 0.8%寒天を含む培養液を加え 72 時間培養した。
- ④ 培養後にメタノールで固定し、0.1%クリスタルバイオレットを含む 20%エタノール液を加えて生細胞を染色後、ブラック(死んだ細胞)数を算定し感染価を算出した。

結果

| 次亜塩素酸水の作用時間 (分) | 生残ウイルス数 (PFU/ml) |
|-----------------|-------------------|
| 0分 | 7.5×10^7 |
| 1分 | 1.1×10^5 |
| 3分 | 1.2×10^4 |
| 5分 | 2.1×10^3 |
| 10分 | 4.5×10^2 |



この、次亜塩素酸水のネコカリシウイルスに対する不活化効果の測定の実験は再現性のある事を確認した。成績はそのうちの代表的なものである。

考察

現在、ヒトノロウイルスの有効な培養・測定系が知られていない。その為に近年増加しているノロウイルスが原因と考えられている急性胃腸炎に対し、その予防法を検討する手段がなかった。しかし、ネコカリシウイルスはノロウイルスに類似したウイルスで、ネコ腎臓由来の CRFK 細胞で培養が可能である事から、ヒトノロウイルスの代替実験系として用いることが可能である。

今回、ヒトのノロウイルスに対する次亜塩素酸系消毒薬・次亜塩素酸水の消毒効果を、類似ウイルスであるネコカリシウイルスを用いて調べた。ウイルスを処理するために用いた濃度は、予備実験の結果から最終濃度 100ppm とし、ウイルスとの接触時間を 1 から 10 分間とした。その結果、ネコカリシウイルス感受性 CRFK 細胞でのプラック形成能でウイルスの活性を見ると、作用時間の長さに比例して形成されるプラックの数は急激に減少し、1 分間の接触で約 1/700 になり、3 分間では約 1/7000 になった。10 分間の接触では 10 万分の 1 以下に減少したが、この作用時間内では完全なウイルスの不活性化は観察されなかった。

これらの結果は、ネコカリシウイルスを用いた系で得られたものであるが、次亜塩素酸水が効率よくヒトノロウイルスを不活性化しうることを示しており、近年急増しているノロウイルスによる食中毒を、食品に直接使用しうる消毒薬として認可されている次亜塩素酸消毒薬による予防できる可能性を示し、食品衛生上の観点からも重要な結果といえる。今後更に、ノロウイルスによる食中毒を予防するための消毒着の使用条件を詳細に検討する必要がある。