

## 各種酸化剤によるカリシウイルスの不活化に関する研究

日大生産工(院) ○飯塚 絹江

日大生産工 小森谷 友絵・神野 英毅

### 1 緒言

カリシウイルスはノロウイルス、サポウイルス、ベシウイルス、ラゴウイルスの総称であり、ウイルス表面に 32 個のコップ状のくぼみを持ち、直径 35~39 nm のエンベロープを持たないプラス一本鎖 RNA ウイルス群である。この中で、ノロウイルスは急性胃腸炎の原因ウイルスであり、近年では本ウイルスによる食中毒が多数報告されている。ノロウイルスは時として集団感染を引き起こすため有効な不活化法が望まれている<sup>1)</sup>。

ノロウイルスの主な経路は空気感染、接触感染、経口感染がある。接触感染では感染者の手洗い後のタオルや吐瀉物を処理した布巾等からの感染などがある。このような布上のウイルスは洗濯による除去行為が行われている。布上のウイルスは 塩素系漂白剤で不活性化処理することが厚生労働省より推奨されている。漂白成分である 次亜塩素酸ナトリウムは漂白剤だけでなく殺菌剤としても用いられていられ、ウイルスの不活化効果が報告されている。しかし、次亜塩素酸はその酸化力から洗濯において色柄を脱色するという点で使用範囲が限られる。近年、酸素系漂白洗剤が用いられるようになった。漂白成分として使われる漂白活性化剤は洗濯液中で有機過酸を生成し、その酸化力によって漂白作用を示す。漂白活性化剤のアルキルアシルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム(OBS)では殺菌効果<sup>2)</sup>、殺ダニ効果<sup>3)</sup>が報告されている。そこで本研究では漂白剤の酸化剤として用いられる次亜塩素酸ナトリウムおよび OBS によるウイルス不活化効果の検討を行った。

### 2 実験

#### 2.1 ウイルス培養

ノロウイルスは人工培養系が確立されていないため代替ウイルスとしてネコカリシウイルス (Feline calicivirus : FCV)を用いた。FCV は F9 株を使用し、宿主細胞にはネコ腎細胞 (Crandell-Rees feline kidney cell : CRFK)を用いた。FCV は CRFK 細胞が 80%コンフルエントに達した細胞に感染させた。約 20 時間ウイルス培養を行い、細胞変性を確認後回収した。

#### 2.2 ウイルス濃縮

ウイルス培養液は回収後、細胞残渣を遠心分離し、0.20  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過を行った。その後限外濾過フィルター Amicon Ultra-15 (Millipore)を用いてウイルスを濃縮した。この濃縮液をウイルスサンプルとして不活化試験に用いた。

#### 2.3 ウイルス不活化

##### 2.3.1 不活化処理

次亜塩素酸ナトリウムは濃度調製後、ウイルスと一定時間反応させ、0.1 N チオ硫酸ナトリウムを用いて反応停止させた。

OBS は過炭酸ナトリウム(PC) を 25°C、10 分間反応させ有機過酸を生成させた (Fig.1)。

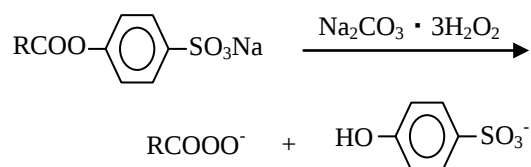


Fig.1 OBS の化学構造式および有機過酸の生成工程

有機過酸を生成させた溶液と FCV を一定時間反応させ不活化不活化を行った。不活化反応後 0.1 N チオ硫酸ナトリウム、0.05%カタラーゼを含む 100 mM HEPES (pH 7.5)にて反応を停止させた。比較のため PC のみで同様に不活化を行った。

### 2.3.2 感染価測定

不活化後のウイルス液を 100 mM HEPES にて 10 倍ずつ段階希釈し、それぞれの希釈液を 30  $\mu$ l ずつ 96 穴プレートに培養しておいた CRFK 細胞に播種して行った。3 日間細胞培養し、細胞変性を顕微鏡にて観察した。

### 2.3.3 遺伝子定量

遺伝子抽出前処理として RNase 処理を行った。不活化ウイルス溶液に RNase 250  $\mu$ g/ml(ニッポンジーン)を加え、37 $^{\circ}$ C、30 分間行った。ウイルス RNA は酵素処理後、Magstration System 6GC(PSS)を用いて抽出した。One Step SYBR PrimeScript RT-PCR kit II (TAKARA)、LightCycler2.0(Roche)を用いて Real-time RT-PCR による遺伝子定量を行った。

Table 1 使用したプライマー

| 遺伝子配列   |                              |
|---------|------------------------------|
| F9Cp66F | 5'-ACCCGACAAGGAACAATGGT-3'   |
| F9Cp68R | 5'-GAGCAAAGGGCCTAAGGATTGT-3' |

## 3 結果および考察

### 3.1 次亜塩素ナトリウムによる不活化

500 ppm に調整した次亜塩素ナトリウムを用いて不活化を行った。ウイルス感染価は、1 時間の不活化処理により約 6 log 以上減少した。またその時の遺伝子数の変化を Fig.2 に示した。RNase による酵素処理を遺伝子学的測定のサンプル前処理として行うことで、ウイルス感染活性により近い、正確な測定が行えることが示唆された。

### 3.2 OBS による不活化

25 $^{\circ}$ C、10 分間不活化させた結果 PC のみでは

感染価は減少しなかったが、OBS を添加することによって不活化効果が得られた。アルキル鎖長での比較ではアルキル鎖長 12 の OBS (以下 OBS-12)で不活化効果が最大となった(Fig.3)。アルキル鎖長が長くなるにつれ感染価減少がみられた要因として、カプシドタンパクの疎水部分と反応がおこりやすくなったからと考えられる。

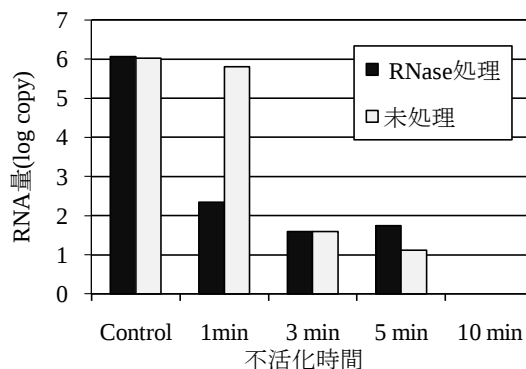


Fig.2 遺伝子定量の結果

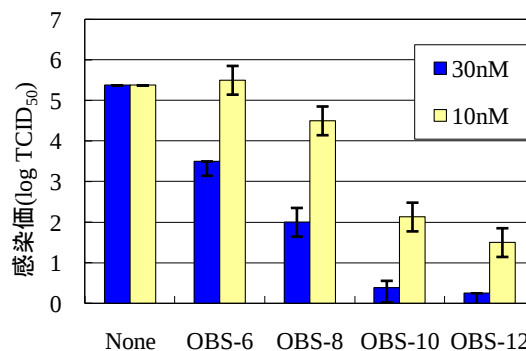


Fig.3 OBS のアルキル鎖長による不活化効果

## 4 参考文献

- 1) 西尾治, 他, ノロウイルスによる食中毒について, *食衛誌*, 46(6), 235-245, (2005)
- 2) 戸部聖一, 他, 漂白活性化剤アルキルアシルオキシ安息香酸およびアルキルアシルオキシベンゼンスルホン酸塩の殺菌効果, *BokinBobai* 35(5), 269-277, (2007)
- 3) Seiichi Tobe, *et al*, "Effects of Bleach Activator, Sodium Alkyl Acyloxybenzene Sulfonate, on House Dust Mites (*Dermatophagoides farinae*)", *Journal of Oleo Science*, 59(4), 185-190, (2010)