〈短 報〉

加熱処理による母乳中のマウスノロウイルスの不活化効果

清水 優子¹⁾・北島 正章²⁾・早川 有子³⁾・遠矢 幸伸⁴⁾・牛島 廣治¹⁾*Inactivation of Murine Norovirus in Breast Milk by Heat Treatment*Yuko SHIMIZU¹⁾, Masaaki KITAJIMA²⁾, Yuko HAYAKAWA³⁾, Yukinobu TOHYA⁴⁾ and Hiroshi USHIJIMA¹⁾¹⁾Aino Health Science Center, Aino University, ²⁾Graduate School of Engineering, The University of Tokyo,³⁾Department of Health Science, Gumma Paz College,⁴⁾Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences, Nihon University

(2010年9月7日 受付・2011年1月7日 受理)

要 旨

母乳がヒトノロウイルス(HuNoV)に汚染された場合には、乳児に甚大な健康被害をもたらすことが懸念されるため、適切な感染予防策の構築が求められる。しかしながら、HuNoVは未だ細胞培養系が確立されていないため、その不活化条件については十分な知見が得られていない。本研究では、HuNoVに遺伝的に近縁且つ細胞培養可能なマウスノロウイルス(MNV)を代替ウイルスとして使用し、母乳中のMNVに対する加熱処理の不活化効果を評価した。その結果、母乳中のMNVは65℃以上1分間の加熱で99.9%(3 log₁₀)以上不活化することが判明した。HuNoV感染予防の観点から見た母乳等の加熱処理の条件として、65℃以上且つ1分間以上で不活化が可能と思われる。

Key words : ノロウイルス感染症, マウスノロウイルス, 加熱不活化, 母乳

ヒトノロウイルス(Human norovirus: HuNoV)は、ウイルス性急性胃腸炎の主要な病因であり、乳児から高齢者に至るまで幅広い年齢層のヒトに感染して激しい下痢や嘔吐などの症状を引き起こす^{1,2)}。その感染経路はヒト-ヒト感染および飲食物を介した経口感染であるが、感染力が非常に強いいため、ごく少量のウイルスでも感染が成立する^{1,2)}。特に、母乳がHuNoVに汚染された場合には、乳児に甚大な健康被害をもたらすことが懸念される。しかしながら、HuNoVは未だ効率良く増殖させることのできる細胞培養系が確立されていないため、その不活化条件については十分な知見が得られていないのが現状である。そのような中で、近年HuNoVに遺伝学的に近縁且つ細胞培養可能なマウスノロウイルス(Murine norovirus: MNV)が発見され^{3,4)}、不活化実験におけるHuNoVの代替ウイルスとして急速に普及しつつある⁵⁾。本研究では、母乳中のMNVに対する加熱処理に

よる不活化効果を検討した。

実験に使用したMNV高濃度原液は、国内のマウス糞便から分離されたMNV(S7-PP3株)をRAW264.7細胞(ATCC TIB-71)にて増殖させたものである。このMNV液濃度は、10⁶ Tissue Culture Infectious Dose 50% (TCID₅₀)/50 μLであった。母乳試料については、授乳期の母親(10名)から提供され、採取後実験操作に供するまで凍結保存し、融解後プールした成乳を使用した。ウイルス感染力価測定の際に母乳中の脂肪による細胞観察の影響をなくすため、前処理として6000×g、10分間の遠心を行い、上清の脂肪層を取り除いた液体成分(乳清)を使用した。母乳9 mLとMNV 1 mL(9:1, v/v)を混合したものを反応液(10 mL)とし、4段階の温度条件(55, 60, 65, 70℃)で加熱した。各温度条件について、加熱開始後経時(0, 1, 2.5, 5, 10分後)に反応液の一部を回収し、TCID₅₀法により感染力価を測定した。加熱前のウイルス感染力価N₀(TCID₅₀)に対する所定条件における加熱後のウイルス感染力価N(TCID₅₀)の割合を生残率とした。各温度および各加熱時間のそれぞれに

¹⁾藍野大学藍野健康科学センター, ²⁾東京大学大学院工学系研究科, ³⁾群馬パース大学保健科学部, ⁴⁾日本大学生物資源科学部獣医学科

について全て3回の実験を行い、各実験条件における MNV の生残率の平均値を算出した。感染力価測定法及び生残率の算出法の詳細は既報に従った⁶⁾。また、対照実験系としてリン酸緩衝食塩水(phosphate buffer saline: PBS) 9 mL と MNV 1 mL (9 : 1, v/v) を混合したものを反応液(10 mL)とした場合についても同様の実験操作を実施した。

まず、母乳自体の MNV に対する抗ウイルス作用を確認するため、母乳中に MNV を添加し室温で 60 分間接触させた後の不活化率を測定したところ、その不活化率は 55% ($0.35 \log_{10}$) ($n=5$) であった。図 1(A) に、母乳と MNV を混合し各温度条件で加熱した場合の MNV の生残率の経時変化を示す。65°C および 70°C で加熱した場合には、1 分間の加熱により MNV は 99.9% ($3 \log_{10}$) 以上不活化した。60°C で加熱した場合には、

加熱開始からの時間経過とともに不活化し、10 分後に 99.9% ($3 \log_{10}$) 以上不活化した。55°C で加熱した場合には、加熱開始から 10 分後の不活化率は約 90% ($1 \log_{10}$) であった。PBS と MNV を混合した対照実験系における生残率の低下の程度は、いずれの温度条件下においても母乳と混合した場合(前述)と同等であった(図 1(B))。

室温下での MNV 不活化率測定結果から、母乳自体の MNV に対する抗ウイルス作用は、加熱による不活化作用と比較して無視できるレベルであると判断した。加熱実験より、65°C 以上の温度条件で加熱すれば、母乳中の MNV は速やかに不活化することが判明した。また、60°C でも一定の不活化は認められるが、この温度条件では十分な不活化効果を得るには十分な加熱時間を確保する必要があると言える。PBS と MNV を混合した対照実験より、加熱処理による不活化効果は母乳中

図 1 加熱処理によるマウスノロウイルスの不活化

MNV 生残率 $\log_{10}(N/N_0)$ を縦軸とし、各加熱条件下における加熱時間を横軸に示す。下向き矢印以降は検出限界以下となる。エラーバーは標準偏差 ($n=3$)。

のタンパク質等には影響されないことが分かった。本研究では、加熱処理による不活化効果の基礎的知見を得ることを目的として 10 mL の容量で加熱処理実験を実施したが、実際には更に大容量の母乳を処理する場合が考えられる。その場合には、全体にわたって均一に 65°C 以上の温度に達していることを確認することが必要である。

これまで、熱処理による HuNoV の不活化条件としては、A 型肝炎ウイルスを用いた熱処理実験結果に基づき 85°C で 1 分以上という処理条件が推奨されてきた^{7,8)}。HuNoV は未だ細胞培養系が確立されていないため、不活化実験等における HuNoV の代替ウイルスとしてネコカリシウイルス (Feline calicivirus: FCV) が広く用いられてきた。FCV を用いた PBS 中での加熱処理実験においては、56°C の場合には 8 分間の加熱で、71.3°C の場合には 1 分間の加熱で 99.9% ($3 \log_{10}$) の不活化が認められている⁹⁾。しかしながら、FCV はノロウイルス属とは異なるベジウイルス科に属するウイルスであることやネコの呼吸器に感染し糞便中には排出されないことなど^{3,4)}、HuNoV とは異なる特性を持つため代替ウイルスとして使用するには限界がある。このような状況の中、近年発見された MNV は、細胞培養が可能なウイルスの中で HuNoV に遺伝的に最も近縁なウイルスであり、極めて HuNoV に類似した特性を有する代替ウイルスとして急速に注目を集めている^{3,4)}。Hewitt らは、米国で分離された MNV (MNV-1 株) と A 型肝炎ウイルス (HM-175 株) の熱処理における生残率の消長を解析しており、いずれのウイルスについても 63°C の場合には 5 分間の加熱後に 99.9% ($3 \log_{10}$) 以上の不活化が、72°C の場合には 1 分間の加熱後に 99.97% ($3.5 \log_{10}$) 以上の不活化が認められたとしている⁵⁾。また、Baert らも、MNV-1 株が 60°C 以上の温度条件により速やかに不活化されるという加熱処理実験結果を示している¹⁰⁾。これらの報告とあわせて、これまで推奨されてきた 85°C で 1 分以上という加熱処理条件で MNV への高い不活化効果を有することが確認された。

今回の検討から、MNV は 65°C 且つ 1 分間以上の加熱処理により速やかに不活化することが明らかとなった。MNV は、遺伝学的に HuNoV に近縁なウイルスであり、カプシドタンパクの構造も HuNoV に類似している

と考えられている。加熱処理による不活化は熱によるカプシドタンパクの構造変化により引き起こされるため、HuNoV も MNV と同様に加熱処理により効率的に不活化されることが強く示唆された。本研究での加熱処理による MNV 不活化効果の検討は、有用な HuNoV 感染予防策のひとつになりうると思われる。

謝 辞：本研究にあたりご協力いただきました東京大学大学院工学系研究科片山浩之教授に感謝いたします。

利益相反について：本研究における利益相反はない。

文 献

- 1) 牛島廣治, 西村修一：ノロウイルス感染症。最新医 2008; 63(3)増刊号：617-35.
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター：
<http://idsc.nih.go.jp/disease/norovirus/index.html>
- 3) Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW 4th: STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 2003; 299(5612): 1575-8.
- 4) Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW 4th: Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol* 2006; 80(11): 5104-12.
- 5) 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* 2009; 107: 65-71.
- 6) 清水優子, 牛島廣治, 北島正章, 片山浩之, 遠矢幸伸：ヒトノロウイルスの代替としてマウスノロウイルスを用いた消毒薬による不活化効果の検討。環境感染誌 2009; 24(6): 388-94.
- 7) Favero MS, Bond WW: Disinfection and sterilization. In: Zuckerman AJ, Thoma HC, eds. *Viral Hepatitis*. Churchill Livingstone, London, 1998. p.627-35.
- 8) Fiore AE: Hepatitis A transmitted by food. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 705-15.
- 9) Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M: Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(8): 4538-43.
- 10) Baert L, Wobus CE, Coillie EV, Thackray LB, Debevere J, Uyttendaele M: Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(2): 543-6.

〔連絡先〕〒150-0002 渋谷区渋谷 2-17-3-4F
 藍野大学藍野健康科学センター 牛島廣治
 E-mail: ushijima-hiroshi@jcom.home.ne.jp

Inactivation of Murine Norovirus in Breast Milk by Heat Treatment

Yuko SHIMIZU¹⁾, Masaaki KITAJIMA²⁾, Yuko HAYAKAWA³⁾, Yukinobu TOHYA⁴⁾ and Hiroshi USHIJIMA¹⁾

¹⁾*Aino Health Science Center, Aino University,* ²⁾*Graduate School of Engineering, The University of Tokyo,*

³⁾*Department of Health Science, Gumma Paz College,*

⁴⁾*Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences, Nihon University*

Abstract

Human norovirus (HuNoV) may pose significant health risks to infants if the virus contaminates infant feed, and HuNoV infections are very important to prevent through infant feed such as breast milk. However, little is known about the appropriate condition to inactivate HuNoV, due to the lack of a routine cell culture system for HuNoV. The present study used a murine norovirus which is culturable and genetically close to HuNoV as a surrogate for HuNoV, and investigated its inactivation characteristics in breast milk. MNV inoculated in breast milk was rapidly inactivated and reached more than 99.9% ($3 \log_{10}$) inactivation after 1 min treatment at 65°C. Our results suggest that heat treatment of more than 65°C and 1 min can adequately inactivate HuNoV in breast milk.

Key words : norovirus gastroenteritis, murine norovirus, heat treatment, breast milk