

マヨネーズ・ドレッシング類中における ノロウイルスの挙動と新規不活化剤の探索

東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科・助教 高橋 肇

■ 緒 言

ヒトノロウイルスは、非細菌性急性胃腸炎の原因となることで知られる、カリシウイルス科の非エンベロープウイルスである。感染力、環境耐性が高く (Rzezutka *et al.*, 2004)、10～100 粒子程度といったごく少量のウイルス数でも発症することが明らかとなっている。感染経路としては、ウイルスに汚染された生の食品もしくは加熱不十分な食品の喫食や、感染者が調理することによる食品を介した感染、感染者の糞便や嘔吐物から手指等を介することによる接触感染、または空気中に飛び散ったウイルスを吸い込むことによる飛沫感染が挙げられる。感染後、24～48 時間で発症し、吐き気、嘔吐、下痢、腹痛、軽度の発熱といった症状を引き起こすことが明らかとなっている (de Wit *et al.*, 2007)。

わが国で報告されているウイルス性食中毒の多くはノロウイルスを原因とするものであり、全ての食中毒事例中、患者数においてはノロウイルスによるものが最も多い。直近では、2014 年 1 月に浜松で発生した食パンを原因とする集団食中毒が挙げられ、製造工場の従業員がノロウイルスに感染していたことから食品が汚染されて感染が拡大したと考えられている。学校閉鎖となる小学校が相次ぎ、発症した児童数は 1,000 人を超えるものとなった (浜松市, 2014)。

ノロウイルス食中毒の主な原因食品としてはカキなどの二枚貝が多く報告されてきたが、近年では、サラダなどの非加熱喫食食品 (RTE 食品) を原因食品とする食中毒事例もしばしば報告されている。これは、ウイルスに汚染された水や土壌での生鮮野菜の栽培や (El-Senousy *et al.*, 2013)、収穫後の洗浄に汚染水を使用したことによるものであると考えられている (野田 衛, 2013)。以前の調査では、レタス、イチゴ、ラズベリーなどといった生鮮食品の表面にノロウイルスが付着、流通し、アウトブレイクを引き起こした事例が報告されている (Ethelberg *et al.*, 2010) (野田 衛, 2013)。

しかし、これらの RTE 食品中でのウイルスの挙動、また製造段階で添加される保存料や日持ち向上剤、喫食時に用いられる調味料等がウイルスの生残に及ぼす影響について調べた例は少ない。

そこで本研究では、サラダ中でウイルスがどのような挙動を示すのか解析するとともに、ウイルス不活化効果を持つ薬剤を探索することを目的とした。

■ 方 法

使用ウイルス

本研究では、ヒトノロウイルス (hNoV) の代替ウイルスであるネズミノロウイルス (MNV-1) を用いた (Katharina *et al.*, 2012)。

マウスマクロファージ細胞 (RAW 264.7) を、10% ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum ; FBS)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (Wako) を含んだ D-MEM 培地 (Wako) を用いて、コンフルエントになるまで培養した。そこに 1 ml の MNV-1 を接種し、細胞変性が広く見られたら凍結-融解を -20°C で 2 回、-80°C で 2 回ずつ繰り返した後、遠沈管に分注して 8,000g、20 分の遠心分離し、使用するまで -80°C で保存した。

1. サラダの作製

製造段階における洗浄等に用いられる薬剤等の影響を排除するため、小売店で購入したキャベツとタマゴでコールスローサラダおよびタマゴサラダを作製し、実験に用いた。キャベツは滅菌した包丁で切り、約 55°C に熱したお湯に 10 秒程くぐらせた後フードプロセッサーで細断し、2% の塩水に 1 分間浸漬した。水分を切った後 20% 量のマヨネーズを加えてよく混ぜ、実験に供した。タマゴは茹でたものをスライサーで細かくし、20% 量のマヨネーズを加えてよく混ぜ、実験に供した。

2. サラダ中での MNV-1 の挙動解析

作製したサラダをストマッカー袋に 10g ずつ取り、感染価が 10⁶PFU/ml 程度の MNV-1 を 1 ml 接種した。サンプルをストマッカー (Seward) を用いて 230rpm で 30 秒間ホモジナイズし、ウイルスをサラ

ダに付着させ、4°Cで5日間保存した。

回収は、0(接種直後)、1、2、3、4、5日目に行った。ストマッカー袋にPBS(ニッスイ)を90ml加えてストマッカーにかけ、ウイルスを遊離させた。その後ろ過滅菌し、D-MEM培地を用いて段階希釈を行った。サンプルはアッセイに用いるまで-80°Cで保存した。

3. 調味液中での MNV-1 の挙動解析

本実験には、マヨネーズ、ゴマドレッシング、フレンチドレッシングをサンプルとして使用した。各調味液を滅菌チューブに9g取り、感染価が 10^6 PFU/mlのMNV-1を1ml加えてボルテックスし、4°Cで5日間保存した。

回収は同様に、0(接種直後)、1、2、3、4、5日目に行った。サンプルを新しい滅菌チューブに1g測り取り、PBSを9ml加えてボルテックスした後、8,000g、10分で遠心分離し、0.2 μ mシリンジフィルターを用いてろ過滅菌した。これをD-MEM培地で段階希釈し、プラークアッセイを用いて感染価を測定した。

4. 各種日持ち向上剤・保存料によるウイルス低減の検討

薬剤は、フェルラ酸(三栄源エフ・エフ・アイ)、ポリリジン製剤であるサンキーパー 381(三栄源エフ・エフ・アイ)およびグリシン酢酸ナトリウム製剤であるサンキーパー S-30(三栄源エフ・エフ・アイ)、アートフレッシュI01(三栄源エフ・エフ・アイ)、アートフレッシュI08(三栄源エフ・エフ・アイ)を用いた。それぞれ蒸留水に溶かして5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000ppmに調製してろ過滅菌し、実験に供した。

調製した薬剤を滅菌チューブに移し、感染価が 10^6 PFU/mlのMNV-1を等量加えてボルテックスした。室温下で1時間暴露し、D-MEM培地で段階希釈をした後、プラークアッセイを用いて感染価を測定した。

5. プラークアッセイ

プラークアッセイは、Mariamら(2012)の方法を参考にして行った。RAW 264.7を、細胞数が 1.0×10^6 cells/well程度になるように6wellプレート(Falcon)に接種し、37°C、19時間培養して細胞を定着させた。培養後、細胞液を抜いてMNV-1を接種したサンプルを1wellにつき500 μ lずつ接種し、1時間浸とうさせた後ウイルス液を除去した。そこに1.5%のSeaPlaque Agarose(Lonza)を含むD-MEM培地を2ml入れ、10分間静置して固定し、37°C、で48時間インキュベートした。測定には、0.03%のニュートラルレッド(SIGMA)を含むPBS溶液を染色液として用いた。染色液を1wellにつき2mlずつ入れ、1時間染色した後プラーク数を数え、感染価を測定した。

■ 結果

1. サラダ中での MNV-1 の挙動解析

作製したサラダ中でのMNV-1の挙動を解析した結果、コールスローサラダにおいては、日が経つにつれ若干の感染価の減少傾向が見られるものの、5日間の保存期間中、感染価はほとんど減少しなかった。また、タマゴサラダにおいても、保存期間中感染価の大きな減少は認められず、5日目の時点で0.5log程度の感染価の減少にとどまった。(Fig.1、2)。

2. 調味液中での MNV-1 の挙動解析

調味液中でのMNV-1の挙動を解析した結果、マヨネーズ、ゴマドレッシング、フレンチドレッシングのいずれも、暴露後も感染価を維持しており、接種ウイルス量に対し、0.5log程度減少にとどまった(Fig.3)。

3. 各種日持ち向上剤によるウイルス低減の検討

各薬剤のMNV-1に対する不活化効果を確認したところ、ポリリジン製剤の10,000、8,000、6,000ppmにおいて、感染価が2log以上減少した。また、フェルラ酸の9,000、8,000、7,000ppmにおいても、2log以上感染価が減少した。3種のグリシン酢酸ナトリウム製剤では、全ての濃度において多くて1log程度の感染価の減少であり、不活化効果が得られなかった(Table1)。

■ 考 察

本実験では、サラダ中で MNV-1 がどのような挙動を示すのか解析するため、自作したサラダに MNV-1 を接種し、プラークアッセイを用いて感染価を測定した。その結果、5 日間の保存期間中にウイルスの感染価の減少は認められず、MNV-1 はサラダ中で長期にわたって生残することが明らかとなった。ノロウイルスは 10～100 粒子程度のウイルス数で発症することが知られており、これを超えるウイルス汚染が起こった場合、これら食品を介して感染する危険が高まることが推察された。

一般的にサラダは調味液等を添加して喫食することが多いが、これらの使用がウイルスの生残に及ぼす影響はほとんど明らかとなっていない。以前の調査に、マヨネーズの細菌に対する低減効果を調べた例があり (Hwang *et al.*, 2005)、この報告を受け、本研究ではノロウイルスに対しても同様の効果を持つのか検証したが、サラダと同様、5 日間の保存期間中感染価は減少せず、このことから、サラダに調味液を添加しても MNV-1 の生残には影響を及ぼさないことがわかった。

以上 2 つの実験結果より、サラダの一般的な消費期限内で、MNV-1 は調味液の有無に関わらず生残することが明らかになった。これらの RTE 食品では加熱することなしにそのまま喫食するため、混入したウイルスを除去する手段がない。したがって、製造段階や喫食前にウイルスが混入した場合、重大な結果を引き起こす可能性も想定されることから、事前にウイルス混入を防ぐことが重要であることが改めて確認された。

サラダ類の中には、業務向け等比較的消費期限の長い製品も存在し、それらの保存のためには、日持ち向上剤や、保存料が使用されている。しかしながら、そのような製品における、保存料や日持ち向上剤のウイルスに対する効果は明らかとなっていない。そのため本研究では、これらの薬剤の効果についても検証し、ウイルス低減に効果を持つ薬剤の探索を行った。

各薬剤のウイルスに対する不活化効果の検討において、ポリリジン製剤が、どの濃度でも 2log 程度感染価を減少させることが明らかとなり、これら薬剤の不活化効果が期待された。ポリリジンの抗菌メカニズムについては、細菌表面に静電的に結合し細胞膜を破壊することによる抗菌効果があることが報告されている (Yuhua *et al.*, 2011)。しかしポリリジンのウイルスへの作用機構はいまのところ解明されておらず、今回の結果をもたらしたメカニズムについては今後検討していく必要があると考えられる。

フェルラ酸においてもポリリジンとほぼ同等の効果が見られたが、効果が認められた添加濃度では、酸味が強くなってしまうため、食味に影響を及ぼす可能性が考えられた。グリシン酢酸ナトリウム製剤の不活化効果はどれも 1log 以下の減少量であり、不活化効果をもたないことがわかった。グリシン酢酸ナトリウムにおける抗菌メカニズムについては、pH が下がって疎水性となったところで細胞内に入り込み、解離して水素イオンを放出することで細胞の ATP を消費させ、細菌を弱らせると考えられているが、このような作用機構は、ウイルス不活化には効果がない可能性が考えられた。

これら薬剤によるウイルス感染価の減少量は多くて 2log 程度であるが、加工段階で入念な洗浄が行われる市販のサラダに 2log 以上のウイルスが混入していることは考えにくいいため、サラダにおいても同様の効果が得られれば、低減効果としては十分であると考えられた。本研究ではサラダ等 RTE 食品中でノロウイルスが長期にわたり感染価を維持すること、その感染力は調味料等では低減できないことが確認できた。しかし、日持ち向上剤、保存料の中には、抗ウイルス活性を有するものが確認され、今後これら薬剤等の実用化に向け、詳細な検討を行うことで、より安全な製品の供給に寄与できると考えられた。

■ 文 献

Rzewutka A, Cook N, Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol. Rev.* 28,441-453(2004)

de Wit MAS, Widdowson MA, Vennema H, de Bruin E, Fernandes T, Koopmans M, Large outbreak of norovirus: The baker who should have known better. *J. Infect.* 55, 188-193(2007)

浜松市、嘔吐・下痢症状等による学校閉鎖等について

<http://www.city.hamamatsu.shizuoka.jp/koho2/emergency/20140116.html> (2014)

浜松市, 食中毒発生第1号に係る検査結果について(第4報)

<http://www.city.hamamatsu.shizuoka.jp/shise/koho/koho/hodohappyo/h26/1/2014012404.html> (2014)

El-Senousy WM, Costafreda MI, Pintó RM, Bosch A, Method validation for norovirus detection in naturally contaminated irrigation water and fresh produce. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 74-79 (2013)

野田 衛, ノロウイルス食中毒、感染症の話題

http://www.nyusankin.or.jp/scientific/pdf/Nyusankin_479_a.pdf (2013)

Ethelberg S, Lisby M, Böttiger B, Schultz AC, Villif A, Jensen T, Olsen KE, Scheutz F, Kjelsø C, Müller L., 2010. Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. *Euro Surveill.* 15, (2010)

Katharina V, Martijn B, Froukje LV, Saskia AR, Ana MRH, Persistence of human norovirus GI.4 and GI.4, murine norovirus, and human adenovirus on soft berries as compared with PBS at commonly applied storage conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 137-144 (2012)

Gonzalez-Hernandez MB, Bragazzi Cunha J, Wobus CE. Plaque Assay for Murine Norovirus. *J Vis Exp.* 22, e4297 (2012)

Hwang C. Effect of Mayonnaise pH and Storage Temperature on the Behavior of *Listeria monocytogenes* in Ham Salad and Potato Salad. *J Food Prot.* 68, 1628-1634 (2005).

Chang Y, McLandsborough L, McClemnts DJ, Physicochemical Properties and Antimicrobial Efficacy of Electrostatic Complexes Based on Cationic ϵ -Polylysine and Anionic Pectin. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6776-6782 (2011)

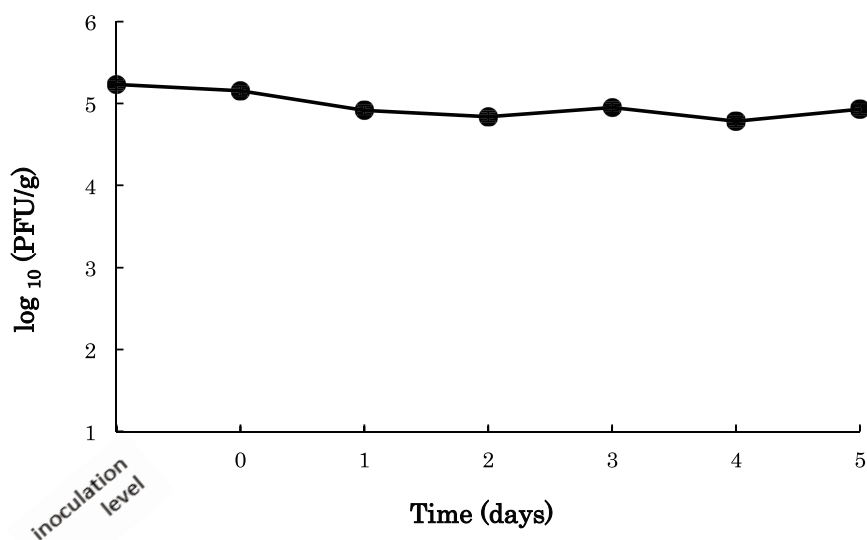


Fig.1 4°Cに保存したコールスローサラダ中のMNVの挙動(n=3).

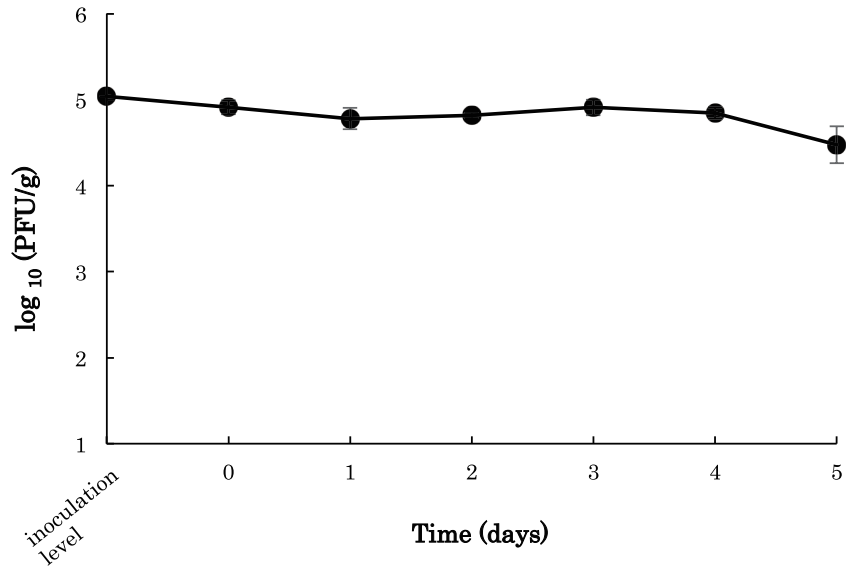


Fig.2 4°Cに保存したタマゴサラダ中のMNVの挙動(n=3).

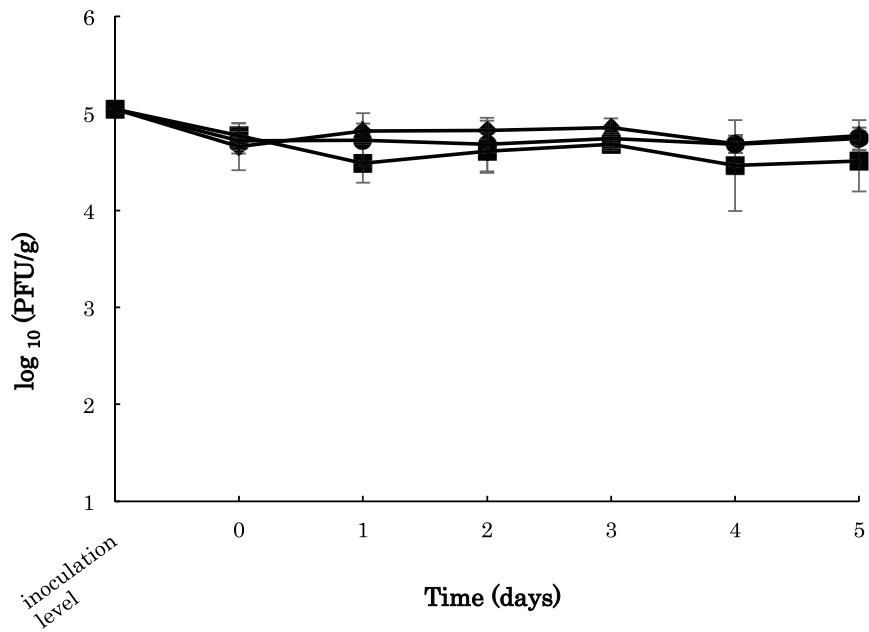


Fig.3 4°Cに保存した各種調味料中でのMNVの挙動(n=3)
 ●; マヨネーズ, ◆; セサミドレッシング, ■; フレンチドレッシング.

Table1 日持ち向上剤、保存料の MNV 低減効果

薬剤名		濃度 (ppm)					
		10000	9000	8000	7000	6000	5000
サンキーパー 381 (ポリリジン製剤)	低減量 (log ₁₀)	2.04	1.64	2.18	1.72	2.32	1.27
フェルラ酸	低減量 (log ₁₀)	1.82	2.01	2.09	2.11	1.72	1.96
アートフレッシュ 101 (グリシン酢酸ナトリウム製剤)	低減量 (log ₁₀)	0.41	0.44	0.64	1.35	0.49	0.79
アートフレッシュ 108 (グリシン酢酸ナトリウム製剤)	低減量 (log ₁₀)	0.60	0.67	0.54	1.08	1.09	1.37
サンキーパー S-30 (グリシン酢酸ナトリウム製剤)	低減量 (log ₁₀)	0.37	0.64	0.60	0.64	2.03	0.67