

=原 著=

# ネコカリシウイルスに対する抗ウイルス活性を示す 食品添加物および食品素材の探索

田坂 寛之<sup>\*1</sup>・國武広一郎<sup>\*1</sup>・西谷 巧太<sup>\*1,\*2</sup>・  
盛田 隆行<sup>\*1,\*2,†</sup>・勢戸 祥介<sup>\*2</sup>

(<sup>\*1</sup> 攝津製油株式会社, <sup>\*2</sup>大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

(受付: 2018年10月29日)

(受理: 2019年4月24日)

## Screening for the Antiviral Materials for Norovirus from Food Additives and Materials

Hiroyuki TASAKA<sup>\*1</sup>, Koichiro KUNITAKE<sup>\*1</sup>, Kota NISHITANI<sup>\*1,\*2</sup>,  
Takayuki MORITA<sup>\*1,\*2,†</sup> and Yoshiyuki SETO<sup>\*2</sup>

(<sup>1</sup> Settsu Oil Mill, Inc., Chikkoshinmachi, Nishi-ku, Sakai 592-8331)

(<sup>2</sup> Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University,  
Orai-kita Izumisano 598-0048; <sup>†</sup>Corresponding author)

Total of 52 food additives and food materials were screened using norovirus surrogate feline calicivirus (FCV) to assess the effect of reduction against norovirus. Over 0.01% GSE (Grape Seed Extract) ethanol solution and FCV solution mixed by 1:1 for 1 min at room temperature, the virus infectivity were reduced <1/1,000. We had found out the effective antiviral activity in GSE containing Proanthocyanidin.

### 緒 言

ノロウイルス (以下NoVと略す) は、カリシウイルス科ノロウイルス属に分類され、冬季に多発するウイルス性急性胃腸炎の主な病原ウイルスであり、乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層に感染し、嘔吐・腹痛・下痢・発熱などの症状を引き起こす<sup>2)</sup>。NoVはウイルス性食中毒の主要な病原因子であり例年事件数・患者数ともに食中毒統計の上位を占めている<sup>4)</sup>。さらに乳幼児施設・学校・病院・高齢者施設などで集団胃腸炎事例の発生が多数報告されている<sup>3,6)</sup>。NoVの感染経路は、水やカキ等の二枚貝以外にもNoVに汚染された種々の食品を介してヒトに経口感染することが知られており、近年ではNoV感染調理従事者の手指を介した食材や調理器具等の汚染を原因とする食中毒事例が多数報告されている<sup>3)</sup>。NoVの感染拡大を防止するには、手洗いによる物理的なウイルス除去、食材の十分な加熱調理、調理器具

の洗浄・消毒、トイレやドアノブ等不特定多数の人の接触が考えられる箇所の消毒などが極めて重要である。NoVの消毒方法として、85~90°Cで90秒間以上の加熱、200 ppm以上の次亜塩素酸ナトリウムによる浸漬 (嘔吐物や糞便の処理では5,000 ppm以上) が推奨されている<sup>5)</sup>。しかしながら、調理場などにおいては加熱消毒に耐えられない調理器具が存在するといった問題、次亜塩素酸ナトリウムの漂白作用による使用環境への影響および有機物存在下における消毒効果の低下といった問題がある。また、エタノールや逆性石鹼ではNoVに対して十分な消毒効果が得られないことが報告されている<sup>1)</sup>。このような状況のもと食品製造現場などでは安全で簡便に使用でき、NoVに対して効果のある消毒剤の開発が求められている。

本研究では、食品製造現場等への応用が可能であり、高い抗NoV活性を示す物質を見いだすことを目的として、NoV代替ネコカリシウイルスを用いて抗ウイルス効果の検討を行った。NoVは簡便な培養方法が開発されておらず、抗ウイルス効果の測定には同じカリシウイルス科のネコカリシウイルス (カリシウイルス科ベジウ

<sup>†</sup> 連絡先

<sup>\*1</sup> ☎ 592-8331 堺市西区築港新町1-5-10

<sup>\*2</sup> ☎ 598-0048 泉佐野市りんくう往来北1-58

Table 1. Description of food additives and food materials and antiviral activity

Product name	Additive concentration (wt%)	Main component	Company
サンソフト <sup>®</sup> No.760	1.0%	Monocaprin	Taiyo Kagaku Co., Ltd.
サンソフト <sup>®</sup> No.750	1.0%	Monolaurin	Taiyo Kagaku Co., Ltd.
トマテノール <sup>®</sup>	1.0%	Naringenin chalcone	Kikkoman Biochemifa Company
イソフラボンK	1.0%	Soybean isoflavone aglycone	Kikkoman Biochemifa Company
サンメリン <sup>®</sup> AO	1.0%	Enzymatically Modified isoquercitrin	San-Ei Gen F.F.I., Inc.
ナイシンA	1.0%	Nisin	San-Ei Gen F.F.I.,Inc.
ゴマペプチド	0.5%	Sesame peptide	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
シンナムアルコール	0.05%	Cinnamic alcohol	Toyotama International Inc.
シンナムアルデヒド	0.05%	Cinnamic aldehyde	Toyotama International Inc.
リナロール	0.05%	Linalool	Toyotama International Inc.
フェニルエチルアルコール	0.05%	Phenethyl alcohol	Toyotama International Inc.
オイゲノール	0.05%	Eugenol	Toyotama International Inc.
アロエエキス	0.1%	Aloesin・Aloetin	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
ムクロジエキス	0.1%	Saponin	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
ニンニクエキス末	0.1%	Alliin	Koei Kogyo Co., Ltd.
サンテアニン <sup>®</sup>	0.02%	L-Theanine	Taiyo Kagaku Co., Ltd.
ドクダミエキス	0.1%	Quercitrin	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
ヨモギエキス	0.1%	Tannin	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
レモンバーム抽出物	0.1%	Citral	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
ネオバンブス <sup>®</sup>	0.1%	Bamboo dry distillate	Shiraimatsu Pharmaceutical Co., Ltd.
NIKKOL <sup>®</sup> Decaglyn 1-M	0.3%	Decaglyceryl monomyristate	Nikko Chemicals Co., Ltd.
NIKKOL <sup>®</sup> Decaglyn 5-OV	0.3%	Decaglyceryl pentaoleate	Nikko Chemicals Co., Ltd.
キトサンLL-40	0.3%	Chitosan	Yaizu Suisankagaku Industry Co., Ltd.
ワサビスパイシック <sup>®</sup> 乳化物	1.0%	Allyl isothiocyanate	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
アスタキサンチン	0.5%	Astaxanthin	Oryza Oil&Fat Chemical Co., Ltd.
NIKKOL <sup>®</sup> SS-10 V	0.3%	Sorbitan monostearate	Nikko Chemicals Co., Ltd.
NIKKOL <sup>®</sup> SP-10 V	0.3%	Sorbitan monopalmitate	Nikko Chemicals Co., Ltd.
NIKKOL <sup>®</sup> SL-10	0.3%	Sorbitan monolaurate	Nikko Chemicals Co., Ltd.
バジルスパイシック <sup>®</sup> 乳化物	1.0%	Linalool	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
ジンジャーパイシック <sup>®</sup> 乳化物	1.0%	Gingerol	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
ウコン乾燥エキスF	1.0%	Curcumin	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
オリーブリーフエキス末	0.3%	Oleuropein	Koei Kogyo Co., Ltd.
(Z)-3-Hexenol	0.3%	(Z)-3-Hexenol	Zeon Corporation
(E)-2-Hexenol	0.3%	(E)-2-Hexenol	JNC Corporation.
ゴマスパイシック <sup>®</sup> 乳化物	1.0%	Sesamin	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
NIKKOL <sup>®</sup> Hexaglyn PR-15	0.3%	Hexaglyceryl polyricinoleate	Nikko Chemicals Co., Ltd.
NIKKOL <sup>®</sup> Decaglyn PR-20	0.3%	Decaglyceryl polyricinoleate	Nikko Chemicals Co., Ltd.
NIKKOL <sup>®</sup> Decaglyn 10-OV	0.3%	Decaglyceryl decaoleate	Nikko Chemicals Co., Ltd.
サンメリン <sup>®</sup> YAF	0.3%	Chinese bayberry extract	San-Ei Gen F.F.I.,Inc.
ザクロ果皮エキス末	0.3%	Ellagic acid	Koei Kogyo Co., Ltd.
サラキープ <sup>®</sup> PE	0.6%	Saponin	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
キラヤニン <sup>®</sup> P-20	2.0%	Saponin	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
月桃葉乾燥エキスF	0.5%	Cineol	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
ザクロ花エキス末	0.3%	Punicalagin	Koei Kogyo Co., Ltd.
カリンエキス	1.0%	Tannin	Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.
ポリフェノン <sup>®</sup> PF	1.0%	Catechin	Mitsui Norin Co., Ltd.
ポリリジン	1.0%	$\epsilon$ -Polylysine	JNC Corporation.
赤ワインエキス末	0.6%	Proanthocyanidin	Koei Kogyo Co., Ltd.
(E)-2-Hexenal	0.3%	(E)-2-Hexenal	JNC Corporation.
リンゴ酸	1.6%	Maric acid	Fuso Chemical Co., Ltd.
サンフェノン <sup>®</sup> BG-3	0.01%	Catechin	Taiyo Kagaku Co., Ltd.
グラヴィノール <sup>®</sup> T	0.02%	Proanthocyanidin	Kikkoman Biochemifa Company

ウイルス属、以下FCVと略す)が代替ウイルスとして汎用されている。FCVを用いた液体製剤の抗ウイルス効果測定では、ウイルス液と被検試料が容積比1:9で混合処理され効果判定されることが多いが、1:9では被検試料の存在比が多いため実際に消毒剤として使用する場合には清拭や噴霧による環境消毒を想定したのではなく、特に食品製造現場をはじめとした水を扱う環境を反映した試験条件とは言えない。本研究では実際の使用場面を想定し、より被検試料の存在比が少ない条件下で効果を発揮する物質の探索を試みた。今回は、安全性が高いあるいは安全性が認められており食品に混在しても問題とならない食品添加物・食品素材を対象に、生残ウイルス量を1/1,000以下に減少させる抗ウイルス効果を有する素材の探索を行ったので報告する。

### 材料および方法

#### 1. 供試ウイルスおよび培養細胞

FCVはF9株(ATCC: VR-782)を用いた。また、FCVの宿主細胞としてネコ腎臓由来細胞(Crandell-Reese feline kidney cells, CRFK細胞, ATCC: CCL-94)を用いた。CRFK細胞の培養にはDMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Wako)に5%FBS(Fetal Bovine Serum)を添加して用いた。培養は37°C, 5%CO<sub>2</sub>条件下で行った。FCVはCRFK細胞に感染させて2~3日間培養した後、培養液を回収し10,000×g, 10分間で遠心した上清をウイルス液として使用時まで-80°Cにて凍結保存した。

#### 2. 供試食品添加物および食品素材

市販されている食品添加物および食品素材の計52品目を使用した。各素材は50~70%のエタノール水溶液に溶解させた後試験に供した。各被検試料の一覧および使用濃度をTable 1に示した。

#### 3. 抗FCV効果のスクリーニング

ウイルス液は $2 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> (Tissue culture infectious dose 50%, 50%組織培養細胞感染量)/0.1 mLに調整して用いた。被検試料液とウイルス液を等量(1:1)で混合した後、室温で30分間、5分間もしくは1分間ローテーターを用いてかくはんし混合液とした。DMEMを用いて混合液の10倍段階希釈系列を作製し、各希釈液を96穴プレートに単層培養したCRFK細胞に1穴ずつ接種した。5日間培養した後に顕微鏡下での細胞変性効果(cytopathic effect; CPE)の有無を確認しウイルス力価を測定した。対照としてPBSを用いて同様の操作を行った。対照と比較して対数値で3以上のウイルス力価減少が見られた被検試料液についてさらに抗ウイルス効果を測定した。

#### 4. ウイルス感染価(TCID<sub>50</sub>)の測定

抗FCV効果のスクリーニングにおいて、対数値で3以上のウイルス力価減少が見られた被検試料液およびエタノールの詳細な抗ウイルス効果を確認するため、生残

ウイルス感染価の測定を行った。抗FCV効果のスクリーニングと同様に、等量(1:1)あるいは1:9で混合処理を行い、DMEMを用いて混合液の10倍段階希釈系列液を作製し、96穴プレートに単層培養したCRFK細胞に4穴ずつ接種した後、37°C, 5%CO<sub>2</sub>存在下で1時間ウイルスを吸着させた後、希釈液を取り除き新しいDMEMを0.1 mL加えて5日間培養した。その後、各穴の培養液の一部を新しいCRFK細胞に接種し盲継代を行い、顕微鏡下でのCPEの有無を確認した。ウイルス感染価(TCID<sub>50</sub>)はReed-Muench法により算出した。

## 結 果

### 1. ウイルス感染価測定によるエタノール水溶液の抗ウイルス効果

58%エタノール溶液あるいは75%エタノール溶液がFCVに与える影響を調べた。ウイルス液とエタノール溶液を等量混合した場合、58%エタノールでは1分間および5分間の処理において生残ウイルス感染価の減少はほぼ認められなかったが、75%エタノールで混合処理した場合の生残ウイルス感染価の減少量(対数値)は1分間で0.84, 5分間で2.17だった(Fig. 1A)。ウイルス液とエタノール水溶液を1:9で1分間混合処理した場合のウイルス感染価減少量は、58%エタノールが1.62, 75%エタノールが3.12であり、1:9で5分間混合処理した場合

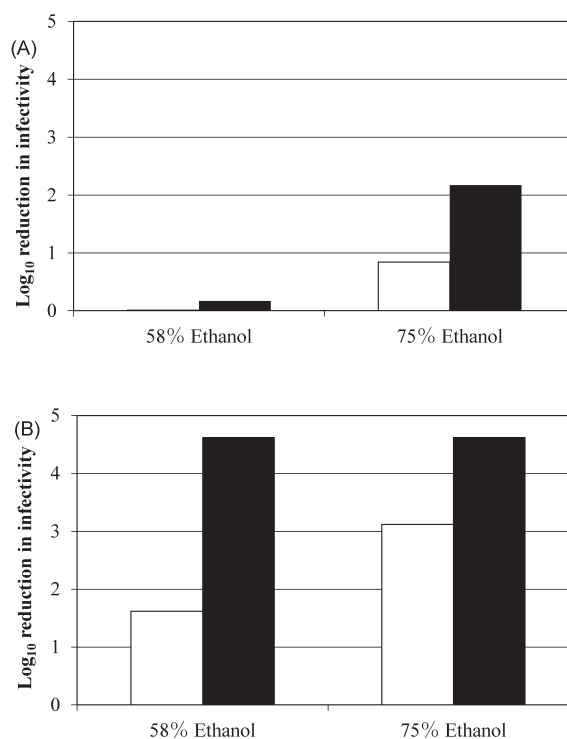


Fig. 1. Effect of Ethanol solution on inactivation of FCV. Results are expressed as Log<sub>10</sub> reduction in TCID<sub>50</sub>. The virus solution were mixture by 1:1(A) and 1:9 (B) with ethanol solution. The incubation period was 1 min (open column) and 5 min (closed column).

Table 2. Antiviral activity\* of screening positive products

Product name	Additive concentration (wt%)	Incubation time	
		5 min	1 min
ザクロ花エキス末	0.01%	4	2
サンフェノン <sup>®</sup> BG-3	0.01%	3	1
グラヴィノール <sup>®</sup> T	0.01%	4	4

\* Antiviral activity were expressed as Log<sub>10</sub> reduction in TCID<sub>50</sub>.

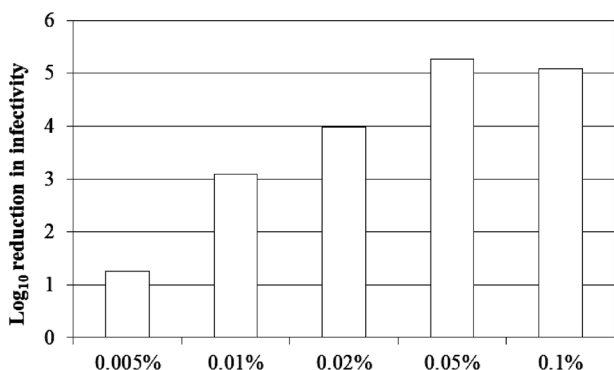


Fig. 2. Effect of GSE/58% Ethanol solution on FCV. Results are expressed as Log<sub>10</sub> reduction in TCID<sub>50</sub>. The virus solution were mixed by 1:1 with various concentration of GSE.

はいずれの濃度でも4.66以上（検出限界以下に減少）であった（Fig. 1B）。

## 2. 市販の食品添加物・食品素材の抗FCV効果スクリーニング

52品目の食品添加物・食品素材（Table 1）について、抗ウイルス効果のスクリーニングを行った。その結果5分間の混合処理では、ザクロ花エキス、サンフェノン<sup>®</sup>BG-3およびグラヴィノール<sup>®</sup>Tの3種類で生残ウイルス力価の減少量（対数値）が3以上の抗ウイルス効果が認められたが、1分間の混合処理で生残ウイルス力価の減少量が3以上認められたものはグラヴィノール<sup>®</sup>T（減少量=4）のみであった（Table 2）。グラヴィノール<sup>®</sup>Tはブドウ種子を原料として抽出された素材であるため、以下GSE（Grape Seed Extract; ブドウ種子抽出物）とした。

## 3. 感染価測定法による評価

スクリーニングで抗ウイルス効果を示したGSEについて、感染価評価による詳細な抗ウイルス性評価や濃度依存性の検討を行った。0.005～0.1%GSE含有58%エタノール溶液とウイルス液を等量混合し室温で1分間混合処理したところ、GSEを0.01%以上含む溶液においてウイルス感染価減少量が3以上となり生残FCVは1/1,000以下に減少した（Fig. 2）。また、0.05%以上ではウイルス感染価減少量が約5に達し、plateauを示した。

## 考 察

アルコール消毒は食品製造現場で広く一般的に使用されている。しかしながら、FCVを含む代替ウイルスを用いた実験からNoVはアルコールに対して耐性を示すことが知られており<sup>1)</sup>、調理従事者の手指や調理器具等の消毒不足によるNoV食中毒が多発している<sup>3)</sup>。FCVに対する各種エタノール水溶液の抗ウイルス効果を調べたところ、ウイルス液とエタノール水溶液を1:9で混合した場合、1分間処理では75%エタノール、5分間処理では58および75%エタノールの両エタノール水溶液で3以上のウイルス感染価減少が認められた（Fig. 1B）。これらのことからウイルス液とエタノール水溶液を1:9の割合で混合させた場合、消毒剤として汎用される50～75%濃度のエタノールでも抗FCV効果を有することが示唆された。しかしながら、1:9という混合条件はエタノールの消毒剤としての利用や産業応用を想定したものではなく、これらの結果のみで有効性を断定することができない。エタノール水溶液とウイルス液を等量（1:1）混合処理した場合、5分間処理では75%のエタノールであっても感染価対数減少値が2.17と低く、十分な抗ウイルス効果は認められなかった（Fig. 1A）。そこで本研究では産業応用性も考慮し、いずれのエタノール濃度でも効果の見られなかった1:1の混合比において高い抗ウイルス効果を発揮できる素材の探索および抗ウイルス効果の検討を行った。

NoVに効果のある抗ウイルス成分についての報告は少なく、抗ウイルスメカニズムは不明な点が多い。本研究では、疎水成分とウイルス表面との相互作用や食品乳化剤成分の界面活性作用による影響、ポリフェノールなどのタンニン成分がもつタンパク質への結合性による影響など、NoVに対して影響を与える可能性があり、食品添加物や食品素材として用いられる安全性の高いものを対象に検討を行った。今回52品目の素材より調製した被検試料とウイルス液を等量混合で30分間処理したところ複数の素材においてウイルス力価を低下させるものが認められたが（data not shown）、処理時間を5分間で検討したところ、抗ウイルス効果を有するものはTable 2に示した3つの素材となり、さらに1分間という短時間の処理で抗ウイルス効果が認められたのは0.01%GSEアルコール水溶液のみであった。GSEを含む58 vol%エタノール水溶液はウイルス液との等量混合において1分間の混合処理で液中のウイルス感染価を1/1,000以下に減少させた（Fig. 2）。また、GSE水溶液でも同等の抗ウイルス効果があった（data not shown）。GSEの主成分であるProanthocyanidinは多くの植物に含まれるポリフェノールの一種であり、タンパク質へ結合する性質を持つ。それゆえにFCVやNoVのカプシドタンパク質に結合することで抗ウイルス効果を発現するものと考えられる。GSEは天然由来の素材でありその

他の成分も影響を与えている可能性があることや、ポリフェノールやタンニン類を含むドクダミエキスやヨモギエキスで効果が見られなかったことから、すべてのポリフェノールおよびタンニン類が同様の効果を示すわけではない。したがってGSEの抗ウイルスメカニズムの解明のためには、さらなる検討が必要である。

今回、食品製造現場などへの応用性や使用時の安全性を重要視し、食品添加物および食品素材を対象として抗ウイルス効果の検討を行った。対象とした素材の中には30分間の長時間処理において効果が示唆されていたものもあったが、溶解性、臭気および色調などの安定性の問題により産業応用が困難と考え、以後対象から除外した。

本研究において抗ウイルス効果を示したGSEは、エタノール製剤などにも配合することができ、また国内においては既存添加物に属する天然由来の食品添加物である。すべてのGSEが食品添加物として販売されているわけではないが、GSEは食品素材として使用実績があり動物実験等で安全性が確認されている<sup>7)</sup>天然素材である。GSEを含むエタノール製剤は、食品製造現場やNoVによる二次汚染が危惧される部位などの消毒に役立つことが期待できることから、現在われわれは製品化を視野に入れて引き続き検討を重ねている。一方、GSEを用いて本研究と同様の方法でFCVおよびNoVを処理したところ、RT-PCR法によりウイルス遺伝子が検出されなくなったことから<sup>8)</sup>(data not shown)、Proanthocyanidinを含むGSEが有する抗ウイルス効果のメカニズムについて解明する必要があるとともに、今後、本研究のスクリーニングで得られた知見を参考に、新たな抗NoV成分の探索を行うことも予定している。

抄録

計 52 品目の食品添加物・食品素材について、ノロウ

イルス代替ネコカリシウイルスを用いて抗ウイルス活性のスクリーニングを行った。その結果、0.01%以上のGSE(Grape Seed Extract) エタノール水溶液とウイルス液を等量混合した場合、室温 1 分間後には、ネコカリシウイルスの感染価は 1/1,000 に減少した。これらのことから、Proanthocyanidin を含む GSE が抗ウイルス活性を有することが明らかになった。

## 文 献

- 1) Doultree, J. C., Druce, J. D., Brich, C. J., Bowden, D. S., Marshall, J. A.: Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Infect.*, 41, 51-57(1999).
- 2) Green, K. Y.: 2007. *Caliciviridae: The noroviruses*, p. 949-979. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 5th ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- 3) 林 志直: ノロウイルス食中毒と感染性胃腸炎. *食衛誌*. 51, 279-284 (2010)
- 4) 厚生労働省: 食中毒統計資料. [https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html)
- 5) 厚生労働省: 大量調理施設衛生管理マニュアル. 平成29年6月16日, 生食発0616第1号
- 6) Kumazaki, M., Uauko S.: Norovirus genotype distribution in outbreaks of acute gastroenteritis among children and older people: an 8-year study. *BMC Infect. Dis.*, 16, 643 (2016).
- 7) 西川秋佳: 添加物部会資料既存添加物の安全性の見直しに関する調査研究ブドウ種子抽出物及びラック色素. 平成28年8月30日, 厚生労働省 薬事・食品衛生審議会資料
- 8) 田坂寛之, 盛田隆行, 勢戸祥介: ノロウイルスに効果のある食品添加物・食品素材の探索. 第32回食品微生物学会学術総会講演要旨集. 92(2011)