

平成 20 年度

ノロウイルスの不活化条件に関する調査

報告書

国立医薬品食品衛生研究所

食品衛生管理部

山本 茂貴

野田 衛

I 背景

近年、ノロウイルスによる食中毒・感染症が増加し、国民の健康に大きな被害をもたらしている。過去数年間の食中毒統計によると、ノロウイルスによる食中毒は、事例数ではカンピロバクターに次いで第二位、患者数では第一位を占めていたが、2006年末の未曾有の大流行により、2006年は患者数、事例数とも第一位となり、事例数で全食中毒事例の半数近く、患者数では3/4近くを占めた。このノロウイルスの大流行を受け、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会において、平成19年10月12日に「ノロウイルス食中毒対策について(提言)」が取りまとめられるなど、ノロウイルス対策は食中毒、感染症の両面から厚生労働行政上重要な課題のひとつとなっている。

ノロウイルスによる食中毒・感染症の未然予防および発生後の拡大防止のためには、汚染環境等に存在するノロウイルスを加熱あるいは消毒・殺菌剤等により不活化(死滅)させることが極めて重要である。厚生労働省はノロウイルスを不活化させる方法として、85℃・1分以上の加熱および次亜塩素酸ナトリウムによる処理が有効であるとして、その適用を推奨している。しかしながら、すべての汚染物に加熱あるいは次亜塩素酸ナトリウムによる消毒が適用できるわけではなく、特に、次亜塩素酸ナトリウムは、金属に対する腐食作用、皮膚等に対する刺激作用、衣類に対する漂白作用等があるため、その使用が制限される場合が多く、次亜塩素酸ナトリウムに替わる有効な消毒剤等の開発が強く求められている。また、実際の現場において、ノロウイルスは有機物とともに存在するが多いため、試験管内の不活化効果は実際の現場での有効性とは必ずしも一致せず、現場に即した環境(有機物存在下)での有効性評価も必要とされている。さらに、近年、ノロウイルスに有効とされる消毒剤等が開発、販売されているが、それらについての有効性評価はあまり行われていない。一方、ノロウイルスに有効な消毒剤等に関するデータについて多くの文献的報告があり、消毒剤等の有効性に関する情報整理も必要とされている。

II 目的

以上の背景を踏まえて、ノロウイルスの不活化に関し実験的に各種消毒剤等の有効性を検証すること、およびこれまで得られている科学的データを取りまとめ、ノロウイルスの不活化条件等について情報を整理することを目的として、本調査を行った。

今年度は、下記の事項について実施した。

1. ノロウイルスの代替ウイルスであるネコカリシウイルスを用いての市販消毒剤等を中心とした、有機物存在下での不活化効果の有効性の効果判定試験
2. リアルタイムPCR法による遺伝子定量法での効果判定の検証実験
3. ノロウイルス等の不活化等に関する文献情報の収集および取りまとめ

III 各種消毒剤等のネコカリシウイルスに対する不活化効果試験

1. 方法

(1) 供試ウイルス

ネコカリシウイルス (FCV) F9株をCRFK細胞に接種し、37℃、1時間吸着、PBS(-)で3回

洗浄後、血清不含イーグル MEM 培地で、37°C、CO₂ フラン器内で静置培養した。全ての細胞に細胞変性効果 (CPE) が生じた時点 (培養後約 2 日目) で、培養液および細胞を回収し、凍結融解を 3 回繰り返した後、3,000rpm、30 分、遠心分離した上清を試験用ウイルス原液とした。試験用ウイルス原液は少量に小分けし、使用時まで -80°C で保存した。

試験時に、試験用ウイルス原液を、PBS(-)、0.2% 牛血清アルブミン (Sigma A7979-50ML) 加 PBS(-)、あるいは 20% 牛血清アルブミン加 PBS(-) を等量加え、有機物を含まないウイルス液 (FCV-PBS(-))、有機物 (牛血清アルブミン) を 0.1% (FCV-0.1% 牛血清アルブミン) あるいは 10% (FCV-10% 牛血清アルブミン) 含むウイルス液の 3 種類のウイルス液を調製し、それぞれ不活化試験に供した。なお、供試ウイルス液は不活化試験時に等量の消毒剤等と混合されるため、不活化試験時に FCV-0.1% 牛血清アルブミンは 0.05%、FCV-10% 牛血清アルブミンは 5% の牛血清アルブミンを含むことになる。

(2) 供試消毒剤等

不活化試験に供した消毒剤等およびそれらの調整方法の概要を表 1 に示した。

(3) 不活化試験

3 種類のウイルス液各 25 μ l と各消毒剤等 25 μ l を混和し、室温で 3 分間静置した。その後、0.1N チオ硫酸ナトリウム 5 μ l を加え混合した後、速やかに反応液 20 μ l を血清不含イーグル MEM 培地 900 μ l で希釈混和した。不活化試験は消毒剤等ごとに 3 回繰り返した。

(4) 不活化試験後の生存ウイルスの定量

血清不含イーグル MEM 培地で希釈した反応液を、さらに血清不含 MEM 培地で 10 倍階段希釈し、各希釈液 25 μ l を 96 穴マイクロプレートに培養した CRFK 細胞に接種し (各希釈液につき 4 穴を使用)、2% 牛胎児血清加イーグル MEM 培地で 37°C、CO₂ 加フラン器内で培養した。接種後 7 日～8 日目に CPE の有無を観察し、50% 以上の細胞に CPE が認められた場合、CPE 陽性 (不活化されていない) とした。生存ウイルス量は不活化試験に供したウイルス液 25 μ l 中の生存ウイルス量 (TCID₅₀) で示した。定量試験の結果、生存ウイルスがまったく確認できない場合、32TCID₅₀/25 μ l 以下の生存ウイルス量となる。

2. 結果 (図 1、表 2)

今年度実施したネコカリシウイルスを用いた不活化試験の結果を図 1 に、また昨年度実施した結果と合わせてその概要を表 2 に取りまとめた。

(1) 炭酸ナトリウム及び過炭酸ナトリウム

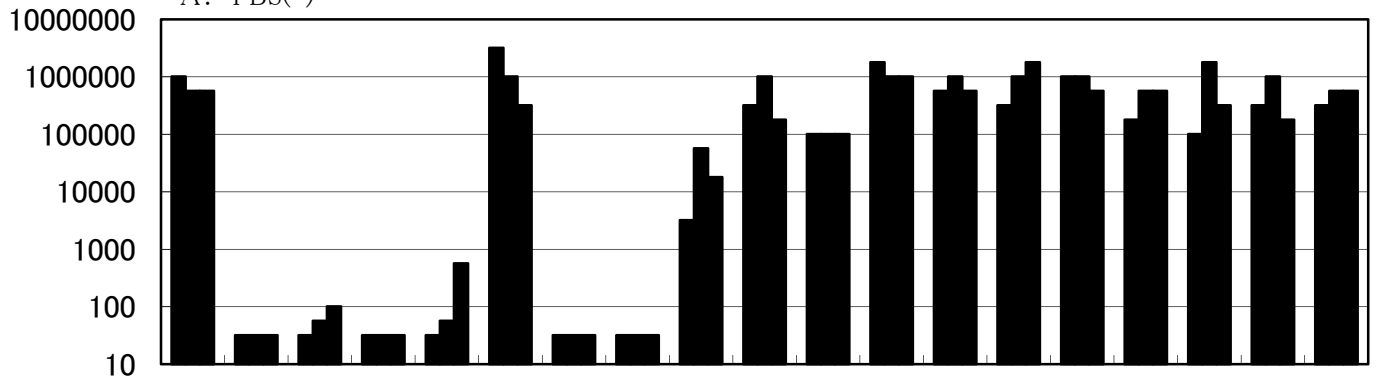
炭酸ナトリウム及び過炭酸ナトリウムによるネコカリシウイルスに対する不活化効果の有効性が報告されている (1) ことから、検証試験を実施した。1.25% 炭酸ナトリウム (最終濃度) および 2.5% 過炭酸ナトリウムで PBS(-) 中、0.05% 牛血清アルブミン存在下で検出限界以下 (4log₁₀ 以上減少) となり、5% 牛血清アルブミン存在下で 3log₁₀ 程度減少した。この不活化の程度は 5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムには及ばないまでも、1,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムと同等以上の不活化効果であった。0.25% 炭酸ナトリウムおよび 0.5% 過炭酸ナトリウムでは PBS(-)、0.05% 牛血清アルブミン存在下で 3～4log₁₀ の減少を示したが、5% 牛血清アルブミン存在下では不活化効果は認められなかった。

表 1 供試消毒剤およびその調製法

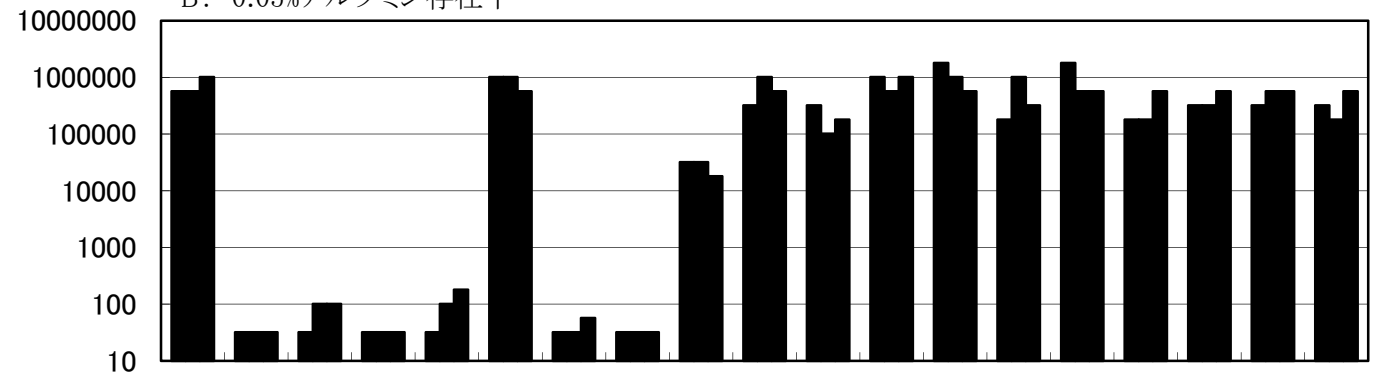
消毒剤等	試験液の調整法	備考
炭酸ナトリウム	Milli Q 水で希釈して、供試濃度の 2 倍濃度の試験液を作成。	試験時の濃度： 1.25% 0.25%
過炭酸ナトリウム	Milli Q 水で希釈して、供試濃度の 2 倍濃度の試験液を作成。	試験時の濃度： 2.5% 0.5%
市販品 J	購入品を直接使用	[用途]除菌・防カビ・消臭 [主成分]フェノール類・プロパノール・水酸化ナトリウム・エチレングリコール・水
市販品 K	購入品を直接使用	[用途]除菌・消臭 [主成分]二酸化塩素液・界面活性剤・シリコン系消泡剤
市販品 L	購入品を直接使用	[用途]除菌・防カビ・消臭 [主成分]二酸化塩素水溶液
市販品 M	購入品を直接使用	[用途]除菌消臭効果 [主成分]殺菌電解水 99.87%以上、ClO ₂ 0.13%未満
市販品 N	購入品を直接使用	[用途]殺菌・消臭 [主成分]強酸性水
市販品 O	購入品を直接使用	[用途]消臭抗菌 [主成分]水・ユーカリエキス・グリセリン脂肪酸エステル・乳酸・キトサン・エタノール・コカミドプロピルベタイン・焦性ブドウ酸
市販品 P	購入品を直接使用	[用途]手指、皮膚の殺菌消毒 グルコン酸クロルヘキシジン、塩酸アルキルジアミノエチルグリシン
市販品 Q	購入品を直接使用	[用途]手指・皮膚の殺菌・消毒 [主成分]ベンザルコニウム塩化物 0.05w/v%、添加物：DL-ピロリドンカルボン酸Na、クエン酸、クエン酸Na、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、エタノール
市販品 R	購入品を直接使用	[用途]除菌・除ウイルス [主成分]陽イオン系界面活性剤(第4級アンモニウム塩系)、アルカリ剤
市販品 S	購入品を直接使用	[用途]除菌 [主成分]グレープフルーツ種子抽出物(GSE)、エチルアルコール、フィチン酸、精製水
市販品 T	購入品を直接使用	[用途]手指・皮膚の洗浄・消毒 [主成分]エタノール 76.9~81.4vol%、/添加物:ヒアルロン酸Na、グリセリン、トコフェロール酢酸エステル、カルボキシビニルポリマー、トリエタノールアミン
市販品 U	購入品を直接使用	[用途]手指用清浄ジェル [主成分]エタノール、水、イソプロパノール、カルボマー、ミリスチン酸イソプロピル、香料、グリセリン、PG、酢酸トコフェロール、オキシベンゾン-4、DIPA
市販品 V	購入品を直接使用	[用途]サントラージェル(アルコール系消毒消臭除菌剤) [主成分]65%エタノール、5%IPA、アロエ、セージ、ローズマリー、ネトル、ジャモミレ、他
市販品 W	購入品を直接使用	[用途]すり傷、切り傷、さし傷、かき傷、靴ずれ、創傷面の洗浄・消毒 [主成分] 50ml 中、塩化ベンゼトニウム 0.02g、/添加物：ヒドロキシプロピルセルロース LPG

図1 各種消毒薬等によるネコカリシウイルスに対する不活化作用

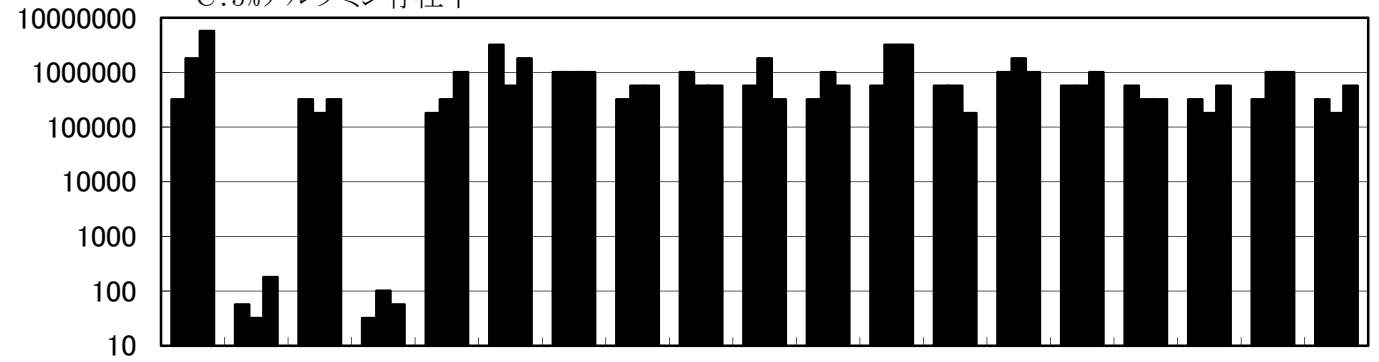
A: PBS(-)



B: 0.05%アルブミン存在下



C: 5%アルブミン存在下



- 対照 (PBS(-))
- 炭酸ナトリウム(試験時 1.25%)
- 炭酸ナトリウム(試験時 0.25%)
- 過炭酸ナトリウム(試験時 2.5%)
- 過炭酸ナトリウム(試験時 0.5%)
- 市販品(1)
- 市販品(2)
- 市販品(3)
- 市販品(4)
- 市販品(5)
- 市販品(6)
- 市販品(7)
- 市販品(8)
- 市販品(9)
- 市販品(10)
- 市販品(11)
- 市販品(12)
- 市販品(13)
- 市販品(14)
- 市販品(15)
- 市販品(16)
- 市販品(17)
- 市販品(18)
- 市販品(19)
- 市販品(20)

表2 各種消毒剤等のネコカリシウイルスに対する不活化効果

試験試薬	有機物の存在											
	対照 (PBS(-))			0.05%アルブミン			5%アルブミン					
	平均	±	SD	減少	平均	±	SD	減少	平均	±	SD	減少
接種ウイルス	4.25	±	0.25	対照	4.33	±	0.14	対照	4.08	±	0.14	対照
5000ppm 次亜塩素酸 Na	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4
1000ppm 次亜塩素酸 Na	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	2.75	±	0.00	1
200ppm 次亜塩素酸 Na	0.00	±	0.00	≥4	0.08	±	0.14	4	3.92	±	0.14	0
100ppm 次亜塩素酸 Na	0.75	±	0.75	3	0.42	±	0.52	3	4.00	±	0.25	0
最終濃度 70%エタノール	0.75	±	0.25	3	0.75	±	0.90	3	2.00	±	0.25	2
最終濃度 60%1-プロパノール	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	2.42	±	0.14	1
最終濃度 35%エタノール	2.92	±	0.76	1	2.83	±	0.63	1	3.83	±	0.14	0
最終濃度 30% 1-プロパノール	0.00	±	0.00	≥4	0.08	±	0.14	4	2.00	±	0.25	2
市販エタノール (最終濃度 38.5%~40.7%)	0.42	±	0.52	3	0.83	±	0.29	3	4.17	±	0.29	0
最終濃度 1.25% 炭酸ナトリウム	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	0.33	±	0.38	3
最終濃度 0.25% 炭酸ナトリウム	0.25	±	0.25	4	0.33	±	0.29	4	3.92	±	0.14	0
最終濃度 2.5% 過炭酸ナトリウム	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	0.25	±	0.25	3
最終濃度 0.5% 過炭酸ナトリウム	0.50	±	0.66	3	0.42	±	0.38	3	4.08	±	0.38	0
市販品 A(次亜塩素酸 Na/消毒)	0.17	±	0.14	4	0.17	±	0.29	4	3.75	±	0.50	0
市販品 B(次亜塩素酸 Na/漂白剤)	0.17	±	0.29	4	0.00	±	0.00	≥4	2.83	±	0.76	1
市販品 C (安定化次亜塩素酸/消臭除菌)	1.67	±	1.15	2	1.50	±	1.32	2	3.92	±	0.38	0
市販品 D(エタノール/清浄)	1.25	±	0.90	3	1.83	±	0.95	2	3.58	±	0.52	0
市販品 E (エタノール/洗浄・食品添加物)	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	4.08	±	0.29	0
市販品 F (ポピオンヨード/殺菌消毒)	2.00	±	0.14	≥2	2.00	±	0.00	≥2	2.00	±	0.00	≥2
市販品 G	4.08	±	0.14	0	4.08	±	0.38	0	4.08	±	0.52	0
市販品 H	3.83	±	0.52	0	4.00	±	0.50	0	4.58	±	0.29	0
市販品 I	4.08	±	0.38	0	4.50	±	0.25	0	4.42	±	0.14	0
市販品 J	4.50	±	0.50	0	4.42	±	0.14	0	4.67	±	0.38	0
市販品 K (二酸化塩素/除菌消臭)	0.00	±	0.00	≥4	0.08	±	0.14	4	4.50	±	0.00	0
市販品 L (二酸化塩素/除菌防かび消臭)	0.00	±	0.00	≥4	0.00	±	0.00	≥4	4.17	±	0.14	0

市販品 M	2.67 ± 0.63	1	2.92 ± 0.14	1	4.33 ± 0.14	0
市販品 N	4.08 ± 0.38	0	4.25 ± 0.25	0	4.33 ± 0.38	0
市販品 O	3.50 ± 0.00	0	3.75 ± 0.25	0	4.25 ± 0.25	0
市販品 P	4.58 ± 0.14	0	4.42 ± 0.14	0	4.75 ± 0.43	0
市販品 Q	4.33 ± 0.14	0	4.50 ± 0.25	0	4.08 ± 0.29	0
市販品 R	4.42 ± 0.38	0	4.08 ± 0.38	0	4.58 ± 0.14	0
市販品 S	4.42 ± 0.14	0	4.42 ± 0.29	0	4.33 ± 0.14	0
市販品 T	4.08 ± 0.29	0	3.92 ± 0.29	0	4.08 ± 0.14	0
市販品 U	4.08 ± 0.63	0	4.08 ± 0.14	0	4.00 ± 0.25	0
市販品 V	4.08 ± 0.38	0	4.17 ± 0.14	0	4.33 ± 0.29	0
市販品 W	4.17 ± 0.14	0	4.00 ± 0.25	0	4.00 ± 0.25	0

()主成分/主用途

(2) 市販消毒剤等

住宅用又は家庭用除菌合成洗剤、スプレータイプ除菌・消臭剤、除菌用ハンドソープ等 14 種類の市販消毒剤等について不活化効果を調べた。本試験ではすべての市販消毒剤等は、等量のウイルス液と混合して試験されているため、市販されている状態(使用濃度)の 1/2 濃度で試験されている。

ネコカリシウイルスに対して明瞭な不活化効果が認められたものは 2 種類の試験液のみ(市販品 K 及び L)で、いずれも、PBS(-)中、0.05%牛血清アルブミン存在下で一部生存ウイルスがみられたもののほぼ不活化された。しかし、5%牛血清アルブミン存在下では不活化効果はあまりみられなかった。市販品 K 及び L はいずれも、二酸化塩素を主成分とするスプレータイプで、キッチン、トイレなどの環境の消臭・除菌剤であった。

次亜塩素酸(0.13%未満)を含む電解水を主成分とする市販品 M は、PBS(-)、0.05%牛血清アルブミン存在下で $1\log_{10}$ 程度の不活化効果が観察された。

3. 考察

昨年引き続き、嘔吐物、糞便等の有機物が多量に存在する場合のノロウイルスの不活化を想定し、5%牛血清アルブミン存在下での各種消毒剤等の有効性を調べた。今年度実施した試験液で、5%牛血清アルブミン存在下での不活化効果が認められたものは、1.25%炭酸ナトリウムおよび 2.5%過炭酸ナトリウムで $3\log_{10}$ 程度減少した。この不活化の程度は 5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムには及ばないまでも、1,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムと同等以上の不活化効果であった。しかし、その減少量は $3\log_{10}$ 程度であり、 $10^6 \sim 10^9$ 個/g 程度のウイルスが存在することを考えると、やはり物理的除去を基本とし、消毒・殺菌を行う前に、可能な限り嘔吐物や糞便等を除去し、除去しきれず残存したウイルスに対し消毒剤等を使用することを原則とすることには変わりはない。今回供試した 14 種類の市販消毒剤等では、5%牛血清アルブミン存在下での不活化効果が確認できたものはみられなかった。

一方、有機物がほとんど存在しない状態では、1.25%炭酸ナトリウムおよび2.5%過炭酸ナトリウムは検出限界以下まで不活化され、生存したウイルスは検出されず、0.25%炭酸ナトリウムおよび0.5%過炭酸ナトリウムでは3~4log₁₀程度の不活化効果があった。市販消毒剤等では2種類の試験液が4log₁₀程度の不活化効果があった。この不活化は200ppm次亜塩素酸ナトリウムとほぼ同等の効果であり、有機物の少ない環境でのノロウイルスの不活化に次亜塩素酸ナトリウムの代替え消毒剤として利用することができる可能性があると考えられた。いずれも、二酸化塩素を主成分とするスプレータイプの消臭・除菌剤で、キッチンやトイレなどの環境材料への使用を目的としたものであった。二酸化塩素は文献的にも(2)不活化効果が報告されており、有用な不活化効果が期待できると考えられた。

その他の市販消毒剤等ではネコカリシウイルスに対して明瞭な不活化効果は観察されなかった。なお、本試験では使用に指示されている1/2濃度で試験されていること、またゲルタイプの試験液ではウイルスと試験液が十分に混和されていない可能性があることなどから、これらの市販消毒剤が必ずしも不活化効果をまったく持たないことを示すものではない。

昨年度、実施した消毒剤等を含め、これまで実施した消毒剤等の不活化効果試験の結果を概観すると(表2)、嘔吐物や糞便等の高濃度のノロウイルス汚染の除去に際しては、汚染物を可能な限り物理的に取り除いた上で、5,000ppm以上の濃度の次亜塩素酸ナトリウムの使用が推奨される。有機物が少ない施設環境の清浄・除菌や手指の消毒等を目的とする場合は次亜塩素酸ナトリウム以外にも有効性が確認される消毒剤が存在するので、使用目的に応じて使い分けることができると考えられる。

IV. リアルタイムPCR法による遺伝子定量法での効果判定の検証実験

1. 方法

(1) 供試ウイルス

ノロウイルス(遺伝子型GII.4)陽性糞便の10%乳剤液をさらにPBS(-)で1000倍希釈したものを被検ウイルス原液とし、供試時まで-80℃で保存した。

試験時に、試験用ウイルス原液を、PBS(-)あるいは20%牛血清アルブミン(Sigma A7979-50ML)加PBS(-)を等量加え、有機物を含まないウイルス液、有機物(牛血清アルブミン)を10%含むウイルス液の2種類のウイルス液を調製し、それぞれ不活化試験に供した。なお、各供試ウイルス液は不活化試験時に等量の消毒剤等と混合されるため、不活化試験時に10%牛血清アルブミン加ウイルス液は5%の牛血清アルブミンを含むことになる。

(2) 供試消毒剤等

表1に示した市販消毒剤等の一部を用いた。対照としてPBS(-)を用いた。

(3) 不活化試験

2種類のウイルス液各50μlと各消毒剤等50μlを混和し、室温で3分間静置した。その後、以下の4種類の方法で得た試験液をRNA抽出に供した。

①反応後、速やかに反応液の一部を分取したもの(方法①)。

②反応後、等量(100μl)の牛胎児血清を加え、よく混和し、その一部を速やかに分取したもの(方法②)。

③反応後、等量の牛胎児血清を加え、よく混和し、室温で一夜放置後その一部を分取したものの(方法③)。

④反応後、等量の牛胎児血清を加え、よく混和し、その混合液 70 μ l に後述の AVL 試薬 140 μ l を加え、室温で一夜放置し、以後の RNA 抽出操作を行ったもの (方法④)。

(4) RNA 抽出

上記方法①～③で得た試験液 70 μ l に QIAamp Virus RNA Mini Kit (Qiagen) 添付の AVL 試薬 140 μ l を加え、以降、マニュアル記載の方法を用いて RNA 抽出を行った。方法④についても同様に処理した。

AVE 液 60 μ l に回収した RNA 液を DNase 処理した後、High Capacity cDNA Synthesis Kit (ABI) および Oligo dT を用いて cDNA を合成した。Kageyama らのリアルタイム PCR 法 (J Clin Microbiol, 41, 1548-1557, 2003) により cDNA 5 μ l 中のノロウイルス RNA コピー数を定量した。

(5) 結果の判定

リアルタイム PCR 法による定量値の結果とネコカリシウイルスを用いた感染性を指標とした結果とを比較し、リアルタイム PCR 法による定量値の結果による効果判定の有用性を検証した。

2. 結果

遺伝子定量検査による不活化効果判定結果をネコカリシウイルスを用いた感染価の結果と合わせて表 3 に示した。供試 7 消毒剤等の 5% 牛血清アルブミンを含む場合と含まない場合の 2 条件の不活化の結果は、6 種類消毒剤等 (市販品 J, K, L, M, S) では感染価が減少した条件では遺伝子定量値も減少し、感染価が変化しなかった条件では遺伝子定量値の変化もなく、感染価を指標とした場合と遺伝子定量値を指標した場合とで効果の判定は定性的に概ね一致した。しかし、感染価では大きく減少したのに対し遺伝子定量値ではそれほど減少しなかったもの (試薬 K の有機物を含まない場合)、逆に感染の減少は顕著ではないが、遺伝子定量値では比較的減少が大きかったもの (試薬 M の有機物を含まない場合) もあり、定量的には必ずしも感染価と遺伝子定量値とは一致しない傾向が認められた。

一方、市販品 0 では、5% 牛血清アルブミン存在下で、感染価ではほとんど不活化効果が認められなかったのに対し、遺伝子定量値では大きく定量値が減少した。このため、遺伝子定量値では試験液 (市販品 0) が抽出効率、酵素反応などに影響し見かけ上定量値が減少した可能性が考えられた。そのため、試験液そのものの影響を調べるために、ウイルス液に試薬 0 を添加後、反応時間を置かず、方法①および方法②で RNA 抽出を行った結果、同様に遺伝子定量値は検出限界以下となり、試験液そのものが RNA 抽出以降の工程に作用を及ぼし、定量値に影響を与えていることを示す結果となった。

また、消毒剤等の作用を止める目的で等量の牛胎児血清を添加したもの (方法②)、あるいは牛胎児血清添加後に消毒剤の影響が残っている場合、経時的に定量値が低下する可能性があるため、牛胎児血清添加後反応液を一夜放置したもの (方法③) あるいは牛胎児血清添加後蛋白変性剤を含む RNA 抽出キットに添加されている AVL 試薬を添加して一夜放置したもの (方

法④)について遺伝子定量を行ったが、大きな変化は認められなかった。

表3 遺伝子定量検査と感染価による不活化効果判定の比較

試薬	有機物の割合	リアルタイム PCR による判定(ノロウイルス)				感染価の減少 (\log_{10}) (ネコカリシ ウイルス)
		方法①	反応後、等量の牛胎児血清を添加			
			方法②	方法③	方法④	
対照	0%	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-
市販品 J	0%	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-
市販品 K	0%	↓(-)	↓(-)	↓	↓	↓↓
	5%	-	-	-	-	-
市販品 L	0%	↓↓(↓)	↓↓(↓)	↓↓	↓↓	↓↓
	5%	-	-	-	-	-
市販品 M	0%	↓↓(↓↓)	↓↓(↓)	↓↓	↓↓	↓
	5%	-	-	-	-	-
市販品 N	0%	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-
市販品 O	0%	↓↓(↓↓)	↓↓(↓↓)	↓↓	↓↓	↓
	5%	↓↓(↓↓)	↓↓(↓↓)	↓↓	↓↓	-
市販品 S	0%	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-

↓ : リアルタイム PCR では定量価が対照の>0%~50%に減少、感染価では $1\sim 2\log_{10}$ の減少

↓↓ : リアルタイム PCR では定量価が検出限界以下、感染価では $3\log_{10}$ 以上の減少

()内は反応時間<10 秒での結果

3. 考察

ヒトノロウイルスは培養ができないことから、ヒトノロウイルスそのものに対する不活化効果を調べる場合には、PCR 法による遺伝子検査が用いられている。ウイルスの遺伝子はウイルス粒子の内部に存在し、一般的に消毒剤等が RNA に影響を及ぼすためにはウイルス構造蛋白質になんらかの影響を与える必要がある。従って、PCR 法等の遺伝子検査で効果があったと判定される場合は、感染性にも影響がある、すなわち不活化効果があると考えことは妥当である。しかしながら、それは遺伝子検査に偽陰性の可能性が完全に排除されることが前提となる。今回供試した消毒剤等の多くは感染価と遺伝子定量値との結果は、効果の有無の判定において多くは一致したが、感染価では変化がなく、遺伝子定量値のみが減少した例が 1 例認められた(市販品 O)。この理由として、用いたウイルスの違いによることを否定す

ることはできないが、通常は考えにくい。この例では試験液そのものが、RNA 抽出以降のステップに何らかの影響を及ぼし見かけ上遺伝子定量を減少させているものと考えられた。市販消毒剤等はそれぞれ成分が異なり、また一つの消毒剤にも複数の消毒に有効な成分が含まれていることもあるので、それぞれの消毒剤あるいはその有効成分等に対し薬剤の作用を中和する試薬を用いて反応を停止することは不活化効果のスクリーニング検査の判定法としては現実的でない。汎用的な薬剤作用を停止する方法としては、薬剤の影響を受けない程度に希釈する方法、多量の有機物を添加し作用を弱める方法などが考えられ、今回は等量の牛胎児血清を添加した系を試みた。市販品 M では反応時間を 10 秒以下とした場合牛胎児血清を添加することにより定量値が増加し、消毒剤の中和に効果があったが、市販品 0 では効果は認められなかった。

本結果から、遺伝子検査においては、感染性には影響を及ぼさず、見掛け上遺伝子検査で有効と判定される可能性が示唆されたので、遺伝子検査による効果判定には十分な注意が必要であると考えられた。

V ノロウイルス等の不活化等に関する文献情報の収集および取りまとめ

1. 調査方法

インターネット等を通じて、ノロウイルスおよび関連ウイルス等に関する不活化、生存性等に関する論文を収集し、その情報を整理した。

2. 調査結果

(1) ノロウイルスの不活化条件等に関する研究の現状の概要

今年度は、前年度の取りまとめ以降に発表された論文を中心に情報を収集した。不活化に関しては、単に消毒剤等を試験管内で反応させて効果を判定するのではなく、実際にノロウイルス等の汚染が問題となる食品や環境中における効果判定を行う報告が多くみられた。また、ヒトノロウイルスは依然培養できていないが、マウスノロウイルスが培養可能となったことから代替えウイルスとしてマウスノロウイルスを使用して不活化効果を検討している報告が増加した。

さらに、遺伝子検査がウイルスの生存性や不活化効果の判定に利用可能かを検討している報告も少なからずみられ、今後の研究動向が注目される。

(2) 感染性試験法以外の代替え法を用いたウイルスの不活化評価法

ウイルスの生存性や消毒剤の殺菌効果の判定はウイルスの感染性を調べるのが唯一直接的な評価方法であるが、近年、感染性試験法以外の代替え試験法の開発やそれらを用いた消毒剤等の不活化効果判定に関する報告がみられる。

Nuanualsuwan ら(3)は、A 型肝炎ウイルス、ポリオウイルス 1 型、ネコカリシウイルスを用いて、紫外線照射、塩素処理、加熱処理を行ったウイルスを蛋白分解酵素、RNase で消化した後、RT-PCR 法で検出することにより、未処理のウイルス粒子(感染性ウイルス)と処理したウイルス粒子(不活化ウイルス)を区別できる可能性を示した。

一方、Baert ら(4)は Nuanualsuwan らが報告した酵素処理をマウスノロウイルスの熱による不活化の判定に用いているが、感染性の有無とリアルタイム PCR による遺伝子検出には相関性はなかったと報告している。しかし、マウスノロウイルス RNA を細胞にトランスフェクトすると感染性粒子が回収されるが、熱処理をした場合は、回収されなかったと報告している。また、マウスノロウイルスの熱による不活化では 80°C、150 秒が必要であることも報告している。

Topping ら(5)は、加熱によるウイルス粒子の構造的変化により粒子外部に露出したウイルス RNA を RNase 処理で分解した後、逆転写、リアルタイム PCR を行い、RNA のコピー数を調べた。その遺伝子定量値が感染性を指標とした方法と相関性が認められたことから、ウイルスの不活化評価法に応用できる可能性があることを報告した。また、ヒトノロウイルス GII.4 はネコカリシウイルス FC-9 と比較して同じ不活化を得るのに 13.3°C 高い温度を必要としたことから、ヒトノロウイルスはネコカリシウイルスより熱に対し抵抗性であることを示している。

Lamhoujeb ら(6)は、Nuanualsuwan ら(3)の酵素処理とリアルタイム NASBA 法を用いてレタスと七面鳥をモデルとして調理済み食品(Ready to eat foods)中のウイルスの生存性を調べた。レタスや七面鳥に添加されたノロウイルスは冷蔵保存で少なくとも 10 日間生存することが示された。また、加熱処理、酵素処理に対してネコカリシウイルスはノロウイルスと比較して抵抗性が弱く、代替えウイルスとして適切ではないことを示している。

(3) 水環境中における生存性

Bae ら(7)は、地上水(surface water)と地下水(groundwater)における生存性をマウスノロウイルス、ネコカリシウイルス、ポリオウイルス、MS2 フェージを用いて調べた。感染価と PCR 法による遺伝子定量を行った結果、25°C においてネコカリシウイルスは感染価および遺伝子定量値の減少が顕著であり、他のウイルスと比較して生存性が低くノロウイルスの代替えウイルスとして適さないとともに、マウスノロウイルスは生存性が高く重回帰分析でもノロウイルスと有意な違いはなかったことから、地上水や地下水における生存性試験ではマウスノロウイルスがノロウイルスの代替えウイルスとして適当であることを示した。

Shin ら(8)は、塩素要求フリー(chlorine demand-free)の水及びクロロフォルム処理、フィルター処理で精製したウイルス粒子を用いて、ノロウイルスの塩素に対する抵抗性を厳密に調べた。短い増幅産物と長い増幅産物が得られる 2 種類の RT-PCR で不活化効果を判定した結果、1mg/L あるいは 5mg/L の通常の水道水の不活化に使用される塩素濃度でノロウイルスは対照としたポリオウイルス、MS2 フェージと比較して、MS2 よりは抵抗性であるがポリオウイルスよりは感受性であり、これまでの報告ほどノロウイルスは塩素に対し耐性ではなく、適切な塩素処理で飲料水のノロウイルスの汚染は制御できると述べている。

二酸化チタン(TiO₂)は、紫外線によって-OH、O₂⁻、HO₂⁻、H₂O₂などのフリーラジカルを放出し、その強力な酸化力により殺菌作用を示すとされている。Lee ら(9)は、25mJ/cm²の紫外線照射によりマウスノロウイルスは二酸化チタン存在下で 3.6log₁₀、非存在下で 3.3log₁₀の減少を示し、紫外線照射及び二酸化チタンの併用の有用性を報告した。

(4) 食品における生存性

近年特に欧米においては新鮮な、あるいは冷凍した野菜・果物によるノロウイルス集団発生が問題となっている。Butot ら(10)は A 型肝炎ウイルス、ノロウイルス、ロタウイルスおよびネコカリシウイルスを用いて生鮮野菜・果物における生存性と不活化法を検討した。ブルーベリー、ラズベリー、イチゴ、バジル、パセリを用いた -20°C 、2 日間の凍結保存により、イチゴにおいてネコカリシウイルスの生存性が減少($2.71\log_{10}$)した以外、感染価(ノロウイルスはリアルタイム PCR のよる遺伝子定量のみ)の減少は概ね $1\log_{10}$ 以下で、顕著な減少は観察されなかった。90 日間の観察では、A 型肝炎ウイルスとロタウイルスはほぼ同様な動態を示し、ロタウイルスがブルーベリーとバジルで凍結後 2 日目以降に $1\log_{10}$ 減少した以外ほとんど感染価の減少は観察されなかった。ノロウイルスの GI と GII の比較では GII の生存性が低い傾向にあり、GII はブルーベリーでは 90 日間で $2.31\log_{10}$ の減少が観察された。これらの生鮮農産物からのウイルスの除去効果の検討では、冷水および温水を用いた場合 GI ノロウイルスが洗浄後不検出であったのを除き、概ね $1.51\log_{10}$ 以内の減少で、ほとんどのウイルスは除去されなかった。200ppm の塩素水による洗浄では、ネコカリシウイルスで特に除去効果が大きく、GI、GII のノロウイルス、A 型肝炎ウイルスでもブルーベリー、イチゴ、バジルで有意に減少したが、ラズベリー、パセリではノロウイルス、A 型肝炎ウイルスで顕著な減少は観察されなかった。塩素水による洗浄において A 型肝炎ウイルスは他のウイルスと比較して、抵抗性が強かった。ラズベリーとパセリの二酸化塩素による洗浄では、5、10、25、50ppm の 1 分間の作用でほとんど減少効果はなく、10 分の作用でも $21\log_{10}$ 以下の減少に止まり、ウイルスの除去が困難であることが示された。

Mattison ら(11)は、ネコカリシウイルスを用いて、レタス、イチゴ、ハム、およびステンレスにおける生存性を調べた。10%糞便乳剤のろ過液で作成したウイルス液を付着・乾燥後、 4°C または室温で 7 日間観察した結果、 4°C での生存性が高い傾向にあり、イチゴを除き、レタス、ハム、およびステンレスでは 7 日目まで感染性ウイルスが検出された。特に、ハムでの生存性が高く、乾燥しにくい、ハムの成分がウイルスの保護作用があるなど、ハムはウイルスの生存に適した環境であると考察している。

Hewitt ら(12)は、ニュージーランドの緑イ貝(Greenshell mussel, *Perna canaliculus*)を用いて煮沸および蒸し焼きによる不活化を検討した。供試した 6 ロット 50 個体の緑イ貝は煮沸により、加熱開始後 170 秒で中心温度 90°C (ニュージーランドでは 90°C 、90 秒の加熱がウイルスの不活化に推奨されている)に達し、210 秒で殻が開いたことから、殻が開いた時点ではウイルスの不活化には十分ではないことを示唆した。また、180 秒の蒸し焼きでは中心温度は 63°C で、A 型肝炎ウイルスは $1.51\log_{10}$ の減少、180 秒間の煮沸水への浸漬では中心温度 92°C で、A 型肝炎ウイルスは検出されなかった。これらの結果から、煮沸水での 3 分間の浸漬をウイルスの不活化に推奨している。

Baert ら(13)は、加熱等により風味や形状を損ないやすく、集団発生の原因となっているラズベリーについて、加熱による殺菌効果をマウスノロウイルス、大腸菌、および *B. fragilis* HSP40 に感染するファージ B40-8 を用いて調べた。ラズベリーピューレに各微生物を汚染させた場合、 65°C 、30 秒の緩和な加熱で、それぞれ $1.86\log_{10}$ 、 $2.77\log_{10}$ 、 $3.89\log_{10}$ 、 75°C 、

15 秒の加熱では $2.81\log_{10}$ 、 $3.61\log_{10}$ 、 $3.44\log_{10}$ の感染価の減少が認められた(表 4)。さらにマウスノロウイルス、B40-8 ファージについて加熱後、4℃、24 時間冷蔵保存した結果、感染価の低下は認められなかった。

表 4 ラズベリーピューレ中の加熱による不活化

微生物	感染価の減少 (\log_{10})	
	65℃、30 秒	75℃、15 秒
マウスノロウイルス	1.86 ± 0.32	2.81 ± 0.39
B40-8 ファージ	3.89 ± 0.46	3.44 ± 0.56
大腸菌	2.77 ± 0.44	3.61 ± 0.48

Baert ら(14)は、玉ねぎ、ほうれん草における洗浄による除去および生存性等についてマウスノロウイルスを用いて調べた。表面汚染させた輪切り玉ねぎの飲料水(portable water)による 1 回の洗浄(100ml の水による 25 秒の攪拌)で $0.39\log_{10}$ の減少、ほうれん草では 1 回の洗浄(10g のほうれん草を 350ml の水で 2 分間攪拌)で $1.01\log_{10}$ 、3 回の洗浄で $1.26\log_{10}$ の減少であった。一方、 $4.98 \pm 0.21\log_{10}$ PFU/ml を含む水から輪切り玉ねぎには $3.21 \pm 0.58\log_{10}$ PFU、ほうれん草(10g)には $3.74 \pm 0.28\log_{10}$ PFU のマウスノロウイルスが移行した。水およびほうれん草洗浄水における生存性を調べた結果、飲料水では 7 日でほとんど感染価は減少せず、ほうれん草洗浄水では 6 日までほとんど感染価の減少はなかったが、6 日から 7 日目にかけて $0.67\log_{10}$ の減少があった。

また、過酢酸によるマウスノロウイルスの不活化効果を飲料水(pH8.18)あるいは脱ミネラル水(demineralized water, pH5.62)で希釈した液で調べたところ、20ppm の過酢酸の 5 分の作用で脱ミネラル水(pH4.13)は $2.88 \pm 0.25\log_{10}$ PFU、飲料水(pH7.70)は $2.41 \pm 0.18\log_{10}$ PFU 不活化され、最大の不活化は 150ppm の過酢酸を含む脱ミネラル水(pH3.58)を用いた場合で、 $4.29 \pm 0.15\log_{10}$ の減少であった。ほうれん草の湯煎(ほうれん草 50g を 80℃または 90℃の飲料水に 1 分間浸漬後、速やかに 1 分間 4℃で冷却)では不検出となった(表 5)。この時のほうれん草のペルオキシダーゼ活性をみると 80℃では 35.6%、90℃では 78.8%が失活しており、この活性を指標に利用できると報告している。また、きざんだ(shredded)玉ねぎおよびぶち切り(chopped)ほうれん草に汚染させたマウスノロウイルスの-21℃における生存性は 6 カ月間でほとんど変動はなかった。

(参考) 過酢酸

過酢酸は殺菌消毒薬として使用され、主に医療器具の滅菌、殺菌、消毒に 0.2%-0.3%の濃度で用いられておる。ほとんど全ての細菌、真菌、芽胞、ウイルスに対しグルタルアルデヒドと同等かそれ以上の効果を示すが、グルタルアルデヒドと異なり、人体に対する影響が少ない。分解生成物は酢酸、過酸化水素で、過酸化水素は最終的に水と酸素に分解されるため、実質的にはほぼ無害である。また、過酢酸は炭疽菌に代表される芽胞にも有効であり、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、次亜塩素酸ナトリウム、過酸化水素とともに世界保

健機関 (WHO) が炭疽菌の消毒薬として推奨するもののひとつとなっている。

表 5 ほうれん草の湯煎によるマウスノロウイルスの不活化

	ほうれん草のペルオキシダーゼ活性 (%)	感染価 (\log_{10} PFU/検体)	遺伝子コピー数 (\log_{10} コピー数/検体)
未処理	100.8±16.5	4.35±0.49	3.74±0.40
湯煎 (80℃、1分)	65.2±16.1	<1.30	3.13±0.39
湯煎 (90℃、1分)	22.0±7.1	<1.30	3.57±0.29

Fino ら(15)は、いちご、青ネギ、レタスに付着する A 型肝炎ウイルス、アイチウイルス、ネコカリシウイルスの紫外線による不活化を検討した(表 6)。240mWs/cm²の照射で、レタスでは 4.5~4.6log₁₀、青ネギでは 2.5~5.6log₁₀、イチゴでは 1.9~2.6log₁₀の減少で、レタスの表面が最も不可化されやすく、ストロベリー表面が最も不活化されにくかった。40、120、あるいは 240mWs/cm²の照射量で、不活化効果に大きな違いはなかった。

表 6 食品表面に付着させたウイルスの UV による不活化

ウイルス	食品	UV 照射量 (mWs/cm ²)		
		40	120	240
A 型肝炎ウイルス	レタス	4.29±0.59	4.45±0.20	4.62±0.00
A 型肝炎ウイルス	青ネギ	4.16±0.42	5.31±0.42	5.58±0.21
A 型肝炎ウイルス	イチゴ	1.28±0.32	1.79±0.05	2.60±0.73
アイチウイルス	レタス	3.96±0.33	4.41±0.60	4.59±0.57
アイチウイルス	青ネギ	2.35±0.51	3.66±0.48	2.49±0.35
アイチウイルス	イチゴ	1.53±0.45	1.60±0.51	1.87±0.19
ネコカリシウイルス	レタス	3.48±0.03	3.82±0.01	4.62±0.00
ネコカリシウイルス	青ネギ	2.46±0.38	3.92±0.64	3.88±0.77
ネコカリシウイルス	イチゴ	1.13±0.27	1.57±0.24	2.28±0.53

(5) 環境中における不活化

Hudson らは(16)、ホテルの室内、船室、事務室の様々な場所に乾燥状態で存在するウイルスの不活化方法として、ネコカリシウイルスを用いてオゾンガスの有用性を検討した。不活化は、オゾン発生装置を用いてオゾンガスを発生させ、濃度が 20-25ppm に達してから 20 分間その濃度を維持した後、加湿器を 5 分間作動させた。その後、オゾン発生装置と加湿器を止め、さらに 10 分間放置した後、スクラバー (除ガス装置) を 15 分間作動し、オゾンガスを除去させた。ホテルにおいて、バスルーム、ベッド、机の上に置かれたネコカリシウイルス(プラスチック上で乾燥させたウイルス)は 3.7log₁₀ 以上の減少を示した。船室のベッド、

机、隣接するバスルームにおける実験(オゾン発生 15 分、加湿 4 分、放置なし、除ガス 15 分)では、感染性ウイルスは検出されなかった(5.37×10^3 以上の減少)。プラスチック以外に、布(Fabric)、綿織物(Cotton)、カーペットに塗布したウイルスを用いて、机の上や下側、壁、窓、床に設置したウイルスの不活化を行った結果、いずれも有効に不活化され、オゾンガスによる室内に乾燥状態で残留するノロウイルスの不活化に有用であることを示した。

Lee ら(9)は、マウスノロウイルスを用いて種々の環境での生存性を調べた。ガーゼやおむつの中で 18°C または 30°C では1日で $3\log_{10}$ 以上減少したが、 4°C では30日で $2\log_{10}$ (ガーゼ)、40日で $2\log_{10}$ 以下(おむつ)の減少に止まり、 -20°C では $2\log_{10}$ 未満(ガーゼ)、 $1\log_{10}$ 未満(おむつ)の減少であった。糞便中の生存性を40日間観察した結果、 4°C が最も安定で $1\log_{10}$ 未満の減少、 -20°C と 18°C では $4\log_{10}$ の減少で、 30°C では24時間で $5\log_{10}$ 以上の減少が認められた。0.5Mあるいは1Mの塩化ナトリウム存在下で、72時間後にそれぞれ $1.5\log_{10}$ 、 $2.5\log_{10}$ の減少を認めた。一方、リアルタイムPCRでは、定量値の減少はほとんど観察されなかった。

Park ら(17)は、ステンレスおよびセラミックタイル(孔あり)における生存性をMS2ファージおよびノロウイルスを用いて調べた。MS2ファージの感染価はウイルス液接種後3時間の乾燥で約 $2\log_{10}$ (ステンレス2.5%、セラミックタイル1.1%)減少後、 25°C 、2日間でさらに $1.5\log_{10}$ 減少したが、MS2ファージおよびノロウイルスのRT-PCRのコピー数は接種ウイルス量と比較して24時間後までは変化せず、2日後に $1\log_{10}$ 減少した。

Park ら(17)は次亜塩素酸(HOCl)を電気化学的に発生させる装置(図参照)を利用して生成した次亜塩素酸による不活化を、ヒトノロウイルスおよび代替えウイルスとしてMS2ファージ、マウスノロウイルスを用いて検討した。セラミックス製タイル(孔あり)とステンレスに汚染させた3種類のウイルスは20~200ppmの次亜塩素酸溶液の10分(以下)間の作用で、感染価およびウイルスコピー数ともに少なくとも $3\log_{10}$ 減少した(ヒトノロウイルスは遺伝子検出のみ実施)(表7)。水溶液中では20秒の作用で、感染価および遺伝子検出ともに、少なくとも $3\log_{10}$ 減少した。また、閉鎖室内に霧状に噴霧した場合の実験では、1%糞便を含む3種のウイルス混合液を塗布し、乾燥させたセラミックタイルを水平方向、垂直方向に設置し、180~200ppmの遊離塩素を1時間噴霧させた。その結果、感染価では $3.5\log_{10}$ 以上、遺伝子検出では概ね $5\log_{10}$ 以上の低下が観察され(表8)、有用性が確認されたと報告している。



http://www.puricore.com/markets_foodretail.aspx

表7 次亜塩素酸による不活化

遊離塩素濃度	3log ₁₀ 以上の減少に必要な作用時間(分)		
	MS2 ファージ		ヒトノロウイルス
	感染価	RT-PCR	RT-PCR
188ppm	1 1*	1 1	1 1
38ppm	5 5	5 5	5 10
18.8ppm	5 5	5 5	10 5

*：左側はセラミックタイル、右側はステンレスに汚染させた場合の時間(分)

表8 次亜塩素酸溶液噴霧によるウイルスの不活化

設置方向	遺伝子減少(log ₁₀ PCR 単位)			感染価減少(log ₁₀ PFU)	
	ヒトノロウイルス	マウスノロウイルス	MS2 ファージ	マウスノロウイルス	MS2 ファージ
水平-1	>6	>5.5	5.5	>3.5	>4.0
水平-2	>6	>5.5	6	>3.5	>4.0
水平-3	>6	>5.5	5.5	>3.5	>4.0
水平-4	>6	>5.5	6	>3.5	>4.0
水平-5	>5.5	>5.5	5.5	>3.5	>4.0
垂直-1	>5.5	>4.5	5.5	>3.5	>4.0
垂直-2	>4.5	>5	5	>3.5	>4.0
垂直-3	>6	>5	6.5	>3.5	>4.0
垂直-4	4.5	4.5	6	>3.5	>4.0
垂直-5	>4.5	>4.5	4.5	>3.5	>4.0

(参考)次亜塩素酸

次亜塩素酸は水と塩化ナトリウムから電気化学的に生成される(電気分解)。pH5~pH7の弱酸性の水溶液中で、次亜塩素酸ナトリウムのような漂白作用、腐食作用、人体に対する影響がない上、低濃度で高い殺菌効果を持つなどの特徴を持つ。

Lagesら(18)はネコカリシウイルスを用いて、9種類の手指用消毒剤の30秒あるいは2分間の作用による消毒効果を比較した。99.5%のエタノールは62%エタノール、70%あるいは91%イソプロピルアルコールを含むエタノール性殺菌剤(Sanitizer)と比較して効果的であった表(9)。10%ポピドンヨード(1%の有効ヨードを含む)を含む消毒剤(Antiseptics)は30秒の作用で2.67log₁₀の減少を示し、いずれのエタノールに基づく殺菌剤(Sanitizer)、非アルコールの殺菌剤および抗菌性(Antimicrobial)石鹼と比較して高い不活化効果を示した。

トリクロサン含有の抗菌性石鹸は最も低い効果を示し、石鹸を用いない手洗いと同様の結果であった。これらのことから、エタノール含有の手指用消毒剤及びトリクロサン含有抗菌用石鹸ではノロウイルスの予防に不十分であることを示した。

表9 手洗用消毒剤等のネコカリシウイルスに対する不活化効果

内容	分類	商品名	減少(log ₁₀)	
			30秒	2分
99.5%エタノール	ACS 試薬	エタノール	1.00	1.30
62%エタノール	Hand sanitizer	Purell instant hand sanitizer	0.50	0.55
91%イソプロピルアルコール	Antiseptic	91%isopropyl alcohol	0.00	0.43
70%イソプロピルアルコール	Antiseptic	70%isopropyl rubbing alcohol	0.67	0.55
3%過酸化水素(安定化)	Antiseptic	HomeBest hydrogen peroxide topical	0.09	0.47
0.13%塩化ベンザルコニウム+2%塩酸リドカイン	Antiseptic	Band Aid hurt-free antiseptic wash	0.00	0.22
10%ポピドンヨード	Antiseptic	Swan topical antiseptic microbicide povidone-iodine solution, 10%	2.67	2.39
0.60%トリクロサン	Hand soap	Dial complete antibacterial foaming hand wash	0.25	0.50
0.115%トリクロサン	Hand soap	Softsoap hand soap antibacterial	0.42	0.17
水道水による手洗い			0.33	0.42

ACS : American Chemical Society

Belliot ら(19)は、マウスノロウイルスを用いて医療機関で使用される消毒薬に対する抵抗性を調べた(表10)。マウスノロウイルスは、アルコール、アルコールハンドラボ、ブリーチ、ポピドンヨードに基づく消毒薬に感受性を示した。

表10 マウスノロウイルスに対する各種消毒剤の不活化効果

消毒剤	性状 (濃度、商品名)	作用時間	感染価(log ₁₀) の減少(%減少)	RNA コピー(log ₁₀) の減少(%減少)
エタノール	60%	0.5分	>4(99.99)	1.22±

				0.23(93.97)
エタノール	60%	1分	>4(99.99)	未検査
エタノール	60%	3分	>4(99.99)	未検査
エタノール	30%	0.5分	0.11± 0.06(22.38)	未検査
エタノール	30%	1分	0.16± 0.20(30.82)	未検査
エタノール	30%	3分	0.29± 0.11(48.71)	未検査
エタノール	10%	0.5分	-	未検査
エタノール	10%	1分	-	未検査
エタノール	10%	3分	-	未検査
イソプロパノール	60%	0.5分	3.86(99.98)	1.08± 0.57(91.68)
イソプロパノール	60%	1分	>4(99.99)	未検査
イソプロパノール	60%	3分	>4(99.99)	未検査
イソプロパノール	30%	0.5分	0.63± 0.18(76.56)	未検査
イソプロパノール	30%	1分	0.78± 0.08(83.40)	未検査
イソプロパノール	30%	3分	1.62± 0.39(97.60)	未検査
イソプロパノール	10%	0.5分	-	未検査
イソプロパノール	10%	1分	0.08± 0.05(16.82)	未検査
イソプロパノール	10%	3分	0.06± 0.02(12.90)	未検査
塩素	0.26%、ブリーチ	0.5分	>4(99.99)	>4(99.99)
塩素	0.26%、ブリーチ	1分	>4(99.99)	未検査
塩素	0.26%、ブリーチ	3分	>4(99.99)	未検査
ポビドンヨード	1%、Betadine	0.5分	>4(99.99)	0.41± 0.51(61.10)
ポビドンヨード	1%、Betadine	1分	>4(99.99)	未検査
ポビドンヨード	1%、Betadine	3分	>4(99.99)	未検査

第四級アンモニウム塩、 アルカリアミン（非イオン系界面活性剤）	Asphene381	0.5分	0.75± 0.09(82.22)	未検査
第四級アンモニウム塩、 アルカリアミン（非イオン系界面活性剤）	Asphene381	1分	1.01± 0.01(90.23)	未検査
第四級アンモニウム塩、 アルカリアミン（非イオン系界面活性剤）	Asphene381	3分	0.96± 0.15(89.04)	未検査
第四級アンモニウム塩、 アルカリアミン（非イオン系界面活性剤）	Asphene381	15分	0.59± 0.09(74.30)	未検査
第四級アンモニウム塩、 アルカリアミン（非イオン系界面活性剤）	Asphene381	30分	0.35± 0.14(55.33)	未検査
第四級アンモニウム塩、 アルカリアミン（非イオン系界面活性剤）	Asphene381	60分	0.55± 0.13(71.82)	未検査
アルコールハンドラボ	Steriium gel	0.5分	>4(99.99)	0.30± 0.18(49.88)
アルコールハンドラボ	Steriium gel	1分	>4(99.99)	未検査
アルコールハンドラボ	Steriium gel	3分	>4(99.99)	未検査
アルコールハンドラボ	Aniosgel 85NPC	0.5分	>4(99.99)	未検査
アルコールハンドラボ	Aniosgel 85NPC	1分	>4(99.99)	未検査
アルコールハンドラボ	Aniosgel 85NPC	3分	>4(99.99)	未検査
アルコールハンドラボ	Purell	0.5分	1.85± 0.05(98.59)	未検査
アルコールハンドラボ	Purell	1分	2.07± 0.11(99.15)	未検査
アルコールハンドラボ	Purell	3分	2.89± 0.13(99.97)	未検査
アルコールハンドラボ	Purell	15分	2.26± 0.09(99.45)	未検査
アルコールハンドラボ	Purell	30分	2.87± 0.12(99.87)	未検査
アルコールハンドラボ	Purell	60分	>4(99.99)	0.63± 0.19(76.56)

Macingara(20)は、ポリクオターニウムポリマー(四級アンモニウム塩のカチオン系ポリマー)と有機酸を含む新しいアルコール性の手指消毒剤の有効性を、ヒトロタウイルス、ポリオウイルス、およびヒトノロウイルスの代替えとしてネコカリシウイルスとマウスノロウイルス等を用いて調べた(表 11)。試験管内では、それらのウイルスは 30 秒の作用で $3\log_{10}$ 以上の減少が認められたが、fingerpad 法(指の腹部：爪の反対側にウイルスを接種し有効性判定を行う)法では、30 秒の作用でマウスノロウイルスで $2.48\log_{10}$ 、アデノウイルス、ロタウイルスで $3\log_{10}$ 以上、ポリオウイルスで $2.98\log_{10}$ 、A 型肝炎ウイルスで $1.32\log_{10}$ の減少であった。

表 11 新規エタノール製剤による各種ウイルスの不活化

消毒剤	ウイルス	作用時間	減少(\log_{10})
75%エタノール	マウスノロウイルス	30 秒	0.91*
新規エタノール製剤	マウスノロウイルス	30 秒	2.48*
新規エタノール製剤	アデノウイルス 5 型	15 秒	≥ 3.16
新規エタノール製剤	アデノウイルス 5 型	30 秒	≥ 3.12
新規エタノール製剤	ロタウイルス	15 秒	≥ 4.32
新規エタノール製剤	ロタウイルス	30 秒	≥ 3.84
新規エタノール製剤	ポリオウイルス 1 型	30 秒	2.98
新規エタノール製剤	A 型肝炎ウイルス	30 秒	1.32

*：有意差あり(<0.0001)

(6) 高圧処理

Buckow ら(21)は、ネコカリシウイルスをモデルとして高圧処理による不活化を検討した。75°C、2 分の加熱及び 450MPa、15 分の高圧処理の結果に基づきパラメータを設定し、500MPa までの種々の圧力および 5°C~75°C までの温度での不活化条件を明らかにし、食品の高圧処理による不活化の有用性を報告した。

(7) 有機物等存在下での消毒剤による不活化

Poschetto ら(22)は、有機物存在下での有機酸、アルデヒド、ハロゲン化合物、過酸化物の不活化について調べた。有機酸(55-60%ギ酸、7%グリオキシル酸含有)、アルデヒド(22-25%グルタルアルデヒド、12%オリゴマー含有)、ハロゲン化合物(12%次亜塩素酸 Na)、過酸化物(14-16%過酢酸、22-24%過酸化水素、<15%酢酸)によるネコカリシウイルスの不活化は、アルデヒドを除き、有機物が含まれると不活化効果は減少した(表(12))。

表 12 ネコカリシウイルスの各種薬剤の不活化効果

	3log ₁₀ 減少 (>99.9%)に必要な濃度と時間 (FCVの感染価)		
	蛋白なし	40%牛胎児血清含有	25%糞便含有
有機酸	0.5% 15分	4% 15分	4% 15分
アルデヒド	0.1% 15分	0.1% 15分	0.1% 15分
ハロゲン化合物	0.5% 15分 (4,500ppm)	0.5% 15分 (4,500ppm)	0.8% 15分
過酸化物	0.1% 15分	0.1% 15分	1% 60分

また、25%糞便存在下での不活化効果を Nuanualsuwan ら(3)が報告した酵素処理を用いた RT-PCR 法で評価した結果は表 13 のとおりであるが、感染価を指標とした場合と比較し、より高濃度あるいは長時間の作用時間を必要としており、実際にはより低濃度、短時間の作用で効果がある考察している。また、ノロウイルスはネコカリシウイルスと比較して、これらの薬剤に対して抵抗性である可能性を示唆している。

表 13 25%糞便存在下での各種薬剤の不活化効果 (酵素処理-RT-PCR で判定)

	減少 (log ₁₀)	必要な濃度と作用時間	
		ネコカリシウイルス	ノロウイルス
有機酸	3	4.0% 30分	5% 60分
アルデヒド	2	0.5% 60分	2.0% 60~120分
ハロゲン化合物*	≥3	1% (6,000ppm) 15分	1% (6,000ppm) 15分
過酸化物	3	1.0% 60分	1.0% 60分
		2.0% 15分	2.0% 60分

*: ハロゲン化合物は、10%糞便存在下の結果。(25%糞便では、1% (6,000ppm) あるいは 1.2% (7,000ppm) の 120 分の作用では 0~2log₁₀ の減少。

IV 参考文献

- 1 高木弘隆、杉山和良; ネコカリシウイルス (FCV) を代替としたノロウイルス (NV) 不活性化効果の検討-アルカリ剤、過酸化水素および過炭酸ナトリウムによる不活性化効果-。医学と薬学: 57(3):312-313, 2007
- 2 Jeanette, A et al; Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by chlorine dioxide, Appl Environ Microbiol; 31:3100-3105, 2005
- 3 Nuanualsuwan S, Cliver DO. et al.: Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. J Virol Methods; 104(2):217-225, 2002

- 4 Baert L, Wobus CE, Van Coillie E, Thackray LB, Debevere J, Uyttendaele M et al. : 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*; 74(2):543-546, 2008
- 5 Topping JR, Schnerr H, Haines J, Scott M, Carter MJ, Willcocks MM, Bellamy K, Brown DW, Gray JJ, Gallimore CI, Knight AI et al. : Temperature inactivation of Feline calicivirus vaccine strain FCV F-9 in comparison with human noroviruses using an RNA exposure assay and reverse transcribed quantitative real-time polymerase chain reaction-A novel method for predicting virus infectivity, *J Virol Methods*; 156(1-2):89-95, 2009
- 6 Lamhoujeb S, Fliss I, Ngazoa SE, Jean J et al. : Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl Environ Microbiol*; 74(11):3349-3355, 2008
- 7 Bae J, Schwab KJ et al. : Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Appl Environ Microbiol*; 74(2):477-484, 2008
- 8 Shin GA, Sobsey MD et al. : Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Res*; 42(17):4562-4568, 2008
- 9 Lee J, Zoh K, Ko G et al. : Inactivation and UV disinfection of murine norovirus with TiO₂ under various environmental conditions. *Appl Environ Microbiol*; 74(7):2111-2117, 2008
- 10 Butot S, Putallaz T, Sánchez G et al. : Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. *Int J Food Microbiol*; 126(1-2):30-35, 2008
- 11 Mattison K, Karthikeyan K, Abebe M, Malik N, Sattar SA, Farber JM, Bidawid S. et al. : Survival of calicivirus in foods and on surfaces: experiments with feline calicivirus as a surrogate for norovirus.. *J Food Prot*; 70(2):500-503, 2007
- 12 Hewitt J, Greening GE et al. : Effect of heat treatment on hepatitis A virus and norovirus in New Zealand greenshell mussels (*Perna canaliculus*) by quantitative real-time reverse transcription PCR and cell culture. *J Food Prot*; 69(9):2217-2223, 2006
- 13 Baert L, Uyttendaele M, Van Coillie E, Debevere J et al. : The reduction of murine norovirus 1, *B. fragilis* HSP40 infecting phage B40-8 and *E. coli* after a mild thermal pasteurization process of raspberry puree. *Food Microbiol*; 25(7):871-874, 2008

- 14 Baert L, Uyttendaele M, Vermeersch M, Van Coillie E, Debevere J et al. : Survival and transfer of murine norovirus 1, a surrogate for human noroviruses, during the production process of deep-frozen onions and spinach. *J Food Prot*; 71(8):1590–1597, 2008
- 15 Fino VR, Kniel KE et al. : UV light inactivation of hepatitis A virus, Aichi virus, and feline calicivirus on strawberries, green onions, and lettuce. *J Food Prot*; 71(5):908–913, 2008
- 16 Hudson JB, Sharma M, Petric M et al. : Inactivation of Norovirus by ozone gas in conditions relevant to healthcare. *J Hosp Infect*; 66(1):40–45, 2007
- 17 Park GW, Boston DM, Kase JA, Sampson MN, Sobsey MD et al. : Evaluation of liquid- and fog-based application of Sterilox hypochlorous acid solution for surface inactivation of human norovirus. *Appl Environ Microbiol*; 73(14):4463–4468, 2007
- 18 Lages SL, Ramakrishnan MA, Goyal SM et al. : In-vivo efficacy of hand sanitisers against feline calicivirus: a surrogate for norovirus. *J Hosp Infect*; 68(2):159–163, 2008
- 19 Belliot G, Lavaux A, Souihel D, Agnello D, Pothier P et al. : Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants. *Appl Environ Microbiol*; 74(10):3315–3318, 2008
- 20 Macinga DR, Sattar SA, Jaykus LA, Arbogast JW et al. : Improved inactivation of nonenveloped enteric viruses and their surrogates by a novel alcohol-based hand sanitizer. *Appl Environ Microbiol*; 74(16):5047–5052, 2008
- 21 Buckow R, Isbarn S, Knorr D, Heinz V, Lehmacher A et al. : Predictive model for inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate, by heat and high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol*; 74(4):1030–1038, 2008
- 22 Poschetto LF, Ike A, Papp T, Mohn U, Böhm R, Marschang RE et al. : Comparison of the sensitivities of noroviruses and feline calicivirus to chemical disinfection under field-like conditions. *Appl Environ Microbiol*; 73(17):5494–500, 2007