

Norovirus の代替指標として Feline Calicivirus を用いた 手洗いによるウイルス除去効果の検討

¹⁾ 東京都健康安全研究センター微生物部, ²⁾ 麻布大学獣医学部

森 功次¹⁾ 林 志直¹⁾ 野口やよい¹⁾ 甲斐 明美¹⁾
大江 香子²⁾ 酒井 沙知²⁾ 原 元宣²⁾ 諸角 聖¹⁾

(平成 18 年 2 月 24 日受付)

(平成 18 年 4 月 26 日受理)

Key words: *Norovirus* (NV), viral gastroenteritis, *feline calici virus* (FCV), glove juice test, washing hand

要 旨

ノロウイルス (NV) による集団胃腸炎は事例数, 患者数ともに毎年上位をしめ, その予防対策の構築が求められている. しかし NV は現在培養系が確立されていないため, その不活化の条件などに不明な点も多い. そこでノロウイルスと同じカリシウイルス科に属するネコカリシウイルス (FCV) が培養可能であることに着目し, 手洗いによるウイルス除去効果についてウイルス感染価と遺伝子量を指標にアルコール, クルルヘキシジン, 第四級アンモニウム塩, 成分としてヨード化合物, トリクロサン, フェノール誘導体を含むハンドソープを用いて検討を行った. その結果, 流水によるすすぎのみでもウイルス量が 100 分の 1 程度に減少することが明らかとなった. 手洗い時にハンドソープを使用することにより, さらにウイルス量の減少傾向が強まったことから, 手洗いはウイルス性胃腸炎の発生予防および拡大防止に非常に有効な手段であることが示唆された.

[感染症誌 80: 496~500, 2006]

序 文

ノロウイルス (*Norovirus*: NV) による食中毒や感染症は毎年冬季を中心に多発し, NV による食中毒は病因物質別事件数としても毎年上位を占める¹⁾ことから, その予防対策の構築が求められている. 従来, ウイルス性胃腸炎は冬季のカキなど二枚貝の生食に起因するものが主と考えられてきたが, 最近では貝類によると推定される事例は集団例の 1/3 以下である. 貝類の喫食以外に感染経路が推定された事例としては, ウイルスを保有する調理者により調理過程でウイルスに汚染された食品を喫食したと推定される事例, 幼稚園や病院, 高齢者施設などの施設内でみられる, 食品を介さないヒトからヒトへの伝播によると推定される事例などが多く認められている²⁾. また, 施設内感染事例においては汚物の処理にあたった施設職員がウイルスに感染して発症する場合があるほか, 非発症の職員からウイルスが検出される場合もある³⁾. このよう

な背景から, 有効な手洗いによるウイルスの除去は, 他の食中毒起因細菌の場合と同様に, 食中毒の発生予防や, 施設内の胃腸炎流行の拡大防止のために重要であると考えられる.

しかし NV は現在のところ, 人工的な培養ができないため, その不活化の条件などを実験室で確認することができず, 有効な予防対策を講じるための科学的根拠が乏しい. そこでノロウイルスと同じカリシウイルス科に属するネコカリシウイルス (*Feline Calici Virus*: FCV) がネコ腎臓由来の培養細胞である CRFK 細胞中で増殖可能であることに着目し, 本ウイルスを NV の代替指標として用い, 手洗いによるウイルス除去効果の検討を行った.

材料および方法

1. 供試ウイルス株

FCV のワクチン株である F9 株を用いた. CRFK 細胞に F9 株を感染させて培養し, 得られたウイルス液を分注し, -80°C に凍結して各検討時まで保存した.

2. 使用薬剤

別刷請求先: (〒169-0073) 東京都新宿区百人町 3-24-1
東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス
研究科 森 功次

Table 1 Antiseptic drug products used in hand washing trial

Antiseptic drug product	Ingredient and concentration	Dose for hand washing
Alcohol	70% ethyl alcohol	spray 3 times
Chlorhexidine	0.1% gulconate chlorhexidine	50mL
Quaternary ammonium	0.1% benzalkonium chloride	50mL
Hand soap A	75mg/ml povidone-iodine	1mL
Hand soap B	Triclosan	1mL
Hand soap C	Isopropylmethyl phenol	1mL

Table 2 Sequences of primers and probe for real-time PCR to detect FCV F9 strain

Primer (Position)
F9-3F : 5'-Tgc-ggT-CgA-TTA-TTC-CAA-Atg-3' (4462-4482)
F9-3R : 5'-CgA-TCg-gAA-AAg-TAA-CgA-Agg-A-3' (4548-4527)
Probe (Position)
F9-3 : 5'-FAM-TTC-gAC-CCA-ATC-gCC-TCg-TgT-Cag-TAMRA-3' (4486-4509)

手指衛生のための CDC ガイドライン⁴⁾に準じ、薬剤を選択した。すなわち、アルコール (70% Ethyl Alcohol)、消毒薬であるクロルヘキシジン (0.1% Gulconate chlorhexidine)、第四級アンモニウム塩 (0.1% Benzalkonium chloride)、および成分としてそれぞれヨード化合物 (75mg/mL Povidone-iodine)、トリクロサン (Triclosan)、フェノール誘導体 (Isopropylmethyl phenol) を含む手指洗浄用石けんをハンドソープ A, B, C として供試した (Table 1)。

3. 手洗い方法

FCV のウイルス液 1.5mL を両手指に 20 秒間摺りこんだ後、それぞれの薬剤によるもみ洗いを 10 秒、流水によるすすぎを 15 秒行った。薬剤の量はポンプタイプの手指洗浄用石けん (ハンドソープ A, B, C) は一押し (1mL)、希釈が必要なもの (クロルヘキシジンおよび第四級アンモニウム塩) については、添付書に従い手指消毒用の濃度に調製し、両手指に十分行き渡るよう 50mL を使用した。またアルコールは 3 回噴霧し、10 秒間両手に摺りこんだ後、他の薬剤同様に流水によるすすぎを 15 秒間行った。すすぎ後は手に残った水をペーパータオルでふき取った。用いた薬剤の有効成分とそれぞれの使用量は Table 1 に示したとおりである。

4. 手洗い効果の測定

米国 FDA が推奨する Glove Juice 法⁵⁾に基づいた森田らの変法⁶⁾により手洗い効果測定用試料を得た。

すなわち、MEM 培地を 20mL 入れたラテックスグラブに手洗い後の片手を挿入し、指頭 2 秒、指間 2 秒 (親指と人差し指間は 4 秒) を各 2 回、手のひら 10 秒、手の甲 10 秒を各 1 回のもみ洗いをした後、グラブ内の MEM 培地を回収した。また、対照として FCV

ウイルス液を摺りこんだ後「手洗いなし」および「流水によるすすぎのみ」についても同様の処理を行った。なおこれらの操作は各薬剤につき 4 回実施した。

手洗い後の MEM 培地回収液をフィルター (口径: 0.22 μ m) でろ過したものを試料として、ウイルス感染価およびウイルス遺伝子量を測定することにより、手洗い効果を調べた。

5. ウイルス感染価の測定

試料を MEM 培地で 10 倍段階希釈液を作製し、96 穴プレートに単層培養した CRFK 細胞に接種した。これを 5% CO₂ 存在下 37°C で培養し、TCID₅₀/100 μ L (Tissue Culture Infectious Dose 50%, 組織培養細胞における 50% 感染量) を測定することによりウイルス感染価を求めた。

6. FCV 遺伝子量の測定

手洗い後のウイルス回収液 100 μ L から Proteinase K (WAKO) および CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromid, ナカライテスク) を用いて RNA を抽出⁷⁾した。次に、ウイルス性胃腸炎診断マニュアル⁸⁾にしたがって逆転写反応を行い、cDNA を作製した。FCV 遺伝子量の測定は Realtime PCR 法によった。Realtime PCR 用のプライマーおよびプローブとしては、プライマー設計ソフト Primaer Express (ABI) により FCV F9 株のポリメラーゼ領域に F9-3F/F9-3R のプライマーペアと TaqMan プローブとして F9-3 を設計し、依頼合成 (ABI) した。それらプライマーおよびプローブの配列を Table 2 に示した。また、定量用のコントロールには、RNA 抽出時および逆転写反応時のロスを考慮し、あらかじめ感染価の明らかな F9 株のウイルス液について 10⁹~10⁰TCID₅₀/100 μ L の 10 本の 10 倍段階希釈液を作製し、用いた。各希釈液

Fig. 1 Effect of hand washing on FCV infectious ability in CRFK cells

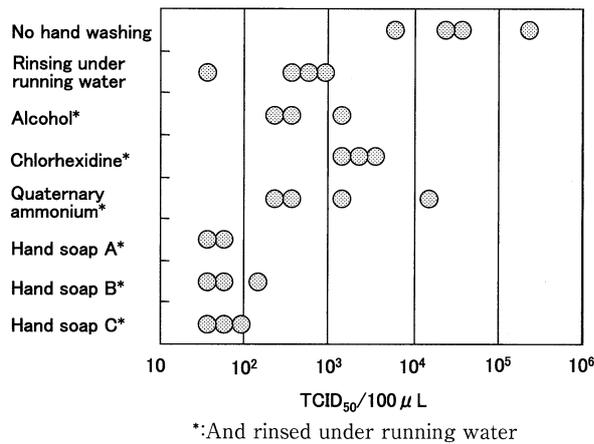
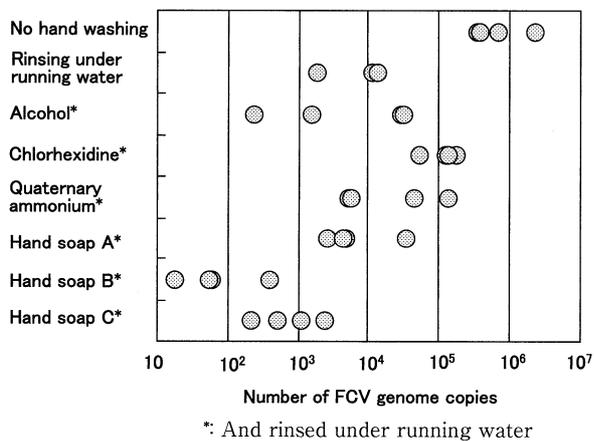


Fig. 2 Effect of hand washing on the number of FCV genome copies



のそれぞれ $100 \mu L$ から試料と同様の方法により RNA 抽出および逆転写反応を行い、試料と同時に realtime PCR 法で測定し、測定値から検量線を作成した。試料中の FCV 遺伝子量は得られた検量線から定量した。この定量用コントロール 10 ポイントによる検量線の相関係数は $0.95 \sim 0.96$ であった。

7. 手洗い時間の検討

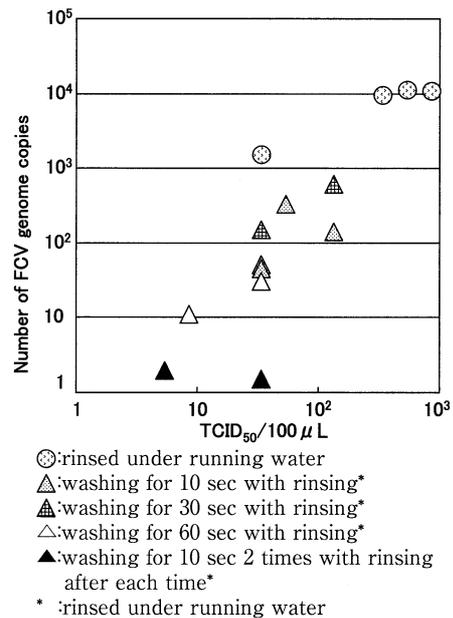
ハンドソープ B を用い、手洗い時間を 30 秒、60 秒、にそれぞれ 15 秒間流水すすぎを行うものおよび 10 秒のみ洗いと 15 秒の流れすすぎの組み合わせを 2 回繰り返すものの 3 種とし、それぞれ 2 回ずつ実施し、洗浄後の手指よりウイルスを回収した。回収したウイルス液は前述と同様の方法により回収し、感染価および遺伝子量の測定を行った。

成 績

1. 使用薬剤のウイルス感染価測定への影響の確認

今回の検討に使用した薬剤は、いずれも直接 CRFK 細胞に作用させた場合、細胞毒性がみられた。しかし、

Fig. 3 Comparison of hand washing methods (hand soap B)



手指を各薬剤で洗浄後、流水によりすすぎ、残り水をペーパータオルでふき取った後に MEM 培地によりウイルスを回収した場合には、いずれの薬剤を使用しても回収液に細胞毒性は認められないことを確認した。

2. ウイルス感染価からみた洗浄効果

手洗い後の手指に残るウイルスの感染価の減少、すなわち、回収液の $TCID_{50}/100 \mu L$ を Fig. 1 に示した。手洗いなしの場合を基準に、流水すすぎのみの手洗いにより、約 $1/100$ 、すなわち $0.64 \pm 0.5\%$ の感染価に減少した。

次に、手洗いに各薬剤を用いた場合、回収液のウイルス感染価を流水すすぎのみの場合の値を基準に比較すると、ハンドソープ A で $8.8 \pm 2.3\%$ 、ハンドソープ B で $14.6 \pm 10.9\%$ 、ハンドソープ C で $11.8 \pm 5.5\%$ にそれぞれ減少した。しかし、アルコール噴霧して流水によるすすぎ、あるいはクロルヘキシジンや第四級アンモニウム塩による手洗いでは、流水すすぎのみの場合と比較してウイルス感染価の減少傾向はみられなかった。

3. ウイルス遺伝子量からみた洗浄効果

手洗い後の手指に残るウイルス遺伝子量を Fig. 2 に示した。感染価同様に手洗い後の回収液の FCV 遺伝子量は、流水すすぎのみ手洗いにより、手洗いなしの場合に比較して、約 $1/100$ 、すなわち $1.1 \pm 0.6\%$ に減少がみられた。

各種薬剤について、FCV 遺伝子量を流水すすぎのみの場合と比較すると、ハンドソープ B で $1.7 \pm$

1.6%, ハンドソープCで $10.3 \pm 9.3\%$ にそれぞれ減少した。しかし、ハンドソープA, クロルヘキシジン, 第四級アンモニウム塩およびアルコールを用いた場合ではウイルス遺伝子量の減少傾向はみられなかった。

4. 手洗い方法による除去効果の検討

手洗いの時間および回数について検討した結果, もみ洗い時間を10秒から30秒に増やした場合では明確な減少傾向がみられなかった。一方, もみ洗い時間を60秒にした場合は10秒の場合の $14.7\% \pm 6.86\%$, およびもみ洗い10秒を2回にした場合には $1.23 \pm 0.17\%$ にそれぞれ遺伝子量が減少した (Fig. 3)。

考 察

手洗いの効果を人工的に培養できないNVの代替指標ウイルスとしてFCVを用いて検討した。評価方法としては, 手洗いの効果を, ①組織培養によるウイルス感染価の測定による不活化効果と, ②realtime PCR法によるウイルス遺伝子量の定量による除去効果の二つの指標を用いて比較検討した。

流水によるすすぎのみの手洗いによるウイルスの除去効果を, 手洗いなしの場合と比較すると, ウイルス感染価, ウイルス遺伝子量ともに100分の1程度に減少していることから, 手洗いの物理的な効果により手指に付着したウイルス量が100分の1程度に減少するものと推定された。

クロルヘキシジン, 第四級アンモニウム塩およびアルコールには流水すすぎのみの場合と同程度のウイルス除去効果, 不活化効果を示したに過ぎなかった。クロルヘキシジンに関しては, エンテロウイルス等のエンベロープのないウイルスについては不活化効果がないことが報告されている⁹⁾。そのことも同様にエンベロープを持たないFCVに対して不活化効果がみられなかった一因と考えられた。

ウイルス感染価の減少効果のみられたハンドソープA, B, Cはいずれも界面活性剤を含む市販の製品であった。このことから, 薬剤に含まれる成分に加えて, 手洗いの際に洗浄効果のあるものが, よりウイルス除去効果が大きいと考えられた。

ヨード化合物を成分として含むハンドソープAは, 流水すすぎのみの場合と比較して, ウイルス感染価の減少傾向はみられたが, ウイルス遺伝子量には減少傾向がみられなかった。これは今回の検討に用いたハンドソープに含まれるヨード化合物 (ポビドンヨード) に本ウイルスの不活化作用があるため¹⁰⁾と推定された。

さらに, 効果的な手洗い方法を検索する目的で, 感染価および遺伝子量で減少効果のみられたハンドソープBを用いて, 手洗いの時間および回数を検討したところ, 手洗い時間をある程度長く, あるいは手洗い

を繰り返した場合に, ウイルスの減少傾向がみられた。このことから, より丁寧でより頻回の手洗いによりウイルス除去効果が高まることが示唆された。

従来からいわれている食中毒の予防対策のための三つの要素として, 病原体を「付けない」, 「増やさない」, 「殺す」という基本がある。しかし, ウイルス性胃腸炎では「増やさない」は当てはまらないため, 「付けない (除去)」, 「殺す (不活化)」という二つの要素が重要となる。食品に付着したウイルスであれば加熱による不活化が有効¹¹⁾であり, 施設環境であれば次亜塩素酸等の薬剤や紫外線などによるウイルスを不活化する方法¹²⁾¹³⁾がある。しかし次亜塩素酸は, その皮膚への刺激等から手指の洗浄に用いるのは適当ではない。今回の検討により, 手洗いには物理的なウイルス除去効果があることが確認できた。流水によるすすぎのみでも100分の1程度にウイルスの量が減少することに加え, 手洗い時に洗浄作用や不活化作用を持つハンドソープを利用することで一層の効果が期待できる。さらに, もみ洗いの時間を長く, あるいはもみ洗いの回数を増やすことによりウイルス除去効果が高まる結果が得られた。

今後, これらのデータを, すでに報告されている細菌に関する検討成績とあわせて, 調理従事者, 保育園等の集団生活に関係する職員, 病院などの施設で介護等に当たる職員等に情報提供し, 啓蒙活動を展開していくことが, ウイルス性に限らず, 有効な集団胃腸炎の予防や拡大防止に重要である。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課：平成16年食中毒発生状況。食品衛生研究。2005；55 (9)：78—164。
- 2) 国立感染症研究所：ノロウイルス感染集団発生2003年9月～2005年10月。病原微生物検出情報。2005；26 (12)：323—5。
- 3) 森 功次, 林 志直, 佐々木由紀子, 野口やよい, 甲斐明美, 諸角 聖：発症者および非発症者糞便中に排出されるNorovirus遺伝子量の比較。感染症誌。2005；79 (8)：521—6。
- 4) Centers for Disease Control and Prevention (CDC)：Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings。MMWR。2002；51 (16)：1—44。
- 5) U.S.Food and Drug Administration (FDA)：Guidelines for effectiveness testing of surgical hand scrub (glove juice test)。Federal Register。1978；43：1242—3。
- 6) 森田師郎, 前田 正, 谷口力夫, 中村 実, 立花光雄, 宮崎晴久, 他：各種手洗い法の洗浄効果の検討。日食微誌。1999；16 (1)：65—70。
- 7) 林 志直, 森 功次, 野口やよい, 佐々木由紀子, 中村敦子, 長島真美, 他：都内におけるノー

- ウォーク様ウイルスに起因した胃腸炎集団事例の発生状況 (1997年11月~2000年3月). 東京衛研年報 2000; 51: 8-13.
- 8) 国立感染症研究所: ウイルス性下痢症診断マニュアル (第3版). 2003.
- 9) Narang HK, Codd AA: Action of commonly used disinfectants against enterovirus. J Hosp Infect 1983; 4: 209-12.
- 10) Doultree JC, Druce JD, Birch CJ, Bowden DS, Marshall JA: Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. J Hosp Infect 1999; 41: 51-7.
- 11) Slomka MJ, Appleton H: Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of small round structured viruses in shellfish. Epidemiol. Infect 1998; 121: 401-7.
- 12) Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Gerba CP: Chlorine Inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. Appl Environ Microbiol 2003; 69 (7): 3979-85.
- 13) Suphachai N, Tadesse M, Sakchai H, Dean OC: Ultraviolet Inactivation of Feline Calicivirus, Human Enteric Viruses and Coliphages. Photochemistry and Photobiology 2002; 76: 406-10.

Effects of Handwashing on Feline Calicivirus Removal as Norovirus surrogate

Kohji MORI¹⁾, Yukinao HAYASHI¹⁾, Yayoi NOGUCHI¹⁾, Akemi KAI¹⁾, Kyoko OHE²⁾,
Sachi SAKAI²⁾, Motonobu HARA²⁾ & Satoshi MOROZUMI¹⁾

¹⁾Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,

²⁾School of Veterinary Medicine, Azabu University

Viral gastroenteritis caused by Norovirus (NV) mainly appears during the winter season. In fact, outbreaks and patients with NV gastroenteritis are the major cause of community disease in the winter. Strategies to avoid gastroenteritis caused by NV are thus needed. No effective method for evaluating virus inactivation and removal exists for of NV, which cannot be cultured using cell-lines. Trials using *Feline Calici Virus* (FCV; a member of the calicivirus family) as a NV surrogate have been conducted by culturing FCV in CRFK cells.

By washing one's hands, about 99% of the viruses can be removed, compared with simply rinsing one's hands in running water. Washing one's hands with alcohol, chlorhexidine, quaternary ammonium, or 3 other kinds of hand soaps (containing povidone-iodine, triclosan, and isopropylmethyl phenol, respectively), was also effective for removing viruses. These results suggest that washing one's hands may be an effective method of preventing viral gastroenteritis.