

1 擬似おう吐物落下飛散実験

ノロウイルスは 10～100 個のウイルスで十分に感染するといわれており、1 滴のおう吐液も感染源となる可能性がある。おう吐物の迅速かつ適切な処理は、感染拡大の防止に最も重要な対策の一つである。今回、確実な消毒を実施するために、擬似おう吐物を作成し、種々の条件下で落下させ、飛散範囲の検討を行なった。さらに、擬似おう吐物にポリオウイルス (PV) を混入し、飛散したおう吐物中のウイルスの活性を調べた。

(1) おう吐物飛散の範囲と飛散状況

方法

白色紙上に 50cm 四方のカーペットを置き、赤に着色した擬似おう吐物 50g を 50cm 及び 1m の高さから静かにカーペット中心部に落下させた。カーペットを取り除き白色紙上に飛散した赤色点を数えた。塩化ビニル (塩ビ) 床材については、塩ビ床の上に白色紙を敷き、擬似おう吐物を落下させた後、中心から 50cm 四方を除いて白色紙に飛散した赤色点を数えた。(写真 1)

擬似おう吐物：炊いた白米 12.5g に水 37.5mL を加えスタマッカーで処理したもの。

床の条件： 塩化ビニル床、②裏ゴム張りカーペット (毛足の長さ 2mm) 裏布張り長毛カーペット (毛足 10mm) 裏布張りループ状カーペット (毛足 5mm)

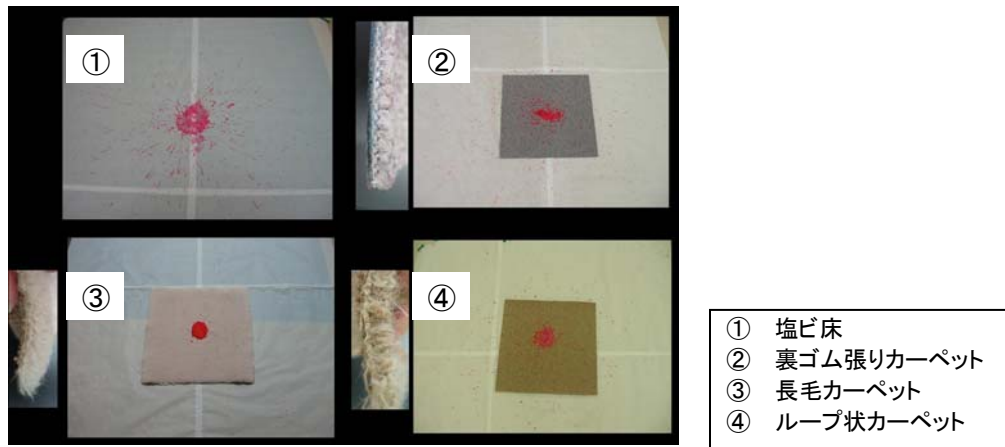


写真 1 各種の床に落下させた擬似おう吐物

結果

1 m の高さから擬似おう吐物を落下させた場合、カーペット敷きでは落下地点から半径 1.6～1.8m の範囲まで擬似おう吐物の粒子が確認され、粒子数は 10^3 個レベルであった。塩ビ床の場合には半径 2.3m まで飛散が確認され、おう吐物粒子は 10^4 個レベルであった。(図 1)

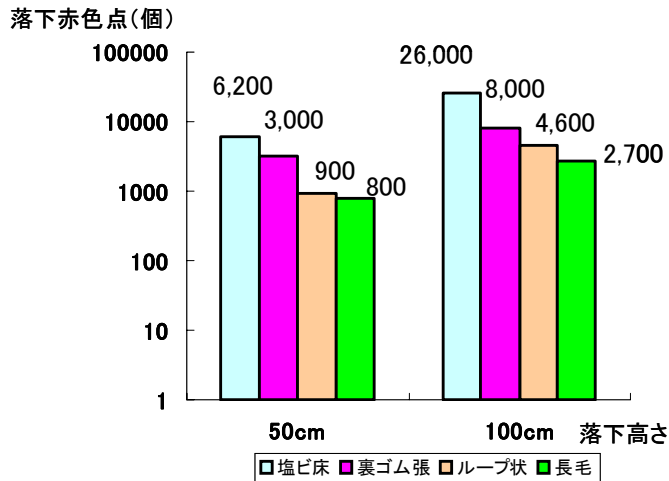


図1 各種床における飛散おう吐物数
(落下中心から半径 50-160cm の範囲)

(2) ウイルス飛散の範囲を測定 (飛散した擬似おう吐物中ウイルスの活性試験)

飛散した少量のおう吐物にもウイルスの活性が認められるかどうかを調べるため、ノロウイルスの代替ウイルスを混入した擬似おう吐物を用いて、飛散したおう吐物粒子中のウイルス活性を調べた。

方法

ポリオウイルス(PV)添加の擬似おう吐物 (終濃度 1×10^7 個/mL) を塩ビ床に 1m の高さから落下させた。落下中心から 2m30cm まで 1 列または 2 列に並べた HeLa 細胞を发育させた径 90mm の円形シャーレにおう吐物を捕集し、倒立顕微鏡下で PV による細胞変性効果を観察した。

結果

落下地点から 140cm までのすべての HeLa 細胞のシャーレで細胞変性効果が観察され、167cm の地点では 2 枚のうち 1 枚 (1/2)、176cm の地点では 2/2、194cm の地点では 1/2 のシャーレで細胞変性効果が認められた。

(図 2)

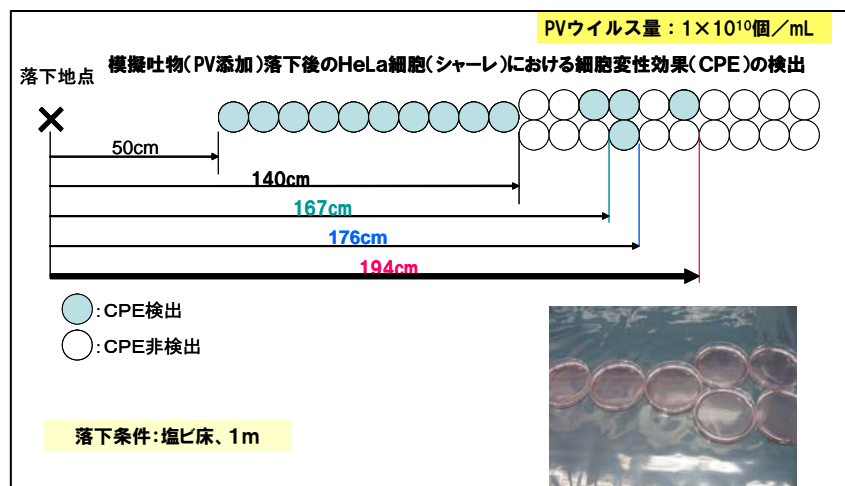


図 2 擬似吐物(PV 添加)落下後の HeLa 細胞(シャーレ)における細胞変性効果の検出

まとめ

おう吐物の飛散範囲は、1mの高さから静かに落下させた場合でも半径2m程度に及ぶことがわかった。また、2m程度飛散したおう吐物粒にウイルスの活性も認められた。

おう吐物の処理においては、広範に飛散することを考慮した清掃と消毒を実施する必要性が認められた。

おう吐物を行なう人は、作業中に手、ひざ、靴底などへのおう吐物の付着に気をつけ、自らの感染防止と二次汚染の防止に努める必要がある。

2 加熱による消毒方法の研究

厚生労働省から示されている「ノロウイルスに関する Q&A」では、ふん便やおう吐物が付着したものの処理は 200ppm または 1,000ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液での消毒、あるいは 85℃ 1 分以上の熱処理が推奨されている。しかし、カーペット敷きの床へのおう吐の場合、高濃度の次亜塩素酸ナトリウムの使用はその刺激臭やカーペットの脱色の危惧から敬遠される傾向にある。さらに布団に付着したおう吐物についても、次亜塩素酸ナトリウムの使用や丸ごとの熱処理は困難であると考えられる。そこで厚労省の Q&A において提案されているスチームアイロンや布団乾燥機など汎用器具による加熱についてその効果の検討を行なった。

(1) 家庭用スチームアイロンによるカーペットの加熱実験

方法

おう吐物の飛散範囲の把握に用いた 50cm × 50cm のカーペット 3 種類について行った。カーペット上におう吐した場合を想定し、水 50mL をカーペット上に撒き、全体を濡らして、家庭用スチームアイロン（100V1,200W、温度調節範囲約 120℃～210℃、低・中・高の 3 段階設定）を「高」にして加熱した。スチームアイロンを 30 秒間くまなくかける方法及び濡らしたペーパータオルをカーペット上に置き、その上にスチームアイロンを置いて加熱する方法を試みた。（写真 1）



写真 1 スチームアイロンによる加熱におけるカーペット表面の温度測定

使用温度計は食品中心温度測定用センサ付きデジタル温度計

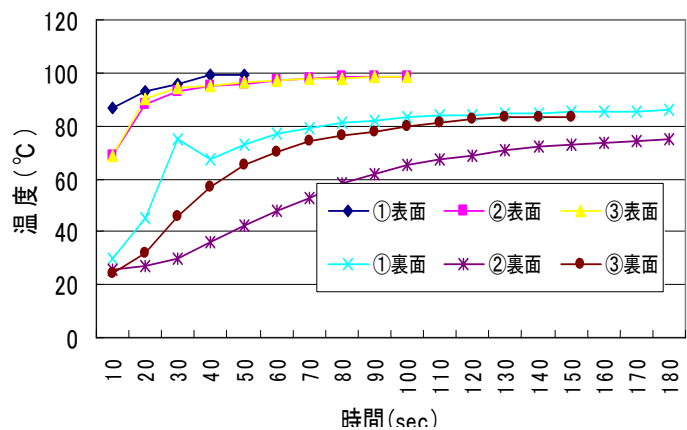


図 1 家庭用スチームアイロンでの加熱による各種カーペットの到達温度

結果

直接スチームアイロンを 30 秒間、全体的にかけた直後のカーペット表面温度は 43℃ であった。いずれのタイプのカーペットも、濡れタオルの上から 20 秒ほどスチームアイロンを当てることにより表面温度は 85℃に到達したが、85℃を 1 分間維持するためには 2 分程度継続して当てる必要があった（図 1）。

スチームアイロンを固定して当てる場合、濡れタオルの上から当てることによりアイロンからの蒸気の散逸を防ぐことができ、短時間でのカーペット表面温度の上昇に有効であった。

カーペットの裏面の温度は180秒の加熱で毛足の短い裏がゴム張りのカーペットやループ状のものは85℃に到達したが、長毛のカーペットは75℃程度までしか上昇しなかった(図1)。裏面まで85℃に加熱するのはカーペットの厚さや材質によっては困難であると考えられた。

(2) 小型スチームクリーナーによるカーペットの加熱

方法

スチームクリーナー(吐出圧力0.25MPa、吐出口蒸気温度約100℃)は付属しているブラシ及びクロスを装着し(写真2)、カーペット上の温度計の上にあてて蒸気を噴霧して表面温度を測定した。また同時にカーペット裏面の温度を測定した。

結果

カーペット表面は30~40秒のスチーム噴霧により、85℃以上に到達した。スチームアイロンと同様に85℃を1分間維持するためには1ヶ所に2分間ほど蒸気を噴霧する必要がある。

裏面は、180秒の加熱でも60~75℃程度しか上昇しなかった(図2)。



写真2 ブラシ型吹き出し口にクロス
を装着したスチームクリーナー

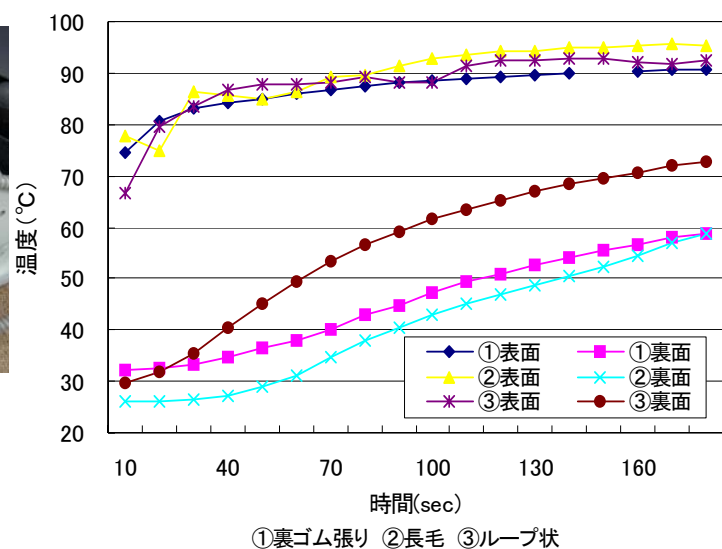


図2 小型スチームクリーナーで加熱したときのカーペットの温度変化

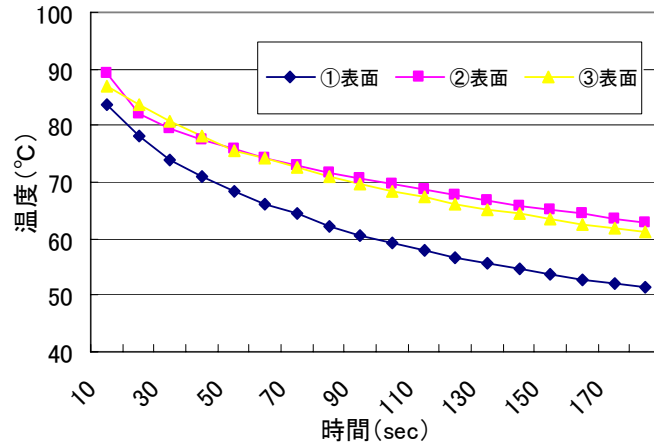
(3) 熱湯による加熱

方法

電気ポットで沸騰させた熱湯50mLをカーペットにかけ、表面温度を測定した。

結果

カーペットの表面は、10秒間はほぼ85℃を保持できたが、30~60秒後には75℃に低下した(図3)。85℃を1分間維持するためには、熱湯量を多くするなどさらに検討する必要がある。



裏ゴム張り 長毛 ループ状

図3 各種カーペットに熱湯をかけたときの温度変化

(4) 布団乾燥機による布団の加熱

方法

布団におう吐した場合を想定し、1ヶ所に水100mLをこぼし、布で水を軽く拭き取った後、家庭用布団乾燥機(100V580W)を2時間運転して、敷布団の表面及び裏面の温度を測定した。(写真3)

結果

布団の表面温度は55 程度の温度上昇にとどまった。(図4)

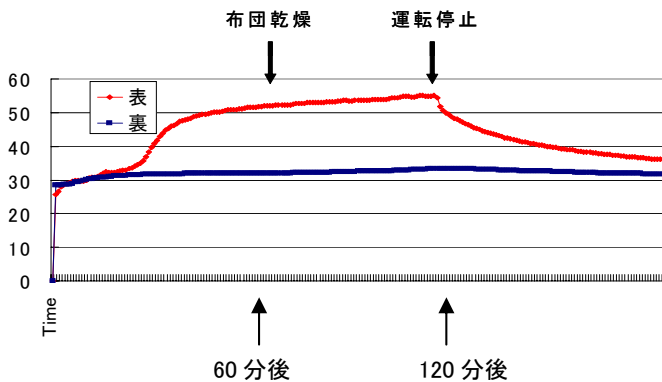


図4 布団乾燥機による布団の温度上昇
(水100mLをこぼした場合)



写真3 使用中の家庭用布団乾燥機

まとめ

カーペットや布団等の加熱処理において家庭用スチームアイロン、小型スチームクリーナーなどの利用を検討した結果、85 1分間を維持するためには長時間の作業が必要であること、あるいはその条件の維持が困難な場合があることが分かった。今後、さらに効果的な加熱方法について、検討を加える予定である。

3 加熱によるノロウイルスの不活化条件の検討

ノロウイルスの熱による不活化温度の検討についてはいくつかの報告がある。しかし、ノロウイルスは培養法が確立されていないため、代替ウイルスでの報告しかない。そこで、ノロウイルスの構造タンパクであるカプシドタンパクを人工的に作製し、種々の温度条件によるノロウイルス由来カプシドタンパクの不活性条件の検討を行った。

また、ウイルスの加熱による不活化の目安として 85℃ 1 分の温度条件が推奨されている。しかし、実際の加熱処理においては、この条件の維持が困難な場合も多々あることから、加熱温度と加熱時間についての詳細な検討が必要であると考えられ、ノロウイルスの代替ウイルスを用いて実施した。

(1) ノロウイルス発現タンパクを用いた不活化条件の検討

方法

2006/2007 年シーズンに都内の感染事例において検出された GII/4 および GII/6 のカプシド遺伝子を PCR 法により増幅後、バキュロウイルスに組み込み発現させたタンパクを用いた。

0.5mL チューブにタンパク液 30 μ L を入れ、サーマルサイクラーにて、50~99 $^{\circ}$ C の範囲で、1 分間加熱後、氷冷し、市販ノロウイルス抗原検出キットおよび B 型赤血球による凝集反応性をみた。

結果

ノロウイルスの外皮蛋白は 1 倍~1,000 倍に希釈した場合でも、ノロウイルス抗原検出キット (ELISA 法) による反応性が認められた (図 1)。また、B 型赤血球とも強く凝集することが判明した。

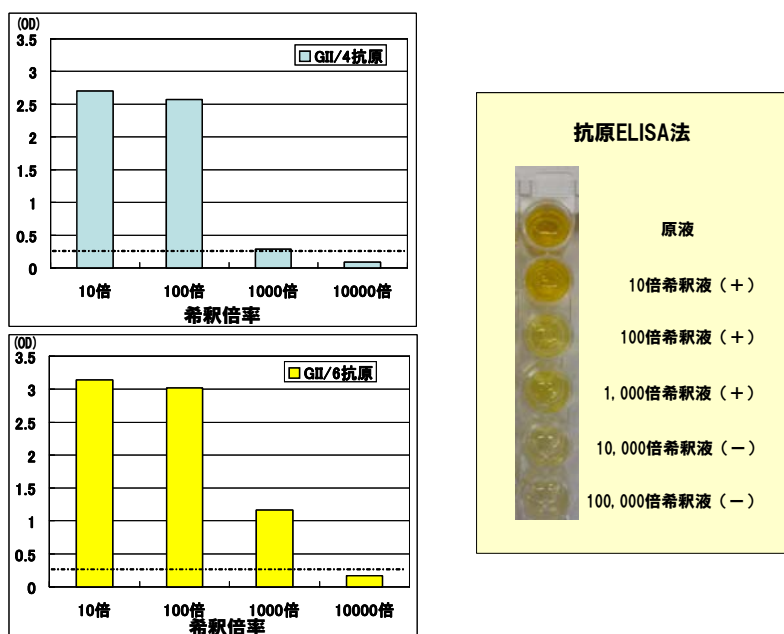


図 1 ELISA 法によるノロウイルス発現タンパクの希釈濃度別の反応性

ノロウイルス発現タンパクは 72°C前後以上の加熱処理により変性し、ELISA 法で検出されなくなった (図 2)。図 1 に示すように本実験におけるノロウイルス発現タンパクの抗原はタンパクを 1,000 倍希釈した場合は検出されたが、10,000 倍希釈した場合は不検出であったことから、72°C前後以上の加熱処理により少なくとも 10^{-3} 程度に抗原性が消失すると考えられた。

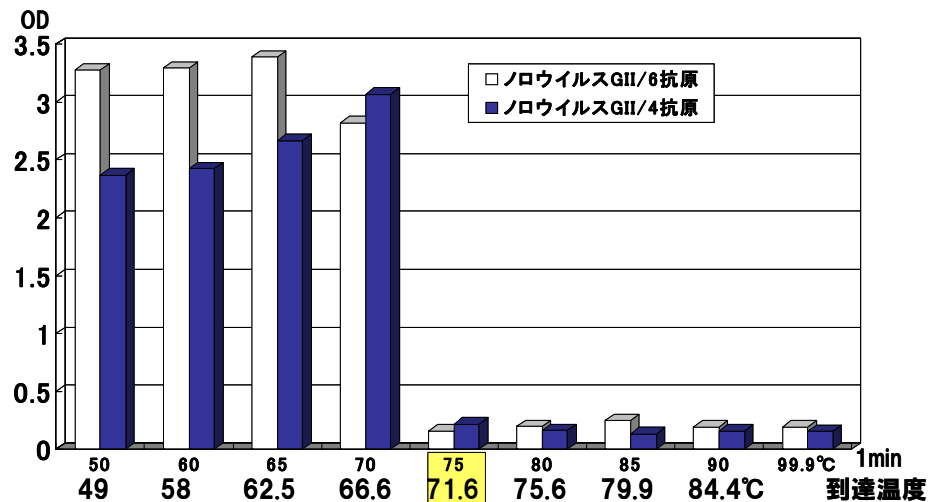


図 2 加熱によるノロウイルス発現タンパクの抗原性の変化 (ELISA 法による)

(2) ネコカリシウイルス(FCV)による検討

方法

CRFK 細胞で培養した FCV の F9 株の溶液 (感染価 $10^{6.93}$ TCID₅₀/100 μL) を使用した。

ウイルス液 500 μL を 1.5mL のチューブに分注し、同量のリン酸緩衝液を分注したチューブにセットした温度計のセンサーとともに恒温水槽により加熱した。恒温水槽の設定温度は 55~85°C とした。加熱前のウイルス液の温度は 7~8°C であった。加熱開始後、設定温度-0.5°C 到達時を 0 秒として計時を開始し、30 秒、1、3、5、10 分経過後に氷冷した。このウイルス液を CRFK 細胞に接種し、細胞変性効果 (CPE) を指標に、加熱によるウイルス不活化効果の判定を行った。不活化効果は、ウイルス液によって細胞が CPE を起こさない時点を「不活化完了」として判定した。

結果

今回の検討に用いた量のウイルスは、ウイルス液の中心温度 60 で 5 分以上、65°C で 3 分以上の加熱により、70 以上では設定温度到達時点で FCV は不活化された。(図 3)

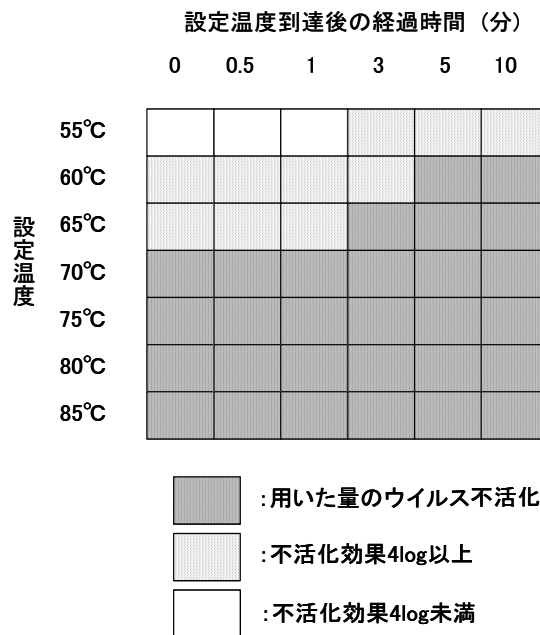


図3 加熱によるFCVの不活化

(3) まとめ

ノロウイルス発現タンパク及びFCVを用いた実験より、ウイルス本体が少なくとも72程度に加熱されることにより、不活化される可能性が示唆された。

ノロウイルス発現タンパクを用いた実験では、72°Cで10³レベルの発現タンパクが変性することから、おう吐物の落下地点の周辺部などノロウイルス量の少ないと考えられる部分では85°Cより低い温度で消毒可能であることが示唆された。

FCVを用いた実験ではウイルス液の中心温度60°Cで5分以上、65°Cで3分以上の加熱により不活化され、85°Cより低い温度においても加熱時間を長くすることにより不活化する可能性が示唆された。

今後さらに実際の事例に即した条件での検討などを加える必要があると考える。

4 ノロウイルス感染を確認する検査法の検討

ノロウイルス感染を確認する検査には、核酸遺伝子増幅法であるリアルタイム PCR 法をはじめ市販キットを用いた検査法がある。ノロウイルス感染症に対する感染拡大・防止対策を早急に行う必要性から、迅速性および簡便性を備えた各市販キットでのウイルス検出率について検討を行った。各市販キットの特徴（検出感度、検査所用時間、コスト、簡便性等）を考慮し、リアルタイム PCR 法での結果を基にその有用性を検討した。今回は、体外診断用医薬品および研究用試薬として市販されている 4 種の市販キット（A～D）について検討した。

(1) 検査材料および検査法

供試材料

平成 18 年 4 月から平成 19 年 6 月の間に発生した胃腸炎集団発生事例で、リアルタイム PCR 法＜当センター法＞で陽性になった 17 事例より選出したふん便 64 件を検査材料とした。今回用いたふん便は、更にリアルタイム PCR 法＜通知法＞で陽性になることを確認した。また、リアルタイム PCR 法＜センター法と通知法＞で陰性となったカンピロバクター感染者、ロタウイルス感染者等のふん便 22 件を陰性対照とした。

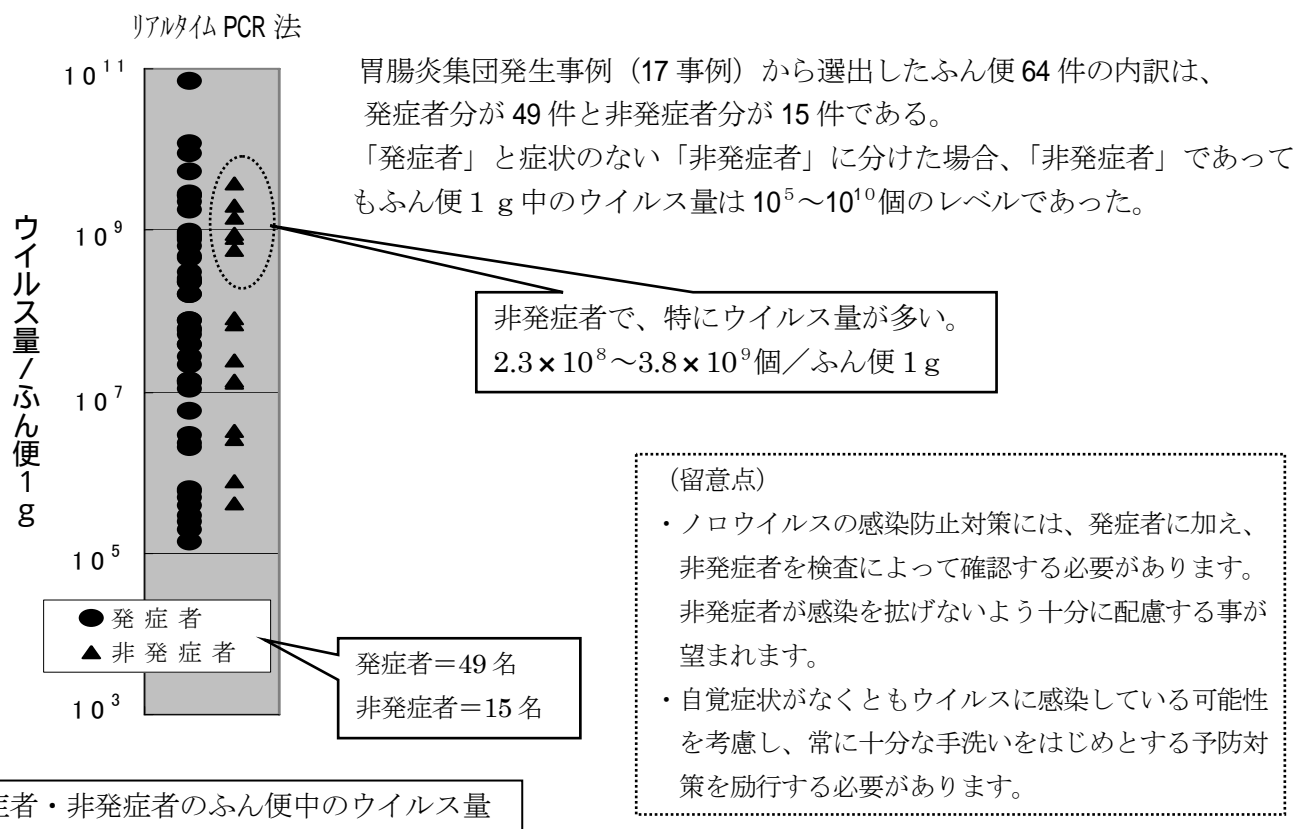
検査方法

- リアルタイム PCR 法＜通知法＞食安監発第 1105001 号、平成 15 年 11 月 5 日発

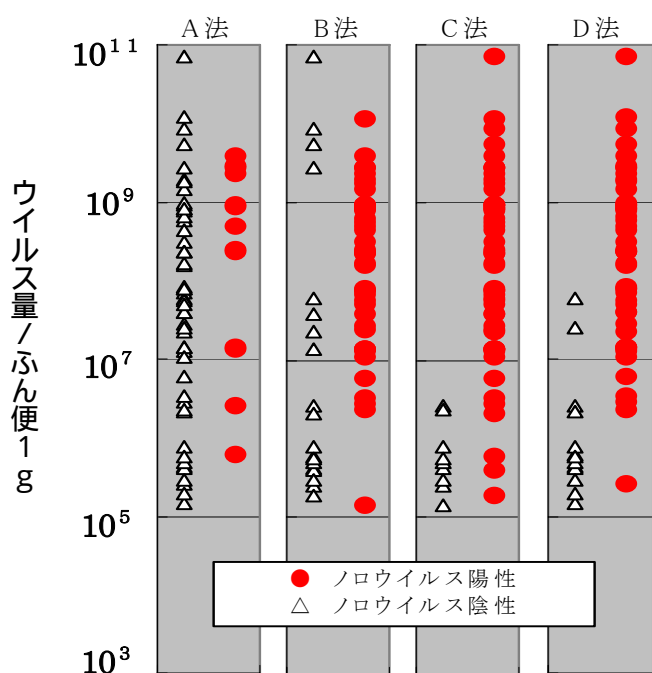
ふん便 10% 乳剤 (PBS-) 作成	10,000～12,000rpm、20 分冷却遠心	
遠心上清 140 μL から核酸抽出 (QIAamp Viral RNA Mini キット)		DNase 処理
RT 反応 (42°C、1 時間)	99°C、5 分	リアルタイム PCR 判定

- A 法；抗原抗体反応に基づく検査法＜体外診断用医薬品＞、添付書に準拠
- B～D 法；遺伝子増幅に基づく検査法＜研究用試薬＞、添付書に準拠

(2) ふん便中のノロウイルス量



(3) 市販キットを用いた検査結果の比較



* ウイルス検出率は、リアルタイム PCR 法による検出率を 100% として算出した。

* ウイルス量の標記は、リアルタイム PCR 法<通知法>で得られた遺伝子数を、検査に用いた検体量から「ふん便 1g 中のウイルス量」に換算した。

* 抗原抗体反応法
ウイルスとウイルスに対する抗体が結合する原理を利用した方法

* 核酸増幅法
ウイルスの特定遺伝子（核酸）を人為的に増幅し、大量に増えた遺伝子を検出する方法

市販検査キット（4 種類）によるウイルス検出率には顕著な差がみられた。

○ 抗原抗体反応によるウイルス検出率（A 法）は 20% で、ふん便 1g 中のウイルス量が 7×10^{10} 個でも検出できない検体があった。この方法では遺伝子群（G I 群と G II 群）の区別はできない。

核酸増幅法によるウイルス検出率（B～D 法）は 70～86% の範囲で、抗原抗体反応法による結果より高率であった。ふん便 1g 中のウイルス量が 10^5 個以上あれば検出できているが、 $10^5 \sim 10^7$ 個レベルで検出できない検体が多くあった。ウイルス検出率を比較すると、C 法 > D 法 > B 法となった。特に、C 法はふん便 1g 中のウイルス量が 2×10^6 個以上あるものはすべて検出できた。

陰性対照とした 22 件のふん便は、A～D 法すべて陰性となった（偽陽性はなかった）。

各検査法におけるウイルス検出率、検査所要時間、コスト等の比較*

検査法	原理	ウイルス検出率*	所要時間 / 10 検体 (h)**	検査機関の料金 / 1 検体 (千円)***	備考
リアルタイム PCR 法	核酸増幅	—	7	18～20	厚生労働省通知 (H15.11.5 付食案監第 1105001 号) による検査法
A 法	抗原抗体反応	20%	3.5	2～4.5	【用途】臨床診断用
B 法	核酸増幅	70%	3.5	5～8	
C 法	核酸増幅	86%	5	—	電気泳動法により結果判定 検査機関の料金設定不明
D 法	核酸増幅	80%	4.5	5	検査機関の料金設定なし 【料金】簡易検査用のため、検査キット料金から算出

* これらの結果は市販キットの性能を示すものではない。

** 当センターで実施した場合の検査所要時間

*** 検査機関の各社の HP 等を基に作成

★当センターにおける通常業務の検査は、検出率を向上させるために通知法に加え、27,000rpm・3 時間の超遠心処理（濃縮操作）を行っている。そのため、検査数によって異なるが、結果判定までには 10～15 時間程度を要している。

(4) 検査法の特徴

ウイルス検出率に着眼すると、現時点においてはリアルタイム PCR 法が最も適した検査方法である。しかし、高額な機器が必要であり、検査術式も複雑である。ウイルス量による検出範囲等の結果に加え、コストや検査に要する時間、検体数が大量となった場合の処理のしやすさ、さらに食中毒や感染症の原因究明やまん延防止という目的を考慮すると、市販キットを用いた検査法を活用することが有効である。市販キットを用いた検査法の特徴から、胃腸炎患者の集団発生が起こった場合、迅速に判定するための市販キットの利用法を以下提案する。

検査法の原理	長所	短所
抗原抗体反応	<ul style="list-style-type: none">・検査手順が簡便・検査判定までの時間が短い・低コスト	<ul style="list-style-type: none">・低検出率・特定のウイルス遺伝子型のみ検査可
核酸増幅	<ul style="list-style-type: none">・高検出率・ウイルス遺伝子群の判別可	<ul style="list-style-type: none">・検査感度を高くすると、長時間・コスト高となる・特定のウイルス遺伝子型のみ検査可

- ・ 抗原抗体反応検査方法
検査手法の簡便性、検査の迅速性・コスト面で優れる反面、検出率は核酸増幅法より劣り、また遺伝子群の判別ができない。
- ・ 核酸増幅による検査方法
ウイルス検出率は抗原抗体反応検査より高率であるが、コストが高くなる。

【抗原抗体反応検査】

胃腸炎集団発生当初の検査（迅速性）や胃腸炎患者の臨床診断検査とする。
体外診断用医薬品と認可されているキットであり、検査にかかる所要時間が短く、多数検体を同時に検査できるという利点を考慮し、集団胃腸炎患者発生時のスクリーニング検査として活用できる。しかし、本キットで陰性の場合には核酸増幅法による確認検査が必要となる。
今回の結果において陰性対照検体が陽性（偽陽性）になることがなかったことから、当該検査法で胃腸炎患者の集団に陽性者が確認できれば、早急に「ノロウイルス防止対策」の措置が可能となる。

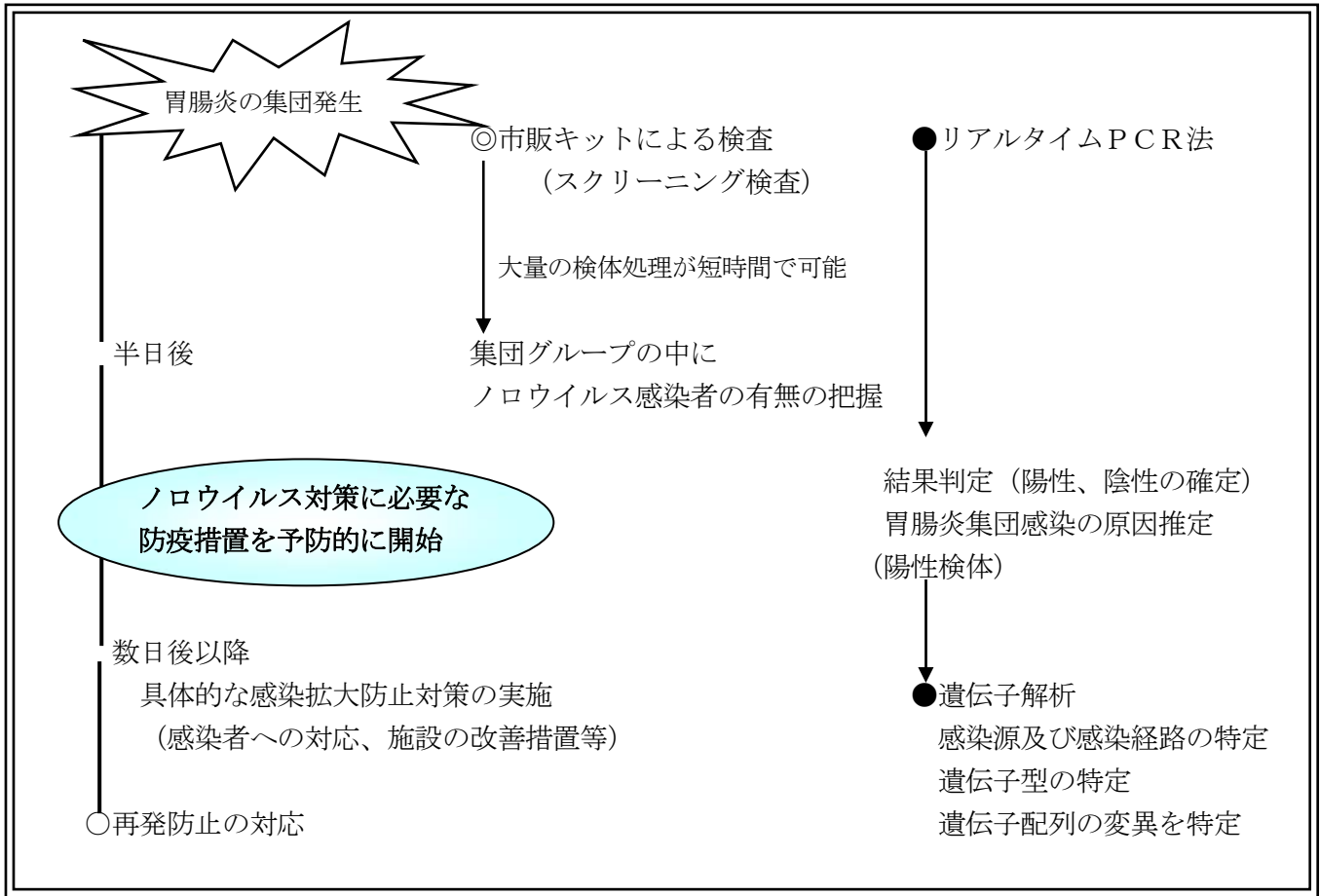
【核酸増幅検査法】

リアルタイム PCR 法と比較して、70～86%のウイルス検出率が得られ、偽陽性もなかった。
検査試薬が調整されていることから検査法は簡便で、迅速性もあり、また抗原抗体反応キットより検出感度が高い。
コスト高ではあるが、遺伝子群の鑑別も可能であるため、原因病原体が特定できる。
特に、症状がなくなった感染者（発症者の経過観察時）や発症者と接触した人のノロウイルス保有状況を把握することに利用できる。

(留意点)

- ・ 集団発生時当初の迅速検査、発症患者の迅速診断には、「抗原抗体反応による検査法」が利用できます。しかし、本法で陰性の場合にはリアルタイム PCR 法での確認を推奨します。
- ・ 核酸増幅法である市販キットによる検査でも、本来陽性である検体を陰性としてしまう可能性があります。リアルタイム PCR 法での最終確認を行うことを推奨します。

胃腸炎集団発症時における初動調査モデル例



(2) 食品からの核酸抽出法（カキの中腸腺を用いる方法）の検討

ノロウイルスによる食中毒事件において、食品からウイルスが検出されることは非常に少ない。それは、食品中に検査阻害物質が存在すること、また食品中に含まれるウイルスが微量であるためと考えられる。

今年度は、食中毒事件の主な原因物質であるカキについて、核酸抽出法の検討を試みた。

カキ中腸腺乳剤 54 検体にノロウイルスが陽性となったふん便を添加し、通知法と改良法*との比較を行った。その結果、通知法では検出率が 53.7%であったのに対して、改良法では 98.1%であった。今後、カキ消費シーズンにおいて改良法の有用性を検証していく予定である。

改良法

通知法で示している食品処理にフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール＝25：24：1 混合液で抽出操作を加えた方法。