

## ノロウイルスによる胃腸炎の感染経路に関する検討

おう吐などによりウイルス汚染された施設が関与したと推定される集団胃腸炎が複数事例で報告されている。この感染が成立する理由として、空気を介した感染や塵埃による感染が指摘されているが、実際にウイルス粒子の浮遊状況などは測定されていないのが現状である。そこで、おう吐などにより飛散したウイルスの室内環境中での動態を把握し、空気や塵埃を介する感染拡大の可能性を検討する目的で①ミスト状ウイルス液の空気中での動態の検討、②おう吐による浮遊粒子の発生に関する検討を行なった。また、ウイルスに汚染された施設を介した感染拡大の可能性を検討する目的でドアノブを介した感染拡大の可能性について検討した。

### 1 ミスト状ウイルス液の空気中での動態の検討

#### 1.1 目的

空気中に浮遊するウイルス液の時間経過による動態を浮遊粒子の大きさ別に把握する。

#### 1.2 実験方法

##### 1.2.1 供試ウイルス

ノロウイルス (Norovirus:NV) 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 Calicivirus:FCV) が NV とほぼ同じ粒子径であることからこれを代替指標とした。

##### 1.2.3 実験操作

- ①容積 360L のチャンバー内にネブライザー (コリソタイプ) を用いて FCV 液を 30 秒間噴霧した。なお、噴霧前にはチャンバー内をクリーナーで吸引し、 $0.3 \mu\text{m}$  以上の粒子がほぼ浮遊していない状態とした。チャンバー内に導入される空気は HEPA フィルター通過後のものである。
- ②一定時間経過後 (噴霧直後、1、2、4、12 および 24 時間経過後の 6 系列) に、ロープレッシャーインパクトターを用いて、 $23.9\text{L}/\text{min}$  の流速で 10 分間、浮遊する粒子径の区分 ( $0.06 \sim 12.1 \mu\text{m}$  の 12 区分) 別にサンプリングを行った。
- ③回収したインパクトター内のガラス板からウイルスを洗いだし、ウイルス RNA 抽出後、realtime-PCR 法により回収できたウイルス量を定量した。サンプリングは各設定時間につき 2 回ずつ、ウイルス量測定は各回収サンプルにつき 2 回ずつ実施した。

#### 1.3 結果及び考察

FCV を噴霧した直後 (約 1 分後) に回収を試みたところ、インパクトターの各区分から FCV が検出された。これによりネブライザーにより噴霧されたウイルス液は、さまざまな粒子径でチャンバー内に分散しているものと思われた。

各粒子径画分での FCV 検出値の平均値の推移を図 1 に示した。噴霧後、一定時間経過ごとに回収した試料についても同様に測定したところ時間経過とともに粒子径の大きな画分から FCV の

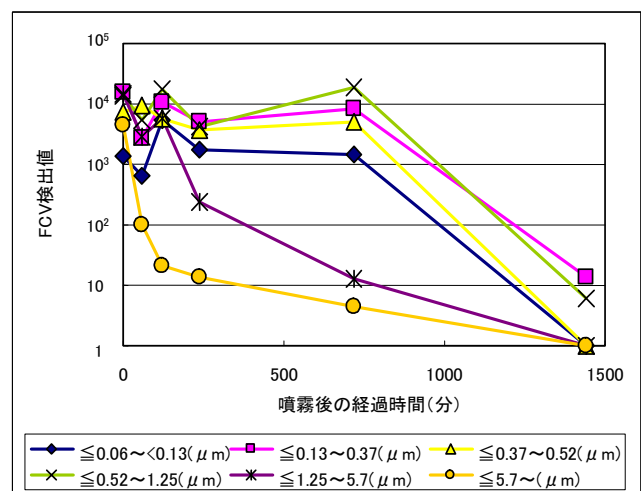


図 1 各粒子径画分における FCV 検出の経時変化

検出値が低下する傾向がみられた。ただし、12時間経過後まではおおむね粒子径  $1 \mu\text{m}$ 以下の画分(1.25  $\mu\text{m}$ 未満の6区分)についてはウイルス量に差がみられなかった。24時間経過後にはいずれの画分でもウイルスはほぼ測定できなかった。時間経過による測定値の低下は主にチャンバー床面への粒子の落下のためと考えられた。

学会報告等

- 1)大貫 文, 他: 公衆衛生学会,福岡,2008 (発表予定)
- 2)森 功次, 他: 第56回日本ウイルス学会学術集会,岡山,2008 (発表予定)

## 2. おう吐による浮遊粒子発生の検討

### 2.1 実験目的

ノロウイルスの集団感染において空気中のウイルスを介して感染する経路として、感染者が床などにおう吐した時に飛散するウイルスを含む微小粒子が空気中に浮遊し、それが何らかの経路で人の腸管に取り込まれて感染する経路とおう吐により床に付着したウイルス粒子が何らかの原因で塵埃として再飛散したものを人が取り込んで感染する経路が考えられる。そこで、まず、床におう吐した時に飛沫粒子が発生し、空気中に滞留するかどうかを把握するために、バイオクリーンルーム内で、模擬おう吐物を落下させて発生する粒子の動態を調べた。

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 模擬おう吐物の作製法

次の2種類の模擬おう吐物を作製した。

①炊いた白米20 gに精製水100 mLを加えて、ストマッカーで30分間破碎混合した。それから残差を残したエキス部分のみを分取し、精製水で1:3の割合で希釈して400 mLの模擬おう吐物を作製した。

②炊いた白米60gを用い、①と同様の方法で模擬おう吐物を作製した。

#### 2.2.2 模擬おう吐物の落下方法

模擬おう吐物を人のおう吐物の代替として使い、以下の方法によりクリーンルーム内に落下させる実験を行った。クリーンルームはあらかじめHEPAフィルター通過空気を数10分間送風して、 $0.3 \mu\text{m}$ 以上の粒子数が10 counts/L 以下になるのを確認してから以下の実験を行った。すなわち65cmの高さに設置したマウスピースに、クリーンルームの外部サイフォンより模擬おう吐物400mL



写真1 クリーンルーム内での模擬おう吐物の落下による飛沫粒子発生実験

をいっきに吐出させた。おう吐物を受けるプラスチックバットの中に、塩ビシートとタイルカーペット（短毛、裏ゴム張り）を敷いた条件で、2種類の模擬おう吐物をそれぞれ落下させた。

### 2.2.3 発生粒子の計測法

粒子計測用のサンプリングチューブを、バットの底面から 35 c mの高さに設置し、発生粒子を粒径サイズ毎に計測した。吸引空気量0.5 L/min、2分間隔で30秒間計測の条件で、発生粒子の経時変化を計測した。

## 2.3 実験結果

### 2.3.1 おう吐物濃度と発生粒子数

模擬おう吐物の濃度を2段階に設定した場合の発生粒子数を経時的変動を見た結果、落下により発生する粒子数は、おう吐物濃度の高い方が若干多く、減衰する傾向は、濃度の高い方が若干緩くなることが認められた。

### 2.3.2 材質と発生粒子数

塩ビシートとタイルカーペットの2種類の材質について、模擬おう吐物を落下させて、発生粒子数に違いがあるかを調べた結果を図2、図3に示す。塩ビシートの方が、タイルカーペットよりも発生する粒子が多かった。タイルカーペットについては、模擬おう吐物では粒子の減衰が少ない傾向が認められ、特に1.0~5.0 μ m粒子が長く滞留する傾向が見られた。一方、塩ビシートでは、0.3~0.5 μ m粒子が1.0~5.0 μ m粒子よりも多く発生し、減衰はカーペットよりも早い傾向が見られたことから、両者からの浮遊粒子の比重や形態などの性質が異なることが推察された。

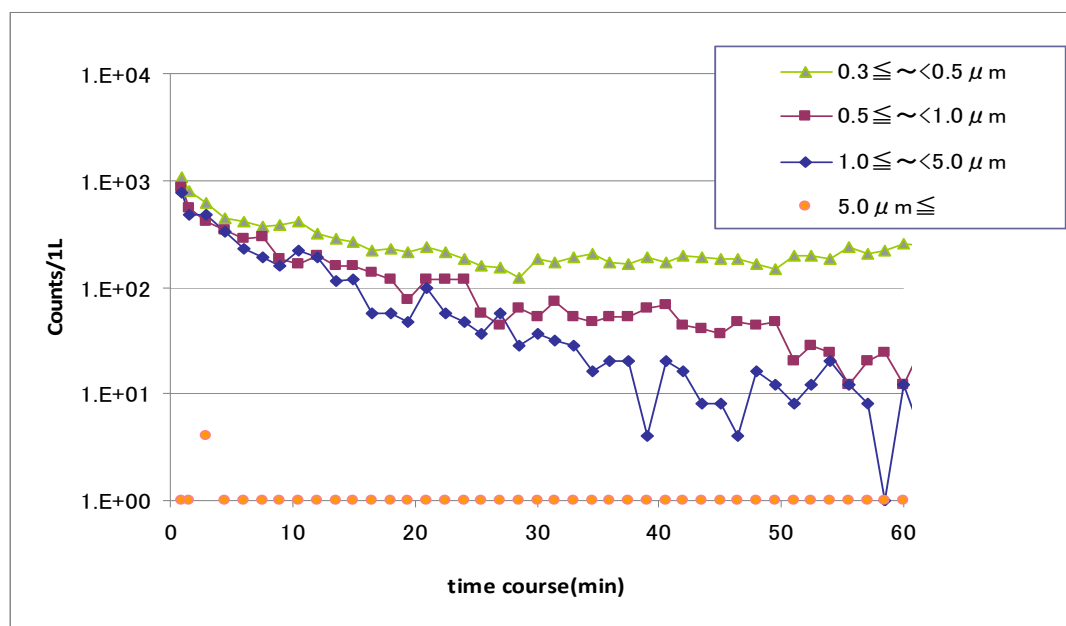


図2 模擬おう吐物（白米60g/100ml）落下による発生粒子の経時変化（塩ビシートに落下）

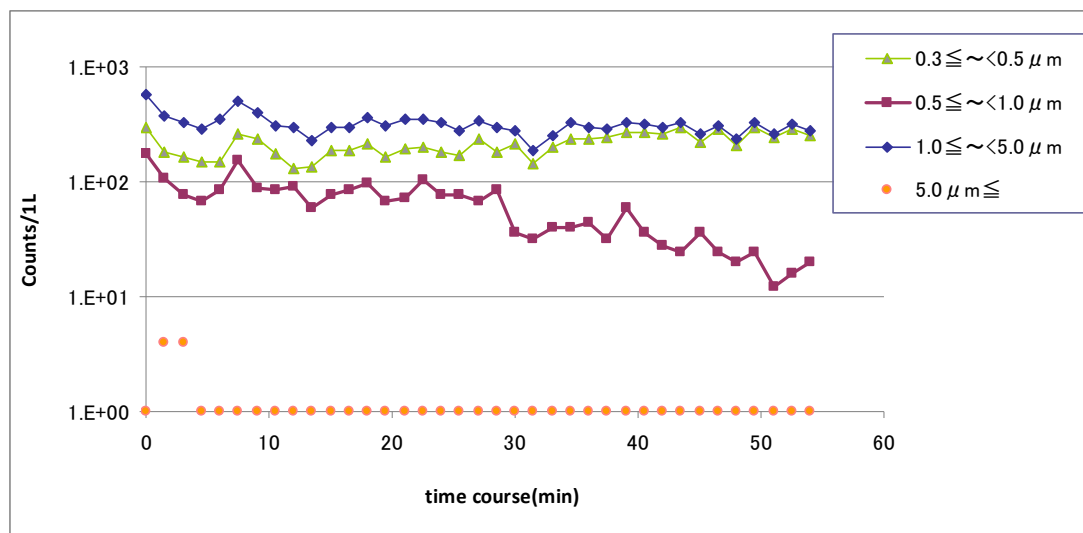


図3 模擬おう吐物(白米60g/100ml)落下による発生粒子の経時変化(タイルカーペットに落下)

## 2.4 考察

ノロウイルスを含んだおう吐物が床に落下した場合、その一部は、飛沫 (droplet)あるいは飛沫核 (droplet nuclei)となって、空気中に飛散し、少なくとも60分程度は滞留するものと思われる。5  $\mu$  m以上の粒子(飛沫)は急激に落下沈降して減衰するが、1 ~ 5  $\mu$  m領域の浮遊粒子は、比較的長く滞留することが考えられる。また、呼吸により、人体に吸引された浮遊粒子の空気流体力学的解析によれば、1 ~ 5  $\mu$  mのいわゆるミクロン粒子は、鼻腔、口腔、上気道の部分に沈着しやすいことがわかっている。もしそれらが食物といっしょに嚥下されれば、ウイルスが消化管にも十分移行しうる可能性がある。ノロウイルスの感染単位は、100単位と極少量であることを考え合わせれば、おう吐によって発生した浮遊粒子が空気中で飛沫核となって滞留し、生残しているノロウイルスを吸引することで、人への感染経路の一因ともなりうる。したがって、おう吐した初期に発生するウイルスを含む浮遊粒子をいかに速やかに除去するかが大事である。窓のある部屋では、窓開けにより換気をし、浮遊粒子を拡散・希釈させることが対策として有効かと思われる。また、人のおう吐物の処理にあたっての感染を避けるために、マスクの着用などの対策も必要かと思われる。

## 3. ドアノブを介した感染拡大の可能性についての検討

### 3.1 目的

感染経路のひとつとして、ウイルスに汚染されたドアノブを介した感染拡大の可能性が指摘されている。そこでこの経路による感染成立の可能性の有無を確認する目的で、FCV を代替指標として用いた伝播の有無についての検討を実施した。

### 3.2 実験方法

#### ① ドアノブを介した手指汚染について

両手指にFCV液1.5mlをもみこみ、風乾後ドアを開閉操作することによりドアノブを汚染した。次に、汚染者とは違う手指(他者の手指)によりドアの開閉操作を行った。ドアの開閉操作後、手指

から FDA の glovejuice 法を用いてウイルスの回収を試み、回収液を CRFK 細胞に接種してウイルス伝播の有無を検討した。

② ドアノブを介してウイルス汚染された手指による食品汚染について

ドアノブを介した食品汚染の可能性を考え、①同様の方法により汚染ドアノブ由来でウイルスが付着したと考えられる手指により食品試料を扱った。すなわち汚染ドアノブの開閉操作一度行い、その後盛り付け作業を想定して、キャベツ千切りを連続して 10 回分取した。各回の分取量に応じて回収液を一定濃度となるように加え、ウイルス誘出液を限外ろ過膜による濃縮後ウイルス RNA を抽出し、realtime-PCR 法を用いて食品試料中のウイルス遺伝子の検出を試みた。

### 3.3 結果および考察

① ドアノブを介した手指汚染について

開閉操作によるドアノブ汚染後、別の 2 名によりドアノブの開閉操作を行ったところ、その 2 名の手指から感染価を持ったウイルスがそれぞれ回収された。これによりウイルスに汚染されたドアノブが他者の手指を汚染することが確認できたと思われる。

② ドアノブを介してウイルス汚染された手指による食品汚染について

ウイルスに汚染された手指からさらに食品汚染することが可能か否かについて検討を実施した。その結果、食品試料を 10 回分取したところ 6 回からウイルス遺伝子が検出された。ただし表に示すようにウイルスの検出は 1～5 回目と 7 回目であり、連続した 6 回ではなかった。ドアノブを介さないウイルス汚染手指により、直接食品を扱った場合と比較すると食品からのウイルス遺伝子検出頻度は低下するが、今回の検討によりドアノブを介した場合でも食品汚染が起こりうることを示唆する結果が得られた。

今回の検討には実験的に汚染者の手指全体に FCV 液を添加しており、glovejuice 法による手指からのウイルス回収率および食品試料からウイルス回収率を考えると、検出値の定量的な評価は困難な部分もある。しかし、ノロウイルスの環境中における生存性は、代替指標による検討から室温でも数日と予測される。今回の検討により得られた結果から、ドアノブを介したウイルス汚染拡大の可能性ならびに食品汚染の可能性が実証されたと思われる。

(本検討の概要は、Third International Calicivirus Conference, 森功次ほか, Mexico, 2007 で情報提供をした。

表 FCVに汚染された手によりキャベツを取り分けた場合のキャベツからのFCVの検出

キャベツ取り分け回数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ウイルス回収	○	○	○	○	○	×	○	×	×	×

○:キャベツからウイルス検出, ×:不検出

## 加熱による消毒方法の検討

加熱によるノロウイルス不活化の目安として、中心温度 85°C 1 分の温度条件が推奨されている。しかし、家庭などで実際に加熱によるノロウイルスの消毒を行おうとした場合、食器や衣服では手軽に煮沸したり熱湯をかけたりできるが、床や寝具などについては、実施可能な実用的な方法を選択するうえでの具体的な情報は乏しい。また、おう吐等による布団のウイルス汚染を想定した場合、布団乾燥業者による専用の機器を用いた加熱では不活化に十分な条件が得られるものと思われるが、家庭等で市販の布団乾燥機を用いた場合には十分な加熱条件が確保されるかは不明である。そこで、ノロウイルスとほぼ同じ粒子径のポリオウイルス（ワクチン株、以下 PV という）や、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 Calicivirus、以下 FCV という）による代替実験により、実用的な加熱方法によるウイルス不活化効果を検討した。

今年度に検討した内容は以下のとおりである。

- ・低温長時間加熱による PV 不活化効果の検討
- ・低温長時間加熱による FCV 不活化効果の検討
- ・市販の布団乾燥機を用いた布団の加熱における温度変化の測定

### 1) 低温長時間加熱による PV 不活化効果の検討

#### (1) 方法

0.5mLのマイクロチューブに30 $\mu$ LのPV（ウイルス感染価 $10^{12}$ TCID $_{50}$ ： $10^{12}$ 倍に希釈してもHeLa細胞に細胞変性をおこす量）を入れ、サーマルサイクラーを用いて、40、45、50及び55°Cで30分、もしくは47.5及び50°Cで60分の加熱処理後、10倍段階希釈を行いHeLa細胞に接種し、4日間培養して細胞変性効果の有無を観察した。

		TCID $_{50}$ 発現希釈倍率												
		10 $^0$	10 $^1$	10 $^2$	10 $^3$	10 $^4$	10 $^5$	10 $^6$	10 $^7$	10 $^8$	10 $^9$	10 $^{10}$	10 $^{11}$	10 $^{12}$
加熱条件	無加熱	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	40°C、30分	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	45°C、30分	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	47.5°C、30分	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	50°C、30分	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□
	50°C、60分	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□
	55°C、30分	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□

細胞変性効果あり
  細胞変性効果なし

図 1 低温長時間加熱によるポリオウイルス（ワクチン株）の不活化

## (2) 結果

図1に示すように47.5℃以下の加熱処理ではPVはコントロールとほぼ同様に $10^{-12}$ 希釈まで細胞変性効果が観察され、不活化されていないことが示された。一方、50℃30分及び60分の処理では細胞変性効果は $10^{-3}$ 希釈までしか認められず（ウイルス感染価が元の $10^{-9}$ に減少）、55℃では全く認められなかった（元の $10^{-12}$ 以下に減少）。したがって、ノロウイルスと大きさや構造が類似したポリオウイルスについては、50℃以上の温度で30分以上の加熱により消毒効果が期待できることがわかった。

## 2) 低温長時間加熱によるFCV不活化効果の検討

### (1) 方法

感染価 $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/100 $\mu$ LのFCV液500 $\mu$ Lを1.5mLのチューブに分注し、図2のように、同一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40、45及び50℃である。加熱開始後、設定温度-0.5℃到達時から計時を開始し、5、10、30、60及び120分経過後に氷冷した。このウイルス液をCRFK細胞に接種し、細胞変性効果を指標として不活化効果の判定を行った。

### (2) 結果

結果を図3に示した。40℃で加熱した場合、2時間経過後でも不活化効果はほとんどみられず、45℃で加熱した場合でも2時間経過後のウイルス不活化は3.33 logであり、4 logに達しなかった。50℃で加熱した場合、4 log不活化には10分を要し、2時間加熱で細胞変性効果が見られなくなり、7.5 log以上不活化されたことを示した。

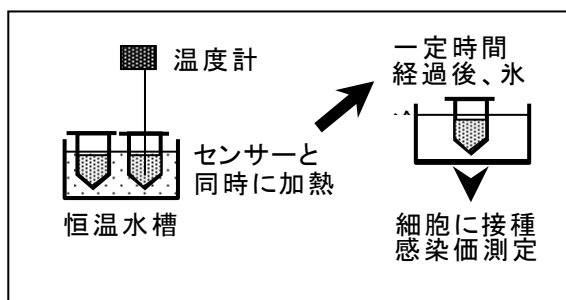


図2 低温長時間加熱によるFCV不活化効果の検討方法

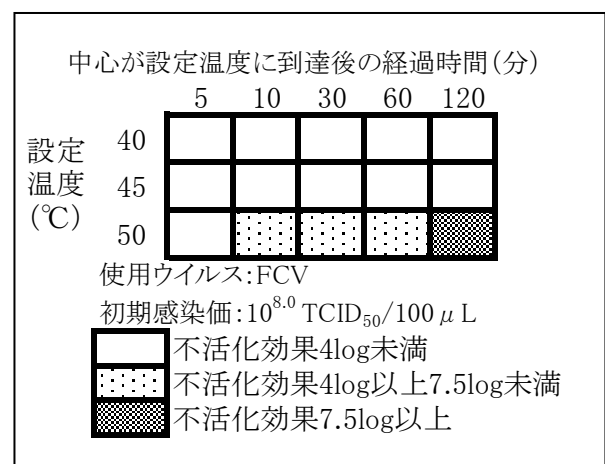


図3 低温長時間加熱によるFCV感染価の低下



### 3) 市販の布団乾燥機を用いた布団の加熱における温度変化の測定

#### (1) 方法

市販の家庭用布団乾燥機2機種を用いて以下のように実験した(図4)。検討に用いた布団は市販品で、敷布団にはシーツをかけて実施した。

① 布団乾燥機の風上(吹き出し口)と風下(吹き出し口の反対側)の1ヶ所ずつを模擬汚染箇所とした。おう吐等による布団汚染時には、おう吐物が内部にしみこむことが予想される。そこで5cm×5cmの小パックに水1mlを分注したもので水分を含んだおう吐物を模し、これに温度計センサーを密着させて、それぞれの模擬汚染箇所の敷布団の表面(布団乾燥機と敷布団の間)と裏面(床面と敷布団の間)に分貼り付けた。

② 敷布団にあてがったタオルの上から水100mlをまいておう吐物によって敷布団がぬれた状態を模した。その上に布団乾燥機のエアータグをセットし、毛布と掛け布団を重ねて布団乾燥機を運転して、運転中の模擬汚染箇所の温度変化を連続的に測定した。

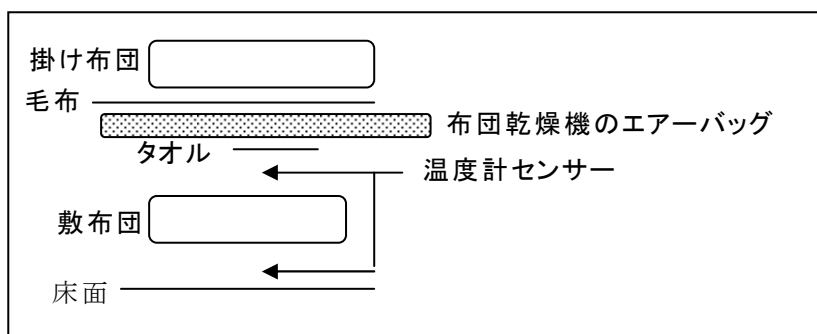


図4 市販布団乾燥機による模擬汚染箇所の加熱方法

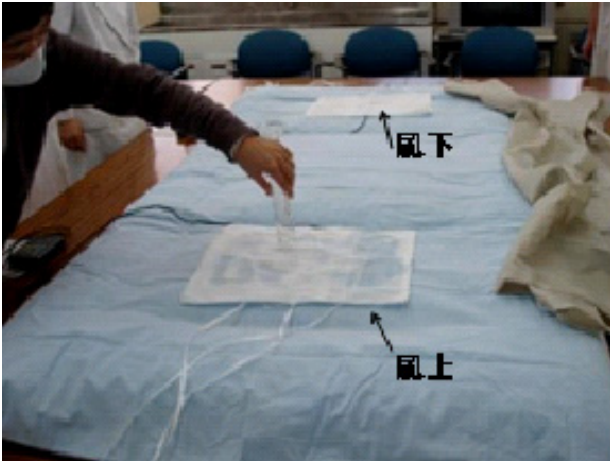


① 温度計センサー付き水パックを敷布団表側にセット



② 温度計センサー付き水パックを敷布団裏側にセット





③おう吐物による敷布団のぬれを模すため水 100mL を散布



④布団乾燥機を運転

## (2) 結果

測定した各模擬汚染箇所の温度推移を図 5 (機種 A) と図 6 (機種 B) に示した。機種 A は 2 時間運転、機種 B は温風なしのモードで 1 時間運転後、継続して温風ありのモードで 2 時間運転した。

機種 A の布団表側 (布団乾燥機をセットした側) では、風下の汚染部の乾燥によると思われる温度の上昇が約 1 時間後から測定され、運転終了時には約 30°C 上昇し、52°C となった。一方、風上における運転終了時の到達温度は 33°C にとどまった。また、布団裏側の到達温度は風上、風下とも運転終了時でも 30°C に達しなかった。

機種 B では、温風なしのモードで運転中は温度上昇がみられなかった。温風ありのモードで運転中の布団表側の温度上昇は 10~15°C にとどまり、到達温度は風上、風下とも 30°C 程度であった。また、布団裏側の到達温度は風上、風下とも運転終了時でも 30°C に達しなかった。

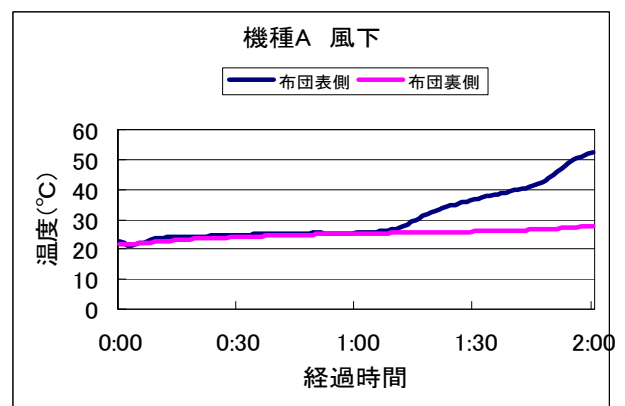
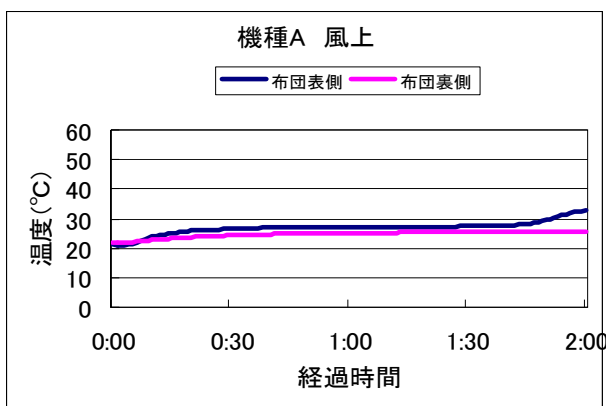


図 5 布市販団乾燥機運転時の模擬汚染箇所における温度変化 (機種 A)

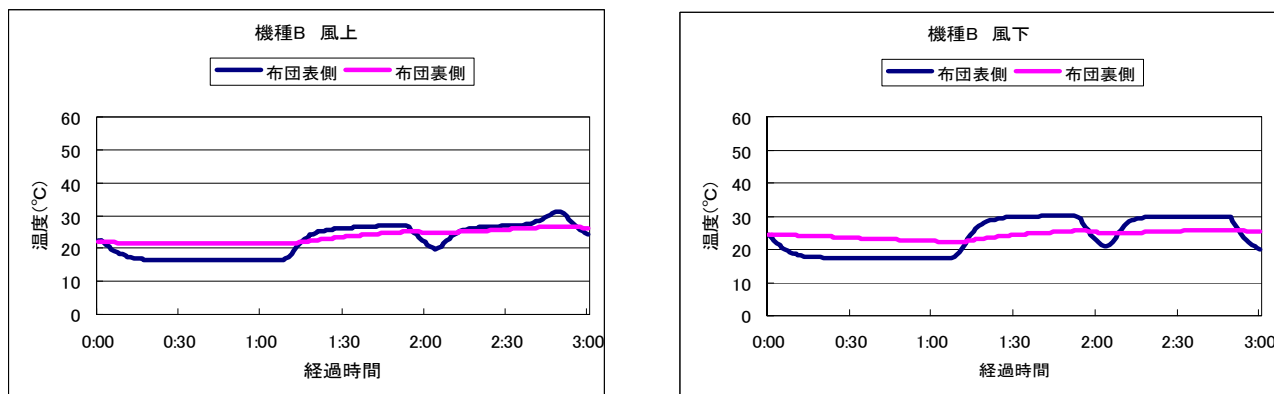


図 6 布市販団乾燥機運転時の模擬汚染筒における温度変化（機種 B）

以上の測定結果及び 19 年度に実施した検討結果から、以下のような点が判明した。

- ① 市販の布団乾燥機の機種によっては、既定の運転時間内に温度が 50°C 以上に上昇しないものがある。
- ② 温度の上昇は布団乾燥機をセットした表側のみであり、布団の裏側は 30°C 程度にとどまる。また、温風吹き出し口の風上と風下では温度上昇の効率が異なる。

#### 4) まとめ

低温・長時間加熱によりウイルスを十分不活化するためには、少なくとも 50°C で 2 時間の加熱が必要であった。

市販の家庭用布団乾燥機は、機種によって能力に差があり、ウイルスの不活化に必要な加熱条件を得ることは困難であることがわかった。寝具等の消毒を確実にを行う場合は、消毒が目的であることを十分説明したうえで布団の洗濯・乾燥を行う専門業者に依頼することが望ましいと考えられる。

### 3 塩素によるウイルス消毒方法の検討

ノロウイルスに対する消毒薬としては次亜塩素酸ナトリウムの使用が推奨される。ノロウイルスについては塩素消毒に耐性であるという報告があるが、用いたウイルス液による塩素消費が不明なため、結果の信頼性に乏しいものがある。また、次亜塩素酸ナトリウムは、有効な消毒効果を得るためには吐物処理時に残留塩素濃度を一定時間維持する必要があるが、おう吐物などが存在すると塩素が消費されて消毒のための塩素濃度の維持が困難であることが予想される。そのため、おう吐物による塩素消費の状況を把握しておくことが必要である。さらに、消毒のための次亜塩素酸ナトリウム溶液は使用の都度、調製することが基本であるが、緊急時に直ちに使用できるように作り置いた場合の保存性などの情報も必要と考えられた。

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 Calicivirus、以下 FCV という）を代替ウイルスとして用いて、ウイルス自身の塩素耐性について検討した。また、実際に塩素による消毒を行うことを想定して、カーペットの上におう吐した場合の塩素消毒への影響について検討を行った。

今年度検討した内容は以下のとおりである。

- ・塩素によるウイルス不活化効果の検討
- ・おう吐物やカーペットによる塩素消費に関する検討
- ・「社会福祉施設等におけるノロウイルス対応標準マニュアル（第3版）」（東京都福祉保健局）に従ってカーペットなどにおう吐した場所を消毒処理した場合の塩素濃度の保持に関する検討
- ・あらかじめ作成した次亜塩素酸ナトリウム溶液の保存条件の検討

#### 1) 塩素によるウイルス不活化効果の検討

##### (1) 方法

- ①CRFK 細胞で培養した FCV を回収し、遠心分離によって宿主細胞片等を除去し、さらにリン酸緩衝液 (PBS) で希釈して残存有機物量を極力減少させた FCV 液を調製し、これを所定濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液と反応させて、FCV 液による塩素消費量を求めた。
- ②FCV 液の塩素要求量は添加する塩素濃度や塩素溶液の pHにかかわらず 0.5 mg/Lであったので、FCV 液と次亜塩素酸ナトリウム溶液との等量混合によって 0.7~0.8 mg/L 程度の残留塩素濃度が確保されるように、次亜塩素酸ナトリウム溶液の塩素濃度をおおむね 2mg/L に調整した。
- ③FCV 液 (感染価  $10^{4.90}$ TCID<sub>50</sub>/100  $\mu$  L) の 50mL をビーカーに分取し、スターラーで攪拌しながら次亜塩素酸ナトリウム溶液を等量添加した。
- ④添加から一定時間 (30 秒、2 分、5 分、20 分および 60 分) 経過時の残留塩素濃度を測定するとともに、1.5mL を分取してウシ胎仔血清 (FCS) で残留塩素を除去し、CRFK 細胞に接種して細胞変性効果の出現から感染価を算出し、不活化率を測定した。対照として、検討に用いたウイ

ルス液に次亜塩素酸ナトリウム溶液と同量のリン酸緩衝液(PBS)および FCS を添加したものを同時に CRFK 細胞に接種した。なお、測定時の室温は 28℃、液温は 26.5～29.0℃であった。

## (2) 結果

FCV 液と次亜塩素酸ナトリウム溶液との混合後の塩素濃度の変化を表 1 に示した。なお、次亜塩素酸ナトリウム溶液については、原液の pH をアルカリ性のものを弱酸性に調整したものをを用いたが、初期塩素濃度をおおむね 2mg/L (アルカリ性 1.99mg/L、弱酸性 2.07mg/L) に希釈した後の pH はともに pH7 であったため、pH の違いではなく、同時実施した平行試験として取り扱った。

この結果から、予想どおりの塩素濃度が確保されたこと、また実験終了時(60 分後)も初期の半分以上の塩素濃度が保持されており、塩素による消毒効果は十分発揮されていたことがわかった。

表 1 FCV 液と次亜塩素酸ナトリウム溶液を等量混合した後の残留塩素濃度の推移\*

次亜塩素酸ナトリウム溶液の塩素濃度(mg/L)	残留塩素濃度 (mg/L)				
	経過時間(分)				
	0.5	2	6	20	60
1.99	0.71	0.69	0.62	0.57	0.4
2.07	0.84	0.84	0.69	0.57	0.47

\*塩素要求量0.5 mg/LのFCV液と塩素濃度1.99mg/Lまたは2.07mg/Lの次亜塩素酸ナトリウム溶液を等量混合したので、初期塩素濃度はおおむね0.7～0.8mg/Lと予想。

次亜塩素酸溶液を添加した FCV 液の感染価は、当初の  $10^{4.90}TCID_{50}/100 \mu L$  から塩素混合後 30 秒経過時には  $10^{0.50}TCID_{50}/100 \mu L$  以下(検出限界以下)となり、感染価が 4.4log 以上減少していたことから、用いたウイルスがほぼすべて不活化されていたと考えられた(表 2)。なお、混合した 30 秒後にすでにウイルス感染価が検出限界以下となる急速な不活化であったため、不活化曲線を得ることはできなかった。

今回の実験から、ノロウイルスと同じカリシウイルス科に属し、同様なウイルス粒子構造を持つ FCV が残留塩素濃度 0.7～0.8 mg/L に 30 秒暴露することにより 4.4log 以上不活化されること、すなわち 4log 不活化 CT 値が 0.4 mg・分/L 以下と推定されることから、ノロウイルスについても同様の塩素感受性があると推察される。

表 2 次亜塩素酸ナトリウム溶液添加による FCV 不活化効果\*

初期 塩素濃度* (塩素添加なし)	残存ウイルス濃度(TCID <sub>50</sub> /100 μL)					
	対照	接触時間(分)				
	0.5	2	6	20	60	
0.7 mg/L	10 <sup>4.9</sup>	nd	nd	nd	nd	nd
0.8 mg/L	10 <sup>4.9</sup>	nd	nd	nd	nd	nd

nd : 検出限界(10<sup>0.5</sup>TCID<sub>50</sub>/100 μL)未滿

\* 実験終了時(60分後)も 0.4~0.47 mg/Lの残留塩素濃度が残存。

## 2) おう吐物による塩素消費に関する検討

### (1) 方法

#### i 模擬おう吐物の塩素消費量

市販のパック入り白飯を電子レンジで加熱解凍した。実際のおう吐物でpHの緩衝作用がみられたことから、その一定量にフタル酸緩衝液 (pH4) を加えてストマッカを用いて1分間粉碎して模擬おう吐物を調整した。この模擬おう吐物の1gを時計皿にとってフタル酸緩衝液(pH4)を1mL加え、1000 mg/L の次亜塩素酸ナトリウム1mLを加え蒸、30秒、1分、2分、5分、10分後の遊離塩素濃度及び残留塩素濃度を測定した。

#### ii 実際のおう吐物の塩素消費量

実際のおう吐物(pH 3.5)を用い、おう吐物2mLを時計皿にとって1000 mg/L の次亜塩素酸ナトリウム1mLを加え、30秒、1分、2分、5分、10分後の遊離塩素濃度及び残留塩素濃度を測定した。

### (2) 結果

#### i 模擬おう吐物の塩素消費量

測定結果を図1に示した。なお、経過時間0分の値は試料で希釈された次亜塩素酸ナトリウムの計算上の初期濃度 (添加濃度の1/3である333 mg/L) である。また、残留塩素濃度は遊離塩素濃度と結合塩素濃度の合計値である。

模擬おう吐物に次亜塩素酸ナトリウムを添加したときのpHはフタル酸緩衝液の緩衝作用によって中和されずpH4であった。次亜塩素酸ナトリウム添加後の残留塩素濃度は30秒後に216 mg/L (遊離塩素濃度は212 mg/L)、10分後は48 mg/L (遊離塩素濃度は32 mg/L)となった。

#### ii 実際のおう吐物の塩素消費量

測定結果を図2に示した。なお、経過時間0分の値は試料で希釈された次亜塩素酸ナトリウムの計算上の初期濃度 (添加濃度の1/3である333 mg/L) である。また、遊離塩素は次亜塩素酸ナトリウム添加後30秒で消失したので残留塩素濃度はすべて結合塩素の濃度である。

おう吐物のpHは次亜塩素酸ナトリウム添加後も変化はなくpH3.5のままであった。次亜塩素酸ナトリウム添加後の残留塩素濃度は30秒後に84 mg/L、10分後では20 mg/Lとなった。



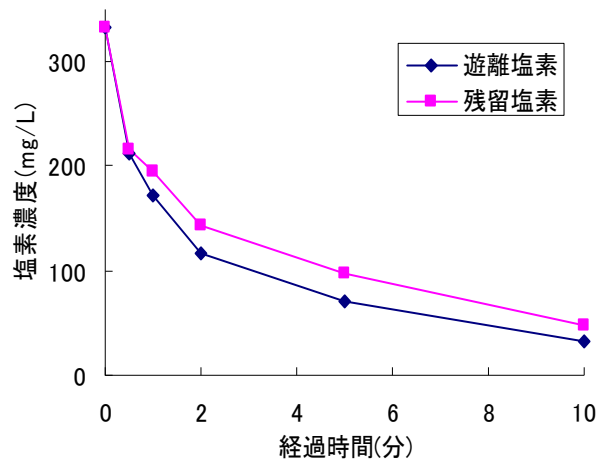


図1 模擬おう吐物に1000mg/L次亜塩素酸ナトリウムを添加時の塩素濃度の経時変化

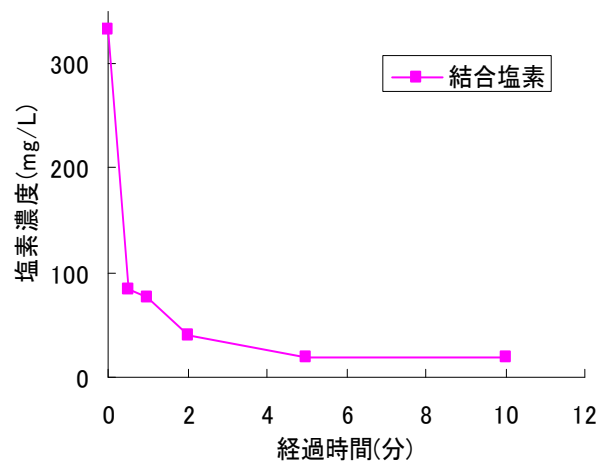


図2 実際のおう吐物に1000mg/L次亜塩素酸ナトリウムを添加時の塩素濃度の経時変化

### 3) カーペットによる塩素消費に関する検討

#### (1) 方法

裏ゴム張り、長毛、ループ状の三種類のカーペットに200mg/Lの次亜塩素酸ナトリウム溶液100mLをかけ、1分、2分、3分、5分、10分後のカーペット上の次亜塩素酸ナトリウム溶液の残留塩素濃度を測定した。

#### (2) 結果

測定結果を図3に示した。裏面ゴム張りのカーペットでは測定開始から10分後の遊離塩素濃度は190 mg/L で塩素消費量は5%であった。長毛のカーペットでは3分後で182 mg/L に減少、10分後の遊離塩素濃度は162 mg/L で塩素消費量は約20%であった。なおループ状のカーペットは1分後では塩素濃度の減少はみられなかったが、2分後以降はカーペット上の次亜塩素酸ナトリウム溶液はカーペット内に浸み込んでしまったため、測定はできなかった。



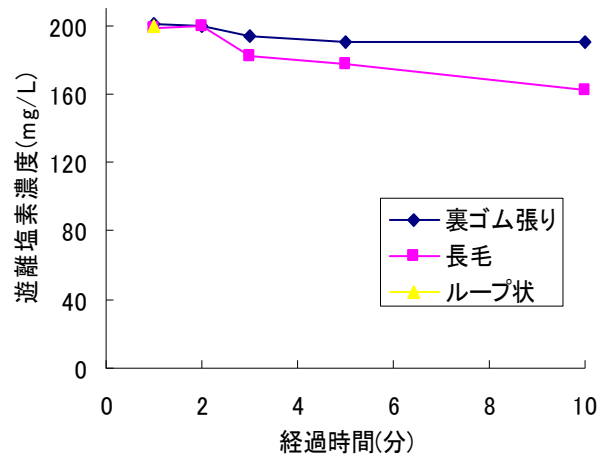


図3 カーペットに撒いた200mg/L次亜塩素酸ナトリウムの遊離塩素濃度の経時変化

#### 4) 「社会福祉施設等におけるノロウイルス対応標準マニュアル(第3版)」(東京都福祉保健局)に従ってカーペットなどにおう吐した場所を消毒処理した場合の塩素濃度の保持に関する検討

##### (1) 方法

##### i 模擬おう吐物の調製

市販のパック入り白飯を電子レンジで加熱解凍し、その25gに等量のフタル酸緩衝液(pH4)を加えてストマックカーを用いて1分間粉碎し、更に50mLのフタル酸緩衝液を加えて模擬おう吐物とした。

##### ii 模擬おう吐物の回収率及び残留塩素濃度の測定

裏ゴム張り、長毛、ループ状の3種類のカーペットに模擬おう吐物の全量を散布し、1分後にペーパータオルを用いて散布した模擬おう吐物をふき取り回収して、散布前の模擬吐物重量とその回収重量から回収率を求めた。回収後、カーペット上のふき取り面を中心にペーパータオルを置き、その上から200mLの1000mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液をペーパータオル全面が浸るようにつけ、5分後及び10分後にカーペット上の次亜塩素酸ナトリウム溶液の一部を採取し、塩素濃度をDPD法で測定した。10分経過後カーペット上のペーパータオルを除去し、カーペットの状況を観察した。(写真1~7参照。)

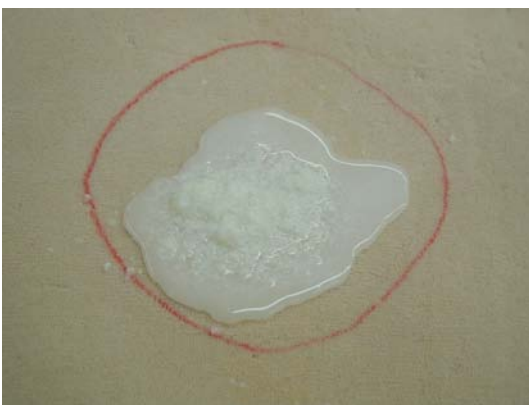


写真1 カーペット上に撒いた模擬おう吐物



写真2 ペーパータオルによるふき取り



写真3 ふき取り後のカーペット

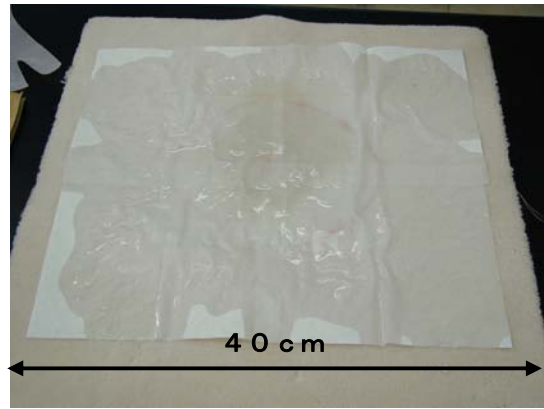


写真4 次亜塩素酸ナトリウム溶液による消毒



写真5 実験後のカーペット（長毛）



写真6 実験後のカーペット（ゴム裏張り）



写真7 実験後のカーペット（ループ状）

## (2) 結果

実験結果を表1に示した。カーペット上に散布した模擬おう吐物の回収率はいずれのカーペットも約80%であった。カーペット上にまいた次亜塩素酸ナトリウム溶液の残留塩素濃度は5分後で初期濃度（1000ppm）の約70～80%、10分後でも55～75%が残っていた。ループ状のものは次亜塩素酸ナトリウム溶液がカーペット内に浸み込んだため塩素濃度の測定はできなかった。本実験から、カーペット上のおう吐物を十分拭き取り、その後1000ppmの次亜塩素酸ナトリウムを用いた場合には、10分後においても半分以上の遊離塩素が残留し、ウイルスの不活化は可能と考えられた。なお、塩素消毒終了後のゴム裏張り、長毛のカーペットでは変色がみられ流水で洗浄しても変色を洗い落とすことはできなかった。次亜塩素酸ナトリウム溶液がカーペット内に浸み込んでしまったループ状のカーペットでは変色は見られなかった。

表1 カーペット上の模擬おう吐物回収率、残留塩素濃度およびカーペット変色の有無

	吐物回収率(%)	塩素濃度(mg/L)	5分後	10分後	カーペットの変色
ゴム裏張り	87.2	残留塩素	692	548	有 (茶色)
		(遊離塩素)	674	534	
長毛	81.3	残留塩素	832	768	有 (茶色)
		(遊離塩素)	830	744	
ループ状	78.6	残留塩素	-	-	無
		(遊離塩素)	-	-	

## 5) あらかじめ作成した次亜塩素酸ナトリウム溶液の保存条件の検討

### (1) 方法

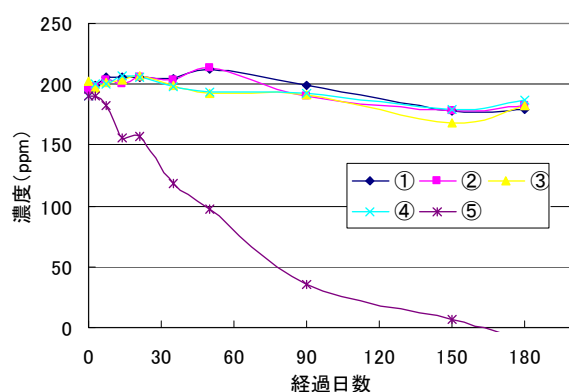
市販の塩素系漂白剤（界面活性剤を含まないもの）の塩素濃度をヨウ素滴定法で求め、水道水で希釈して塩素濃度200mg/L(0.02%)及び1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液を調製した。調製した各溶液をそれぞれ500mLのペットボトルに分注し、試験溶液とした。これを以下の条件で長期間保存し、残留塩素濃度を定期的に測定した。

①4℃遮光 ②20℃遮光 ③25℃遮光 ④30℃遮光 ⑤室温（約26℃の室内、遮光なし）

同様の実験を、ペットボトルに半分量の液量についてと、界面活性剤の製品についても行った。

### (2) 結果

塩素系漂白剤（界面活性剤を含まないもの）の塩素濃度200mg/Lに調整した場合の結果を図4示した。室温保存（約26℃、遮光なし）のもので7日目に約10%、14日目には約20%の減少が見られ、45日で50%以下となり180日目では検出されなかった。一方、遮光した他の保存条件では180日においてもわずかに減少した程度であった。



①4℃遮光 ②20℃遮光 ③25℃遮光  
④30℃遮光 ⑤室温（約26℃の室内、遮光なし）

図4 塩素200ppmの次亜塩素酸ナトリウム溶液の経日変化

塩素濃度1%に調整した場合の結果を図5示した。室温保存（約26℃、遮光なし）のもので14日目以降に減少し、保存90日後には当初濃度の50%以下となり180日で約20%にまで減少したが、遮光した他の保存条件では180日においてもわずかに減少した程度であった。

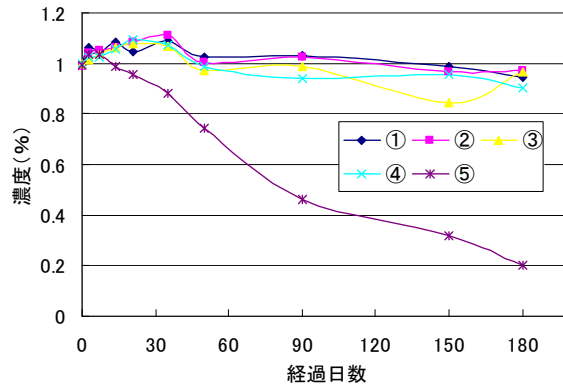
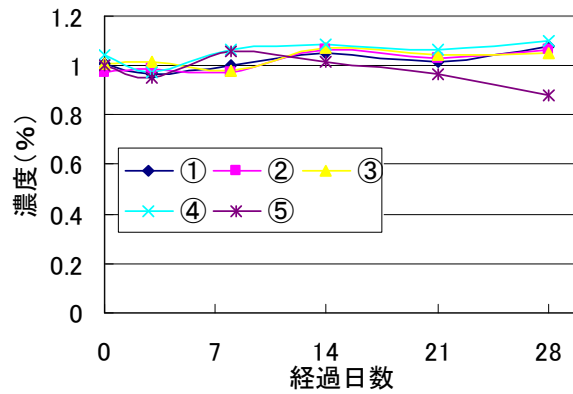


図5 塩素濃度1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液の経日変化

試験溶液をボトルに半分入れて保存した場合の塩素濃度の変化は試験溶液を容器いっぱいに入れて保存したものについて実施した昨年の結果と同様であった。図6に塩素濃度1%の溶液での結果を示す。

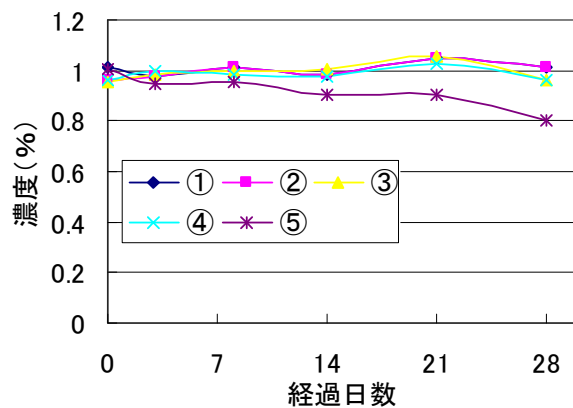


①4°C遮光 ②20°C遮光 ③25°C遮光  
④30°C遮光 ⑤室温 (約26°Cの室内、遮光なし)

図6 塩素濃度1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液の経日変化 (ボトルに半分)

測定結果を図5～6に示した。

界面活性剤入りのものでも結果は同様であり、界面活性剤の有無は塩素濃度の保存性に影響しないことがわかった。図7に塩素濃度1%の溶液での結果を示す。



①4°C遮光 ②20°C遮光 ③25°C遮光  
④30°C遮光 ⑤室温 (約26°Cの室内、遮光なし)

図7 塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液の経日変化 (界面活性剤入り)

## 6) まとめ

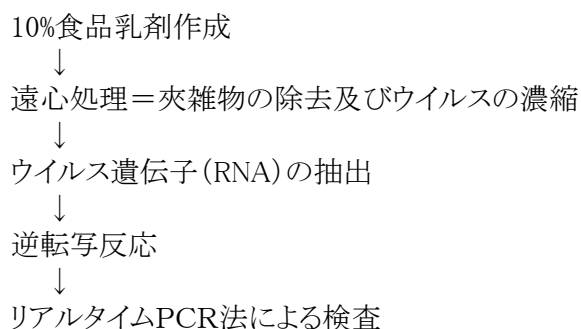
ウイルス自身は水道水程度の塩素濃度で速やかに消毒されることがわかった。しかし、消毒のための塩素はおう吐物と反応して急速に消失することが確認された。したがって、カーペットなどにおう吐した場合、おう吐物を十分除去して二次感染を起こさないように適切に処理したうえで、おう吐物を拭き取った場所を次亜塩素酸ナトリウム溶液でひたすことで、消毒に必要な塩素濃度が維持され、消毒の効果が発揮されるものと考えられた。また、消毒処理に用いる次亜塩素酸ナトリウム溶液は、使用の都度作製することが原則であるが、あらかじめ作り置く場合、室内温度で暗所に保存すれば、約半年間は塩素濃度を保つことが可能であることがわかった。

## 食品からのノロウイルス検出法

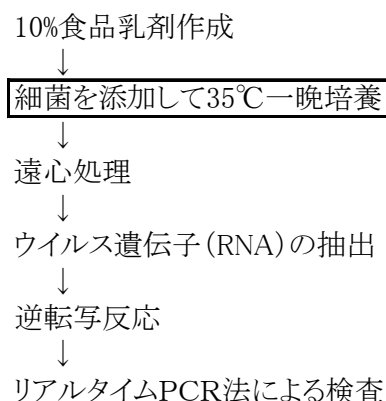
食品におけるノロウイルス(NV)検査は、平成15年11月5日付けの厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知、食安監発第1105001号による検査法(通知法)により実施されているが、食品からNVが検出される事例は非常に少ない。食品からのNV検出を困難にしている原因には、食品成分由来の夾雑物が検査に影響することや、食品中に含まれる微量なNVを効率よく回収することが難しいこと等が考えられる。19年度は、ウイルス遺伝子の抽出時に二段階の精製処理を行うことで検査妨害物質の除去効率を高める方法について検討した。今年度は、より効果的な検査妨害物質の除去方法として、細菌の生物活性を利用した前処理法を考案し検討を行った。

実験1では、腸内細菌科の一種である *Klebsiella oxytoca* を前処理用細菌として用い、カキ等の食品乳剤に添加したNVの回収実験を行い、通知法による回収率との比較を行った。実験2では、*K. oxytoca* を含めた10種の標準菌株を用いてカキ乳剤に添加したNV回収実験を行い、より効果的な細菌を検索した。

### ◇厚生労働省通知による検査法(通知法)



### ◇今回検討した検査法



### <実験1: *Klebsiella oxytoca* を前処理用細菌として用いたNV添加回収実験>

#### 1. 供試用食品乳剤

東京都内で市販または調理されたまぐろの刺身や蒸し鶏などの食品15検体、生食用マガキ18検体を用いた。カキは2~4個体より取り出した中腸腺を1検体とし、PBS(-)を加えて10%乳剤を作成した。他の食品は4~5gを秤量後10倍量のPBS(-)を加え、フィルター付き細菌検査用ポリ袋中で1分間ストマッカー処理を行った。

#### 2. 添加用ウイルス液の作成

過去の食中毒事例において、NV遺伝子型GI/8(以下、GI/8)、NV遺伝子型GII/13(以下、GII/13)が検出され、凍結保存してあった患者糞便2検体を用いた。糞便由来の夾雑物が実験に及ぼす影響を排除するため、これら2検体の10%乳剤を10,000rpm、20分間遠心した後、上清を27,000rpm、3時間超遠心した。得られた沈渣を1mLのPBS(-)で再浮遊し、PBS(-)を用いて更に1,000倍に希釈した。希釈液20mLを直径33mm、孔径0.22μmのフィルターでろ過し、希釈液中に

残存する細菌等を取り除いて添加用ウイルス液とした。この添加用ウイルス液それぞれ70 $\mu$ Lを各食品乳剤8mLに添加したものを供試材料、PBS(-)8mLに添加したものを対照材料とした。

### 3. 通知法による前処理

供試材料及び対照材料を4 $^{\circ}$ C、10,000rpm、20分間遠心後、上清を30%しょ糖溶液1mLに重層し、40,000rpm、2時間超遠心した。

### 4. 今回検討した方法による前処理

過去に食品から分離同定された *K. oxytoca* を35 $^{\circ}$ C、20時間培養した普通斜面培地から、PBS(-)を用いて10<sup>9</sup>/mLの菌液を作成した。この菌液10 $\mu$ Lを供試材料及び対照材料に添加後35 $^{\circ}$ Cで一晩(16時間)培養し、以降は通知法と同様に処理した(以下、開発法)。

### 5. NVの検出及び定量

前処理後に得られた沈渣を滅菌蒸留水140 $\mu$ Lで再浮遊し、全量をRNA抽出に用いた。RNA抽出以後の操作及びリアルタイムPCR法によるNVの検出、定量は、通知法に準拠して行った。

### 6. 実験結果及び考察

通知法を用いて処理した場合と開発法を用いて処理した場合の増幅曲線例を図1に示した。通知法ではカキ18検体中GI/8で4検体、GII/13で1検体がNV不検出となった。NV不検出の検体を除いてリアルタイムPCR法のthreshold cycle(Ct値)を比較したところ、開発法は通知法に比べ、カキではGI/8で2.9~10.5(平均6.8)サイクル、GII/13で2.6~8.8(平均6.4)サイクル短縮した。t検定を行った結果、両法には $p < 0.001$ (両側)で有意差が認められた。他の食品においてもGI/8で0.5~6.7(平均3.4)サイクル、GII/13で0~4.4(平均1.9)サイクルCt値は短縮( $p = 0.002$ )したが、対照材料では有意差は見られなかった( $p = 0.796$ )。また、GI/8及びGII/13ウイルス液それぞれ70 $\mu$ Lを用いて核酸抽出を行い同液中に含まれるNVの定量値を求めたところ、供試材料中に添加したNV量は、GI/8は201,071 copies/test, GII/13は504,045 copies/testとなった。このNV量を100%としてそれぞれの検体及び手法ごとにNVの回収率(x)を $x = (\text{供試材料中のNV定量値} / \text{ウイルス液中のNV定量値}) \times 100$ により求めた。通知法の回収率の平均は、カキではGI/8で0.3%、GII/13で0.5%、他の食品ではGI/8で1.9%、GII/13で7.9%であった。これに対し開発法の回収率の平均は、カキではGI/8で8.6%、GII/13で11.6%、他の食品ではGI/8で13.9%、GII/13で19.6%であった(図2)。なお、添加した*K. oxytoca*菌液から核酸抽出しリアルタイムPCR法で検査した結果、*K. oxytoca*のDNA等によると思われる偽陽性反応は見られなかった。

(食品衛生学雑誌、第49巻第6号:2008年12月に掲載予定)



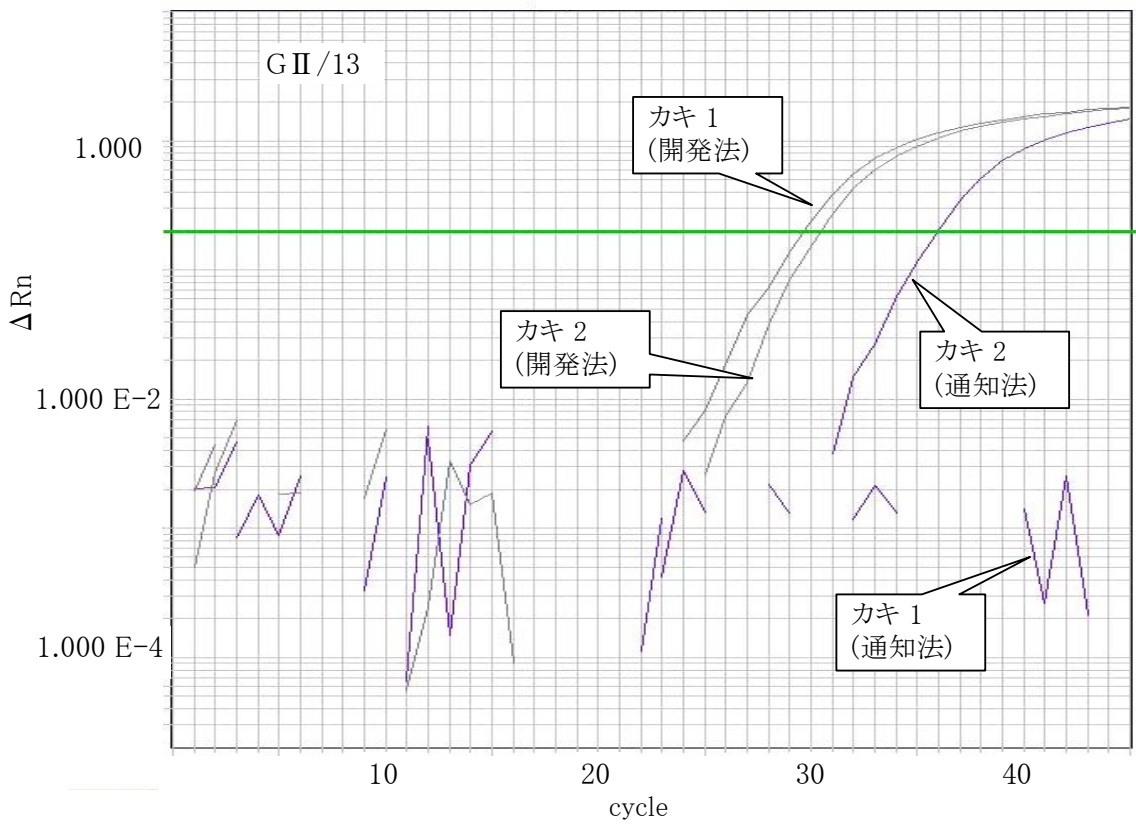


図 1. 通知法または開発法を用いて処理したカキ検体のリアルタイム PCR 法による増幅曲線例

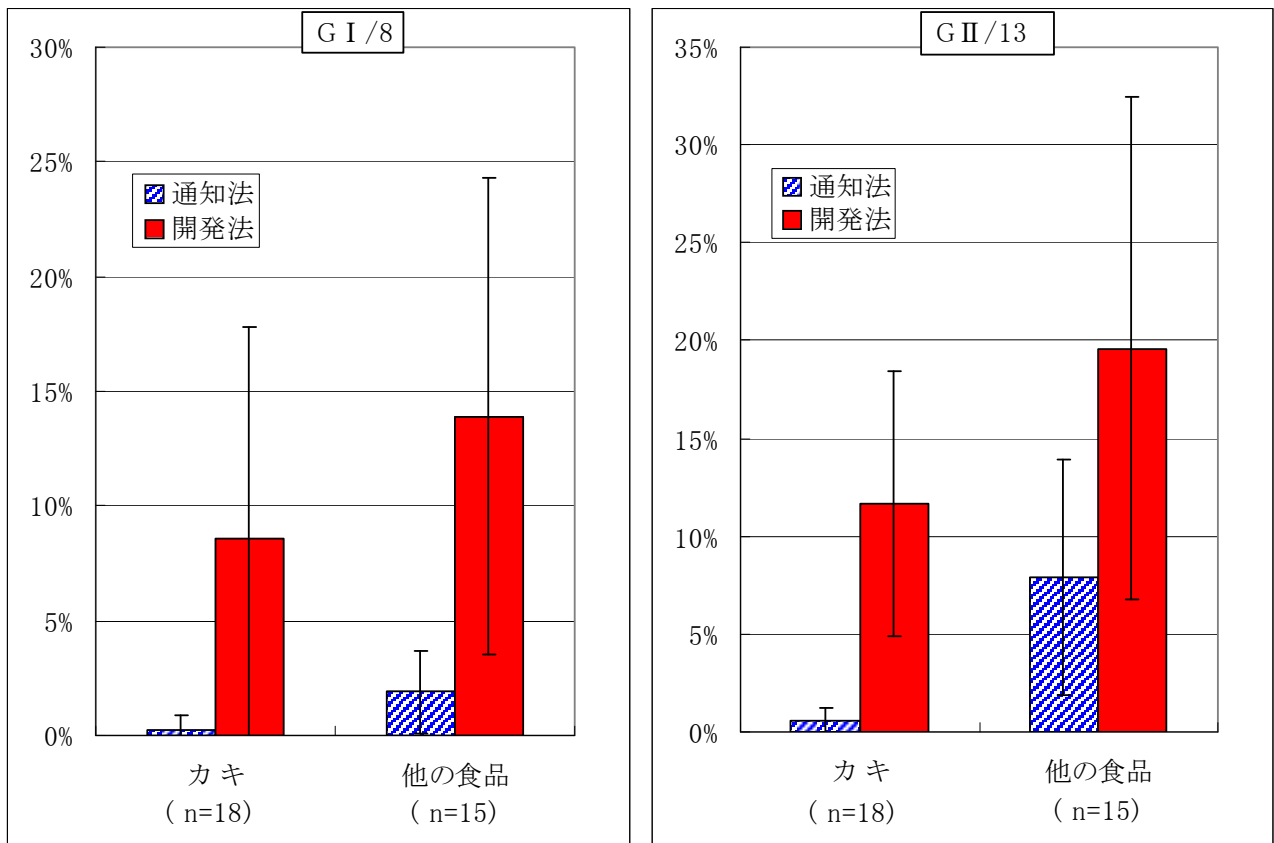


図 2. 通知法と開発法によるノロウイルス回収率の比較

## <実験 2: 10 種の標準菌株を用いた前処理による NV 添加回収実験>

### 1. 供試用食品乳剤

市販の冷凍ガキ 1 検体、産地の異なる殻付き生ガキ 2 検体の合計 3 検体を供試した。1 検体につき 8~10 個体より取り出した中腸腺を、PBS(-)を用いて 10%乳剤にした。各乳剤をそれぞれ 11 本の遠心管に 8mL ずつ分注し供試用カキ乳剤とした。

### 2. 添加用ウイルス液の作成

実験 2 では NV 遺伝子型 G I /8(以下、G I /8)、NV 遺伝子型 G II /4 (以下、G II /4) が検出された患者糞便 2 検体を用いた。実験 1 と同様に遠心後、PBS(-)を用いて 1,000 倍に希釈し、直径 33mm、孔径 0.22  $\mu$  m のフィルターでろ過して添加用ウイルス液を作成した。

### 3. 供試菌株及び供試菌液の作成

再現性、普遍性を確認するために標準菌株を準備して菌液を調製した。菌株は *Bacillus pumilus* NBRC 12092、*Enterobacter aerogenes* NBRC 13534、*Sphingomonas macrogoltabidus* NBRC 15033、*Klebsiella oxytoca* NBRC 102593、*Proteus vulgaris* NBRC 3045、*Micrococcus luteus* NBRC 3333、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 12689、*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NBRC 13719、*Escherichia coli* NBRC 102203、*Serratia marcescens* NBRC 102204 の 10 株を用いた。菌株の選出にあたり食品腐敗能を有すること、ヒトに対する病原性が無いか低いこと、好気性または通性嫌気性であり比較的培養が容易であること等を考慮した。各菌株を 35°C、20 時間トリプチケースソイブイヨンを用いて 2 代継代培養後、菌数が  $10^5$ /mL となるよう PBS(-)を用いて 10,000 倍に希釈し、それぞれ 10mL の供試菌液を作成した。

### 4. 開発法による前処理

10 種の供試菌液 100  $\mu$  L を、あらかじめ調製しておいた供試用カキ乳剤 10 本に添加し 35°C で 16 時間培養した。培養後の供試材料は 4°C、10,000rpm、20 分間遠心後、上清を 30%しょ糖溶液 1 mL に重層して 4°C、40,000rpm、2 時間超遠心した。また、菌液を添加せずに通知法に従って前処理を行った試料を対照とした。

### 5. NV の検出及び定量

前処理後に得られた沈渣を滅菌蒸留水 140  $\mu$  L で再浮遊し、全量を RNA 抽出に用いた。RNA 抽出以後の操作及びリアルタイム PCR 法による NV の検出及び定量は、通知法に準拠した。

### 6. 実験結果及び考察

数種の細菌を用いた予備実験において、腐敗食品から分離した *K. oxytoca* が最も高い NV 回収率を示したことから、本実験では主に食品腐敗細菌を供試した。いずれの菌株を用いた場合も通知法による NV 回収率を G I /8、G II /4 とも上回った。また、開発法に用いた菌株のうち *K. oxytoca* よりも高い NV 回収率を示した株は、G I /8 では *E. aerogenes*、*P. vulgaris*、*E. coli*、*S. marcescens* の 4 株であり、G II /4 では *E. aerogenes*、*P. vulgaris*、*E. coli* の 3 株であったが、Ct 値で比較すると *K.*

*oxytoca*との差はいずれも1サイクル以内であった(表1)。G I /8、G II /4ともに最も高い回収率を示したのは *P. vulgaris* であり、カキの成分であるグリコーゲンや蛋白質、アミノ酸等の分解、消化には、*P. vulgaris* の生物活性が最も適していたと推察された。なお、それぞれの菌液から核酸抽出して検査を行った結果、添加した細菌の核酸等による偽陽性反応は見られなかった。

(東京都健康安全研究センター研究年報、第59号:2009年2月に掲載予定)

表1. 10種の菌株を用いた開発法によるノロウイルス添加回収実験結果

G I / 8

菌株	Ct値		Ct値(平均)	コピー数	回収率(%)	
<i>Bacillus pumilus</i> NBRC 12092	36.9	33.9	34.4	35.1	526	2.5
<i>Enterobacter aerogenes</i> NBRC 13534	30.0	29.4	28.9	29.4	13,333	63.5
<i>Sphingomonas macrogoltabidus</i> NBRC 15033	30.1	34.6	32.0	32.2	2,723	13.0
<i>Klebsiella oxytoca</i> NBRC 102593	30.0	31.7	29.0	30.2	8,469	40.3
<i>Proteus vulgaris</i> NBRC 3045	29.8	29.2	29.2	29.4	13,333	63.5
<i>Micrococcus luteus</i> NBRC 3333	29.4	35.3	30.5	31.7	3,616	17.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC 12689	29.7	32.4	30.0	30.7	6,378	30.4
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NBRC 13719	30.9	31.2	30.8	31.0	5,379	25.6
<i>Escherichia coli</i> NBRC 102203	30.0	29.4	29.6	29.6	11,903	56.7
<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204	29.5	29.6	30.3	29.8	10,626	50.6
通知法	37.9	45.0	40.3	41.1	45	0.2
PBS	30.2	29.6	29.1	29.6	11,903	56.7
ウイルス液				28.6	20,990	100.0

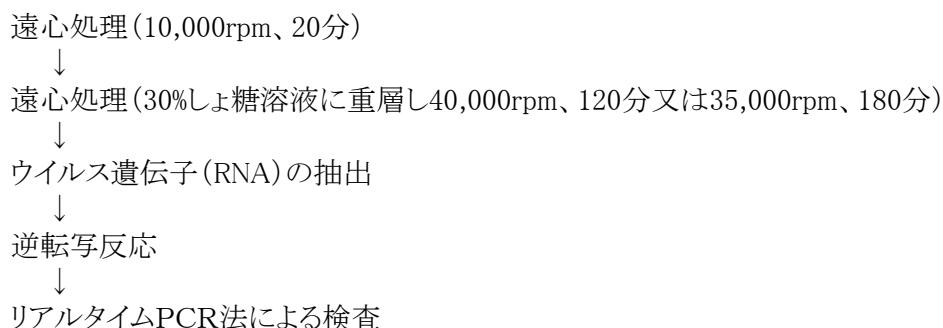
G II / 4

菌株	Ct値		Ct値(平均)	コピー数	回収率(%)	
<i>Bacillus pumilus</i> NBRC 12092	37.6	34.8	38.4	36.9	438	1.4
<i>Enterobacter aerogenes</i> NBRC 13534	31.3	31.4	32.3	31.7	7,520	24.1
<i>Sphingomonas macrogoltabidus</i> NBRC 15033	31.0	36.1	34.6	33.9	2,259	7.3
<i>Klebsiella oxytoca</i> NBRC 102593	31.8	32.8	32.2	32.3	5,418	17.4
<i>Proteus vulgaris</i> NBRC 3045	31.6	31.1	32.1	31.6	7,943	25.5
<i>Micrococcus luteus</i> NBRC 3333	30.9	36.0	32.8	33.2	3,313	10.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC 12689	31.0	33.9	32.3	32.4	5,129	16.5
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NBRC 13719	32.5	32.6	32.9	32.7	4,354	14.0
<i>Escherichia coli</i> NBRC 102203	31.6	31.8	32.7	32.0	6,383	20.5
<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204	31.9	32.0	33.2	32.4	5,129	16.5
通知法	39.2	45.0	41.6	41.9	53	0.2
PBS	30.1	30.1	30.2	30.1	18,032	57.9
ウイルス液				29.1	31,148	100.0

## 拭き取り検体からのノロウイルス検出法

19年度に予備的に行ったノロウイルス(NV)添加回収実験の結果、調理施設等を対象としたNV拭き取り検査には、平成15年11月5日付けの厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知、食安監発第1105001号による検査法(通知法)による食品からのNV検出法を用いることで対応可能と考えられた。拭き取り検体では、食品からのNV検出で問題となる食品成分由来の検査阻害物質による影響は比較的少ないものと推測されたため、今年度は拭き取り検体の濃縮方法(超遠心処理)について条件を変えて実験を行い、最も高いNV回収率が得られる遠心条件について検討した。また、細菌検査用とは別にウイルス検査用検体を採取するのは現実的でないことから、細菌検査用拭き取り検体の残り液を使用してNV検査を行うものとして検討を進めた。

### ◇厚生労働省通知による検査法



## 1. 実験方法

### 1) 供試用拭き取り検体

細菌検査を目的に当センターに搬入された後、冷蔵保存してあった細菌検査終了後の拭き取り検体残り液 5~8本を混合して均一の試料を作成し、4本の遠心管に8mLずつ分注したものを供試用拭き取り検体とした。

### 2) 添加用ウイルス液の作成

NV 遺伝子型 G I /8(以下、G I /8)、G II /4(以下、G II /4) が検出された糞便乳剤を、10,000rpm、20分間遠心した後、上清を27,000rpm、3時間超遠心した。得られた沈渣を1mLのPBS(-)で再浮遊した後、更にPBS(-)を用いて1,000倍に希釈したものを添加用ウイルス液とした。この添加用ウイルス液それぞれ70 $\mu$ Lを供試用拭き取り検体に添加した。

### 3) 濃縮方法

ウイルス液添加後の供試用拭き取り検体を、通知法に従って10,000rpm、20分間遠心し、得られた上清を1mLの30%しょ糖溶液に重層した。その後の超遠心処理は、27,000rpm、240分、32,000rpm、240分、40,000rpm、120分及び50,000rpm、120分の4とおりの条件で行った。

#### 4) NV の検出及び定量

超遠心処理後の沈渣を滅菌蒸留水 140  $\mu$ L で再浮遊し全量を RNA 抽出に用いた。RNA 抽出からリアルタイム PCR 法による NV の検出及び定量までの操作は、通知法に準拠して行った。

#### 2. 実験結果及び考察

今回検討した4とおりの条件では、NV回収率に顕著な差が見られた(表1)。50,000rpm、120分の超遠心処理によるNV回収率はG I /8で58.7%、G II /4では85.7%であり最も高い回収率を示した。通知法に記載された40,000rpm、120分の超遠心処理でもG I /8で30.6%、G II /4で53.9%のNV回収率であり、NVの濃縮を目的とした超遠心処理では、遠心時間を長くするよりも、回転数を上げることの方が効果的であると考えられた。その後の実験において50,000rpm、180分の超遠心処理を行ったところ、一部の遠心管に変形が見られたため50,000rpm、120分以上の回転数や、遠心時間についての検討は行わなかった。また、超遠心前の10,000rpm、20分間の遠心処理を行わない方法や、30%しょ糖溶液を用いずに超遠心を行う方法についても検討したが、いずれも大きな回収率の変化は見られなかった。

以上の結果を基に、5種類の拭き取り検体26件及び、生理食塩水について50,000rpm、120分の遠心処理法を用いたNV添加回収実験を行い、拭き取り対象物ごとにNV回収率を検討した。実際の拭き取り検体に含まれるNVは少量であることが予測されたため、添加用ウイルス液をPBS(-)で更に40倍に希釈してから添加した。その結果、生理食塩水に添加したNVの回収率がG I /8で49.1%、G II /4で77.3%であったのに対し、シンクを拭き取った検体の回収率はG I /8で11.2%、G II /4で13.4%と低い値であったが、その他の拭き取り対象物では27.2%~62.9%の回収率が得られた(表2)。シンクを拭き取った検体中には多くの浮遊物等が見られたことから、それらがNV回収率の低下に関与しているものと考えられたが、詳細については今後検討する必要がある。

表 1. 各遠心条件による拭き取り検体からのノロウイルス回収率

##### G I / 8

	Ct値(検体 1)	Ct値(検体 2)	Ct値(平均)	コピー数	回収率(%)*
27,000回転、240分	32.3	30.8	31.6	34,052	3.9
32,000回転、240分	30.2	28.6	29.4	125,226	14.2
40,000回転、120分	28.2	28.0	28.1	270,324	30.6
50,000回転、120分	26.9	27.1	27.0	518,396	58.7
ウイルス液			26.1	883,130	100.0

##### G II / 4

	Ct値(検体 1)	Ct値(検体 2)	Ct値(平均)	コピー数	回収率(%)*
27,000回転、240分	28.0	28.2	28.1	107,480	10.9
32,000回転、240分	27.2	26.2	26.7	221,069	22.5
40,000回転、120分	24.8	25.1	25.0	530,689	53.9
50,000回転、120分	24.1	24.2	24.1	843,688	85.7
ウイルス液			23.8	984,682	100.0

\*回収率(%) = (供試材料中の NV 定量値 / 添加用ウイルス液中の NV 定量値)  $\times$  100

表 2.対象物別の拭き取り検体からのノロウイルス回収率

拭き取り対象物	G I / 8			G II / 4			
	Ct値	コピー数	回収率(%)	Ct値	コピー数	回収率(%)	
まな板	1	35.3	3,811	19.1	32.8	9,547	33.9
	2	32.9	15,774	78.9	31.5	18,651	66.2
	3	33.7	9,824	49.1	31.6	17,715	62.9
	4	35.4	3,592	18.0	33.8	5,704	20.3
	5	34.7	5,435	27.2	32.8	9,547	33.9
	平均	34.4	6,492	32.5	32.5	11,143	39.6
包丁	1	34.6	5,767	28.9	32.9	9,068	32.2
	2	34.2	7,307	36.6	31.8	15,981	56.7
	3	33.0	14,868	74.4	31.6	17,715	62.9
	4	34.7	5,435	27.2	32.9	9,068	32.2
	平均	34.1	7,753	38.8	32.3	12,352	43.9
手指	1	34.0	8,226	41.2	31.7	16,825	59.7
	2	33.6	10,423	52.1	31.1	22,919	81.4
	3	33.6	10,423	52.1	31.2	21,768	77.3
	4	34.3	6,887	34.5	31.1	22,919	81.4
	5	34.6	5,767	28.9	32.9	9,068	32.2
	平均	34.0	8,226	41.2	31.6	17,715	62.9
取っ手	1	34.2	7,307	36.6	33.7	6,005	21.3
	2	34.4	6,492	32.5	31.2	21,768	77.3
	3	33.8	9,259	46.3	31.7	16,825	59.7
	4	35.1	4,289	21.5	32.1	13,692	48.6
	5	34.8	5,123	25.6	33.3	7,379	26.2
	6	35.8	2,834	14.2	33.6	6,323	22.5
	平均	34.7	5,435	27.2	32.6	10,583	37.6
シンク	1	34.4	6,492	32.5	32.6	10,583	37.6
	2	36.0	2,518	12.6	34.7	3,588	12.7
	3	37.0	1,393	7.0	36.9	1,155	4.1
	4	36.5	1,873	9.4	34.5	3,977	14.1
	5	36.0	2,518	12.6	33.8	5,704	20.3
	6	37.3	1,166	5.8	35.1	2,920	10.4
	平均	36.2	2,237	11.2	34.6	3,777	13.4
生理食塩水	1	33.5	11,059	55.3	31.1	22,919	81.4
	2	33.8	9,259	46.3	31.2	21,768	77.3
	平均	33.7	9,824	49.1	31.2	21,768	77.3
ウイルス液	1	32.8			30.8		
	2	32.2			30.6		
	平均	32.5	19,988	100.0	30.7	28,163	100.0

## ノロウイルス検査用キットの検討

ノロウイルス(NV)感染症に対する予防や、感染の拡大防止対策を迅速に行うことを目的に、NV検査用キットについて検討した。リアルタイムPCR法を基準とし、国内で市販されているNV検査用キット7種類について、NV検出率や検査に要する時間等の比較を行った。NV検査用キット7種類の内訳は、核酸増幅法を利用したキット4種(A～D法)と抗原検出法によるキット3種(E～G法)である。また、国内では平成20年6月18日付けの厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、食安発第0618005号により「大量調理施設衛生管理マニュアル」が改正され、調理施設における衛生管理の徹底が図られている。改正されたマニュアルには、調理従事者等の10月から3月の検便にはNV検査も加えることや、NVを原因とする感染性疾患と診断された場合には高感度な検査法によりNVを保有していないことが確認されるまで、食品に直接触れる調理作業を控えることが望ましいことなどが記載されており、NV検査に対する需要はこれまで以上に高まっていると考えられる。今年度の中間報告では、このマニュアルに記載された点も考慮し、状況や目的に応じたNV検査法について提案を行った。

◇ 核酸増幅法:NV遺伝子(核酸)の一部を人為的に増幅し、大量に増えた核酸を発光や濁度の変化等により検出する方法。

◇ 抗原検出法:NV(抗原)とその抗原に対する抗体が結合する原理(抗原抗体反応)を利用した検査法。

### 1. 検討方法

東京都健康安全研究センターに搬入された食中毒患者、非発症者及び調理従事者の糞便を用いて、リアルタイムPCR法と7種類のNV検査用キットで検査を行い、得られた検査結果等について比較した。リアルタイムPCR法によるNVの検出及び定量は、平成15年11月5日付けの厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知、食安監発第1105001号に準拠して行い、各NV検査用キットによる検査は添付の取り扱い説明書に従った。

### 2. 核酸増幅法を利用したNV検査用キットの検討

#### 1) 供試材料

核酸増幅法を利用したA～D法の検討には、平成18年4月から平成19年6月の間に発生した食中毒関連の検査において、NV陽性と判定された糞便の内、20事例より抽出した糞便検体84件とNV陰性となった検体22件の合計106件を検討用糞便として用いた。それぞれの検体は、採取する部位によって含まれるウイルス量等に差が生じることの無いよう、滅菌蒸留水を用いて20～50%濃度の乳剤を作成し供試材料とした。また、キット中に核酸抽出用試薬が含まれていないA、C、D法では、リアルタイムPCR検査用に核酸抽出したRNA抽出液を検査用試料として用いた。



## 2) 検査結果

核酸増幅法を利用した4種類のキット及びリアルタイムPCR法による検査結果を表1及び図1に示した。リアルタイムPCR法では、陽性検体84件すべてが(+)となり検出率は100%であったが、NV検査キットの検出率は72.6%~86.9%であった。検体中に含まれるNV量が少ない場合は検出され難い傾向が見られたが、一部のキットでは糞便1g中のNV量が $10^9$ 個(コピー)以上であっても検出されない検体が見られた。これは、NV量以外にNVの遺伝子型が、検査に影響しているものと考えられた。なお、陰性検体22件はいずれのキットでも(-)と判定された。

表1. 核酸増幅法を用いたキットのノロウイルス検出率及びリアルタイムPCR法との一致率

	A法		B法		C法		D法		リアルタイムPCR法	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
陽性検体	61	23	73	11	69	15	73	11	84	0
陰性検体	0	22	0	22	0	22	0	22	0	22
検出率*	72.6%		86.9%		82.1%		86.9%		100.0%	
一致率**	78.3%		89.6%		85.8%		89.6%		100.0%	

\* 検出率(%) = {陽性検体が(+)と判定された件数} / {陽性検体数} × 100

\*\* 一致率(%) = {陽性検体が(+)、陰性検体が(-)と判定された件数 / 検体数} × 100

注: 検査用の糞便材料は希釈して用いているため、検査キット本来の性能を示すものではない。

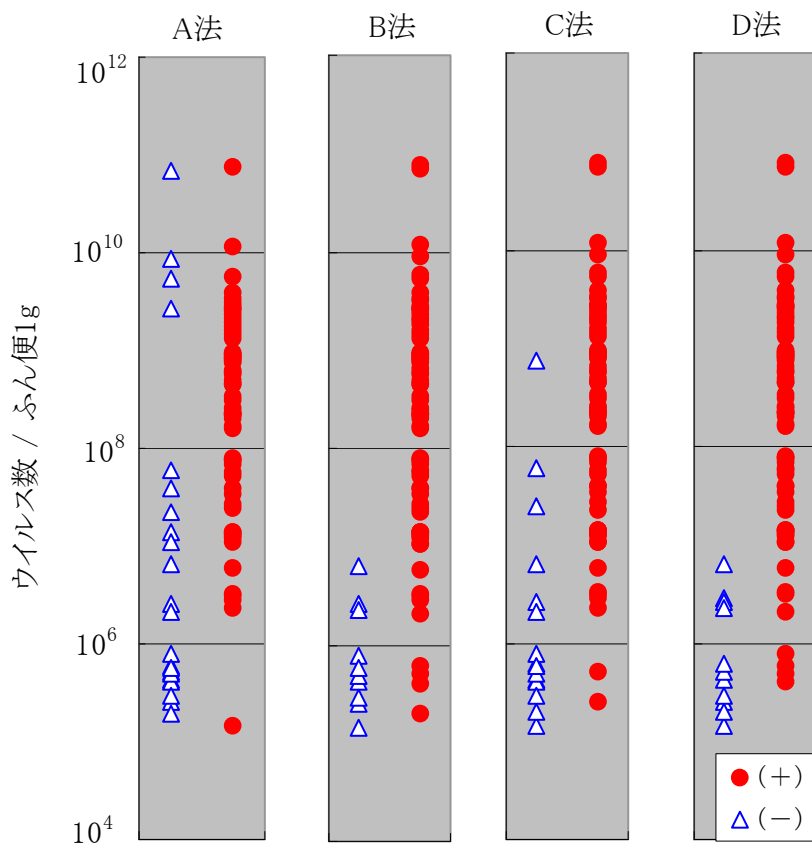


図1. 陽性検体84件のノロウイルス量と核酸増幅法を用いたキットの検査結果

### 3) 核酸増幅法を利用したキットで(+)となるために必要な NV 量の検討

核酸増幅法を利用した4種類のキットによる検査で、いずれのキットでも(+)となった検体の中から選出した10検体をそれぞれ2倍階段希釈し、A~Dの各キットで(+)となる検出限界を求めた。検出限界とされた検体中のNV量をリアルタイムPCR法によって定量後キットごとにその平均値を求め、得られた平均値をそれぞれのキットで(+)となるために必要なNV量とした。その結果、Aキットの必要NV量は、糞便1g当たり $2.2 \times 10^6$ 個であり、Bキットでは $3.4 \times 10^6$ 個、Cキットでは $7.4 \times 10^5$ 個、Dキットでは $6.8 \times 10^5$ 個であった。なお、今回の検討ではリアルタイムPCR法の必要NV量を糞便1g当たり $2 \times 10^5$ 個とし、それ以上の定量値を示した検体をリアルタイムPCR(+)とした。

### 3. 抗原検出法を利用した NV 検査用キットの検討

#### 1) 供試材料

19年度の検討で、抗原検出法を利用したキットは、核酸増幅法を用いた検査法に比べ検出限界値が高いことが判明していたため、抗原検出法を利用したE、F、G法の検討では核酸増幅法を利用したキットの検討で用いた陽性検体とは別に、事前の検査で糞便1g中に含まれるNV量が $10^6$ 個以上とされた陽性検体85件を用いた。また、陰性検体としてNV陰性となった検体100件を用いた。各検査法に用いる糞便材料を均一なものとするため、滅菌蒸留水を用いて50%濃度に希釈した糞便乳剤を作成して供試材料とした。

#### 2) 検査結果

抗原検出法を利用した3種類のキット及びリアルタイムPCR法による検査結果を表2及び図2に示した。陽性検体85件における検出率は30.6%~42.4%であり、糞便1g中に含まれるNV量が $10^8$ 個未満の検体では(+)となるものは無かった。また、3キットとも糞便1g中のNV量が $10^8$ 個以上であっても検出されない場合が多く見られた。陰性検体100件を用いた結果では2~4%が(+)と判定された。

表2. 抗原検出法を用いたキットのノロウイルス検出率、特異性及びリアルタイムPCR法との一致率

	E法		F法		G法		リアルタイムPCR法	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
陽性検体	26	59	31	54	36	49	85	0
陰性検体	3	97	4	96	2	98	0	100
検出率*	30.6%		36.5%		42.4%		100.0%	
特異性**	97.0%		96.0%		98.0%		100.0%	
一致率***	66.5%		68.6%		72.4%		100.0%	

\* 検出率(%) = {陽性検体が(+)と判定された件数} / {陽性検体数} × 100

\*\* 特異性(%) = {陰性検体が(-)と判定された件数} / {陰性検体数} × 100

\*\*\* 一致率(%) = {陽性検体が(+), 陰性検体が(-)と判定された件数 / 検体数} × 100

注: 検査用の糞便材料は希釈して用いているため、検査キット本来の性能を示すものではない。

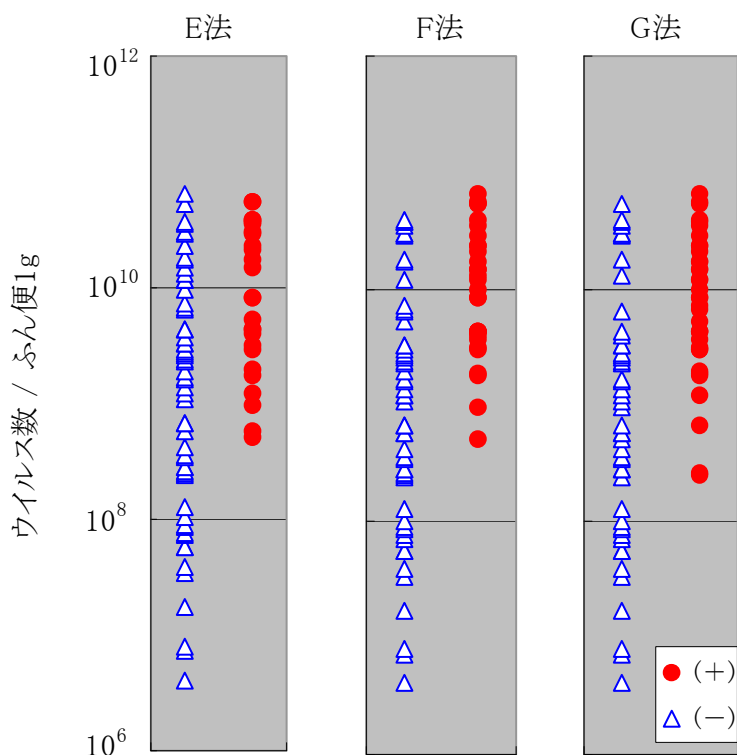


図 2. 陽性検体 85 件のノロウイルス量と抗原検出法を用いたキットの検査結果

#### 4. 検査所要時間の比較

各 NV 検査法において、供試材料 10 件の検査を一度に行った場合に要したおよその時間を表 3 に示した。キットによる NV 遺伝子の検出前に核酸抽出処理が必要な A、C、D 法では、リアルタイム PCR 法で用いた核酸抽出キットと同じ抽出キットを使用することとし、その抽出操作に要した時間も検査所要時間に加えた。

表 3. ノロウイルス検査用キットの検査所要時間

検査方法	原理	核酸抽出キット	所要時間*
リアルタイムPCR法	核酸増幅反応	要	6時間
A 法	核酸増幅反応	要	3.5時間
B 法	核酸増幅反応	不要	5.5時間
C 法	核酸増幅反応	要	4時間
D 法	核酸増幅反応	要	3時間
E 法	抗原抗体反応	不要	3時間
F 法	抗原抗体反応	不要	1時間
G 法	抗原抗体反応	不要	1時間

\* 糞便 10 件の検査を一時に行うと仮定した場合に要するおよその時間。但し核酸抽出が必要な検査法では、その時間も含む。

## 5. まとめ

核酸増幅法を利用したノロウイルス検査用キットは、リアルタイム PCR 法に比べ短時間で結果が得られるが、リアルタイムPCR法によるノロウイルス検出率を100%とした場合に72.6%～86.9%の検出率であった。抗原検出法を利用したノロウイルス検査用キットの検査所要時間は核酸増幅法より更に短縮するが、ノロウイルス検出率は低下した。また、C、F、Gの3種類のノロウイルス検査用キットは、専用機器やPCR反应用温度制御装置等を用いずに検査することが可能であった。以上のことを考慮し、状況や目的に応じたノロウイルスの検査方法として、以下の提案を行うこととした。

- ・ リアルタイム PCR 法
  - 感染源・感染経路の調査。
  - 調理従事者等がノロウイルスを保有していないことの確認。
  
- ・ 核酸増幅法を利用したノロウイルス検査用キット
  - 調理従事者等の日常健康管理。
  - 感染源の調査。
  
- ・ 抗原検出法を利用したノロウイルス検査用キット
  - 胃腸炎患者集団発生当初の迅速検査。