

感染性胃腸炎集団感染事例の疫学的解析及び感染拡大防止策

1. はじめに

2008-2009 シーズン¹⁾の東京都内における感染性胃腸炎患者報告数は、過去5年平均とほぼ同等のレベルで推移した(図1)。同シーズンに保健所より報告された感染性胃腸炎の集団事例²⁾は187件で、前シーズン(240件)の78%に減少している(図2)。施設別には、高齢者施設が半数以上を占めていた2006-2007年シーズンに比べ保育施設の割合が増加し、2008-2009年シーズンには、保育園・幼稚園が66事例(35%)、高齢者施設が62事例(33%)であった(図3)。シーズン前半は保育園・幼稚園が多く、2009年1月以降は高齢者施設の発生が多かった。(図4)。

2008-2009年シーズンの、ノロウイルスを原因とする感染性胃腸炎の集団感染事例の疫学的解析を行い、感染拡大防止策について検討したので報告する。

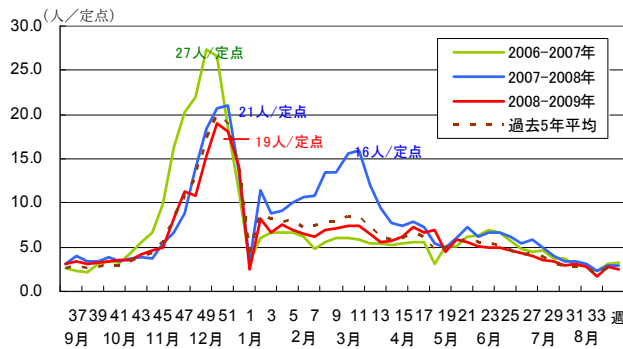


図1 感染性胃腸炎の定点あたり患者報告数の推移※
※感染症発生動向調査(都内150定点医療機関からの報告)

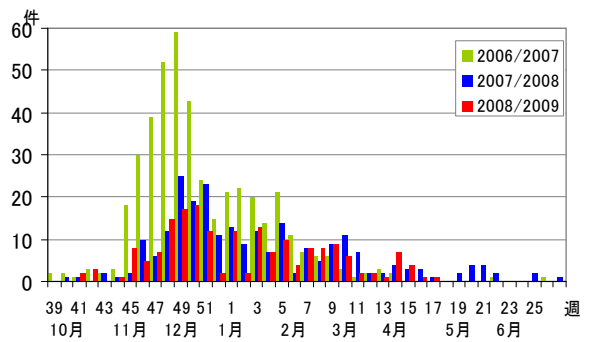


図2 感染性胃腸炎の集団事例報告数

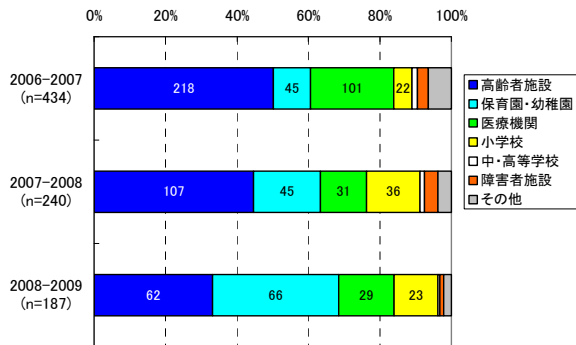


図3 3年間の施設別報告数の推移

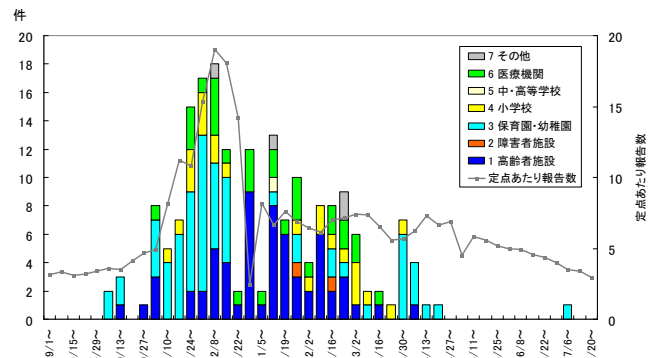


図4 施設別発生状況及び患者報告数推移(2008-2009シーズン)

2. 方法

東京都では、都内の保健所が探知した感染性胃腸炎集団事例について、以下の2つの基準を満たす事例の報告を求めている。

- (1) 感染性胃腸炎として病原体が確定
- (2) 同一施設において有症状者が10人以上発生(食中毒をのぞく)

これらの報告のうち、ノロウイルスを原因とする166施設の積極的疫学調査記録を分析対象とした。

また、2008年12月から2009年3月の間に、ノロウイルスを原因とする感染性胃腸炎の集団発生があった施設のうち、49施設について、発生時の対応及び平常時の感染症予防対策に関するアンケート調査を行った。

¹ 感染性胃腸炎のシーズンとは、毎年36週(9月初旬)より1年間としている。

² 患者10人以上の事例で食中毒を除くもの。原因はノロウイルス、ロタウイルス、サポウイルスなど。

3. 結果

3.1 集団発生の状況

分析対象とした施設の内訳は、高齢者施設 60 (35%)、保育施設 49 (30%)、医療機関 28 (17%)、小学校 21 (13%)、障害関連施設 3 (2%)、その他 5 (3%) である。

3.1.1 施設別発症率

全施設の平均発症者数は、利用者が 28.1±20.4 (人±SD)、職員が 4.3±4.2 (人±SD) で、発症率はそれぞれ 32.3%、14.6% であった。施設別の状況は表 1 に示した。高齢者施設と保育施設を比較すると、高齢者施設の職員の発症率は保育施設に比べ高かったが (p<0.05)、利用者の発症率に有意な差はみられなかった。

	全施設	高齢者施設	保育園	医療機関	小学校
施設数	166	60	49	28	21
平均発症者数 (利用者)	28.1±20.4	24.4±12.9	27.9±14.5	20.9±11.5	45.7±38.7
平均発症者数 (職員)	4.30±4.20	6.2±4.7	3.0±3.3	5.1±3.9	0.8±0.9
平均発症率 (利用者)	32.3%	37.4%	31.6%	29.4%	25.4%
平均発症率 (職員)	14.6%	21.6%	10.6%	20.3%	2.4%

表 1 施設別平均発症者数及び発症率

3.1.2 施設別発生期間

初発患者の確認から、保健所による終息の判断までの期間は、平均 20.5±8 日 (最小 5 日～最大 52 日) であった。施設別には表 2 に示したとおりである。保育施設が高齢者施設に比べ、終息までの期間が長い傾向がみられた (p<0.01)。

	全施設	高齢者施設	保育園	医療機関	小学校
施設数	166	60	49	28	21
終息までの平均期間 (日)	20.5±8.0	18.7±6.0	23.5±8.8	20.0±7.0	16.5±7.2
終息までの期間の幅 (日)	5～52	8～34	9～52	9～37	5～34

表 2 施設別発生期間

3.1.3 入院及び死亡

感染性胃腸炎の発症にともない、入院したのは医療機関を除き全体で 51 名であり、内訳は高齢者施設 46 名、保育施設 4 名であった。症状の悪化に伴い、高齢者施設において 1 名の死亡の報告があった。

3.1.4 検査結果及び症状

健康安全研究センターあるいはその他の検査機関で行われた検査結果を図 5 に示した (キット検査等による「ノロウイルス陽性」のみの情報を除く)。高齢者施設や医療機関では主に G II/4 が、保育施設や小学校では主に G II/3・G II/6 が検出された。

症状について高齢者施設と保育施設を比較すると、高齢者施設では「下痢あるいは腹痛」と「おう吐」の出現率がそれぞれ 67.1%、66.3% と大きな差はないが、保育施設では 41.7%、74.9% とおう吐の出現率が高い傾向が見られた。

また、保育施設における、0～1 歳と 2 歳以上の発症率を比較すると、前者が発症率 52.1%、後者が 25.7% と、低年齢者の発症率が高い傾向がみられた。

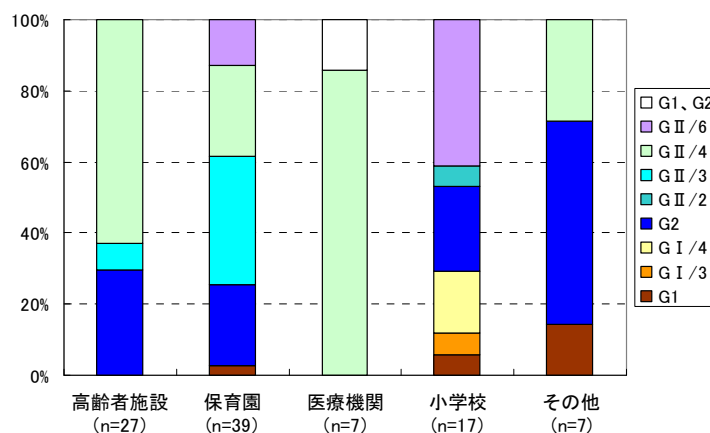


図 5 施設別検出ウイルス

3.2 アンケート調査結果 (発生時対応)

アンケート調査は、発生があった施設を管轄する保健所に依頼し、49 施設の職員 (看護師や保育士) に対して行った。回答を得られたのは、保育施設 23 施設 (47%)、高齢者施設 17 施設 (35%)、医療機関 4 施設 (8%)、小学校 4 施設 (8%)、その他 1 施設 (2%) であった。

3.2.1 おう吐物処理について

おう吐物処理の状況について 10 項目質問した (表 3)。実施率が特に低かったのは、「おう吐した人のケアをする際に、手袋・マスク・エプロンを身につけた」(45%)、「おう吐物処理の際に手袋・マスク・エプロンを身につけた」(57%) であった。

接触感染予防策としての個人防護（以下、PPE³）の不備で最も多かったのは、エプロンであった（エプロンについては、その場で身につけられなくても、あとで着替えたものについては「実施」に含めた）。

3.2.2 環境消毒

接触頻度の高い箇所の消毒の実施、適切な消毒剤の使用については、実施率は90%以上だった。

3.2.3 感染拡大防止策（接触感染予防策）

有症状者の可能な範囲でのゾーニング、必要に応じた集会等行事の延期・中止については、実施率は約8割（79～84%）だった。

3.2.4 職員間の連絡体制・情報管理

職員への適切な情報伝達、保健所等外部との連絡窓口の設置、利用者・家族等への適切な情報提供については90%以上が実施と回答した。

3.2.5 施設の構造上の制約

「手洗い場が不足あるいはケアの場所から遠い」という項目については、保育施設・高齢者施設では1割強（12%～13%）があると答えているが、小学校では4施設中3施設（75%）、医療機関では4施設中2施設（50%）が制約としてあると回答している。「清潔区域と汚染区域の交差（汚物運搬の際に食堂を通過など）」については、保育施設・高齢者施設・小学校の2割程度（22%～24%）があると答えている。医療機関であると答えた施設はなかった。

3.3 アンケート調査結果（平常時の感染症予防策）

3.3.1 実施率8割以下の平常時対策

施設における平常時の感染症予防対策について質問した。実施率8割以下と回答した項目は、「排泄のケアの際に手袋を着用し、1回ごとに交換している」、「新人職員に対して、標準予防策に関する研修を行っている」、「職員はケアや場面に合わせて手袋・マスク・エプロンを着用している」等であった（図6）。実施率の低い項目は多くが標準予防策に関する項目だった。

3.3.2 感染症対策委員会

感染症対策委員会について質問した。「感染症対策委員会（感染症に関する話し合いの場）があり、かつ機能している」と回答したのは全体の約半数（49%）であり、高齢者施設においては76%が上記の回答であったのに対し、保育施設では、30%であった（図7）。

3.4 自由回答

今回の発生で困ったこと・気づいたことについて質問した。保育園では、「おう吐・下痢だけでは園児を休ませない保護者が多い、保護者の理解を得にくい」、という回答が多く、回復途上の登園による感染拡大を懸念していた。

高齢者施設では、認知症の方のケアの際の対応、職員が発症した場合のマンパワー不足に関する回答が多かった。

おう吐物処理手順	実施率
1 おう吐のあった場所から離れるように、周囲の人を誘導した	81%
2 換気を行った	80%
3 「おう吐した人」のケアをする際に、手袋、マスク、エプロンを身につけた	45%
4 「おう吐した人」のケア後に流水・石鹸で手を洗った	98%
5 おう吐物の処理の際に、手袋、マスク、エプロンを身につけた	57%
6 おう吐物をペーパータオルなどで大まかに除去した	86%
7 広範囲の消毒を行った（おう吐物の中心から半径2m程度）	71%
8 おう吐物処理後に流水・石鹸で手を洗った	96%
9 おう吐物が付着した可能性がある食器類を調理室に戻す前に適切に消毒した（あるいは使い捨て食器を使用した）	74%
10 おう吐物が付着した可能性があるリネン類を適切に消毒した	78%

表3 おう吐物処理に関する質問（n=49）

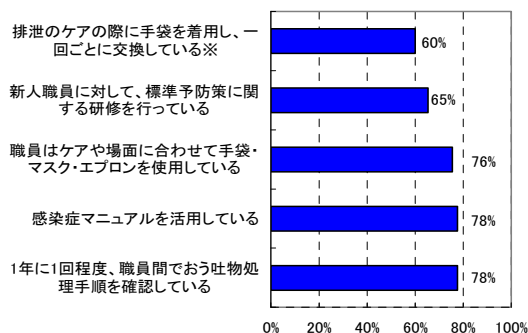


図6 実施率8割以下の平常時対策（n=49/※n=45）

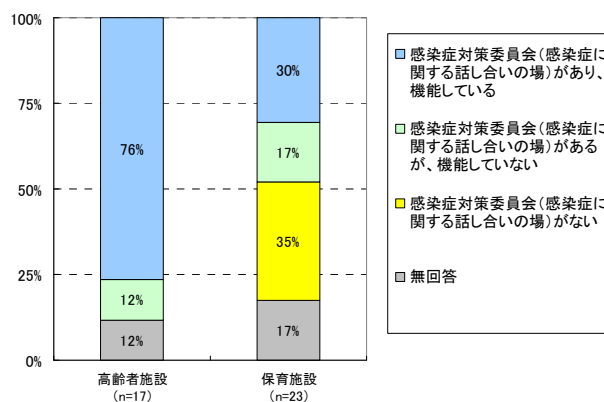


図7 感染症対策委員会（話し合いの場）の状況

³ PPE=personal protective equipment（手袋・マスクなどの個人防護具を示す）

少数ではあるが、医療機関では、おう吐や下痢を疾患による症状であると想定し、「感染症の可能性があると早期に認識できなかった」という回答が見られた。

3.5 事例

保健所より報告のあった事例のうち、特徴的な事例を紹介する。

3.5.1 保育園での流行事例

保育園において6週間の間に2回の流行が見られた事例で、園児計42名、職員3名が発症した。感染拡大の要因として推測されたのは、園及び家庭内での下痢やおう吐を介した感染、回復途上にある児の登園による影響である。2回の流行両方に罹患した園児がいたことから、異なるタイプのノロウイルス感染が推測されたが、検査結果は、前半はノロウイルスGⅡ陽性（サブタイプ不明）、後半はノロウイルスGⅡ/6陽性であった。

保健所は、園での適切なおう吐物処理、手洗いの徹底、環境消毒の強化、ゾーニング、保護者への周知（おう吐物処理手順及び登園基準等）などの提言を行った。

3.5.2 小学校での流行事例

小学校における事例で、20日間の間に、生徒計128名（発症率26.0%）の発症があった。感染拡大の要因として推測されたのは、学校のトイレを介した感染、家族内での感染、不十分な手洗いである。検査ではGⅡ/6が検出された。流行初期に音楽発表会があり、会場でのおう吐があったが、迅速な対応により行事を介した他校への感染拡大はなかった。

終息後の学校職員のアンケートより、胃腸炎が発生している中で、練習を積んだ生徒への「教育的配慮（行事への参加）」と「感染拡大防止策（参加中止）」の2つの面に苦慮したこと、手洗いについて構造上の制約がある（水道の不足、1つの蛇口に生徒20名以上という学年がある）という回答があった。

保健所は、環境消毒としてのトイレ消毒の強化、流行中の学校行事の実施については、保健所を交えて対応を協議することなどを提言した。

4. 考察

保健所より報告された積極的疫学調査記録及びアンケート調査の結果より、ノロウイルスによる感染拡大防止のために、以下のことを提案したい。

保育園については、感染拡大の一つの要因として、回復途上の園児の登園（発熱がなく、おう吐・下痢だけでは登園するなど）による影響が推測される。ノロウイルスは長期間にわたって排泄される可能性もあることから⁴、少なくとも症状が続く間は登園を控えることについて保護者への理解を求めていくことも必要である。発熱や下痢などが頻繁に生じやすい年齢であることから、他の施設に比べ、保育園はより標準予防策の徹底及び衛生的な環境の保持が求められる。

高齢者施設については、認知症のある利用者に関連して、手洗いが十分に行えない（居室に石鹸等を置けない等）状況があるが、手袋や液体石鹸を携帯するなど、施設の中で可能な限り標準予防策を徹底する工夫が求められる。また、高齢者施設には慢性的なマンパワー不足があるが⁵、そのような中でも職員が体調不良を申告しやすい、受診しやすい職場体制づくりも重要である。

小学校については、トイレ清掃の体制が自治体や学校によって異なり、胃腸炎発生時のトイレ消毒の強化を迅速に行えない可能性がある。このことから、学校における感染症予防マニュアルには、胃腸炎発生時の環境消毒の強化の具体的な方法（トイレ、手洗い場などの清掃・消毒の強化等）を記載しておく必要がある。

施設に共通することとしては、感染性胃腸炎流行シーズン前に、施設内で1年に1回はおう吐物処理方法及び物品の確認を行うことが望ましい。

感染症発生動向調査における感染性胃腸炎発生の動向と、集団発生の報告がリンクしていることから（図4）、今後も定点医療機関報告の動向による注意喚起の継続は必要である。

⁴ 谷口力夫他. 乳幼児施設におけるノロウイルス集団感染事例の記述疫学的解析. 日本食品微生物学会雑誌 2008; 25(1): 27-31.

⁵ 田島誠一. 介護職の労働環境—その課題と展望. 月間総合ケア 2007; 17(5): 12-18.

ノロウイルスの遺伝子解析

1. はじめに

東京都における感染性胃腸炎の患者数は2006-2007流行期に1定点あたり27人に達し、東京都感染症サーベイランス事業開始以来最も高い値を示した。この原因として、新たに出現したGⅡ/4変異株が関与したと考えられている。2008-2009流行期において、都内における胃腸炎集団発生から検出されるノロウイルスの遺伝子型を明らかにし、発生防止対策に活用することを目的に調査を実施した。

2. 方法

2.1 検査材料

2008年4月から2009年3月までに、都内で報告された胃腸炎集団発生739事例について胃腸炎起因ウイルスの検索を行った。

2.2 検査方法

材料はPBS(-)により10%乳剤を調整し、ポリエチレングリコールを用いた濃縮により核酸抽出材料を得た。核酸の抽出はCTAB法により行い、逆転写酵素 Supper Script II を用いてcDNAを合成した。

ノロウイルス遺伝子の検出は、厚生労働省の通知法に準拠して行った。その他の胃腸炎ウイルスについてはサポウイルスはOkaraの方法によるリアルタイムPCR法、またA群ロタウイルスとアデノウイルスはイムノクロマト法、C群ロタウイルスはRPHA法、アストロウイルスは酵素抗体法の市販キットを用いて検査した。各市販キットの術式は、添付書類に従った。

2.3 ノロウイルスの遺伝子解析

ノロウイルス陽性と判定した材料について遺伝子解析を実施した。ノロウイルスのカプシド領域について塩基配列を決定し、遺伝子型の分類は病原微生物検出情報の方法により決定した。

3. 結果と考察

遺伝子解析を実施した206事例中、114事例(55%)がノロウイルスGⅡ/4であった(図1)。次いで、GⅡ/6(28事例)、GⅡ/3(26事例)、GⅠ/4(17事例)、GⅡ/12(7事例)、GⅠ/3(4事例)、GⅠ/1(3事例)、GⅡ/2(2事例)であり、GⅠ/8、GⅠ/11、GⅠ/14、GⅡ/7、GⅡ/13がそれぞれ1事例ずつ検出された。GⅡ/4はノロウイルス流行最盛期には型別されたノロウイルス陽性事例数の過半数を占めていましたが、それ以外の時期は他の遺伝子型(各種のGⅠ、GⅡ/3、GⅡ/6など)のノロウイルスによる事例も多く確認された。

ノロウイルスの遺伝子型を集団発生施設別に比較すると、GⅡ/4は飲食店、会食・宿泊施設、家庭内、高齢者施設における事例では遺伝子型別実施例の過半数を占めていたが、保育園・小学校等の施設利用者が低年齢層の施設では56事例中12事例(21%)と半数以下であった。一方、GⅡ/6は28事例から検出され、このうち19事例(68%)は保育園・小学校等から検出された(図2)。

今回の胃腸炎集団発生からのウイルス検索および検出されたウイルスの遺伝子解析により、高齢者福祉施設など利用者が成人層である施設ではノロウイルスGⅡ/4が、保育園・小学校など利用者が低年齢層の施設からはGⅡ/3とGⅡ/6が多数検出された。利用者が低年齢の施設ではノロウイルスの他にサポウイルス、A群・C群ロタウイルス、アストロウイルスの検出例もあり、胃腸炎の原因究明を進める上で、胃腸炎起因ウイルスを幅広く検索対象として設定することが重要であった。

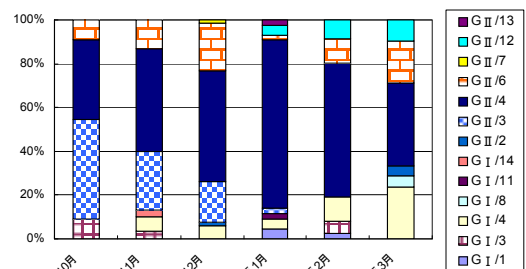


図1 集団発生事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型 (2008年10月～2009年3月)

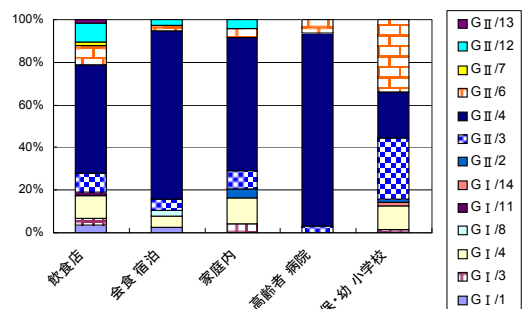


図2 施設別ノロウイルスの遺伝子型 (2008年10月～2009年3月)

感染経路に関する実験

感染性胃腸炎を引き起こすノロウイルスの集団感染が頻発している。ウイルスに汚染した食材の喫食による経口感染がその主な原因であるが、その他にウイルス汚染した器物による接触感染や患者のおう吐物との接触感染なども認められている。さらに、海外の文献調査によれば、ノロウイルスを含んだおう吐物からの飛沫感染や乾燥したウイルスを含んだ粉塵などの空気を介する感染事例も報告されている。イギリスのレストランでの集団発生調査から、エアロゾル化したウイルスが空調によって運ばれ、ウイルス汚染した空気を吸い込むことが感染の原因であると結論している¹⁾。また、2006年の11月、都内のMホテルで発生した集団感染は、おう吐物による飛沫とカーペットからの粉塵により空気を媒介とした感染が拡大したと報告されている²⁾。

今回のタスクフォースの「感染経路の解明」部会では、「模擬おう吐物の床面への落下によって生じる飛沫の飛散状況」及び「乾燥吐物の足踏みにより生じる粉塵中のウイルスの動態」等を把握することを目的とし、ノロウイルスの代替として大腸菌ファージ Q β （キューベータ）を用いクリーンブース内で実験を行ったので、その結果について報告する。

1. 代替ウイルス大腸菌ファージ Q β

1.1 Q β の性状

ノロウイルスの代替として Q β を用いた。ノロウイルスがカリシウイルス科の中でも最小の 38nm で正 20 面体であり、Q β は 28nm で正 20 面体ときわめて相似的である。さらにいずれも、RNA ウイルスである点も代替ウイルスとしての条件を備えている。

今回実験に供した Q β は、東京大学大学院都市工学専攻（片山浩之准教授）より分与されたもので、宿主菌株である大腸菌 E12 F⁺ (A/ λ) の F 絨毛（性絨毛）に特異的に感染し、溶菌を起こす。

1.2 Q β の定量法

1.2.1 プラーク法³⁾（感染性 Q β の定量）

加熱溶解した滅菌済み上層寒天を 48℃ の湯水につけて保温し、指数増殖した宿主菌液を上層寒天 250mL につき 10mL 加えた。適度に希釈した試料を下層寒天に 1mL 滴下し、よく攪拌した上層寒天約 10 mL を下層寒天全体に広げた。静置して上層寒天が固化した後、37℃ で 18～24 時間培養した。

計測は、寒天培地上の溶菌斑(プラーク)の中心の数を数え、試料 1mL 当たりの溶菌斑数(PFU: plaque forming unit)、すなわち[PFU/mL]で表示する。本法による検出限界は、試料 1mL に溶菌斑 1 個であるため、1PFU/mL である。

1.2.2 real-time PCR 検出法（遺伝子量の定量）

プラーク法では感染力を失った Q β を測定できない。したがって、遺伝子量測定法である real-time PCR 法による測定を行った。

試料液 100 μ L を proteinase K と CTAB で処理し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール混液と混和した。その水層をエタノール沈澱し、遠心して、RNA ペレットを回収した。

回収した RNA を超純水に再浮遊させ、1 時間反応を起こさせ、相補的 DNA (c DNA) を作成した。

FG3(+)(-)のプライマーペアと FAM/MGB ラベルした FG3(P)プローブを使用した。real-time PCR における熱条件は、95℃ 15 秒、60℃ 1 分を 50 サイクル反応させた。定量は、既知のファージ(FG4)の塩基配列をベースにした合成 DNA の段階希釈列を作成し、得られた c DNA と同時に real-time PCR をおこなった際に、各希釈段階で測定された ct 値から検量線を引き、試料の ct 値に当てはめて、定量値を算出した。

1.3 文献

- 1) P.J.Marks, et al. : Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus(NLV) in a hotel restaurant, : Epidemiol. Infect.124, 481-487,(2000)
- 2) 林志直；披露宴会場における集団感染事例について、；第 19 回ウイルス性下痢症研究会抄録集、13.(2007)
- 3) 神子直之：ウイルス不活化手法の大腸菌ファージによる評価；環境微生物工学研究法、233-236, 土木学会衛生工学委員会編

2. 模擬おう吐物落下実験による Q β 粒子の空間分布と滞留時間

クリーンルーム（清浄度クラス 100）内に設置したクリーンブース（120cm×90cm×200cm）内の中央において、高さ約 80cm の位置からリン酸緩衝液またはリン酸緩衝液に白飯を加えた模擬おう吐物を一気に落下させ、ブース内での空間分布及び浮遊 Q β の滞留時間を測定した。クリーンブースは全面ビニール製で、床面には塩ビシートを置いた（図 1）。

2.1 方法

2.1.1 模擬おう吐物の調製

白飯を用いた模擬おう吐物の調整方法は、以下の通りである。炊いた白飯 125g にリン酸緩衝液（PH 7.0）150mL を加えて、ストマッカーにより 30 分間粉碎し、さらにリン酸緩衝液で 500mL までメスアップした。なお、対照として、リン酸緩衝液 500mL を用いた。上記の 2 種類の調製液に、高濃度の Q β フェージ液を約 2 mL 添加して、手振りによく攪拌したものを以下の落下実験に用いた。

2.1.2 落下 Q β の検出

クリーンブース内の床面、高さ 100cm、160cm の各 4 隅に、プラスチック製バット（13 cm 角）を設置し、皿面を上にして、落下してくる Q β を採取した（図 2）。

3 時間後、ブース内より回収したバットに液体培地 5 mL を注ぎ、全面にわたってよく攪拌した後、液体培地を全て回収した。回収液をプラーク法及び real-time PCR で測定した。

2.1.3 浮遊 Q β の検出法 1 インピンジャー法（液体採取法）

リン酸緩衝液 20mL を入れた細菌捕集用インピンジャーにクリーンブース内の空気（高さ 85cm）を導入し、10 L/分で 15 分間空気を採取した。回収液をプラーク法及び real-time PCR で測定した。

2.1.4 浮遊 Q β の検出法 2 アンダーセンサンプラー法（粒径分布測定法）

浮遊 Q β の粒径分布を測定するために、浮遊粒子分級採取装置（アンダーセンサンプラー）を用いて測定をおこなった。バイアブルサンプラー（AV-100 改: 東京ダイレック）に、8 枚の下層寒天（20mL）シャーレをセットして、マスフローコントローラにより 28.4L/min の流量で、15 分間空気を吸引し（高さ 85cm）、プラーク法で測定した。

2.2 結果

2.2.1 落下 Q β の空間分布

落下させた模擬おう吐物等の Q β 量はリン酸緩衝液が 2.8×10^{14} PFU (3.4×10^{14} copy)、リン酸緩衝液+白飯が 1.6×10^9 PFU (1.3×10^{13} copy) であった。模擬おう吐物落下直後の写真を図 3 に、リン酸緩衝液と模擬おう吐物の結果を表 1 に示す。

注) - : 未実施, ND: 検出されず

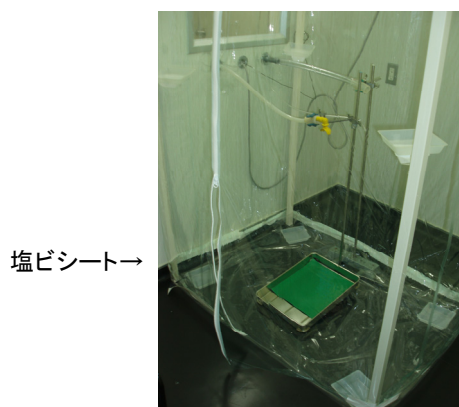


図1. クリーンブース

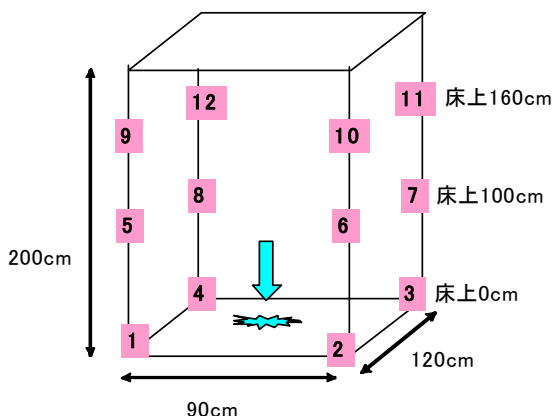


図2. 落下Q β 測定における採取位置



表1 Qβの検出結果

測定位置 (cm)	リン酸緩衝液		リン酸緩衝液 + 白飯	
	ブレード法 (PFU/100cm ²)	real-time PCR (copy/100cm ²)	ブレード法 (PFU/100cm ²)	real-time PCR (copy/100cm ²)
1	-	-	9.2 × 10 ⁴	2.2 × 10 ⁶
2	0	-	1.9 × 10 ⁵	1.2 × 10 ⁷
3	-	-	8.9 × 10 ³	ND
4	-	-	65	3.8 × 10 ³
5	27	ND	ND	ND
6	100	1.3 × 10 ²	ND	ND
7	36	ND	ND	ND
8	3	2.2 × 10 ⁴	ND	ND
9	15	3.3 × 10 ⁴	ND	ND
10	160	33	7.1 × 10 ⁴	ND
11	ND	7.9 × 10 ⁴	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND

注) - : 未実施, ND: 検出されず

図3. 模擬おう吐物落下直後のクリーンブース内

リン酸緩衝液ではQβファージが広く分布し、160cmの高さ（測定位置9～11）からもQβを検出した。リン酸緩衝液に白飯を加えた場合では床面からのみ検出した。

2.2.2 浮遊Qβの滞留時間

落下させた模擬おう吐物等のQβ量はリン酸緩衝液が8.0 × 10¹³PFU (9.0 × 10¹⁴copy)、模擬おう吐物が1.6 × 10⁹PFU (1.3 × 10¹³copy)であった。

インピンジャー法及びアンダーセン法による滞留時間の結果を表2に示す。

リン酸緩衝液による結果では、インピンジャー法では落下2時間後まで、アンダーセン法では、1時間後までQβを検出した。模擬おう吐物の場合は、浮遊Qβは検出されなかった。

2.2.3 浮遊Qβの粒径分布

アンダーセン法による粒径分布の結果を表3に示す。3.3~4.7 μmを中心にした一峰性の分布を示した。

2.3 考察

リン酸緩衝液の実験により、浮遊Qβの粒径分布が、3.3~4.7 μmを中心、一峰性の分布を示すことが分かった。一方、模擬おう吐物の落下では空間に浮遊・落下するQβは検出されなかった。これは、模擬おう吐物によるマスクング、でんぷん成分への吸着、浮遊しやすい5 μm以下の粒子の生成割合が少なかったこと等が原因と推測された。

なお、5 μm前後の粒子の多くは咽頭から上気道に沈着するが、一部は食道に入り消化管に入る可能性がある⁴⁾。したがって、おう吐時の浮遊粒子による二次感染に注意が必要である。

2.4 文献

4) 作業環境のための労働衛生の知識、p23、作業環境測定協会編、2009.

表2. 浮遊Qβの滞留時間

経過時間	インピンジャー法		アンダーセン法
	ブレード法 (PFU/L)	real-time PCR (copy/L)	ブレード法 (PFU/m ³)
5分	ND	5.5 × 10 ⁵	5.2 × 10 ²
1時間	ND	6.1 × 10 ²	49
2時間	ND	5.1 × 10 ²	-
3時間	ND	ND	-

Qβ/リン酸緩衝液による

表3. 浮遊Qβの粒径分布

粒径区分 (μm)	落下5分後 (PFU/m ³)	1時間後 (PFU/m ³)
11以上	52	ND
7~11	45	ND
4.7~7	1.3 × 10 ²	14
3.3~4.7	2.2 × 10 ²	24
2.1~3.3	71	12
1.1~2.1	12	ND
0.65~1.1	2	ND
0.43~0.65	ND	ND

3. 乾燥吐物の足踏みによる Qβ の飛散実験

クリーンブース床面の乾燥吐物の上を足踏みして粉塵を飛散させ、ブース内での空間分布及び浮遊 Qβ を測定した。

3.1 方法

3.1.1 乾燥吐物からの発塵法

床面上に落下させた模擬おう吐物を 1 週間クリーンブース内で乾燥させた。実験は防護服を着た人がブース内に入り、乾燥した模擬おう吐物が飛散した箇所を、5 分間足踏みして発塵させた (図 4)。

3.1.2 落下 Qβ の検出

2.1.2 と同様の方法で、図 2 の 1~8 にプラスチックバット及び寒天培地を設置し、落下する Qβ を測定した。採取時間は、足踏みを含めた 30 分間とした。

3.1.3 浮遊 Qβ の検出法 フィルター法

クリーンブース内の高さ 60cm 及び 140cm に携帯型空気採取装置を設置し、直径 25mm のミリポアフィルター (0.22 μm ポアサイズ) を装着して、2L/min×30 分間空気を採取した。フィルターは液体培地 5mL で超音波抽出後、ブランク法及び real-time PCR で測定した。

3.2 結果

3.2.1 落下 Qβ の空間分布

結果を表 4 に示す。床面の 2 隅から Qβ を検出したが、それ以上の高さからは検出されなかった。

3.2.2 浮遊 Qβ の検出

結果を表 4 に示す。60cm 及び 140cm のいずれにおいても Qβ は検出されなかった。

3.3 考察

乾燥した模擬おう吐物の足踏みによる発塵実験より、床面からは Qβ を検出したが、高さ 100cm における落下 Qβ 及び浮遊 Qβ は検出されなかった。これは、足踏みによる発塵では、5 μm 以下の粒子が発生する確率は低いことが原因の一つと推測された。

その原因としては、今回の実験に使用した塩ビシートが発塵しにくい材質であったこと、床面に落下させた吐物の拭取り処理を行わず、そのまま乾燥させたこと等が考えられた。床材の変更 (カーペット等) も含め、追加実験を検討する必要がある。



図4. 床面の足踏み

表4. 乾燥吐物の足踏みによる落下及び浮遊 Qβ

測定位置	床上 (cm)	ブランク法 (PFU/100cm ²)	real-time PCR (copy/100cm ²)
落下			
1		ND	ND
2	0	3.6 × 10 ²	1.5 × 10 ⁵
3		2.3 × 10 ²	8.9 × 10 ³
4		ND	ND
5		ND	-
6	100	ND	-
7		ND	-
8		ND	-
浮遊			
60cm		ND	ND
140cm		ND	ND

4. 気流攪乱による浮遊Qβの空間分布

4.1 方法

リン酸緩衝液を落下させ1時間経過後に、ブース内に新しいプラスチックバット及び家庭用空気清浄機を設置（図5）した。風力・強で10分稼働させ空気を攪乱させた後、バット内のQβをプラーク法及びreal-time PCRで測定した。空気清浄機は前面から空気を取込み、上部から排出するタイプで、強運転の場合の排出空気量は $5.1\text{m}^3/\text{min}$ である。

4.2 結果及び考察

結果を表5に示す。1ヶ所からQβが検出され、空気清浄機による上昇気流によって、Qβが舞い上がった可能性が考えられた。

すなわち、おう吐物の処理と消毒作業の際に不適切な操作が行なわれた場合などに、ウイルスの再飛散が起こることが示唆された。

空気清浄機などの設定条件を変更し、さらに情報収集する必要がある。

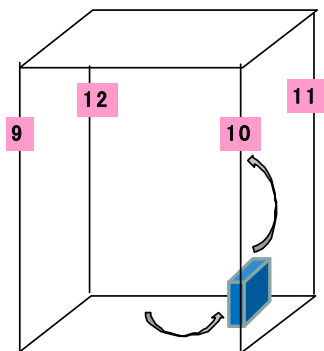


図5. 空気清浄機による空気攪乱実験

採取位置	プラーク法	real-time PCR
	(PFU/100cm ²)	(copy/100cm ²)
9	ND	ND
10	ND	ND
11	ND	ND
12	ND	8.6×10^3

消毒法の検討

二酸化塩素及びオゾンを用いたノロウイルスの消毒に関する知見は乏しい。そこで二酸化塩素及びオゾンによるウイルスの消毒力を評価するために文献調査を行った。次いで市販の二酸化塩素剤及びオゾン水製品について調査し、ウイルスの消毒実験に用いる製品を選定した。ネコカリシウイルス (FCV) を代替ウイルスとして、二酸化塩素及びオゾンによる不活化実験を行い、ウイルスの不活化に必要な二酸化塩素及びオゾンの濃度を調査した。

1. 二酸化塩素及びオゾンによる水中ウイルス不活化データに関する文献調査

1.1 目的

二酸化塩素及びオゾンによる FCV の不活化実験を行うに当たり、適切な消毒剤初期濃度及び実験方法等に関する情報を入手するために文献調査を行った。水中のウイルス又はファージを対象とした文献を検索した。

1.2 調査方法

インターネットを利用して文献検索を行い、ヒットした文献のアブストラクトから不活化 CT 値 (消毒剤濃度: C × 接触時間: T) や不活化率等のデータを得た。ヒットした文献のうちフルテキストが入手できたものについて、より詳細な実験条件を調べた。

1.3 結果及び考察

二酸化塩素又はオゾンを用いた水中のウイルス不活化に関する論文を検索したが、不活化データが十分に揃っている論文は非常に少なかった。

二酸化塩素に関しては、フルテキストが入手できたのは 2 編^{1), 2)} のみであった。この 2 編からウイルス不活化に関する各種データを入手し、表 1-1 にまとめた。

オゾンに関する文献は 2 編^{3), 4)} を入手できた。この 2 編の論文からウイルス不活化に関する各種データを得て、表 1-2 にまとめた。

1.3.1 二酸化塩素による不活化

表 1-1 に示した二酸化塩素によるウイルス及びファージの不活化実験は、二酸化塩素初期濃度 0.5~3mg/L で行われており、いずれも消毒剤消費のない水及び器具を用いていた。

アルカリ性の方が酸性よりも CT 値が小さいことから、二酸化塩素は次亜塩素酸とは逆にアルカリ性で消毒力が強いことがわかった。表 1-1 の論文¹⁾ に引用されている他の論文^{5), 6), 7)} でも、二酸化塩素の消毒力がアルカリ側で強いことが示されていた。

表 1-1 二酸化塩素によるウイルス不活化データ

対象ウイルス 又はファージ	初期濃度 (mg/L)	不活化率 (log ₁₀)	CT 値 (mg/L × min)	pH 値	温度 (°C)	不活化評価法
FCV ¹⁾	1.01	4	20.20~30.30	6	5	細胞培養
	0.90	3.6	>0.68	8	5	細胞培養
	0.84	4	4.20~6.72	6	15	細胞培養
	0.72	4.15	<0.18	8	15	細胞培養
AD40 ¹⁾	0.51	4	0.77~1.53	6	5	細胞培養
	0.53	4	0.80~1.59	8	5	細胞培養
	0.49	4	0.49~0.74	6	15	細胞培養
	0.47	4.15	<0.12	8	15	細胞培養
f2 ファージ ²⁾	3	5	>45	9	3	大腸菌培養
	3	4.2	180	7	3	大腸菌培養
	3	2	360	5	3	大腸菌培養

表 1-2 オゾンによるウイルス不活化データ

対象ウイルス 又はファージ	初期濃度 (mg/L)	不活化率 (log ₁₀)	接触時間 (分)	残留濃度 (mg/L)	pH 値	温度 (°C)	不活化評価法
FCV ³⁾	1.00	4.28	0.25	0.110	7	5	細胞培養
	1.00	>4.74	1.2	<0.0001	7	5	細胞培養
	0.06	1.85	0.25	0.02	7	5	細胞培養
	0.06	2.77	5	<0.0001	7	5	細胞培養
AD40 ³⁾	0.49	2.63	0.25	0.108	7	5	細胞培養
	0.49	3.28	2	<0.001	7	5	細胞培養
	0.30	3.04	0.5	0.014	7	5	細胞培養
	0.30	3.55	10	<0.001	7	5	細胞培養
Poliovirus 1 ⁴⁾	0.38	>4.7	5	0.28	7	5	大腸菌培養
	0.36	>4.9	5	0.16	7	5	大腸菌培養
MS2 ファージ ⁴⁾	0.38	>7.5	5	0.28	7	5	大腸菌培養
	0.36	>8.0	5	0.16	7	5	大腸菌培養

温度に関しては、次亜塩素酸やオゾンと同様に高水温で CT 値が小さく、水温の低下に伴い CT 値が大きくなることから、低水温では消毒力が弱まることがわかった。

対象としたウイルス又はファージの種類により、同一不活化率の達成に必要な CT 値に違いはあるものの、吐物処理時を想定した pH 値 (pH3.5 程度) 及び温度 (20~30°C 程度) における 4log₁₀ 不活化 CT 値は比較的小さいものと推察された。ノロウイルスの代替として用いられる FCV では、表 1-1 に示したように pH6, 15°C における 4log₁₀ 不活化 CT 値は 4.20~6.72mg・min/L であり、1mg/L の二酸化塩素に約 5 分間接触させれば 4log₁₀ 不活化が達成できると考えられた。

このことから、二酸化塩素による不活化実験は、次亜塩素酸ナトリウムによる不活化実験と同様に初期濃度 1mg/L 程度に設定して行うこととした。

1.3.2 オゾンによる不活化

表 1-2 に示したオゾンによるウイルス及びファージの不活化実験は、オゾン初期濃度 0.06~1.00mg/L で行われており、いずれも消毒剤消費のない水及び器具を用いていた。

実験温度及び pH 値はいずれも 5°C, pH7 で行われていた。オゾンの消毒力は次亜塩素酸ナトリウムや二酸化塩素に比べてはるかに強いが、水温の低下に伴い低下することが知られている。また、pH8 以上では pH の上昇に伴いオゾン分解速度が速くなり、結果として消毒力が低下する⁸⁾。吐物処理時に想定される pH 値 (pH3.5 程度) 及び温度 (20~30°C 程度) を考慮すると、オゾンによる吐物の消毒は極めて効果が高いと推察された。

表 1-2 には CT 値が示されておらず、代わりに接触時間及びオゾン残留濃度が示されている。これは次亜塩素酸ナトリウムや二酸化塩素とは異なり、オゾンそのものが時間の経過に伴って分解し濃度が低下することから CT 値が算出できないためである。初期オゾン濃度を低く設定すると、接触後の残留オゾン濃度が測定できない (定量下限値未満) おそれがあることから、オゾンによる不活化実験も初期濃度 1mg/L 程度に設定して行うこととした。

- 1) Thurston-Enriquez, J. A. et al. 1997. Inactivation of Enteric adenovirus and feline calicivirus by chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3100-3105.
- 2) Noss C. I. et al. 1985. Disinfecting capabilities of oxychlorine compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1162-1164.
- 3) Thurston-Enriquez, J. A. et al. 2005. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Research.* 39:3650-3656.
- 4) Shin, G. A. et al. 2003. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3975-3978.

- 5) Cronier, S. et al. 1978. Chlorine dioxide destruction of viruses and bacteria in water, p.651-658. In R. L. Jolly. Et al. (ed), Water chlorination: environmental impacts and health effects, vol. 2. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Mich.
- 6) Alvarez, M. E. 1982. Mechanisms of inactivation of poliovirus by chlorine dioxide and iodine. Appl. Environ. Microbiol. 44:1064-1071
- 7) Shin, G. A. et al. 1998. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and coli Phage MS2 by free chlorine, chlorine dioxide, and ozone disinfection of water. Proceedings of the Water Quality Technology Conference. American Water Works Association, Denver, CO.
- 8) 金子光美. 1997. 第11章 オゾンによる消毒, p.185-186. 水の消毒, (財)日本環境整備教育センター

2. 市販の二酸化塩素剤及びオゾン水関連製品の調査

ノロウイルスの消毒に有効とされる二酸化塩素剤及びオゾン水を家庭で消毒に用いるには、消毒剤の入手が容易である必要がある。

そこで、インターネット検索により市販の二酸化塩素剤及びオゾン水関連製品について調査し、そのうちのいくつかについて実際に入手した。

2.1 調査方法

インターネットエクスペローラを用いてGoogle検索によりキーワードを「二酸化塩素 販売」及び「オゾン水 販売」として検索された製品のホームページにアクセスして製品の情報を確認した。

2.2 結果及び考察

2.2.1 二酸化塩素剤

検索結果を表2-1に示した。一般向けの二酸化塩素剤の多くはスプレータイプで原液をそのままスプレーする方式のものであった。二酸化塩素関連製品は表2-1にあげた以外にも一般向け、容量10L以上の業務用、二酸化塩素発生錠剤、二酸化塩素発生装置（製造装置）など様々な製品の販売を確認した。

表2-1の製品のうち1から5の製品について購入し、ヨウ素滴定法により二酸化塩素濃度を求めたところ、製品1で843mg/L、製品2は未検出、製品3～5は界面活性剤を含むため窒素ガスによるばっ気操作時に多量の泡が発生して測定不能であった。

以上の結果から二酸化塩素剤製品1を消毒効果の実験に用いることとした。

2.2.2 オゾン水関連製品

検索結果を表2-2に示した。オゾン水関連製品のほとんどがオゾン水生成装置で、消毒液として使用可能なオゾン水は2製品のみであり販売も容量10L以上となるため一般家庭に常備して使用するには不向きと考えられた。

製品1を入手しヨウ素滴定で濃度を求めたところ30mg/Lであった。

以上の結果からオゾン水製品1を消毒効果の実験に用いることとした。

表2-1 インターネットで販売を確認した二酸化塩素剤

製品	容量	表示成分
○ 1	500g	二酸化塩素水溶液
○ 2	250mL	殺菌電解水 99.87%以上 二酸化塩素 0.13%未満
○ 3	300mL	二酸化塩素液、界面活性剤 シリコン系消泡剤
○ 4	300mL	二酸化塩素液、界面活性剤 シリコン系消泡剤
○ 5	1000mL	二酸化塩素液、界面活性剤 シリコン系消泡剤
6	500mL	純粋二酸化塩素水溶液 約80ppm
7	500mL	安定化二酸化塩素、精製水
8	350mL	安定化二酸化塩素、活性ゲル化剤
9	250mL	二酸化塩素系

注) ○は購入した製品 (google 検索「二酸化塩素 販売」)
他にも一般向け、容量 10L 以上の業務用、二酸化塩素発生錠剤
などの製品あり
二酸化塩素発生装置(製造装置)を除く

表2-2 インターネットで販売を確認したオゾン水製品

製品	製品の種類
○ 1	オゾン水
2	オゾン水
3	オゾン水供給装置
4	オゾン水供給装置
5	オゾン水生成器
6	オゾン水生成器
7	オゾン水生成器
8	オゾン水生成機器・オゾンガス生成機器
9	オゾン水生成機器・オゾンガス生成機器
10	オゾン水生成装置
11	オゾン水脱臭・除菌洗浄器
12	オゾン発生器、オゾン水生成装置
13	オゾン発生装置・オゾン水殺菌機
14	オゾン流水器
15	ピュアオゾン発生させるオゾン機器
16	卓上オゾン水生成器
17	無臭・高濃度オゾン溶解水製造装置

注) ○は購入した製品 (google 検索「オゾン水 販売」)



図1 入手した二酸化塩素剤

3. 消毒剤消費量の低いウイルス液を用いた二酸化塩素及びオゾンによる FCV 不活化効果の検討

3.1 目的

二酸化塩素及びオゾンによるノロウイルスの不活化に関する研究報告は非常に限られている。ノロウイルス消毒を謳った二酸化塩素剤が多数市販されており、二酸化塩素による消毒効果を検証する必要があると考えられた。また、オゾンが分解しない特徴を持つとされるオゾンナノバブル水も市販されており、消毒効果が期待される。

そこで、ノロウイルスの代替として FCV を用い、ウイルス培養液の精製と希釈により消毒剤消費量をできる限り低くして、二酸化塩素及びオゾンによる不活化実験を行った。

3.2 実験方法

3.2.1 二酸化塩素剤及びオゾン剤

市販の二酸化塩素剤の中で界面活性剤を含まない二酸化塩素剤製品 1（表 2-1）を選定した。この製品の二酸化塩素濃度を測定したところ、600mg/L であった（注）。この二酸化塩素剤を精製水で希釈し、2.19mg/L に調整して実験に用いた。

市販のオゾン剤として、オゾン水製品 1（表 2-2）を選定した。このオゾン水のオゾン濃度を測定したところ、30mg/L であった。予備実験の結果、ウイルス培養液によりオゾンが消費されることがわかったため、オゾン水を精製水で希釈して 4mg/L に調整して実験に用いた。

（注）開封後約 2 ヶ月経過したため、開封直後の濃度 843mg/L より低下していた

3.2.2 FCV 液の調整

Crandell Feline Kidney (CRFK) 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た。さらにリン酸緩衝液 (PBS) により希釈を行い、残存有機物量の低減を図った。この FCV 液を不活化実験に用いた。

3.2.3 不活化実験

- ①二酸化塩素剤及びオゾン水をそれぞれ精製水で希釈し、二酸化塩素濃度 2.19mg/L, オゾン濃度 4mg/L に調整した。
- ②FCV 液 50mL をビーカーに入れ、スターラーで攪拌しながら各消毒剤（二酸化塩素, オゾン）を 50mL 添加した。
- ③消毒剤添加直後（15 秒以内）、30 秒、1 分、2 分及び 5 分経過時の各消毒剤濃度を測定した。消毒剤濃度測定時にウイルス感染価測定用に 1.5mL を分取してウシ胎仔血清 (FCS) で消毒剤を中和した後、CRFK 細胞に接種した。
- ④細胞変性効果 (CPE) の出現によりウイルス感染価を算出した。各消毒剤の代わりに PBS を用いて FCS を添加した FCV 液を CRFK 細胞に接種し、対照とした。対照 FCV 液の感染価をもとに各接触時間におけるウイルス感染価を比較し、不活化率を算出した。

3.3 結果および考察

3.3.1 二酸化塩素及びオゾン濃度の経時変化

二酸化塩素及びオゾン濃度の経時変化を図 3-1 に示した。二酸化塩素による不活化実験時に測定した水温は 24℃、pH7 であった（オゾンの実験時は測定せず）。

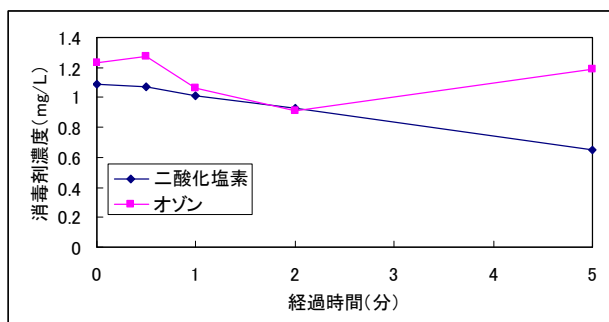


図 3-1 FCV 液に混合した二酸化塩素及びオゾン濃度の経時変化

2. 19mg/L の二酸化塩素を FCV 液と等量混合した直後（15 秒以内）の二酸化塩素濃度は 1.09mg/L であり、FCV 液による初期消費はほとんどなかった。その後経時的に濃度が低下し、5 分接触後で 0.65mg/L となった。この濃度変化パターンは次亜塩素酸ナトリウムによる不活化実験時の濃度変化と同様であった。

4mg/L のオゾンと FCV 液と等量混合した直後（15 秒以内）のオゾン濃度は 1.23mg/L であり、FCV 液による初期消費が見られた。しかし、その後の濃度変化は小さく、5 分接触後の濃度は実験開始時の濃度とほぼ同じであった。この結果から、オゾンでは次亜塩素酸ナトリウムや二酸化塩素とは異なり、FCV 液との反応が瞬時に起こることがわかった。

3.3.2 FCV の不活化

表 3-1 に二酸化塩素及びオゾンによる FCV の不活化効果を示した。対照 FCV 液の感染価は $10^{3.60} \sim 10^{3.90} \text{TCID}_{50}/100 \mu\text{L}$ であった。二酸化塩素及びオゾンを添加した FCV 液の感染価は混合直後（15 秒以内）で検出限界 ($10^{0.50} \text{TCID}_{50}/100 \mu\text{L}$) 未満となり、感染価が 3.1~3.4 log 以上減少した。したがって、二酸化塩素では CT 値 $< 0.27 \text{mg/L} \times \text{min}$ で 3.1 log 以上の不活化、オゾンでは初期濃度 1.23mg/L、接触時間 0.25 分未満で 3.4 log 以上の不活化が達成できたことになる。これらの結果は、前述の文献調査による不活化実験のデータとほぼ一致していた。

昨年度実施した塩素による FCV 不活化実験では、1mg/L の塩素で 30 秒接触後のウイルス感染価が検出限界未満となった。今回の実験でも、二酸化塩素及びオゾンは、ウイルス液との混合直後からウイルスをほぼ完全に不活化させる結果となった。

したがって、次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素、オゾンはいずれも高いウイルス不活化効果を持つことが示された。嘔吐などによるウイルス汚染箇所の消毒には高濃度の消毒剤が必要とされているが、これらの実験結果からウイルス自体の消毒は低濃度の消毒剤（次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素、オゾン）暴露によって達成できることが示された。実際のウイルス汚染箇所の消毒に必要な二酸化塩素及びオゾン濃度を求めるためには、おう吐物や床材などによる消毒剤の消費量を把握する必要がある。

表 3-1 二酸化塩素及びオゾンによる FCV 不活化効果

消毒剤	初期濃度 (mg/L)	対照	ウイルス感染価 ($\text{TCID}_{50}/100 \mu\text{L}$)				
			接触時間 (分)				
			<0.25	0.5	1	2	5
二酸化塩素	1.09	$10^{3.6}$	nd	nd	nd	nd	nd
オゾン	1.23	$10^{3.9}$	nd	nd	nd	nd	nd

nd : 検出限界 ($10^{0.5} \text{TCID}_{50}/100 \mu\text{L}$) 未満

4. 二酸化塩素によるおう吐物処理に関する検討

ノロウイルスのおう吐物の消毒には次亜塩素酸ナトリウムのほかに二酸化塩素及びオゾンが有効であると考えられた。これらによる有効な消毒効果を得るためにはおう吐物処理時に消毒液の濃度を一定時間維持する必要がある。そこで、おう吐物処理時の二酸化塩素濃度について、いくつかの条件を設定して検討を行った。

4.1 実験方法

4.1.1 模擬おう吐物の二酸化塩素消費量

白米を用いてpHを酸性にした模擬おう吐物を調製し、おう吐物を消毒したときの二酸化濃度の変化について検討した。

- ・ 模擬おう吐物試料の調製

東洋水産(株)製マルちゃんあったかごはんを電子レンジで加熱解凍し、その一定量に等量のパタル酸緩衝液 (pH4)を加えてストマッカを用いて1分間粉碎して試料を調整した。

- ・ 二酸化塩素濃度の測定

模擬おう吐物の1gを時計皿にとってパタル酸緩衝液を1mL加え、これに600ppmの二酸化塩素1mLを加え、DPD法により30秒、1分、2分、5分、10分後の二酸化塩素濃度を測定した。

4.1.2 カーペットの二酸化塩素消費量

二酸化塩素によるおう吐物の消毒にあたり、カーペットの上におう吐した場合はカーペットによる二酸化塩素濃度の消費分を考慮する必要がある。そこで、カーペットの種類の違いによる二酸化塩素消費量の検討を行った。

- ・ 塩素濃度の測定

裏ゴム張り、長毛、ループ状の三種類のカーペットに600ppmの二酸化塩素溶液50mlをかけ、1分、2分、3分、5分、10分後のカーペット上の二酸化塩素濃度を測定した。

なお、次亜塩素酸ナトリウムを用いた実験では1000ppmで実験を行ったが、家庭用として販売されている二酸化塩素剤の濃度を秤定したところ600ppmであった。このため、600ppmを初期値として実験を行った。

4.1.3 おう吐物ふき取り後にカーペット上に残るおう吐物の量及び二酸化塩素消費量

模擬おう吐物を用いてカーペット上のおう吐物をふき取った後、カーペット上に残るおう吐物の量及びその消毒時の二酸化塩素濃度を検討した。

- ・ 模擬おう吐物の調製

東洋水産(株)製マルちゃんあったかごはんを電子レンジで加熱解凍し、その25gに等量のパタル酸緩衝液(pH4)を加えてストマッカを用いて1分間粉碎し、更に50mLのパタル酸緩衝液を加えて散布用模擬おう吐物とした。

- ・ 回収率及び二酸化塩素濃度の測定

裏ゴム張り、長毛、ループ状の三種類のカーペットに調整した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、散布前の模擬おう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50mLの600ppm二酸化塩素溶液をペーパータオル全面が浸るようにつけ、1分後、2分後、3分後、5分後及び10分後にカーペット上の二酸化塩素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二酸化塩素によるカーペット変色の有無を確認した。

4.2 結果

4.2.1 模擬おう吐物の二酸化塩素消費量

測定結果を図4-1に示した。なお、0分の値は試料で希釈された二酸化塩素の計算上の初期濃度(600ppmの1/3量 \approx 200ppm)である。

実際のおう吐物でpHの緩衝作用がみられたことから、模擬おう吐物はパタル酸緩衝液を用いてpH4の試料として調整した。この試料に二酸化塩素を添加したときのpHは緩衝作用により中和されずpH4であった。模擬おう吐物に600ppm二酸化塩素を添加したときの濃度は添加後30秒で84ppmまで減少し5分後で24ppm、10分後で15ppmの二酸化塩素が残っていた。

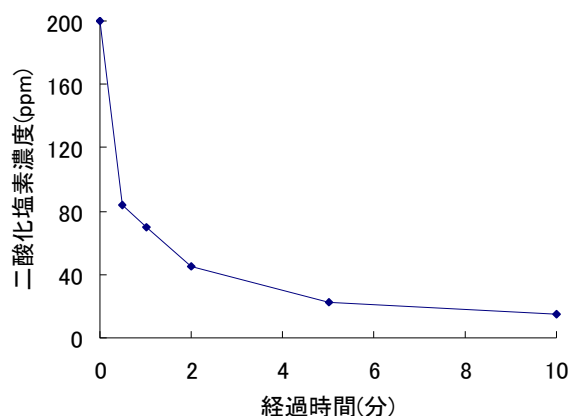


図4-1 模擬おう吐物 (pH4、パタル酸で調製) に600ppmの二酸化塩素添加時の濃度の経時変化

4.2.2 カーペットの二酸化塩素消費量

測定結果を図4-2に示した。裏ゴム張り、長毛、ループ状のいずれのカーペットも測定開始から1分後で二酸化塩素濃度は220ppm以上で塩素消費量は約65%であった。裏ゴム張り及び長毛のカーペットでは10分後でも100ppm以上の二酸化塩素が残っていた。ループ状のカーペットに撒いた二酸化塩素は2分後以降次第にカーペット内にしみ込みはじめ、3分後で101ppmであることまで確認したが、5分後以降はサンプリングできないほどしみ込んでしまったため、測定できなかった。

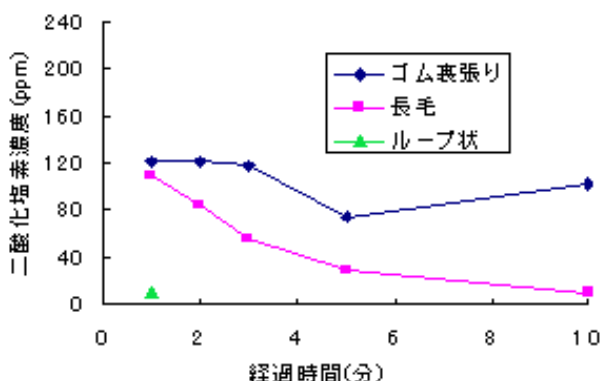


図4-2 カーペットに撒いた600ppmの二酸化塩素濃度の経時変化

4.2.3 模擬おう吐物ふき取り後にカーペット上に残る模擬おう吐物の量及び二酸化塩素消費量

カーペット上に撒いた模擬おう吐物の回収率を表4-1に、吐物ふき取り後にカーペットに撒いた600ppmの二酸化塩素濃度の経時変化を図4-3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裏ゴム張り及び長毛で90%以上であったが、ループ状では吐物の水分の一部がカーペットにしみ込んだためやや回収率が悪かった。模擬おう吐物回収後にカーペット上に撒いた二酸化塩素濃度は裏ゴム張り及び長毛のカーペットで1分後で約20%が残っていた。ループ状のものはただちにカーペット内にしみ込み、1分後で所定量以下の量しかサンプリングできなかったが、わずかに二酸化塩素が残っていることを確認した。裏ゴム張りのものは2分目以降わずかに濃度が減少したが、10分後でも約100ppmの二酸化塩素が残っていた。長毛のものは5分後で1分後の半分まで減少、10分後では約10ppmまで減少した。

表4-1 カーペット上の模擬おう吐物回収率及びカーペット変色の有無

	吐物回収率 (%)	カーペットの変色
ゴム裏張り	98	有 (茶～ピンク)
長毛	92	有 (茶～ピンク)
ループ状	68	有 (茶～ピンク)

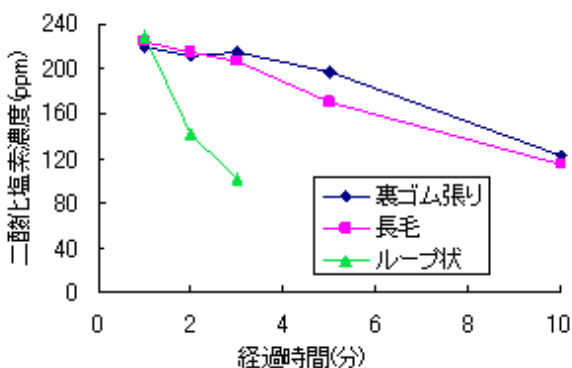


図4-3 おう吐物ふき取り後にカーペットに撒いた600ppmの二酸化塩素濃度の経時変化

4.3 考察

カーペット上の模擬おう吐物の二酸化塩素による消毒について下記1)～3)の実験を行った。

実験は、これまでに報告した次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果の実験で用いたものと同じフタル酸でpH4に調製した模擬おう吐物及び裏ゴム張り、長毛、ループ状の3つのカーペットを使用した。

実験に先立って実施したウイルス液を用いたFCV不活化効果の検討において2ppmの二酸化塩素で15秒以内にウイルスがほぼ完全に不活化したことから、模擬おう吐物及びカーペットと二酸化塩素を接触して一定時間経過後の二酸化塩素の濃度を測定し、二酸化塩素が次亜塩素酸ナトリウムに代えてノロウイルスの消毒に使用できるかどうかを検証した。

実験1) 模擬おう吐物の二酸化塩素消費量では、模擬おう吐物と接触した二酸化塩素（初期値600ppm）は時間の

経過とともに減少するが、10分後においても約15ppmの濃度が検出された。実際のおう吐物では種々の食品成分によって二酸化塩素と複雑な反応により更に急速に二酸化塩素濃度が減少する可能性があるが、ウイルスの不活化は可能と考えられた。

次に実験2)ではカーペットそのものが消費する二酸化塩素量について検討した。裏ゴム張り及び長毛のカーペットでは同じ傾向を示し、二酸化塩素の消費は少なく、カーペット上への散布に使用することが可能と考えられた。

一方3)の実験で模擬おう吐物がカーペット上にわずかに残るものの、600ppmの二酸化塩素を用いた場合には、裏ゴム張り及び長毛のものでは10分後においても二酸化塩素が残留し、ウイルスの不活化は可能と考えられた。しかし、二酸化塩素液が浸み込むタイプのカーペットでは、二酸化塩素濃度が測定できなかったため、消毒効果は不明である。また、実際のおう吐物は二酸化塩素消費量がより多いことが考えられるので、おう吐物の入手が可能であるならば追試を行ってより詳細な検討を行いたい。

なお、600ppmの二酸化塩素を用いてカーペット上の吐物の消毒をした場合、次亜塩素酸ナトリウム1000ppmで消毒した場合と同様にカーペットが変色し(カーペットに残存する吐物が塩素により茶色～ピンクに変色)、流水で洗ってもカーペットの変色は回復しなかった(図4-4)。

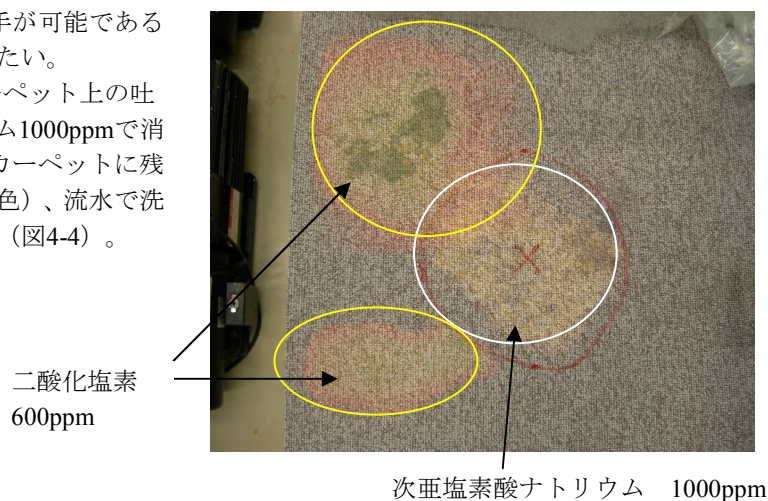
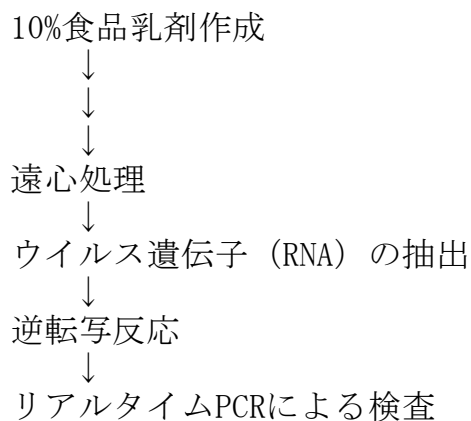


図4-4 次亜塩素酸ナトリウム及び二酸化塩素による吐物処理後のカーペット

食品からのノロウイルス遺伝子検出法の開発

これまで食品からのノロウイルス遺伝子（以下、NV と標記する）検出率向上を目的に食品検体処理方法（食品成分由来夾雑物の除去方法）の検討を行い、細菌を利用した処理方法（開発法）を考案した。この方法は、厚生労働省の通知による試験方法（通知法）の途中に、細菌を添加して培養する行程を追加したものであり、検査用食品乳剤に添加した細菌が、食品成分を栄養源として分裂増殖を繰り返すことを利用し、検査を妨害する食品成分由来夾雑物を減少させることで NV 検出率の向上を図るものである（図 1）。

◇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（開発法）

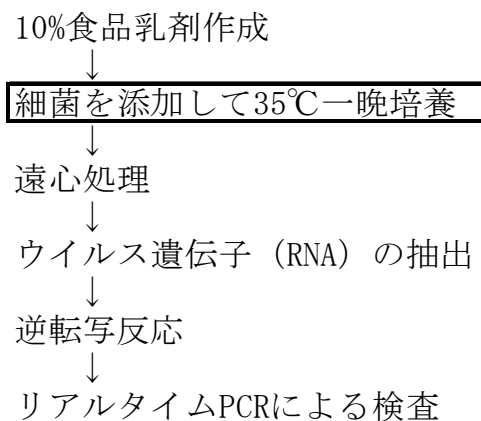


図 1 開発法によるノロウイルス検査行程

ここでは、実際の食品検査にこの開発法が適用可能かどうかを検証するため、実際の食品検体からの NV 検出を試み、また当センター以外の検査機関による実施の可能性について検討した結果を報告する。

1 食中毒事件に関連した食品の開発法によるノロウイルス検査結果

1-1) 材料と方法

平成 21 年 1 月～3 月に食中毒事件関連食品として搬入された検体のうち、患者から NV が検出された 15 事例の食品 42 検体について開発法による再検査を行った。食品検体の内訳は生食用カキ 15 件（7 事例）、その他の食品 27 件（9 事例）であった。NV 陽性の判定基準は、厚生労働省通知のとおり実測値 10 コピー以上であることとし、陽性と判定された検体については、2nd リアルタイム PCR¹⁾でも陽性となることを確認した。なお、これらの検体は、食中毒事件当時の検査ではすべて NV 陰性と判定されていたものである。

1-2) 結果および考察

15 事例の食品 42 検体の開発法による再検査の結果、生食用カキ 4 検体（4 事例）から NV が検出され

表1 開発法による食中毒事件関連食品の再検査結果

事例	検体名	ノロウイルス遺伝子						
		G I			G II			
		Ct値	2nd- Realtime PCR	コピー数	Ct値	2nd- Realtime PCR	コピー数	
1	A	エビ	ud			ud		
2		ピータン	ud			ud		
3		くらげ	ud			ud		
4		チャーシュー	ud			ud		
5		蒸し鶏	ud			ud		
6	B	キュウリともやしのお浸し	ud			ud		
7	C	かき	41.6	11.9	13.2	ud		
8		鴨	ud			ud		
9	D	鯛の海老ムース詰め	ud			ud		
10		イチゴムース	ud			ud		
11	E	サラダ	ud			ud		
12		バチマグロ	ud			ud		
13	F	大根おろし	ud			ud		
14		ほうれん草胡麻和え	ud			ud		
15	G	生かき	ud			ud		
16		胡麻豆腐	ud			ud		
17		お刺身	ud			ud		
18	H	茶ぶり生子	ud			ud		
19		香の物	ud			ud		
20		白玉ぜんざい	ud			ud		
21		ステーキ	ud			ud		
22	I	ごぼう煮	ud			ud		
23		ごはん	ud			ud		
24		付け合わせ野菜	ud			ud		
25	J	殻付きかき	ud			43.8	ud	
26	K	かき	43.6	23.2	4.2	39.2	18.3	124.7
27	L	生食用かき2粒	ud			ud		
28		長崎(九十九島)産かき	ud			39.6	22.1	100.2
29		厚岸丸かき(北海道)	ud			ud		
30		ブルーポイント(アメリカ)	ud			ud		
31		広島(大黒神島)産かき	ud			43.9	ud	
32		オイスターベイ(アメリカ)	ud			ud		
33		厚岸かきエモン(北海道)	ud			ud		
34		厚岸丸かき(北海道)	ud			ud		
35		ブルーポイント(アメリカ)	ud			ud		
36		シュリンプカクテル	ud			ud		
37		蒸しムール貝	ud			ud		
38		クラブケーキ	ud			42.2	ud	
39		兵庫(赤穂)産かき	ud			ud		
40	N	からみもち	ud			ud		
41		きなこもち、あん	ud			ud		
42	O	殻付きかき	42.0	14.6	10.5	40.4	ud	

ud: 不検出

表2 食中毒事件関連食品の陽性検体のまとめ

	ノロウイルス遺伝子						当該事例の患者から検出された ノロウイルス遺伝子型
	G I			G II			
	Ct値	コピー数	判定	Ct値	コピー数	判定	
7	41.6	13.2	(+)	ud	—	(-)	GI/1、GII/UT
26	43.6	4.2	(-)	39.2	124.7	(+)	GI/UT
28	ud	—	(-)	39.6	100.2	(+)	GII/4
42	42	10.5	(+)	ud	—	(-)	GI/4

ud:不検出

UT:遺伝子型不詳

た(表1、表2)。なお、それらのカキから検出されたNVの遺伝子型については、遺伝子量が少なかったため検査不能であった。

NVが検出された食品(事例C、番号7;事例K、番号26;事例M、番号28;事例O、番号42)はいずれも参考品又は同一ロット品として搬入された生食用カキであり、他の食品からは検出されなかった。カキのような二枚貝ではノロウイルスは中腸腺に特異的に集積するため、汚染部位が明確で、かつ、ノロウイルス濃度も高いと考えられる。しかし、二枚貝以外の食品が原因となる場合、ノロウイルスは調理人の手指等を介して食品に付着するものと考えられ、汚染部位の特定が困難であるとともに、ノロウイルス量も比較的少量である可能性が高い。今回供試した蒸し鶏やサラダ等の食品の場合でも、手指に触れた部分を特定して採取し検査に供するのは困難であることや、別の調理人によるものである可能性も否定できないこと等を考慮すると、NVの検出は非常に難しいといえる。しかし、カキを喫食した後に発生した食中毒事件7事例のうち4事例(57.1%)の生食用カキからNVが検出されたことは、これまでの検査法ではNVが検出されていなかったことを考慮すれば、食中毒原因を推定する上で有効な情報となり得るものであり、本開発法の有効性を示すものと考えられた。また実測値10コピー未満で結果としてはNV陰性とされた場合であっても、2ndリアルタイムPCRで陽性となる検体が見られたことについては、今後、そうした少量のNVが検出される事例の収集とノロウイルスの遺伝子型の確定を行い、またそれらの試料と食中毒原因との疫学的関連などのデータを蓄積し、ノロウイルス汚染の陽性判定基準の見直しとそれに伴う開発法によるノロウイルス検査方法の改良提案に向けた検討を進める必要がある。

- 1) 篠原美千代:リアルタイムPCR法で得られた低い値の信頼性について、厚生労働科学研究費補助金 食品・化学物質安全総合研究事業 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 平成14年度総括・分担研究報告書, 56-59

2 二枚貝のノロウイルス汚染調査への適用可能性の検討

2-1) 材料と方法

平成20年度の市場監視係先行調査「市場に流通する二枚貝のノロウイルス等の汚染実態調査」において、市場に流通する生食用カキ等の二枚貝111件を検体とし、通知法および開発法によってNVを検査した。NV陽性の判定基準は、厚生労働省通知のとおり実測値10コピー以上であることとし、陽性と判定された検体については、2ndリアルタイムPCR¹⁾でも陽性となることを確認した。

2-2) 結果および考察

通知法では 111 検体中 1 検体 (0.9%) のみが NV 陽性と判定されたが、開発法ではカキ、シジミおよびホンビノスガイの合計 20 検体 (18.0%) から NV が検出された (表 3)。NV が検出された二枚貝 (冷凍カキを除く) は、ほとんどが 11 月から 2 月に流通していたものであり、また陽性となった二枚貝の採取地は 1 件が国外、その他は国内 7 つの県であった。

表 3 二枚貝のノロウイルス汚染調査結果 (2008 年 5 月～2009 年 2 月)

検査対象二枚貝	検体数	通知法		開発法	
		陽性数	陽性率	陽性数	陽性率
生食用カキ	45	0	0.0%	9	20.0%
加熱調理用カキ	32	0	0.0%	6	18.8%
シジミ	14	1	7.1%	2	14.3%
アサリ	8	0	0.0%	0	0.0%
ハマグリ	7	0	0.0%	0	0.0%
ホンビノスガイ	5	0	0.0%	3	60.0%
合計	111	1	0.9%	20	18.0%

過去に報告された市場流通二枚貝の調査結果^{2, 3)}でもカキやシジミから NV (当時は旧名称である SRSV を使用) が検出されており、今回、開発法によって NV が検出されたことはこれらの報告と同様であり、NV を持つ二枚貝が市場に広く流通していることが再確認された。また、通知法による検査ではこうした状況が十分に把握出来ない可能性があることも示された。通常、ノロウイルスは二枚貝の内臓に蓄積し、二枚貝が実際に食中毒の原因となるかどうかは二枚貝の喫食方法、喫食によって取り込まれるノロウイルス量、喫食した人の健康状態などによって異なると考えられ、本調査の結果が直ちに市場流通二枚貝が危険であることを意味するものではない。しかし、これまで通知法による検査で報告されているよりも広範囲に NV を有する二枚貝が市場に出回っていることが分かったことから、今後さらに調査を継続し、より多くの事例について検査するとともに、これらがノロウイルス食中毒の原因となる可能性についても検討する必要がある。

2) 藤田 満 ほか：貝類におけるウイルス分布実態調査、東京都衛生局学会誌、No. 99、1997年。

3) 東京都食品環境指導センター：広がる SRSV 感染症、くらしの衛生、Vol. 44、8-9、2001年11月。

3 開発法における細菌添加量と添加後の培養時間に関する検討

3-1) 材料と方法

これまで、開発法における細菌添加後の培養時間 (一晚) を 48 時間まで延長した場合や、添加する菌量を変えて一晚培養しても NV 回収率にほとんど変化が見られないことが予備実験で分かっていたので、検査の迅速化の試みとして、培養時間を短縮した場合の NV 回収率について、添加す

る細菌濃度を変化させて比較した。実験用材料としてノロウイルス遺伝子型 GI/4 および遺伝子型 GII/4 を添加したカキ乳剤を用いた。使用する菌 (*K. oxytoca* NBRC 102593) 液の濃度は、 10^9 /mL、 10^7 /mL、 10^5 /mL、 10^3 /mL の 4 とおりを用い、それぞれの菌液 100 μ L をカキ乳剤 8mL に添加した後、35°C で 2 時間、4 時間、6 時間、および一晩 (18 時間) の培養を行った。各濃度の菌液で一晩培養後に得られた NV 回収量の平均値を 100% とし、各培養時間の NV 回収率を菌液の濃度ごとに比較した。

3-2) 結果および考察

培養時間を長くするに従い回収率は向上し、 10^9 /mL の菌液を添加した場合には 4 時間以上の培養でほぼ 100% の回収率が得られた (表 4)。

表 4 添加する菌液濃度と培養時間によるノロウイルス遺伝子回収率の変化

ノロウイルス遺伝子		GI/4				GII/4			
菌液濃度		10^9 /mL	10^7 /mL	10^5 /mL	10^3 /mL	10^9 /mL	10^7 /mL	10^5 /mL	10^3 /mL
培養時間	2時間	9.1%	8.7%	10.0%	8.4%	9.8%	11.7%	10.3%	10.6%
	4時間	105.1%	13.6%	20.5%	17.0%	108.8%	20.7%	26.5%	22.2%
	6時間	96.8%	30.0%	26.6%	33.9%	96.3%	42.5%	34.4%	47.4%
	18時間	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

この結果から、緊急検査の場合など、開発法の検査時間の短縮が必要な場合には、 10^9 /mL の菌液を添加すれば培養時間を 4 時間に短縮し、迅速に結果を得ることが可能であることが示された。

4 当センター以外の機関での開発法実施に関する検討

4-1) 材料と方法

開発法の普遍的な実施の可能性を検討するため、当センター以外の衛生行政関係機関 (以下、外部機関という) で、通知法と開発法によるノロウイルスの添加回収実験を行った。

実験は杉並区衛生試験所、江戸川保健所の協力により実施し、供試食品として冷凍剥き身ガキ、添加回収用ウイルスとしては NV 遺伝子型 GI/4 および GII/4 を含む糞便検体を用いた。開発法に用いる菌液は *K. oxytoca* NBRC 102593 (杉並区衛生試験所) または、*K. oxytoca* ATCC 43086 (江戸川保健所) を普通斜面培地で培養後、PBS(-)を用いて浮遊させたものとした。通知法、開発法とも遠心処理後の操作は、厚生労働省通知に従ったが、杉並区衛生試験所ではウイルスの濃縮を超遠心法により行い、江戸川保健所ではポリエチレングリコールによる濃縮法を用いた。いずれの濃縮法も厚生労働省通知に記載された手法である。実験は実施日を変えて 2 回ずつ行い、2 回の実験での回収率の平均値で評価した。

4-2) 結果および考察

それぞれの機関におけるノロウイルス添加回収実験による回収コピー数と陽性コントロールの回収コピー数を100%とした場合の回収率を表5および表6に示す。

杉並区衛生試験所による結果は、通知法ではGI/4、GII/4それぞれ1.2%および3.0%であったのに対し、開発法ではGI/4、GII/4それぞれ21.6%および27.0%であった(表5)。江戸川保健所による結果は、通知法ではそれぞれ0.1%および0.2%であり、開発法ではそれぞれ4.9%および0.9%であった(表6)。

2機関の通知法による回収率の平均を1とした場合の開発法による2機関の回収率の平均は、GI/4では20.4倍、GII/4では8.7倍となり、当センターでの20年度の結果⁴⁾(GI/8では28倍、GII/13では23.2倍)と同様に、開発法によるノロウイルス回収率が通知法による回収率を上回る結果が得られた。

4) 東京都健康安全研究センター:「ノロウイルス対策緊急タスクフォース」中間報告(第2報)。

表5 杉並区衛生試験所におけるノロウイルス添加回収実験結果

	ノロウイルス遺伝子									
	GI/4					GII/4				
	Ct値1	Ct値2	平均	コピー-数	回収率	Ct値1	Ct値2	平均	コピー-数	回収率
通知法	38.3	38.5	38.4	81	1.2%	38.1	38.5	38.3	204	3.0%
開発法	31.9	34.7	33.3	1,460	21.6%	32.8	35.7	34.3	1,820	27.0%
PC	29.1	32.1	30.6	6,750	100%	30.5	33.3	31.9	6,740	100%

PC:陽性コントロール

表6 江戸川保健所におけるノロウイルス添加回収実験結果

	ノロウイルス遺伝子									
	GI/4					GII/4				
	Ct値1	Ct値2	平均	コピー-数	回収率	Ct値1	Ct値2	平均	コピー-数	回収率
通知法	39.1	39.8	39.5	43	0.1%	41.8	40.4	41.1	44	0.2%
開発法	33.4	33.2	33.3	1,460	4.9%	38.9	38.2	38.6	173	0.9%
PC	27.9	28.1	28.0	29,500	100%	30.0	30.0	30.0	19,000	100%

PC:陽性コントロール

このように、両施設間でNV回収率に差は見られたものの、いずれの機関においても、当センターによる結果と同様、開発法による回収率は通知法を上回っており、外部機関が開発法を適用した場合でも通知法よりも高率にNVが検出され、より高精度の検査法として普遍的に実施が可能であることが示された。なお、機関によって回収率に差が生じた原因としては、それぞれで用いた菌株

やウイルス濃縮法の違いのほか、本法による検査手技等への習熟度の違いなどが考えられた。

5 まとめ

より高精度な食品からのノロウイルス検出法として細菌を利用した検体処理法（開発法）を考案した。これの実用化に向けた検討を行い、以下のような成果を得た。

- 1) 食中毒事件関連食品として搬入され、事件当時の検査ではノロウイルス遺伝子陰性と判定されていた食品 42 検体について開発法による再検査を行った結果、生食用カキ 4 検体からノロウイルス遺伝子を検出した。
- 2) 開発法で市場流通二枚貝 111 検体を検査したところ、通知法よりも多くの検体でノロウイルス遺伝子を検出した。
- 3) 開発法では、 10^9 /mL の菌液を使用した場合、4 時間以上の培養で一晩培養と同程度のノロウイルス遺伝子回収率に達することが分かった。
- 4) 開発法は、東京都健康安全研究センター以外の機関でも通知法に比べて高いノロウイルス遺伝子回収率を得たことから、外部機関でも広く実施可能であることを確認した。