

## 新規塩素系消毒剤「亜塩素酸水」のヒトノロウイルスに対する不活化作用

### 要旨

ヒトノロウイルス (HuNoV) は感染性胃腸炎の原因として最も頻度が高い。本ウイルスはアルコールに耐性を示すため、その不活化には塩素系消毒剤が使用される。近年、本邦において亜塩素酸水が第2類医薬品として承認されている。本研究では亜塩素酸水製剤の HuNoV に対する不活化効果を検証した。HuNoV として genogroup GII.2 および GII.4 を用いた。これら HuNoV 株を亜塩素酸水もしくは次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (NaClO) に暴露し、反応液を RNase で処理した後に定量的 PCR 法により残存 RNA を定量した。また、ウシ血清アルブミン (BSA)、ヒツジ赤血球 (SRBC)、ポリペプトンまたは肉エキスなどの有機物負荷条件下での亜塩素酸水の HuNoV に対する不活化効果も検証した。非有機物負荷条件下では、遊離塩素 200 ppm の亜塩素酸水は 5 分以内に HuNoV RNA のコピー数を  $3.0 \log_{10}$  以上減少させた。0.3% BSA と 0.3% SRBC または 0.5% ポリペプトンという有機物高負荷条件下においても 60 分以内に HuNoV RNA のコピー数を  $3.0 \log_{10}$  以上減少させた。一方、有機物負荷条件下での 1,000 ppm NaClO の HuNoV GII.4 に対する不活化効果は弱く、0.5% のポリペプトン負荷条件下では、60 分間の処理でも HuNoV RNA のコピー数を  $1.0 \log_{10}$  以上減少させることはできなかった。亜塩素酸水はシステイン、ヒスチジンおよびグルタチオンなどの特定のアミノ酸に反応するのに対し、NaClO は試験したすべてのアミノ酸と反応した。この亜塩素酸水の有機物に対する選択的な反応性有機物高負荷条件下でのウイルス不活化効果の維持に寄与していると考えられた。以上の結果は、亜塩素酸水が有機物汚染度の高い環境下でも微生物不活化作用を発揮できる消毒剤であることを示している。

### 緒言

ヒトノロウイルス (HuNoV) は世界各国において、ウイルス性食中毒の主要な原因ウイルスである<sup>1)</sup>。日本ではノロウイルス食中毒の患者は毎年約 1 万人程度報告されている<sup>2)</sup>。ウイルスに汚染された食品の摂取、ウイルス保有者やその排泄物で汚染された環境表面を介した接触が HuNoV の主要な伝播経路である。HuNoV はその高い伝染性のため、病院や介護施設においてしばしば集団感染を起こす。HuNoV は 100 個程度という極めて少ないウイルス量で感染が成立するとされているが<sup>3)</sup>、ノロウイルス感染性胃腸炎患者の便 1 g 中には、少なくとも  $10^8$  個以上という大量のウイルス粒子が含まれる<sup>4)</sup>。したがって、HuNoV による感染性胃腸炎の集団発生を防止するには、適切な石鹸による手洗いとともに、患者の排泄物で汚染された環境表面の厳重な消毒が重要である<sup>5)</sup>。HuNoV は非エンベロープウイルスであり、多くの消毒薬に抵抗性を示す。そのため、消毒剤の適切な選択とともに患者の排泄物の的確な処理が感染制御に必須である。2011 年に米国 Center for Disease Control (CDC) より発表された HuNoV の集団感染防

止に関するガイドラインでは、HuNoVの不活化には1,000～5,000 ppmの次亜塩素酸ナトリウム水溶液(NaClO)が推奨されている<sup>6)</sup>。しかしながら、NaClOに代表される塩素系消毒剤は有機物との接触によりその抗微生物活性が減弱することが知られており<sup>7,8)</sup>、吐物や糞便中のHuNoVは不活化が不十分となるリスクがある。したがって、有機物高負荷条件化においてもHuNoVに対する不活化効果が減弱しにくい消毒薬の開発が期待されている。

2019年に新規塩素系消毒剤である亜塩素酸水が第2類医薬品として本邦で承認された。遊離塩素200 ppmの亜塩素酸水はHuNoVの代替ウイルスであるネコカリシウイルスの感染価をタンパク質負荷条件下であっても4.0 log<sub>10</sub>以上減少させることが報告されている<sup>9)</sup>。この不活化効果は、1,000 ppmのNaClOよりも高いことから、亜塩素酸水はヒト排泄物中のHuNoVを効率的に不活化することが期待されている。HuNoVは未だ培養細胞での感染系が利用できないため、本ウイルスに対する消毒剤の有効性は代替ウイルスであるネコカリシウイルスやマウスノロウイルスを用いて評価されている。しかしながら、これらウイルスの消毒剤感受性は異なることが知られており、例えば、マウスノロウイルスはネコカリシウイルスよりもアルコール消毒薬に対する感受性が高いことが報告されている<sup>10)</sup>。したがって、HuNoVに対する消毒剤の不活化効果を真に評価するためには、臨床検体中のHuNoVを用いたアッセイが必要である。

本研究では、ノロウイルス感染性胃腸炎患者の下痢便から分離した2種類のHuNoV(genogroup GII.2 および GII.4)を用い、亜塩素酸水の本ウイルスに対する不活化効果を検証した。

## 材料と方法

### 【実験材料】

2名のノロウイルス感染性胃腸炎の患者より、インフォームドコンセントを得た上で、便検体の提供を受けた。リン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH7.4)で10% (w/v)の便懸濁液を調整した。便懸濁液中の大きな残渣を遠心(6,000 g、10分、4°C)により除去し、上清を新しいチューブに回収した。この上清にポリエチレングリコール(分子量6,000)と塩化ナトリウムをそれぞれ8.0%と2.1%になるよう添加し、溶解させた。この溶液を4°Cで24時間静置した後、遠心した(8,000 g、20分、4°C)。沈殿をPBSで2回洗浄し、余分なPBSを濾紙で除去した後、滅菌蒸留水に溶解した。この溶液をHuNoV検体として分注し、試験の供するまで-70°Cで保存した。

### 【HuNoVの遺伝子型分類】

本研究で用いたHuNoVの遺伝子型別分類は以下のように行った。HuNoV検体からウイルスゲノムRNAをQIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen社)で抽出し、PrimeScript® RT reagent kit (タカラバイオ社)を用いてcDNAを合成した。逆転写反応は6塩基のラン

ダムプライマーを用いて最終容量 20  $\mu$ l の反応液中で 37°C、15 分間行った。逆転写反応は 85°C、5 秒の加熱で停止させた。この cDNA を鋳型として、HuNoV のウイルスゲノム上の ORF1 と ORF2 を跨ぐ遺伝子領域を PCR 増幅した。増幅に使用したプライマーの塩基配列を以下に示す。

G2-SKF : 5'-CNTGGGAGGGCGATCGCAA-3')

G2-SKR : 5'-CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT-3'

PCR 増幅産物を QIAquick PCR purification kit (キアゲン社)を用いて精製した後、その塩基配列をプライマー G2-SKF または G2-SKR を用いてサンガー法により決定した。得られた塩基配列の相同性検索を行い、最も相同性の高いノロウイルス遺伝子にもとづき遺伝子グループを決定した。

#### 【消毒剤】

本研究に使用した消毒剤は亜塩素酸水(含量 亜塩素酸( $\text{HClO}_2=68.46$ )として 8,000 ppm、三慶株式会社)、次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (NaClO、有効塩素濃度 60,000 ppm、オーヤラックス株式会社)、複合型塩素系除菌剤 (RST、キョーリン製薬株式会社)、80% エタノール (健栄製薬) および 0.1%塩化ベンザルコニウム (昭和製薬) である。

#### 【ノロウイルス粒子溶解性試験】

各種消毒剤のノロウイルス粒子に対する溶解性を Nowak らの報告<sup>11)</sup>に従い、RNA 分解酵素処理 (ウイルス粒子の溶解に伴って遊離するウイルス RNA を全て分解するため) と逆転写反応定量 PCR 法 (RT-qPCR) を組合せた手法により評価した。HuNoV 試験液 100  $\mu$ l を消毒剤 900  $\mu$ l と混合し、25°C で指定時間攪拌しながら反応させた。反応液中の HuNoV は RNA のコピー数が  $10^7/\text{ml}$  のオーダーになるように設定した。有機物負荷条件下の試験では、ウシ血清アルブミン (BSA、シグマ社)、ポリペプトン (日本製薬株式会社)、肉エキス (ナカライテスク) またはヒツジ赤血球 (SRBC、日本バイオシーラム) を終濃度が 0.3%または 0.5%になるように添加した。一定時間の後、反応液 100  $\mu$ l を 900  $\mu$ l Difco D/E neutralizing broth (ベクトンディッキンソン社) と混和し、消毒剤の作用を中和した。中和後の反応液に 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるよう DNase フリーの RNA 分解酵素 (RNase, 日本ジーン株式会社) を添加し、25°C で 30 分間静置した。その後、140  $\mu$ l の反応液を採取し、QIA viral RNA extraction kit (キアゲン社) を用いてウイルスゲノム RNA を抽出した。反応液中の HuNoV ゲノム RNA のコピー数は、Norovirus GI/GII kit (タカラバイオ) と Thermal Cycle Dice Real Time System III (TP970, タカラバイオ) と用いた定量的 PCR (qPCR) 法により測定した。

### 【遊離塩素濃度の測定】

塩素系消毒剤の遊離塩素濃度はテトラメチルベンジジン法<sup>12)</sup>を用いて測定した。0.01%の3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) を50%アセトンで溶解し、比色指示薬として使用した。1.6 Mのリン酸バッファー (pH6.5) は、それぞれ1.6 Mのリン酸二水素カリウムとリン酸水素二カリウムを混合して調整した。消毒剤9.5 mlを0.5 mlのリン酸バッファー (pH6.5) で緩衝し、1.0 mlのTMBを添加して攪拌した後、直ちに655 nmの吸光度を測定した。NaClOを用いて作成した標準曲線にもとづき、吸光度から試験液の遊離塩素濃度を算出した。

### 【統計解析】

データは独立した3回の実験により得られた測定値の平均±標準偏差で示した。2群間の測定値の平均の差はStudent's t-testで検証し、他群間の比較は一元配置分散分析で評価した後、Tukey's post-hoc testもしくはDunnnett's testにより検定した。有意水準を0.05として統計学判定を行った。

## 結果

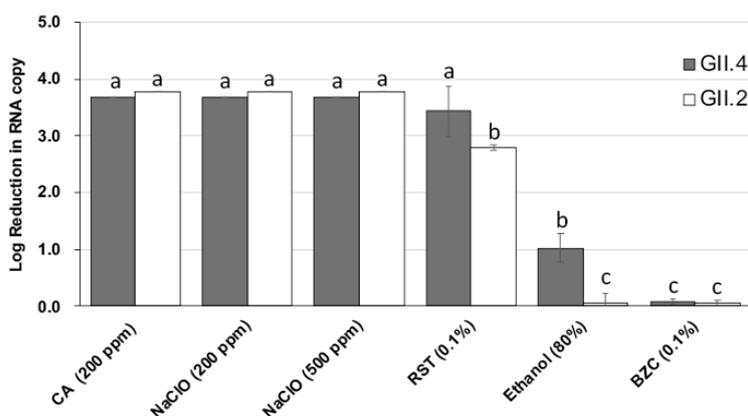
### 第1節 本研究に用いたHuNoVの遺伝子グルーピング

ノロウイルスによる感染性胃腸炎と診断された患者2名より提供を受けた便検体からウイルスゲノムRNAを抽出し、プライマーG2-SKFとG2-SKRを用いてRT-PCRを行った。このPCR産物のシークエンスを行い、344 bpの塩基配列情報を得た。NCBIデータベースでの相同性検索およびNorovirus Typing Tool ver.2.013)を用いた解析により、本研究で用いたHuNoVの一つは、Hu/SP/GII.4 Valencia[P31]/3935と最も高い相同性(99.71%)を示し、GII.4遺伝子グループのサブクラスターSydney\_2012に属するウイルスであると判定された。もう一方のHuNoVはGII.2遺伝子グループのNoV/0170FB/17/TZに最も高い相同性(99.12%)を示した。以上結果より、本研究で用いるHuNoVはGII.4とGII.2の2つの異なる遺伝子グループに属するウイルス株である。

### 第2節 亜塩素酸水のHuNoV粒子に対する溶解作用

まず始めに日本国内の医療施設や福祉施設で環境消毒のために使用されている代表的な薬剤について、非有機物負荷条件下でHuNoV粒子に対する影響を調べた(Fig. 1)。塩素系消毒薬である亜塩素酸水(遊離塩素濃度200 ppm)とNaClO(遊離塩素濃度200 ppmおよび500 ppm)は、30分以内にHuNoV GII.2およびGII.4のウイルスゲノムRNAコピー数を3 log<sub>10</sub>以上減少させた。亜塩素酸水やNaClOと比べて効果は劣るものの、界面活性剤を含有する複合型塩素系除菌剤RSTはHuNoV GII.2およびGII.4のウイルスゲノムRNAコピー数をそれぞれ2.80 ± 0.07および3.43 ± 0.47 log<sub>10</sub>減少させた。一方、80%エタノールおよび0.1%塩化ベンザルコニウムでのGII.2株に対する減少数はそれ

ぞれ  $0.05 \pm 0.21$  および  $0.05 \pm 0.10 \log_{10}$  であり、GII.4 株に対する減少数はそれぞれ  $1.02 \pm 0.33$  および  $0.09 \pm 0.03 \log_{10}$  であった。これらの結果から、以下の検討については亜塩素酸水と NaClO のみを用いた。

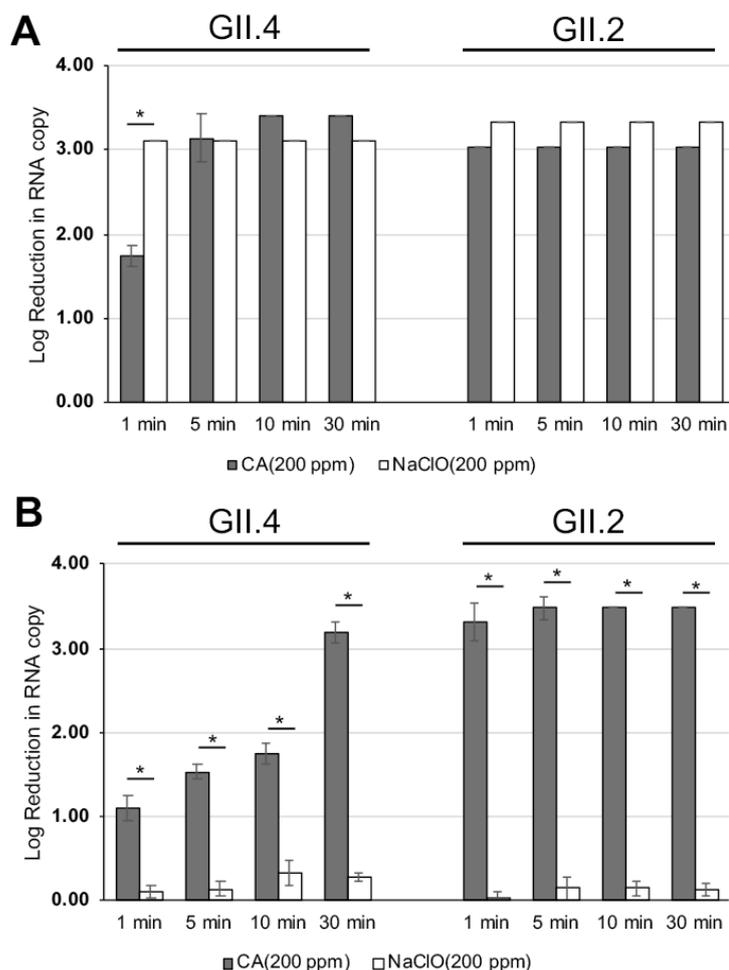


**Figure 1. Effects of the selected disinfectants on HuNoV RNA copy number reduction.** HuNoVs of the GII.4 and GII.2 genogroups were exposed to the indicated concentrations of the respective disinfectant for 30 min. After neutralization and RNase treatment, intact HuNoV particles were quantified by RT-qPCR. The data are shown as mean  $\pm$  SD of the  $\log_{10}$  reduction in HuNoV RNA copy number. Statistical analysis was performed in each genogroup. Columns marked with different letters indicate significant differences ( $p < 0.01$ ).

### 第3節 0.3%ウシ血清アルブミン (BSA) 存在下での亜塩素酸水の HuNoV 粒子に対する溶解作用

遊離塩素濃度が 200 ppm の亜塩素酸水もしくは NaClO が HuNoV のウイルスゲノム RNA コピー数を  $3 \log_{10}$  以上減少させるのに要する時間を検討した。非有機物負荷条件下では、200 ppm の亜塩素酸水は HuNoV GII.2 および GII.4 のウイルスゲノム RNA コピー数をそれぞれ 5 分および 1 分以内に  $3 \log_{10}$  以上減少させた (Fig. 2A)。一方、200 ppm の NaClO では、HuNoV GII.2 および GII.4 のウイルスゲノム RNA コピー数を 1 分以内に  $3 \log_{10}$  以上減少させた。0.3% BSA 存在下では、亜塩素酸水が HuNoV GII.4 株のウイルスゲノム RNA コピー数を  $3 \log_{10}$  以上減少させるのに必要な時間は 30 分であった (Fig. 2B)。注目すべきは、亜塩素酸水の HuNoV GII.4 株に対するウイルス粒子溶解作用が 0.3% BSA 存在下においても時間依存的に増加している点である。この所見は亜塩素酸水が有機物存在下においても長時間ウイルス不活化作用を維持していることを示唆する。本研究で用いた GII.2 株は亜塩素酸水に高い感受性を示し、0.3% BSA 存在下においても 200 ppm の亜塩素酸水による処理で 1 分以内に 99.9% 以上のウイルス粒子が損傷を受けた。一方、200 ppm の NaClO については、0.3% BSA 存在下では GII.2 および GII.4 株ともに 30 分間の処理でも 90% 以上のウイルス粒子が損傷を受けず残存し

た。

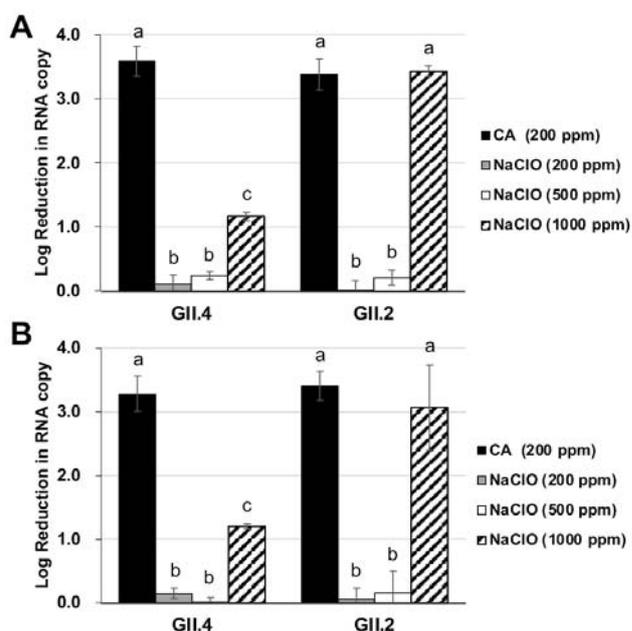


**Figure 2. Log<sub>10</sub> reduction of HuNoV RNA copy number after treatment with CA and NaClO in the absence (A) or presence of 0.3% BSA (B).** HuNoV GII.4 and GII.2 were treated with CA or NaClO with the free-chlorine level adjusted to 200 ppm, for the indicated times. After neutralization and RNase treatment, intact HuNoV particles were quantified by RT-qPCR. The data are shown as mean ± SD of the log<sub>10</sub> reduction in HuNoV RNA copy number. Significant differences ( $p < 0.01$ ) between CA and NaClO are indicated by asterisks (\*).

#### 第4節 BSA 以外の有機物存在下での亜塩素酸水の HuNoV 粒子に対する溶解作用

ヒト排泄物を模擬するため、ポリペプトンや肉エキスがそれぞれ嘔吐物や糞便の代替物として消毒剤のウイルス不活化試験に用いられている<sup>14)</sup>。遊離塩素濃度 200 ppm の亜塩素酸水は、それぞれ 0.3% のポリペプトンもしくは肉エキス存在下でも、HuNoV GII.2 および GII.4 のウイルスゲノム RNA コピー数を 30 分以内に 3 log<sub>10</sub> 以上減少させた (Fig. 3)。一方、遊離塩素濃度 200 ppm および 500 ppm の NaClO では、これらの有機物が存在すると 30 分間の処理でも 90% 以上のウイルス粒子が損傷を受けず残存した。CDC ガ

イドライン<sup>6)</sup>で推奨されているように、1,000 ppm の NaClO はこれら有機物存在下においても GII.2 株に対しては効果的にウイルス粒子を溶解させたが、GII.4 株に対する効果は限定的であった



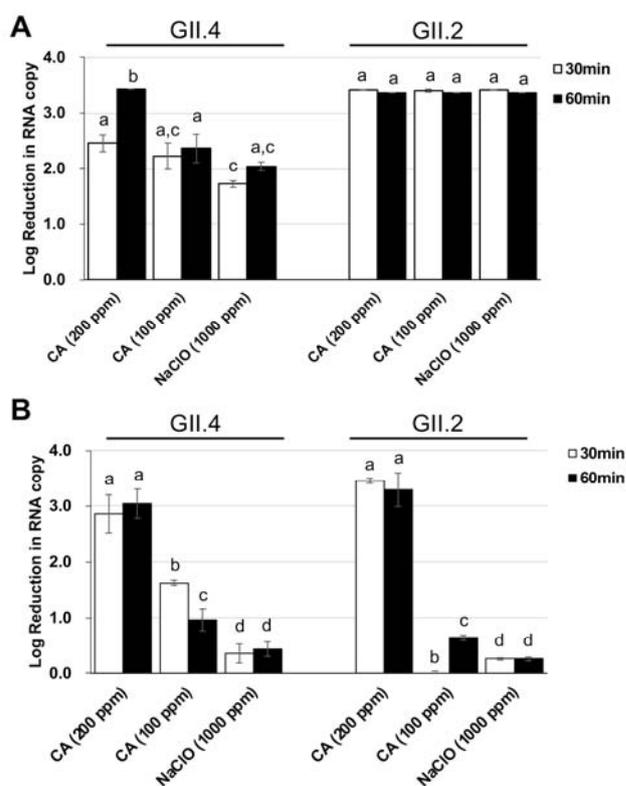
**Figure 3. Log<sub>10</sub> reduction of HuNoV RNA copy number after treatment with CA and NaClO in the presence of 0.3% polypeptone (A) or 0.3% meat extract (B).** HuNoV GII.4 and GII.2 were treated with CA (200 ppm) or NaClO (200 ppm, 500 ppm or 1,000 ppm) for 30 min. After neutralization and RNase treatment, intact HuNoV particles were quantified by RT-qPCR. The data are shown as mean  $\pm$  SD of the log<sub>10</sub> reduction in HuNoV RNA copy number. Columns marked with different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

#### 第5節 高度汚染環境を模擬した条件下における亜塩素酸水の HuNoV に対する作用

日本環境感染学会より出版されている環境消毒薬の評価指針<sup>15)</sup>では、高度汚染環境を模擬した条件として 0.3% BSA と 0.3%ヒツジ赤血球が存在する実験系が推奨されている。一方、食品衛生協会での指針<sup>14)</sup>では、ヒト排泄物中でのウイルス不活化効果は 0.5% ポリペプトン存在下で評価するべきであるとの指針が示されている。これらの指針に従い、高度汚染環境を模擬した条件下における亜塩素酸水の HuNoV に対する作用を検証した。

遊離塩素濃度 200 ppm の亜塩素酸水は、0.3% BSA と 0.3%ヒツジ赤血球存在下または 0.5% ポリペプトン存在下のいずれでも HuNoV GII.2 および GII.4 のウイルスゲノム RNA コピー数を 60 分以内に 3 log<sub>10</sub> 以上減少させた (Fig. 4) この効果は 1,000 ppm の NaClO よりも優れていた。しかしながら、HuNoV GII.4 については、遊離塩素濃度 200

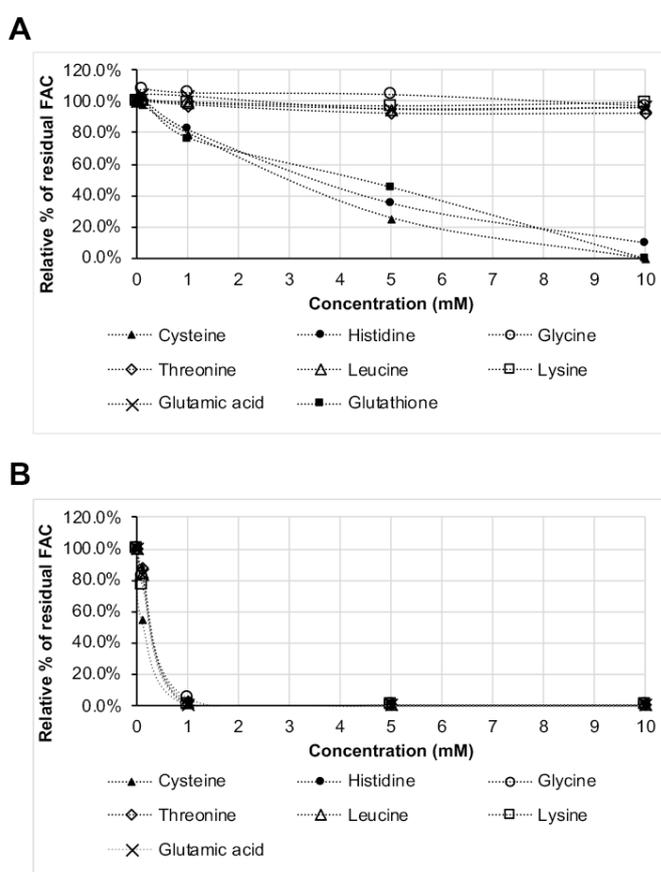
ppm の亜塩素酸水を用いた場合でもウイルスゲノム RNA コピー数を  $3 \log_{10}$  以上減少させるには 30 分以上の作用時間が必要であった。0.3% BSA と 0.3% ヒツジ赤血球存在下で亜塩素酸水の遊離塩素濃度を 100 ppm に減少させた場合、HuNoV GII.2 のウイルスゲノム RNA コピー数は 30 分以内に  $3 \log_{10}$  以上減少した。一方、GII.4 株のウイルスゲノム RNA コピー数の減少は 60 分間の作用でも  $2.37 \pm 0.29 \log_{10}$  にとどまり、1,000 ppm の NaClO と同等の効果であった (Fig. 4A)。遊離塩素濃度 100 ppm の亜塩素酸水を 0.5% ポリペプトン存在下で作用させた場合は、60 分間接触後のウイルスゲノム RNA コピーの減少数は GII.2 および GII.4 株でそれぞれ  $0.64 \pm 0.02$  および  $0.96 \pm 0.20$  と限定的であったが、その効果は 1,000 ppm の NaClO よりも優れていた (Fig. 4B)。これらの結果から、亜塩素酸水の HuNoV に対する不活化作用は有機物存在下においても比較的安定しており、NaClO よりも優れた効果を有することが示唆される。



**Figure 4. Log<sub>10</sub> reduction of HuNoV RNA copy after treatment with CA and NaClO in the presence of 0.3% BSA plus 0.3% SRBC (A) or 0.5% polypeptone (B).** HuNoV GII.4 and GII.2 were treated with CA (200 ppm or 100 ppm) or NaClO (1,000 ppm) for indicated time. After neutralization and RNase treatment, intact HuNoV particles were quantified by RT-qPCR. The data are shown as means  $\pm$  SD of the log<sub>10</sub> reduction in HuNoV RNA copy. Columns marked with different letters indicate significant differences ( $p < 0.01$ ).

#### 第6節 亜塩素酸水のアミノ酸に対する反応性

遊離塩素濃度 100 ppm の亜塩素酸水および NaClO を各種アミノ酸またはグルタチオンと 10 分間接触させ、残存する遊離塩素を TMB 法により測定した。亜塩素酸水については、システイン、ヒスチジンおよびグルタチオンとの接触により遊離塩素濃度は減少したが、グリシン、スレオニン、ロイシン、リジンやグルタミン酸などとの接触では遊離塩素の減少は認めなかった (Table 1 および Fig. 5)。NaClO では試験したすべてのアミノ酸との接触により、残存遊離塩素が速やかに検出限界以下にまで減少した。この結果は、NaClO は非特異的にすべてのアミノ酸と反応するが、亜塩素酸水は特定のアミノ酸と選択的に反応することを示唆する。



**Figure 5. Effect of amino acids on the free available chlorine level of CA and NaClO.** Amino acids were added to the indicated concentrations with 100 ppm each of CA (A) or NaClO (B). After 10-min incubation, the residual free available chlorine level was measured by the TMB method [12]. The data are expressed as means of percentages of the initial free available chlorine level from three independent repeats. Refer to Table S1 for the data with statistical analysis, which includes the results from 15 kinds of amino acids tested.

**Table S1. Residual free chlorine levels of CA and NaClO after contact with amino acids <sup>a)</sup>**

Amino acids	100 ppm CA				100 ppm NaClO			
	Amino acids concentration (mM)				Amino acids concentration (mM)			
	0.1	1	5	10	0.1	1	5	10
Cys	97.80±2.98%	79.65±6.89%	25.92±7.97%*	0.14±0.14%*	54.18±12.05%*	0.00±0.00%*	0.00±0.00%*	0.01±0.01%*
Ala	105.37±4.80%	105.41±5.67%	106.36±4.17%	101.97±0.87%	72.21±11.64%	0.27±0.24%*	0.07±0.05%*	0.07±0.09%*
Gln	98.94±4.43%	96.14±5.01%	96.85±5.10%	80.55±18.93%	81.48±4.45%*	0.75±0.82%*	0.05±0.06%*	0.05±0.06%*
His	101.92±4.14%	82.21±2.82%*	35.40±5.42%*	10.17±6.95%*	87.61±3.77%*	0.57±0.72%*	0.01±0.01%*	0.01±0.02%*
Gly	107.85±4.99%	105.70±7.67%	104.57±6.57%	97.27±11.17%	81.42±3.17%*	4.79±2.82%*	0.14±0.04%*	0.03±0.03%*
Ile	104.45±3.00%	103.64±3.52%	102.33±3.79%	94.24±5.94%	63.42±17.36%*	2.51±2.12%*	0.10±0.00%*	0.07±0.01%*
Ser	108.23±3.56%	105.90±1.29%	99.10±1.45%	96.15±3.07%	81.68±1.68%*	0.50±0.15%*	0.20±0.01%*	0.16±0.03%*
Thr	99.89±2.77%	97.61±3.80%	92.20±0.45%	92.18±5.73%	87.08±0.80%*	2.09±1.15%*	0.16±0.01%*	0.10±0.02%*
Pro	104.15±2.88%	105.06±2.68%	97.11±2.79%	89.92±4.57%	75.61±4.35%*	0.00±0.01%*	0.00±0.00%*	0.00±0.00%*
Arg	99.75±5.56%	103.66±3.09%	97.41±5.17%	93.93±4.12%	66.93±1.97%*	0.09±0.01%*	0.10±0.03%*	0.08±0.06%*
Leu	101.18±4.77%	98.76±5.95%	95.12±10.79%	95.93±10.60%	84.15±1.07%*	0.84±0.24%*	0.10±0.03%*	0.09±0.04%*
Met	96.67±2.39%	93.04±2.28%	93.30±2.81%	92.85±2.37%	69.20±1.23%*	0.02±0.03%*	0.02±0.03%*	0.03±0.02%*
Asn	100.64±1.14%	95.52±3.29%	92.69±2.41%	89.20±1.81%**	81.45±1.11%*	0.08±0.06%*	0.08±0.04%*	0.10±0.07%*
Lys	100.06±2.29%	99.26±4.07%	96.76±2.33%	99.03±7.93%	76.41±1.03%*	0.06±0.01%*	0.04±0.01%*	0.02±0.01%*
Glu	104.88±6.22%	103.95±5.69%	95.38±1.75%	96.57±2.95%	83.47±2.29%*	0.24±0.02%*	0.58±0.02%*	0.53±0.09%*

Residual free chlorine levels of 100 ppm each of CA and NaClO were measured by TMB method after 10-min contact with indicated concentration of 15 amino acids. Amino acids with high water solubility were tested. The relative percentages to initial free chlorine levels are shown. Marks (\* and \*\*) indicate significant differences from initial free chlorine level at *p*-values less than 0.01 and 0.05, respectively.

## 考察

亜塩素酸水は新規塩素系消毒薬であり、本邦において第2類医薬品として承認されている。これまでに、亜塩素酸水はNaClOと同等のウイルス不活化効果や殺芽胞能を有することが報告されている<sup>9,16</sup>。NaClOは速効性の消毒剤であり、ヒトノロウイルスを含む非エンベロープウイルスの除染に推奨されている<sup>5</sup>。しかしながら、その反応性の高さゆえに、NaClOは有機物との接触により急激に遊離塩素濃度が低下することも知られている<sup>8,17</sup>。

我々はこれまでに、亜塩素酸水が有機物存在下でも遊離塩素濃度を比較的安定に維持し、0.3% BSA 負荷条件下においても効率的にヒトノロウイルスの代替ウイルスであるネコカリシウイルスを不活化することを報告してきた<sup>9,12,16</sup>。それゆえ、亜塩素酸水はヒトノロウイルス感染患者の便や吐物で汚染された環境表面の消毒に適していると考えている。しかしながら、ヒトノロウイルスの代替ウイルスとして消毒剤の効果検証に用いられるネコカリシウイルス、マウスノロウイルスやチュランウイルスの消毒剤感受性はそれぞれ異なり、ヒトノロウイルスの感受性との間にも差があると考えられている<sup>10,18</sup>。したがって本研究では、急性胃腸炎患者の便より分離したGII.2およびGII.4の遺伝子グループの属するヒトノロウイルスを用い、亜塩素酸水の本ウイルスに対する不活化効果を検証した。ヒトノロウイルスについては未だ培養細胞を用いた感染実験系が利用できないため、本研究ではNowakらの報告<sup>11</sup>)に従い、RNase処理とRT-qPCR法を組合わせた手法により亜塩素酸水のヒトノロウイルスに対する不活化効果を調べた。本手法は損傷ウイルス粒子より遊離したウイルスゲノムRNAを完全に除去することにより、正常なウイルス粒子数を算出するものである。

検証の結果、有機物負荷の無い条件下において、遊離塩素濃度200 ppmの亜塩素酸水はヒトノロウイルスのGII.2およびGII.4株を5分以内に3 log<sub>10</sub>以上減少させた(**Fig. 2A**)。それぞれ0.3%のBSA、ポリペプトンもしくは肉エキスを添加した条件でも、遊離塩素濃度200 ppmの亜塩素酸水はヒトノロウイルスのGII.2およびGII.4株を30分以内に3 log<sub>10</sub>以上減少させた。一方、200 ppmまたは500 ppmのNaClOを用いて同様の検討を行った結果、有機物存在下では90%以上のウイルス粒子が残存した。GII.4株については、これら条件下で1,000 ppmのNaClOで1時間処理してもウイルスゲノムRNAコピー数の減少は1.20 log<sub>10</sub>程度にとどまった(**Fig. 2B**および**Fig. 3**)。確かに亜塩素酸水は有機物存在下ではNaClOよりもヒトノロウイルスに対する不活化効果に優れているが、**Figure 4**で示したように有機物高負荷条件下では遊離塩素濃度200 ppmの亜塩素酸水でもウイルスゲノムRNAコピー数を検出限界以下にまで減少させるには30分以上の処理が必要である。したがって、亜塩素酸水を吐物中や便中のヒトノロウイルスの不活化を

目的に使用するべきではなく、臨床現場においては吐物や便を標準的な感染対策マニュアルに従って速やかに除去した後の環境表面に適用すべきである。興味深い事に、亜塩素酸水と NaClO のヒトノロウイルス不活化作用に対する影響は有機物の種類により差が認められ、亜塩素酸水は BSA による阻害を受けやすく、NaClO はポリペプトンや肉エキスの阻害をより受けやすい傾向がある。これらの所見は、亜塩素酸水と NaClO の有機物に対する反応機構に違いがあることを示唆している。

亜塩素酸水の抗微生物作用が有機物によって阻害を受けにくい理由を解明するため、亜塩素酸水と NaClO をそれぞれ 0.1 mM から 10 mM に調整した各種アミノ酸と混合し、遊離塩素濃度の変動を調べた。その結果、NaClO がすべてのアミノ酸と反応して遊離塩素濃度が速やかに低下するのに比べ、亜塩素酸水はシステイン、ヒスチジンおよびグルタチオンと混合した場合にのみ遊離塩素濃度の減少が認められた。亜塩素酸水は選択的な有機物との反応性を示し、この性質が NaClO と比較し、亜塩素酸水が有機物負荷条件下でも比較的安定して抗微生物作用を発揮できる一因であると考えられる。

Hatanaka らは、亜塩素酸水は 0.5% BSA 存在下でも *Campylobacter jejuni* を効率的に殺滅することを報告している<sup>19)</sup>。この論文では、亜塩素酸水が *C. jejuni* のゲノム DNA に対して影響を与えず、外膜タンパク質の凝集作用を示したことから、その殺菌機構は生存に必須なタンパク質群の変性作用であると結論している。本論文にはデータを掲載していないが、200 ppm の亜塩素酸水による処理後に RNase 処理を行わなかった場合、残存するヒトノロウイルスゲノム RNA のコピー数は、RNase 処理を行った場合に比べて約 1.8 log<sub>10</sub> 高くなる。これらのことから、亜塩素酸水はヒトノロウイルスのゲノム RNA を分解するのではなく、ウイルスカプシドタンパク質の特定のアミノ酸に対して反応することによりウイルス粒子に損傷を与えるものと推定される。我々は最近、酸性化亜塩素酸ナトリウム溶液 (ASC) の酸化作用を担う主たる活性酸素種として塩素過酸化ラジカル (ClOO•) を同定した<sup>20)</sup>。このラジカルは全く新規の活性酸素種であり、極めて長寿命のラジカルである。亜塩素酸水は ASC を弱酸性領域で安定化した新規薬剤であることから、本薬剤においても塩素過酸化ラジカルが抗微生物作用に主要な役割を担っていると考えられ、今後検討を進める予定である。

Rachmadi らはマウスノロウイルスが塩素への頻回暴露により、耐性を獲得することを報告している<sup>21)</sup>。この塩素への感受性の低下はマイナーカプシドタンパク質 (VP2) をコードする遺伝子の 7,280 番目の塩基置換によるアミノ酸変異と関連している。したがって、塩素系消毒剤のヒトノロウイルスに対する不活化作用はウイルスゲノム破壊ではなく、カプシドタンパク質に対する変性作用に由来するのではないかと考えている。

本研究では亜塩素酸水のヒトノロウイルスに対する不活化作用を、RNase 処理後に残存したウイルスゲノム RNA を RT-qPCR で定量する方法により評価した。この手法では正常なウイルス粒子と薬剤により損傷を受けたウイルス粒子を区別して定量することが可能である。ヒトノロウイルスの培養細胞を用いた感染実験系が確立されていないため、現時点では RT-qPCR 法が本ウイルス数を定量する標準的な方法である。しかしながら、試験薬剤による処理後に RT-qPCR 法により定量したヒトノロウイルスのゲノム RNA のコピー数の減少数と感染価の減少値は相関しないとの報告もある<sup>22)</sup>。この Costantini らの論文では、50 ppm の遊離塩素によってヒトノロウイルスの感染性は完全に消失したが、RNase 処理を行わない RT-qPCR 法では相当量のウイルスゲノム RNA が検出されている。このことは、RT-qPCR 法によるゲノム RNA のコピー数定量では、消毒剤のヒトノロウイルスに対する不活化能力を過小評価している可能性を示唆している。近年、ヒト腸管オルガノイドを用いたヒトノロウイルスの試験管内感染実験系が開発され<sup>23)</sup>、いくつかの消毒剤のヒトノロウイルスに対する効果検証に応用されている<sup>22,24)</sup>。このヒト腸管オルガノイドを用いた実験系は未だ一般的ではなく消毒剤の評価法として標準化されてはいないが、亜塩素酸水のヒトノロウイルス不活化メカニズムを明らかにするための有効な手段であり、今後、本手法を用いた検討を予定している。

以上、亜塩素酸水は有機物存在下においてもヒトノロウイルスを効率的に不活化できる。この安定性は微生物構成成分に対する選択的な反応性に起因すると考えられる。亜塩素酸水のこのような選択性は、ヒト排泄物で汚染された環境の消毒に有利であるだけでなく、塩素による遺伝毒性を低減する。今後、亜塩素酸水が医療現場や福祉施設での感染対策に貢献することが期待できる。

## 引用文献

- [1] Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinje J and Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1224-31. <https://doi.org/10.3201/eid1408.071114>
  
- [2] Yoshikura H. Declining *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella*, increasing *Campylobacter* and persisting norovirus food poisonings: Inference derived from food poisoning statistics of Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2020;73:102-10. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2019.247>
  
- [3] Caul EO. Small round structured viruses: Airborne transmission and hospital control. *Lancet.* 1994;343:1240-2. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(94\)92146-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(94)92146-6)

- [4] Teunis PF, Sukhrie FH, Vennema H, Bogerman J, Beersma MF and Koopmans MP. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. *Epidemiol Infect.* 2015;143:1710-7. <https://doi.org/10.1017/S095026881400274X>
- [5] MacCannell T, Umscheid CA, Agarwal RK, Lee I, Kuntz G, Stevenson KB and Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee H. Guideline for the prevention and control of norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011;32:939-69. <https://doi.org/10.1086/662025>
- [6] Center for Disease Control and Prevention. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports.* 2011; 60, <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6003.pdf>; 2011 [Accessed 27 July 2021.]
- [7] Coates D. Comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate disinfectants: Neutralization by serum. *J Hosp Infect.* 1988;11:60-7. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(88\)90040-0](https://doi.org/10.1016/0195-6701(88)90040-0)
- [8] Chitnis V, Chitnis S, Patil S and Chitnis D. Practical limitations of disinfection of body fluid spills with 10,000 ppm sodium hypochlorite (NaOCl). *Am J Infect Control.* 2004;32:306-8. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2003.10.007>
- [9] Goda H, Yamaoka H, Nakayama-Imaohji H, Kawata H, Horiuchi I, Fujita Y, Nagao T, Tada A, Terada A and Kuwahara T. Microbicidal effects of weakly acidified chlorous acid water against feline calicivirus and *Clostridium difficile* spores under protein-rich conditions. *PLoS One.* 2017;12:e0176718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176718>
- [10] Cromeans T, Park GW, Costantini V, Lee D, Wang Q, Farkas T, Lee A and Vinje J. Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80:5743-51. <https://doi.org/10.1128/AEM.01532-14>
- [11] Nowak P, Topping JR, Fotheringham V, Gallimore CI, Gray JJ, Iturriza-Gomara M and

Knight AI. Measurement of the virolysis of human GII.4 norovirus in response to disinfectants and sanitisers. *J Virol Methods*. 2011;174:7-11. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.004>

[12] Yamaoka H, Nakayama-Imaohji H, Horiuchi I, Yamasaki H, Nagao T, Fujita Y, Maeda H, Goda H and Kuwahara T. Tetramethylbenzidine method for monitoring the free available chlorine and microbicidal activity of chlorite-based sanitizers under organic-matter-rich environments. *Lett Appl Microbiol*. 2016;62:47-54. <https://doi.org/10.1111/lam.12506>

[13] Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MC, Green K, Martella V, Wang Q, White PA, Katayama K, Vennema H, Koopmans MPG and Vinje J. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol*. 2019;100:1393-406. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001318>

[14] Standard methods of analysis in food safety regulation. Japan Food Hygiene Association; 2018.

[15] Efficacy evaluation committee in Japanese Society for Infection Prevention and Control. Guidelines for efficacy evaluation of antiseptocs: Environmental hygiene 2020. *Jpn J Infect Prevent Control*. 2020;35.

[16] Horiuchi I, Kawata H, Nagao T, Imaohji H, Murakami K, Kino Y, Yamasaki H, Koyama AH, Fujita Y, Goda H and Kuwahara T. Antimicrobial activity and stability of weakly acidified chlorous acid water. *Biocontrol Sci*. 2015;20:43-51. <https://doi.org/10.4265/bio.20.43>

[17] Wei CI, Cook, D. L., Kirk, J. R. Use of chlorine compounds in the food industry. *Food Technol*. 1985;39:107-15.

[18] Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA and Vinje J. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: Aa comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J Food Prot*. 2006;69:2761-5. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.11.2761>

[19] Hatanaka N, Awasthi, S. P., Goda, H., Kawata, H., Uchino, Y., Kubo, T., Aoki, S.,

Hinenoya, A., Yamasaki, S. Chlorous acid is a more potent antibacterial agent than sodium hypochlorite against *Campylobacter*. *Food Cont.* 2020;111:107046. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107046>

[20] Kawata H, Kohno M, Nukina K, Horiuchi I, Goda H, Kuwahara T, Yoshimori K, Miyaji A, Kamachi T and Yoshikawa T. Identifying the chloroperoxy radical in acidified sodium chlorite solution. *PLoS One*. 2021;16:e0252079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252079>

[21] Rachmadi AT, Kitajima M, Watanabe K, Yaegashi S, Serrana J, Nakamura A, Nakagomi T, Nakagomi O, Katayama K, Okabe S and Sano D. Free-chlorine disinfection as a selection pressure on norovirus. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84:e00244-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00244-18>

[22] Costantini V, Morantz EK, Browne H, Ettayebi K, Zeng XL, Atmar RL, Estes MK and Vinje J. Human norovirus replication in human intestinal enteroids as model to evaluate virus inactivation. *Emerg Infect Dis*. 2018;24:1453-64. <https://doi.org/10.3201/eid2408.180126>

[23] Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, Neill FH, Blutt SE, Zeng XL, Qu L, Kou B, Opekun AR, Burrin D, Graham DY, Ramani S, Atmar RL and Estes MK. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*. 2016;353:1387-93. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5211>

[24] Sato S, Matsumoto N, Hisaie K and Uematsu S. Alcohol abrogates human norovirus infectivity in a pH-dependent manner. *Sci Rep*. 2020;10:15878. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72609-z>