〈原 著〉

ヒトノロウイルスの代替としてマウスノロウイルスを用いた 消毒薬による不活化効果

清水 優子¹⁾・牛島 廣治¹⁾・北島 正章²⁾・片山 浩之²⁾・遠矢 幸伸³⁾

Murine Norovirus as a Novel Surrogate to Evaluate Disinfectants for Human Norovirus

Yuko SHIMIZU¹⁾, Hiroshi USHIJIMA¹⁾, Masaaki KITAJIMA²⁾, Hiroyuki KATAYAMA²⁾ and Yukinobu TOHYA³⁾

¹⁾Aino Health Science Center, Aino University, ²⁾Graduate School of Engineering, The University of Tokyo,

³⁾Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences, Nihon University

(2009年5月1日 受付・2009年9月14日 受理)

要 旨

ヒトノロウイルス(HuNoV)は、未だ細胞培養系が確立されていないため、各種消毒薬のHuNoVに対する有効性について十分な知見が得られていない。そこで、HuNoVに形態学的にも遺伝学的にも類似し細胞培養可能なマウスノロウイルス(MNV)を用い、塩素系およびエタノール系消毒薬の不活化効果をTissue Culture Infectious Dose 50% (TCID₅₀)法を指標に評価した。次亜塩素酸ナトリウムおよびジクロロイソシアヌル酸ナトリウム(塩素系消毒薬)は、200 ppm、30秒間の接触でMNVは99.998% (4.8 log₁₀)以上不活化して検出限界以下となり、125 ppmの場合でも30秒間で99.99% (4 log₁₀)以上の不活化が認められた。70 v/v%エタノール、0.18 w/v%クロルヘキシジングルコン酸塩含有72 v/v%エタノールおよび0.18 w/v%ベンザルコニウム塩化物含有75 v/v%エタノールは、30秒間の接触で検出限界以下までウイルス感染価を低下させた。

本研究で対象とした2種類の塩素系消毒薬は、いずれも終濃度125 ppmで高いMNV不活化効果を示した。また、3種類のエタノール系消毒薬については、エタノール濃度70 v/v%以上で使用すれば、いずれも短時間でMNVの不活化が達成できることが分かった。以上の結果から、これらの市販の消毒薬はHuNoVに対しても高い不活化効果を有することが期待され、ノロウイルス感染症の発生制御および拡大防止の感染対策を目的とした環境用消毒薬として有用であると考えられる。

Key words : ノロウイルス感染症, マウスノロウイルス, 消毒薬, 不活化

はじめに

ヒトノロウイルス(Human norovirus : HuNoV)は、ヒト-ヒト感染および二枚貝などの喫食による経口感染によりヒトに感染し、下痢、嘔吐および発熱などの症状を引き起こす^{1,2)}ことが知られている。乳幼児から高齢者に至るまで幅広い年齢層のヒトに感染し、特に乳幼児では初冬に全国で一斉に流行が発生する傾向がある。HuNoVの感染力は非常に強く、ごく少量のウイルス摂

取でも感染が成立する。そのため、完全な感染対策は極めて困難であり、施設内でのHuNoV集団感染事例が頻繁に報告されているのが現状である。ここ数年、HuNoV感染者の報告数は増加傾向にあり、大きな社会問題となってきた。HuNoVの感染および流行を阻止するためには、有効な治療薬および消毒薬の開発が必要不可欠であるが、HuNoVは未だ効率良く増殖させることのできる細胞培養系が確立されていないため、これらの開発および効果の評価が困難な状況にある^{1,2)}。

ノロウイルス(Norovirus : NoV)はカリシウイルス科に属し、直径約38 nmの小型の一本鎖(+)RNA ウィ

¹⁾藍野大学藍野健康科学センター, ²⁾東京大学大学院工学系研究科, ³⁾日本大学生物資源科学部獣医学科

ルスである。NoV 属は現在 Genogroup I (GI) から GV までの 5 つの Genogroup に分類されており、これまでヒトへの感染が報告されている Genogroup は GI, GII および GIV である¹⁾。

マウスノロウイルス (Murine norovirus : MNV) は、2003 年に初めて米国の研究施設における免疫系ノックアウトマウスから見出され、ノロウイルス属の GV に分類されている。そしてこの MNV は、細胞培養により感染力価を測定することが可能であり、細胞培養が可能なウイルスの中で HuNoV に最も近縁なウイルスであることから新たな代替ウイルスとして急速に注目を集めている。わが国においても研究用の健常マウスから MNV が分離・同定された³⁾。近年、世界中の研究施設で研究用マウスからの MNV の分離報告が相次いでいるが、これまで分離されている全ての MNV 株は同一血清型である⁴⁾。

本研究では、国内で分離された MNV を HuNoV の代替ウイルスとして使用し、MNV に対する各種汎用消毒薬の不活化効果を解析した。消毒薬として、塩素系消毒薬 (次亜塩素酸ナトリウムおよびジクロロイソシアヌル酸ナトリウム)、エタノール、クロルヘキシジングルコン酸塩含有エタノールおよびベンザルコニウム塩化物含有エタノールを用いた。消毒薬との接触によるウイルスの感染力価の消長を解析し、これらの消毒薬の MNV に対する不活化効果を検証した。

材料と方法

1. 使用したウイルス株およびウイルス液の作製法

国内において分離された MNV (S7-PP3 株) を用いた。マウスのマクロファージ由来細胞株である RAW

264.7 細胞 (ATCC TIB-71) に MNV を感染させて培養し、3 回凍結融解を繰り返した後、800 g で 15 分間の遠心分離を行った。上清をセルロースアセテート膜 (孔径 0.2 μm , Advantec) でろ過し、分注後 -80°C で保存した。作製したウイルス液中のウイルス濃度は 10^{6-7} Tissue Culture Infectious Dose 50% (TCID₅₀) / 50 μL であった。

2. 使用した消毒薬

表 1 に、使用した消毒薬の種類および MNV との反応条件をまとめた。本研究では、塩素系消毒薬 2 種類とエタノール系消毒薬 3 種類 (合計 5 種類) の市販の消毒薬について、その MNV 不活化効果を検証した。

塩素系消毒薬として、次亜塩素酸ナトリウム (sodium hypochlorite ; 化学式 NaOCl ; 商品名「ミルトン」[杏林製薬株式会社]) およびジクロロイソシアヌル酸ナトリウム (dichloroisocyanuric acid sodium ; 化学式 $\text{C}_3\text{O}_3\text{N}_3\text{Cl}_2\text{Na}$; 商品名「ミルトン CP」[杏林製薬株式会社]) を使用した。消毒薬中の遊離塩素濃度は、*N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine (DPD) 粉末 (Hach 社) および水質分析計 DR/890 (Hach 社) を用いた DPD 法により測定した。

エタノール系消毒薬として、エタノール (ethanol ; 化学式 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; エタノール含有量 76.9–81.4 vol% ; 商品名「消毒用エタノール」[吉田製薬株式会社])、0.2 w/v% クロルヘキシジングルコン酸塩含有 80 v/v% エタノール (chlorhexidine gluconate ; 化学式 $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10} \cdot 2\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$; 商品名「ヒビソフト®」[大日本住友製薬株式会社]) および 0.2 w/v% ベンザルコニウム塩化物含有 83 v/v% エタノール (benzalkonium chloride ; 化学式 $[\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{R}]\text{Cl}$ (R = C_8H_{17} ~ $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$) ; 商品名

表 1 消毒薬の種類と MNV との反応条件

	消毒薬	Reaction conc.	MNV : 消毒薬	反応停止法
塩素系	次亜塩素酸ナトリウム	50 ppm	1 : 1	チオ硫酸ナトリウム
		125 ppm	1 : 1	
		200 ppm	1 : 1	
		1000 ppm	1 : 1	
	ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	50 ppm	1 : 1	チオ硫酸ナトリウム
		125 ppm	1 : 1	
		200 ppm	1 : 1	
		1000 ppm	1 : 1	
エタノール系	エタノール	40 v/v%	1 : 1	希釈 (1,000 倍)
		70 v/v%	1 : 9	
	クロルヘキシジングルコン酸塩含有エタノール	0.1 w/v% (40 v/v% エタノール)	1 : 1	希釈 (1,000 倍)
		0.18 w/v% (72 v/v% エタノール)	1 : 9	
	ベンザルコニウム塩化物含有エタノール	0.1 w/v% (42 v/v% エタノール)	1 : 1	希釈 (1,000 倍)
		0.18 w/v% (75 v/v% エタノール)	1 : 9

図1 MNV 感染による細胞変性効果(CPE)
(A) RAW 264.7 細胞(非感染) (B) MNV 感染 RAW264.7 細胞(CPE+)

「ウエルバス®」[丸石製薬株式会社])を使用した。

3. ウイルス感染力価の測定と生残率の算出

各消毒薬を表1に示した濃度となるようにそれぞれ調製し、MNVに添加し、十分に混和することでMNVを消毒薬と接触させた。所定時間(0.5, 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60分)経過後、表1に示した方法で速やかに反応を停止させた。すなわち、塩素系消毒薬はチオ硫酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)を用いて中和し、その他は10%牛胎児血清含有Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培地で1000倍希釈することで反応を停止させた。クロルヘキシジングルコン酸塩およびベンザルコニウム塩化物含有エタノールについてはウイルス感染力価測定の際の細胞毒性を考慮し、さらに10倍希釈した。

各反応液はDMEM培地で10段階希釈し、RAW 264.7細胞を培養した96wellマイクロプレートに各希釈液50 μL /wellを4wellずつ接種し、炭酸ガス培養装置(37°C; 5% CO_2)内で培養した。4日間培養後、顕微鏡下で細胞変性効果(cytopathic effect: CPE)の出現を観察し、TCID₅₀法によってウイルスの感染力価を定量した。図1に、MNV非感染のRAW 264.7細胞の顕微鏡観察像とともに、MNV感染により引き起こされたRAW 264.7細胞のCPEの顕微鏡観察像を示す。約90%コンフルエント時のMNV非感染RAW 264.7細胞は、顕微鏡下で光沢をもつ円形に近い形状として観察される(A)に対し、MNVに感染したRAW 264.7細胞には光沢がなくなり萎縮する激しい細胞損傷および細胞損傷に伴う細胞間隙の顕著な増加が認められる(B)ため、MNV感染によるCPEの出現の有無が容易に判定可能

であった。

消毒薬との反応前のウイルス感染力価 N_0 (TCID₅₀)に対する所定条件における消毒薬による反応後のウイルス感染力価 N (TCID₅₀)の割合 N/N_0 を算出し、生残率とした。表1に示した各濃度および各反応時間のそれぞれについて全て3回の実験を行い、各実験条件におけるMNVの生残率の平均値を算出した。

結 果

1. 次亜塩素酸ナトリウムのMNV不活化効果

図2(a)に、次亜塩素酸ナトリウムと接触させた場合のMNVの生残率の経時変化を示す。濃度1000 ppmおよび200 ppmの場合、30秒間の接触によりMNVは99.998% ($4.8 \log_{10}$)以上不活化して検出下限以下となった。濃度125 ppmの場合、30秒間の接触でMNVは99.99% ($4 \log_{10}$)以上不活化し、8分間の接触で99.999% ($5 \log_{10}$)以上不活化して検出下限以下となった。濃度50 ppmの場合は、1分間の接触で99% ($2 \log_{10}$)程度不活化したが、その後は極めて緩やかに不活化し、60分間の接触後の不活化率は99.8% ($2.7 \log_{10}$)であった。

次亜塩素酸ナトリウム濃度が50 ppm以下の場合には長時間の接触後もウイルスの一部が生残する可能性があるが、濃度125 ppm以上の次亜塩素酸ナトリウムと接触させた場合に30秒間の接触で99.99% ($4 \log_{10}$)以上のウイルス不活化が期待できる。

2. ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムのMNV不活化効果

図2(b)に、ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムと接

図2 消毒薬による MNV の生残率の経時変化

横軸は MNV と消毒薬との反応時間，縦軸は MNV 生残率 $\log_{10}(N/N_0)$ を示す．下向き矢印以降は検出限界以下となる．

触させた場合の MNV の生残率の経時変化を示す．濃度 200 ppm および 1000 ppm の場合には，30 秒間の接触により MNV は 99.999% ($5 \log_{10}$) 以上不活化して検出限界以下となった．濃度 125 ppm の場合には，30 秒間の接触で 99.99% ($4 \log_{10}$) 以上不活化し，8 分間の接触で 99.999% ($5 \log_{10}$) 以上不活化した．濃度 50 ppm の場合は，2 分間の接触で 99% ($2 \log_{10}$) 程度不活化したが，その後は極めて緩やかに不活化し，60 分間の接触後の不活化率は 99.8% ($2.7 \log_{10}$) であった．

ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムと接触させた場合

の MNV の生残率の経時変化は，次亜塩素酸ナトリウムと接触させた場合とほぼ同様であった(図 2(a)(b))．すなわち，ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム濃度が 50 ppm 以下の場合には長時間の接触後もウイルスの一部が生残する可能性があるが，濃度 125 ppm 以上のジクロロイソシアヌル酸ナトリウムと接触させた場合に 30 秒間の接触で 99.99% ($4 \log_{10}$) 以上のウイルス不活化が期待できる．

3. エタノールの MNV 不活化効果

図 2(c) に，エタノールと接触させた場合の MNV の

生残率の経時変化を示す。エタノール濃度 70 v/v% の場合、30 秒間の接触で 99.94% ($3.3 \log_{10}$) 以上不活化して検出下限以下となった。エタノール濃度 40 v/v% の場合は、エタノールとの接触による MNV の不活化は緩やかであった。すなわち、15 分間の接触後の不活化率は約 90% ($1 \log_{10}$) であり、60 分間の接触後の不活化率は 99.6% ($2.4 \log_{10}$) であった。

エタノール濃度が 40 v/v% 以下の場合には長時間の接触後もウイルスの一部が生残する可能性があるが、濃度 70 v/v% 以上のエタノールと接触させた場合には 30 秒間の接触で 99.9% ($3 \log_{10}$) 以上のウイルス不活化が期待できる。

4. クロルヘキシジングルコン酸塩含有エタノールの MNV 不活化効果

図 2(d) に、クロルヘキシジングルコン酸塩含有エタノールと接触させた場合の MNV の生残率の経時変化を示す。0.18 w/v% クロルヘキシジングルコン酸塩含有 72 v/v% エタノールと接触させた場合、30 秒間の接触で MNV は 99.9% ($3 \log_{10}$) 以上不活化して検出限界以下となった。0.1 w/v% クロルヘキシジングルコン酸塩含有 40 v/v% エタノールと接触させた場合、30 秒間の接触後の不活化率は 90% ($1 \log_{10}$) であり、その後は緩やかに不活化して 60 分間の接触後の不活化率は 99.8% ($2.7 \log_{10}$) であった。

0.18 w/v% クロルヘキシジングルコン酸塩含有 72 v/v% エタノールには 99.9% ($3 \log_{10}$) 程度のウイルス不活化効果が認められた。

5. ベンザルコニウム塩化物含有エタノールの MNV 不活化効果

図 2(e) に、ベンザルコニウム塩化物含有エタノールと接触させた場合の MNV の生残率の経時変化を示す。0.18 w/v% ベンザルコニウム塩化物含有 75 v/v% エタノールと接触させた場合、MNV は 30 秒間で 99.8% ($2.8 \log_{10}$) 以上不活化し検出下限以下となった。0.1 w/v% ベンザルコニウム塩化物含有 42 v/v% エタノールと接触させた場合、2 分間の接触で 93% ($1.2 \log_{10}$) 程度不活化し、8 分間の接触で 99.6% ($2.5 \log_{10}$) 程度不活化した。その後は緩やかに不活化し、接触開始から 60 分後には 99.9% ($3 \log_{10}$) 以上不活化して検出下限以下となった。

ベンザルコニウム塩化物含有エタノールによる MNV の不活化効果は、クロルヘキシジングルコン酸塩含有エタノールによる不活化効果と同程度かそれ以上であると考えられた。

考 察

本研究では、国内で分離された MNV を HuNoV の代替ウイルスとして使用し、MNV に対する塩素系および

エタノール系消毒薬の不活化効果を検証した。

ノロウイルス感染症は、急性感染症であり特に慢性化および癌化することのない疾患ではあるが、症状が急激であり小児および高齢者が感染すると症状が重篤になり死に至ることもある^{1,2)}。実際に、世界的には年間に 10 ～ 20 万人がノロウイルス感染症に関連する病因で死亡していると推定されており⁵⁾、わが国でも HuNoV 感染に伴う脱水による全身の消耗を原因とした死亡例または嘔吐による窒息を原因とした死亡例が報告されている。小児における HuNoV 感染事例では、脳症および痙攣などの合併症を引き起こすこともある。また近年、合併症の有無にかかわらずウイルス血症が認められることも明らかとなってきた⁶⁾。HuNoV 感染には、感染者の吐物や糞便に汚染された物質に手を触れることで手がウイルスに汚染され、その手を介して汚染された食物を喫食することによる経口感染およびウイルスが含まれたエアロゾルを吸入することによる飛沫感染がある。HuNoV の二次感染を防ぐためには、不活化に有効な消毒薬を用いて汚染されている可能性のある場所に適切な消毒を施し、その感染経路を断ち切ることが非常に重要である。

消毒薬の開発およびウイルスに対する有効性の評価を目的とした実験では、一般にウイルスを消毒薬と接触させ、一定時間経過後に反応を停止した後、消毒薬との接触によるウイルスの感染力価の消長を細胞培養法によって測定する。MNV の場合ブラックアッセイにより感染力価を測定することも可能であるが、MNV の培養細胞である RAW 264.7 細胞は半付着性の細胞であることから、ブラックアッセイが可能な他のウイルスに比べるとブラック形成が容易ではない。それに対し、TCID₅₀ 法では MNV の増殖に伴う明瞭な CPE が確認できるため、TCID₅₀ 法のほうが容易かつ確実な方法である。そのため、本研究では TCID₅₀ 法を用いて MNV の感染力価を測定した。また、Real-time RT-PCR により MNV の遺伝子量の消長を測定することも可能であるが、遺伝子量の低減は感染力価の低減を大きく過小評価することになることが知られているため、本研究では遺伝子量の変化の追跡は必要ないと判断し感染力価の低減のみを測定することとした。

HuNoV は効率良く増殖させることのできる細胞培養系が確立されていない。このような状況下で、消毒実験等における HuNoV の代替ウイルスとしては、同じカリシウイルス科に属し細胞培養が可能なネコカリシウイルス (Feline calicivirus : FCV) およびイヌカリシウイルス (Canine calicivirus : CaCV) が広く用いられてきた^{7~11)}。米国環境保護局 (U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency) は、ノロウイルス代替として FCV を用いることを推奨しており、99.9% ($3 \log_{10}$) あるいは 99.99% ($4 \log_{10}$) 以上の感染価が減少す

れば抗ウイルス薬として有効であるとしている¹²⁾。Duizer らの FCV, CaCV を用いた 70% エタノール実験では 8 分で 99%, 30 分で 99.9% の不活化を見た。また次亜塩素酸ナトリウムは FCV, CaCV とともに 30 ppm ではあまり効果が認められなかった。300 ppm, 10 分では CaCV は 99.9% の不活化がみられたが, FCV は 99% 以下の不活化に留まった⁷⁾。しかしながら, FCV はノロウイルス属とは異なるベジウイルス属に属するウイルスであること, 及び HuNoV が腸管で増殖して糞便中に排出されるのに対し, FCV はネコの呼吸器に感染するウイルスであり糞便中には排出されないことなど, HuNoV とは異なる特性を持つため代替ウイルスとして使用するには限界があると考えられている¹³⁾。

2003 年にその存在が初めて報告された MNV は, 形態学的にも遺伝学的にも HuNoV に類似したウイルスであり, ノロウイルス属の Genogroup V に分類されている^{3,4,14,15)}。そして, この MNV は培養法により感染力価を測定することが可能であるため, 近年 HuNoV の代替ウイルスとして用いられるようになってきている。Belliot らは, 米国で分離された MNV (MNV-1 株) を用いた消毒実験結果を報告しており, 60% エタノールでは 30 秒で 99.99% 以上不活化し, 0.26% 活性塩素 (36 mM 次亜塩素酸ナトリウム) では 30 秒で 99.99% 以上不活化したとしている¹⁶⁾。これらの結果から, MNV, CaCV, FCV の代替ウイルスにより多少の差が見られることがわかる。

我々の結果では, 塩素系消毒薬は 125 ppm, 30 秒で 99.99% 以上の不活化効果が見られた。厚生労働省が推奨している 200 ppm では 30 秒で 99.999% 以上の高い不活化が見られた。DPD 法により遊離塩素濃度を測定したところ, 本研究で使用了次亜塩素酸ナトリウムおよびジクロロイソシアヌル酸ナトリウム中に含まれる塩素は遊離塩素が大半を占めており, 結合塩素はほとんど検出されなかった (data not shown)。

北島らは, 水道水中の HuNoV の塩素消毒耐性の解明を目的として本研究よりも低い初期遊離塩素濃度 (0.1 および 0.5 ppm) で MNV の不活化効果を調べている。また, この報告では, 水試料中に添加した遊離塩素濃度の経時変化を追跡しているが, 水中の遊離塩素濃度は時間経過とともに減少する傾向が認められたとしている¹⁷⁾。その原因としては, 水試料中に存在した塩素消費物質の影響が考えられる。本研究では, 消毒薬との接触中の遊離塩素濃度の経時変化は調べていないが, ウィルス液中に含まれる細胞培養用培地由来の有機物等により塩素が消費されたため時間経過とともに消毒効果が低減したものと考えられる。エタノール系消毒薬の場合は, 培地由来成分によるエタノールの消費およびエタノールの気化により時間経過とともに消毒効果が低減し

たものと考えられる。

エタノールは 70 v/v% および 40 v/v% の 2 つの濃度に設定し不活化実験を行った。エタノール系消毒薬の場合は, 塩素系消毒薬と比較すると不活化に時間がかかった。特に, 40 v/v% の場合は十分な不活化効果は認められなかった。クロロヘキシジングルコン酸塩含有エタノールとベンザルコニウム塩化物含有エタノールはいずれも約 80 v/v% のエタノールを含んでいるが, エタノール単独の場合に比べクロロヘキシジングルコン酸塩およびベンザルコニウム塩化物が不活化効果を増大させていると考えられた。エタノール系消毒薬については, エタノール濃度 70 v/v% 以上で十分量使用すれば, 短時間 (30 秒以内) で MNV に対して不活化作用が認められた。

塩素系の消毒薬は, 低い濃度では水道水の消毒に用いられる。我が国の水道法では, 水道水の微生物学的安全性の確保のため給水栓末端で 0.1 mg/L 以上の遊離塩素濃度を保つことが定められている。また, ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムは固形塩素系消毒薬として有用である。一方, エタノール系消毒薬は, 手指の消毒等に便利であり危険性が少ないため広く使用されている。塩素系消毒薬およびエタノール系消毒薬のそれぞれの特徴を理解し, 効果のある濃度, 時間で用いることが重要である。

この報告は, HuNoV の新たな代替ウイルスとして MNV を使用し, 市販の塩素系 (2 種類) およびエタノール系 (3 種類) 消毒薬による不活化効果を検討した国内で初めての報告である。本研究により得られた結果から, 今回評価対象とした消毒薬は, HuNoV に対しても高い不活化効果を有することが期待され, ノロウイルス感染症対策を目的とした環境用消毒薬として使用可能であると考えられる。

利益相反について: 本研究は, 杏林製薬株式会社より消毒薬の提供を受けた。

文 献

- 1) 牛島廣治, 西村修一: ノロウイルス感染症. 最新医 2008; 63(3)増刊号: 617-35.
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター: ノロウイルス感染症. <http://idsc.nih.go.jp/disease/norovirus/index.html>
- 3) 遠矢幸伸: マウスノロウイルス. ウィルス性下痢症研究会第 20 回学術集会抄録集 2007, p. 4.
- 4) Thackray LB, Wobus CE, Chachu KA, Liu B, Alegre ER, Henderson KS, *et al.*: Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence. J Virol 2007; 81 (19): 10460-73.
- 5) Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD: Systematic literature review of

- role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(8): 1224-31.
- 6) Takanashi S, Hashira S, Matsunaga T, Yoshida A, Shiota T, Tung PG, *et al.*: Detection, genetic characterization, and quantification of norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. *J Clin Virol* 2009; 44(2): 161-3.
 - 7) Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M: Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(8): 4538-43.
 - 8) 森 功次, 林 志直, 野口やよい, 甲斐明美, 大江香子, 酒井沙知, 他: Norovirus の代替指標として Feline Calicivirus を用いた手洗いによるウイルス除去効果の検討. *感染症誌* 2006; 80(5): 496-500.
 - 9) 森 功次, 林 志直, 秋場哲哉, 野口やよい, 吉田靖子, 甲斐明美, 他: Norovirus の代替指標として Feline Calicivirus を用いた, 手指に添加したウイルスの速乾性消毒剤による擦式消毒, ウェットティッシュによる清拭および機能水を用いた手洗いによる除去および不活化効果の検討. *感染症誌* 2007; 81(3): 249-55.
 - 10) 高木弘隆, 杉山和良: ネコカリシウイルス(FCV)を代替としたノロウイルス(NV)不活化効果の検討. *医と薬学* 2007; 57(3): 311-2.
 - 11) 隅下佑一, 加藤由美, 高本一夫, 古田太郎, 西尾治, 木村博一: ノロウイルス代替のネコカリシウイルスおよび各種微生物に有効なエタノール製剤の開発. *防菌防黴* 2007; 35(11): 725-32.
 - 12) U.S. Environmental Protection Agency: Confirmatory virucidal effectiveness test using feline calicivirus as surrogate for Norovirus. http://www.epa.gov/opad001/pdf_files/confirmatory_virucidal_test.pdf
 - 13) Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW 4th: Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol* 2006; 80(11): 5104-12.
 - 14) Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW 4th: STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 2003; 299(5612): 1575-8.
 - 15) Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, *et al.*: Replication of *Norovirus* in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* 2004; 2(12): 2076-84.
 - 16) Belliot G, Lavaux A, Souihel D, Agnello D, Pothier P: Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(10): 3315-8.
 - 17) 北島正章, 遠矢幸伸, 松原康一, 原本英司, 宇田川悦子, 片山浩之, 他: 新たな代替指標としてマウス分離株を用いた水道水中のノロウイルスの塩素耐性の解明. *環境工学研究論文集* 2008; 45: 361-70.
- 〔連絡先: 〒150-0002 東京都渋谷区渋谷 2-17-3-4F
 藍野大学藍野健康科学センター 牛島廣治
 E-mail: ushijima-hiroshi@jcom.home.ne.jp〕

Murine Norovirus as a Novel Surrogate to Evaluate Disinfectants for Human Norovirus

Yuko SHIMIZU¹⁾, Hiroshi USHIJIMA¹⁾, Masaaki KITAJIMA²⁾, Hiroyuki KATAYAMA²⁾ and Yukinobu TOHYA³⁾

¹⁾Aino Health Science Center, Aino University, ²⁾Graduate School of Engineering, The University of Tokyo,

³⁾Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences, Nihon University

Abstract

Human noroviruses(HuNoVs)are the major cause of acute viral gastroenteritis worldwide. However, no cell culture system for HuNoVs is available, so little is known about the efficacy of various disinfectants against HuNoVs. Cultivable murine norovirus(MNV) was used as a novel surrogate for HuNoVs to evaluate the efficacy of five types of chlorine-based and alcohol-based commercial disinfectants to MNV using the TCID₅₀ method. MNV was inactivated to more than 99.998 % (4.8 log₁₀) and reached the detection limit by 200 ppm of chlorine-based disinfectants, sodium hypochlorite and dichloroisocyanuric acid sodium, with contact time of 30 seconds. Moreover, MNV was inactivated at 99.99% (4 log₁₀) using chlorine-based disinfectants at a final dilution concentration of 125 ppm with contact time of 30 seconds. Three types of alcohol-based commercial disinfectants, 70 v/v% ethanol, 0.18 w/v% chlorhexidine gluconate with 72 v/v% ethanol, and 0.18 w/v% benzalkonium chloride with 75 v/v% ethanol, all reduced MNV to titers below the detection limit with contact time of 30 seconds. Chlorine-based disinfectants showed great efficacy against MNV even if diluted to 125 ppm. In addition, alcohol-based disinfectants had adequate efficacy against MNV if used without dilution (ethanol concentrations of more than 70 v/v%). These results suggest that these disinfectants can inactivate HuNoVs. The five types of commercially available disinfectants tested here can be used to prevent norovirus infection.

Key words : norovirus infection, murine norovirus, disinfectant, inactivation