二酸化塩素ガス発生ゲル剤によるネコカリシウイルスの不活化の検討

森野博文,* 小泉朋子, 三浦孝典, 福田俊昭, 柴田 高

Inactivation of Feline Calicivirus by Chlorine Dioxide Gas-generating Gel

Hirofumi Morino,* Tomoko Koizumi, Takanori Miura, Toshiaki Fukuda, and Takashi Shibata
Taiko Pharmaceutical Co., Ltd.; Uchihonmachi 3-34-14, Suita, Osaka 564-0032, Japan.

(Received January 15, 2013; Accepted June 5, 2013)

Noroviruses are one of the most important causes of acute gastroenteritis throughout the world. The aim of this study is to evaluate the efficacy of a chlorine dioxide gas-generating gel (ClO_2 gel, 60 g) against feline calicivirus (FCV), a norovirus surrogate, in the wet state on glass dishes in a test sink (43 cm long, 75 cm wide, and 29 cm deep). The ClO_2 gel permits sustained release of gaseous ClO_2 (1.7 mg/h at 25°C), and was placed in one corner of the test sink. The glass dishes containing FCV suspension were placed at three positions in the test sink. We demonstrated that FCV was inactivated within 5 h (>2 or $>3 \log_{10}$ reductions at three positions, $n=20$) in the test sink where the ClO_2 gel was placed. These small quantities of ClO_2 gel might be a useful tool for reducing the risk of infection by norovirus in wet environments such as kitchens and bathrooms under optimal condition.

Key words—chlorine dioxide; gas; norovirus; feline calicivirus; infectious gastroenteritis

緒 言

ノロウイルス (norovirus; NV) は感染性胃腸炎を引き起こす最も重要な原因ウイルスであり, その感染力は極めて強く容易に集団感染を引き起こす.¹⁾ 本ウイルスに対する衛生意識が高まっており, 現在, 手洗いを基本とした NV の感染対策が食品や医療分野などにおいて行われている. しかし, 毎年, NV による集団感染が学校, 食品業界, 老健施設, 医療関連施設など多くの施設で頻発しており, 現行の感染対策を補完する新たな対応策が望まれる.

二酸化塩素 (ClO_2 , CAS No. 10049-04-4) は常温において黄色のガスとして存在し,²⁾ その溶存液は優れた殺菌, ウイルス不活化効果を有する.^{3,4)} 溶存液のほかに, ガス状態での微生物の不活化効果の報告もある.^{5,6)} しかし, その多くは燻蒸など無人空間での使用を想定した高濃度域での有効性データであり, 有人空間での使用を想定した低濃度域での報告は限られる.^{7,8)} 最近われわれは 0.1 ppmv (0.28 mg

/m³) 以下の低濃度の二酸化塩素ガス (ClO_2 gas) が NV の感染リスクの低減に有望であることを報告した.^{9,10)} これまでの報告では, 機械式の ClO_2 gas 発生装置を用いたが, 今回われわれは, 簡便にトイレや流し台等に設置が可能であり, 徐放的に ClO_2 gas を放出する小さなゲル剤 (60 g) を準備した. 本稿ではその小さなゲル剤が, 現行の NV の感染対策を補完する新たな対応策になり得るかを検討した.

NV による集団感染において, 食品取扱い施設における調理従事者の関与が指摘されており,¹¹⁾ 調理場やトイレから特に多くのウイルスが検出されている.¹²⁾ 調理場で検出された NV と集団感染との因果関係について十分には解明されていないが, 実際問題として調理場の流し台周辺は, 人が直接口にする食材や食器類を常に取り扱っており, 感染源のない環境が要求される場所である. したがって, 新しい感染対策の評価環境は, 食品取扱い施設の流し台周辺が理想と思われる. NV は培養方法が未確立であることから, 環境中の NV の検出には定量 RT-PCR 法を用いる必要があるが, 同法はウイルスの感染力そのものを評価できない. そこで, 今回食品取扱い施設の流し台に近い環境として, バイオセーフティ施設内の流し台を新しい感染対策の評価環境

The authors declare no conflict of interest.

大幸薬品株式会社

*e-mail: morino@seirogan.co.jp

とし、培養困難な NV の代替えとしてネコカリシウイルス (FCV) を用い、小さなゲル剤を流し台に設置した場合の有用性に関して、流し台に置かれたガラスシャーレ上に滴下された浮遊液中の FCV に対する不活化効果を指標として評価した。

材料と方法

1. 試験ウイルス 供試ウイルスは feline calicivirus (FCV, F9, ATCC VR-782) を用いた。FCV の培養及びウイルス感染価の測定はネコ腎由来の株化細胞 (Crandell Reese feline kidney cells; CRFK, ATCC CCL-94) を用いた。

2. 暴露チャンバーを用いた二酸化塩素ガスの有効性の検討 FCV に対する ClO_2 gas の不活化効果について、縦 30×横 30×高さ 15 cm (13.5 L) の暴露チャンバーを準備した。暴露チャンバー内にガラスシャーレを 10 枚設置し、それらのガラスシャーレ上に FCV の浮遊液 [10^7 50% tissue culture infectious dose (TCID_{50})/50 μL の Dulbecco's phosphate buffer saline (D-PBS)] を 100 μL 滴下した [Fig. 1 (A)]. 暴露チャンバー内に ClO_2 gas 発生装置から ClO_2 gas を導入し (2 L/min), 暴露チャンバー内の ClO_2 gas 濃度が 0.02, 0.05 ppmv (チャンバー内 5 カ所の濃度の変動係数 0.02) となるように調整した。また、暴露チャンバー内の相対湿度が一定となるように、調湿した空気を導入した (6 L/min)。暴露チャンバー内から 1, 2, 3, 4, 5 時間後にウイルスの滴下されたガラスシャーレを 2 枚ずつ取り出し、2% ウシ胎仔血清 (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) によりウイルスを回収し、常法 (Spearman-Kaber method) に従って、ウイルス感染価 ($\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$) を求め評価した。暴露チャンバー内の ClO_2 gas 濃度は ClO_2 gas 測定器 (0–1000 ppb, Model 4330-SP, Interscan corporation, CA, USA) を用いて測定した。低濃度 ClO_2 gas の抗 FCV 活性に対する有機物の影響を見るために 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 g/L のウシ血清アルブミン (BSA, Sigma-Aldrich, MO, USA) を含むウイルス浮遊液を準備した。また、低濃度 ClO_2 gas の抗 FCV 活性におけるウイルス浮遊液 ($10^7 \text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$, in D-PBS) の液量 (50, 100, 200, 400 μL) の影響を検討した。

3. 流し台を用いたゲル剤の有効性の検討 本

Fig. 1. Schematic Diagrams of a Test Chamber and a Test Sink

(A) The glass dishes containing FCV suspension were placed in the test chamber. The ClO_2 gas in the test chamber was produced by a ClO_2 gas generator. The concentration of ClO_2 gas in the test chamber was measured by a ClO_2 gas detector. (B) A ClO_2 gas-generating gel was placed in the upper left corner of the test sink. Two glass dishes were placed at each of positions A, B, and C. Virus suspension (100 μL) was placed on the glass dishes. A closed circle in the figure indicates the center of the test sink.

研究において、 ClO_2 gas を発生するゲル剤 (60 g) は二酸化塩素溶液、アクリル酸重合体部分ナトリウム塩架橋物を含み、 ClO_2 gas を徐放的 (ガス発生量: 1.7 mg/h at 25°C) に放出するものを用いた (Cleverin Gel, Taiko Pharmaceutical Co., Ltd., Japan, 以下ゲル剤)。バイオハザードの観点上、試験環境は 104 m^3 のバイオセーフティ施設内 (換気回数: 15 回/h) にある縦 43×横 75×深さ 29 cm の流し台とした。ゲル剤は実際の流し台での洗浄作業を考慮して、左上隅に置き、ゲル剤から右下に 30 cm (position A), 45 cm (position B), 60 cm (position C) の場所にガラスシャーレ (内径 5 cm) を各場所に 2 枚ずつ設置した [Fig. 1 (B)]. 次に、それらのガラスシャーレ上に上述の FCV の浮遊液を 100 μL 滴下した。また実際の使用環境に近づけるように、流し台の底面を適度に濡れた状態とした。5 時間後、ウイルス感染価を求めた。独立した実験を 20 回実施し、ウイルス感染価の中央値を求め

た. 同様にしてゲル剤の設置していないものをコントロールとした. また, position B において, 0 から 5 時間まで 1 時間毎のウイルス感染価を測定した. 流し台中央底面の ClO_2 gas 濃度を 1 時間毎に検知管 (23L, GASTEC, Japan), 流し台内側の温湿度を温湿度ロガー (DL-8829, CUSTOM, Japan), 流し台内側の風速を風速計 (MODEL6034, KANO-MAX, Japan) により測定した. なお, 評価時間内であっても, 流し台付近の人の往来は自由とした.

4. 統計処理 有意差の検定は Prism 4 for Windows (GraphPad Software, Inc., CA, USA) を用いて, Mann-Whitney 検定を行い, $p < 0.01$ を有意差ありとした.

結 果

1. チャンバー実験 FCV に対する ClO_2 gas の不活化効果を調べるためにチャンバー内での暴露実験を行った. 暴露チャンバー内に設置したガラスシャーレ上の FCV に対する低濃度 ClO_2 gas の経時的な有効性を Fig. 2 に示した. 空気を導入したコントロール実験の場合, 5 時間後であっても自然減衰はほとんど確認できなかった. 一方, ClO_2 gas を導入することによりチャンバー内のガス濃度を 0.02 ppmv (0.06 mg/m^3) に調整した場合, 5 時間後のコントロールに対するウイルス感染価は 1/100 以下, チャンバー内のガス濃度を 0.05 ppmv (0.15 mg/m^3) に調整した場合, 3 時間以降のコントロールに対するウイルス感染価は 1/1000 以下となった. なお, チャンバー内の温度は $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ($n=9$), 相対湿度は $56 \pm 2\%$ ($n=9$) であった.

2. 有機物の影響 二酸化塩素溶存液の抗微生物活性は夾雑する有機物の影響を受けることが知られている. そのため低濃度 ClO_2 gas による FCV 不活化効果がウイルス浮遊液中のタンパク質濃度に影響されるのかを BSA を添加することで検討した. その結果, ウイルス浮遊液中の BSA 濃度が高くなるほど, 低濃度 ClO_2 gas による FCV 不活化効果が減弱した (Table 1). 1 g/L の BSA が添加された場合, 無負荷条件下と比べて, FCV の不活化効果が 1/1000 以下に減弱した.

3. ウイルス浮遊液の液量の影響 実環境にお

Fig. 2. Inactivation of FCV on the Glass Dishes in the Test Chamber by Low-concentration ClO_2 Gas

The FCV on the glass dishes was exposed to ClO_2 gas at concentrations of 0 ppmv (ordinary air), 0.02 ppmv, or 0.05 ppmv concentrations for 0, 1, 2, 3, 4 and 5 h. This experiment represents samples with no organic load. The asterisks indicate reductions of $>2 \log_{10}$ (*) and $>4 \log_{10}$ (**) as compared with control values (in ordinary air). Data represent mean $\pm$ S.D. ($n=3$). (○) air (control); (●) ClO_2 gas (mean 0.02 ppmv); (▲) ClO_2 gas (mean 0.05 ppmv).

Table 1. Effect of Organic Load on Inactivation of FCV in the Wet State by Low-Concentration ClO_2 Gas

Exposure time (h)	BSA concentration in virus suspension (g/L)	Infectivity ($\log_{10}$ [TCID ₅₀ /50 µL])		Log ₁₀ reduction
		Air (Control)	ClO_2 gas (Mean 0.05 ppm)	
5	0	5.2	<0.5	>4.7 ^{a)}
	0.2	5.6	2.1	3.5 ^{a)}
	0.4	5.8	2.8	3.0 ^{a)}
	0.6	5.9	4.0	1.9
	0.8	6.0	4.3	1.7
	1	5.8	4.7	1.1

Values are the mean of four experiments. ^{a)} Values indicate titer reductions of $>3 \log_{10}$ as compared with control values (in ordinary air).

Table 2. Effect of Amount of Virus Suspension on Inactivation of FCV in the Wet State by Low-Concentration ClO₂ Gas

Exposure time (h)	Amount of virus suspension (μL)	Infectivity (log ₁₀ [TCID ₅₀ /50 μL])		Log ₁₀ reduction
		Air (Control)	ClO ₂ gas (Mean 0.05 ppm)	
5	50	4.8	<0.5	>4.3 ^{a)}
	100	5.2	<0.5	>4.7 ^{a)}
	200	6.1	<0.5	>5.6 ^{a)}
	400	5.3	3.7	1.6

Values are the mean of three experiments. ^{a)} Values indicate titer reductions of >3 log₁₀ as compared with control values (in ordinary air).

Fig. 3. Inactivation of FCV on the Glass Dishes in the Test Sink by a ClO₂ Gas-generating Gel

The white column shows control experiments where ClO₂ gas-generating gel was not placed; the gray column shows experiments that involved treatment with ClO₂ gas using gas-generating gel. These experiments represent samples with no organic load. Horizontal lines indicate the minimum, 25th percentile, median, 75th percentile, and maximum values. Median values were calculated from 20 independent experiments; * $p < 0.001$ (Mann-Whitney test).

ける感染源は様々な状態が想定されるため、低濃度 ClO₂ gas の抗 FCV 活性におけるウイルス浮遊液の液量の影響を検討した。その結果、ウイルス浮遊液の液量が 400 μL の場合、100 μL の条件下と比べて低濃度 ClO₂ gas (0.05 ppmv) による FCV 不活化効果が 1/1000 以下に減弱した (Table 2)。

4. 流し台底面の二酸化塩素ガス濃度 ゲル剤を設置した場合、流し台中央底面の ClO₂ gas 濃度の平均値は 0.09 ± 0.04 ppmv (0.25 ± 0.11 mg/m³, $n = 20$) であった。一方、ゲル剤を設置しないコントロール実験の場合は、0.01 ppmv 以下となり、検知管の検出限界以下であった。また、流し台底面の温度は $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ($n = 40$)、相対湿度は $67 \pm 5\%$ ($n = 40$) であった。

5. 流し台実験 流し台に設置したガラスシャーレ上の FCV に対するゲル剤の有効性を Fig. 3 に示した。ゲル剤を設置しない場合のコントロール実験において、5 時間後のウイルス感染価は $10^{5.5}$

TCID₅₀/50 μL (position A), $10^{5.7}$ TCID₅₀/50 μL (position B), $10^{5.8}$ TCID₅₀/50 μL (position C) であった。一方、ゲル剤を設置した場合において、5 時間後のウイルス感染価は $10^{1.6}$ TCID₅₀/50 μL (position A), $10^{2.9}$ TCID₅₀/50 μL (position B), $10^{3.6}$ TCID₅₀/50 μL (position C) であり、コントロールに対するウイルス感染価は position A では 1/1000 以下、position B, C では 1/100 以下となり、すべての設置位置で有意 ($p < 0.001$, $n = 20$) に減少した。ゲル剤から最も離れた position C (60 cm) ではゲル剤から近い position A (30 cm) と比べて効果が 1/100 弱かった。次に、評価環境におけるウイルス浮遊液の経時的な状態変化を見るために、ゲル剤未設置時の各設置位置におけるガラスシャーレ上のウイルス浮遊液の残存量を調べた。その結果、4 時間後にはほぼ乾燥状態であることが分かった (Table 3)。また、流し台底面の風速はすべての設置位置で 0.1 m/s 以下であった (Table 3)。

Table 3. Residual Amounts of Virus Suspension on the Glass Dishes and Air Velocity in the Sink

Position of the dishes	Residual amounts of virus suspension (μL)						Air velocity (m/s)
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	
A	100	66 $\pm$ 10	31 $\pm$ 8	8 $\pm$ 5	<3	<3	<0.1*
B	100	68 $\pm$ 7	33 $\pm$ 6	8 $\pm$ 5	<3	<3	<0.1*
C	100	73 $\pm$ 8	40 $\pm$ 7	15 $\pm$ 8	5 $\pm$ 4	<3	<0.1*

Data represent mean $\pm$ S.D. ($n=6$). The asterisks represent values below the detection limit of the anemometer.

Fig. 4. Time Course of Inactivation of FCV on the Glass Dishes in the Test Sink by a ClO₂ Gas-generating Gel

The glass dishes were placed at position B. This experiment represents samples with no organic load. The asterisks indicate reductions of $>2 \log_{10}$ (*) as compared with control values (in ordinary air). Data represent mean $\pm$ S.D. ($n=3$). (○) not placed gel (control); (●) placed gel.

6. 経時的な効果 流し台 position B におけるゲル剤の経時的な効果を Fig. 4 に示した。ゲル剤を設置しない場合のコントロール実験において、5 時間後のウイルス感染価は開始時と比べて約 1/10 に低下した。一方、ゲル剤を設置した場合において、4 時間以降のウイルス感染価はコントロールに対して 1/100 以下となった。流し台中央底面の ClO₂ gas 濃度の平均値は 0.1 ± 0.04 ppmv であった。

考 察

本研究において、ゲル剤は試験環境である流し台の FCV を有意に不活化した。そのゲル剤の FCV に対する不活化効果の程度及びチャンバー実験での ClO₂ gas の経時的な効果から推測して、ゲル剤による NV の不活化効果は、次亜塩素酸ナトリウム溶

液のような既存薬剤の清拭や噴霧による効果と比べて、作用は緩和であり瞬間的な効果はあまり期待できない。しかし、既存薬剤とは異なる特徴として、ゲル剤は徐放的にガスを放出することにより、液剤の使用方法である清拭や噴霧操作が不要であること、また、放出するガスの特性として液剤の届かないような箇所作用する可能性が考えられる。以前の研究により、FCV に対する ClO₂ gas の不活化効果には水分の存在が重要であり、完全に乾燥させた FCV 試料に対しては約 70% 以上の高湿度環境が必要であった。⁹⁾ この結果より、NV の感染対策におけるゲル剤の適用場所としては、今回の流し台のような湿潤環境下が必要と思われる。

NV に対する液剤のウイルス不活化効果試験の方法がアメリカ合衆国環境保護庁 (Environmental Protection Agency; EPA) より提示されている。¹³⁾ その報告によれば、NV の代替ウイルスとして FCV が用いられており、試験ウイルスには有機物として 5% のウシ胎仔血清 (約 4 g/L のタンパク質を含む) の負荷が推奨されている。本報告のチャンバーを用いた有機物負荷実験より、低濃度 ClO₂ gas のウイルス不活化効果は、無負荷条件下と比べて 0.4 g/L 負荷の場合、約 1/50 に ($>4.7 \log_{10}$ reduction から $3.0 \log_{10}$ reduction に低減)、1 g/L 負荷の場合、約 1/4000 に ($>4.7 \log_{10}$ reduction から $1.1 \log_{10}$ reduction に低減) 減弱された。これらのことより、ゲル剤は 4 g/L 以上のタンパク質が NV の感染源に夾雑すると、その不活化効果を十分に発揮できない可能性がある。

バイオハザードの観点上、今回の試験は換気回数が多い特殊な部屋で実施する必要があった。本研究における施設内の ClO₂ gas 濃度は、施設の広さ (104 m³)、換気回数 (15 回/h)、ゲル剤の ClO₂ gas 発生速度 (1.7 mg/h) から理論値として算出することが可能であり、その計算値は 0.001 ppmv 以下であった。施設内 (ゲル剤から 2 m 以上離れた場所) のガス濃度の実測値は 0.01 ppmv 以下 (検出限界以下) であり理論値と矛盾しない。一方、施設内にある流し台底面の ClO₂ gas 濃度の実測値は 0.09 ppmv であり、施設内のガス濃度よりも高い値であった。このことは、流し台内側の風速が 0.1 m/s 以下であったことから考えると、評価に使用した場所は気流の影響を大きく受けない環境であり、ゲル剤

から放出された ClO_2 gas が試験環境付近で滞留したためと推測される。したがって、本研究で確認したゲル剤による FCV の不活化効果は、ゲル剤付近の限定的な空間（ゲル剤に近い距離）において、 ClO_2 gas がその効果を発揮したためであると考ええる。また以上のことは、ゲル剤の性質の一面を見ていと考えられる一方で、今回の実験条件が一定の最適な条件となっているために、ゲル剤が FCV の不活化効果を発揮できた可能性はある。

ClO_2 gas の安全性に関して、米国産業衛生専門家会議（ACGIH）は ClO_2 gas の作業環境中の基準値として 8 時間加重平均値を 0.1 ppmv, 15 分短時間暴露限界値を 0.3 ppmv と定めている。¹⁴⁾ 最近、われわれは ClO_2 gas の毒性試験として、ラットを用いた ClO_2 gas の長期吸入暴露試験を実施し、1 日 24 時間、6 ヶ月にわたり 0.1 ppmv の ClO_2 gas に暴露したが、剖検所見に異常は観察されず、毒性の兆候はみられなかったことを報告した。¹⁵⁾ また、本研究と同型のゲル剤（60 g, 1 個設置/6 畳）と 2.5 倍量のゲル剤（150 g, 1 個設置/12 畳）を用いた、人のインフルエンザ様疾患に対する前向きコホート研究の結果、室内のガス濃度は 0.01–0.02 ppmv であり、54 日間で有害事象は不快臭気のみであった。¹⁶⁾

以上より、徐放的に ClO_2 gas を放出する小さなゲル剤は、流し台及びトイレの手洗い場や便器内のような湿潤環境下において、現行の NV の感染予防対策を補完する追加的な対応策となる可能性が示唆された。本研究では、以下の課題がある。今回ゲル剤の対象となったガラスシャーレ上の FCV 浮遊液は、水分が蒸発するために経時的にその状態（3–4 時間まで残存）が刻々と変化しており、ゲル剤の不活化効果に影響を及ぼす可能性が考えられる。しかし、本報告ではその詳細な解析検討まではできなかった。また、流し台実験の結果はチャンバー実験の結果よりもばらつきが大きく、効果が弱く不安定であったが、その原因の特定まではできなかった。さらに、今回の結果は FCV に対する効果であり、NV に対して全く同じように効果があるのかは確認できていない。

REFERENCES

1) Aron J. H., Jan V., Benjamin L., Geun W.

- P., Catherine Y., Nicole G., Umesh P., *MMWR Recomm. Rep.*, **60**, 1–18 (2011).
- 2) O'Neil M. J., Heckelman P. E., Koch C. B., Roman K. J., "The Merck Index—An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals," 14th ed., Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, 2006.
- 3) Takayama M., Sugimoto H., Mizutani S., Tanno K., *J. Antibact. Antifung. Agents*, **23**, 401–406 (1995).
- 4) Sanekata T., Fukuda T., Miura T., Morino H., Lee C., Maeda K., Araki K., Otake T., Kawahata T., Shibata T., *Biocontrol Sci.*, **15**, 45–49 (2010).
- 5) Wilson S. C., Wu C., Andriychuk L. A., Martin J. M., Brasel T. L., Jumper C. A., Straus D. C., *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5399–5403 (2005).
- 6) Sy K. V., McWatters K. H., Beuchat L. R., *J. Food Prot.*, **68**, 1165–1175 (2005).
- 7) Morino H., Matsubara A., Fukuda T., Shibata T., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 773–777 (2007).
- 8) Ogata N., Shibata T., *J. Gen. Virol.*, **89**, 60–67 (2008).
- 9) Morino H., Fukuda T., Miura T., Lee C., Shibata T., Sanekata T., *Biocontrol Sci.*, **14**, 147–153 (2009).
- 10) Morino H., Fukuda T., Miura T., Shibata T., *Lett. Appl. Microbiol.*, **53**, 628–634 (2011).
- 11) Centers for Disease Control and Prevention. "Norovirus": <http://www.cdc.gov/norovirus/index.html>, cited 30 May, 2012.
- 12) Boxman I. L., Dijkman R., te Loeke N. A., Hägele G., Tilburg J. J., Vennema H., Koopmans M., *J. Food Prot.*, **72**, 111–119 (2009).
- 13) U.S. Environmental Protection Agency (EPA), "Confirmatory Virucidal Effectiveness Test—Using Feline Calicivirus as Surrogate for Norovirus," 2006.
- 14) Dobson S., Cary R., "Concise International Chemical Assessment Document 37—Chlorine Dioxide (Gas)," World Health Organization, Geneva, 2002.
- 15) Akamatsu A., Lee C., Morino H., Miura T., Ogata N., Shibata T., *J. Occup. Med. Toxicol.*, **7**, 1–8 (2012).
- 16) Mimura S., Fujioka T., Mitsumaru A., *Jpn. J. Environ. Infect.*, **25**, 277–280 (2010).