東京医療保健大学大学院

医療保健学研究科　医療保健学専攻　博士課程

ノロウイルスのサロゲートウイルスを用いた アルコール感受性と疎水性の評価

２０１３年度入学

２０１６年3月１日　博士

医療保健学研究科　医療保健学専攻　感染制御学領域

学籍番号　ＨＤ０１３００２　　氏名　吉田　葉子

研究指導教員　小林　寛伊

副研究指導教員　大久保　憲

東京医療保健大学大学院　医療保健学研究科　医療保健学専攻
博士論文　要旨

ノロウイルスのサロゲートウイルスを用いた
アルコール感受性と疎水性の評価

東京医療保健大学大学院
医療保健学研究科　医療保健学専攻
博士課程
領 域 名　感染制御学
学籍番号　ＨＤ０１３００２
氏　　名　吉田　葉子

背景（Background or Introduction）

ヒトノロウイルスは現在のところ培養ができないため、消毒薬の効果を検討する場合には、*Caliciviridae* に属する *Vesivirus Feline calicivirus*（FVC）や *Norovirus Norwalk virus* ＧⅤ型（Murine norovirus；MNV）などのサロゲート（代替）ウイルスが用いられるのが一般的であるが、これらのウイルスに対するアルコールの効果は、必ずしも一致した見解が示されていない。また、FCV に対し一定の効果が得られるアルコール濃度であれば連続作用により完全不活化されるという理論があるが、消毒薬の連続作用による影響は不明確である。さらに、ノンエベロープウイルスの最外側器官であるカプシドはリン脂質含有量が少ないため親水性が高く、一般的にアルコールに抵抗性傾向を示すと考えられるが、ウイルスによりアルコール感受性は異なり、その要因としてカプシドの疎水性の相違が関連する可能性がある。

目的（Objective）

ヒトノロウイルスのサロゲートウイルスである FCV の異なる 2 種類の遺伝子型および MNV を用いて、ウイルス属および遺伝子型によるアルコール感受性の違いと疎水性の関係性を明らかにすること。また、ウイルスが完全不活化されない濃度の消毒薬連続作用による影響を FCV の標準ウイルス株とエタノールを用いて検証すること。

方法(Methods)

試験には FCV F9、FCVF4、MNV および 50v/v%エタノール連続作用後の FCV F9 を用いた。各種アルコールによるウイルス不活化効果の評価は Time-Kill 法により行い、$TCID_{50}$ 法によりウイルス感染価を算出した。ウイルスの疎水性評価は HIC 法を応用して行った。

結果(Results)

FCV よりも MNV の方が各種アルコールに対する感受性が高く、また、FCV F9 よりも FCV F4 の方が高いアルコール感受性を示し、ウイルス属や遺伝子型による差異が明らかとなった。FCV F9 は比較的効果が高い 50v/v%エタノールであっても完全不活化されず、その連続作用によりエタノール感受性は低下した。各種ウイルスの疎水性はエタノール感受性の順と相関した。

結論（Conclusions）

ウイルス分類学上近縁なウイルスであってもアルコール感受性に関わる遺伝子が同等とは限らず、サロゲートウイルスによる評価だけでヒトノロウイルスの消毒薬感受性を判断するのは注意が必要である。また、効果が不確実な濃度での消毒薬の使用は、抵抗性ウイルスの出現を助長させる可能性があり、消毒薬使用の際には有効性が確実な濃度を選択することが重要である。ノンエンベロープウイルスでもウイルス属や遺伝子型によりアルコール感受性が異なるのは、カプシドの疎水性が関連しており、アルコール感受性の評価にウイルス疎水性が利用可能であると思われる。

キーワード（Key Words）
ノロウイルス、サロゲートウイルス、FCV、MNV、遺伝子型、アルコール、感受性、疎水性

目次

はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7

図表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10

Abstract ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19

ノロウイルスのサロゲートウイルスを用いたアルコール感受性と疎水性の評価

はじめに

ノロウイルスは急性胃腸炎の原因となるウイルスの一属である。カキなどの 2 枚貝を摂取することで食中毒の原因になるほか、感染したヒトの糞便や吐物などを介して経口感染する。ウイルス分類学上では *Caliciviridae Norovirus Norwalk virus*（NV）に分類され、さらに 7 つの遺伝子群 Genogroup Ⅰ～Ⅶ型に分けられている。そのうちヒトに感染し胃腸炎等を引き起こすのはＧⅠ型 9 種類、ＧⅡ型 19 種類、GⅣ型 1 種類の計 29 種類の遺伝子型で、それぞれの抗原性は異なる。GⅢ型はウシ、ＧⅤ型はマウス、GⅦ型はイヌから発見され、ヒトへの感染性はない[1)]。

ヒトに感染するノロウイルスは現在のところ動物や人工細胞を使った培養ができないため、消毒薬の効果を検討する場合には、培養可能なサロゲート（代替）ウイルスを用いて評価する手法が一般的である。

サロゲートウイルスには NV ＧⅤ型（Murine norovirus；MNV）や、NV と同じ *Caliciviridae* に属する *Vesivirus Feline calicivirus*（FCV）などが用いられるが、これらのウイルスに対するアルコールの効果は、必ずしも一致した見解が示されていない[2-7)]。要因としては同系統のウイルスでも属や種、遺伝子型によってアルコールに対する感受性に差異を示す可能性が考えられるが、同系統ウイルスでのアルコール感受性を比較した報告はない。

また、FCV に対し一定の効果が得られるアルコール濃度であれば連続作用により完全不活化されるということが示されているが[8)]、*Poliovirus* に対し次亜塩素酸ナトリウムを連続的に作用させると、次亜塩素酸ナトリウムに耐性を示すと報告があり[9)]、連続作用による影響も不明確である。

さらに、エンベロープウイルスの最外側器官であるエンベロープはリン脂質が多く含まれるため疎水性が高く、アルコールの脱脂作用によって容易に不活化されるが、エンベロープを持たないウイルス（ノンエベロープウイルス）は最外側器官がカプシドとなり、カプシドはリン脂質含有量が少ないため親水性が高く、アルコールに抵抗性傾向を示すといわれている[10-11)]。ノンエベロープウイルスには NV や FCV、*Adenovirus*、*Poliovirus* などが含まれるが、これらウイルスにおけるアルコール感受性も均一性に欠ける[12-14)]。その要因としては、アルコールは親水性のヒドロキシ基と疎水性のアルキル基を持つ構造をしており、脱脂作用はヒドロキシ基が脂質と結合することによって反応が進むため、ヒドロキシ基との親和性が高いウイルスの方がより不活化効果が高いと推測されることから[15)]、カプシドの疎水性の相違によってアルコール感受性が異なる可能性がある。

今回、ノロウイルスのサロゲートウイルスである FCV の異なる 2 種類の遺伝子型および MNV を用いて、ウイルス属および遺伝子型によるアルコール感受性の違いと疎水性の関係性を実験検証した。また、ウイルスが完全不活化されない濃度の消毒薬連続作用による影響を FCV の標準ウイルス株とエタノールを用いて検証した。

方法

1. アルコール感受性の評価

1-1. 試験製剤

試験にはメタノール（試薬特級　和光純薬工業㈱）、エタノール（試薬特級　和光純薬工業㈱）、n-プロパノール（試薬特級　和光純薬工業㈱）、2-プロパノール（試薬特級　和光純薬工業㈱）を使用した。

1-2. 供試ウイルス

Feline calicivirus ATCC VR-782（以下 FCV F9）および *Feline calicivirus* F4（以下 FCV F4）は Crandell-Reese feline kidney cell line（以下 CRFK 細胞）で、Murine norovirus S7（MNV）は Mouse monocyte/macrophage cell line RAW264（以下 RAW 細胞）で増殖させて試験に使用した。

1-3. ウイルス不活化効果の確認

ウイルス不活化効果の評価は Time-Kill 法により行った。接触時に 10、20、30、40、50、60、70、80、90v/v%となるように調製した試験製剤 900µL に供試ウイルス液 100µL を混和した。30 秒後、100µL サンプリングし、不活性化剤（FCV ; 10%NCS 添加 DMEM、MNV ; 10%FBS 添加 MEM）900µL に加え、十分混和して反応を停止した。反応液は細胞培養液（FCV ; 2%NCS 添加 DMEM、MNV ; 10%FBS 添加 MEM）で 10 倍希釈法による希釈系列を作成し、事前に 96well マイクロプレートに培養しておいた宿主細胞（FCV ; CRFK 細胞、MNV ; RAW 細胞）に 10µL/well を 4well ずつ接種し、炭酸ガス培養装置（37℃、5%CO_2）内で培養した。FCV は 3 日間、MNV は 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、$TCID_{50}$ 法（Behrens-Kärber 法）によりウイルス感染価を算出した。試験は各 5 回実施し、ウイルス感染価の平均値を求めた。図 1 に FCV 非感染の CRFK 細胞と FCV 感染により引き起こされた CRFK 細胞の CPE、図 2 に MNV 非感染の RAW 細胞と RAW 感染により引き起こされた RAW 細胞の CPE の顕微鏡像を示す。

2. エタノール連続作用による影響

2-1. 供試ウイルス

CRFK 細胞で増殖させた FCV F9 を 0 cycle とした。接触時に 50v/v%となるように調製したエタノール 4.5mL に 0 cycle の FCV 0.5 mL を混和し、5 分後に 1 mL サンプリングし、不活化剤（10%NCS 添加 DMEM）9 mL と混和して反応を停止させた。事前にシャーレに培養しておいた CRFK 細胞に反応液を接種して培養し、この培養液を 3 回連続して凍結融解した後、1000Gravity（以下 G）で 15 分間の遠心分離を行い、上清を回収した。これを 1 cycle として同様の操作を 10 cycle まで繰り返し、0、5、10 cycle の FCV F9 を試験に用いた。

2-2. エタノール連続作用後のアルコール感受性の評価

エタノール連続作用後のアルコール感受性の評価は Time-Kill 法により行った。接触時に 50v/v%となるように調製したエタノール 900 µL に供試ウイルス液 100 µL を混和した。15、30、60、180、300 秒後、100 µL サンプリングし、不活性化剤（10%NCS 添加 DMEM）900 µL に加え、十分混和して反応を停止させた。反応液は細胞培養液（2%NCS 添加 DMEM）で 10 倍希釈法による希釈系列を作成し、事前に 96 well マイクロプレートに培養しておいた CRFK 細胞に 10 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。3 日間培養後、顕微鏡下で CPE の出現を観察し、$TCID_{50}$ 法によりウイルス感染価を算出した。試験は各 5 回実施し、ウイルス感染価の平均値を求めた。

3. ウイルスの疎水性評価

3-1. 供試ウイルス

FCV F9 および FCV F4、MNV、50v/v%エタノール 10cycle の FCV F9 を試験に使用した。

3-2. ウイルスの透析

ウイルス培養液には、血清や細胞由来のタンパク質が多く含まれ、疎水性相互作用樹脂への吸着に影響を与えると考えられるため、事前に透析を行った。ウイルス培養液 10mL を入れた透析チューブ（Dialysis Membrane Size 20　和光純薬工業㈱）をバッファー（0.1M リン酸緩衝液（pH7.8）または 0.1M HEPES 緩衝液（pH8.1））1L 中にセットし、4℃で透析した。3 時間後にバッファーを交換し、さらに一晩透析した。透析チューブを RO 水 1L 中に移し、4℃で透析した。3 時間後に RO 水を交換し、さらに一晩透析した。透析チューブから透析済みのウイルス液を回収し、孔径 0.2µm のフィルター（ミニザルト®　Sartorius）でろ過滅菌し、得られたろ液を 4.0M NaCl 水溶液と等量混合して作製した 2.0M NaCl ウイルス液を試験に用いた。

3-3. 疎水性相互作用樹脂を用いたバッチ法によるウイルス吸着率の測定

ウイルスの疎水性評価は疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC：Hydrophobic Interaction Chromatography）法 [16]を応用して行った。疎水性相互作用樹脂（Phenyl Sepharose 6 Fast Flow(High Sub)　GE healthcare）500µL をマイクロチューブに入れ、2.0M NaCl 水溶液 1mL を加えて十分に撹拌後、800G で 2 分間遠心し、上清を除去した。この操作を 5 回繰り返し行い、樹脂を 2.0M NaCl 水溶液で平衡化した。2.0M NaCl ウイルス液 500µL を添加し、ローテーターで 1 時間撹拌、800G で 2 分間遠心し、上清を孔径 0.2µL のフィルターでろ過した。ろ液を細胞培養液（2%NCS 添加 DMEM）で 10 倍希釈法による希釈系列を作成し、事前に 96well マイクロプレートに培養しておいた宿主細胞（FCV；CRFK 細胞、MNV；RAW 細胞）に 100µL/well を 8well ずつ接種し、炭酸ガス培養装置（37℃、5%CO_2）内で培養した。FCV は 3 日間、MNV は 5 日間培養後、顕微鏡下で CPE の出現を観察し、$TCID_{50}$ 法によりウイルス感染価を算出し、下記計算式にて吸着率を算出した。試験は各 3 回実施し、吸着率の平均値を求めた。

＜吸着率の計算方法＞

$$\frac{\text{試験前のウイルス感染価} - \text{回収液のウイルス感染価}}{\text{試験前のウイルス感染価}} \times 100\ (\%)$$

4. 統計処理

アルコールの感受性評価ではウイルス感染価の対数減少値 4Log 以上で有効とし、有効でない濃度においては ATCC 株である FCV F9 と MNV あるいは FCV F4 のウイルス感染価の対数減少値を、エタノール連続作用による影響評価では 0cycle と 5cycle あるいは 10cycle をそれぞれ t 検定により比較し、$P<0.05$ をもって有意差ありとした。

結果

1. メタノールによる不活化効果

メタノールによる FCV F9 および FCV F4、MNV の不活化効果を表 1 および図 3 に示す。FCV F9 および FCV F4、MNV はいずれもメタノール濃度が高くなるほど不活化効果が高く、FCV F9 および FCV F4 は 90v/v%、MNV では 60%v/v%以上でウイルス感染価を 4Log 以上減少させた。なお、FCV F9 と FCV F4 では有意差は認められなかったが、50～80v/v%の濃度域で FCV F9 よりも MNV の方が高い感受性を示した（$P<0.01$）。

2. エタノールによる不活化効果

エタノールによる FCV F9 および FCV F4、MNV の不活化効果を表 1 および図 4 に示す。FCV F9 と FCV F4 共に 60v/v%で最も不活化効果が高く、40v/v%以上で FCV F9 よりも FCV F4 の方が有意に高いエタノール感受性を示した（$P<0.01$）。しかし、60v/v%におけるウイルス感染価の対数減少値は FCV F9 で 1.45、FCV F4 で 3.55 であり、完全な不活化効果は認められず、日本で常用されている消毒用エタノール（76.9～81.4v/v%）と同等の濃度である 80v/v%におけるウイルス感染価の対数減少値でも、FCV F9 で 0.45、FCV F4 で 1.55 であり十分な効果が得られなかった。一方、MNV では 50v/v%以上でウイルス感染価を 4log 以上減少させ、両 FCV よりも高い感受性を示した。

3. n-プロパノールによる不活化効果

n-プロパノールによる FCV F9 および FCV F4、MNV の不活化効果を表 1 および図 5 に示す。FCV F9 と FCV F4 共に 40v/v%で最も不活化効果が高く、ウイルス感染価の対数減少値は FCV F9 で 3.7、FCV F4 で 4.35 であった。また、20v/v%以上で FCV F9 よりも FCV F4 の方が有意に高い感受性を示した（$P<0.05$）。一方、MNV では 40v/v%以上でウイルス感染価を 4log 以上減少させ、両 FCV よりも高い感受性を示した。

4. 2-プロパノールによる不活化効果

2-プロパノールによる FCV F9 および FCV F4 の不活化効果を表 1 および図 6 に示す。

FCV F9 と FCV F4 共に 50v/v%で最も不活化効果が高く、30v/v%以上において FCV F9 よりも FCV F4 の方が有意に高い不活化効果を示した（P<0.05）。しかし、50v/v%におけるウイルス感染価の対数減少値は FCV F9 で 1.05、FCV F4 で 3.45 であり、完全な不活化効果は認められなかった。日本で常用されているイソプロパノールと同等の濃度である 70v/v%におけるウイルス感染価の対数減少値でも、FCV F9 で 0.45、FCV F4 で 1.4 であり十分な効果が得られなかった。一方、MNV では 60v/v%以上でウイルス感染価を 4log 以上減少させ、両 FCV よりも高い感受性を示した。

5. 50v/v%エタノール連続作用後 FCV F9 のエタノール感受性

50v/v%エタノール連続作用後 FCV F9 のエタノール感受性を図 7 に示す。15 秒、30 秒、60 秒、180 秒、300 秒の各作用時間におけるウイルス感染価の対数減少値は 0 cycle では 0.58、1.08、2.29、3.29、3.33、5 cycle では 0.50、0.57、1.15、2.13、2,68、10 cycle では 0.15、0.40、0.83、2.17、2.68 であり、作用時間が長くなるほど不活化効果が高くなる傾向を示したが、いずれも 300 秒以内に完全不活化には至らなかった。また、0 cycle よりも 5 cycle および 10 cycle の方が有意にエタノール感受性が低下した（P<0.05）。

6. ウイルスの疎水性評価

ウイルス吸着率の平均値を表 2 に示す。MNV で 99.4%、FCV F4 で 90.0%、FCV F9 で 86.9%であり、ウイルス属および遺伝子型で明らかな相違が見られた。また、50v/v%エタノール連続作用 10cycle の FCV F9 のウイルス吸着率は 43.8%となり、エタノールの連続作用によりウイルスの疎水性が増した。

考察

1. ノロウイルスのサロゲートウイルスのアルコール感受性

FCV や MNV などのノンエンベロープウイルスの最外側器官であるカプシドは主成分がタンパク質であり、脂質の含有量が少ないため、エタノールの脱脂作用は効果的でない。今回の研究では FCV よりも MNV の方がアルコール感受性が高く、ウイルス属によりに差異がみられた。また、メタノール以外のエタノール、n-プロパノール、2-プロパノールで FCV F9 よりも FCV F4 の方が高い感受性を示し、遺伝子型による差異も明らかとなった。

ウイルス分類学上近縁なウイルスは互いに類似した性状を示すことが多いことから、ノロウイルスと同じ *Caliciviridae* に属し、細胞培養可能な FCV がサロゲートウイルスとして用いられてきた。さらに 2004 年、*Norovirus* に属する MNV の細胞培養が可能であることが報告されたことにより [17]、MNV による不活化試験等が行われるようになった。このように現在では、ノロウイルスのサロゲートウイルスとして主に FCV や MNV が使用されるが、これらのアルコール感受性は異なり、本研究の結果から、ウイルス分類学上近縁なウイルスであってもアルコール感受性に関わる遺伝子が同等とは限らず、サロゲートウイルスによる評価だけでノロウイルスのアルコール感受性を判断するのは注意が必要であると示唆された。

また、ノロウイルスは一本鎖 RNA ウイルスであり[18]、遺伝子変異が起こりやすいことから、常にサロゲートウイルスがヒトノロウイルスと同等であるとは断言しがたい。ヒトノロウイルスについては 2006 年にブタへの感染が、2007 年にはヒト結腸癌由来株化細胞（CaCo2 細胞）の三次元立体培養法による増殖が確認されているが、その後の研究報告はない[19, 20]。しかし、近年、ヒトの B 細胞を用いた NV GⅡ.4 Sydney 株の培養法が報告されていることから、今後はヒトノロウイルスを用いた不活化試験の確立が期待される[21, 22]。

2. FCV F9 に対するエタノール連続作用による影響

ノロウイルスのサロゲートウイルスのうち、FCV F9 が最もアルコール抵抗性が高かったが、比較的有効性が高い 50v/v%エタノールでも 5 分間の作用では完全には不活化されず、一部の FCV が活性を保ったまま感染性を有していた。ある一定の効果が得られるアルコール濃度であれば連続作用により完全不活化されるということが示されているが[8]、本研究より 50v/v/%エタノールを連続作用させることによってエタノール感受性が低下し、10 回繰り返し作用しても完全不活化には至らないことが判明した。その要因としては、カプシドが肥厚することでエタノールに抵抗性を示す FCV が潜在的に存在しており、エタノールを連続作用させることによってエタノール抵抗性（カプシド高肥厚）ウイルスが選択的に生存した、あるいは元来、疎水性が高く、エタノールとの親和性がない、結果としてエタノール抵抗性傾向を示す FCV が選択された可能性が考えられる。

前者に関しては、今回の実験ではカプシド層の肥厚を比較していないため仮説の領域を脱し得ないが、後者については実験結果として疎水性が高いウイルスが選択的に生存しており、少なくとも、エタノールの連続作用がエタノール抵抗性の FCV を表出させたと推測できる。今回、試験に用いた FCV F9 はいわゆる標準ウイルス株であるが、繰り返し継代することにより、遺伝子的な変異が起き、疎水性の高い FCV が発生した可能性があるが、エタノール感受性 FCV と抵抗性 FCV のゲノム解析は未実施のため、今後はカプシドをコードする領域に変異があるかを調べる必要がある。

しかしながら、FCV へのエタノール連続作用によってエタノール抵抗性の FCV が出現することは事実であり、他のウイルスでも同様な機序が働く可能性は否めない。医療現場ではエタノールを用いて手指や環境を消毒する機会があるが、エタノールの連続使用によってノンエベロープウイルスが選択的に生存し、期待される消毒効果が得られないことも想定される。エタノールの消毒効果が不明確なウイルスを対象とした使用は、抵抗性ウイルスの出現を助長させる可能性があり注意が必要である。

3. ウイルスの疎水性とアルコール感受性の関係

ウイルスの疎水性評価では MNV、FCV F4、FCV F9、50v/v%エタノール連続作用 10cycle の FCV F9 の順で疎水性が高くなり、エタノール感受性の順と相関した。アルコールの主な消毒機序としては脱脂があげられる[23]。エンベロープウイルスでは表面を覆うエンベロープの主成分がリン脂質であるため、アルコールの脱脂作用によって脂質が溶解し、ウイルスの内容物が漏出して不活化される。一方、MNV や FCV などのノンエンベロープウイルスでは、蛋白質が主成分であるカプシドがウイルスの最外側器官である。カプシドはリ

ン脂質含有量が少ないため、一般的にアルコールによる不活化には時間を要すると考えられるが、その感受性の度合いはウイルスにより異なる。また、アルコールは親水性のヒドロキシ基（-OH）と疎水性のアルキル基（-C_nH_{2n+1}）を持つ構造をしており、脱脂作用はヒドロキシ基が脂質と結合することによって反応が進む。つまり、ヒドロキシ基との親和性が高いウイルスの方がよりアルコール感受性が高くなると考えられる。MNV や FCV F4 は FCV F9 よりも高い疎水性を示したことから、脂質を多く含有する可能性が高く、ヒドロキシ基との親和がスムーズとなるためアルコールに対してもより感受性となると示唆された。

つまり、ウイルス属や同種ウイルスでも遺伝子型によってアルコールの不活化効果に差異を示す要因としては、カプシドのリン脂質含有率や疎水性があげられる。これらは同種のウイルスでも遺伝子型の相違によって表面の構造に若干の差異があるために起こる現象と推察されるが、遺伝子型の相違と表面構造の関連性に関しては、今後の研究が期待される。しかしながら、本研究における疎水性評価は HIC 法のみの実施であり、他法での実験や評価を重ね、より詳細な検討が必要であろう。

さらに本研究では、2 種類の FCV に対し最も効果が高い濃度はアルコールの種類によって異なり、アルコールの炭素数が多いほど、最大効果を示す濃度が低濃度域に遷移する傾向がみられた。アルコールの炭素数が増加するとアルキル基数も比例して多くなるため、より疎水性が増すことから[24]、より親水性が高い低濃度域で効果が高くなったと推測された。一概にアルコールといってもその分子構造によって有効濃度に差異があることも示唆されるため、使用するアルコールがどの濃度で最大限の効果を発揮するかを精査する必要がある。

結論

ウイルス分類学上近縁なウイルスであっても消毒薬感受性に関わる遺伝子が同等とは限らない。また、ヒトノロウイルスおよびそのサロゲートウイルスは遺伝子変異を起こす可能性もあり、サロゲートウイルスよる評価だけでヒトノロウイルスに対する消毒薬の効果を判断するのは注意が必要である。さらに、効果が不確実な濃度での消毒薬の使用は、抵抗性ウイルスの出現を助長させる可能性があり、消毒薬使用の際は有効性が確実な濃度を選択することが重要である。ノンエンベロープウイルスでもウイルス属や遺伝子型によりアルコール感受性が異なるのは、カプシドの疎水性が関連しており、アルコール感受性の評価にウイルス疎水性の評価が利用可能であると思われる。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました指導教官である小林寛伊研究科長に深く感謝致します。また、本研究にあたりアドバイスをいただきましたサラヤ株式会社バイオケミカル研究所の古田太郎顧問、および実験にあたりご協力いただきましたサラヤ株式会社バイオケミカル研究所の皆様に感謝致します。

引用文献

1) Jan V. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 2015; 53(2): 373-381.

2) Park GW, Barclay L, Macinga D, et al. Comparative efficacy of seven hand sanitizers against murine norovirus, feline calicivirus, and GII.4 norovirus. *J Food Protect.* 2010; 73(12): 2232-2238.

3) Cromeans T, Park GW, Costantini V, et al. Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80(18): 5743-5751.

4) D'Souza DH, Su X. Efficacy of chemical treatments against murine norovirus, feline calicivirus, and MS2 bacteriophage. *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7(3): 319-326.

5) Paulmann D, Steinmann J, Becker B, et al. Virucidal activity of different alcohols against murine norovirus, a surrogate of human norovirus. *J Hosp Infect.* 2011; 79(4): 378-379.

6) Shimizu-Onda Y, Akasaka T, Yagyu F, et al. The virucidal effect against murine norovirus and feline calicivirus as surrogates for human norovirus by ethanol-based sanitizers. *J Infect Chemother.* 2013; 19(4): 779-781.

7) Wang Q, Zhang Z, Saif LJ. Stability of and attachment to lettuce by a culturable porcine sapovirus surrogate for human caliciviruses. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(11): 3932-3940.

8) 新版 増補版 消毒と滅菌のガイドライン. 於:小林寛伊編. 消毒と滅菌のガイドライン. 第 3 版第 4 刷. 東京：へるす出版 2015;80.

9) Robert CB, Peter TBS, Susan MS. Development of poliovirus having increased resistance to chlorine inactivation. *Appl Environ Micribiol.* 1977; 34(6): 849-853.

10) Herbert NP, Daniel LP, Richard NP. Principles of viral control and transmission. *Disinfectant Sterilization and Preservation.* 1991; 411-444.

11) Klein M, Deforest A. Antiviral action of germicides. *Soap and Chemical Specialities.* 1963; 39(7): 70-72.

12) Macinga DR, Sattar SA, Jaykus LA, et al. Improved inactivation of nonenveloped enteric viruses and their surrogates by a novel alcohol-based hand sanitizer. *Appl Environ Micribiol.* 2008; 74(16): 5047-5052.

13) Eterpi M, McDonnell G, Thomas V. Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J Hosp Infect.* 2009; 73(1): 64-70.

14) Kramer A, Galabov AS, Sattar SA, et al. Virucidal activity of a new hand disinfectant with reduced ethanol content: comparison with other alcohol-based formulations. *J Hosp Infect.* 2006; 62(1): 98-106.

15) Oshikamo R, Tohya Y, Kawaguchi Y, et al. The molecular cloning and sequence of an open reading frame encoding for non-structural proteins of feline calicivirus F4 strain isolated in Japan. *J Vet Med Sci.* 1994; 15(6): 1093-1099.

16) Dahlbäck B, Hermansson M, Kjelleberg S, et al. The hydrophobicity of bacteria - an important factor in their initial adhesion at the air-water interface. *Arch Microbiol.* 1981; 128(3): 267-270.
17) Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, et al. Replication of norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* 2004; 12(2): 2076-2084.
18) Glass RI, parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2009; 361(18): 1776-1785.
19) Cheetham S, Souza M, Meulia T, et al. Pathogenesis of a genogroup Ⅱ human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol.* 2006; 80(21): 10372-10381.
20) Staub TM, Höner zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, et al. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(3): 396-403.
21) Jones MK, Watanabe M, Zhu S, et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science.* 2014; 7(346): 755-759.
22) Jones MK, Grau KR, Costantini V, et al. Human norovirus culture in B cells. Nat Protoc. 2015; 10(12): 1939-1947.
23) 山下 勝. アルコール類の微生物に対する作用. 防菌防黴. 1996; 24(3): 195-219.
24) 古田 太郎, 大木 香, 島田 明美, 他. 水溶性溶剤の抗菌活性 : 疎水性パラメータおよび化学構造との関係. 防菌防黴. 1999; 21(8): 439-444.

表 1　各種アルコールによる不活化効果（作用時間；30 秒、n=5）

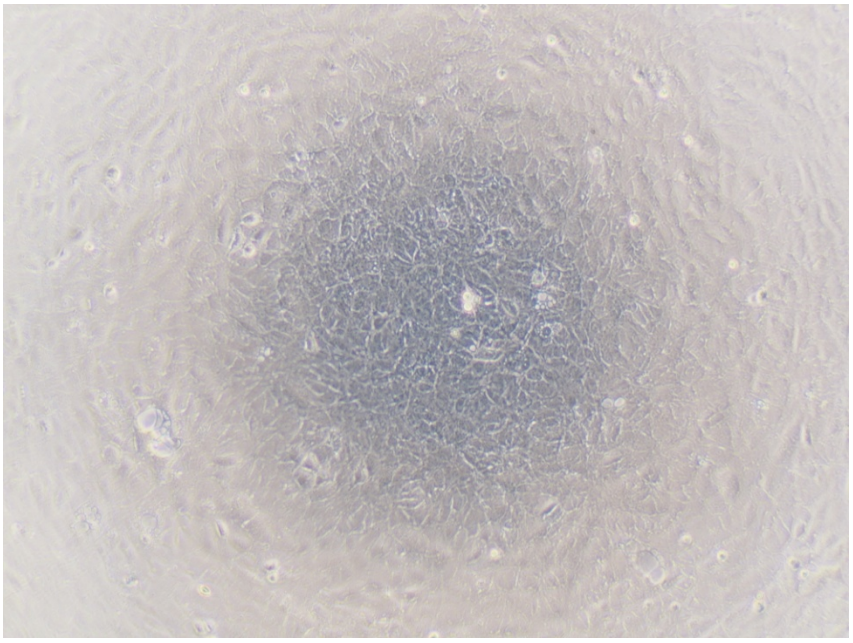
アルコールの種類	濃度 (v/v%)	対数減少値（Log $TCID_{50}$）			*P*値	
		MNV	FCV F9	FCV F4	MNV vs FVC F9	FCV F9 vs FVC F4
メタノール	10	0.25	-0.1	0.1	0.0479	0.1265
	20	0.05	N.T.	N.T.	−	−
	30	0.4	0.15	0.05	0.3511	0.5871
	40	0.35	N.T.	N.T.	−	−
	50	3.65	0.41	0.45	<0.0001	0.8374
	60	>4	1.05	0.8	−	0.1869
	70	>4	2.25	1.7	−	0.1529
	80	>4	3.9	3.6	−	0.3268
	90	>4	4.7	4.35	−	0.014
エタノール	10	0.15	0.15	0.6	1	0.024
	20	0.25	N.T.	N.T.	−	−
	30	0.4	0.25	0.6	0.5927	0.2643
	40	1.55	0.45	1.55	<0.0001	<0.0001
	50	>4	1.35	3.3	−	<0.0001
	60	>4	1.45	3.55	−	<0.0001
	70	>4	0.9	1.65	−	0.0359
	80	>4	0.45	1.55	−	0.0007
	90	>4	0.55	0.6	−	0.8287
n-プロパノール	10	0.1	0.1	0.05	1	0.8171
	20	1.05	0.7	3.1	0.2335	0.0001
	30	3.75	2.25	4.3	0.0003	<0.0001
	40	>4	3.7	4.35	−	0.0382
	50	>4	2.9	3.75	−	0.0108
	60	>4	1.5	3.15	−	<0.0001
	70	>4	1.2	3	−	<0.0001
	80	>4	0.7	1.95	−	0.0263
	90	>4	0.75	0.35	−	0.0002
2-プロパノール	10	0.1	-0.05	0.35	0.0943	0.0535
	20	0.1	N.T.	N.T.	−	−
	30	0.25	0.2	1.0	0.7404	0.0207
	40	1.55	0.85	2.85	0.0009	0.0003
	50	3.4	1.05	3.45	<0.0001	<0.0001
	60	>4	0.95	3.1	−	0.0002
	70	>4	0.45	1.4	−	0.0146
	80	>4	0.2	1.05	−	<0.0001
	90	>4	0.25	0.8	−	0.0172

N.T.；試験せず

表 2　ウイルス吸着率（疎水性）（n=3）

ウイルス	吸着率（平均値）
MNV	99.4%
FCV F4	90.0%
FCV F9	86.9%
50v/v%エタノール連続作用 10cycle FCV F9	43.8%

（A）



（B）

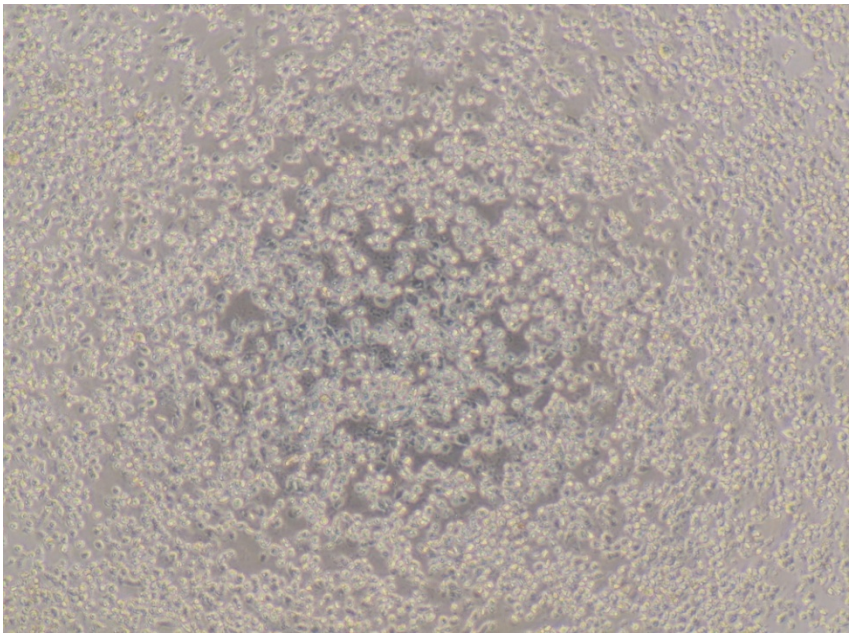
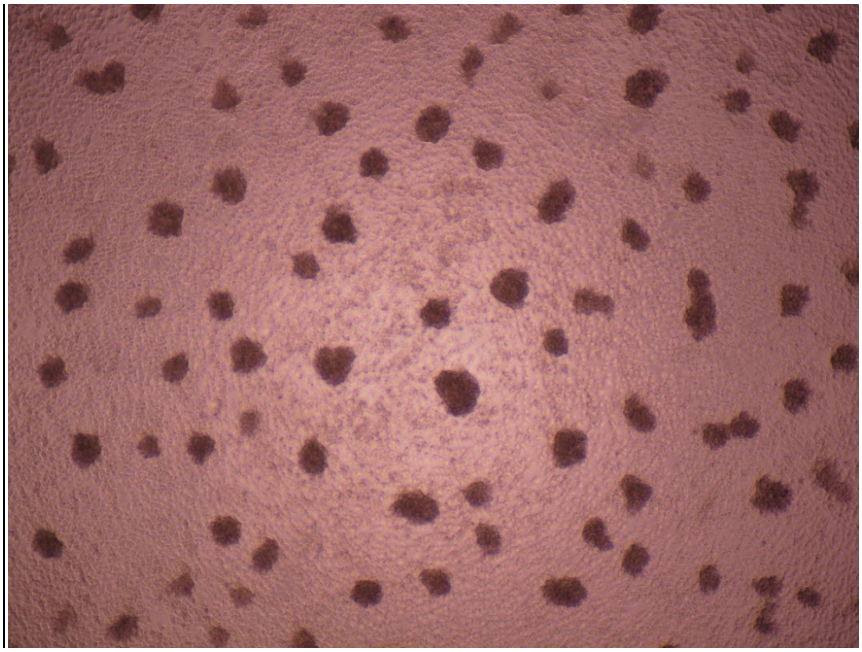


図 1　FCV 感染による細胞変性効果 Cytopathic effect（CPE）
（A）FCV 非感染 CRFK 細胞（CPE－）
（B）FCV 感染 CRFK 細胞（CPE＋）

（A）



（B）

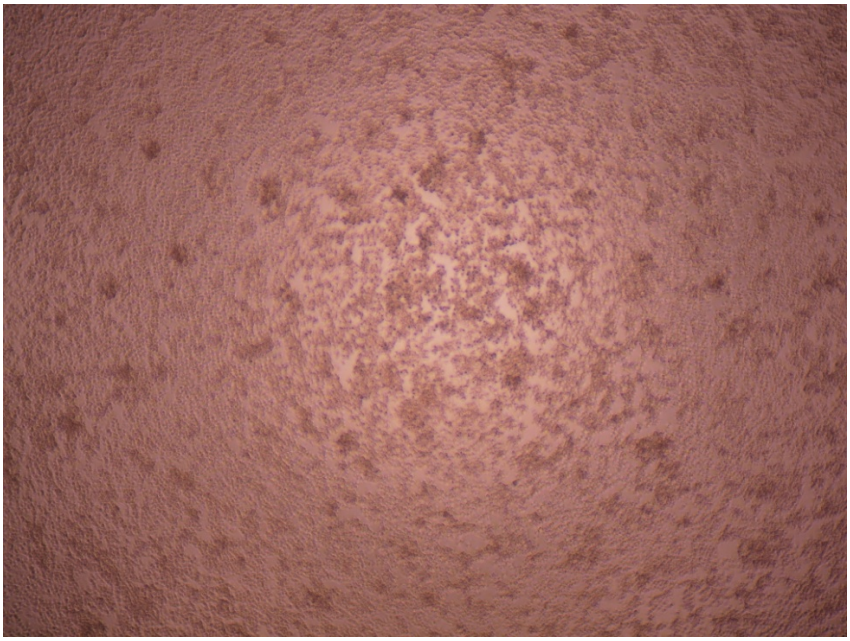


図 1　MNV 感染による細胞変性効果（CPE）
（A）MNV 非感染 RAW 細胞（CPE－）
（B）MNV 感染 RAW 細胞（CPE＋）

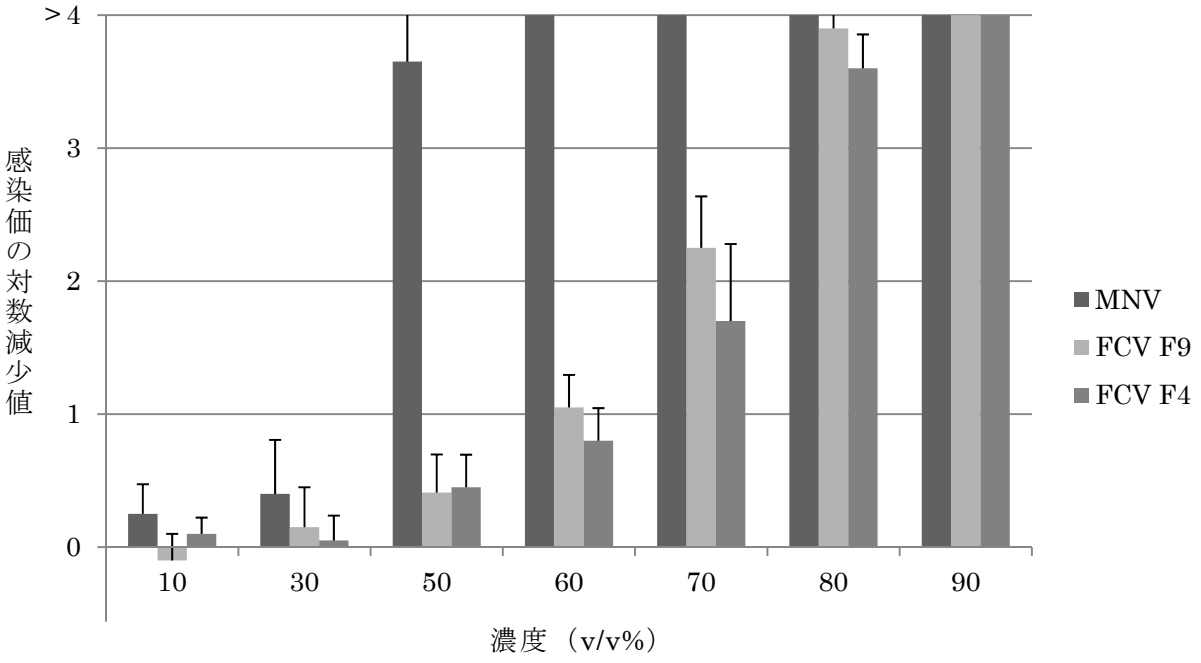


図 3　メタノールによる不活化効果（作用時間：30 秒）
（mean±S.D.，n=5）

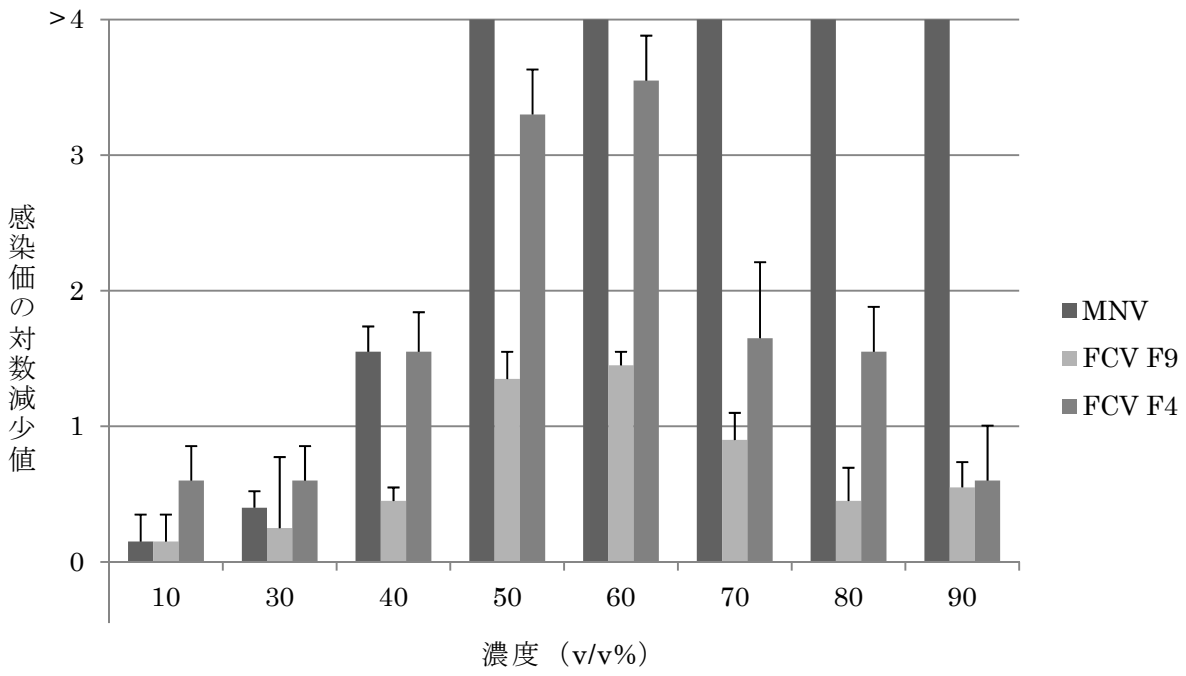


図 4　エタノールによる不活化効果（作用時間：30 秒）
（mean±S.D.，n=5）

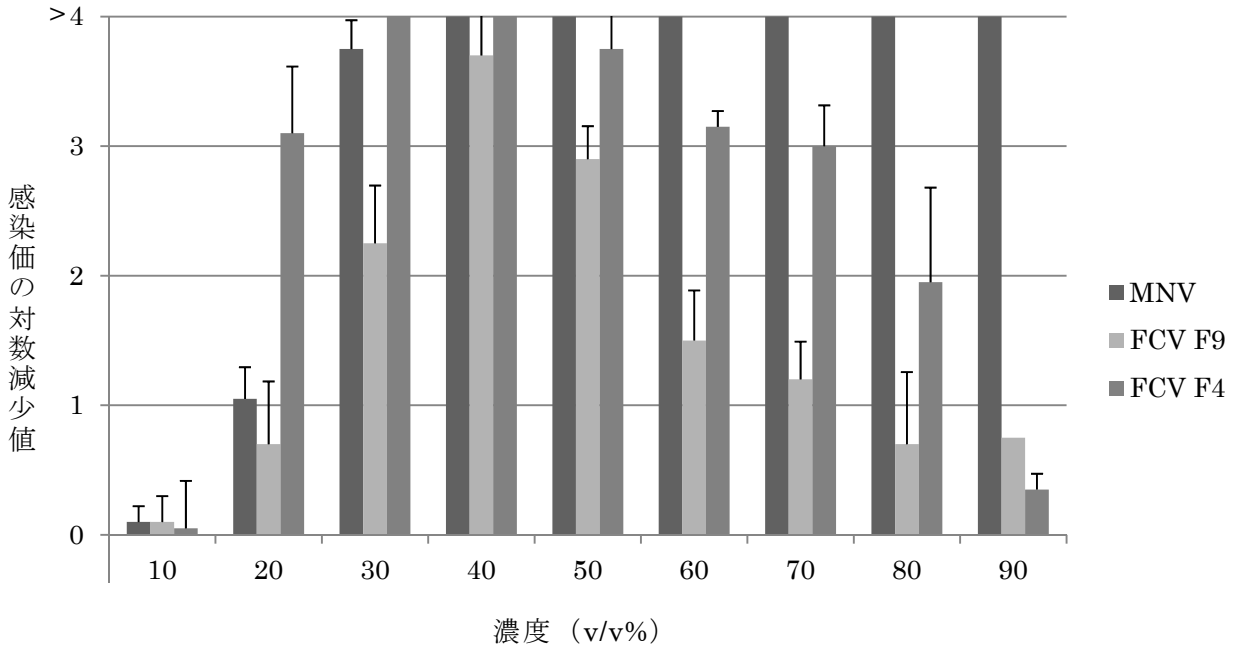


図 5　n-プロパノールによる不活化効果（作用時間：30 秒）
（mean±S.D.，n=5）

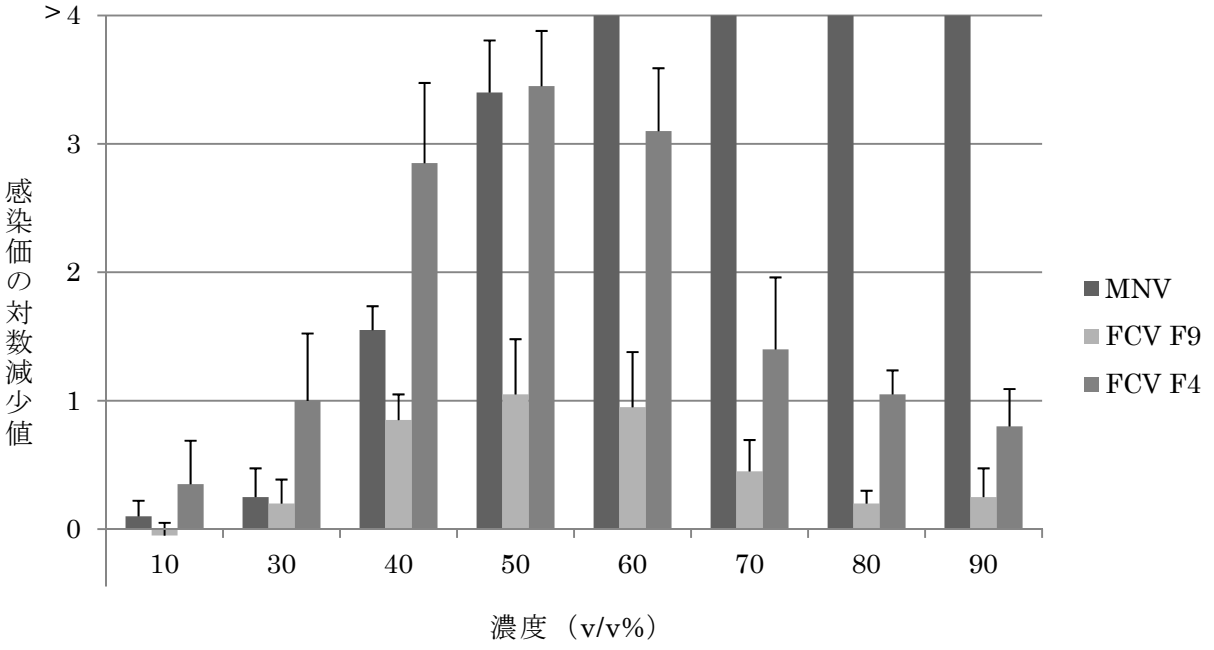


図 6　2-プロパノールによる不活化効果（作用時間：30 秒）
（mean±S.D.，n=5）

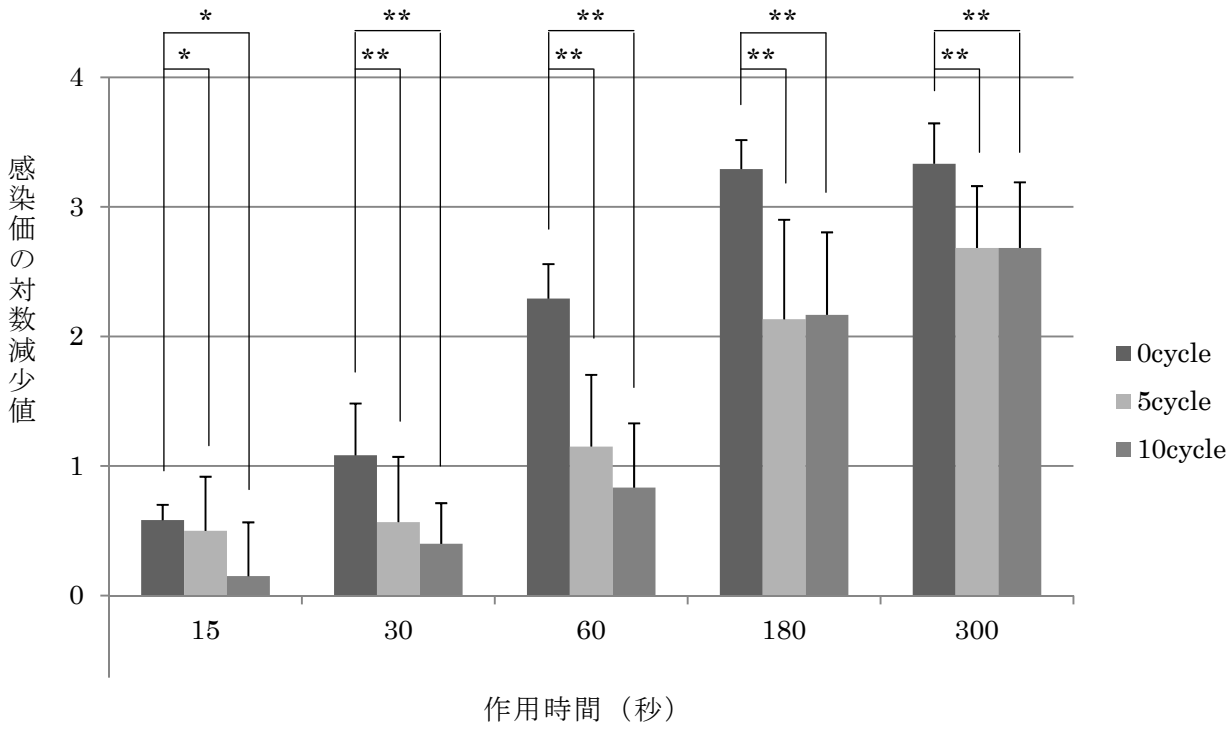


図 7　50v/v%エタノール連続作用後 FCV のエタノール感受性

*：P<0.05　**：P<0.01（mean±S.D., n=5）

Evaluation of susceptibility to alcohol and hydrophobicity of Norovirus using a surrogate virus

Yoko Yoshida
Division of Infection Prevention and Control, Tokyo Healthcare University Postgraduate School, Faculty of Healthcare, Department of Healthcare

OBJECTIVE. To identify the relation between susceptibility to alcohol and hydrophobicity according to virus genus and genotype using two different genotypes of FCV and MNV, which are surrogate virus of human norovirus and MNV. In addition, this paper tries to verify the effect of continuous disinfection with a concentration that the virus cannot be inactivated completely using standard virus strain of FCV and ethanol.

DESIGN. Experimental study.

METHODS. We used FCV F9, FCV F4, MNV and FCV F9 which were exposed to 50v/v% ethanol continuously. The time-kill method was used to evaluate the virucidal activity of each type of alcohol and the viral infectivity was determined with the $TCID_{50}$ method. HIC method was applied to evaluate the viral hydrophobicity.

RESULTS. The MNV had a greater susceptibility to each alcohol than FCV. Among FCV, FCV F4 had a higher susceptibility to alcohol than FCV F9 and the difference according to virus genus and genotype was revealed. FCV F9 could not be inactivated completely by 50 v/v% ethanol, which is comparatively highly effective, and susceptibility to alcohol was decreased after continuous exposure to 50 v/v% ethanol. The hydrophobicity of each virus were correlated with the susceptibility to ethanol.

CONCLUSION. Even if the viruses are closely related in virus classification, it does not mean the gene for susceptibility to alcohol is equivalent. Therefore, it is important to understand that human norovirus and surrogate viruses may have different susceptibility to disinfectants. Also, it is essential to use disinfectant with an effective concentration since the use of an ineffective concentration may cause the occurrence of a resistant virus. The difference of susceptibility to alcohol according to the genus and genotype in an non-enveloped virus is related to the hydrophobicity of its capsid. Thus virus hydrophobicity can be utilized to evaluate the susceptibility to alcohol.