

No.53 Jun . 2006

ウイルス不活化試験について

はじめに

サーズウイルス，トリインフルエンザウイルス，ノロウイルス等，私たちの健康を直接脅かす恐れがあるといわれるウイルスの話題をたびたび耳にします。これらの不安から少しでも安心感を得たいという消費者のニーズを反映して，消毒剤，殺菌剤のほかにもマスク，空気清浄機，掃除機等にウイルス対応をうたったものが数多く出ているようです。では，ウイルスとはそもそもどのようなものなのでしょうか。また，その効果はどのようにして調べることができるのでしょうか。

ウイルスとは

ウイルスは大きさ数十～数百ナノメートルの粒子で，カプシドと呼ばれる膜とその中の遺伝子(DNA又はRNA)により構成されています。さらに，その外側を覆うエンベロープと呼ばれる膜を持つものもあります(図-1)。ところがウイルスは非常に小さく，限られた遺伝子情報しか持たないため，自分自身の力だけでは増殖することができません。その代わりに，ウイルスは，他の細胞に侵入し，遺伝子をもぐりこませて，その細胞の持つ酵素を利用して自分自身を増殖させます。このように，ウイルスは特殊な増殖様式を取るため，1種類のウイルスが感染することのできる細胞の種類は非常に限られています。例えばインフルエンザウイルスの場合は，ヒト，ブタ，トリに感染し，ノロウイルスの場合は，ヒトの腸管細胞にのみ感染します。

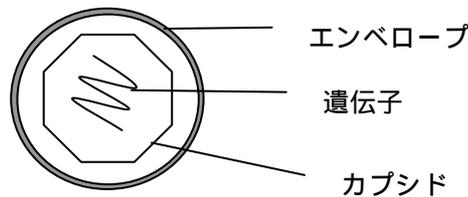


図 - 1 ウイルスの模式図

ウイルスの培養

ウイルスを培養するには，宿主となる細胞に感染させてウイルスを増殖させることが必要です。マウス，ウサギ，ニワトリ等の実験動物や発育鶏卵，培養細胞に感染させて培養します。実験動物を用いる試験は倫理上の問題からなるべく避ける方が望ましいため，弊財団では培養細胞に感染させる方法を採用しています。インフルエンザウイルスはMDCK細胞(イヌ腎細胞由来)に，アデノウイルス，ヘルペスウイルス，ポリオウイルス(ワクチン株)はHEp-2細胞(ヒト由来)に，ネコカリシウイルス(食中毒で問題になっているノロウイルスの近縁種)はCRFK細胞(ネコ腎細胞由来)に感染させ，ウイルスを培養しています。

ウイルスの測定

ウイルスは非常に小さな粒子で、通常の光学顕微鏡では観察することはできません。また、培養するためには、各ウイルスの宿主として特定の細胞が必要です。このような性質を持つウイルスの測定は、限られた方法で行うことができません。一方、測定方法の一つである免疫学的な反応による確認は、病院でのインフルエンザの検査にも用いられています。ただし、ある一定量以上のウイルスが存在する場合にのみ反応するように作られているので、存在するウイルス量が分からないのが欠点です。培養細胞に感染させてウイルス量を定量する方法としては、TCID₅₀(Median tissue culture infectious dose, 50%感染量)を測定する方法や、プラーク法等があります。

TCID₅₀法とプラーク法

TCID₅₀法とプラーク法は、ウイルスに感染すると細胞の形状が変化する現象(細胞変性)を利用したウイルス量の測定法です。なお、ウイルス1個が感染を生じさせるとは限らないので、得られた数値は「ウイルス粒子数」ではなく、正確には「感染価」と呼びます。

一定量のウイルスを含むウイルス液に感染した細胞は、細胞変性を起こします。このウイルス液を希釈し、ある一定以上薄くなると、接種しても細胞変性は起こらなくなります。そこで、細胞を試験管のようなもので何本も培養しておき、ウイルス液を順番に希釈して接種し、ちょうど半分の試験管の細胞が感染する濃度を指してTCID₅₀と呼びます(図-2)。

プラーク法の場合はシート状に培養した培養細胞にウイルス液を接種したあと、全体を寒天のようなゲルで被い培養します。こうすることにより、ウイルスの感染が隣り合った細胞のみに限定されて拡大するため、数日後には感染した部分(プラーク)を1箇所、2箇所...と肉眼で数えることができますようになります。

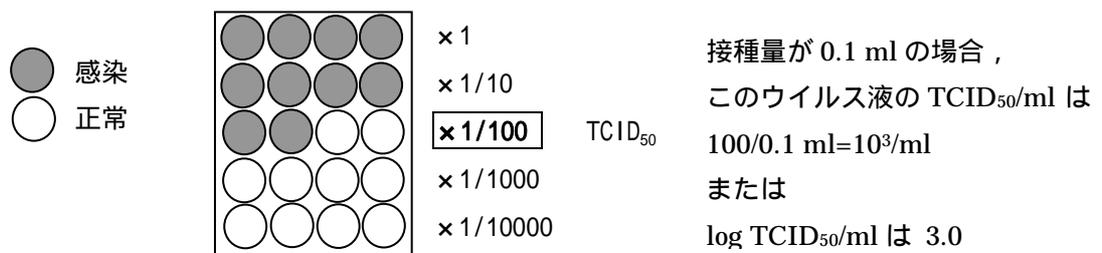


図 - 2 TCID₅₀法

ウイルスの不活化

ウイルスを殺菌剤・消毒剤によって不活化する場合、エンベロープを持つかどうかで薬剤耐性が変わります。エンベロープは薬剤で比較的簡単に破壊されるため、エンベロープを持つウイルス(インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルスなど)は不活化されやすい傾向があり、エンベロープを持たないウイルス(アデノウイルス、ノロウイルスなど)はそれに比べて薬剤耐性が高いとされています。消毒用アルコール、0.05~0.5%次亜塩素酸ナトリウムといった消毒剤は、広範囲のウイルスに対して有効だとされています¹⁾。しかし、ノロウイルスのように薬剤耐性の高いウイルスは、消毒用アルコール

の場合、消毒剤としては比較的長い30分間の浸漬が必要とされているので、消毒条件には注意が必要です²⁾。なお、熱による不活化は、二枚貝のカキのノロウイルスでは85℃以上で1分以上、感染性の廃棄物では98℃以上の煮沸で15～20分間とされています¹⁾。

殺菌剤・消毒剤等のウイルス不活化試験

液状の場合は直接ウイルス液を添加し、一定時間作用後に反応を停止し、ウイルス感染価を測定します。ガス状のものや、揮発成分を利用するものは、非接触状態で密閉容器中で暴露するなどの方法をとったりします。殺菌剤・消毒剤等について試験する場合は、反応の停止が確実に行われているかの確認をしっかりとしておく必要があります。さらに、感染価の測定に使用する培養細胞が、薬剤そのものでダメージを受ける場合も多いので、その点についても十分に確認をしておかないと判定を誤る原因になります。

布・プラスチック板等の抗ウイルス加工したもののウイルス不活化試験

抗ウイルス加工した繊維・プラスチック板等のウイルス不活化試験は、対象とするものとウイルス液を一定時間(通常24時間)接触させた後、ウイルス液を回収し、感染価を測定して行います。

効果の判定

ウイルス不活化効果の有無の判定基準は、自主基準として各自で定める必要があります。通常、殺菌剤・消毒剤のようにウイルスを大幅に減少させるもの場合は、対照と比べて 10^{-4} ～ 10^{-6} の減少差が、抗ウイルス加工のように殺菌剤・消毒剤よりゆるやかな抑制を目的とする場合は、 10^{-2} ～ 10^{-4} 程度の減少差が目安です。対照と比べて 10^{-1} 程度の差は、誤差の範囲と見られるので、効果を判断する場合は、測定回数を増やして統計処理をする必要があります。

参考文献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課：感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き(2004)
- 2) Erwin Duizer, Paul Bijkerk, Barry Rockx, Astrid de Groot, Fleur Twisk, and Marion Koopmans : Inactivation of Caliciviruses, *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 4538-4543(2004)