

原著

# 生活用具における単純ヘルペスウイルスの残存状況と消毒効果

長谷川ともみ

日本性感染症学会誌

Vol.25, No.1

# 生活用具における単純ヘルペスウイルスの残存状況と消毒効果

Residual infectivity and virus particles of herpes simplex virus on household items

長谷川ともみ<sup>1)</sup> 松井弘美<sup>1)</sup> 窪木茉美<sup>2)</sup>  
Tomomi HASEGAWA Hiromi MATSUI Mami KUBOKI  
高尾友里<sup>3)</sup> 大黒 徹<sup>4)</sup> 白木公康<sup>4)</sup>  
Yuri TAKAO Toru DAIKOKU Kimiyasu SHIRAKI

生活用具における単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus type 1 : HSV) の残存状況と消毒効果を組織培養法と real-time PCR 法によって HSV-DNA を定量化し検討を行った。結果は、ガラス、プラスチックでは、乾燥に伴いウイルス接種直後以降、ウイルス感染性 (力価) の低下がみられた。湿潤した状態のガーゼでは 3 時間後もウイルス感染性が維持された。消毒効果の検討では、ガラス、プラスチックともに水拭きで拭き取ることでウイルス感染性が顕著に低下し、アルコール綿で拭き取ることによってウイルスの感染性及び不活化粒子も除去できることが分かった。ガーゼを洗濯、乾燥した場合 real-time PCR 法で残存が認められたが、ウイルス感染性は検出感度以下になることが分かった。このことより、湿潤状況によっては生活用具が HSV 感染の媒介物となりうると考えられるが、アルコール消毒や洗濯、乾燥によって感染性は失われることが定量的に分かった。

Residual infectivity and numbers of virus particles (DNA copy numbers) of herpes simplex virus on household items were evaluated by plaque assay and quantitative PCR methods. Although the viral virus was quickly inactivated on glass or plastic surfaces, it was preserved for at least 3 hours on wet gauze patches. Viral infectivity and viral particles were eliminated by wiping the glass or plastic surface with ethanol for disinfection. Viral infectivity was also lost after the gauze patches containing remnant viral DNA particles were washed. Thus, household items contaminated with HSV- could be a source of HSV infection, and disinfecting agents, such as antiseptic ethanol, or drying eliminated viral infectivity on the surfaces of household items.

*Key words : HSV, Contact infection, Disinfection*

## 緒言

単純ヘルペスウイルス(以下HSVと表記する)は通常、病変部からの直接接触感染である。しかし、無症状者の口腔内分泌物からのウイルス分離はよくあるが、通常の

学校生活でこれらが感染源となることは稀であると報告されている<sup>1)</sup>。また、吉田らによれば、バスタオルやピアニカ、プラスチック製コップ、ガラス製コップなどの生活用具がウイルスの感染を媒介するという症例も報告されており<sup>2)</sup>、小児期における HSV 感染は生活用具を媒体

1) 富山大学大学院医学薬学研究部母性看護学 : Department of Maternity Health Nursing, Toyama University

2) 長野県立こども病院看護部 : Department of Nursing, Nagano Children's Hospital

3) 富山大学附属病院看護部 : Department of Nursing, Toyama University Hospital

4) 富山大学大学院医学薬学研究部ウイルス学 : Department of Virology, Toyama University

2014(平成26)年3月6日受付、同5月15日掲載決定

(〒930-0194)富山市杉谷2630 富山大学大学院医学薬学研究部母性看護学 長谷川ともみ

とする間接的な感染が多いと考えられる。さらに、葛島らによって、同室で生活する感受性者においては、感染率 (84%)、顕性発症率 (95%) とともに極めて高いことが報告されており<sup>3-5)</sup>、HSV 患児がいる場合では保育園内や幼稚園内または同胞の感染率は高いと考えられる。

そこで、本研究の目的は主として乳幼児が使用している生活用具が HSV の媒介物となりうるのかを検討することである。吉田らの実験では、ガラス、プラスチック、ゴム、紙絆創膏、木綿製タオルすべてにおいてウイルス液を塗布または滴下した後 1 時間後までウイルスが存在しており、ガラス、プラスチックでは 3 時間後でもウイルスが分離できたと確認されているが<sup>2)</sup>、感染性 (以下力価) については報告されていない。そこで、本研究では、継時的な HSV の力価評価による感染性の消失過程だけでなく、real-time PCR を用いることによって、ウイルス粒子の残存効果についても検討し、また、日常的に行われる水拭き、アルコール消毒、洗濯による HSV の除去効果についても詳細に検討することとした。

## 対象と方法

### 材料、試薬

細胞培養には Vero 細胞を使用し、6cm 径プラスチックディッシュに 1 層性になるまで 37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 5% 牛血清含イーグル MEM 培地で培養した。

室温 25°C、湿度 50% のセーフティーキャビネット内で、細胞培養実験操作、乾燥作業を行った。ウイルス液には HSV1 野生株 7401H 株 (九州大学医学部ウイルス学、森良一教授より供与：富山大学 ウィルス学教室で継代) を使用した。

ウイルス希釈用培地には、2% 牛血清含イーグル MEM 培地 (抗菌剤入り) を使用し、ウイルス接種後、力価測定用の重層培養液の培養液には 1% メチルセルロース含有 2% 牛血清含イーグル MEM 培地を使用した。

媒介物としたガラスはエタノールにつけたカバーガラスをバーナーで火焰滅菌したものを使用し、プラスチックは細胞培養用 12 well プレートを使用した。ガーゼはオートクレーブにかけ乾燥させたガーゼを使用した

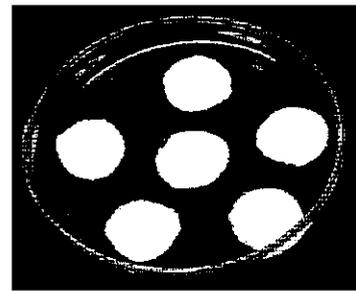


Fig. 1 Photo of autoclaved gauze patches used for the viral inactivation experiments.

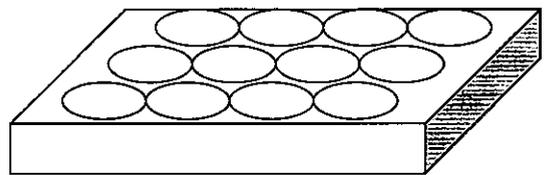


Fig. 2 Illustration of a 12-well culture dish used for the titration of viral infectivity.

#### Figure Legend

- \* 1 : The size of an HSV blister on the lips is thought to be 0.5 ~ 2 mm in diameter. The viral load of the liquid contained in a blister is estimated to be 4  $\mu$ l. However, because 4  $\mu$ l is a very small quantity, after experimentation we decided to use drops of 10  $\mu$ l in volume.
- \* 2 : After each well was inoculated with the drops of virus liquid, the count was started. The culture dish was stored in a safety cabinet at room temperature (25 degrees C).
- \* 3 : In the case of the gauze only, the gauze was placed in a centrifuge, and the solution remaining in the gauze was extracted.
- \* 4 : Cells were cultured in Eagle's MEM culture medium containing 5% fetal bovine serum until a monolayer of Vero cells coated a plastic dish of 6 cm in diameter.

(Fig.1、2)。ガーゼは 10  $\mu$ l 滴下し、自然乾燥したものと 90  $\mu$ l の medium を追加し、湿潤した状態を保っていたガーゼ (10  $\mu$ l wet) を使用した。

real-time PCR は Thermal Cycler Dice Real Time system TP800 (タカラバイオ株式会社) を用いた。ウイルス核酸抽出にはキアゲン社の QIA Blood RNA extraction kit を使用した。

生活用具に付着した HSV の時間経過による残存状況及び力価測定

乳幼児が使用する生活用具（ガラス、プラスチック、ガーゼ）を各々同じ大きさで準備し、これらにウイルス液（ウイルス力価  $1.5 \times 10^8$  pfu）を  $10 \mu\text{l}$  滴下した。ウイルス接種直後、1 時間後、2 時間後、3 時間後に 2% 牛血清含イーグル MEM 培地（抗菌剤入り）を  $1\text{ml}$  ずつ滴下し、シェーカーで 3 分間揺らし、ガラス、プラスチック、ガーゼ内の溶液を全量回収した。回収した溶液に含まれるそれぞれのウイルス力価を測定するために以下の方法で段階希釈後力価測定を行った。回収したウイルスをディッシュに  $200 \mu\text{l}$  ずつ接種し、混和、重層、固定、染色しディッシュにできたブラック数をそれぞれ測定し、生活用具の種類及び時間経過によって HSV の力価がどのように変化するか検討した（Fig.2 を参照）。

real-time PCR では不活化したウイルスも測定することができるため、DNA コピー数を測定し、その変化についても検討した。

水拭き、アルコール消毒によるウイルス消毒効果

残存状況同様にガラス、プラスチック、ガーゼを各々同じ大きさで準備し、これらにウイルス液（ウイルス力価  $1.5 \times 10^8$  pfu）を  $10 \mu\text{l}$  ずつ滴下した。ガラス、プラスチックは消毒用エタノール含浸綿と水で濡らしたペーパーでの拭き取りを行った。ガーゼは洗剤を溶かした水の中でガーゼ片を洗い、脱水したものと脱水後自然乾燥したものを準備した。それぞれに 2% 牛血清含イーグル MEM 培地（抗菌剤入り）を  $1\text{ml}$  ずつ滴下し、シェーカーで 3 分間揺らし溶液を全量回収し、残存状況同様の手技でブラック数をそれぞれ測定し、アルコール消毒、水拭き及び洗濯によるウイルス消毒効果を測定した。

また、ガラス、プラスチックに関してはウイルス液を拭き取ったペーパー、アルコール綿そのもののウイルス力価についても調べた。

ウイルス消毒効果も同様に DNA コピー数の変化についても検討するため、回収したウイルス溶液の real-time PCR を測定した。

残存状況、消毒効果ともに、結果の信頼性を確保するために、ディッシュ 2 枚にウイルスを接種する実験を行いブラック数、DNA コピー数の平均値を算出した。

成績

残存状況

残存状況におけるブラック数の測定結果と real-time PCR の測定結果を Fig.3 ~ 6 に示す。ガラス、プラスチックにおいて、ウイルス滴下直後は湿潤していたが徐々に乾燥し始め、1 時間値測定の際には乾燥していた。ガーゼ（ $10 \mu\text{l}$  滴下自然乾燥）においてはウイルス接種直後乾燥が始まり、1 時間値測定の際には乾燥していた。ガーゼ  $10 \mu\text{l}$  wet つまり、medium  $90 \mu\text{l}$  を追加し、計  $100 \mu\text{l}$  による湿潤環境においたものは 3 時間値測定の際も湿潤した状態を保っていた。

ガラス、プラスチックに関しては、乾燥に伴いウイルス接種直後（Fig.3 ~ 6 の 0 時間値）以降のブラック数

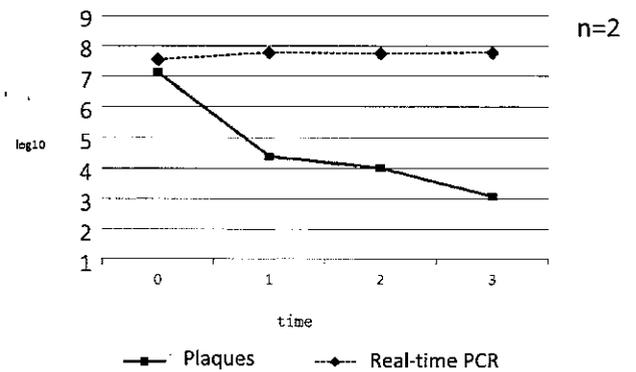


Fig. 3 Time-dependent inactivation of viral infectivity (PFU/ml) and residual viral DNA (DNA copies/ml) on a glass surface in the room.

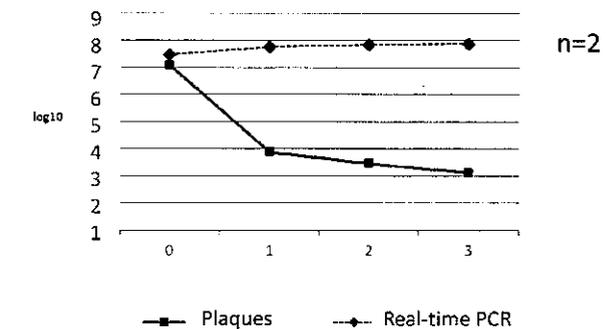
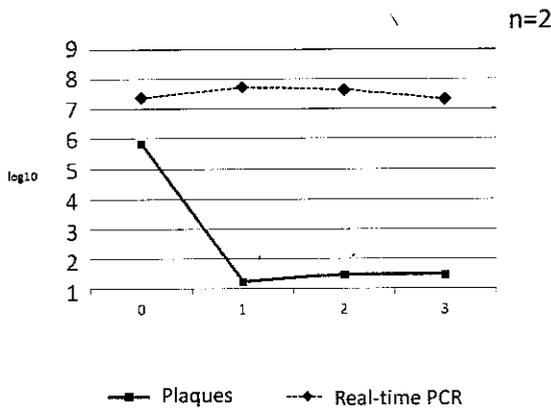
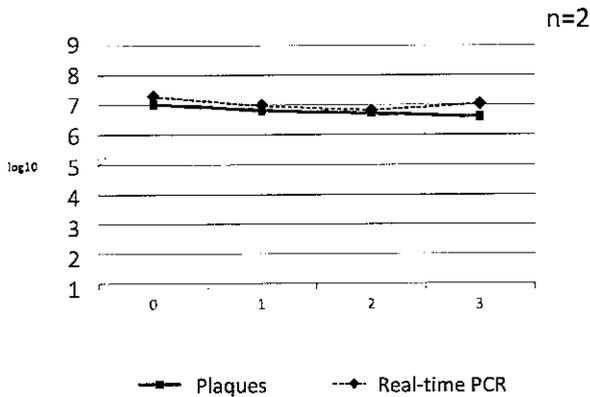


Fig. 4 Time-dependent inactivation of viral infectivity (PFU/ml) and residual viral DNA (DNA copies/ml) on a plastic surface in the room.



**Fig. 5** Time-dependent inactivation of viral infectivity (PFU/ml) and residual viral DNA (DNA copies/ml) on dry gauze in the room after immersing it in 10  $\mu$ l of virus solution.



**Fig. 6** Time-dependent inactivation of viral infectivity (PFU/ml) and residual viral DNA (DNA copies/ml) on wet gauze in the room after immersing it in 10  $\mu$ l of virus solution.

は減少し、ウイルス力価（感染性）の低下がみられた。ガーゼに関しては、ウイルス滴下直後から乾燥し始めた。ガーゼ10 $\mu$ lの自然乾燥はガラス、プラスチックと同様にウイルス力価の低下がみられたが、湿潤した状態を保っていたガーゼ10 $\mu$ l wetではウイルス力価が維持されているということが分かった。

real-time PCR 測定の結果、DNA コピー数は残存状況を測定したすべての実験で3時間一定の値を保っていたことより、接種された DNA コピー数は均等であったが、培養結果からは、時間経過とともに感染力が失われたことが分かった。

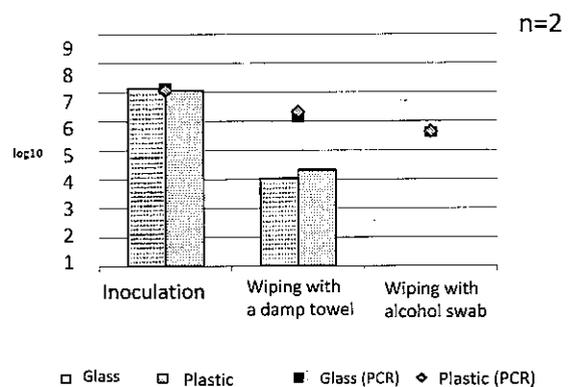
**消毒効果**

ガラス、プラスチック共に水拭きしたものは、ウイルス接種直後に拭き取りを行わなかったものに比べ、ウイルス力価が低下することが顕著にみられた (Fig.7)。さらに、アルコール綿で拭き取ることによってウイルス力価は0（検出感度以下）になることが認められた。

この結果より、ウイルスを拭き取った側（水拭きしたペーパー、アルコール綿）にウイルスが移行したことが懸念されたため、ウイルスを拭き取ったペーパー、アルコール綿についてもウイルスの検出実験を行った。Fig.7、8を比較してみると、水拭きに関しては拭き取られた側に比べ、拭き取った側にウイルスが移行したことが分かった。アルコール消毒に関しては、アルコール消毒した側、ウイルスを拭き取ったアルコール綿ともにウイルス力価は検出感度以下になることが分かった。

また、拭き取った側と拭きとられた側の real-time PCRを比較してみると、ブラック数の差と同じようにウイルスを拭き取った側の方が DNA コピー数は多くなることが分かった (Fig.7、8)。

ウイルスを滴下したガーゼを洗濯、脱水し自然乾燥したもののウイルス力価は検出感度以下になることが分かった。残存状況の結果からも分かるように乾燥することでウイルス力価が低下し、検出感度以下になることが改めて分かった。また、real-time PCR の値より DNA



**Fig. 7** Inactivation or removal of viral infectivity (PFU/ml) and residual viral DNA (DNA copies/ml) after wiping the virus solution on the glass or plastic surface with an antiseptic alcohol swab or gauze dampened with tap water.

かであった。

ほとんどの保育園、幼稚園では自分のタオルを手拭タオルとして頻回に利用していると考えられるが、間違えて友達のタオルを使用することがあった時にはタオルが媒介物となる可能性が考えられる。そのため、こまめに洗濯を実施することや、間違えないような工夫をすることもしくはペーパータオルの使用が重要である。

消毒効果においては、ガラス、プラスチックのアルコール消毒、タオルの洗濯、自然乾燥によってウイルス感染力が消失するという結果が得られ (Fig.9)、アルコール消毒、洗濯、その後のしっかりと乾燥によってウイルス感染力がなくなるということが認められた。よって、乳幼児が使用した後の生活用具はアルコール消毒、もしくは洗濯、乾燥をすることによって、生活用具を媒介物とした感染を防ぐことができるといえるだろう。生活用具を選ぶ際にはアルコールでの消毒が容易な物や繰り返し洗濯ができるものを選ぶことが重要になると考えられる。

保育園、幼稚園で子どもが自主的に行う感染予防策として、手洗いやうがいがあるが、子どもの感染予防に関して発達上のセルフケア不足を大人が補うこととして、室内掃除、遊具の消毒、歯ブラシ消毒、床・水まわり・トイレ・テーブルまわりの清潔保持、寝具の消毒・洗濯、室温・湿度の調整などがある<sup>6-9)</sup>。現在の法律では、HSVに感染している患児に対しての出席停止期間、予防策が必要な期間は決められていないため<sup>10)</sup>、患児がいるクラスでは担任が迅速な対応を行う必要があると考えられる。本研究より患児がいるクラスでは遊具などはアルコール消毒を行い、リネン類は、洗濯、乾燥させるなどの適切な対応をすることで感染症の蔓延を防ぐことができると考えられる。

本研究より身近にあるものや、洗濯、乾燥などの家庭

で簡単にできることで HSV の感染を防ぐことができることが確認できたため、身近にあるアルコールなどの資源を有効に活用し適切な感染対策をとることと湿潤下タオルの使いまわしを防ぐことが重要であると考えられる。

## 文 献

- 1) 岡部信彦：学校・幼稚園・保育園等での感染症対策，登校登園停止など，小児臨，2005；58：1929-1934.
- 2) 吉田正己，手塚 正：生活用品または医療器具を介する単純ヘルペスの感染経路，西日皮，1988；50：1050-1054.
- 3) 葛島清隆，森島恒雄：HSVの初感染像の変化，臨科学，1989；25：835-841.
- 4) 葛島清隆，木村 宏，後藤泰浩，木戸真二，ラーマン MM，寺島 真，その他：乳幼児期の単純ヘルペス初感染における高い顕性発症率—全日保育所における検討—，日小児会誌，1989；93：2098-2102.
- 5) 葛島清隆，木村 宏，花田直樹，柴田元博，西川和夫，森島恒雄：乳幼児閉鎖集団における HSV 感染症の感染経路と対策，臨とウイルス，1990；18：423-423.
- 6) 巷野悟郎監修：最新保育保健の基礎知識第4版改訂，日本小児医事出版社，東京，2006，p.120-121.
- 7) 溝脇しのぶ：万が一の場合に備えた園での対応～親への対応を含めて～，チャイルドヘルス，2006；9：16-18.
- 8) 平山宗宏：乳幼児集団生活施設における感染症対策，臨と微生物，2006；33：675-678.
- 9) 大石智洋：様々な環境下での感染制御集団生活での感染制御保育園，幼稚園における感染制御，小児臨，2005；58：2377-2383.
- 10) 鈴木葉子：集団生活において予防すべき感染症と対応一覧，チャイルドヘルス，2005；8：354-357.