

Real-time PCR 法を用いたアデノウイルスに対する消毒薬の評価

赤沼 正堂

北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻感覚器病学講座眼科学分野

要 約

目的：ヒトアデノウイルス(HAdV)に対する消毒薬の効果を real-time polymerase chain reaction 法を用いて評価した。

方法：エタノール、ポビドンヨード、次亜塩素酸ナトリウムと HAdV-3, -4, -8, -19, -37 を一定時間混合した。混合液を A549 細胞に 6 日間感染させ、HAdV DNA copy 数を測定した。対照と比べ 4 Log 以上の差を消毒効果を有するものとした。

結果：エタノールでは 80% 濃度 10 分間で効果がみられたが、70%、40% 濃度では 10 分間ではすべての血清型に効果はみられなかった。0.2% ポビドンヨード

では 1 分間で HAdV-3, -4, -19, -37, 3 分間で HAdV-8 に効果がみられた。0.1% 次亜塩素酸ナトリウムでは、15 秒間ですべての血清型に効果がみられた。

結論：いずれの消毒薬も HAdV に対する効果がみられたが、効果を示す濃度や作用時間が異なり、適応場所、器具を考慮する必要がある。(日眼会誌 111: 384-390, 2007)

キーワード：ヒトアデノウイルス, real-time PCR, エタノール, ポビドンヨード, 次亜塩素酸ナトリウム

Evaluation of Disinfectant against Adenovirus by Real-time Polymerase Chain Reaction

Masataka Akanuma

Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Hokkaido University Graduate School of Medicine

Abstract

Purpose : To evaluate the effect of disinfectant against human adenovirus (HAdV) using a real-time polymerase chain reaction method.

Methods : Ethanol, povidone-iodine, and sodium hypochlorite were mixed with HAdV-3, -4, -8, -19, and -37. A diluted mixed solution was infected with A549 cells for six days and then the number of HAdV DNA copies was counted. A reduction in the number of HAdV DNA copyies by 4 log was considered as virucidal activity.

Results : Ethanol at 80% concentration was effective against all serotypes after ten minutes, but 70% and 40% concentrations of ethanol were ineffective against all serotypes. Povidone-iodine at 0.2% concentration was effective against HAdV-3, -4, -19, and -37 after one minute, and against HAdV-8

after three minutes. Sodium hypochlorite (0.1% concentration) was effective against all serotypes after 15 seconds.

Conclusion : While all disinfectants were effective against HAdV, the effective concentration percentages and the times required were different, which indicates the importance of deliberating on the concentration, application time and location to apply the disinfectant, and what equipment to use for application.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 111 : 384-390, 2007)

Key words : Human adenovirus, Real-time polymerase chain reaction, Ethanol, Povidone-iodine, Sodium hypochlorite

別刷請求先：060-8638 札幌市北区北 15 条西 7 北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻感覚器病学講座眼科学分野
赤沼 正堂 E-mail : akanuma@med.hokudai.ac.jp

(平成 18 年 6 月 30 日受付, 平成 18 年 10 月 2 日改訂受理)

Reprint requests to : Masataka Akanuma, M. D. Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Hokkaido University Graduate School of Medicine. Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan

(Received June 30, 2006 and accepted in revised form October 2, 2006)

I 緒 言

ヒトアデノウイルス(human adenovirus, HAdV)は 51 種類の血清型に分けられる。HAdV 感染症は呼吸器、消化器、眼などに多様な症状を示す。特に HAdV-3, -4, -7, -8, -11, -19, -37 の 7 種の血清型は結膜炎起因の主要な血清型として知られ、世界各地でウイルス性結膜炎の流行を引き起こしている¹⁾²⁾。HAdV は時に院内感染を引き起こし、手指や眼圧計チップなどの医療器具が感染拡大の原因と考えられている^{3)~6)}。

これまでも HAdV に対する消毒薬の効果について報告がある⁷⁾⁸⁾。しかしながら、プラーク法⁹⁾や細胞変性効果(cytopathic effect, CPE)¹⁰⁾を用いた検討のため、増殖が遅い HAdV 血清型ではプラークや CPE の検出が困難である。また HAdV の感染価が低い場合は、プラークや CPE が検出されず、消毒効果を適切に評価ができない。

Real-time polymerase chain reaction(PCR)法¹¹⁾は、定量的に DNA copy 数を算出することが可能である。近年、有賀ら¹²⁾、大口ら¹³⁾は real-time PCR 法を用いて、HAdV 迅速診断キットを定量的に評価した。また、内尾¹⁴⁾は抗 HAdV 薬物の効果スクリーニングに従来のプラーク法や CPE 法ではなく、real-time PCR 法による HAdV DNA copy 数によって評価した。Real-time PCR 法を用いた定量的な方法は客観的に評価する点で有用な手段である。

そこで、本研究では real-time PCR 法を用いて、臨床の場で用いられることが多いエタノール、ポビドンヨード、次亜塩素酸ナトリウムの HAdV に対する消毒効果を検討した。

II 対象と方法

1. Real-time PCR 法

Real-time PCR 法は Miura-Ochiai ら¹⁵⁾の方法に従って行った。PCR 増幅反応は LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics)を用い、95°C 10 分間の FastStart Taq DNA ポリメラーゼの活性化および鋳型 DNA の変性後、95°C 10 秒の熱変性、70°C 10 秒間のアニーリング、72°C 25 秒間の伸長反応を 45 サイクル行った。HAdV ヘキソン遺伝子の PCR 増幅産物を pT 7 Blue T-vector(Novagen)に組み込み、測定した吸光度から DNA 量を算出したものをスタンダード DNA として、増幅産物と同時に解析し HAdV DNA copy 数を算出した。

2. 細胞

American Type Culture Collection(ATCC)から入手した A549 細胞を使用した。培養培地には 10% ウシ胎仔血清加 Eagle's minimum essential medium(MEM) (日水製薬)を使用し、維持培地には 2% ウシ胎仔血清

加 MEM を使用した。

3. ウィルス

HAdV-3, -4, -8, -19, -37 の異なる血清型のウィルスを使用した。HAdV-3, -8, -37 は ATCC から入手した prototype を使用した。HAdV-4, -19 は遺伝子解析によって HAdV-4 a¹⁶⁾¹⁷⁾、HAdV-19 a^{18)~20)}と同一とされた臨床分離株を使用した。

市販のプラスチックフラスコに単層培養された A549 細胞に、real-time PCR 法で HAdV DNA copy 数を算出した 2×10^6 copy のウィルス液を接種し 37°C で培養した。CPE がみられた時点で培養細胞を回収した。回収した培養細胞を 3 回凍結融解し、3,000 rpm, 10 分の遠心後、上清を回収しウィルス液とした。その後 real-time PCR 法でウィルス液の HAdV DNA copy 数を算出した。

4. 消毒薬

エタノール(国産化学)、ポビドンヨード(イソジン[®]液、明治製菓)、次亜塩素酸ナトリウム(和光純薬)を使用した。

5. HAdV 増殖試験

5×10^4 cell の A549 細胞を 24 穴マイクロプレートに準備し、0.1, 1, 10 copy/cell のウィルス液を接種し、37°C で培養した。培養 1, 3, 6, 9, 12 日目に感染細胞を回収し、real-time PCR 法で HAdV DNA copy 数を算出し、ウィルス増殖曲線を求めた。

6. 消毒薬効果判定試験

5×10^7 copy 数のウィルス液 10 μ l にエタノール 90 μ l を混合、ポビドンヨードと次亜塩素酸ナトリウムでは 5×10^7 copy 数のウィルス液 50 μ l に消毒薬 50 μ l を混合し、室温下で一定時間反応させた。混合液の終濃度は、エタノールは 80%, 70%, 40%, ポビドンヨードは 5%, 1%, 0.2%, 次亜塩素酸ナトリウムは 0.1%, 0.05%, 0.01% とした。反応時間はエタノールとポビドンヨードは 1 分, 3 分, 5 分, 10 分, 30 分, 60 分, 次亜塩素酸ナトリウムは 15 秒, 30 秒, 1 分, 3 分, 5 分, 10 分とした。反応後、エタノールでは phosphate-buffered saline(PBS)を 900 μ l 添加し、ポビドンヨードと次亜塩素酸ナトリウムでは 0.5% チオ硫酸ナトリウム溶液を 900 μ l 添加し消毒薬の反応を停止させた。その後 PBS で 10 倍希釈したのち、混合液の 100 μ l を計算上 10 copy/cell となるように A549 細胞に接種し 37°C で 3 日間培養した。培養 3 日目に上清を除去し細胞表面を PBS で 5 回洗浄後、維持培地を 1 ml 加えてさらに 37°C で 3 日間培養した。培養後、上清と細胞を回収し凍結融解を 3 回行った。4°C, 5,000 rpm で 5 分間遠心し、上清の 100 μ l を DNA 抽出キットのスマイテスト EX-R & D kit(ゲノムサイエンス研究所)で HAdV DNA を抽出した。抽出した HAdV DNA を 100 μ l の TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)で溶解し、

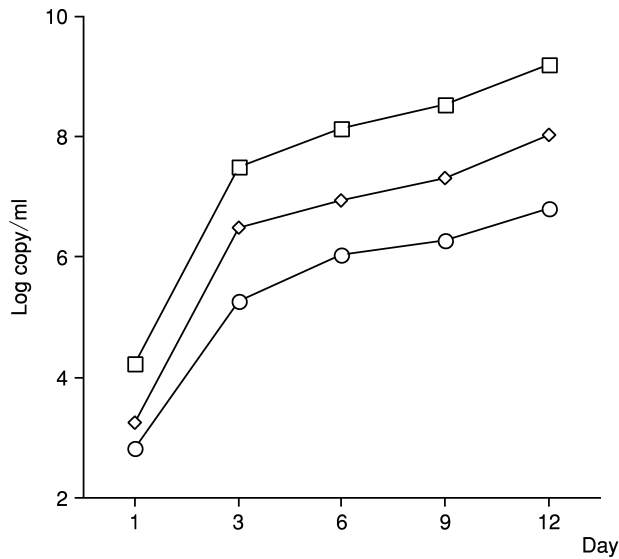


図 1 ヒトアデノウイルス(HAdV)増殖曲線。

図には HAdV-8 の結果を示した。□は 10 copy/cell, ◇は 1 copy/cell, ○は 0.1 copy/cell を表した。HAdV-3, -4, -19, -37 においても同様の結果が得られた。

real-time PCR 法で HAdV DNA copy 数を算出した。

7. 消毒効果判定法

Real-time PCR 法を用い、消毒薬の代わりに PBS を用いた対照群と比較して HAdV DNA copy 数が 4 Log (99.99%) 以上の差 (reduction) のみられたものを消毒効果の有するものとした。

III 結 果

1. HAdV 増殖試験

各培養日数いずれにおいても、接種した HAdV-8 濃度の高いものが培養細胞内での HAdV DNA copy 数が高かった(図 1)。検討したすべての血清型で同様であり、いずれの血清型のウイルス液も増殖能があることを確認した。この試験後、次の消毒薬効果判定試験では培養日数を 6 日間とし、十分な HAdV の増殖を得るため HAdV 濃度を 10 copy/cell とした。

2. 消毒薬効果判定試験

1) エタノール

80% エタノールはすべての血清型で 10 分で消毒効果がみられた(図 2 a)。70% エタノールは、HAdV-3, -4, -8, -37 では 30 分で消毒効果がみられた。HAdV-19 では 10 分で消毒効果がみられた(図 2 b)。40% エタノールは、HAdV-3, -8, -19, -37 では 30 分で消毒効果がみられた。HAdV-4 は 60 分で消毒効果がみられた(図 2 c)。

2) ポビドンヨード

5% ポビドンヨードは、HAdV-4, -19 では 30 分で消毒効果がみられた。HAdV-3, -37 では 60 分で消毒効果

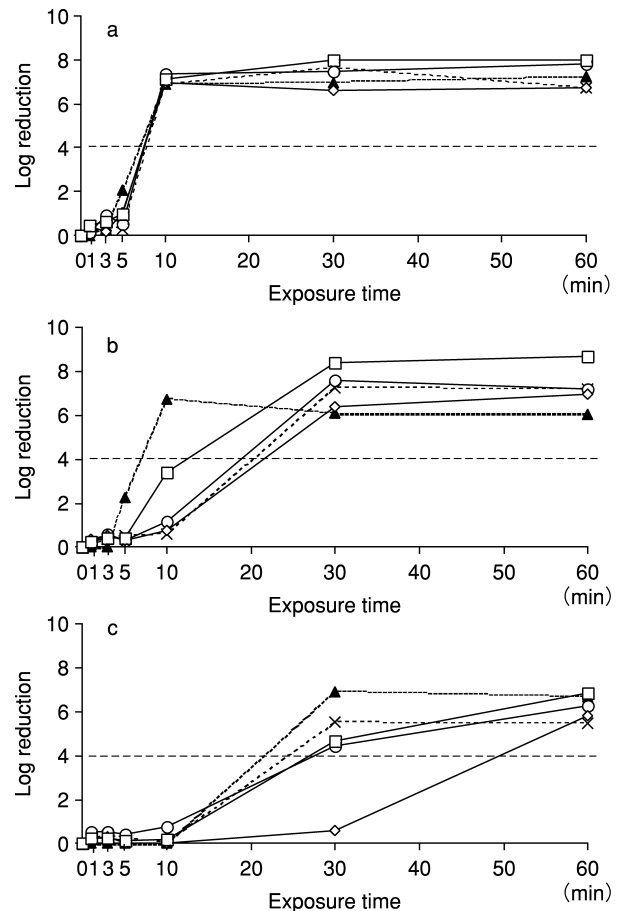


図 2 HAdV の増殖に及ぼすエタノールの影響。

横軸は反応時間、縦軸は Log reduction を表した。□は HAdV-3, ◇は HAdV-4, ○は HAdV-8, ▲は HAdV-19, ×は HAdV-37 を表した。

a : 80% エタノールでは、すべての血清型で、10 分で 4 Log 以上の HAdV DNA copy 数の減少がみられた。

b : 70% エタノールでは、HAdV-19 は 10 分で、HAdV-3, -4, -8, -37 は 30 分で 4 Log 以上の HAdV DNA copy 数の減少がみられた。c : 40% エタノールでは、HAdV-3, -8, -19, -37 は 30 分で、HAdV-4 は 60 分で 4 Log 以上の HAdV DNA copy 数の減少がみられた。

がみられた。HAdV-8 は 60 分でも消毒効果はみられなかった(図 3 a)。1% ポビドンヨードは、HAdV-4 では 1 分で消毒効果がみられた。HAdV-3, -8, -19, -37 は 3 分で消毒効果がみられた(図 3 b)。0.2% ポビドンヨードは、HAdV-3, -4, -19, -37 では 1 分で消毒効果がみられた。HAdV-8 は 3 分で消毒効果がみられた(図 3 c)。

3) 次亜塩素酸ナトリウム

0.1%, 0.05% 次亜塩素酸ナトリウムは、すべての血清型で 15 秒で消毒効果がみられた(図 4 a, 4 b)。0.01% 次亜塩素酸ナトリウムでは、すべての血清型において 10 分でも消毒効果はみられなかった(図 4 c)。

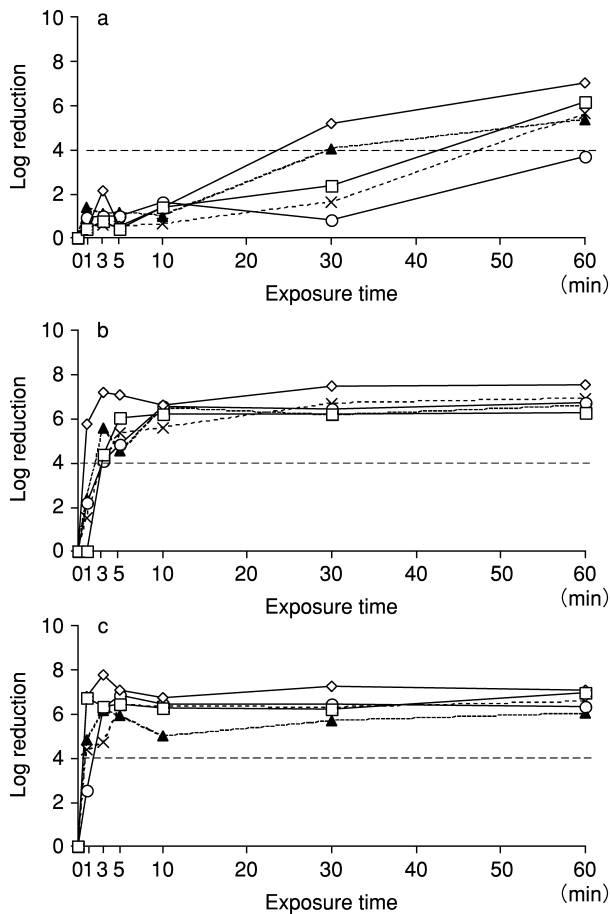


図 3 HAdV の増殖に及ぼすポビドンヨードの影響。横軸は反応時間、縦軸は Log reduction を表した。□は HAdV-3、◇は HAdV-4、○は HAdV-8、▲は HAdV-19、×は HAdV-37 を表した。
 a : 5% ポビドンヨードでは、HAdV-4、-19 は 30 分で、HAdV-3、-37 は 60 分で 4 Log 以上の HAdV DNA copy 数の減少がみられた。HAdV-8 は 60 分でも 4 Log 以上の HAdV DNA copy 数の減少はみられなかった。b : 1% ポビドンヨードでは、HAdV-4 は 1 分で、HAdV-3、-8、-19、-37 は 3 分で 4 Log 以上の HAdV DNA copy 数の減少がみられた。c : 0.2% ポビドンヨードでは、HAdV-3、-4、-19、-37 は 1 分で、HAdV-8 は 3 分で 4 Log 以上の HAdV DNA copy 数の減少がみられた。

IV 考 按

HAdV はエンベロップをもっておらず、その周囲を脂質のカプシドで囲まれているため乾燥に強く、室温で数日間感染力を維持する^{21)~24)}。HAdV 感染症に対する有効な抗ウイルス薬が見出されていない現在、HAdV 感染の広がりを防ぐためには HAdV に対する消毒が有効な手段のひとつとなる。

ウイルスに対する消毒効果判定では、プラークによるウイルス感染価が対照群と比較して 4 Log (99.99%) 以上の差がみられたものを消毒効果の有するものとして判定されてきた²⁵⁾²⁶⁾。しかしながら、プラークや CPE による判定法は、定量的に判定するには不向きである。

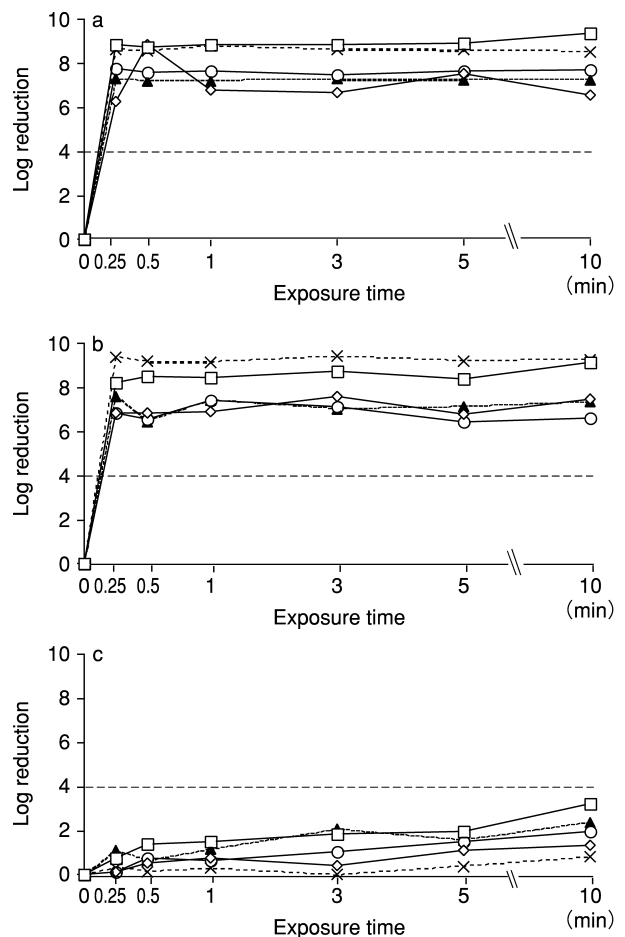


図 4 HAdV の増殖に及ぼす次亜塩素酸ナトリウムの影響。横軸は反応時間、縦軸は Log reduction を表した。□は HAdV-3、◇は HAdV-4、○は HAdV-8、▲は HAdV-19、×は HAdV-37 を表した。
 a : 0.1% 次亜塩素酸ナトリウムでは、すべての血清型で、15 秒で 4 Log 以上の HAdV DNA copy 数の減少がみられた。b : 0.05% 次亜塩素酸ナトリウムでは、すべての血清型で、15 秒で 4 Log 以上の HAdV DNA copy 数の減少がみられた。c : 0.01% 次亜塩素酸ナトリウムでは、いずれの血清型においても 4 Log 以上の HAdV DNA copy 数の減少はみられなかった。

一方、real-time PCR 法は定量的かつ客観的に評価するのに有用な方法である。本研究は HAdV の消毒効果を定量的、客観的に判定するために、real-time PCR 法による定量法を用いており、HAdV に対する消毒薬の効果に関して分子生物学的手法を用いた初めての報告である。消毒薬に関しては、日常診察現場で使用されているエタノール、ポビドンヨード、次亜塩素酸ナトリウムを選択した。その結果、各々の消毒薬には HAdV に対して消毒効果を示す濃度や、消毒に必要な時間が異なることが分かった。

エタノールは 1 分、3 分、5 分の消毒時間では HAdV の消毒効果はみられず、10 分以上の消毒時間が必要で

あることが示唆された。医療従事者が手を洗う時間は平均 15 秒²⁷⁾と報告されており、エタノールのみで手指に付着した HAdV を消毒するのは難しいと考えられる。このことから、現在臨床で用いられている速乾性のエタノールを使用する場合も、消毒時間が短いために HAdV の消毒効果は低いと考えられる。上野ら⁸⁾は流水とエタノールの手指消毒薬の併用でウイルス除去効果が高まると報告しており、エタノールで手指を消毒する場合には手洗いを併用するのが望ましい。

ポビドンヨードはポリビニルピロリドンにヨウ素を結合させたもので、RNA および DNA ウイルスのいずれにも抗ウイルス効果を示し、エンベロープの有無にかかわらず抗ウイルス効果を示す²⁸⁾²⁹⁾。HAdV-5 に対して、市販のポビドンヨード液で 1% と 5% 濃度 3 分以上の処理で不活化がみられたという報告²⁸⁾²⁹⁾がある。本研究において、5% 濃度では HAdV-3, -4, -19, -37 に対して 30 分以上の消毒時間が必要であり、HAdV-8 に関しては 60 分でも消毒効果はみられず、これまでの報告よりも長い消毒時間が必要と考えられた。1% 濃度では、HAdV-4 では 1 分、HAdV-3, -8, -19, -37 では 3 分で消毒効果がみられ、これまでの報告と同様に 3 分以上の処理で HAdV の消毒が可能と考えられた。0.2% 濃度では、HAdV-3, -4, -19, -37 では 1 分、HAdV-8 では 3 分で消毒効果がみられ、3 分以上の時間が必要と考えられた。本研究では、5% 濃度よりも低濃度の 1% および 0.2% 濃度で短時間での消毒効果がみられ、濃度相関性はみられなかった。ポビドンヨードの効果に濃度相関性がみられない理由として、遊離ヨウ素濃度が起因していると思われる。Trueman³⁰⁾はポビドンヨードを希釈すると carrier polymer とヨウ素の結合が弱まり、遊離ヨウ素の量が増加することを報告した。すなわち、ポビドンヨードの消毒効果は溶液中で遊離したヨウ素に起因しており、希釈された低濃度のポビドンヨードの方が短時間で消毒効果を示すと考えられた。これまでも細菌を用いた検討で、商品化されている濃度のポビドンヨードよりも希釈されたポビドンヨードの方がより短時間で細菌を不活化するという報告³¹⁾³²⁾があるが、本研究では HAdV に対して同様の結果が得られた。また本研究では、同じ濃度のポビドンヨードでも HAdV の血清型によって消毒に必要な時間が異なり、血清型による感受性の違いがみられた。Sauerbrei³³⁾らは、血清型によってポビドンヨードで HAdV のゲノムが破壊されるものと破壊されないものがあり、感受性の違いがあることを報告している。ポビドンヨードにおいて血清型による感受性の違いが出てくる理由として、HAdV は各血清型によってヘキソンやファイバーに関連する蛋白質の違いがみられる³⁴⁾ため、ビリオン表面の蛋白質に作用するポビドンヨードでは、血清型による感受性の差が生じると考えられた。本研究から、今後ポビドンヨードを臨

床現場で用いる際には、1% または 0.2% 濃度に希釈されたポビドンヨードを使用するのが望ましいと考えられた。1% および 0.2% 濃度では、エタノールよりも短時間で消毒が可能と考えられる。しかし希釈された低濃度のポビドンヨードは、温度、光に対して不安定で長期間保存は困難であるため、使用直前に希釈液を作製して用いるのが望ましい。またポビドンヨードは皮膚、粘膜にアレルギー反応を起こすことがある^{35)~37)}ため、使用する際にはアレルギー反応に注意する必要がある。

次亜塩素酸ナトリウムは、これまでに 0.5% の濃度で HAdV-5 に対して 1 分の処理で消毒効果がみられ³⁸⁾、また 0.05% 濃度では HAdV-8 に対して 10 分の処理で消毒効果がみられたという報告³⁹⁾がある。また HAdV-8 に対しては、10 倍希釈された次亜塩素酸ナトリウム 5 分の処理で消毒効果がみられたという報告⁴⁰⁾がある。これまでの HAdV に対する次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果の報告は、検討された HAdV の血清型がそれぞれ 1 種類であったり、次亜塩素酸ナトリウム濃度が異なるが、いずれも 10 分以内の処理で HAdV の消毒が可能であると報告されている。本研究では 0.1% および 0.05% の濃度 15 秒の処理で HAdV DNA copy 数の減少がみられ、これまでの報告よりも短時間で HAdV の消毒が可能であると思われた。次亜塩素酸ナトリウムは金属腐食性があるため金属製の医療器具の消毒には用いることができない。また皮膚に対する刺激性があるため、人体に用いることは困難である。しかしながら、腐食性の少ない非金属製の机など、環境への利用には短時間での HAdV の消毒が期待できると思われた。

以上の結果より、各消毒薬とも HAdV に対する消毒効果がみられた。しかしながら、各々の性質や消毒時間が異なることから、適応する箇所および器具を考慮する必要性を示唆した。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻眼科学分野大野重昭教授に深く感謝申し上げます。また多くのご助言、ご指導いただきました青木功喜博士、株式会社三菱化学ビーシーエル、ならびに諸先生に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Sawada H, Aoki K, Kawana R, Matsumoto I, Shinagawa M, Guo DF, et al: Molecular epidemiology of adenoviral conjunctivitis in Sapporo, Japan, and Manila, the Philippines. *Jpn J Ophthalmol* 31: 538-546, 1987.
- 2) Aoki K, Tagawa Y: A twenty-one year surveillance of adenoviral conjunctivitis in Sapporo, Japan. *Int Ophthalmol Clin* 42: 49-54, 2002.
- 3) Buehler JW, Finton RJ, Goodman RA, Choi K, Hierholzer JC, Sikes RK, et al: Epidemic kera-

- toconjunctivitis : report of an outbreak in an ophthalmology practice and recommendations for prevention. *Infect Control* 5 : 390—394, 1984.
- 4) **Keenlyside RA, Hierholzer JC, D'Angelo LJ** : Kertaconjunctivitis associated with adenovirus type 37 : an extended outbreak in an ophthalmologist's office. *J Infect Dis* 147 : 191—198, 1983.
 - 5) **D'Angelo LJ, Hierholzer JC, Holman RC, Smith JD** : Epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 8 : epidemiologic and laboratory aspects of a large outbreak. *Am J Epidemiol* 113 : 44—49, 1981.
 - 6) **Jernigan JA, Lowry BS, Hayden FG, Kyger SA, Conway BP, Groschel DH, et al** : Adenovirus type 8 epidemic keratoconjunctivitis in an eye clinic : risk factors and control. *J Infect Dis* 167 : 1307—1313, 1993.
 - 7) **Craven ER, Butler SL, McCulley JP, Luby JP** : Applanation tonometer tip sterilization for adenovirus type 8. *Ophthalmology* 94 : 1538—1540, 1987.
 - 8) 上野哲治, 西城一翼 : アデノウイルス感染予防と手指消毒剤ウエルパスの抗ウイルス効果について. *日眼会誌* 94 : 44—48, 1990.
 - 9) **Green M, Wold WSM** : Human adenoviruses : Growth purification and transfection assay. In : *Jakoby WB, et al(Eds) : Methods Enzymol LV III*. Academic Press, New York, 425—435, 1979.
 - 10) **Lennete EH, Schmidt NJ** : *Diagnosis Procedures for : Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 5th ed. American Public Health Association, Washington DC, 1979.
 - 11) **Heid CA, Stevens J, Livak K J, Williams PM** : Real-time PCR quantitative PCR. *Genome Res* 6 : 986—994, 1996.
 - 12) 有賀俊英, 三浦里香, 田川義継, 大橋 勉, 中川尚, 岡本茂樹, 他 : 改良版アデノチェック®の臨床的検討. *臨眼* 59 : 1183—1188, 2005.
 - 13) 大口剛司, 有賀俊英, 三浦里香, 島田康司, 中島晴彦, 田川義継, 他 : アデノウイルス迅速診断キット「キャピリア®アデノ」の検討. *臨眼* 59 : 1189—1192, 2005.
 - 14) 内尾英一 : ウイルス性結膜炎の新しい薬物治療. *日眼会誌* 109 : 962—985, 2005.
 - 15) **Miura-Ochiai R, Shimada Y, Konno T, Yamazaki S, Aoki K, Ohno S, et al** : Quantitative detection and rapid identification of human adenoviruses. *J Clin Microbiol* 45 : 958—967, 2007.
 - 16) **Wadell G, Hammarskjold ML, Winbeg G, Varsanyi TM, Sundell G** : Genetic variability of adenoviruses. *Ann NY Acad Sci* 354 : 16—42, 1980.
 - 17) **Li QG, Wadell G** : The degree of genetic variability among adenovirus type 4 strains isolated from man and chimpanzee. *Arch Virol* 101 : 65—77, 1988.
 - 18) **Wadell G, de Jong JC** : Restriction endonucleases in identification of a genome type of adenovirus 19 associated with keratoconjunctivitis. *Infect Immun* 27 : 292—296, 1980.
 - 19) **Kemp MC, Hierholzer JC, Cabradilla CP, Objeski JF** : The changing etiology of epidemic keratoconjunctivitis : antigenic and restriction enzyme analyses of adenovirus types 19 and 37 isolated over a 10-year period. *J Infect Dis* 148 : 24—33, 1983.
 - 20) **Meng ZD, Kennett ML, Rodger SM, Dickson KE, Anderson BN, Gust ID, et al** : Further characterization of 41 isolates of adenovirus types 19/37 by serum neutralization and DNA restriction enzyme analysis. *J Hyg (Lond)* 97 : 377—383, 1986.
 - 21) **Mitsui Y, Hanna L, Hanabusa J, Minoda R, Ogata S, Kurihara H, et al** : Association of adenovirus type 8 with epidemic keratoconjunctivitis. *AMA Arch Ophthalmol* 61 : 891—898, 1959.
 - 22) **Wegman DH, Guinee VF, Milian SJ** : Epidemic keratoconjunctivitis. *Am J Public Health Nations Health* 60 : 1230—1237, 1970.
 - 23) **Nauheim RC, Romanowski EG, Araullo-Cruz T, Kowalski RP, Turgeon PW, Stopak SS, et al** : Prolonged recoverability of desiccated adenovirus type 19 from various surfaces. *Ophthalmology* 97 : 1450—1453, 1990.
 - 24) **Gordon YJ, Gordon RY, Romanowski E, Araullo-Cruz TP** : Prolonged recovery of desiccated adenoviral type 5, 8, and 19 from plastic and metal surfaces *in vitro*. *Ophthalmology* 100 : 1835—1840, 1993.
 - 25) **Kampf G, Rudolf M, Labadie JC, Barrett SP** : Spectrum of antimicrobial activity and user acceptability of the hand disinfectant agent Sterillium® Gel. *J Hosp Infec* 52 : 141—147, 2002.
 - 26) **BS EN 14476** : Chemical disinfectants and antiseptics. Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine. Test method and requirements (phase 2, step 1). 2005.
 - 27) 西城一翼, 板谷幸一, 片岡秋子, 野田みき子, 渡辺広昭, 金子正光 : 薬剤部の院内活動-ICUにおける手指消毒の検討. *J Hokkaido Soc Hosp Pharm* 32 : 23—28, 1987.
 - 28) **Kawana R, Kitamura T, Nakagomi O, Matsu-moto I, Arita M, Yoshihara N, et al** : Inactivation of human viruses by povidone-iodine in comparison with other antiseptics. *Dermatology* 195 Suppl 2 : 29—35, 1997.
 - 29) 川名林治, 北村 敬, 千葉峻三, 中込 治, 松本一郎, 有田峯生, 他 : ポビドンヨード (PVP-I) によるウイルスの不活化に関する研究—市販の消毒剤との比較. *臨床とウイルス* 26 : 371—386, 1998.
 - 30) **Trueman JR** : Inhibition and destruction of the microbial cell. In : *WB Hugo (Ed) : The halogens*. Academic Press, Inc., London, 171—183,

- 1971.
- 31) **Berkelman RL, Holland BW, Anderson RL** : Increased bactericidal activity of dilute preparations of povidone-iodine solutions. *J Clin Microbiol* 15 : 635—639, 1982.
- 32) **Lacey RW** : Antibacterial activity of povidone iodine towards non-sporing bacteria. *J Appl* 46 : 443—449, 1979.
- 33) **Sauerbrei A, Sehr K, Eichhorn U, Reimer K, Wutzler P** : Inactivation of human adenovirus genome by different groups of disinfectants. *J Hosp Infect* 57 : 67—72, 2004.
- 34) **Crawford-Miksza L, Schnurr DP** : Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. *J Virol* 70 : 1836—1844, 1996.
- 35) **Marks JG Jr** : Allergic contact dermatitis to povidone-iodine. *J Am Acad Dermatol* 6 : 473—475, 1982.
- 36) **Erdmann S, Hertl M, Merk HF** : Allergic contact dermatitis from povidone-iodine. *Contact Dermatitis* 40 : 331—332, 1999.
- 37) **Lachpelle JM** : Allergic contact dermatitis from povidone-iodine : a re-evaluation study. *Contact Dermatitis* 52 : 9—10, 2005.
- 38) **Sattar SA, Springthorpe VS, Karim Y, Loro P** : Chemical disinfection of non-porous inanimate surfaces experimentally contaminated with four human pathogenic viruses. *Epidemiol Infect* 102 : 493—505, 1989.
- 39) **Nagington J, Sutehall GM, Whipp P** : Tonometer disinfection and viruses. *Br J Ophthalmol* 67 : 674—676, 1983.
- 40) **Threkeld AB, Forggatt JW 3rd, Schein OD, Forman MS** : Efficacy of a disinfectant wipe method for the removal of adenovirus 8 from tonometer tips. *Ophthalmology* 100 : 1841—1845, 1993.
-