

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

上野 哲治*, 西城 一翼**

*札幌医科大学眼科学教室, **札幌医科大学附属病院薬剤部

要 約

手指用消毒剤ウエルパスの抗アデノウイルス(Ad)効果について Ad3を用い、ブラックアッセイにより検討した。また、Adの付着した手指に対する種々のウイルス除去方法の効果について、同様に検討した。suspension testの結果では30秒～60秒以内で、ウイルスの感染価は、検出感度以下になった。fingertip testの結果、紙による拭き取り、流水下の手洗い、石鹸による手洗い、ウエルパスの擦り込み、エタノール綿による拭き取り、ブラッシングによる手洗い、いずれも単独では指に付着したウイルスの除去はできなかった。しかし、流水で洗い(15秒)、紙で拭いた後、ウエルパスを擦り込むとウイルスブラックは検出されなかった。以上より、手指を介したAdの感染予防法として流水による洗浄、紙による拭き取り、およびウエルパスの擦り込みを組み合わせた方法が最適と思われた。(日眼会誌 94:44-48, 1990)

キーワード: アデノウイルス, 消毒剤, ウエルパス, 抗ウイルス作用, 手洗い

Prevention of Adenovirus Infection and Antiviral Activity of a Hand Disinfectant, Welpas®

Tetsuji Ueno and Kazuyoku Saijo

*Department of Ophthalmology, Sapporo Medical College

**Department of Hospital Pharmacy, Sapporo Medical College

Abstract

A commercial alcoholic disinfectant (Welpas) was tested for its activity against adenovirus type 3 (Ad 3) by using two procedures, the in vitro suspension test and the in vivo fingertip test. Other available techniques for the sterilization of fingers were also evaluated for removal of Ad by using the fingertip test. In the suspension tests, the infectivity of Ad 3 was reduced to undetectable levels within 30~60 seconds. This results suggest the effectiveness of this disinfectant in reducing Ad infectivity. In the fingertip tests, the viruses were recovered from fingertips in varying titers after using one of the following techniques: wiping with tissue papers, washing with running water, washing with soap and rinsing with water, rubbing with Welpas, wiping with cotton soaked in 70% alcohol, or washing with a brush under running water. However, the viruses were not recovered when the fingertip was washed with water, wiped with paper, and rubbed with Welpas successively. This technique was found to be the most effective method currently available. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 44-48, 1990)

Key words: Adenovirus, Disinfectant, Welpas®, Antiviral activity, Handwashing

別刷請求先: 060 札幌市中央区南1条西16丁目 札幌医科大学眼科学教室 上野 哲治
(平成元年6月16日受付, 平成元年8月14日改訂受理)

Reprint requests to: Tetsuji Ueno, M.D. Dept. of Ophthalmol., Sapporo Medical College
S-1, W-16, Chuo-ku, Sapporo 060, Japan

(Received June 16, 1989 and accepted in revised form August 14, 1989)

I 緒 言

アデノウイルス (Ad) による結膜炎には、Ad 8 型や19型による流行性角結膜炎(EKC)や、Ad 3 型や7型による咽頭結膜熱 (PCF) などがあり、いずれも伝染力が強く流行をおこしやすい。特にこの流行は眼科外来において、医療従事者の手指や医療器具を介しておこることがあるため、その感染予防は眼科医にとって重要な問題となっている^{1)~3)}。医療器具の消毒に関しては、最近 Craven ら⁴⁾が、眼圧計のチップを対象として、いくつかの方法を検討しており、sodium hypochlorite などの有効性を報告している。一方、手指の消毒に関しては流水の下で十分に洗い流すことが有効な方法とされている。しかしどの程度洗えば感染を予防できるのかその基準は不明確であり、また Clarke ら⁵⁾は手洗いによってもアデノウイルスを除去し得なかったと報告していることから、眼科臨床医にとって確実に容易におこなえる手指の消毒法は確立されていないと言える。今回我々は、速乾性に手に擦り込む形式の手指用消毒剤であるウエルパス (Welpas[®]) を使用する機会を得たので、その抗ウイルス効果について検討をおこなった。またそれに加えて、従来おこなわれている手洗いなどによるウイルス除去の効果についても検討をおこない、アデノウイルス性結膜炎の確実に迅速な感染予防法の確立を試みた。以下その結果を報告する。

II 実験材料および方法

1) 細胞およびウイルス 細胞は HeLa 細胞を用い、10% fetal calf serum を含んだ Eagle' minimum essential medium (MEM) 中で培養した。ウイルスはアデノウイルス 3 型 (Ad3) の G.B 株を用いた。使用したウイルスの感染価は 1.3×10^{11} plaque forming unit (PFU)/ml であった。

2) 手指消毒剤 ウエルパス ウエルパス (丸石製薬株式会社) は 100ml 中にエタノール 83ml、塩化ベンザルコニウム 0.2g および界面活性剤、湿潤剤、精製水、香料を含み、医療従事者の手指消毒剤として使用されている。

3) ブラックアッセイ ウイルスの感染価はブラックアッセイを用いて検討した。ブラックアッセイは既述の方法⁶⁾⁷⁾を用い以下のようにおこなった。直径 6cm の plastic dish (Nunc) に培養した HeLa 細胞にウイルス液を感染させた後、5% fetal calf serum および

0.9% bacto agar (Difco) を含んだ MEM (white agar) をのせ、7日後、その上に 0.002% neutral red を含んだ white agar (red agar) を重層し 4~7 日後にブラックを判定した。

4) ウイルス感染価減弱試験

(1) suspension test : ウイルス液 100 μ l もしくは 10 μ l とウエルパス 100 μ l とを 30 秒間および 60 秒間混合した後、速やかに phosphate buffer saline (PBS) で 10 倍希釈を繰り返して反応を停止させた。この希釈液を用いてブラック法をおこない、ウエルパスのウイルス感染価におよぼす効果について検討した。

(2) fingertip test : ウイルス液 10 μ l を試験者の人差し指の指先に付着させた後、親指とのおいだでこすりあわせて乾燥させた。次いで以下のそれぞれの方法を用いてウイルスの除去を試みた。紙 (tissue paper) により付着部をふきとる。流水の下で 10 秒もしくは 60 秒間洗った後、紙でふきとる。石鹸を用いて 15 秒間洗った後、流水で 15 秒もしくは 60 秒間洗い、紙でふきとる。ウエルパスを指先につけ乾くまで擦り込む。70% エタノールに浸した綿で指先を拭きとる。ブラッシングしながら流水の下で 15 秒間洗う。流水の下で 15 秒間洗い、紙で拭き、ウエルパスを擦り込む。以上の処置の後、ウイルスを付着させた指先を PBS 1ml とセルローススポンジ (MQA tip) とで洗いウイルスの回収をおこなった。またウイルスを付着させて乾燥させた後、無処置のまま指先を洗浄して得られたウイルス量をコントロールとした。なお流水による洗浄 (15 秒)、石鹸を用いた洗浄 (15 秒)、ウエルパスを用いた方法、および流水で洗った後、拭き取り、ウエルパスを擦り込む方法についてはそれぞれ 2 回ずつおこなった。

III 結 果

(1) suspension test : ウイルス液 100 μ l (1.3×10^{10} PFU) とウエルパス 100 μ l とを混合した結果、表 1 に示すように 30 秒後では感染価は 1.0×10^6 PFU となり約 $1/10^4$ に低下した。60 秒後では検出感度未満 (10^4 PFU >) となり $1/10^6$ 以下の低下となった。次にウイルス液 10 μ l (1.3×10^9 PFU) とウエルパス 100 μ l とを混合した結果では 30 秒後で検出感度未満 (10^4 PFU >) となり $1/10^4$ 以下の低下となった。この結果からは 10^4 PFU 以下のウイルスであれば、ウエルパスに 30 秒接触させることにより感染力を消滅させられると思われる。なおブラック法をおこなう際、ウエルパスの濃度が高いと細胞に障害を与えブラックが検出できなくなる。こ

表1 suspension test : アデノウイルス 3 型 100 μ l (1.3×10^{10} PFU) もしくは 10 μ l (1.3×10^9 PFU) と ウエルバス 100 μ l とを直接混合し, 30秒および60秒後のウイルス感染価の変化.

V : W	30秒	60秒
1 : 1	1.0×10^6	$10^5 >$
1 : 10	$10^6 >$	not tested

V = ウイルス
W = ウエルバス
PFU/ml

のためウエルバスの影響がみられない希釈段階の上限に対応したウイルスの感染価がこの test の検出感度となる。今回の実験では、細胞に接触するウエルバスの濃度が $1/10^4$ 以下であれば細胞へ障害を与えずブラックの検出が可能であった。

(2) fingertip test : 指先に付着させたウイルス (1.3×10^9 PFU) をそのまま回収した場合、そのウイルス量は図 1(a) に示す様に 1.3×10^7 PFU であった。本操作による回収率は約 $1/10^2$ となる。この値を基準として、以下の各処置をおこなった場合の結果との間で比較検討をおこなった (図 1)。まず、(b) 指先を紙 (tissue paper) でふきとった後に回収されたウイルス量は 3.1×10^4 PFU であった。基準に比べ約 $1/400$ の減少である。(c) 流水 (水道水) の下で15秒間洗浄した

場合、回収されたウイルス量は、1 回目 5.6×10^3 PFU, 2 回目 1.0×10^3 PFU, 平均値 3.3×10^3 PFU, (d) 60秒間の洗浄では 3.8×10^2 PFU であった。洗浄の時間が長いほどウイルス量は減少するが60秒の洗浄でも完全にはならず、紙でふきとるのに比べても $1/10 \sim 1/100$ 程度の減少にすぎない。(e) 石鹸を用いて洗い、その後流水の下で洗浄した場合、15秒間では、1 回目 1.1×10^3 PFU, 2 回目 3.4×10^2 PFU, 平均値 7.2×10^2 PFU, (f) 60秒間では 1.9×10^2 PFU であった。この場合でも長く洗うほど効果は大きい、やはりウイルスは残った。(g) ウエルバスを指先に擦り込んだ場合では1 回目 4.0×10^3 PFU, 2 回目 1.4×10^3 PFU, 平均値 2.7×10^3 PFU であった。この結果は流水で15秒間洗浄するのと同様であった。(h) 70%エタノール綿で拭き取った場合では 3.1×10^4 PFU であった。これは紙で拭いた値と同じであった。(i) ブラッシングをしながら流水で15秒間手を洗った場合は 2.2×10^2 PFU であった。この方法は、流水で洗う場合や石鹸で洗うより効果は大きかった。(j) 最後におこなったのは流水で15秒洗い、紙で拭いた後ウエルバスを擦り込む方法である。この方法も繰り返しておこなったが、ブラックは2回とも検出できず、今回おこなった中では最も効果的であった。

infectivity titer (PFU/ml)

	10	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
(a) 1.3×10^7								
(b) 3.1×10^4								
(c) 3.3×10^3								
(d) 3.8×10^2								
(e) 7.2×10^2								
(f) 1.9×10^2								
(g) 2.7×10^3								
(h) 3.1×10^4								
(i) 2.2×10^2								
(j) 0								

図1 fingertip test : アデノウイルス 3 型 10 μ l (1.3×10^9 PFU) を付着させた指先に対して、(a) 無処置、(b) 紙で拭き取る。(c) 流水で15秒洗う、(d) 流水で60秒洗う、(e) 石鹸と流水で15秒洗う、(f) 石鹸と流水で60秒洗う、(g) ウエルバスを擦り込む、(h) 70%エタノールで拭く、(i) ブラッシングしながら流水で15秒洗う、もしくは、(j) 流水で15秒洗い紙で拭きウエルバスを擦り込む。以上の処置の後、指先から回収されたウイルスの感染価。なお (c), (e), (g), および (j) は2回おこなってえられた値の平均値。

IV 考 按

アデノウイルスによる角膜炎や結膜炎は、眼科外来を受診した患者の間で流行しやすいことが知られており、この感染は医師などの手指や眼圧計などの検査器具を介して発生することが多い。Buehler ら²⁾はこの感染を防ぐため以下の方法を勧めている。(1)手指を石鹸を用いて流水の下で少なくとも10秒以上十分に洗う。(2)器具は75℃の水槽に5分間浸すか、1%chloramine T や1%~2% sodium hypochlorite の溶液に15分間浸す。(3)EKCの患者は隔離して診察をおこなう。(4)流行が発生したら開封した点眼液は廃棄する。(5)流行が終わるまで眼圧測定などの検査は延期する。(6)二次感染を防ぐため患者への指導をおこなう。これらの中で手指の消毒に関しては、(1)にあるように手指をよく洗浄することとしている。しかしClarke ら³⁾は手指を洗ってもウイルスが残存したと報告しており、手指を介したウイルス感染の予防方法はまだ確立していないと言える。

ウエルバスは、エタノールなどを含む消毒剤で、手指へ直接擦り込み使用するものである。今回、我々はウエルバスの抗ウイルス効果を調べると共に、従来用いられている感染予防法がどの程度効果を持っているのか検討をおこなった。ウエルバスとウイルスとを直接混合する suspension test では、ウイルスの感染価は $1/10^5$ もしくはそれ以下に低下しており、ある程度効果のあることがわかった。しかしこの suspension test は試験管内でおこなっているため、実際に使用する場合は以下の様にいくつかの異なる点がある。ウエルバスを手指に擦り込むと30秒程で乾燥してしまう。このため、手指に付着したウイルスに対するウエルバスの比率が低下し抗ウイルス効果が減弱すると思われる。またウエルバスがウイルスと接触する時間も30秒以下となる。さらに皮膚表面の蛋白質がウエルバスのようなアルコールの持つ抗ウイルス効果を阻害することや、逆に皮膚表面の脂質やpHがウイルスの感染力を低下させることも考えられる。このためSchürmann ら⁸⁾は抗ウイルス剤の評価をおこなう場合、suspension test だけではなく、実際にウイルスを付着させた手指に薬剤を作用させてその効果を検討する方法を勧めている。今回の我々の実験でもこの様なことからウエルバスによる洗浄の他に、いくつかの効果的と思われる処置をウイルスの付着した指へおこない、それぞれの抗ウイルス効果を検討してみた。

まず紙で拭きとっただけでも、指に付着していたウイルス量は何もしなかった場合の量に比べて $1/300$ に低下した。これは機械的な除去の有効性を示している。流水による洗浄および石鹸による洗浄の時間は、結果にも記載したように、15秒と60秒とに設定した。この理由として、医療従事者が手を洗う時間はICUなどで平均15秒であるとの報告⁹⁾があるため通常の洗浄時間を15秒とし、これより長く洗浄する時間として60秒とした。実際に60秒間手をあらうのは15秒に比べてかなり長く感じられる。結果は、時間的には長く洗ったほうが効果があった。しかし、ウイルスの完全な除去はできなかった。また石鹸に関しては、15秒程度の手洗いでは使用しても、しなくても、大きな差はないと言える。ウエルバスの擦り込みや、アルコール綿による拭き取りでも、それぞれ単独ではウイルスの除去はできなかった。ブラッシング洗浄では、流水や石鹸で洗ったより効果は大きいものの、やはりウイルスは手指に残留した。ブラッシングは単に手を洗うことに比べ面倒で、皮膚を痛めることもあり、しかもこれのみではウイルスの除去ができないことから考えると眼科外来で頻繁に用いる方法としては適していないと思われる。最後におこなったのは流水で洗い、紙で抜き、ウエルバスを擦り込む方法である。この操作によりウイルスは手指より検出されず、今回検討した方法の中では最も効果的であった。fingertip test は実際に人の手指を用いる方法であり、またブラックアッセイ自体が、わずかな操作の違いで結果が変わることがあり、再現性が必ずしも高いとは言えない。このため実験によって得られた感染価の細かな差はあまり大きな意味は持たないが、この最後の方法では2回ともウイルスは検出されず、その結果はある程度評価できると考えられる。これは洗浄し紙で拭く機械的除去作用と、ウエルバス中のアルコールによる化学的除去作用が相加的に働いたものと思われる。この方法は、臨床的にさほど時間がかからず、皮膚への障害も少ないことから考えると、現在のところ手指を介したアデノウイルス感染予防法として適当と思われる。

今回の実験では、臨床的には主に咽頭結膜熱をおこすAd3を使用した。アデノウイルスには多くの血清型があり、それぞれ物理的・化学的性質が異なっており、アルコールに対する感受性も差があると考えられている。このため流行性角結膜炎を主に起こすAd8やAd19についても、同様の実験をおこなう必要があるが、これらの血清型は増殖力が弱く、ブラックの検出

が困難である。さらにウイルスの感染価が低いと、あまり効果の無い方法でも容易にウイルスが検出されなくなり、ウイルス除去方法の正当な評価ができなくなると考えられる。また Ad3 と高い DNA 塩基配列ホモロジーを有し、物理的にも化学的にも極めて類似した性質を持つ Ad7¹⁰⁾ が院内感染により発生した流行性角結膜炎の患者より分離されたとの報告もある²⁾。以上の理由により今回の実験では、高い感染価を持つ Ad3 をアデノウイルスの代表として用い、手指を介した感染の予防法について検討をおこなったわけである。今後は Ad8 や Ad19 に対し感受性が高く、かつブラックアッセイに耐えられる丈夫な細胞を選び、同様の検討をおこないたい。

稿を終えるにあたり、御校閲いただいた中川 喬教授に感謝いたします。また貴重な御助言をいただいた札幌医科大学癌研究所分子生物学部門藤永 恵教授および吉田幸一講師に感謝いたします。

文 献

- 1) D'Angelo LJ, Hierholzer JC, Holman RC, et al: Epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 8: Epidemiologic and laboratory aspects of a large outbreak. *Am J Epidemiol* 113: 44—49, 1981.
- 2) Buehler JW, Finton RJ, Goodman RA, et al: Epidemic keratoconjunctivitis: Report of an outbreak in an ophthalmology practice and recommendations for prevention. *Infect Control* 5: 390—394, 1984.
- 3) 風見由花子, 鈴木真理, 風見宣生他: 院内発生例を主としたアデノウイルス 8 型流行性角結膜炎の臨床像. *眼臨* 83: 212—215, 1985.
- 4) Craven ER, Butler SL, McCulley JP, et al: Applanation tonometer tip sterilization for adenovirus type 8. *Ophthalmology* 94: 1538—1540, 1987.
- 5) Clarke SKR, Dean Hart JC, Barnad DL: The disinfection of instruments and hands during outbreaks of epidemic keratoconjunctivitis. *Trans Ophthal Soc UK* 92: 613—618, 1972.
- 6) Green M, Wold WSM: Human adenoviruses: Growth purification and transfection assay, in Jakoby WB and Pastan IH (eds): *Methods Enzymol LVIII* New York, Academic Press, 425—435, 1979.
- 7) 松村武男: XI ウイルス学への応用: 1. ブラック法, 堀田 進, 大山昭夫 編: 組織培養, 基本と実際. 大阪, 永井書店, 235—242, 1976.
- 8) Schürmann W, Eggers HJ: Antiviral activity of an alcoholic hand disinfectant. comparison of the in vitro suspension test with in vivo experiments on hands, and on individual fingertips. *Antiviral Res* 3: 24—41, 1983.
- 9) 西城一翼, 板谷幸一, 片岡秋子他: 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.
- 10) Tibbetts C: Physical organization of subgroup B human adenocirus genomes. *J Virol* 24: 564—579, 1977.