

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)  
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」  
研究協力報告

## 水溶性高分子ポリマーコーティングによる 手指汚染の水洗いによる簡易除去 (第二報)

研究協力者	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
	林 真由美	新潟県保健環境科学研究所
	広川 智香	新潟県保健環境科学研究所
	新井 礼子	新潟県保健環境科学研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

調理従事者による食品汚染が食中毒の原因となることが多く、手指の衛生管理が重要な課題である。ノロウイルスの代替ウイルスとして、大腸菌の MS2 ファージを使用して、汚染前の水溶性高分子ポリマーによる手指のコーティングが、手洗い後に手に残存するウイルス汚染を減らす効果があるかどうか評価した。

3 人の被験者の左右それぞれの手を  $2 \times 10^7$  個のファージで汚染し、次の 4 つの試験、A: 手洗い無し、B: 水のみの手洗い、C: ハンドソープによる手洗い、D: 3%カルボキシメチルセルロースの 45%エタノール液 (CMC 液) によるコーティング後にファージで汚染し水洗い、を実施して、手に残ったファージをグローブジュース法で回収し、回収したバッファー中のファージ濃度を定量した。回収液中のファージ濃度の平均は、A: 623pfu/ml、B: 27.6pfu/ml、C: 42.6pfu/ml、D: 2.2pfu/ml と、D が最も濃度が低かった。

CMC 液によるコーティングを実施して水洗いする方法が、最も手に残るファージ量が少なく、トイレの前に手指にこれらのコーティング剤を塗布することで、トイレ後の手洗いにおいて、トイレ中のウイルスの手指汚染を効率的に洗い流すことができると考えられた。

### A. 研究目的

調理従事者等からの食品の汚染は手指を介して汚染することが多いと考えられ、  
厳重な手洗いの方法が周知されている。

しかし推奨されている手洗い方法は時間や手間を要し、それを日々実践することは容易ではない。

手指がウイルスに汚染される機会とし

て最も多いのはトイレと考えられ、特に自分のお尻を拭く際に手指を汚すことが多いと考えられる。

お尻を拭く作業を汚染作業と考え、その前に手袋をして行くと手を汚すことが無いが、手袋の着脱に手間がかかり、汎用的ではない。

そこで、トイレに入る前に手指を水溶性ポリマーでコーティングして、トイレの後に手を洗えば、ポリマーとともに簡単にウイルスを含む汚れを落とすことができるのではないかと考え、検討を行った。

昨年度の研究では、水溶性高分子ポリマーのカルボキシメチルセルロースとポリエチレングリコール6000で指をコーティングすることで、墨汁やノロウイルスを流水のみで容易に除去できることが確認された。

そこで、今年度は手全体を用いて、安全な大腸菌 MS2 ファージをノロウイルスの代替ウイルスとして汚染ウイルスに使用し、水溶性高分子ポリマーによるコーティングの手洗いにおける有効性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

使用したファージの調製

ノロウイルスの代替ウイルスとして、*Escherichia coli* phage MS2 (NBRC 102619 株) を使用した。宿主菌株は、*Escherichia coli* (以下、*E. coli*) (NBRC 106373 株) を使用した。

*E. coli* の増殖用培地として、Bacto Trypton (DIFCO) ; 1g、D(+) グルコース ; 0.1g、NaCl ; 0.8g、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ; 0.03g、

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.015g を蒸留水 100ml に溶解し、121°C 15 分オートクレーブ滅菌したブイヨン (以下、トリプトブイヨン) を使用した。

トリプトブイヨンに *E. coli* を接種して約 6 時間程度培養後、MS2 ファージを接種して一晩培養した。これを 9000rpm 10 分遠心後、上清を回収し、1.2 μm、0.22 μm、0.1 μm のフィルターで順次ろ過した。この上清に 10ml あたり PEG6000 ; 1.2g、NaCl ; 0.58g を加えて溶解後、2 時間冷蔵静置した。これを 10000rpm 30 分遠心して上清を除去し、沈査を 0.5% ウシ血清アルブミン加 PBS(-) (以下、BSA 加 PBS(-)) に浮遊させ、再度 0.22 μm のフィルターでろ過して原液とした。

この原液を 10 倍段階希釈してプラーク法により、濃度を算定したところ、原液は  $2.8 \times 10^{11}$  pfu/ml の濃度であった。

これを 0.5% BSA 加 PBS(-) で、 $5 \times 10^5$  pfu/μl に希釈して塗布用原液とした。

### 2. 方法 1 ダブルレイヤーアガー法によるプラーク形成によるファージの定量

トリプトブイヨンに寒天を 1% 濃度に加えた培地約 10ml をシャーレに入れて下層平板を作製した。下層平板に被検液を入れ、更に約 6 時間程度トリプトブイヨンで培養した *E. coli* 菌液 100 μl を入れた。ここに、寒天濃度 0.5~0.6% のトリプトブイヨン寒天培地約 10ml を入れて混釈した。固化した培地を安全キャビネット内で乾燥後、37°C オーバーナイトで培養し、形成されたプラーク数をカウントした。なお、全てのファージの定量はシャーレを 2 枚使用して、その平均をデータとした。

### 3. 方法 2 被験者の手の前処理と MS2 フ

## ファージの汚染

手指の消毒剤や手洗い剤の有効性を評価する ASTM インターナショナルの方法； ASTM E2011-13 : Standard Test Method for Evaluation of Hygienic Handwash and Handrub Formulations for Virus-Eliminating Activity Using the Entire Hand を参考に、方法 2 以降の試験を実施した。

被験者 3 名の左右の両手を使用した。試験前の手の準備として、①抗菌性物質を含まない石鹸で手を洗い、1 分以上流水で流した。②ペーパータオルで水分を除去し、乾燥させた。③1.5ml の 70%エタノールを手にとり、両手全面に広げて十分乾燥させたのち、試験を行った。

ファージ液の塗布方法は、片手あたり、 $5 \times 10^5$  pfu/ $\mu$ l のファージ液  $40 \mu$ l (合計  $2 \times 10^7$  pfu) を塗布した。塗布は、手指の汚染の実態を考慮して、マルチチャンネルピペットに 4 本のチップを装着して  $2 \mu$ l にセットし、手の指と平に 5 か所塗布したのち、それぞれの手をもんで手の平面に広げて乾燥させた。

### 4. 方法 3 グローブジュース法 (以下、GJ 法) による手からのファージの回収

クリーンルーム用の高度清浄滅菌アセトニトリル手袋 (M サイズ) に、0.1%ツイーン 20、1%ペプトン加 PBS(-) を 40ml 入れ、これを被験者の両手に装着し、輪ゴムで手首を止めた。1 分間両手をよくもんだ後、手袋を外し、バッファーを 50ml 遠沈管に回収した。回収したバッファーを  $0.22 \mu$ m のフィルターで濾過し、原液あるいは 0.1%ツイーン 20・1%ペプトン加 PBS(-) で適宜 10 倍段階希釈してプラーク

法の被検液とした。

### 5. 方法 4 MS2 ファージによる手指汚染と手洗い試験

以下の A から D の試験を次の条件で実施した。各試験は、1 日 1 回として、1 日以上の間をあけて行った。手洗いは、25°C の水温で、1 分間で 2 l の水流で 20 秒洗浄することとした。

試験 A: ファージ液を手に塗布し乾燥後 GJ 法で回収した。

試験 B: ファージ液を手に塗布後、水で手洗しペーパータオルで水分を除去した後に GJ 法で回収した。

試験 C: ファージ液を手に塗布後、市販の泡状ハンドソープ 1 押しを片手に付け、両手全体に伸ばしてこすった後手洗いし、ペーパータオルで水分を除去した後 GJ 法で回収した。

試験 D: 3%カルボキシメチルセルロース・45%エタノール液 (以下 CMC 液) 1.5ml を片手にとり、両手全面に広げて乾燥させた。ファージ液を手に塗布して乾燥後、手洗いし、ペーパータオルで水分を除去したのちに GJ 法で回収した。  
(倫理面への配慮)

手指汚染の実験に参加した 3 名に、MS2 ファージはヒトへの感染力は無いことを説明し、承諾を得たうえで実験した。

## C. 研究結果

A から D の各試験で、GJ 法によりそれぞれ片手から回収されたバッファー中のファージ濃度の結果を表 1 にまとめた。ファージを塗布後すぐに GJ 法で回収する試験 A では、回収バッファー 1ml 中のファージ濃度は、片手平均で 623 pfu/ml で、40ml

中の総量は  $2.5 \times 10^4$  pfu であった。汚染したファージの総量が  $2 \times 10^7$  pfu であることから考えると、回収率は 0.13% と非常に少なかった。

水のみの手洗い試験 B では、回収したバッファー中のファージ濃度は、片手平均 27.6 pfu、ハンドソープ手洗い試験 C では、回収したバッファー中のファージ濃度は、片手平均 42.6 pfu で、水洗いのみのほうが回収ファージ量が少なかった。

CMC 液でコーティングした後ファージで汚染し、水洗いした試験 D では、回収バッファー中のファージ濃度は 2.2 pfu/ml と最も低い濃度であった。

試験 D と A~C の試験における 3 人の左右の手から回収したバッファー中のファージ濃度について、t-検定を行ったところ、危険率 0.01% で有意差があることが確認された。

#### D. 考察

A を対照とすると、B と C の試験では、概ね 1 オーダー低く、D は更に B と C より 1 オーダー低い成績となり、CMC 液によるコーティングを行った手からのファージの回収量が最も少なく、CMC 液によるコーティングが手に残るファージ量を最も少なくする方法であることがわかった。

水洗いのみの試験 B より、ハンドソープで洗った試験 C の回収バッファー中のファージ濃度が高い傾向となった。これは、ハンドソープの使用により、グローブジュース法によるその後の回収の際に、手に付いたファージが落ちやすくなったためではないかと考えられた。

しかし、試験 A によるファージの回収

率が 0.13% と非常に低く、ファージが手に残っているのか、あるいはその後の処理中に物に吸着されるのか不明であり、追加試験によって手に付着している量を明らかにする必要がある。これらの実験条件を整えて、手指に付いたファージの量を正確に評価する方法を検討して、再度 CMC 液の有効性を評価する必要がある。

また、実施した試験 A から D は 1 回のみであることから、繰り返し実施する必要がある。

#### E. 結論

CMC 液による手指のコーティング法は、水やハンドソープを用いた手洗いより、手に残るファージの量を 1/10 にすることが確認された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
無し
2. 学会発表  
無し

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表 1 試験 A から D における GJ 法による回収バッファー中のファージ濃度

	被験者						(pfu/ml)	
	1		2		3		平均	SD
	左手	右手	左手	右手	左手	右手		
試験A ファージ塗布後回収	545	1170	390	990	205	435	623	375
試験B 水洗のみ	21.9	22.4	17.5	35.6	22.9	45.3	27.6	10.6
試験C ハンドソープ手洗い	44.4	99.6	26.0	31.8	16.9	36.8	42.6	29.5
試験D CMCコーティング後水洗い	2.8	6.0	1.3	1.5	1.0	0.3	2.2	2.1