Bull, Natl. Inst. Health Sci., **129**, 37-54（2011） **Special Report**

ノロウイルスの不活化に関する研究の現状

野田　衛#，上間　匡

Current Topics on Inactivation of Norovirus

Mamoru Noda# and Masashi Uema

Human norovirus is the most important foodborne virus in Japan. According to the statistics of food poisoning by the Ministry of Health, Labour, and Welfare (MHLW), the number of patients infected with norovirus has accounted for half of all the patients with food poisoning in recent years. One of the most important measures for the control of infectious diseases is establishing of techniques for inactivating pathogens. For the prevention of food poisoning caused by norovirus, MHLW recommends that foods be subjected to heat treatment at 85°C for 1 min or more; moreover, it recommends the use of sodium hypochlorite to inactivate (disinfect) this virus. However, application of these treatments is not always feasible because heat results in denaturation and sodium hypochlorite can be toxic to the human body and can cause discoloration. Therefore, it is necessary to develop and improve the efficacy of disinfectants and physiochemical treatments against the virus. Human norovirus cannot be propagated in cell culture or in a small animal. This matter is the greatest hindrance for testing the stability of this virus in environments or for evaluating the efficacy of disinfectants, heat treatment, pH treatment, ultraviolet or gamma irradiation, high hydrostatic pressure treatment, and other methods for the inactivation of the virus. Hence, some viruses such as human enterovirus, feline calicivirus, or mouse norovirus have been used as surrogates of human norovirus. The data on inactivation and stability of surrogate viruses are exclusively used as the data of human noroviruses. In recent years, some attempts to distinguish between infectious and non-infectious virus particles by genetic methods such as polymerase chain reaction have been made. These methods include pretreatments by RNase for digesting viral RNAs from non-intact or destroyed virus particles, or addition of a reagent such as ethidium monoazide for inhibiting PCR amplification of viral RNAs from them, before RNA extraction. Non-intact virus particles, which may represent virus particles with some damage(s) in the structural protein(s), are not necessarily synonymous with non-infectious virus particles. However, the results of methods using these treatments, compared to the results of traditional methods without these treatments, seem to be more correlated to the amount of the infectious virus particles. Although many disinfectants or physiochemical treatments have been reported, traditional techniques such as removal of virus particles by washing in running water, heat treatment, or disinfection by sodium hypochlorite are still important control measures. Establishment of control measures for human norovirus and successful propagation of the virus in cell culture are strongly desired.

Keywords: norovirus, inactivation, disinfectant, food, environment

1．はじめに

ノロウイルスは我が国において最も重要な食品媒介性ウイルスである．厚生労働省の食中毒統計に基づく過去数年の病因物質別の報告数をみると，事例数ではカンピロバクターに次いで第二位か第一位，患者数では全食中毒患者の約半数を占めており，本ウイルスの制御は食品

To whom correspondence should be addressed:
Mamoru Noda; Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan; Tel: +81-3700-9104; FAX: +81-3700-9527; E-mail: mamorunoda@nihs.go.jp

衛生対策上重要な課題のひとつとなっている．食中毒予防の基本のひとつは，その病原体の殺菌・消毒法の確立にある．ノロウイルスの不活化に有効な方法として，厚生労働省は85℃，１分以上の加熱処理，次亜塩素酸ナトリウムの使用を推奨しているが，加熱による熱変性，次亜塩素酸ナトリウムの漂白作用や人体に対する影響から，必ずしもあらゆる場面で使用できる訳ではなく，それらに替る有効な殺菌・消毒法の開発が求められている．一方，ヒトノロウイルスは細胞培養や小動物で増殖させることができないため，ヒトノロウイルスに対する薬剤の有効性評価，物理化学的処理に対する抵抗性，環境や食品での生存性等を調べることができない．そのため，現在それらの研究はネコカリシウイルス等の代替ウイルスを用いて行われている．近年では，感染性ウイルスと非感染性ウイルスとを区別するための遺伝子検査法の開発が進んでいる．

本稿では，ノロウイルスを中心として，A型肝炎ウイルスなど食品媒介性ウイルスの不活化法，生存性などに関する研究の現状について概観する．

２．ノロイルスの不活化，生存性等の研究の歴史と現状

ウイルスに対する熱，pHなどの物理化学的作用や殺菌・消毒薬等に対する抵抗性および環境における生存性などを調べるためには，生きた（感染性のある）ウイルス量を定量的に測定する必要がある．感染性ウイルス量の測定方法には本来の宿主である動物あるいはそのウイルスに感受性のある実験動物あるいは培養細胞を用いる方法があるが，一般に簡便で定量性の高い培養細胞を用いる方法が利用される．しかし，ヒトノロウイルスはこれまで培養細胞での培養が成功していないため，培養細胞による方法は実施することができない．そのため，これまでノロウイルスの不活化等に関する研究は，①ボランティアによるヒトの糞便由来ノロウイルスの感染実験，②ノロウイルスに近縁な代替ウイルスによる培養細胞での実験等により行われてきた．

ボランティア感染実験は糞便由来のヒトノロウイルスを含むジュースをボランティアに飲ませ，嘔吐，下痢等の胃腸炎症状の発症の有無を調べるもので主に米国で行われてきた[1,2]．感染性のあるノロウイルスの有無を直接的に知ることができるが，再現性や定量性に欠けるなどの問題点がある．また近年ノロウイルスに対する感受性に個体差が認められることが明らかになっており[3]，その発見以前の研究の実験結果には疑問点が残る．

一方，分類学的に近縁なウイルスは互いに類似した物理化学的性状を示すことが多いことから，種々のウイルスによる不活化実験の結果からノロウイルスの抵抗性等が類推され，またノロウイルスの抵抗性等を知る目的で培養できないヒトノロウイルスに替わり，種々のウイルスが不活化実験等に利用されてきた．研究初期においては同じヒトの腸管系ウイルスでありエンベロープを持たない１本鎖RNAウイルスであるポリオウイルス，コクサッキーウイルスおよびエコーウイルスなどのエンテロウイルスが用いられていたが，1990年代後半になると，ノロウイルスと同じカリシウイルス科に属し細胞培養での培養に成功したネコカリシウイルスが主に利用されるようになった．現在のノロウイルスに対する加熱や消毒剤等に対する抵抗性は，主にこのネコカリシウイルスのデータに基づいており，米国の環境保護庁（Environmental Protection Agency，EPA）の抗微生物剤部局（Antimicrobials Division）は抗ウイルス効果試験法として，ノロウイルスの不活化試験にネコカリシウイルスを用いるプロトコルを作成している（http://epa.gov/oppad001/pdf_files/initial_virucidal_test.pdf）．また，ノロウイルスと同様に二枚貝等を介して感染し，食品媒介性ウイルスとして重要なA型肝炎ウイルスに関するデータが利用される場合もある．

2004年，マウスノロウイルスが，ヒトノロウイルスと同じノロウイルス属に属するウイルスとして初めて培養細胞での分離・増殖が報告された[4]ことから，マウスノロウイルスを用いた不活化実験等が行われはじめた．また，ヒトノロウイルスはヒト以外ではチンパンジーが感受性動物として報告されていたが，2006年にブタにおけるヒトノロウイルスの感染が報告[5]されたことから，今後ヒトノロウイルスのブタに対する感染性を指標とした実験も行われるものと思われる．

近年，感染性ウイルスを検出するための遺伝子検査法の開発に関する報告がなされているが，このことに関しては詳しく後述する．

一方，ヒト結腸癌由来株化細胞である$CaCo_2$細胞の３次元立体培養法によりヒトノロウイルスの増殖が確認されたとする報告[6]がなされたが，その後の研究報告はなく，他のグループの追試報告もみられない．しかし，本報告では，$CaCo_2$細胞の３次元培養法はノロウイルスの感染性試験に有用と述べられており，今後の研究動向が注目されている．

３．物理化学的要因，消毒剤等による不活化

３．１　加熱

ウイルスは一般的に加熱に弱く，加熱処理はウイルスの不活化に最も有効な手段である．ネコカリシウイルスを用いた実験では，56℃・60分，70℃・５分，煮沸・１分で，それぞれ検出限界（$7.5\log_{10}$）以下となり[7]，東京都健康安全研究センターのデータでは60℃・５分以上，65℃・３分以上の加熱で，70℃以上では設定温度到

達時点で検出限界（4 $\log_{10}$）以下となっている（http://www.metro.tokyo.jp/INET/OSHIRASE/2007/11/DATA/20hb1401.pdf）．Duizer らによるネコカリシウイルスおよびイヌカリシウイルスを用いたデータでは，20℃・1週間，37℃・24時間，56℃・8分，71.3℃・1分で3 $\log_{10}$減少し，4℃では2週間の観察で1 $\log_{10}$以下しか減少していない[8]．マウスノロウイルスとネコカリシウイルスを用いた1 $\log_{10}$低下に必要な時間を比較したデータでは，それぞれ56℃で3.5分，6.7分，63℃で25秒，25秒，72℃で9.9秒，7秒で[9]，マウスノロウイルスはネコカリシウイルスと比較して，特に低温加熱（56℃）に対し抵抗性が強い傾向が示唆されている．スキムミルク等に添加したA型肝炎ウイルスを用いた実験では，85℃・30秒以内で検出限界（5 $\log_{10}$）以下に，80℃・74.4秒（1.24分）で5 $\log_{10}$減少している[10]．

ノロウイルスの構造タンパク質を発現して作製したノロウイルス様粒子（VLP）の抗体に対する結合性をELISA法で調べた実験によると72℃前後の加熱処理で少なくても10^3程度の抗原性の減少が観察されている[11]．

Hewitt ら[12]は，ノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスの加熱による不活化試験の代替ウイルスとしてのマウスノロウイルスの有用性を感染価およびリアルタイムPCR法によるRNA定量値を指標として検討した．感染価を指標としたマウスノロウイルスとA型肝炎ウイルスの比較では，水およびミルクにおいて，63℃および72℃での熱感受性はD値（値が1 $\log_{10}$低下するのに必要な時間）および経時的な感染価の推移において同様な傾向を示した．一方，ノロウイルスを含め，RNA定量値を指標として加熱による経時的変化をみると，ノロウイルスはマウスノロウイルスやA型肝炎ウイルスと比較して定量値の低下が少なく，特に63℃の水においてその傾向が顕著であった．これらの結果から，Hewitt らはヒトノロウイルスはマウスノロウイルスやA型肝炎ウイルスと比較して熱に対して抵抗性が強く，代替ウイルスを用いての評価には注意が必要であると考察している．

3．2　紫外線，γ線

紫外線照射はカキの浄化用の海水の殺菌処理等に常用されている．リン酸緩衝液中のネコカリシウイルス，A型肝炎ウイルス，ポリオウイルス1型，大腸菌ファージMS2および大腸菌ファージφX174を用いた紫外線による不活化実験では，1 $\log_{10}$減少に必要な紫外線照射量は，それぞれ47.85，36.50，24.10，23.04，15.48mWs/cm^2で，ネコカリシウイルスが最も不活化されにくかった[13]．他の報告ではネコカリシウイルス，イヌカリシウイルス，大腸菌ファージMS2の3 $\log_{10}$減少に必要な紫外線照射量は，それぞれ120，200，650J/m^2で，大腸菌ファージMS2，イヌカリシウイルス，ネコカリシウイルスの順に紫外線に耐性であり，ウイルスが含まれる溶液中の蛋白質の濃度には特に影響を受けなかったと報告されている[14]．また，滅菌済み下水二次流出水に添加したネコカリシウイルス，ポリオウイルス，大腸菌ファージMS2および大腸菌の4 $\log_{10}$減少に必要な紫外線照射量は，それぞれ19.04，27.51，62.50，5.32mWs/cm^2で，ネコカリシウイルスが大腸菌に次いで，紫外線照射に感受性であったとする報告もある[15]．これらの結果の違いの原因は現時点では不明である．

γ線照射に関しては，ネコカリシウイルス，イヌカリシウイルス，大腸菌ファージMS2の比較実験で3 $\log_{10}$減少に必要なγ線照射量は，低濃度の蛋白質存在下で，それぞれ500，300，100Gyでネコカリシウイルスおよびイヌカリシウイルスは大腸菌ファージMS2より耐性であること，および高濃度蛋白質存在下ではいずれの微生物もほとんどγ線で不活化されなかったことが報告されている[14]．

3．3　pH

感作時間30分のpH安定性試験で，イヌカリシウイルスはpH 5以下およびpH10以上で，ネコカリシウイルスはpH 2以下およびpH10以上で検出限界（5 $\log_{10}$）以下に，ネコカリシウイルスはpH 9，イヌカリシウイルスはpH 6で4 $\log_{10}$程度感染価が低下し，ネコカリシウイルスはイヌカリシウイルスと比較して，アルカリ側で不安定，酸性側で安定している傾向があった．イヌカリシウイルスおよびネコカリシウイルスの両方が検出限界（5 $\log_{10}$）以下になる条件はpH 2以下およびpH10以上であった[8]．

マウスノロウイルスとネコカリシウイルスを用いた実験（37℃，30分間の感作）では，ネコカリシウイルスはpH 2以下およびpH10で4 $\log_{10}$以上，pH 3で3 $\log_{10}$以上，pH 4およびpH 7～pH 9で2 $\log_{10}$程度不活化されたのに対し，マウスノロウイルスはpH 2～pH 9で1 $\log_{10}$以下，pH10で1.8$\log_{10}$程度しか低下せず，マウスノロウイルスはpH 2～pH10の範囲で不活化されにくかった[9]．

3．4　消毒剤

3．4．1　次亜塩素酸ナトリウム

次亜塩素酸ナトリウムはノロウイルスの不活化に有効な薬剤として最も常用されている．ネコカリシウイルスを用いた実験では，5,000ppm以上の次亜塩素酸ナトリウムの1分間の作用で検出限界（5 $\log_{10}$）以下に不活化された[7]．100～1,000ppmの濃度では供試した製品ある

いは報告により違いがみられ，1,000ppm・1分間の作用で2.5$\log_{10}$程度しか不活化しないとする報告から，200ppm・30秒間の作用で5$\log_{10}$以上不活化されるとする報告もある[7,16,17]．

ネコカリシウイルスおよびイヌカリシウイルスを用いた実験では，両ウイルスとも10分間の作用で3,000ppm以上では検出限界（5$\log_{10}$）以下に不活化され，30ppm以下では1$\log_{10}$以下の減少であったが，300ppmではネコカリシウイルスは10分から30分の作用で2$\log_{10}$以下の減少にとどまったのに対し，イヌカリシウイルスでは10分で3$\log_{10}$以上，30分で4$\log_{10}$以上減少し，両ウイルスの次亜塩素酸ナトリウムに対する抵抗性に違いが認められている[8]．

A型肝炎ウイルスを用いた低濃度の次亜塩素酸ナトリウムによる実験では，10mg/L・30分の作用で，検出限界（約5$\log_{10}$）以下に不活化されている[18]．

3．4．2　アルコール類

アルコール類のうち消毒・殺菌に最も一般的に利用されているエタノールでは，50%・3分，70%・3分，80%・5分，75%・5分の作用でネコカリシウイルスが4$\log_{10}$以上不活化されたとする報告[17,19]がある一方，10～100%の濃度，1，3，10分間の作用で効果を比較し，すべての条件で2.3$\log_{10}$（99.49%）以下の減少しかなかったとする報告もみられる[20]．また，ネコカリシウイルスおよびイヌカリシウイルスを用いて70%エタノールの効果を経時的に調べた実験では，8分で2$\log_{10}$以下，30分で3$\log_{10}$，60分で5$\log_{10}$以上の減少がみられ，エタノールの効果にはある程度の作用時間が必要とする報告もある[8]．

1-プロパノールではネコカリシウイルスは，50%・30秒，70%・30秒，80%・3分で4$\log_{10}$以上の減少，2-プロパノールでは，50%・3分，70%・5分の作用で4$\log_{10}$以上の減少がみられた[19]．一方，エタノールと同様に10～100%の濃度で，1，3，10分間の作用で効果を比較し，すべての条件で2.8$\log_{10}$（99.84%）以下の減少しかなかったとする報告もある[20]．

ネコカリシウイルスに対してエタノール，1-プロパノールおよび2-プロパノールの最も不活化効果の高い濃度は，それぞれ67%，60%，58%とされている[19]．その有効性は試験管内では1-プロパノール＞エタノール＞2-プロパノールの順だが，指先に付着させたネコカリシウイルスを用いた場合では70%エタノール＞70%1-プロパノール＞70%2-プロパノールの順と報告されている[19]．70%エタノールと70%1-プロパノールの効果を指先に付着させたネコカリシウイルスを用いて比較した別の報告でも同様の結果が得られている[21]．

以上のようにアルコールの不活化効果に関しては報告によりかなり違いが認められている他，種々のアルコール製剤に関しても有効性が認められるものとあまり認められないものが報告されている[17,21]．一方Di Martinoら[22]は，ネコカリシウイルスの種々の臨床分離株を用いて，70%エタノール，70%2-プロプロパノール，70%エタノールと30%2-プロパノールの両方およびクロラミン（2,500μg/ml）に対する抵抗性を調べ，薬剤の種類，作用時間に加え，ウイルス株によっても感受性に違いがあることを示している．

エタノールにアルカリ性のトリエタノールアミン，ジエタノールアミン，モノエタノールアミンを加えるとネコカリシウイルスに対する不活化効果の増強が観察されている[17]．

3．4．3　その他の消毒剤等

炭酸水素ナトリウム（重曹）では，10%（pH8.3）濃度・10分の作用によりネコカリシウイルスは検出限界（4$\log_{10}$）以下となっている[23]．また1%重層に1.3%グルタールアルデヒドまたは活性化ジアルデヒドを併用することにより，4$\log_{10}$程度の不活化効果が観察されている[23]．

第四級アンモニウム塩はネコカリシウイルスに対し不活化効果はみられなかった[7]．第四級アンモニウム製剤のFormulation R-82は256倍希釈液で，ネコカリシウイルスに対し10分間の作用で6$\log_{10}$程度減少し，1,000ppmの次亜塩素酸ナトリウムに匹敵する不活化効果があった[24]．

過酢酸では，0.05～0.1%濃度・30秒の作用により，ネコカリシウイルスは4$\log_{10}$以上の減少がみられている[17]．

二酸化塩素はネコカリシウイルスに対して不活化効果がみられ，15℃・pH8がその作用効果が高く，4$\log_{10}$の減少に必要な濃度は0.18mg/L×分以下（15秒の作用で4.15$\log_{10}$以上の減少）であり，ネコカリシウイルスはアデノウイルス40型より二酸化塩素に対し耐性であった[25]．

ヨード剤はネコカリシウイルスに対し不活化作用がみられ，0.8%濃度・1分間の作用で検出限界（5$\log_{10}$）以下[7]に，10%ポピヨンヨードで30秒以内に3$\log_{10}$以上減少した[16]．

グルタールアルデヒドはネコカリシウイルスに対し不活化作用を持ち，0.5%濃度・1分間の作用で検出限界（5$\log_{10}$）以下となり[7]，3%グルタラールで30秒以内に3$\log_{10}$以上の減少を示した[16]．

オキシドール（通常3%の過酸化水素を含む）はネコカリシウイルスに対し効果がなかったとする報告[16]があ

る一方，1.5%過酸化水素水の20～40分の作用で4～5 $\log_{10}$程度感染価が減少したとする報告[26]もみられる．

炭酸ナトリウム（0.5%濃度，60秒作用）および過炭酸ナトリウム（1%濃度，40秒作用）で4 $\log_{10}$以上のネコカリシウイルスの感染価の減少が認められているが，それぞれ他のネコカリシウイルス株と比較して耐性を示す株も認められている[26]．

ネコカリシウイルスに対し2～3 $\log_{10}$程度の感染価の減少が報告されている消毒剤等としては，強酸性電解水，クレゾール石鹸液，塩化ベンザルコニウム，中性洗剤などがある[16,17,27]．アルカリ性洗剤（pH11.7以上）や洗浄機洗剤（pH11.43）など，アルカリ性の洗剤にもネコカリシウイルスに対し不活化効果が観察されている[17]．

Poschettoら[28]は，有機物存在下での有機酸，アルデヒド，ハロゲン化合物，過酸化物による不活化について調べた．有機酸（55～60%ギ酸，7%グリオキシル酸含有），アルデヒド（22～25%グルタールアルデヒド，12%オリゴマー含有），ハロゲン化合物（12%次亜塩素酸Na），過酸化物（14～16%過酢酸，22～24%過酸化水素，＜15%酢酸）によるネコカリシウイルスの不活化は，アルデヒドを除き，有機物が含まれると不活化効果は減少した．

Beekesら[29]は，SDS，水酸化ナトリウム，1-プロパノール（n-プロパノール）を含む配合物の不活化効果をプリオン，ポリオウイルス，A型肝炎ウイルス，カリシウイルス（マウスノロウイルスを含む），細菌（*Enterococcus. faecium* および *Mycobacterium. avium*），真菌（*Aspergillus niger*）を用いて調べた．ウイルスに対する効果をみると，20分の作用で単体のエタノールまたはプロパノールは上記のウイルスに対して有意な不活化効果がみられなかったが，20%n-プロパノールあるいは50%エタノールをSDSおよび水酸化ナトリウムの混合物として使用したところ，カリシウイルス，A型肝炎ウイルス（追加の有機負荷物として10%FCSを添加），ポリオウイルス（追加の有機負荷物として10%FCSを添加，または添加なし）に対して4 $\log_{10}$以上の不活化効果が観察された．これらの結果およびプリオンや細菌に対する不活化試験の結果，0.2%SDS，0.3%水酸化ナトリウム，20%n-プロパノールの配合物が優れていると結論している．

3.5 静水圧処理，高圧ホモジナイゼーション

静水圧処理（Hydrostatic Pressure Treatment）は，液体中で200～600MPa程度の圧力を加えることにより殺菌する方法であり，種々の細菌やウイルスに対してその有用性が報告されている．本法の大きな特徴は，蛋白変性が起こりにくいことであり，食品中の微生物の殺菌や輸血用血液中のウイルスの不活化などへの応用が期待されている[30]．もう一つの特徴として，静水圧処理に対する抵抗性は分類学的な近縁性と必ずしも一致しないことが挙げられる[30]．このことは一般に分類学的に近縁なウイルス同士は加熱や消毒剤等に対し類似した抵抗性を示す場合が多いことと対照的であり，静水圧処理に関しては代替ウイルスでの結果は必ずしもヒトのノロウイルスに当てはまらない可能性があることを念頭におく必要がある．

ネコカリシウイルスを用いた実験では，200MPa・4分（0℃以下，50℃）または250Mpa・2分（0℃以下，50℃）の条件で4 $\log_{10}$以上[31]，275MPa・5分間（約21℃）で7 $\log_{10}$以上[32]の感染価の低下が認められている．また，マウスノロウイルスによる実験では，350Mpa・5分（5℃）で5.56$\log_{10}$の感染価の低下が認められ，またカキ中のマウスノロウイルスにおいても400MPa・5分・5℃の条件で4.05$\log_{10}$の減少が認められている[33]．A型肝炎ウイルスでは，450Mpa・5分（約21℃）で7 $\log_{10}$以上の感染価の低下が認められ[32]，カキ中のA型肝炎ウイルスでは，400MPa・1分（20℃以下）で3 $\log_{10}$以上の感染価の低下が認められている[34]．培地の替わりに海水中でA型肝炎ウイルスの静水圧処理を行うと不活化されにくくなることから，海水中の塩分がウイルスの保護作用を示すことが推察されている[32]．以上のネコカリシウイルス，マウスノロウイルス，A型肝炎ウイルスの静水圧処理に対する抵抗性は，ポリオウイルスやコクサッキーA9型ウイルスなどと比較して，弱い傾向にある[32]．

Buckowら[35]は，ネコカリシウイルスをモデルとして静水圧処理による不活化を検討した．75℃・2分の加熱および450MPa・15分の静水圧処理の結果に基づきパラメータを設定し，500MPaまでの種々の圧力および5～75℃の温度での不活化条件を明らかにし，食品の静水圧処理による不活化の有用性を報告している．

Shimazakiら[36]は異なる4種類のA型肝炎ウイルスを用いて加熱および静水圧処理による不活化効果を調べた．細胞馴化したKRM238（サブゲノタイプIIIB），KRM003（IIIB），KRM031（IA），TKM005（IB）のHAV株を使用し，60℃で最長10時間の加熱処理した結果，3～5 $\log_{10}$感染価が減少した．KRM238およびTKM005は他の2株よりも不活化されにくかった．420MPa（25～30℃で1分間加圧し，直ちに除圧するサイクルの3回繰り返し）の高静水圧処理では3～5 $\log_{10}$減少し，KRM031が他の株と比較して不活化されやすかった．

Groveら[37]は，塩分を含む緩衝液中のA型肝炎ウイルスの高静水圧処理による不活化のデータを基に，モデル

化を試みた．不活化のデータにはバラツキがみられたが，対数線形モデルを用いることにより，特定の処理条件で補間が可能で，モデル式を作成できた．そこで，塩分濃度を15g/Lまたは30g/Lに調整したマガキ乳剤にA型肝炎ウイルスを接種して，そのモデルを評価した．375MPa以上の高静水圧処理の場合，マガキ乳剤中では緩衝液中と比較して，A型肝炎ウイルスは不活化されやすく，そのため，375MPa以上の高静水圧処理においては，本モデルは安全性が担保できるフェイルセーフ（実際の不活化の程度より少ない不活化であると予測する）の結果を予測した．このことから，本モデル式は，高静水圧処理によるカキの安全性を把握するための有益なモデルになる可能性があると考察している．塩分に関しては，30g/Lの濃度と比較して，15g/Lの濃度においてA型肝炎ウイルスの不活化効果は高い傾向にあり，特に緩衝液中で顕著であった．

Louら[38]は培地および新鮮農産物に接種したマウスノロウイルスの高静水圧処理による不活化を検討した．400MPa，2分間，4℃の高圧処理でマウスノロウイルスは5 $\log_{10}$以上減少した．ウイルスの生存性は圧力，pHおよび食品の成分に影響し，20℃より4℃の場合が不活化されやすく，さらに酸性（pH 4）より中性（pH 7）の環境で不活化されやすかった．食品にウイルスを添加した場合の不活化効果は培地の場合より低く，不活化の程度は食品の種類（pH）により異なったことから，食品には高静水圧処理による不活化に対して保護作用があると述べている．高静水圧処理による不活化の原因は主にウイルスRNAの分解（degradation）ではなくカプシド蛋白質の破壊（disruption）によった．しかし，高静水圧処理はカプシド蛋白質の分解（degradation）は起こさず，抗原性は保持したままであった．以上から農産物中のノロウイルスの不活化に高静水圧処理が有用であると報告している．

高圧ホモジナイゼーションとは，近年開発した殺菌処理の一手法で，高静水圧処理とは異なるものであり，元々バルブ式ホモジナイゼーションに由来する．バルブ式ホモジナイゼーションは非熱的処理法の1つで，液体食品を強制的に狭い管（オリフィス）に通す方法である．20MPa以下の低圧ホモジナイゼーションは，1900年にAuguste Gaulinによって発明されて以来，牛乳の脂肪分離（クリーミング）を防止する目的で，乳業界で広く用いられてきた．1900年代初期には約150MPaに達するホモジナイザーが開発され，さらに現在の技術では400MPaのホモジナイズ圧が可能となっている（高圧ホモジナイゼーション）．高圧ホモジナイゼーションにかけられた液体食品には，高静水圧，剪断応力，乱流，キャビテーション，衝突，温度といった複数の物理現象が加わる．高静圧処理が比較的低圧（＜400MPa）での連続処理法で分単位の長い作用時間を要するバッチ処理であるのに対して，高圧ホモジナイゼーションは曝露時間が秒単位と短い連続処理である．

高静圧処理によるウイルス等の不活化に関するデータは多く認められるが，高圧ホモジナイゼーションによる不活化の報告はこれまでみられなかった．D'Souzaら[39]はヒト腸管系ウイルスの代替ウイルスとしてマウスノロウイルスおよびMS2大腸菌ファージを用いて高圧ホモジナイゼーション処理に対する影響を調べた．ホモジナイゼーション圧力を0，100，200，250，および300MPa（ホモジナイザーの最大圧力）として処理を行ったところ，曝露温度はそれぞれ24，46，63，70，75℃となった（時間は2秒未満）．MS2が接種量（約6 log PFU）から約3 log PFU不活化されたのは，ホモジナイゼーション圧300MPa・75℃の条件だけであった．また，マウスノロウイルスは300MPaで約0.8log PFU不活化された．これらの結果を既報の高静圧処理による不活化の結果と比較すると，MS2バクテリオファージは600MPa・2℃・5分間の処理と同等以上であったが，マウスノロウイルスは350PMa・2℃・5分間での高静圧処理よりも不活化の程度は低かった．今後の研究に進展が期待される．

3．6　マイクロバブル

マイクロバブルとは，水中で発生する気泡のうち発生時の直径が10マイクロメートル～数十マイクロメートル以下の微細な気泡をいい，有害物質の分解除去技術や殺菌技術のひとつとして注目されている．ノロウイルスとネコカリシウイルスをそれぞれオゾンナノバブル水（電解質イオンを含む水中でオゾンのマイクロバブルを強制的に圧壊して作製したもので，オゾンと同等以上の酸化力を長期間維持可能な状態にしたもの）と混合した後，マイクロバブル処理あるいはバブリングによるオゾンの追加供給を行うと，感染性ウイルスは検出されず（ネコカリシウイルス），RT-PCR法による遺伝子検出も陰性化した[40]．人工的にネコカリシウイルスをカキに取り込ませた後，オゾンナノバブル水中で6時間処理すると，殻付きカキおよびむき身カキの中のネコカリシウイルスの感染価は約2 $\log_{10}$低下し，カキ自体は生きたままで，白色化（体内の外来性有機物の分解除去によると推定）したと報告されている[40]．

3．7　超音波

Suら[41]は，PBSまたはオレンジジュースに添加したネコカリシウイルスF9株，マウスノロウイルス，バクテリオファージMS2に対する超音波による不活化効果

を検討した．10^6PFU/mL 以下あるいは10^4PFU/mL 以下のウイルスを含む PBS またはオレンジジュースを超音波破砕機プローブを氷冷サンプルに挿入して20kHz で破砕（30秒ごとにオン，オフをくりかえす方法で破砕，最大30分）ウイルス不活化効果を検証した．プラークアッセイによる感染価測定により判定した結果，不活化効果はウイルスの種類や，希釈率，希釈媒体に依存し，10^4PFU/mL 以下の力価では，PBS で希釈した場合に検出限界以下となる時間は，ネコカリシウイルスが５分，バクテリオファージ MS2が10分，マウスノロウイルス1型が30分であった．オレンジジュースで希釈した場合は，ネコカリシウイルスは15分で検出限界以下となったが，マウスノロウイルスは30分の超音波破砕後でわずか1.55$\log_{10}$（97.24%）の不活化にとどまった．10^6 PFU/mL のウイルス液の場合は，PBS で希釈した場合でも30分の超音波破砕で，ネコカリシウイルスが2.67 $\log_{10}$（99.79%），バクテリオファージ MS2が4.62$\log_{10}$（99.998%），マウスノロウイルスが0.07$\log_{10}$（０%）の不活化効果となった．このことから，超音波破砕だけではウイルスの不活化効果は不十分であり，他の加熱や加圧，抗微生物剤との組み合わせが必要である，と報告している．

４　環境，食品中での生存性と不活化

４．１　水環境中における生存性と不活化

下水処理時における塩素消毒を想定した不活化実験で，滅菌処理済下水一次流出水中におけるネコカリシウイルスは30mg/L（ppm）・５分間の作用で，４$\log_{10}$以上感染価が低下したと報告されている[15]．ポリオウイルスは同じ濃度の次亜塩素酸ナトリウムを30分作用しても2.85$\log_{10}$の低下にとどまっていることから，ネコカリシウイルスはポリオウイルスと比較して次亜塩素酸ナトリウムで不活化されやすいとしている．

Bae ら[42]は，地上水(surface water)と地下水(ground water)における生存性をマウスノロウイルス，ネコカリシウイルス，ポリオウイルス，MS2ファージを用いて調べた．感染価と PCR 法による遺伝子定量を行った結果，25℃においてネコカリシウイルスは感染価および遺伝子定量値の減少が顕著であり，他のウイルスと比較して生存性が低くノロウイルスの代替ウイルスとして適さないとともに，マウスノロウイルスは生存性が高く重回帰分析でもノロウイルスと有意な違いはなかったことから，地上水や地下水における生存性試験ではマウスノロウイルスがノロウイルスの代替ウイルスとして適当であることを示した．

飲料水中の次亜塩素酸ナトリウムによる不活化効果をノロウイルスのボランティア投与で調べた報告では，他のウイルス（ポリオウイルス，ロタウイルス）が3.75～6.25mg/L・30分の作用で検出限界（１～４$\log_{10}$）以下に不活化されたのに対し，ノロウイルスでは10mg/L・30分間の作用でも８名中１名が発症（抗体価上昇は０名）したことから，同条件で完全には不活化されず，ノロウイルスはポリオウイルス，ロタウイルスと比較して塩素に耐性であるとしている[2]．一方，Shin ら[43]は，塩素要求フリー（chlorine demand-free）の水およびクロロフォルム処理，フィルター処理で精製したウイルス粒子を用いて，ノロウイルスの塩素に対する抵抗性を厳密に調べた．短い増幅産物（197～260bp）と長い増幅産物（494～1,033bp）が得られる２種類の RT-PCR で不活化効果を判定した結果，１mg/L あるいは５mg/L の通常の水道水の不活化に使用される塩素濃度でノロウイルスは対照としたポリオウイルス，MS2ファージと比較して，MS2よりは抵抗性であるがポリオウイルスよりは感受性であり，これまでの報告ほどノロウイルスは塩素に対し耐性ではなく，適切な塩素処理で飲料水のノロウイルスの汚染は制御できると述べている．

Kahler ら[44]は，異なる３条件の原料水中のヒトアデノウイルス2型，コクサッキーウイルス B5型，エコーウイルス1型，マウスノロウイルスの塩素処理による不活化効果について検討した．塩素濃度0.2または１mg/L，水温５または15℃でそれぞれのウイルスに対する不活化効果を検討したところ，マウスノロウイルスに対して最も高い不活化効果を示し，コクサッキーウイルス B5型に対して最も弱かった．水温15℃（pH７）のほうがより早く効果がみられ，また原料水の性状により効果に違いがみられた．CT 値＝塩素濃度（mg/l）×処理時間（min）として３$\log_{10}$の不活化に要する CT 値を比較した結果，塩素濃度0.2mg/L・水温５℃・pH７の条件でマウスノロウイルスは0.016～0.023，ヒトアデノウイルス2型は0.035～0.99，エコーウイルス1型は0.49～0.84，コクサッキーウイルス B5型は3.2～5.2となり，他と比較してコクサッキーウイルス B5型は原料水の状態によっては最大200倍の処理時間を要した．このことは，USEPA の原料水処理に関するガイドライン（Guidance manual for compliance with the filteration and disinfection requirements for public water systems using surface water sources）に示されるものより４倍高い CT 値であった．

Cromeans ら[45]は，飲料水中のヒトアデノウイルス（2型，40型，41型），エンテロウイルス（コクサッキーウイルス B3型，B5型，エコーウイルス1型，11型），マウスノロウイルスに対する，塩素，モノクロラミンによる不活化効果を処理前後の感染価を測定することで検討した．塩素処理に対して（濃度0.2mg/L，水温５℃の条

件），3 $\log_{10}$の不活化時のCT値（mg・min/L）はマウスノロウイルスが0.02未満で最も塩素感受性であり，次いでアデノウイルス（0.01～0.12），エコーウイルス（0.97～1.3），コクサッキーウイルスB3型（1.1～1.4），コクサッキーウイルスB5型（5.5～7.6）の順で，コクサッキーウイルスB5型が最も耐性であった．モノクロラミン（1 mg/L，5℃）に対しては，エコーウイルス1型が最も高感受性でCT値15～18，マウスノロウイルスも感受性が高い（70～78）のに対して，アデノウイルス2型やエコーウイルス11型はCT値1,000以上で感受性が低かった．また，モノクロラミン処理については，塩素処理よりもウイルス間の感受性に大きな差があり，飲料水のリスク管理や処理システムの構築について有用な知見を報告している．

上記2つの報告ではいずれも飲料水における塩素処理に対して供試ウイルスの中でコクサッキーウイルスB5型が最も抵抗性が強いことを示している．このことから飲料水中の塩素の不活化に対してはコクサッキーウイルスB5型を指標として用いることで効率的にウイルス学的な安全性を試験できる可能性がある．

Kitajimaら[46]は飲料水中のヒトノロウイルス，マウスノロウイルス，ポリオウイルス1型の塩素による不活化について検討した．浄水施設で採取した塩素フリーの飲料水に3種類のウイルスを接種し，0.1または0.5mg/Lの濃度の塩素を添加した結果，プラークアッセイによる感染性ウイルス測定では，マウスノロウイルスは塩素濃度0.1mg/L・120分または0.5mg/L・0.5分の処理で4 $\log_{10}$の不活化効果を示し，ポリオウイルス1型では0.1 mg/L・120分で3.84$\log_{10}$，0.5mg/L・2分で4.65$\log_{10}$の不活化効果を示した．一方，リアルタイムRT-PCRで遺伝子検出を行った結果ではマウスノロウイルスは塩素濃度0.1mg/L・120分で0.04$\log_{10}$，0.5mg/L・2分で1.15$\log_{10}$となり，ヒトノロウイルス（0.1$\log_{10}$，0.8 $\log_{10}$）と大きな差はみられなかった．また，感染性ウイルスの減少はウイルスRNAの減少よりも大きかったことから，リアルタイムRT-PCRで検出されるウイルスは必ずしも感染性ウイルスを検出しているとは言えず，飲料水における適切な塩素処理はノロウイルスのリスク低減に効果があると報告している．

Limら[47]はマウスノロウイルスと，大腸菌ファージMS2に対する塩素および二酸化塩素による不活化効果について感染価測定（プラークアッセイ）とショートおよびロングテンプレートの2種類のリアルタイムRT-PCRを用いて比較検討した．プラークアッセイによる感染価測定では，塩素処理による3 $\log_{10}$の不活化時のCT値（mg·min/L）はマウスノロウイルスで0.245（5℃，塩素濃度0.193mg/L），0.179（20℃，0.184mg/L），大腸菌ファージMS2では0.360（5℃，0.174mg/L），0.142（20℃，0.172mg/L）であった．二酸化塩素処理による3 $\log_{10}$不活化時のCT値はマウスノロウイルス0.147（5℃，0.288mg/L），0.055（20℃，0.255mg/L），大腸菌ファージMS2では0.207（5℃，0.174mg/L），0.071（20℃，0.178mg/l）となった．USEPA Guidance manual for virus disinfectionでは5℃の条件で塩素濃度8 mg/L，二酸化塩素33.4mg/LでCT値が6（塩素），17.1（二酸化塩素）であり，今回の実験ではガイドラインよりも十分低容量でウイルスの不活化が確認できたことから，EPAのガイドラインはノロウイルス不活化に十分有効な処理濃度を示していると考えられる．一方でリアルタイムRT-PCRによる測定では，マウスノロウイルス，大腸菌ファージMS2ともに，塩素，二酸化塩素処理によって遺伝子検出量の低下がほとんどみられなかった．また，マウスノロウイルスは大腸菌ファージMS2よりも塩素や二酸化塩素処理に高感受性であったので，モニタリング指標としてMS2を用いることは可能である，と報告している．

Limら[48]はマウスノロウイルスのオゾンによる不活化についてプラークアッセイによる感染性ウイルス検出と，リアルタイムRT-PCRによる遺伝子検出により検討した．マウスノロウイルスの不活化には，温度よりも，pHが大きく影響し，pH5.6よりもpH 7の条件でより不活化効果が高いことが示された（オゾン濃度は1 mg/L）．不活化時におけるCT値（mg・min/L）は0.3（2 $\log_{10}$），1.2（3 $\log_{10}$）でUSEPA guidanceは0.6（2 $\log_{10}$），0.9（3 $\log_{10}$）であり，2 $\log_{10}$不活化において，USEPAガイドラインは十分有効であるが，3 $\log_{10}$不活化については，今回の実験結果より，USEPAよりも高いCT値となるように見直す必要が示唆された．過去の報告において，3 $\log_{10}$不活化のCT値はアデノウイルス（0.04～0.10mg/L・min），ポリオウイルス（0.37mg/L，10s），A型肝炎ウイルス（5 $\log_{10}$，1 mg/L，60s）であり，今回のマウスノロウイルス（1.18mg/L・min）と比較すると低い傾向にあることから，ノロウイルスは他の腸管系ウイルスよりも高濃度のオゾン処理が必要だと考えられ，加えて処理する水の状態（酸化物などの不純物の含有量等）も考慮すべきであると報告している．

Parkら[49]は飲料水中のマウスノロウイルス，ネコカリシウイルス，エコーウイルス12型と大腸菌ファージMS2に対する紫外線（254nm）による不活化効果を検討した．ペトリディッシュにウイルス液を入れ，紫外線照射後に感染性ウイルスをプラークアッセイで測定することにより不活化効果を検討した．培養上清中のウイルスに対しては，4 $\log_{10}$不活化時にマウスノロウイルス29

mJcm^{-2}，エコーウイルス12型30mJcm^{-2}，ネコカリシウイルス25mJcm^{-2}，大腸菌ファージMS2が70mJcm^{-2}の紫外線照射が必要であった．また，細胞内のエコーウイルス12型は上清中に比べて，およそ2.8倍紫外線に対して抵抗性を示した．ヒトノロウイルスの代替えとしてはネコカリシウイルスよりもマウスノロウイルスやエコーウイルス12型がより適切と考えられ，細胞の有無や指標とする代替ウイルスの性状を踏まえた上で飲料水中のヒトノロウイルスに対する紫外線照射による不活化について，効果的な方法を考慮すべきであると述べている．

Loveら[50]はヒトアデノウイルス2型，ポリオウイルス3型，バクテリオファージ（MS2，Q-Beta SP，Fi，M 13，PRD1，Phi-X174）とカリフォルニアアバロン湾で採取した大腸菌ファージを用いて，太陽光シミュレータによる不活化効果を検討した．ウイルスはPBSまたは海水で希釈し，実験室内で最大12時間，太陽光シミュレータで照射し，感染性ウイルス量を計測した結果，もっとも抵抗性を示したのはアデノウイルス2型とMS2であり，太陽光による不活化が病原体除去の主要な機序となる淡水での汚染指標としてMS2が有用であることを示した．

De Gussemeら[51]は，*Lactobacillus fermientum*の菌体表面の銀粒子が抗ウイルス効果を示すという点に注目し，ポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜に固定化した銀による飲料水中のウイルス不活化について検討した．バクテリオファージUZ1に対する不活化効果は，2,500 mg/m^{2}の銀ナノ粒子をコートしたPVDF膜を使用し，3.1L/m^{2}hの流速でウイルス液を処理した場合に3.4log$_{10}$の不活化効果を示した．また，フィルター濾過により，溶出銀の濃度は271μg/Lから飲料水の基準100 μg/Lまで低減できた．このシステムを用いて毎時75L/m^{2}の流速でPVDF膜処理を行えば，3 log$_{10}$のウイルス不活化効果が小スケールで期待できるとしている．

Shirasakiら[52]は，凝集セラミックマイクロフィルター処理によるノロウイルスの除去効果を，リコンビナントノロウイルス様粒子とバクテリオファージQ-beta，MS2を用いて検討した．凝集剤としてPAClを1.08mg-Al/Lで使用した場合に，4 log$_{10}$以上のノロウイルス様粒子の除去効果が確認でき，USEPAの求める4 log$_{10}$の除去・不活化を満たした．Q-betaとMS2に関しては2 log$_{10}$または1 log$_{10}$程度ノロウイルス様粒子よりも低いが，除去効果を示したことから，感染性ノロウイルスについてはさらなる検討の必要があるが，凝集セラミックマイクロフィルターを用いたウイルス除去が飲料水の浄化に有用であり，MS2をノロウイルスの代替指標に使用できることが示唆されたと報告している．

Huら[53]は，Ag-AgI/Al_2O_3の光触媒作用を利用した飲料水中の腸管病原微生物の不活化について検討した．ビーカー内で，菌希釈液に粉末Ag-AgI/Al_2O_3（0.2g/L）を入れて，420nm＜の可視光を照射し，コロニー形成能を計測することで不活化効果を検討したところ，*S.dysenteriae*（pH7.25，10分），*E.coli*（pH7.25，60分）ともに8 log$_{10}$の不活化効果が示された．また，Ag-AgI/Al_2O_3の不活化効果は，水中に存在するHCO_3-SO_4^{2-}により増強されたことから，病原微生物と銀ナノ粒子間，無機陰イオンと銀ナノ粒子間の電子移動が，フリーラジカルを形成し，細菌を不活化する，というメカニズムについて報告している．

二酸化チタン（TiO_2）は，紫外線によって-OH，O_2-，HO_2-，H_2O_2等のフリーラジカルを放出し，その強力な酸化力により殺菌作用を示すとされている．Leeら[54]は，25mJ/cm^{2}の紫外線照射によりマウスノロウイルスは二酸化チタン存在下で3.6log$_{10}$，非存在下で3.3log$_{10}$の減少を示し，紫外線照射および二酸化チタンの併用の有用性を報告した．

Katzら[55]は下水汚泥のアルカリ処理による不活化において雄菌特異的バクテリオファージ2（MS2）が，A型肝炎ウイルス（HM-175/18f株）あるいはレオウイルス（T1Lang株）の指標になるかを調べた．4℃におけるレオウイルス，28℃におけるレオウイルスおよびA型肝炎ウイルスの不活化率は，すべての計測時点においてMS2の不活化率とほぼ同じであった．4℃の場合0.1時間および2時間の処理ではMS2はA型肝炎ウイルスよりも速く不活化されたが，12時間および24時間の処理ではほぼ同じように不活化された．この結果からMS2のようなファージが，腸内ウイルスの28℃におけるアルカリ安定化処理時の残存性をモニタリングする指標となりうると考察している．

Charlesら[56]は，地下水におけるヒトの腸管系ウイルス（アデノウイルス，エンテロウイルス，ノロウイルス）の汚染指標としての大腸菌ファージの有用性を評価するため，感染価およびリアルタイムPCR法によるRNA定量値を比較した．12℃の地下水において，感染価に基づくウイルスの安定性は，安定性の高い順に大腸菌ファージΦX174＞アデノウイルス2型＞大腸菌ファージPRD1＞ポリオウイルス3型＞コクサッキーウイルスB1型であった．PCRによるRNA検出による順序は，GIIノロウイルス＞アデノウイルス＞GIノロウイルス＞エンテロウイルスであった．これらの結果から，地下水のヒト腸管系ウイルスの汚染指標としては安定性の高い大腸菌ファージやアデノウイルスが適していると考察している．

4．2　食品中における生存性と不活化

近年特に欧米においては新鮮な，あるいは冷凍した野菜・果物によるノロウイルス集団発生が問題となっている．Butot ら[57]はA型肝炎ウイルス，ノロウイルス，ロタウイルスおよびネコカリシウイルスを用いて生鮮野菜・果物における生存性と不活化法を検討した．ブルーベリー，ラズベリー，イチゴ，バジル，パセリを用いた－20℃，2日間の凍結保存により，イチゴにおいてネコカリシウイルスの生存性が減少（2.7$\log_{10}$）した以外，感染価（ノロウイルスはリアルタイムPCRによる遺伝子定量のみ）の減少は概ね1$\log_{10}$以下で，顕著な減少は観察されなかった．90日間の観察では，A型肝炎ウイルスとロタウイルスはほぼ同様な動態を示し，ロタウイルスがブルーベリーとバジルで凍結後2日目以降に1$\log_{10}$減少した以外ほとんど感染価の減少は観察されなかった．ノロウイルスのGIとGIIの比較ではGIIの生存性が低い傾向にあり，GIIはブルーベリーでは90日間で2.3$\log_{10}$の減少が観察された．これらの生鮮農産物からのウイルスの除去効果の検討では，冷水および温水を用いた場合GIノロウイルスが洗浄後不検出であったことを除き，概ね1.5$\log_{10}$以内の減少で，ほとんどのウイルスは除去されなかった．200ppmの塩素水による洗浄では，ネコカリシウイルスで特に除去効果が大きく，GI，GIIのノロウイルス，A型肝炎ウイルスでもブルーベリー，イチゴ，バジルで有意に減少したが，ラズベリー，パセリではノロウイルス，A型肝炎ウイルスで顕著な減少は観察されなかった．塩素水による洗浄においてA型肝炎ウイルスは他のウイルスと比較して，抵抗性が強かった．ラズベリーとパセリの二酸化塩素による洗浄では，5，10，25，50ppmの1分間の作用でほとんど減少効果はなく，10分の作用でも2$\log_{10}$以下の減少にとどまり，ウイルスの除去の困難性を示した．

Mattison ら[58]は，ネコカリシウイルスを用いて，レタス，イチゴ，ハム，およびステンレスにおける生存性を調べた．10%糞便乳剤のろ過液で作製したウイルス液を付着・乾燥後，4℃または室温で7日間観察した結果，4℃での生存性が高い傾向にあり，イチゴを除き，レタス，ハム，およびステンレスでは7日目まで感染性ウイルスが検出された．特に，ハムでの生存性が高く，乾燥しにくいあるいはハムの成分がウイルスの保護作用があるなどの理由からハムはウイルスの感染性保持に適した環境であると考察している．

Hewitt ら[59]は，ニュージーランドの緑イ貝（Green shell mussel，*Perna canaliculus*）を用いて煮沸および蒸し焼きによる不活化を検討した．供試した6ロット50個体の緑イ貝は煮沸により，加熱開始後170秒で中心温度90℃（ニュージーランドでは90℃・90秒の加熱がウイルスの不活化に推奨されている）に達し，210秒で殻が開いたことから，殻が開いた時点ではウイルスの不活化には十分ではないことを示唆した．また，180秒の蒸し焼きでは中心温度は63度で，A型肝炎ウイルスは1.5$\log_{10}$の減少，180秒間の煮沸水への浸漬では中心温度92℃で，A型肝炎ウイルスは検出されなかった．これらの結果から，煮沸水での3分間の浸漬をウイルスの不活化に推奨している．加熱によるカキの内部温度の変化を調べた別の報告では，室温に戻したカキの煮沸水中での中心温度は1分間で78℃・1分30秒で88℃[60]に達したと報告されている．また，湯温104℃で中心温度が80℃を超えるために必要な時間は冷蔵カキで2分，冷凍カキで3～4分であったとする報告がある[61]．

Baert ら[62]は，集団発生の原因となっているラズベリーについて，加熱による殺菌効果をマウスノロウイルス，大腸菌，および*B.fragilis* HSP40に感染するファージB40-8を用いて調べた．ラズベリーピューレに各微生物を汚染させた場合，65℃・30秒の加熱でそれぞれ1.86，2.77，3.89$\log_{10}$，75℃・15秒の加熱で2.81，3.61，3.44$\log_{10}$の感染価の減少が認められた．さらにマウスノロウイルス，B40-8ファージについて加熱後，4℃・24時間冷蔵保存した結果，感染価の低下は認められなかった．

Baert ら[63]は，玉ねぎ，ほうれん草における洗浄による除去および生存性等についてマウスノロウイルスを用いて調べた．表面汚染させた輪切り玉ねぎの飲料水（portable water）による1回の洗浄（100mlの水による25秒の攪拌）で0.39$\log_{10}$の減少，ほうれん草では1回の洗浄（10gのほうれん草を350mlの水で2分間攪拌）で1.01$\log_{10}$，3回の洗浄で1.26$\log_{10}$の減少であった．一方，4.98±0.21$\log_{10}$PFU/mlを含む水から輪切り玉ねぎには3.21±0.58$\log_{10}$PFU，ほうれん草（10g）には3.74±0.28$\log_{10}$PFUのマウスノロウイルスが移行した．水およびほうれん草洗浄水における生存性を調べた結果，飲料水では7日間でほとんど感染価は減少せず，ほうれん草洗浄水では6日目までほとんど感染価の減少はなかったが，6～7日目にかけて0.67$\log_{10}$の減少があった．

また，過酢酸によるマウスノロウイルスの不活化効果を飲料水（pH8.18）あるいは脱ミネラル水（demineralized water，pH5.62）で希釈した液で調べたところ，20ppmの過酢酸の5分の作用で脱ミネラル水（pH4.13）では2.88±0.25$\log_{10}$PFU，飲料水（pH7.70）では2.41±0.18$\log_{10}$PFU不活化され，最大の不活化は150ppmの過酢酸を含む脱ミネラル水（pH3.58）を用いた場合で，4.29±0.15$\log_{10}$の減少であった．ほうれん草の湯煎（ほうれん草50gを80℃または90℃の飲料水に1分間浸漬後，速やかに1分間4℃で冷却）では不検出となった．この時点のほうれん草のペルオキシダーゼ活性を

みると80℃では35.6%，90℃では78.8%が失活しており，この活性を指標に利用することができると報告している．また，きざんだ（shredded）玉ねぎおよびぶち切り（chopped）ほうれん草に汚染させたマウスノロウイルスの−21℃における生存性は6カ月間でほとんど変動はなかった．過酢酸は殺菌消毒薬として使用され，主に医療器具の滅菌，殺菌，消毒に0.2〜0.3%の濃度で用いられている．ほとんど全ての細菌，真菌，芽胞，ウイルスに対しグルタルアルデヒドと同等かそれ以上の効果を示すが，グルタルアルデヒドと異なり，人体に対する影響が少ない．分解生成物は酢酸，過酸化水素で，過酸化水素は最終的に水と酸素に分解されるため，実質的にほぼ無害である．また，過酢酸は炭疽菌に代表される芽胞にも有効であり，グルタルアルデヒド，ホルムアルデヒド，次亜塩素酸ナトリウム，過酸化水素とともに世界保健機関（WHO）が炭疽菌の消毒薬として推奨するもののひとつとなっている．

Fino ら[64]は，いちご，青ネギ，レタスに付着するA型肝炎ウイルス，アイチウイルス，ネコカリシウイルスの紫外線による不活化を検討した．240mWs/cm^{2}の照射で，レタスでは4.5〜4.6log$_{10}$，青ネギでは2.5〜5.6 log$_{10}$，イチゴでは1.9〜2.6log$_{10}$の減少で，レタスの表面が最も不活化されやすく，ストロベリーの表面が最も不活化されにくかった．40，120，あるいは240mWs/cm^{2}の照射量で，不活化効果に大きな違いはなかった．

Butot ら[65]は，ベリーおよびハーブの表面に存在する可能性がある腸管系ウイルスの不活性化に関するフリーズドライ，フリーズドライ＋加熱，スチームブランチングの有効性を判定するためのモデル実験を行った．A型肝炎ウイルスおよびネコカリシウイルスの不活性化は，ウイルス培養および定量的RT-PCRで評価し，ノロウイルスの生残性は定量的RT-PCRのみで評価した．ブラックベリー，ブルーベリー，ラズベリー，イチゴ，バジル，パセリを用いて最適化された条件でフリーズドライ処理を行った結果，供試した野菜においてA型肝炎ウイルスRNAの定量値はほとんど減少しなかった（＜1.3log$_{10}$units）が，HAVの感染性は1.2〜2.4log$_{10}$程度減少した．ノロウイルスではバジルの場合を除いて，全体的にGIよりもGIIのノロウイルスに対して有意に（P＜0.05）有効であった．GIIノロウイルスの場合，最も不活性化の程度が大きかったのはフリーズドライのハーブ（バジル，パセリ）とブルーベリーであり，平均で2.7log$_{10}$unit減少した．リアルタイムRT-PCR検出結果に基づくと，ノロウイルスと比較してA型肝炎ウイルスは定量値の減少が少ない傾向にあった．

ブルーベリー，ラズベリー，ブラックベリーおよびイチゴを用いてフリーズドライ処理の後，80，100，120℃で20分間，オーブンによる仕上げの乾燥の影響を調べた．A型肝炎ウイルスの感染性は，80℃の加熱では2 log$_{10}$未満の減少，100℃ではブルーベリーで検出された他は，検出限界以下となり，120℃では全て検出限界となった．RNA量を指標にすると，80℃ではA型肝炎ウイルス，ノロウイルスとも1 log$_{10}$未満の減少，100℃ではA型肝炎ウイルスとGIIノロウイルスは検出されたが，GIノロウイルスは検出されなかった．120℃ではGIノロウイルスに加えイチゴを除きA型肝炎ウイルスも検出限界以下となったが，GIIノロウイルスは依然検出された．

バジル，チャイブ，ミントおよびパセリを用いて95℃あるいは75℃で2.5分間のスチームブランチングによる効果を調べた結果，95℃ではA型肝炎ウイルス，ノロウイルスとも対照と比べて有意に（P＜0.05）減少し，パセリでのA型肝炎ウイルス，チャイブでのネコカリシウイルスを除き，A型肝炎ウイルスおよびネコカリシウイルスの感染価は3 log$_{10}$以上減少した．ノロウイルスのRNA定量値はハーブの種類により異なり，最も大きく減少したのはミントであり，ウイルス力価は3 log$_{10}$ unit以上減少した．75℃の条件ではA型肝炎ウイルスの不活性化の程度はかなり小さくなり，チャイブの場合を除いて平均で2 log$_{10}$の減少あった．GIノロウイルスのRNAの減少幅は，ミントを除いて95℃の場合とほぼ同じであった．

Mormann ら[66]は，各種の食品の表面あるいは内部にノロウイルスを接種し通常の調理のための熱処理，食品の貯蔵・保存のための冷蔵，冷凍，酸性化，および中程度の熱処理によるにノロウイルスの不活化効果をRNase処理後の定量PCR法で調べた．食品を調理するために消費者によって普通に行われる熱処理（ベーキング，クッキング，ロースティング）では，ウイルスRNA定量値の有意な減少が起こったが，一般に，貯蔵および保存のために行われる処理（例：冷蔵，冷凍，酸性化（≧pH4.5）および中程度の熱処理（パスツリゼーション））ではウイルスRNA定量値の減少はほとんど観察されなかった．

Baert ら[67]はみじん切りにしたIceberg lettuce（日本の通常のレタス）に接種したマウスノロウイルスおよび*B.fragilis*感染ファージB40-8の次亜塩素酸ナトリウムおよび過酢酸の不活化効果を調べた．マウスノロウイルスに対して，水道水による洗浄と比較してさらに1 log$_{10}$の減少をもたらすためには200ppmの次亜塩素酸ナトリウムあるいは250ppmの過酢酸が必要であった．B40-8に対してはどの処理によっても1 log$_{10}$の減少はみられなかった．B40-8ファージはマウスノロウイルスと比較して耐性が強いため，次亜塩素酸ナトリウムまたは過酢酸に

よるみじん切りレタスの汚染除去の指標として有用としている．

Casteel ら[68]は，イチゴ，チェリートマトおよび結球レタスに接種したA型肝炎ウイルスおよび指標ウイルスである大腸菌ファージMS2の塩素による不活化効果を調べた．これらの野菜を約10～20ppmの塩素で作用すると，A型肝炎ウイルスおよび大腸菌ファージMS2は90～99%程度が不活化され，99%以上の場合もみられた．イチゴに両ウイルスを接種し約200ppmの遊離塩素溶液で作用すると，A型肝炎ウイルスは5分，大腸菌ファージMS2は3分で2 $\log_{10}$以上の感染価の減少がみられた．MS2とA型肝炎ウイルスの不活性動態は近似していたことから，実験室または実際の現場において殺菌の有効性を測定する際の処理指標および代替ウイルスとして使用できる可能性があることを述べている．

Shieh ら[69]は，低温保存中のホレンソウにおけるA型肝炎ウイルスの生存性を調べた．ホレンソウにA型肝炎ウイルスを接種し，5℃で4週間保存した結果，1 $\log_{10}$以上減少し，接種量の6.75%が残存した．D値は28.6日と計算された．一方，2%血清加PBS中のA型肝炎ウイルスは，同じ保存条件下において，7週間にわたって一定の状態で残存した．ほうれん草からのウイルスの回収には2%血清加PBS（−）が有効であった．

Casteel ら[70]は商業ベースにおけるイチゴ表面に付着したウイルスの不活化を目的として，代替ウイルスとして大腸菌ファージMS2を接種したイチゴを，次亜塩素酸ナトリウムの添加有りまたは無しで稼動させた水洗浄ユニットによる不活化効果を調べた．イチゴに付着したMS2は，洗浄水中の遊離塩素濃度が≦2，20，200ppmの条件でそれぞれ68%，92%，96%不活化された．また，遊離塩素濃度が≦2 ppmの洗浄水中でMS2が検出されたが，20ppmまたは200ppmの遊離塩素濃度を含む水では検出されなかった．

Su ら[71]は，レタスおよびカラシ（pepper）に接種したネコカリシウイルスF9株およびマウスノロウイルスに対するリン酸3ナトリウムの不活化効果を調べた．すなわち，乾燥したレタスおよびハラペニョ（メキシコ唐辛子）に≦7 $\log_{10}$または≦5 long_{10}のネコカリシウイルス，マウスノロウイルスを接種し，2%または5%リン酸3ナトリウムあるいは200mg/L次亜塩素酸ナトリウムを15秒または30秒作用させた後の感染価を比較した．≦5 $\log_{10}$のウイルス量を接種した場合，ネコカリシウイルスはすべて検出限界以下となったが，マウスノロウイルスは2%リン酸3ナトリウムあるいは200mg/L次亜塩素酸ナトリウムでは≦2～3 $\log_{10}$の低下，5%リン酸3ナトリウムでは検出限界以下となった．≦7 $\log_{10}$のウイルス量を接種した場合，ネコカリシウイルスは2%リン酸3ナトリウムが＞5 $\log_{10}$の減少であったのに対し200mg/L次亜塩素酸ナトリウムでは≦1.4 $\log_{10}$の低下にとどまり，マウスノロウイルスは，2%リン酸3ナトリウムでは≦2～3.4 $\log_{10}$の減少，200mg/L次亜塩素酸ナトリウムでは＜1.3 $\log_{10}$の減少，5%リン酸3ナトリウムでは検出限界以下となった．以上の結果および5%リン酸3ナトリウム処理でレタス等に視覚的に変化がないことから，5%リン酸3ナトリウムは次亜塩素酸ナトリウムの代替えになると報告した．

4．3　環境中における不活化

Hudson らは[72]，ホテルの室内，船室，事務室等の様々な場所に乾燥状態で存在するウイルスの不活化方法としてのオゾンガスの有用性をネコカリシウイルスを用いて検討した．不活化は，オゾン発生装置を用いてオゾンガスを発生させ，濃度が20～25ppmに達してから20分間その濃度を維持した後，加湿器を5分間作動させた．その後，オゾン発生装置と加湿器を止め，さらに10分間放置した後，スクラバー（除ガス装置）を15分間作動し，オゾンガスを除去させた．ホテルにおいて，バスルーム，ベッド，机の上に置かれたネコカリシウイルス（プラスチック上で乾燥させたウイルス）は3.7 $\log_{10}$以上の減少を示した．船室のベッド，机，隣接するバスルームにおける実験（オゾン発生15分，加湿4分，放置なし，除ガス15分）では，感染性ウイルスは検出されなかった（5.37×10^3以上の減少）．プラスチック以外に，布（Fabric），綿織物（Cotton），カーペットに塗布したウイルスを用いて，机の上側や下側，壁，窓，床に設置したウイルスの不活化を行った結果，いずれも有効に不活化され，オゾンガスによる室内に乾燥状態で残留するノロウイルスの不活化に有用であることを示した．

Lee ら[54]は，マウスノロウイルスを用いて種々の環境での生存性を調べた．ガーゼやおむつの中で18℃または30℃では1日で3 $\log_{10}$以上減少したが，4℃では30日で2 $\log_{10}$（ガーゼ），40日で2 $\log_{10}$以下（おむつ）の減少に止まり，−20℃では2 $\log_{10}$未満（ガーゼ），1 $\log_{10}$未満（おむつ）の減少であった．糞便中の生存性を40日間観察した結果，4℃が最も安定で1 $\log_{10}$未満の減少，−20℃と18℃では4 $\log_{10}$の減少で，30℃では24時間で5 $\log_{10}$以上の減少が認められた．0.5Mあるいは1Mの塩化ナトリウム存在下で，72時間後にそれぞれ1.5 $\log_{10}$，2.5 $\log_{10}$の減少を認めた．一方，リアルタイムPCRでは，定量値の減少はほとんど観察されなかった．

Park ら[73]は，ステンレスおよびセラミックタイル（孔あり）における生存性をMS2ファージおよびノロウイルスを用いて調べた．MS2ファージの感染価はウイル

ス液接種後3時間の乾燥で約2 $\log_{10}$（ステンレス2.5%，セラミックタイル1.1%）減少後，25℃・2日間でさらに1.5$\log_{10}$減少したが，MS2ファージおよびノロウイルスのRT-PCRのコピー数は接種ウイルス量と比較して24時間後までは変化ぜず，2日後に1 $\log_{10}$減少した．

Parkら[73]は次亜塩素酸（HOCl）を電気化学的に発生させる装置を利用して生成した次亜塩素酸による不活化を，ヒトノロウイルスおよび代替ウイルスとしてMS2ファージ，マウスノロウイルスを用いて検討した．セラミックス製タイル（孔あり）とステンレスに汚染させた3種類のウイルスは20～200ppmの次亜塩素酸溶液の10分間（以下）の作用で，感染価およびウイルスコピー数は少なくても3 $\log_{10}$減少した（ヒトノロウイルスは遺伝子検出のみ実施）．水溶液中では20秒の作用で，感染価および遺伝子検出は，少なくても3 $\log_{10}$減少した．また，閉鎖室内に霧状に噴霧した場合を想定した実験として，1%糞便を含む3種のウイルス混合液を塗布し，乾燥させたセラミックタイルを水平方向，垂直方向に設置し，180～200ppmの遊離塩素を1時間噴霧させた．その結果，感染価では3.5$\log_{10}$以上，遺伝子検出では概ね5 $\log_{10}$以上の低下が観察され，有用性が確認されたと報告している．

Belliotら[74]は，マウスノロウイルスを用いて医療機関で使用される消毒薬に対する抵抗性を調べた．マウスノロウイルスは，アルコール，アルコールハンドラボ，ブリーチ，ポビドンヨードに基づく消毒薬に感受性を示した．

Magulskiら[75]は，医療器具等の表面に存在するノロウイルスの不活化のモデルとしてステンレス表面に接種したマウスノロウイルスを用いて，過酢酸，グルタルアルデヒド，種々のエタノール，炭酸カルシウム（300ppm，pH7.0）の不活化効果を調べた．清浄な条件下で，各種濃度の過酢酸あるいはグルタルアルデヒドを作用させた結果，過酢酸では1,000ppm，1,500ppmで，グルタルアルデヒドでは2,500ppmで4 $\log_{10}$以上の感染価の減少が認められた．エタノール，1-プロパノール，2-プロパノールについて，清浄条件下（不活化試験時の濃度で0.03%の牛血清アルブミンを含む）での不活化効果には差が認められた．最も有効なアルコールは1-プロパノールで，30%の1-プロパノールは5分間の作用で4 $\log_{10}$程度，40%，50%，60%の1-プロパノールは6 $\log_{10}$程度の感染価の減少がみられた．エタノールは，50%で4 $\log_{10}$程度，55%，60%で6 $\log_{10}$程度の減少であった．2-プロパノールは使用した最高濃度である60%で3 $\log_{10}$程度の減少にとどまった．有機物汚染の影響を比較するため，清浄条件と不浄条件（不活化試験時で0.15%の牛血清アルブミンと0.15%の赤血球を含む）の両方で，3種類のアルコールの不活性化効果を比較した結果，40%および60%の2-プロパノール，エタノール，1-プロパノールの不活化効果はそれぞれほぼ同様であった．

Terpstraら[76]は，金属表面で乾燥させたウイルスの生存性と不活化方法を検討した．エンベロープウイルス（ヒト免疫不全ウイルス，ウシウイルス性下痢症ウイルス，仮性狂犬病ウイルス），およびエンベロープを持たないウイルス（イヌパルボウイルス，A型肝炎ウイルス）を，培地中あるいは血漿中で4時間乾燥させた結果，A型肝炎ウイルス，イヌパルボウイルスのエンベロープを持たないウイルスの感染価はほとんど低下しなかった．その後室温で放置すると，7日までは約1 $\log_{10}$の減少に止まったが，28日目では4～5 $\log_{10}$程度感染価が減少した．一般的な消毒剤として使用されている80%エタノール（エンベロープウイルスのみ試験されている），0.1N水酸化ナトリウム，0.1%次亜塩素酸塩の不活化効果を培地および血漿中で調べた結果，A型肝炎ウイルスに注目すると，いずれの条件でも検出限界（5～6 $\log_{10}$）以下になることはなかった．培地中では0.1%次亜塩素酸塩の不活化効果が高く，1分間の作用で5 $\log_{10}$以上の不活化が認められた．血漿中でも0.1%次亜塩素酸塩の不活化効果が高かったが，1分間の作用ではほとんど効果はなく，10分間の作用で5 $\log_{10}$程度の不活化が認められた．

Morinoら[77]は，硬い表面に存在するウイルスの不活化のモデルとして，二酸化塩素ガスの有用性をガラスシャーレ上に接種したネコカリシウイルスF9株を用いて調べた．低濃度の二酸化塩素ガス（平均0.08ppm，0.22μg/L）により，0.5%牛胎児血清存在下（湿った状態）でネコカリシウイルスは45～55%相対湿度，6時間の作用で，2%牛胎児血清（濃度は乾燥させる前のウイルス浮遊液のもの）存在下で乾燥させたネコカリシウイルスは75～85%相対湿度，10時間の作用で，それぞれ＞3 $\log_{10}$減少した（温度はいずれも20℃）．＜0.3ppmの二酸化塩素ガス（平均0.26ppm，0.73μg/L）では5%牛胎児血清存在下で乾燥させたネコカリシウイルスは75～85%相対湿度，20℃，24時間の作用で検出限界（4 $\log_{10}$以上）以下となったが，45～55%の相対湿度では高濃度（平均8 ppm，22.4μg/L）の二酸化塩素ガスでも，20℃，24時間の作用でほとんど感染価の低下は観察されなかった．これらの結果から乾燥条件下におけるネコカリシウイルスの二酸化塩素ガスによる不活化には湿度が重要な役割を担っていると考察している．

Girardら[78]はステンレス表面へのノロウイルスの吸着に対するpHと相対湿度の影響およびそれに吸着したウ

イルスの不活化に対する家庭用消毒剤の影響をヒトノロウイルスおよびマウスノロウイルスを用いて調べた．ヒトノロウイルスの吸着はpHに依存しなかったが，マスノロウイルスはpH 9かつ相対湿度が低い（25%）場合吸着率が低下した．ステンレスに吸着させたヒトノロウイルスの不活化には3%次亜塩素酸ナトリウムが効果的で10分間の作用でRT-PCR法による遺伝子検出で3 $\log_{10}$以上の減少を示したが，第四級アンモニウム化合物やエトキシ化アルコールでは1 $\log_{10}$以下の減少にとどまった．マウスノロウイルスは次亜塩素酸ナトリウムにより感染価および遺伝子検査で4 $\log_{10}$以上の減少が観察され，ヒトノロウイルスより感受性であった．

Sauerbreiら[79]は，2種類の市販のポビドンヨード剤（Betaisodona®，Betaseptic Mundipharma®）の消毒効果をドイツのガイドラインに従って調べた．有機物存在下および非存在下で，Betaisodona®はワクチニアウイルス，ウシウイルス性下痢症ウイルス，ポリオーマウイルスSV40に対して0.5分間の作用で，アデノウイルス5型に対して3～5分の作用で，それぞれ≧4 $\log_{10}$の減少を示し，最も耐性であったポリオウイルス1型に対しては60分以上が必要であった．一方，Betaseptic Mundipharma®はいずれのウイルスに対しても5分以下で≧4 $\log_{10}$の減少を示した．以上のことから，Betaseptic Mundipharma®が皮膚のウイルスの消毒剤として適していると結論している．

Baertら[80]は，豚スラリー（豚の排泄物を噴霧可能な浮遊液にしたもの）における加熱による嫌気的消化によるウイルスの不活化を調べた．ブタノロウイルスの不活化のモデルとしてマウスノロウイルスを用いて調べた結果，37℃の低温加熱，52度の加熱による嫌気的消化を7日，13日行った結果，少なくても4 $\log_{10}$のウイルス感染価の低下がみられた．一般的なウイルスのモデルとして*Bacteroides fragilis*感染ファージB40-8を用いた場合は7日目で2.5$\log_{10}$減少した．ウイルス量の減少は温度とウイルスの環境（豚スラリー，殺菌あるいはオートクレーブ滅菌した豚スラリー，滅菌水道水）に依存した．

Weiら[81]は，種々の家畜の糞（manure）および下水汚泥（biosolid）中のマウスノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスの20℃あるいは4℃における生存性を60日間にわたり調べた．RNA量についてみると，アルカリ条件（pH10.3，pH12.0）の下水汚泥において両ウイルスのRNA量は0日で速やかに検出限界（約3 $\log_{10}$）以下となった．A型肝炎ウイルスRNAは下水汚泥（pH 7.7）や液体の牛糞の中で20℃・60日間で有意に定量値が減少したが，4℃では安定であった．マウスノロウイルスRNAはペレットにしたトリの床敷き，下水汚泥の中では20℃で不安定であったが，液体の牛糞では両温度でさらに不安定であった．一方，感染価でみると4℃あるいは20℃の60日間の観察で，マウスノロウイルスでは種々のトリの床敷きやブタの糞の中で保存環境による有意な違いは観察されなかったが，A型肝炎ウイルスは，硫酸アルミニウムで処理したトリの床敷きと比較してブタの糞や未処理のトリの床敷きの中では高い感染性を維持し，保存環境による生存性に違いがみられた．以上から，農地の土壌の改良のための堆肥や下水汚泥の適応はウイルスのリスクを伴うが，そのリスクはウイルスの種類や堆肥の種類により異なることを示した．

4.4　手指における不活化

Lagesら[82]はネコカリシウイルスを用いて，9種類の手指用消毒剤の30秒あるいは2分間の作用による消毒効果を比較した．99.5%のエタノールは62%エタノール，70%あるいは91%イソプロピルアルコールを含むエタノール性殺菌剤（sanitizer）と比較して効果的であった．10%ポピドンヨード（1%の有効ヨードを含む）を含む消毒剤（antiseptics）は30秒の作用で2.67$\log_{10}$の減少を示し，いずれのエタノールに基づく殺菌剤，非アルコールの殺菌剤および抗菌性（antimicrobial）石鹸と比較して高い不活化効果を示した．トリクロサン含有の抗菌性石鹸は最も低い効果を示し，石鹸を用いない手洗いと同様の結果であった．これらのことから，エタノール含有の手指用消毒剤およびトリクロサン含有抗菌用石鹸ではノロウイルスの予防に不十分であることを示した．

Macingara[83]は，ポリクオータニウムポリマー（第四級アンモニウム塩のカチオン系ポリマー）と有機酸を含む新しいアルコール性の手指消毒剤の有効性を，ヒトロタウイルス，ポリオウイルス，およびヒトノロウイルスの代替ウイルスとしてネコカリシウイルスとマウスノロウイルス等を用いて調べた．試験管内では，それらのウイルスは30秒の作用で3 $\log_{10}$以上の減少が認められたが，fingerpad法（指の腹部：爪の反対側にウイルスを接種し有効性判定を行う方法）では，30秒の作用によりマウスノロウイルスで2.48$\log_{10}$，アデノウイルス，ロタウイルスで3 $\log_{10}$以上，ポリオウイルスで2.98$\log_{10}$，A型肝炎ウイルスで1.32$\log_{10}$の減少であった．

Liuら[84]は，ノロウイルスを用いて，ノロウイルスを汚染させた手指でのエタノール，液体抗菌石鹸，および水洗いによる不活化および除去効果を調べた．不活化の効果は，RNase処理後の定量PCR法[85]で評価した．試験管内での実験で160ppm以上の濃度の次亜塩素酸ナトリウムはRNA定量値の減少が認められたが，エタノールは濃度にかかわらず効果が低く，0.5$\log_{10}$程度の減少にとどまった．ASTM（米国材料試験協会）の標準手指法（fingerpad method），およびその改良法（手こす

りを行う）で，指に付着させたノロウイルスは液体抗菌石鹸処理（減少量は0.67～1.20$\log_{10}$）および水洗いのみ（減少量は0.58～1.38$\log_{10}$）で比較的大きく定量値が減少したのに対し，アルコール性手指用消毒剤は比較的低効果で，0.14～0.34$\log_{10}$の減少にとどまったとして，従来からのアルコール性手指用消毒剤はノロウイルスに対しては比較的低効果であることを確認した．

森ら[86]はネコカリシウイルスを用いて，手洗いによるウイルス除去効果についてウイルス感染価と遺伝子量を指標にアルコール，クルルヘキシジン，第四級アンモニウム塩，成分としてヨード化合物，トリクロサン，フェノール誘導体を含むハンドソープを用いて検討した．その結果，流水によるすすぎのみでもウイルス量が100分の１程度に減少し，さらに手洗い時にハンドソープを使用することによりウイルス量の減少傾向が強まったことを報告している．

４．５　食物成分の殺ウイルス活性

Iwasawa[87]らは，ぶどうの皮や種子に含まれるポリフェノールの一種であるプロアントシアニジンの抗ウイルス活性をネコカリシウイルスおよびコクサッキーウイルス A7型を用いて調べた．10秒間の作用で，２$\log_{10}$以上のウイルス不活性化効果を示すためにはネコカリシウイルスに対して１mg/ml，コクサッキーウイルス A7型に対して10mg/ml 以上のプロアントシアニジンが必要であった．

５．遺伝子検査に基づく感染性ウイルス検出法

ウイルスの生存性や消毒剤の不活化効果の判定はウイルスの感染性を調べることが唯一直接的な評価方法（感染性試験法）であるが，近年，感染性試験法以外の代替え試験法の開発やそれらを用いた消毒剤等の不活化効果判定法に関する報告がみられる．Nuanualsuwan ら[88]は，A 型肝炎ウイルス，ポリオウイルス1型，およびネコカリシウイルスを用いて，紫外線照射，塩素処理，加熱処理を行ったウイルスを蛋白分解酵素，RNase で消化した後，RT-PCR 法で検出することにより，未処理のウイルス粒子（感染性ウイルス）と処理したウイルス粒子（不活化ウイルス）を区別できる可能性を示した．本報告の中で，25%糞便存在下での不活化効果を酵素処理を用いた RT-PCR 法で評価した結果，感染価を指標とした場合と比較し，より高濃度あるいは長時間の作用時間を必要としており，実際にはより低濃度，短時間の作用で効果があると考察している．また，ノロイルスはネコカリシウイルスと比較して，これらの薬剤に対して抵抗性である可能性を示唆している．

一方，Baert ら[89]は Nuanualsuwan らが報告した酵素処理をマウスノロウイルスの加熱処理による不活化の判定に用いているが，感染性の有無とリアルタイム PCR による遺伝子検出には相関性はなかったと報告している．一方，マウスノロウイルス RNA を細胞にトランスフェクトすると感染性粒子が回収されるが，熱処理を行った場合は，回収されなかった．また，マウスノロウイルスの熱による不活化では80℃，150秒が必要であることを報告している．

Topping ら[85]は，加熱によるウイルス粒子の構造的変化により粒子外部に露出したウイルス RNA を RNase 処理で分解した後，逆転写，リアルタイム PCR を行い，RNA のコピー数を調べた．その遺伝子定量値が感染性を指標とした方法と相関性が認められたことから，ウイルスの不活化評価法に応用できる可能性があることを報告した．また，ヒトノロウイルス GII.4はネコカリシウイルス FC-9株と比較して同じ不活化効果を得るのに13.3℃高い温度を必要としたことから，ヒトノロウイルスはネコカリシウイルスより熱に対し抵抗性であることを述べている．

Lamhoujeb ら[90]は，Nuanualsuwan ら[88]の酵素処理とリアルタイム NASBA 法を用いてレタスと七面鳥をモデルとして調理済み食品（ready to eat foods）中のウイルスの生存性を調べた．レタスや七面鳥に添加されたノロウイルスは冷蔵保存で少なくても10日間生存することが示された．また，加熱処理，酵素処理に対してネコカリシウイルスはノロウイルスと比較して抵抗性が弱く，代替ウイルスとして適切ではないことを示している．

一方，別の遺伝子検査を用いた不活化試験のアプローチとして，Rudi ら[91]は，細胞の生死の判定に利用するエチジウムモノアザイドとリアルタイム PCR 法を組合せ，生きた細胞のみを検出する方法を報告した．この方法はエチジウムモノアザイドが死滅した細胞のみで細胞内に侵入し，光照射処理によりエチジウムモノアザイドと DNA が共有結合し，PCR 法による DNA 増幅が阻害されるのに対して生きた細胞ではエチジウムモノアザイドが細胞内に侵入しないため DNA 増幅が阻害されないことを原理としている．Rudi らは *Campylobacter* を用いて実験を行っているが，Soejima ら[92]は大腸菌や *Klebsiella oxitica* を用いて同様のことを報告している．Fittipaldi ら[93]はプロピジウムモノアザイド・リアルタイム PCR 法による感染性を持つバクテリオファージ T4の鑑別法を報告した．85℃の加熱処理および蛋白分解酵素（Protease OB）処理においてプロピジムモノアザイドの前処理で感染性粒子と非感染性粒子の鑑別はできなかったが，110℃の加熱の場合は鑑別可能であった．Kim ら[94]はエチジウムモノアザイド処理を RNA ウイルスの検出に適応した．ポリオウイルスを加熱処理後，プラッ

ク法による感染価とエチジウムモノアザイド処理後のRT-リアルタイムPCRによる定量値を比較した結果，予備的な実験ではあるが両者に相関性がみられ，感染性ウイルスの環境からの検出に適応できる可能性があると報告した．これらの遺伝子検査に基づく感染性ウイルス粒子の鑑別検出法が実際の感染性ウイルス量をどの程度反映するのか，今後の研究の進展が期待される．

6．おわりに

研究の進展により物理化学的処理による不活化条件や各種消毒剤の有効性など，ノロウイルスの不活化に関するデータが蓄積されつつある．しかし，多くの消毒剤や物理化学的処理が報告されてきたにも関わらず，流水によるウイルス粒子の洗浄除去，加熱処理，次亜塩素酸ナトリウムによる消毒など古典的な方法は依然重要な制御方法として位置づけられている．またヒトノロウイルスが培養できないことから，ヒトのノロウイルスを用いての直接的な実験ができないという大きな問題は依然残されたままである．ヒトノロウイルスの制御方法の確立と本ウイルスの培養細胞での増殖の成功が強く望まれている．

参考文献

1）Dolin, R., Blacklow, N. R., DuPont, H., Buscho, R. F., Wyatt, R. G., Kasel, J. A., Hornick, R. and Chanock, R. M.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **140**, 578-583（1972）

2）Keswick, B. H., Satterwhite, TK., Johnson, P. C., DuPont, H. L., Secor, S. L., Bitsura, J. A., Gary, G. W. and Hoff, J. C.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 261-264（1985）

3）Tan, M. and Jiang, X: *Trends Microbiol.*, **13**, 285-293（2005）

4）Wobus, C. E., Karst, S. M., Thackray, L. B., Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J. M., Green, K. Y. and Virgin, H. W.: *PLoS. Biol.*, **2**, 2076-2084（2004）

5）Cheetham, S., Souza, M., Meulia, T., Grimes, S., Han, M. G. and Saif, L. J.: *J. Virol.*, **80**, 10372-10381（2006）

6）Straub, T. M., Höner zu Bentrup, K., Orosz-Coghlan, P., Dohnalkova, A., Mayer, B. K., Bartholomew, R. A., Valdez, C. O., Bruckner-Lea, C. J., Gerba, C. P., Abbaszadegan, M. and Nickerson, C. A.: *Emerg. Infect. Dis.*, **13**, 396-403（2007）

7）Doultree, J. C., Druce, J. D., Birch, C. J., Bowden, D. S. and Marshall, A.: *J. Hosp. Infect.*, **41**, 51-57（1999）

8）Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., De Groot, A., Twisk, F. and Koopmans, M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4538-4543（2004）

9）Cannon, J. L., Papafragkou, E., Park, G. W., Osborne, J., Jaykus, L. A. and Vinjé, J.: *J. Food Prot.*, **69**, 2761-2765（2006）

10）Bidawid, S., Farber, J. M., Sattar, S. A. and Hayward, S.: *J. Food Prot.*, **63**, 522-528（2000）

11）貞升健志，森　功次，猪又明子，小西浩之，小杉有希：食品衛生研究，**57**，41-47（2007）

12）Hewitt, J., Rivera-Aban, M. and Greening, G. E.: *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 65-71（2009）

13）Nuanualsuwan, S., Mariam, T., Himathongkham, S. and Cliver, D. O.: *Photochem. Photobiol.*, **76**, 406-410（2002）

14）De Roda Husman, A. M., Bijkerk, P., Lodder, W., Van Den Berg, H., Pribil, W., Cabaj, A., Gehringer, P., Sommer, R. and Duizer, E.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5089-5093（2004）

15）Tree, J. A., Adams, M. R. and Lees, D. N.: *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 155-162（2005）

16）山崎謙治，大竹　徹：第26回日本食品微生物学会講演要旨集，**108**（2005）

17）丸山　勉，西尾　治，中村明子，古田太郎：ノロウイルス対策現場　その感染症と食中毒，幸書房（2006）

18）Li, J. W., Xin, Z. T., Wang, X. W., Zheng, J. L. and Chao, F. H.: *Appl. Environ Microbiol.*, **68**, 4951-4955（2002）

19）Gehrke, C., Steinmann, J. and Goroncy-Bermes, P.: *J. Hosp. Infect.*, **46**, 49-55（2004）

20）Malik, Y. S., Maherchandani, S. and Goyal, S. M.: *Am. J. Infect. Control*, **34**, 31-35（2006）

21）Kampf, G., Grotheer, D. and Steinmann, J.: *J. Hosp. Infect.*, **60**, 144-149（2005）

22）Di Martino, B., Ceci, C., Di Profio, F. and Marsilio, F.: *Arch. Virol.*, **155**, 2047-2051（2010）

23）Malik, Y. S. and Goyal, S. M.: *Int. J. Food Microbiol.*, **109**, 160-163（2006）

24）Jimenez, L. and Chiang, M.: *Am. J. Infect. Control*, **34**, 269-273（2006）

25）Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J. and Gerba, C. P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 3100-3105（2005）

26）高木弘隆，杉山和良：医学と薬学，**57**, 311-312（2007）

27）森　功次，林　志直，秋場哲哉，野口やよい，吉田靖子，甲斐明美，山田澄夫，酒井沙知，原　元宣：感染症誌，**81**，249-255（2007）

28）Poschetto, L. F., Ike, A., Papp, T., Mohn, U., Böhm, R.

and Marschang, R. E.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 5494-5500 (2007)

29) Beekes, M., Lemmer, K., Thomzig, A., Joncic, M., Tintelnot, K. and Mielke, M.: *J. Gen. Virol.*, **91**, 580-589 (2010)

30) Grove, S. F., Lee, A., Lewis, T., Stewart, C. M., Chen, H. and Hoover, D. G.: *J. Food Prot.*, **69**, 957-968 (2006)

31) Chen, H., Hoover, D. G. and Kingsley, D. H.: *J. Food Prot.*, **68**, 2389-2394 (2005)

32) Kingsley, D. H., Hoover, D. G., Papafragkou, E. and Richards, G. P.: *J. Food Prot.*, **65**, 1605-1609 (2002)

33) Kingsley, D. H., Holliman, D. R., Calci, K. R., Chen, H. and Flick, G. *J.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 581-585 (2007)

34) Calci, K. R., Meade, G. K., Tezloff, R. C. and Kingsley, D. H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 339-343 (2005)

35) Buckow, R., Isbarn, S., Knorr, D., Heinz, V. and Lehmacher, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 1030-1038 (2007)

36) Shimasaki, N., Kiyohara, T., Totsuka, A., Nojima, K., Okada, Y., Yamaguchi, K., Kajioka, J., Wakita, T. and Yoneyama, T.: *Vox Sang.*, **96**, 14-19 (2009)

37) Grove, S. F., Lee, A., Stewart, C. M. and Ross, T.: *J. Food Prot.*, **72**, 1434-1442 (2009)

38) Lou, F., Neetoo, H., Chen, H. and Li, J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 1862-1871 (2011)

39) D'Souza, D. H., Su, X., Roach, A. and Harte, F.: *J. Food Prot.*, **72**, 2418-2422 (2009)

40) 高橋正好：微細気泡の最新技術，株式会社エヌ・ティー・エス，43-49（2006）

41) Su, X., Zivanovic, S. and D'Souza, D. H.: *Foodborne Pathog. Dis.*, **7**, 1055-1061 (2010)

42) Bae, J. and Schwab, K. J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 477-484 (2008)

43) Shin, G. A. and Sobsey, M. D.: *Water Res.*, **42**, 4562-4568 (2008)

44) Kahler, A. M., Cromeans, T. L., Roberts, J. M. and Hill, V. R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 5159-5164 (2010)

45) Cromeans, T. L., Kahler, A. M. and Hill, V. R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 1028-1033 (2010)

46) Kitajima, M., Tohya, Y., Matsubara, K., Haramoto, E., Utagawa, E. and Katayama, H.: *Lett. Appl. Microbiol.*, **51**, 119-121 (2010)

47) Lim, M. Y., Kim, J. M. and Ko, G.: *Water Res.*, **44**, 3243-3251 (2010)

48) Lim, M. Y., Kim, J. M., Lee, J. E. and Ko, G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 1120-1124 (2010)

49) Park, G. W., Linden, K. G. and Sobsey MD.: *Lett. Appl. Microbiol.*, **52**, 162-167 (2011)

50) Love, D. C., Silverman, A. and Nelson, K. L.: *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 6965-6970 (2010)

51) De Gusseme, B., Hennebel, T., Christiaens, E., Saveyn, H., Verbeken, K., Fitts, J. P., Boon, N. and Verstraete, W.: *Water Res.*, **45**, 1856-1864 (2011)

52) Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T., Oshiba, A. and Ohno, K.: *Water Sci. Technol.*, **61**, 2027-2034 (2010)

53) Hu, X., Hu, C., Peng, T., Zhou, X. and Qu, J.: *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 7058-7062 (2010)

54) Lee, J., Zoh, K. and Ko, G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2111-2117 (2008)

55) Katz, B. D. and Margolin, A. B.: *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 2225-2233 (2007)

56) Charles, K. J., Shore, J., Sellwood, J., Laverick, M., Hart, A. and Pedley, S.: *J. Appl. Microbiol.*, **106**, 827-837 (2009)

57) Butot, S., Putallaz, T. and Sánchez, G.: *Int. J. Food Microbiol.*, **126**, 30-35 (2008)

58) Mattison, K., Karthikeyan, K., Abebe, M., Malik, N., Sattar, S. A., Farber, J. M. and Bidawid, S.: *J. Food Prot.*, **70**, 500-503 (2007)

59) Hewitt, J. and Greening, G. E.: *J. Food Prot.*, **69**, 2217-2223 (2006)

60) Slomka, M. J. and Appleton, H.: *Epidemiol. Infect.*, **121**, 401-407 (1998)

61) 小山田正，石村智加子，和田征二，梶谷晴樹：広島市第15回生活衛生関係業績発表会演題集（平成13年度），48-51（2002）

62) Baert, L., Uyttendaele, M., Van Coillie, E. and Debevere, J.: *Food Microbiol.*, **25**, 871-874 (2008)

63) Baert, L., Uyttendaele, M., Vermeersch, M., Van Coillie, E. and Debevere, J.: *J. Food Prot.*, **71**, 1590-1597 (2008)

64) Fino, V. R. and Kniel, K. E.: *J. Food Prot.*, **71**, 908-913 (2008)

65) Butot, S., Putallaz, T., Amoroso, R. and Sánchez, G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 4155-4161 (2009)

66) Mormann, S., Dabisch, M. and Becker, B.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 536-545 (2010)

67) Baert, L., Vandekinderen, I., Devlieghere, F., Van Coillie, E., Debevere, J. and Uyttendaele, M.: *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, **73**, 97-101 (2008)

68) Casteel, M. J., Schmidt, C. E. and Sobsey, M. D.: *Int.*

J. Food Microbiol., **125**, 267-273 (2008)
69) Shieh, Y. C., Stewart, D. S. and Laird, D. T.: *J. Food Prot.*, **72**, 2390-2393 (2009)
70) Casteel, M. J., Schmidt, C. E. and Sobsey, M. D.: *J. Water Health*, **7**, 244-250 (2009)
71) Su, X. and D'Souza, D. H.: *Foodborne Pathog. Dis.*, doi: 10.1089/fpd.2010.0763 (2011) [Epub ahead of print]
72) Hudson, J. B., Sharma, M. and Petric, M.: *J. Hosp. Infect.*, **66**, 40-45 (2007)
73) Park, G. W., Boston, D. M., Kase, J. A., Sampson, M. N. and Sobsey, M. D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4463-4468 (2007)
74) Belliot, G., Lavaux, A., Souihel, D., Agnello, D. and Pothier, P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3315-3318 (2008)
75) Magulski, T., Paulmann, D., Bischoff, B., Becker, B., Steinmann, E., Steinmann, J., Goroncy-Bermes, P. and Steinmann, J.: *BMC Infect. Dis.*, **9**, 107 (2009)
76) Terpstra, F. G., van den Blink, A. E., Bos, L. M., Boots, A. G., Brinkhuis, F. H., Gijsen, E., van Remmerden, Y., Schuitemaker, H. and van't Wout, A. B.: *J. Hosp. Infect.*, **66**, 332-338 (2007)
77) Morino, H., Fukuda, T., Miura, T., Lee, C., Shibata, T. and Sanekata, T.: *Biocontrol Science*, **14**, 147-153 (2009)
78) Girard, M., Ngazoa, S., Mattison, K. and Jean, J.: *J. Food Prot.*, **73**, 400-404 (2010)
79) Sauerbrei, A. and Wutzler, P.: *Lett. Appl. Microbiol.*, **51**, 158-163 (2010)
80) Baert, L., De Gusseme, B., Boon, N., Verstraete, W., Debevere, J. and Uyttendaele, M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 2013-2017 (2010)
81) Wei, J., Jin, Y., Sims, T. and Kniel, K. E.: *Foodborne Pathog. Dis.*, **7**, 901-906 (2010)
82) Lages, S. L., Ramakrishnan, M. A. and Goyal, S. M.: *J. Hosp. Infect.*, **68**, 159-163 (2008)
83) Macinga, D. R., Sattar, S. A., Jaykus, L. A. and Arbogast, J. W.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 5047-5052 (2008)
84) Liu, P., Yuen, Y., Hsiao, H. M., Jaykus, L. A. and Moe, C.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 394-399 (2010)
85) Topping, J. R., Schnerr, H., Haines, J., Scott, M., Carter, M. J., Willcocks, M. M., Bellamy, K., Brown, D. W., Gray, J. J., Gallimore, C. I. and Knight, A. I.: *J. Virol. Methods*, **156**, 89-95 (2009)
86) 森　功次，林　志直，野口やよい，甲斐明美，大江香子，酒井沙知，原　元宣，諸角　聖：感染症誌，**80**，496-500（2006）
87) Iwasawa, A., Niwano, Y., Mokudai, T. and Kohno, M.: *Biocontrol Sci.*, **14**, 107-111 (2009)
88) Nuanualsuwan, S. and Clive, D. O.: *J. Virol.Methods*, **104**, 217-225 (2002)
89) Baert, L., Wobus, C. E., Van Coillie, E., Thackray, L. B., Debevere, J. and Uyttendaele, M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 543-546 (2008)
90) Lamhoujeb, S., Fliss, I., Ngazoa, S. E. and Jean, J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3349-3355 (2008)
91) Rudi, K., Moen, B., Drømtorp, S. M. and Holck, A. L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1018-1024 (2005)
92) Soejima, T., Iida, K., Qin, T., Taniai, H., Seki, M., Takade, A. and Yoshida, S.: *Microbiol. Immunol.*, **51**, 763-775 (2007)
93) Fittipaldi, M., Rodriguez, N. J., Codony, F., Adrados, B., Peñuela, G. A. and Morató, J.: *J. Virol. Methods*, **168**, 228-232 (2010)
94) Kim, K., Katayama, H., Kitajima, M., Tohya, Y. and Ohgaki, S.: *Water Sci. Technol.*, **63**, 502-507 (2010)