

環境表面から感染力を持ったウイルスを 正確に定量・検出することが可能な方法を構築

本研究成果のポイント

- # 環境表面上に存在する感染力を持ったウイルス(感染性ウイルス)の定量・検出は、現段階では標準化されていない。本研究では、感染性ウイルスをスワブで正確に回収して定量できる条件を明らかにした。
- # 環境表面上における感染性ウイルスの回収率はウイルス RNA の回収率よりも大幅に低く、感染性ウイルスの定量が困難であることを示された。[←現在、ウイルス RNA の定量・検出が主流となっている理由である。]
- # 感染性ウイルスの回収率は、乾燥したスワブよりも湿潤したスワブを使用した方が有意に高く、ポリエステルスワブよりも綿スワブ(綿棒)を使用した方が有意に高かった。
- # 回収率は評価面積が増加するほど低下した。ウイルス RNA の場合は評価面積が 400cm² を超えても正確な検出が可能であったが、感染性ウイルスの場合は 15cm² を超えると正確に検出できない場合があった。
- # 「綿スワブを使用する」「スワブは湿潤させる」「評価対象表面積は約 15cm² 以下とする」この3条件を満たすことで、感染性ウイルスの正確な定量・検出が実現する。

京都府立医科大学大学院医学研究科 消化器内科学 助教 廣瀬亮平、同 大学院生 宮崎 啓、同 教授 伊藤義人、同大学院医学研究科 感染病態学 教授 中屋隆明ら研究グループは、様々な環境表面から感染力を持ったウイルスを正確に定量(検出)出来る条件を明らかにしました。本研究に関する論文が科学雑誌「Environment International」に2023年9月10日(日)に掲載されましたのでお知らせします。本研究によって環境表面の感染リスクを従来より正確に評価することが可能となり、今後の感染制御の発展に大いに貢献します。

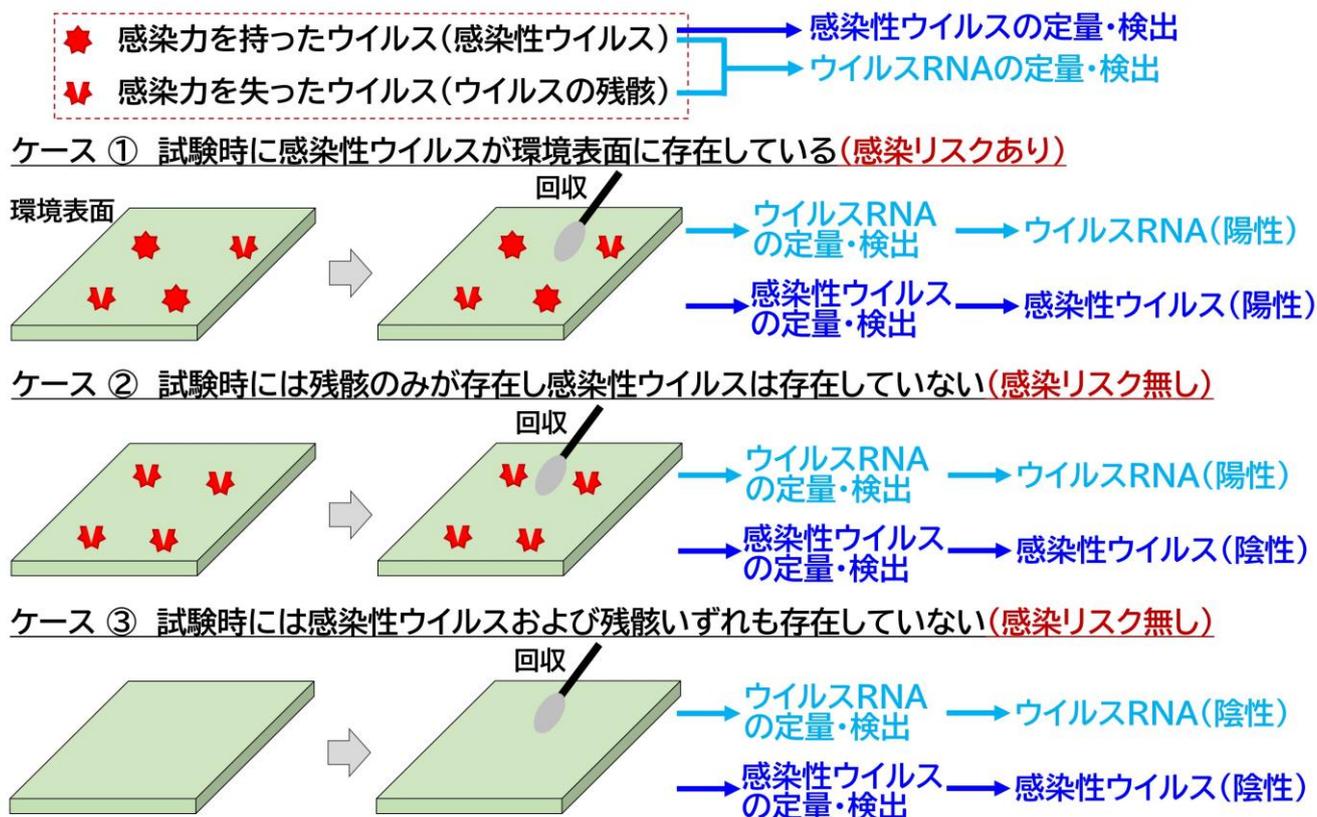
掲載誌情報	Environment International [現地時間 2023年9月10日(日)公開] 雑誌発行元国: アメリカ合衆国 オンライン速報版 URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412023004725
論文情報	論文タイトル: Methods for virus recovery from environmental surfaces to monitor infectious viral contamination [日本語: 感染性ウイルスによる汚染を監視するために環境表面からウイルスを回収・定量する方法]
著者情報	責任著者 京都府立医科大学大学院医学研究科 消化器内科学 廣瀬亮平 主な著者 京都府立医科大学大学院医学研究科 消化器内科学 宮崎 啓 京都府立医科大学大学院医学研究科 消化器内科学 伊藤義人 京都府立医科大学大学院医学研究科 感染病態学 中屋隆明

【研究の背景・目的】

環境表面上の感染性汚染物質のモニタリングは、これまでウイルス RNA (リボ核酸) が対象でした。具体的には、様々な身の回りの物体表面 (環境表面) をスワブで擦過し、表面上に付着しているウイルス RNA を回収します。続いて PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) にて、回収されたウイルス RNA を定量・検出します。これにより環境表面上のウイルス RNA の存在を評価していました。しかし、ウイルス RNA は感染力を持ったウイルス (感染性ウイルス) だけでなく、感染力の失われたウイルスの残骸にも含まれます。そのため、感染リスクの正確な評価には、環境表面上からの感染性ウイルスそのものの定量・検出が極めて重要となります (図1)。しかしながら、感染性ウイルスの定量・検出は非常に難しく、現段階では標準化されていません (文献①)。正確な定量・検出を行うには、環境表面上の感染性ウイルスを回収する必要がありますが、高い回収率を達成するための回収法は明らかにされていません。回収したウイルス量を測定する方法は既に確立されているため、「高回収率のウイルス回収方法」と「正確なウイルス定量・検出法」は、概ね同じ意味と言えます。

本研究では、スワブの種類・スワブ内の水分含有量・評価対象表面の素材・評価対象表面積などの要因が感染性ウイルスの回収率に及ぼす影響を包括的に分析しました。回収率に大きな影響を与える要因を特定した後、最も高いウイルス回収率をもたらす理想的な回収法 (つまり正確なウイルスの定量・検出法) の構築を目指しました。

図1：環境表面上の感染性汚染物質のモニタリング



ウイルスRNAの定量・検出は、感染性ウイルスだけでなくウイルスの残骸も検出してしまう。つまり感染リスクを過大評価してしまう。→ 感染性ウイルスの定量・検出が重要！

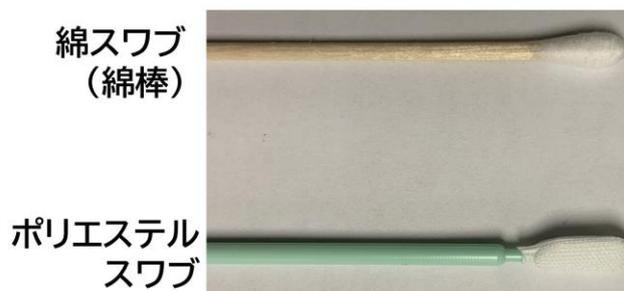
【研究の方法】

本研究では、スワブの種類・スワブ内の水分の有無・評価対象表面の素材と表面積の条件を変え、それぞれの条件における感染性ウイルスの回収率を調査しました。スワブは、綿スワブ(綿棒)とポリエステルスワブの2種を用意しました(図2)。評価対象表面は、室内(病院内)空間によく見かける環境表面6種(材質はガラス・ポリカーボネート・ポリ塩化ビニルシート・シリコンゴム・ステンレス鋼・ポリ塩化ビニルレザー)を選択しました(図3)。これらの表面は、表面積が 1, 4, 6, 25, 49, 100, 255, 400cm² となるように切り出され、評価に使用されました。また、ウイルスには、環境安定性が低い(脆弱な)エンベロープウイルスと安定性が高い(頑丈な)ノンエンベロープウイルスがあり、本研究では、エンベロープウイルスの代表としてインフルエンザウイルス、ノンエンベロープウイルスの代表としてネコカリシウイルスが使用されました(文献②)。

回収率の評価は下記のように行われました。

1. 各素材・各表面積の評価対象表面上にウイルス液を塗布します(表面上に塗布するウイルス量は一定にします)。
2. 45 分間放置し、ウイルス液が評価対象表面上で完全に乾いた段階で試験を開始します。
3. スワブを用いて評価対象表面を擦過し、表面上のウイルスを回収します。(スワブは、濡れた綿スワブ・乾燥した綿スワブ・濡れたポリエステルスワブ・乾燥したポリエステルスワブの計4種です。)
4. 回収されたウイルスの量(力価)を測定します。乾燥した段階(2.の段階)で表面上に存在するウイルス量を 100%として、スワブで回収されたウイルス量から回収率を算出します。

図2： 研究に使用したスワブの種類



綿スワブ
(綿棒)

ポリエステル
スワブ



図3： 研究対象の環境表面とその材質

窓
材質：ガラス

キーボード
ポリカーボネート

床面
PVCシート

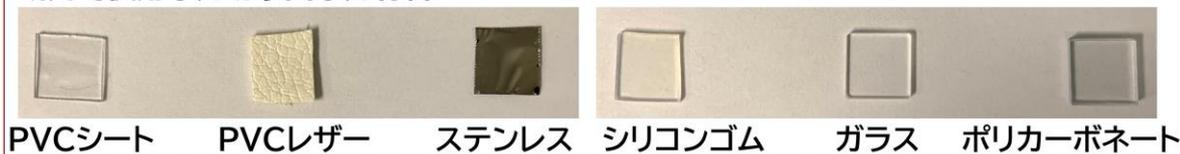
※ PVC=ポリ塩化ビニル

ベッド
PVCレザー

処置台
ステンレス鋼

ターネット・その他医療機器
シリコンゴム

研究で使用した切り出した材料



PVCシート

PVCレザー

ステンレス

シリコンゴム

ガラス

ポリカーボネート

【研究の主な結果と考察】

① インフルエンザウイルスとネコカリシウイルスの両方において、感染性ウイルスの回収率はウイルス RNA の回収率よりも有意に低くなりました ($P < 0.01$)。この結果は、過去の研究の結果とも一致しており、感染性ウイルスの定量・検出がウイルス RNA に比して難しいことを示しています(文献①)。感染性ウイルスを定量・検出するには、回収率の高い新しい回収法が必要です。したがって、我々は感染性ウイルスの最も高い回収率を達成するための理想的な条件の特定を目指しました。

② 感染性ウイルスの回収率は、乾燥したスワブよりも湿潤したスワブを使用した方が有意に高い結果となりました ($P < 0.006$)。また、綿スワブ(綿棒)を使用して得られた感染性ウイルスの回収率は、ポリエステルスワブを使用した場合よりも有意に高い結果となりました ($P < 0.0001$)。この結果は、乾燥したスワブより湿潤したスワブの方が感染性ウイルスの定量・検出に適していること、ポリエステルスワブに比して綿スワブの方が感染性ウイルスの定量・検出に適していることを示しています。

③ 感染性ウイルスの回収率は、対象表面積と強い負の相関(相関係数 > 0.8)を示しました。このことは評価対象面積が広くなるほど回収率が低下することを意味しています。

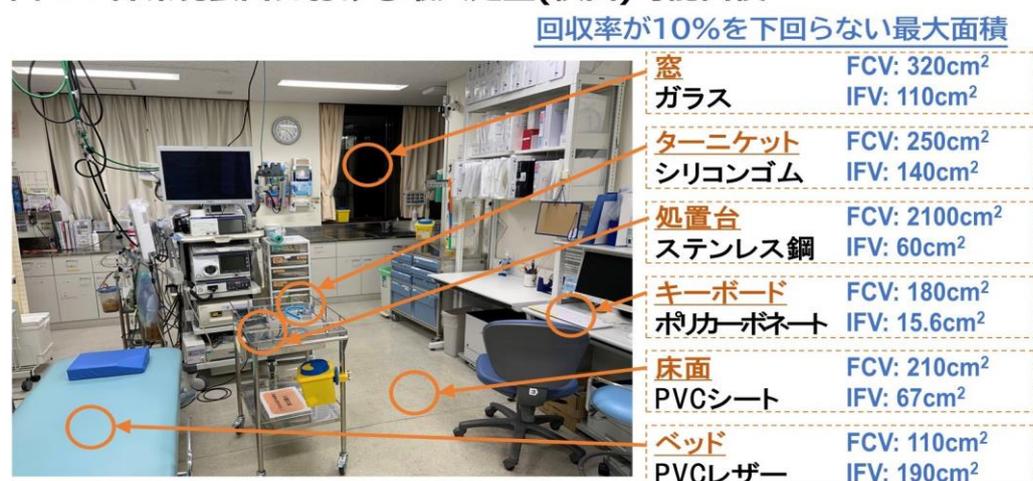
次に、ウイルス回収率が 10%を下回らない最大表面積を「最大定量(検出)可能面積」と定義しました。インフルエンザウイルスの回収では、ポリ塩化ビニルシート、ポリ塩化ビニルレザ、ステンレス鋼、シリコンゴム、ガラス、ポリカーボネート表面での最大定量(検出)可能面積は、それぞれ 67、190、60、140、110、15.6 cm^2 でした(図4)。ネコカリシウイルスの回収では、ポリ塩化ビニルシート、ポリ塩化ビニルレザ、ステンレス鋼、シリコンゴム、ガラス、ポリカーボネート表面の最大定量(検出)可能面積は、それぞれ 210、110、2100、250、320、180 cm^2 でした(図4)。

これらのデータは、100 cm^2 などの広い評価対象表面では感染性インフルエンザウイルスを正確に定量・検出できない可能性があることを示しています。また、正確に定量・検出するためには評価対象表面積を 15 cm^2 程度まで狭める必要があることを示しています。言い換えれば、約 15 cm^2 以下の評価対象表面積であれば、すべての評価対象表面で感染性ウイルスの正確な定量・検出が可能ということになります。

さらに、インフルエンザウイルスは、ネコカリシウイルスに比して回収率が低く、最大定量(検出)可能面積が狭い結果となりました。この結果は、ノンエンベロープウイルスがエンベロープウイルスよりも環境表面でより安定であるという事実に起因すると考えられます(文献②③④)。具体的には、スワブでの拭き取りや乾燥

などの回収プロセス中に、エンベロープを持つウイルスであるインフルエンザウイルスはノンエンベロープウイルスであるネコカリシウイルスよりも不活化されて回復率が低下すると推測されます。

図4：各環境表面における最大定量(検出)可能面積



最大定量可能面積 = 回収率が10%を下回らない最大面積
FCV:ネコカリシウイルス, IFV:インフルエンザウイルス

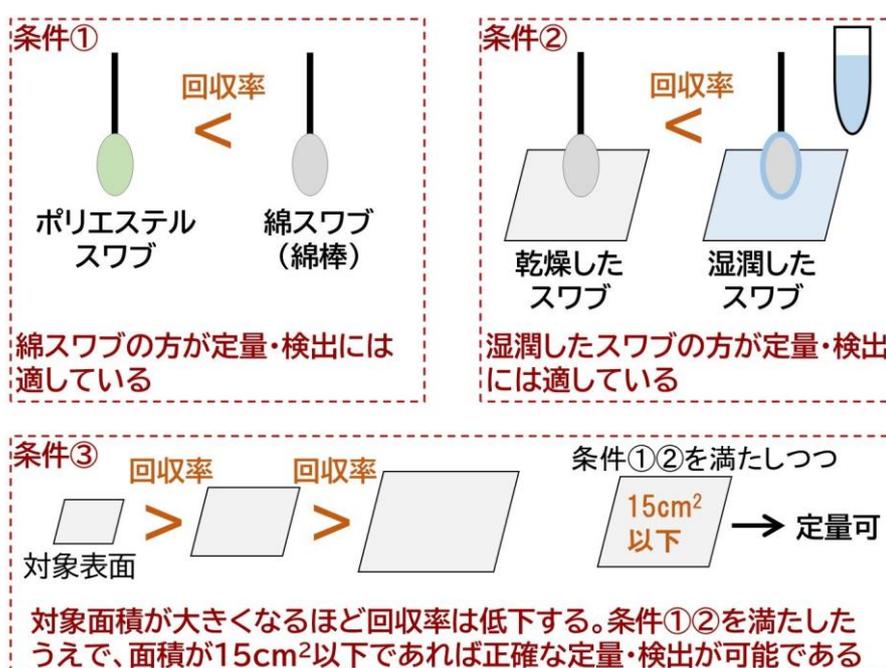
【まとめ】

本研究では、以下の4つの主要な発見を報告しています。

1. 乾燥したスワブより湿潤したスワブの方が感染性ウイルスの定量・検出には適している。
2. ポリエステルスワブに比して綿スワブの方が感染性ウイルスの定量・検出には適している。
3. 評価対象面積が広くなるほど回収率が低下する。
4. 約 15cm² 以下の評価対象表面積であれば、すべての評価対象表面で感染性ウイルスの正確な定量が可能である。

つまり、「綿スワブを使用する」「スワブは湿潤させる」「評価対象表面積は約 15cm² 以下とする」この3条件を満たすことで、現段階で最も高い回収率を達成することができ、感染性ウイルスの正確な定量・検出が実現します(図5)。

図5：環境表面上の感染性ウイルスを定量する理想的な方法



【今後の研究の展開】

本研究で得られた知見は、従来のウイルス RNA の定量・検出と同じ広い評価対象表面積(例:100 cm²以上)では、感染性ウイルスの正確な定量・検出ができない可能性があることを示唆しています。したがって、アウトブレイク発生後の初期スクリーニングでは、これまでと同様にウイルス RNA に焦点を当てることが望ましいと思われます。その上で、初期スクリーニングでウイルス RNA が検出された表面(感染リスクがある可能性がある表面)において、追加で感染性ウイルスの定量を実行することが最善であると考えています。この追加評価により、感染リスクをより正確に把握できるようになり、感染制御において重要な情報を提供します。

将来的に感染性ウイルスの回収率がさらに向上して最大定量(検出)可能面積が増大すれば、感染性ウイルスの初期スクリーニングも可能となるでしょう。我々は、より高い回収率を達成するウイルスの回収、定量・検出方法の構築に現在着手しています。

【文献】

- ① Lee C, Park S, Cho K, Yoo J.E, Lee S, Ko G, Comparison of Swab Sampling Methods for Norovirus Recovery on Surfaces. Food Environ Virol. 2018;10(4):378-385.
- ② Hirose R, Yoshimatsu T, Miyazaki H, Miura K, Fukazawa K, Yamauchi K, Watanabe N, Yoshida T, Bandou R, Itoh Y, Nakaya T. Antiviral papers generated from copper-supported TEMPO-oxide cellulose: Antiviral surface objective performance evaluation and underlying mechanisms. Journal of Environmental Chemical Engineering. 2023;11(5):110592.
- ③ Hirose R, Ikegaya H, Naito Y, Watanabe N, Yoshida T, Bandou R, Daidoji T, Itoh Y, Nakaya T. Survival of SARS-CoV-2 and influenza virus on the human skin: Importance of hand hygiene in COVID-19. Clinical infectious diseases. 2021;73(11):e4329-e4335.
- ④ Hirose R, Itoh Y, Ikegaya H, Miyazaki H, Watanabe N, Yoshida T, Bandou R, Daidoji T, Nakaya T. Evaluation of the residual disinfection effects of commonly used skin disinfectants against viruses: An innovative contact transmission control method. Environmental Science & Technology. 2021;55(23):16044-16055.

【研究資金】

本研究は以下の研究費の支援を受けて行われました。

- ・ 国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 新領域・ムーンショット部 官民による若手研究者発掘支援事業
- ・ JSPS 科研費 若手研究
- ・ 公益社団法人武田科学振興財団 医学研究継続助成 感染領域
- ・ ロッテ財団 奨励研究助成

<p><研究に関すること> 京都府立医科大学大学院医学研究科 消化器内科学 助教 廣瀬亮平 電話：075-251-5325 E-mail：ryo-hiro@koto.kpu-m.ac.jp</p>	<p><広報に関すること> 京都府立医科大学 企画広報課 堤 電話：075-251-5804 E-mail：kouhou@koto.kpu-m.ac.jp</p>
--	---