

短報

畑中律敏ら Access Microbiology 2022.04 000354

DOI 10.1099/acmi.0.000354

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に対する亜塩素酸および次亜塩素酸ナトリウムの活性の比較評価

畑中律敏^{1,2,3}、Sharda Prasad Awasthi^{1,2,3}、Bingting Xu¹、合田学剛⁴、川田宏之⁴、堀内功典⁴、
安木真世^{1,2,3}、山崎伸二^{1,2,3,*}

要約

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) と名付けられた新型コロナウイルスは、2019 年に中国で突然出現し、世界的に拡散して今回の COVID-19 パンデミックを引き起こした。そこで、SARS-CoV-2 の感染を軽減するには、効果的な対策が不可欠である。尚、亜塩素酸 (HClO₂) は効果的な抗微生物剤であることが示されている。しかし、現在のところ、亜塩素酸 (HClO₂) が SARS-CoV-2 を不活性化できることを示す実験的証拠はない。そこで、本研究では、有機物の存在下または非存在下における HClO₂ による SARS-CoV-2 の不活性化能を調べ、同じく強力な抗微生物剤である次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) の結果と比較した。濃縮した SARS-CoV-2 を 10 ppm の HClO₂ と 10 秒間処理すると、ウイルス力価は 1 mL 当たり 5 log 50% 組織培養感染量 (TCID₅₀) 減少した。しかし、同じ濃度の NaClO は、3 分間処理した後でも、HClO₂ ほど効果的に SARS-CoV-2 を不活性化することはできなかった。さらに、10 ppm の HClO₂ は、混合有機物として使用した 5% ウシ胎児血清存在下でも、10 秒以内に 4 log TCID₅₀ ml⁻¹ 以上を不活性化した。本研究において、SARS-CoV-2 に対する消毒薬として使用されている NaClO と比較して、HClO₂ の方が SARS-CoV-2 に対してより効果的であるという結果が得られた。

序論

2019 年末に中国で肺炎患者から新型コロナウイルスが確認され、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) と命名された。このウイルスは急速に世界中に広がり、SARS-CoV-2 による疾病は新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) と呼ばれるようになった。世界保健機関 (WHO) は、2020 年 3 月に COVID-19 をパンデミック (世界的大流行) として発表した。2021 年 11 月 23 日現在、全世界で SARS-CoV-2 感染による患者 2 億 5700 万人以上、死亡者 510 万人が確認されて

いる。

SARS-CoV-2 感染症は、飛沫や密接な接触を介してヒトからヒトへと感染すると考えられており、おそらく空気感染も含まれる。したがって、SARS-CoV-2 はプラスチックやステンレス上で 5 日以上その感染力を維持できることから、飛散した飛沫中のウイルスを不活性化することが感染拡大の防止に重要であると思われる。COVID-19 のワクチン接種は、米国、イスラエル、英国など 60% 以上の人々が接種した国では、感染者数および死亡者数の減少に寄与しているが、いまだに毎日多くの新規感染者が、特に、接種率の低い国で報告されている。さらに、アルファ、ベータ、ガンマ、デルタ、そしてごく最近ではオミクロンのような新しい変異株が出現し、世界中に広がった。

尚、SARS-CoV-2 の感染を防ぐために、WHO は 1000 ppm の次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) の使用を推奨しており、SARS-CoV-2 に汚染されている可能性のある表面の消毒薬として一般的に使われている。しかし、1000 ppm の NaClO は、金属腐食、粘膜の炎症などを引き起こす可能性がある。さらに、NaClO の抗微生物活性は、有機物の存在下では大幅に低下することが報告されている。

2021 年 12 月 15 日受領、2022 年 2 月 16 日受理、2022 年 5 月 23 日公開

著者所属：¹大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻 〒598-8531 大阪府泉佐野市りんくう往来北 1 番地の 58、²大阪府立大学アジア健康科学研究所 〒598-8531 大阪府泉佐野市りんくう往来北 1 番地の 58、³大阪府立大学大阪国際感染症研究センター 〒598-8531 大阪府泉佐野市りんくう往来北 1 番地の 58、⁴三慶株式会社 大阪市中央区城見 2 丁目 2 番 53 号

***連絡先**：山崎伸二 shinji@vet.osakafu-u.ac.jp

キーワード：亜塩素酸；次亜塩素酸ナトリウム；SARS-CoV-2.

略語：COVID-19, 新型コロナウイルス感染症；FBS, ウシ胎児血清；SARS-CoV-2, 重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2；TCID₅₀, 50%組織培養感染量；UK, 英国；USA, アメリカ合衆国；WHO, 世界保健機関。

000354 © 2022 著者



これは、クリエイティブ・コモンズ表示ライセンスの条件の下で配布されるオープンアクセスの記事である。

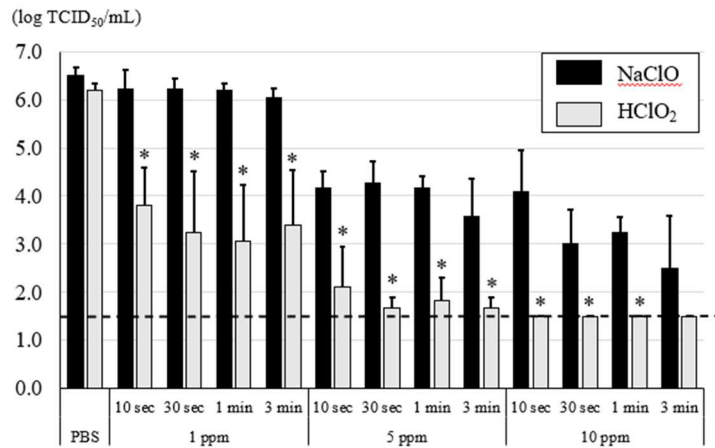


図1. SARS-CoV-2に対する10, 5あるいは1 ppmのHClO₂およびNaClOの抗ウイルス活性。濃縮したSARS-CoV-2ウイルスを10, 5あるいは1 ppmのHClO₂およびNaClOでそれぞれ10秒、30秒、1分あるいは3分間処理した後、50%組織培養感染量(TCID₅₀ ml⁻¹)としてウイルス力価を決定した。点線は検出下限(≦1.5 log TCID₅₀ ml⁻¹)を示す。すべてのデータは、3回の独立した実験からの平均値±標準偏差を表す。*はHClO₂とNaClOによる結果の間でウイルス力価に有意差がある。VeroE6/TMPRSS2細胞に各薬品を10 ppm添加しても、その毒性は認められなかった。

亜塩素酸(HClO₂)も一般的な消毒薬であり、消毒のための医療用医薬品として認められている。いくつかの研究では、HClO₂が黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、カンジダアルビカンス(*Candida albicans*)等の病原体に対して強力な殺菌活性を持つことを示した。さらに、合田らは、HClO₂がインフルエンザウイルスA型や単純ヘルペスウイルス1型などのエンベロップを有するウイルスを不活性化できることを報告している。実際、HClO₂はエンベロップを有するウイルスに対して、エンベロップを保有しないウイルスよりもはるかに強い抗ウイルス活性を示す。しかしながら、現時点では、HClO₂がSARS-CoV-2を効率的に不活性化できるかどうかは不明である。たとえそうだとした場合、SARS-CoV-2を不活性化するためにどれくらいの濃度のHClO₂をどれくらいの時間作用させる必要があるのかについての情報は無い。そこで、本研究では、有機物の存在下または非存在下でのHClO₂によるSARS-CoV-2の不活性化能を実験的に評価し、NaClOの不活性化能と比較した。

方法

SARS-CoV-2の培養には、JCRB細胞バンク(大阪、日本)から購入したVeroE6/TMPRSS2細胞を使用した。VeroE6/TMPRSS2細胞は、低濃度グルコース、ピルビン酸含有ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM; Thermo Fisher Scientific Inc., マサチューセッツ州ウォルサム、米国)に5%の非働化ウシ胎児血清(FBS; Thermo Fisher Scientific Inc.)と真核細胞の選択剤としてよく使われるジェネテシンである1 mg ml⁻¹のG418(ナカライテスク株式会社、京都、日本)を加え、37℃、5%のCO₂を含む大気中で培養した。

VeroE6/TMPRSS2 細胞 14 万個を 25 cm²-細胞培養フラスコに入れ、5 % CO₂加湿インキュベーター内で 37°C、16 時間培養した。細胞を MOI=0.001 の SARS-CoV-2JPN/ TY / WK- 521 株を感染させ、2%の非働化 FBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) および 1 mg ml⁻¹ の G418 (ナカライテスク株式会社) を添加した DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc.) 中で 37°C で 48~96 時間培養した。細胞変性効果 (CPE) が認められた後、培養上清を採取し、3000 r.p.m. で 5 分間遠心分離 (LC-220 ; 株式会社トミー精工、東京) した後、ウイルス粒子を含む上清画分を採取した。次に、採取したウイルス液 10 ml にポリエチレングリコール 6000 を 1 g、NaCl (ナカライテスク株式会社) を 233 mg 加え、4°C で 16 時間静置した。その後、ウイルス液を 15000 r.p.m.、4°C で 10 分間遠心分離 (MX- 301 ; 株式会社トミー精工) し、上清を捨ててペレットを 1 ml の pH 7.4 の PBS (-) で懸濁した。感染性のある SARS-CoV-2 ウイルスを用いた実験は、大阪府立大学のバイオセーフティー委員会の許可を得て、大阪府立大学のバイオセーフティーレベル 3 実験室で実施した。

濃縮ウイルス液 60 µl、または濃縮ウイルス 30 µl と 30 µl の 10% FBS を含むあるいは含まない pH7.4 の PBS (-) を 540 µl の数種の濃度 (10、5 あるいは 1 ppm) の HClO₂ (クロラス酸・Nバリア、三慶株式会社、大阪) または NaClO (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪) と混合した。その後、試料を 25°C で 10 秒、30 秒、1 分または 3 分間処理した。処理後、直ちに、0.1 M チオ硫酸ナトリウム 30 µl、10 倍濃い DMEM (日水製薬株式会社、東京) 60 µl、FBS 12 µl および 50 mg ml⁻¹ の G418 二硫酸塩水溶液 12 µl を添加した。その後、2% FBS と 1 mg ml⁻¹ の G418 を添加した DMEM で 10 倍希釈を行い、以下に示すようにウイルス力価を測定した。

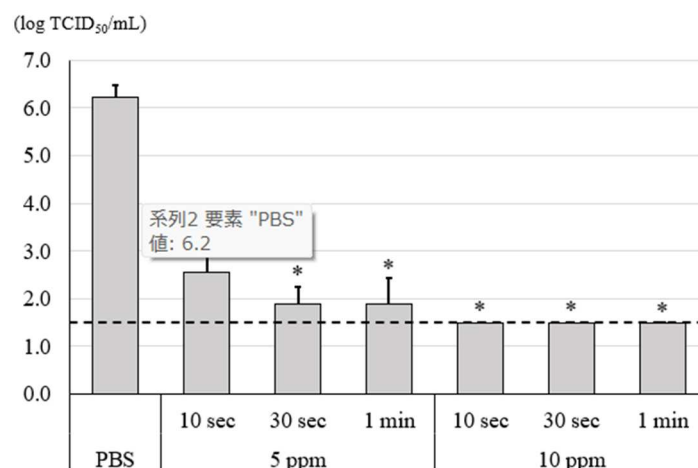


図 2. ウイルス液中に 5% の FBS が存在する条件下での SARS-CoV-2 に対する 10 または 5 ppm の HClO₂ の抗ウイルス活性。5%の FBS を添加した濃縮 SARS-CoV-2 を 10 あるいは 5 ppm の HClO₂ で 10 秒、30 秒または 1 分間処理した後、1 ml あたりの 50%組織培養感染量 (50% tissue culture infective dose per millilitre : TCID₅₀ ml⁻¹) としてウイルス力価を測定した。点線は検出下限 (≦1.5 log TCID₅₀ ml⁻¹) を示す。すべてのデータは、3 回の独立した実験からの平均値±標準偏差を表す。*は HClO₂ と NaClO による結果の間でウイルス力価に有意差がある。VeroE6/TMPRSS2 細胞に各薬品を 10 ppm 添加しても、その毒性は認められなかった。

約 2.5×10^4 個 $100 \mu\text{l}^{-1}$ の VeroE6/TMPRSS2 細胞を 96 ウェルプレート の各ウェルに播種し、それぞれの培地で 37°C 、16 時間培養した。培養液を除去し、2% の FBS および 1 mg ml^{-1} の G 418 を添加した DMEM 培地で 10 倍に段階希釈したウイルス液 $100 \mu\text{l}$ を添加した。ウイルスを感染させた VeroE6/TMPRSS2 細胞を 37°C で 72 時間培養した。細胞をメタノール (ナカライテスク株式会社) で固定し、0.5% のクリスタルバイオレット染色液 (ナカライテスク株式会社) で染色した。次に、Behrens-Kaerber 法を用いて 50%組織培養感染量 (TCID₅₀) を算出した[14]。

統計解析は、Microsoft Excel 2019 (Microsoft、ワシントン州レッドモンド、米国) を用いて、スチューデントの両側 t 検定を実施した。p 値が 0.05 未満である場合、統計的に有意な差があると判断した。

結果と考察

SARS-CoV-2 ウイルスは、2019 年に中国・武漢で最初の患者が確認された直後、急速に世界中に拡散した。数種類の COVID-19 に対するワクチンが開発され、COVID-19 に対するワクチンを導入した地域では感染者が激減したが、イギリス (α)、南アフリカ (β)、ブラジル (γ)、インド (δ) など各国で変異株が出現しており、ワクチン接種が COVID-19 の収束にどこまで貢献できるのかは未だ不明である。WHO は、SARS-CoV-2 の消毒に 1000 ppm の NaClO または 70%エタノールを推奨している[8]。しかし、70%エタノールは人によっては皮膚炎を引き起こす可能性があり、1000 ppm の NaClO は人体には使用できない。そこで、COVID-19 のパンデミックを緩和するために、これらの問題点を補う代替手段を提供することが重要である。

HClO₂ は最も一般的な塩素系消毒薬の 1 つで、人にも使用できる。しかし、HClO₂ が SARS-CoV-2 を不活性化できることを示す直接的な証拠はない。そこで、本研究では、HClO₂ の SARS-CoV-2 不活性化能力を NaClO のそれと比較して広範囲にわたり評価した。結果として、SARS-CoV-2 ウイルスを HClO₂ で処理すると、ウイルス力価は濃度依存的に減少した (図 1)。例えば、1 ppm の HClO₂ であれば、ウイルス力価を 10 秒以内に $2 \log \text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ 減少させることが観察された。又、30 秒以上で処理した場合には、ウイルス力価は約 $3 \log \text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ 減少した。そして、5 ppm の HClO₂ ならウイルス力価を 10 秒以内に $4 \log \text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ 減少させた。しかも、30 秒以上で処理した場合、5%FBS (最終濃度 0.5%) の非存在、存在に関わらず、ウイルス力価は約 $4 \log \text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ 以上減少した。さらに、10 ppm の HClO₂ は、5% FBS (最終濃度 0.5%) の有無にかかわらず、10 秒以内にウイルス力価を検出下限 ($\leq 1.5 \log \text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$) にまで減少できた (図 1 および図 2)。尚、唾液のタンパク質濃度は約 1.1 mg ml^{-1} 程度であることが知られているので、5%FBS は唾液の 2 倍の濃度のタンパク質を含んでいることになる。しかし、ウイルスを 1 ppm の NaClO で処理した場合には、3 分間処理しても、ウイルス力価は低下しなかった。一方、5 ppm および 10 ppm の NaClO で 3 分間処理した場合、ウイルス力価はそれぞれ 3 および $4 \log \text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ 減少した (図 1)。なお、特筆すべき事項として、本実験で用いた最高濃度である 10 ppm の HClO₂ および NaClO であっても、この実験条件下では細胞毒性を示さなかった。これらの結果から、HClO₂ が NaClO よりも SARS-CoV-2 に対してより強力な抗ウイルス剤であることを示唆している。

合田らは、 HClO_2 がインフルエンザウイルス A 型と単純ヘルペスウイルス 1 型の両方を不活性化したことを報告しており、 HClO_2 が SARS-CoV-2 に特異的に抗ウイルス活性を示すだけでなく、他のウイルスに対しても非常に良く効くことを示している。我々の以前の研究において、 HClO_2 の *Campylobacter jejuni* と *C. coli* に対する抗菌活性を調べ、 NaClO のそれと比較した。その結果は、有機物の有無にかかわらず、 HClO_2 が NaClO よりも強力な抗菌活性を有することを示した。尚、本研究で使用した消毒薬の濃度は WHO のプロトコルと比較して非常に低いが、いかなる消毒薬の過剰量の使用は人体や環境に有害となりうるため、消毒薬の最小抗ウイルス濃度を知ることは重要である。

結論

我々のデータは、 HClO_2 が NaClO に比べてより低濃度で SARS-CoV-2 を不活性化することができ、SARS-CoV-2 のヒトへの感染量は不明であるが、有機物の有無に関わらず HClO_2 は NaClO よりも SARS-CoV-2 に対してより強力な消毒薬であることが明らかとなった。SARS-CoV-2 に対して低濃度の HClO_2 が有効であることは、実用上の大きな利点である。唾液などの有機物の存在下または非存在下での SARS-CoV-2 変異株に対する HClO_2 の有効性を調べるため、我々の研究室ではさらなる研究を進めている。

研究費の財源

本研究は、三慶株式会社からの共同研究助成金によって支援された。

謝辞

SARS-CoV-2 JPN/TY/WK- 521 株を提供していただいた国立感染症研究所に感謝する。また、原稿の査読をしていただいた Dr Rupak K. Bhadra (CSIR- Indian Institute of Chemical Biology, Kolkata, India) に感謝する。

著者の本研究に対する役割

N.H., H.G., S.Y. : 研究計画の立案

N.H., S.P.A., B.X., M.Y. : 研究の遂行

H.G., H.K., I.H. : 研究材料の提供

N.H., S.Y. : 原稿の執筆

N.H., H.G., M.Y., S.Y., 原稿の修正

S.Y. : 研究全体の統轄

利益相反

本研究は、三慶株式会社の共同研究として実施され、同社から資金的な支援を受けた。