

ウイルスの精製が塩素系消毒剤である亜塩素酸に対する SARS-CoV-2 の高い感受性を浮き彫りにする

Basirat Mojisola Lawal-Ayinde¹、森田智子¹、小田康祐¹、Tanuza Nazmul¹、黒瀬美羽子¹、野村俊仁^{1,2}、山本旭麻¹、東浦彰史¹、秋田智之³、田中純子³、堀内功典⁴、合田学剛⁴、坂口剛正^{1*}

1 広島大学大学院医系科学研究科ウイルス学研究室、広島

2 広島大学病院感染症科、広島

3 広島大学大学院医系科学研究科疫学・疾病制御学、広島

4 三慶株式会社、姫路

* tsaka@hiroshima-u.ac.jp



要約

OPEN ACCESS

引用：Lawal-Ayinde BM、森田 T、小田 K、Nazmul T、黒瀬 M、野村 T、他。(2023) ウイルスの精製が塩素系消毒剤である亜塩素酸に対する SARS-CoV-2 の高い感受性を浮き彫りにする。PLOS ONE 18(7): e0288634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288634>

編集者：Jian Xu、華東師範大学生命科学学院、中国

受領：2022年10月23日

受理：2023年7月1日

発行：2023年7月14日

亜塩素酸水 (HClO₂) はその抗菌活性で知られています。本研究では、亜塩素酸水が SARS-CoV-2 を不活化する能力を正確に評価することを試みました。感染細胞の細胞培養上清を試験ウイルスとして使用した場合、SARS-CoV-2 D614G 変異株ならびにデルタおよびオミクロン変異株の 99% 不活化濃度 (IC₉₉) は、遊離塩素濃度約 10 ppm (反応時間 10 分) であった。一方、より精製度の高いウイルスを用いた実験では、亜塩素酸水の IC₉₉ は反応時間 1 分で 0.41~0.74 ppm であり、200 倍以上の強力な不活化能力を示しました。次亜塩素酸ナトリウム水では、IC₉₉ は 0.54 ppm であり、これらの塩素化合物が SARS-CoV-2 に対して強力な不活化効果を有することが確認されました。しかし、感染細胞の培養上清を試験ウイルスとして用いた場合、それに含まれるアミノ酸などの不純物によって効果が隠されてしまうことが明らかになりました。また、精製ウイルスにタンパク質 (0.5%ポリペプトン、または 0.3%BSA+0.3%ヒツジ赤血球、または 5%FBS) を添加すると、反応時間 10 分で IC₉₉ 値が 5.3~76 ppm の範囲で高くなり、効果が著しく低下しました。しかし、通常の使用濃度が 200 ppm であることを考慮すると、亜塩素酸水はタンパク質の存在下においてもなお十分な消毒効果を発揮できることが示されました。亜塩素酸水の実用化と効果を確認するにはさらなる研究が必要ですが、SARS-CoV-2 の蔓延を防ぐための重要なツールとなる可能性を秘めています。

著作権：© 2023 Lawal-Ayinde ら。これはクリエイティブ・コモンズ表示ライセンス

の条件に基づいて配布されるオープンアクセスの論文であり、原著者と出典のクレ

ジットがある限り、いかなる媒体においても無制限の使用、配布、複製が許可される。

データの利用可能性に関する声明：すべての関連データは、論文およびそのサポート情報ファイルに含まれている。

資金提供：本研究は、日本の国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の COVID-19 研究助成 (助成番号 JP20he0622011 および JP21fk0108558 (T. S.へ)、JP20fk0108453 および JP21fk0108550 (J. T.および T. S.へ))、広島県産学官連携研究助成 (J. T.および T. S.へ)、国立研究開発法人科学技術振興機構次世代研究者挑戦的研究プログラム (JST SPRING) の研究助成 (助成番号 JPMJSP2132 ((B.L.-A.および M.K.へ)) により支援を受けている。本研究は、三井住友銀行 COVID-19 研究基金 (T. S.へ)、公益財団法人大塚敏美育英奨学財団 (T. N.へ) から支援を受けた。資金提供者は、研究計画、データ収集、解析、出版決定、原稿作成には関与していない。

序論

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の出現は世界的な健康問題となっており、2~10 日の潜伏期間を経てヒトに呼吸器感染症 COVID-19 を引き起こし、重症の肺炎をもたらす、一部の患者では死に至ることさえある[1]。エアロゾル化した SARS-CoV-2 は 3 時間まで生存することが判明しており、ウイルスはプラスチックやステンレス鋼の表面上では 72 時間まで生存することが判明している [2]。このウイルスは、平滑な表面または非多孔質表面の環境では、より長期間安定を保ち、感染力を維持することも判明している [3、4]。ヒトからヒトへの感染は飛沫を介して起こるが、飛沫が物体の表面に付着することで接触感染も起こると言われている [5]。したがって、さらなるウイルスの蔓延を防ぐために、公共の場や医療施設では効率的で安全なウイルス不活化剤が必要とされている。

近年、二酸化塩素、次亜塩素酸ナトリウム、亜塩素酸水溶液など、さまざまな塩素系消毒剤が SARS-CoV-2 に対して抗ウイルス効果を示すことが示されている [6~9]。これらは、塩素イオンが強力な酸化剤であり、微生物タンパク質の変性を引き起こすからである [10]；しかし、塩素イオンは有機物と接触すると急速に抗菌活性を失う [11]。塩素系消毒剤の中でも、亜塩素酸水 (HClO₂) も強い抗ウイルス活性を有することが示されている [12、13]。特に、有機物が多い条件下では、亜塩素酸は一般的な殺菌剤である次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) よりも安定しており、継続的に塩素イオンを生成することが示されている [12]。従って、亜塩素酸水は、病院内などの汚染された環境表面を処理するのにより有用であるかもしれない。

亜塩素酸水をベースにした抗菌剤も開発されている [14]。これらの薬剤は、栄養性細菌 (*Staphylococcus aureus* 黄色ブドウ球菌、*Escherichia coli* 大腸菌、腸管出血性大腸菌 O157、*Campylobacter* キャンピロバクター)、細菌芽胞 (*Paenibacillus* パエニバチルス、*Bacillus* バチルス、*Clostridium difficile* クロストリジウム・ディフィシル) および真菌 (*Candida albicans* カンジダ・アルビカンス) の処置に使用されてきた [12、14]。亜塩素酸水はまた、エンベロープウイルス (インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス-1) および非エンベロープウイルス (ネコカリシウイルス、ヒトライノウイルス、ヒトノロウイルス) の両方に対して効果があることが示されている [13、15]。最近では、SARS-CoV-2 に対しても有効であることが示された [8]。しかし、SARS-CoV-2 に対する作用の詳細な分析は行われていない。

本研究の目的は、亜塩素酸水本来の SARS-CoV-2 に対する不活化活性を可能な限り正確に評価することであった。これを達成するため、亜塩素酸水溶液中の遊離有効塩素 (FAC) を適切な方法でモニターした [16]。実験の過程で、標準的なウイルス不活化試験で一般的に使用される「感染培養細胞の上清」を使用すると、亜塩素酸水の効果が低下することが判明した。そこで、亜塩素酸水の効果を正確に評価するためには、高度に精製されたウイルス粒子を使用する必要があった。

利益相反：G.H. は日本の亜塩素酸水の主要供給会社である三慶株式会社の代表取締役であり、I.H. はその従業員である。亜塩素酸水を供給する三慶株式会社は、本研

究の計画、データ収集、解析、出版決定、原稿作成には関与しておらず、研究材料の提供のみを行った。

材料および方法

試薬

亜塩素酸水（クロラス酸・Nバリア）は三慶株式会社（足利市）から、次亜塩素酸ナトリウム水溶液（ピューラックス-S）は株式会社オーヤラックス（東京都）から購入した。チオ硫酸ナトリウムおよびポリペプトン（PP）（ハイポリペプトンN）は、富士フイルム和光純薬株式会社（東京都）から購入した。ウシ血清アルブミン（BSA）は片山化学工業株式会社（大阪）から、ヒツジ赤血球（SRBCs）は株式会社ジャパン・バイオシーラム（東京都）から購入した。ウシ胎児血清（FBS）は BIOSERA 社（米国ミズーリ州カンザスシティ）から購入した。

遊離有効塩素濃度の測定

亜塩素酸水および次亜塩素酸ナトリウム水溶液の遊離有効塩素（FAC）濃度は、以前に記述したように、使用時に RC-V2-CAW メーター（笠原理化工業株式会社、埼玉県）を用いて DPD 法により測定した[16]。異なる FAC 濃度の亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウム溶液を得るため、溶液を滅菌蒸留水で希釈した。

細胞培養

VeroE6/TMPRSS2 細胞（ヒト TMPRSS2 を発現するアフリカミドリザル腎臓由来細胞；[17]）は、日本研究生物資源コレクション（JCRB）細胞バンク（JCRB1819）から提供された。細胞は、10% FBS と 1 mg/mL の G418（ナカライテスク株式会社、京都市）を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM；富士フィルム和光純薬株式会社）で、37°C、5% CO₂ で維持した。

ウイルス

SARS-CoV-2/JP/Hiroshima-46059T/2020 株（B.1.1, GISAID アクセション ID：EPI_ISL_6289932）、SARS-CoV-2/JP/hiroC77/2021[デルタ（B.1.617.2-様）、EPI_ISL_6316561]、および SARS-CoV-2/JP/FH-229/2021 [オミクロン（BA.1-様）、EPI_ISL_11505197]、はいずれも広島で分離されたものを使用した。ウイルスストック調製のために、感染細胞培養培地を感染後 48 時間で回収し、低速遠心分離で清澄化し、0.45 μm フィルターで濾過した。

ウイルスストックからさらに精製と濃縮を行った。ポリエチレングリコール（PEG）沈殿のため、21 ml のウイルスストックを 1/3 vol（7 ml）の 40% PEG8000（Promega）と混合し、氷上に 6 時間置き、3000 rpm で 30 分間遠心分離し、1 ml の生理食塩水に懸濁した。超遠心分離のために、21 ml のウイルスストックを Beckman SW-32Ti で 22000 rpm、4°C で 1 時間遠心分離し、ペレットを 1 ml の生理食塩水に懸濁した。各ウイルスをアリコートに分け、使用するまで -80°C で凍結した。

ウイルス力価は、標準的な 50% 組織培養感染用量（TCID₅₀）法で測定し、以前に述べたように TCID₅₀/ml で表した[18]。感染および電子顕微鏡サンプルの調製を含む、感染性 SARS-CoV-2 を扱うすべての実験は、広島大学の BSL3 施設で実施された。

SDS-PAGE 分析

調製した各ウイルスを等量の 2x SDS サンプルバッファー（50 mM Tris-HCl、pH6.5、10%グリセロール、2%SDS、0.1%プロモフェノールブルー）と混合し、90°C で加熱した。サンプルは、WIDE RANGE Gel Preparation Buffer（ナカライテスク株式会社、京都市）を用いて調製した 15%SDS-PAGE ゲル上で電気泳動により分離した。電気泳動後、ゲルをクマシーブリリアントブルーで染色し、iBright FL1500 Imaging System（Thermo Fisher Scientific）を用いて可視化した。

透過型電子顕微鏡

電子顕微鏡観察は、グロー放電カーボンコート Cu グリッド（イーエムジャパン株式会社、東京都）にウイルス溶液（3 μ l）を 30 秒間吸着させ、余分な溶液を濾紙で除去した。その後、0.9% (w/v) NaCl を加えて洗浄し、30 秒後に濾紙にプロットした。最後に、染色溶液 [2% (w/v) モリブデン酸アンモニウム四水和物水溶液] をグリッド上にプロットし、30 秒後に濾紙にプロットした。染色工程を 2 回行い、グリッドを風乾した後、紫外線（Care222；ウシオ電機株式会社、東京都）を照射してウイルスを完全に不活化した[18]。サンプルグリッドの観察は、透過型電子顕微鏡（JEM-1400、日本電子株式会社、東京都）を用いて 80 kV で行った。画像は装備された CCD カメラ（1024x1024 ピクセル）で記録された。

殺ウイルス試験

亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウム溶液は、試薬との混合やウイルス反応を含め、実験中はポリスチレン管で取り扱った。溶液（90 μ l）をウイルス接種材料（10 μ l）と室温で 10 分間反応させた後、10 μ l の 1 M チオ硫酸ナトリウムを添加した。反応液を 10% FBS-DMEM で 10 倍ずつ 1.5 ml チューブに連続希釈し、96 ウェルプレート中の VeroE6/TMPRSS2 単層に接種した。接種した細胞は、細胞変性効果（CPE）が完全に出現するまで CO₂ インキュベーターで培養した。細胞変性効果は顕微鏡で観察し、TCID₅₀/ml 値は以前に述べたように Behrens-Käber 法で算出した[19]。溶液の細胞傷害性は、ウイルス非存在下での細胞単層の顕微鏡分析によって決定した。

タンパク質負荷実験には以下の試薬を使用した。最終濃度 0.5% のポリペプトン（PP）を用いた実験では、10% (w/v) 水溶液を調製し、0.1- μ m のフィルターで濾過滅菌した後、等量のウイルス溶液と混合して実験に使用した。ウイルスとの混合液中の PP 濃度は 5% (w/v) であり、ウイルスと試薬は 1 : 9 の割合で混合されたので、反応液中の PP の最終濃度は 0.5% であった。0.03% の BSA を用いた試験では、同様の方法で 0.6% (w/v) の BSA 水溶液を調製し、反応溶液中の最終濃度を 0.03% とした。5% (v/v) FBS を用いた試験では、100% FBS を使用して最終濃度を 5% (w/v) とした。最終濃度 [0.3% ヒツジ赤血球（SRBCs）+ 0.3% BSA] の実験では、ウイルス溶液、(3% SRBC + 3% BSA)、消毒液を 1 : 1 : 8 の割合で混合した。この場合、消毒剤の濃度は他のアッセイの 9 分の 8 に希釈され、最終計算で補正された。

消毒動態の分析

実験データは Chick-Watson モデルに当てはめた [15] :

$$\text{Log}_{10} \left[\frac{N(t)}{N_0} \right] = -k \cdot C^n \cdot t.$$

式 1 において、 $N(t)$ は消毒剤との培養後に残存するウイルス感染力価であり、 N_0 は初期感染力価である。 C は消毒剤の所定の濃度、 t は消毒剤との培養時間である。

k および n はそれぞれ、特定の消毒剤と条件に対する速度定数および消毒剤濃度の相対的重要性を決定する希釈係数であり、非線形最小二乗法によって推定された。

結果

感染細胞上清中の SARS-CoV-2 の不活化

VeroE6/TMPRSS2 細胞にウイルスを感染させ、無血清 DMEM で培養し、培養上清を試験ウイルスとして亜塩素酸水の SARS-CoV-2 不活化効果を検討した。亜塩素酸水中の FAC を測定し、ウイルスを様々な濃度の溶液と混合し、10 分間反応させた。チオ硫酸ナトリウムで反応を停止させた後、ウイルスの感染力価を測定した。その結果、ウイルスの感染力価は亜塩素酸水中の FAC 9 ppm で約 1/10 に減少し、18 ppm では 1/100000 と大幅に減少した。さらに 22.5 ppm で検出限界まで減少し、ウイルスがほぼ完全に不活化されたことが示された (図 1)。

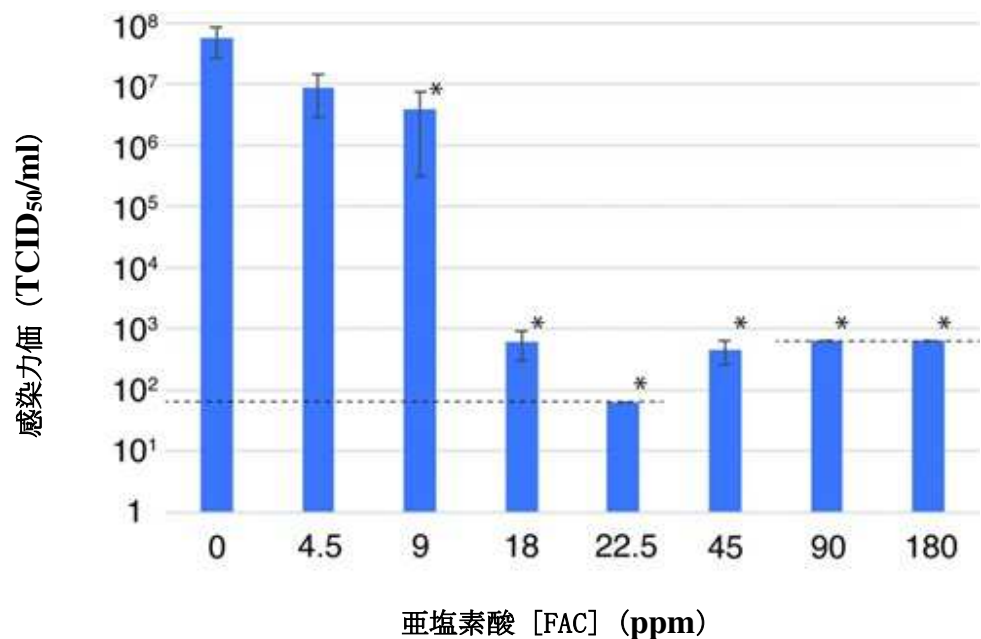


図 1. 亜塩素酸水による SARS-CoV-2 の不活化。 ウイルスを濃度の異なる亜塩素酸水と 10 分間培養し、塩素イオンの反応をチオ硫酸ナトリウムで停止した後、TCID₅₀ 法で感染力価を測定した。反応液中の最終濃度をグラフに示す。点線は亜塩素酸水の細胞毒性による感染力価アッセイの検出限界を示す。実験は 3 回実施し、エラーバーが標準誤差を示す。* : P < 0.05、マン・ホイットニーの U 検定、0 ppm (水) と比較。

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288634.g001>

図1に示した亜塩素酸水中の塩素濃度と感染力価の減少は、塩素イオンのような経時的に効力が蓄積する因子をモデル化するために設計された Chick-Watson モデルによって近似された[20]。

式中の係数 k と n を計算し、近似曲線を描いた (図 2A、表 S1)。この近似値に基づき、10 分間の反応で感染力価を 50%、99%、99.99% に低下させる亜塩素酸水の濃度を導出した (表 1)。

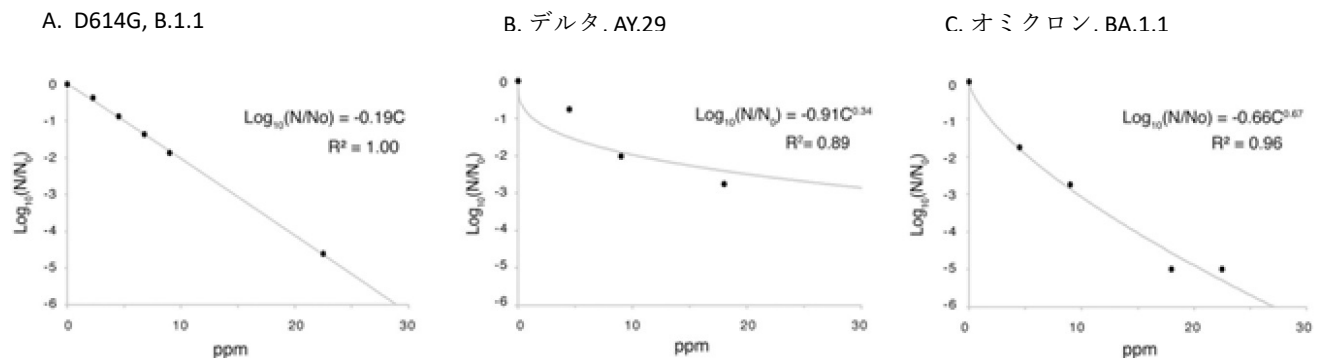


図 2. 亜塩素酸水による SARS-CoV-2 の不活化。 (A) D614G、系統 B.1.1、(B) デルタ変異株、系統 AY.29、(C) オミクロン変異株、系統 BA.1.1。ウイルスを濃度の異なる亜塩素酸水と 10 分間培養し、塩素イオン反応をチオ硫酸ナトリウムで停止した後、TCID₅₀法で感染力価を測定した。測定を行い、Chick-Watson モデルに基づく近似式に当てはめた。近似式と R² 値をグラフに示す。R²: 決定係数、Log₁₀(N/N₀): 生存率の対数減少。

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288634.g002>

表 1. 亜塩素酸水による SARS-CoV-2 変異株の不活化濃度。

ウイルス	不活化濃度 (ppm)		
	50% 不活化	99% 不活化	99.99% 不活化
	(IC ₅₀)	(IC ₉₉)	(IC _{99.99})
D614G, B.1.1	1.5	9.9	19
デルタ, AY.29	1.8	12	23
オミクロン, BA.1.1	0.31	5.3	14

図 2 と表 S1 より、SARS-CoV-2 変異体を亜塩素酸水と 10 分間反応させた場合、50%、99%、99.99% の SARS-CoV-2 を不活化する濃度を Chick-Watson モデルに基づいて計算した。

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288634.t001>

亜塩素酸水によってウイルスが 50% 不活化される濃度 (IC₅₀) は 1.5 ppm で、ウイルスが 1% (99% 不活化) される濃度 (IC₉₉) は 9.9 ppm、ウイルスが 0.01% (99.99% 不活化) される濃度 (IC_{99.99}) は 19 ppm であった。これは、亜塩素酸水が SARS-CoV-2 を大幅に不活化する可能性があることを示している。

SARS-CoV-2 デルタおよびオミクロン変異株に対する亜塩素酸水の効果

これまでに実施されたテストでは、SARS-CoV-2のいわゆるヨーロッパ変異株 D614G (B.1.1) を使用してきた。だが、より高い感染伝播効率を持ち、これまで日本で広がってきた主な変異株であるデルタ変異株 (AY.29) とオミクロン変異株 (BA.1.1) もまた考慮した。様々な濃度の亜塩素酸水で感染力価を測定した結果を、Chick-Watson モデルに当てはめた (図 2B および 2C、表 S1)。デルタ変異株の亜塩素酸水の IC₉₉ は 12 ppm、オミクロン変異株の亜塩素酸水の IC₉₉ は 5.3 ppm で、D614G 変異株の 9.9 ppm と比較的近い値であったことから、両者に同等の効果があらわることが示唆された (表 1)。

ウイルス精製

インフルエンザウイルスや SARS-CoV-2 のように出芽しやすいウイルスの場合、DMEM などの培養液由来のアミノ酸を含む感染細胞培養上清をウイルス液として使用するのが一般的である。一方、ネコカリシウイルス、ポリオウイルス、ヒトノロウイルスに対する亜塩素酸水の効果は、併存するタンパク質やアミノ酸に大きく影響されることが指摘されている[12、13、15]。そこで、SARS-CoV-2 に対する亜塩素酸の本来の効果を確認するため、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法と超遠心分離法の 2 つの方法でウイルスを精製および濃縮した。

精製ウイルス粒子のポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 分析では、培養細胞で増殖させ、限外濾過膜ユニット (Amicon Ultra-15 フィルターユニット、MWCO 100kDa) で同レベルまで濃縮した感染上清中に、細胞由来と思われるタンパク質が検出された (図 3A)。PEG 沈殿により、顕著なタンパク質は除去されたが、他の細胞由来タンパク質の多くのバンドが観察された。超遠心分離では、ほとんどの細胞タンパク質が除去されたようである (図 3A)。

電子顕微鏡 (図 3B) によると、PEG 沈殿では、背景にビリオン以外の物質が見えるが、多くのウイルス粒子も観察された。一方、超遠心分離により精製したサンプルでは、背景にはビリオン以外の物質はほとんど見られなかったが、破壊されたと思われる粒子が多数観察された。顕微鏡写真上で形態学的に無傷の粒子と破壊された粒子を数えることにより、超遠心分離法によってウイルスの約 50% が破壊されたことが分かった。対照的に、PEG 沈殿ではウイルスの約 3% しか破壊されなかった (図 3C、表 S2)。これらの形態学的変化のすべてが感染力の低下と関連しているとは言えないが、実際に関連していると考えられている。

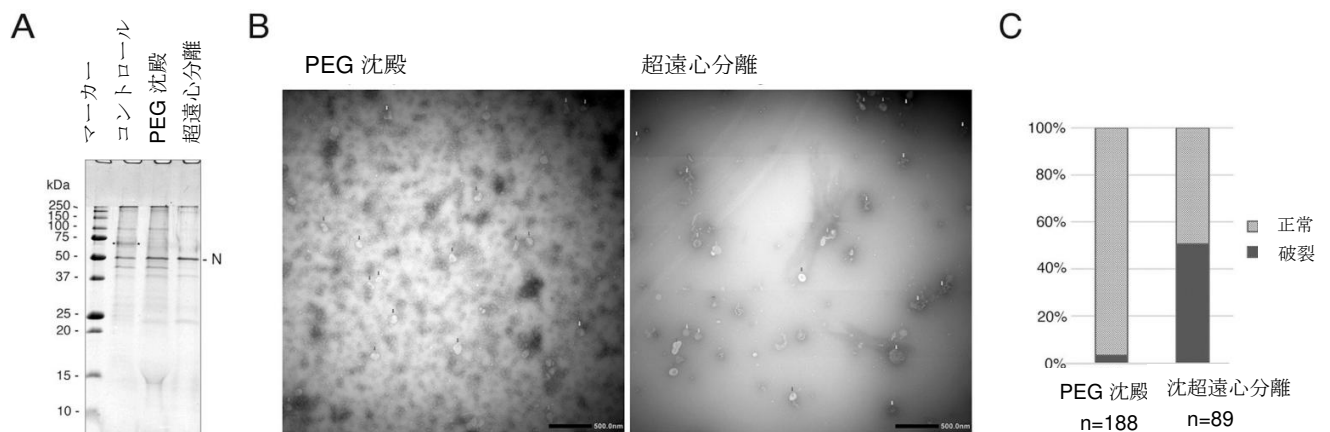


図 3. PEG 精製および超遠心分離したウイルスの分析。 (A) SDS-PAGE 分析。濃縮 (Amicon Ultra-15 フィルターユニットで濃縮、MWCO 100kDa) 後の同量のウイルス (レーン「コントロール (control)」)、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿させたウイルス、超遠心分離で沈殿させたウイルスを SDS-PAGE とクーマシーブリリアントブルー染色で分析した。考えられる主要な細胞タンパク質バンドを星印で示す。SARS-CoV-2 N タンパク質の位置を示す。(B) 電子顕微鏡。SARS-CoV-2 は、PEG 沈殿または超遠心分離によって精製および濃縮し、ネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡で観察した。赤い矢印は比較的無傷なウイルス粒子を示し、黄色の矢印は破壊されたウイルス粒子を示す。(C) B における見かけの無傷ウイルスと破壊されたウイルスの比率を示すグラフ。

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288634.g003>

PEG 沈殿法の場合、濃縮後の総感染力価は濃縮前の約半分であり、ウイルス濃縮による感染力価の低下は僅かであった。一方、超遠心法では力価が約 1/30 に減少した (表 2)。

上記の結果は、PEG 沈殿ではタンパク質を完全に除去するわけではないが、ウイルス感染力価をほとんど損失することなく濃縮できることを示している。一方、超遠心分離法では、異種タンパク質はほぼ完全に除去されたが、ウイルスの損傷が激しく、感染力価が大幅に低下した。

亜塩素酸水による精製 SARS-CoV-2 の不活化

PEG 精製ウイルスと超遠心分離精製ウイルスの両方に対する亜塩素酸水の効果を調べた：PEG 精製ウイルスは感染力価が高いので、PBS で 10 倍に希釈し、残存する汚染物質の希釈を期待した。これらのウイルスに対する亜塩素酸水の効果は非常に強く、試薬を大幅に希釈する必要があり、再現性が難しくなると考えた。そこで、反応時間を 10 分から 1 分に短縮した (図 4A および 4B、表 S1)。PEG 精製ウイルスおよび超遠心分離精製ウイルスの IC₉₉ 値は、それぞれ 0.41 ppm および 0.74 ppm と計算された (表 3)。IC₉₉ 値を 10 分間の反応と仮定して再計算すると、それぞれ 0.051 ppm と 0.007 ppm となり、未精製のウイルスを使用した場合と比較して、有効性が約 200 倍に増強することが示された (表 3)。これは、亜塩素酸水が SARS-CoV-2 を不活化する非常に強力な能力を持っていることを示している。しかし、従来の方法で調製したウイルスの場合、培地中のアミノ酸や培養細胞由来と思われる異物によ

り、亜塩素酸の効果が弱まることがある。従って、ウイルスを精製することによって、本来の強力な不活化能力を評価できると考えられる。

表 2. PEG 沈殿ウイルスおよび超遠心分離ウイルスの感染力価。

	感染力価	容量 (ml)	総感染力価	総感染力価の比率
	(TCID ₅₀ /ml)		(TCID ₅₀)	
濃縮前	6.3 x 10 ⁷	21	1.3 x 10 ⁹	1
PEG 沈殿による濃縮	6.3 x 10 ⁸	1	6.3 x 10 ⁸	0.48
	感染力価	容量 (ml)	総感染力価	総感染力価の比率
	(TCID ₅₀ /ml)		(TCID ₅₀)	
濃縮前	6.3 x 10 ⁷	21	1.3 x 10 ⁹	1
超遠心分離による濃縮	3.6 x 10 ⁷	1	3.6 x 10 ⁷	0.03

SARS-CoV-2 はポリエチレングリコール (PEG) 沈殿または超遠心分離により精製および濃縮した。感染力価、容量、総感染力価およびその比率を表に示す。

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288634.t002>

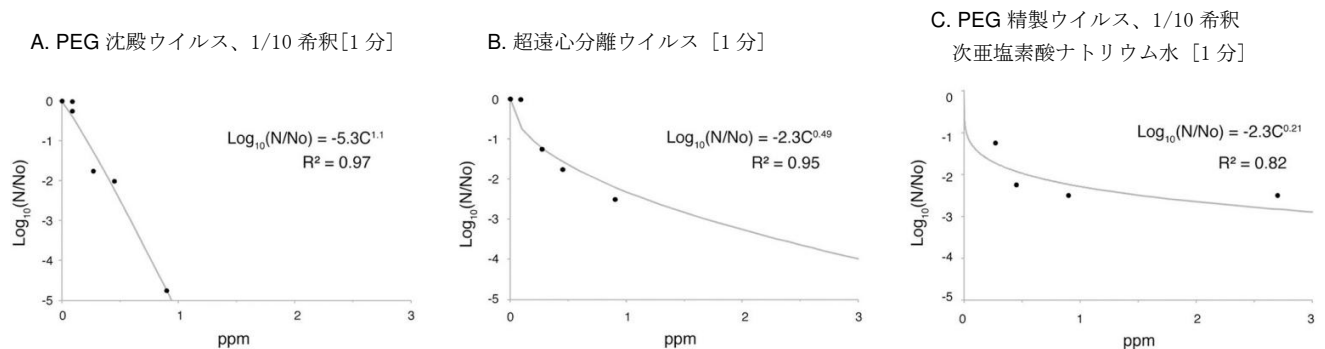


図 4. 塩素試薬による PEG 精製および超遠心分離 SARS-CoV-2 の不活化。1/10 希釈した PEG 精製ウイルス (A) および超遠心分離ウイルス (B) を濃度の異なる亜塩素酸水と培養した。(C) 1/10 希釈の PEG 沈殿 SARS-CoV-2 を次亜塩素酸ナトリウム水溶液と培養した。ウイルスと塩素試薬の培養時間は 1 分で、感染力価は TCID₅₀ 法で測定した。測定を行い、Chick-Watson モデルに基づく近似式に当てはめた。近似式および R² 値をグラフに示す。R²: 決定係数、Log₁₀(N/N₀): 生存率の対数減少。

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288634.g004>

精製 SARS-CoV-2 に対する次亜塩素酸ナトリウムの効果

PEG で精製した SARS-CoV-2 に対する亜塩素酸水の高い不活化効果が塩素系消毒剤に共通するものかどうかを確認するため、広く使用されている次亜塩素酸ナトリウム水溶液の効果調べた (図 4C、表 S1)。次亜塩素酸ナトリウム水溶液を調製し、遊離有効塩素 (FAC) 濃度を合わせて試験した。その結果、PEG 精製ウイルスに対する次亜塩素酸ナトリウム水溶液の IC₉₉ 値は 1 分間暴露で 0.54 ppm であり、亜塩素酸水とほぼ同等の SARS-CoV-2 不活化能力を示した (表 3)。これらの結果から、高いウイルス不活化効果は塩素イオンの作用によるものと推測される。

表 3. PEG 精製 SARS-CoV-2 の亜塩素酸水によるタンパク質負荷下での不活化濃度。

ウイルス	試薬	不活化濃度 (ppm)		
		50% 不活化	99% 不活化	99.99% 不活化
		(IC ₅₀)	(IC ₉₉)	(IC _{99.99})
PEG 精製ウイルス、1/10 希釈	亜塩素酸水	0.073 [1 min]	0.41 [1 min]	0.77 [1 min]
		0.0091 [10 min]	0.051 [10 min]	0.095 [10 min]
超遠心分離精製ウイルス	亜塩素酸水	0.016 [1 min]	0.74 [1 min]	3.0 [1 min]
PEG 精製ウイルス、1/10 希釈	亜塩素酸水+ 0.03% BSA	3.3 x 10 ⁻⁵ [10 min]	0.31 [10 min]	21 [10 min]
PEG 精製ウイルス、1/10 希釈	亜塩素酸水 + 0.3% SRBCs, 0.3% BSA	1.0 [10 min]	5.3 [10 min]	14 [10 min]
PEG 精製ウイルス、1/10 希釈	亜塩素酸水+ 0.5% PP	18 [10 min]	76 [10 min]	128 [10 min]
PEG 精製ウイルス、1/10 希釈	亜塩素酸水 + 5% FBS	7.5 x 10 ⁻³ [10 min]	11 [10 min]	158 [10 min]
PEG 精製ウイルス、1/10 希釈	次亜塩素酸ナトリウム水	7.7 x 10 ⁻⁵ [1 min]	0.54 [1 min]	14 [1 min]

B 図 4 と S1 表に基づいて、タンパク質の負荷ありとなしの場合について、ウイルスを亜塩素酸水と 10 分間反応させた場合の Chick-Watson モデルに基づき、1/10 希釈 PEG 精製 SARS-CoV-2 を 50%、99% または 99.99% 不活化する濃度を計算した。1 分間反応の場合は表に示し、1/10 希釈 PEG 精製ウイルスと亜塩素酸水の場合は 10 分反応を想定した IC₅₀、IC₉₉ および IC_{99.99} の値を示した。BSA : ウシ血清アルブミン、SRBCs : ヒツジ赤血球、PP : ポリペプトン、FBS : ウシ胎児血清。

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288634.t003>

タンパク質負荷条件下での精製 SARS-CoV-2 に対する亜塩素酸水の効果

精製ウイルス中のタンパク質の共存が亜塩素酸水によるウイルスの不活化に影響するかどうかを調べるため、PEG 精製ウイルスを用いてタンパク質負荷実験を行った。0.3% のヒツジ赤血球 (SRBCs) + 0.3% のウシ血清アルブミン (BSA) または 0.03% の BSA は血液による検体の汚染を示し[21]、0.5% のポリペプトン (PP) は嘔吐物による汚染を示すと想定されている[22]。さらに、唾液に含まれるタンパク質の濃度は 0.67~2.37mg/ml であり[23]、これを同等のタンパク質濃度の 5% FBS で代用した[24]。

上記の各タンパク質負荷に対する亜塩素酸水の効果について近似曲線を作成し、不活化濃度を算出した (図 5、表 3、表 S1)。0.03% BSA を添加した場合、IC₉₉ は 0.31 ppm、0.3% SRBC + 0.3% BSA の場合、IC₉₉ は 5.3 ppm となり、亜塩素酸水単独 (IC₉₉=0.051) に比べて不活化効果が劣ることがわかった。5% FBS の場合、IC₉₉ は 11 ppm であった。0.5% の PP を添加した場合は 76 ppm とさらに高く、亜塩素酸水のみを使用した場合に比べて 1500 倍以上強く不活化された (表 3)。

使用した塩素系消毒剤の pH

亜塩素酸水 (HClO_2) 及び次亜塩素酸ナトリウム水 (NaClO) の両方で、pH が極端に低い場合もあれば、高い場合もある。そこで、本研究で使用したこれらの塩素系消毒剤の pH を測定した。亜塩素酸水の pH は、20 ppm で 5.67 ± 0.11 (平均 \pm 標準誤差、 $n = 3$) および 200 ppm で 5.53 ± 0.07 であった。一方、次亜塩素酸ナトリウム水の pH は 20 ppm では 7.63 ± 0.02 および 200 ppm では 8.51 ± 0.04 であった。これらの pH 値は、それぞれ酸性とアルカリ性であることを示している。

pH 値が 4 未満または 11 を超えるような過度の酸性およびアルカリ性は、SARS-CoV-2 に対して重要な抗ウイルス効果を持つ可能性が指摘されている[9]。しかし、この研究で使用された消毒剤は、そのような極端な pH レベルではない。したがって、1 分や 10 分といった比較的短い反応時間では、pH によるウイルス感染力価の低下は可能性が低いと考えられる。

議論

本研究では、精製および濃縮したウイルス粒子を用いて、亜塩素酸水の SARS-CoV-2 に対する高い殺ウイルス能力を実証した。1 分間の反応後の亜塩素酸水の IC_{99} 値は、PEG 精製ウイルスで 0.41 ppm、超遠心分離精製ウイルスで 0.74 ppm であった。さらに、PEG 精製ウイルスに次亜塩素酸ナトリウム水溶液を使用した場合、 IC_{99} は 0.54 ppm [1 分] であり、ほぼ同様の有効性を示した。畑中ら[8]は、亜塩素酸水 1 ppm と 10 秒間の反応で、SARS-CoV-2 の感染力価が約 1/100 に低下したことを報告している。彼らはまた PEG 精製ウイルスも使用しているが、我々の研究結果も彼らの所見とほぼ一致しており、塩素イオンは一貫して SARS-CoV-2 に対して高い不活化能力を示している。

通常、SARS-CoV-2 のように容易に発芽するウイルスの場合、精製せずに感染細胞の上清を試験ウイルスとして使用する。我々は最初、標準的な手順に従って、感染した培養上清 (無血清) を試験ウイルスとして使用した。しかし、この場合、亜塩素酸水の IC_{99} は 9.9 ppm であり、精製ウイルス粒子を使用した場合に比べて約 1/200 の効力であった。培養上清の SDS-PAGE 分析から、分子量約 70 kDa のタンパク質など、細胞由来と思われるタンパク質が見出された (図 3A)。さらに、培地中に元々存在するアミノ酸が亜塩素酸水の効力を弱めたのかもしれない。つまり、亜塩素酸水の効果を正確に評価するためには、高度に精製されたウイルス粒子を使用する必要がある。

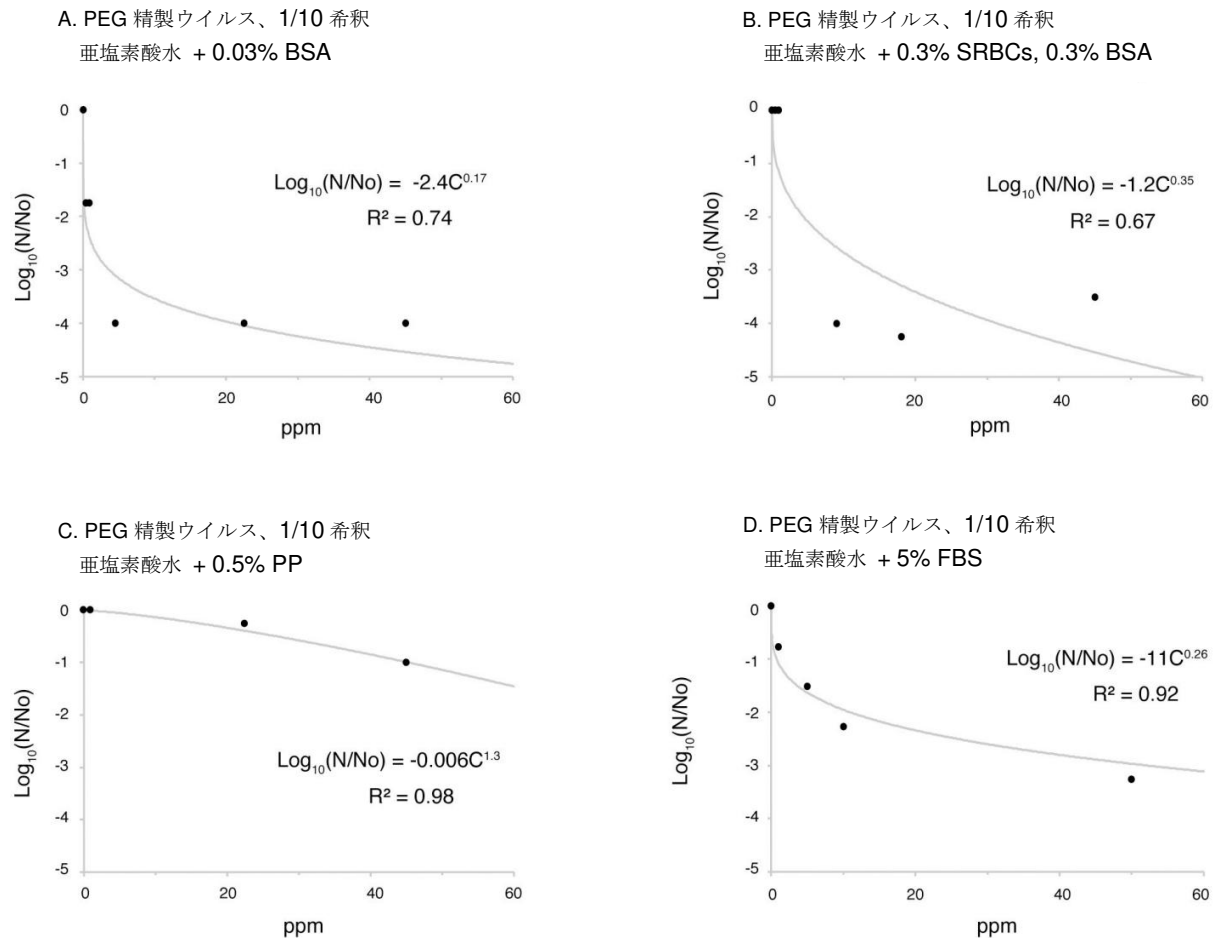


図 5. 様々なタンパク質負荷下での亜塩素酸水による PEG 精製 SARS-CoV-2 の不活化。 1/10 に希釈した PEG 沈殿 SARS-CoV-2 を、0.03% ウシ血清アルブミン(BSA) (A)、0.3% ヒツジ赤血球(SRBCs) + 0.3% BSA (B)、0.5% ポリペプトン(PP) (C)、および 5% ウシ胎児血清(FBS) とともに亜塩素酸水と培養した。ウイルスと亜塩素酸水の培養時間は 10 分間で、感染力価は TCID₅₀ 法で評価した。測定後、Chick-Watson モデルに基づく近似式に当てはめた。近似式および R² 値をグラフに表示する。R² : 決定係数、Log₁₀(N/N₀) : 生存率の対数減少。

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288634.g005>

SARS-CoV-2 の不活化能力はタンパク質の存在によって大きく影響された。嘔吐物による汚染をシミュレートした 0.5% の PP 負荷では、IC₉₉ は 76 ppm (約 1,500 倍) まで増加し、その効力は大幅に低下した。5% FBS を含む唾液をシミュレートした条件では、IC₉₉ は 11 ppm (約 220 倍) であったが、0.3% SRBCs + 0.3% BSA による血液汚染では IC₉₉ は 5.3 ppm (約 100 倍)、0.03% BSA では IC₉₉ は 0.31 ppm (約 6 倍) であった。0.5% の PP 負荷は、特に亜塩素酸水の効力を不活化する傾向があった。この違いは、添加したタンパク質の量の違いによるものとも考えられるが、一方で、過去にアミノ酸を過剰に添加した実験では、亜塩素酸水中のシステインとヒスチジンによってウイルスが特異的に不活化されることが明らかになっており

[15]、この違いはPP、BSA および SRBCs の表面にあるアミノ酸の種類によるものとも考えられる。

実際の用途では、亜塩素酸水は一般的に 200 ppm などの高濃度で消毒に使用される。したがって、PP 負荷 0.5% という最も厳しい条件下でも、SARS-CoV-2 を十分に不活化することができ、亜塩素酸水はウイルスに対して顕著な消毒能力を有すると考えられる。

この研究では、亜塩素酸水がデルタ変異株およびオミクロン変異株を含む SARS-CoV-2 に対して高い不活化能力を示した。さらに、厚生労働省が食品添加物として認可していることからわかるように、亜塩素酸水は毒性が低く [14]、塩素イオンが数時間かけて徐々に消失するため安全であると考えられている [12]。従って、本研究の結果は、亜塩素酸水が SARS-CoV-2 に対する消毒剤として有効であり、公共施設や医療施設での使用に適している可能性を示している。今後は、金属の腐食などの潜在的な問題に注意しながら、実際の環境での消毒効果を検証する必要がある [25]。

補足情報

表 S1. Chick-Watson モデルに基づくパラメータ。 試薬濃度とウイルス増殖阻害の結果を Chick-Watson モデルに当てはめ、速度定数 (k) と希釈係数 (n) を算出した。数値は「 $\text{平均値} \pm \text{標準偏差}$ 」の形で示す。決定係数 (R^2) も算出した。1 分間反応の場合は、表に示す。

(DOCX)

表 S2. PEG 沈殿および超遠心分離で濃縮したウイルスの電子顕微鏡による、明らかに無傷な粒子および破壊された粒子の数。

(DOCX)

S1 生画像。 図 3A および 3B のオリジナル画像と、図 3C の計数用ソース画像。

(PDF)

謝辞

貴重な議論をしていただいた桑原知巳博士および小山一博士に感謝する。また、細胞培養と原稿の準備について吉元玲子氏および平川里絵氏に感謝する。また、透写型電子顕微鏡を使用させていただいた広島大学ライフサイエンス機器分析室のスタッフの方々に感謝する。

著者の寄与

概念化: 坂口剛正

データキュレーション: 小田康祐、黒瀬美羽子、秋田智之、田中純子、坂口剛正

資金調達: 田中純子、坂口剛正

調査: Basirat Mojisola Lawal-Ayinde、森田智子、Tanuza Nazmul、野村俊仁

方法論 : 秋田智之、田中純子

プロジェクト管理 : 坂口剛正

リソース : 堀内功典、合田学剛、坂口剛正

監修 : 坂口剛正

検証 : 坂口剛正

視覚化 : 山本旭麻、東浦彰史

執筆-原案 : Basirat Mojisola Lawal-Ayinde, 坂口剛正

執筆-レビューと編集 : Kosuke Oda, 坂口剛正