

厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
(分担) 研究年度終了報告書
動的光散乱法解析による候補物資の選抜に関する研究

研究代表者 花木 賢一 国立感染症研究所安全実験管理部長

動的光散乱法は溶液中のナノメートルサイズの微粒子を計測する技術で、マウスコロナウイルスをモデルウイルスとして新型コロナウイルスの消毒に有効な薬剤を0.3%ウシ血清アルブミン存在下で1分間反応させてスクリーニングを行った。そして、薬剤等の未処理条件の粒径に近い粒子の消失を以てウイルスは不活化された=有効と判定した。その結果、第四級アンモニウム塩では0.0625%以上の塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、及びドミフェンブロミドが有効であったが、0.5%塩化セチルピリジニウムは無効であった。また、0.425%加速化過酸化水素は有効であったが、1.5%過酸化水素水、0.5%直鎖アルキルベンゼンシルホン酸ナトリウムは無効であった。

A. 研究目的

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) のパンデミックにより消毒薬の一般需要が急増し、2020 年はアルコール製剤をはじめとする消毒薬の供給不足が社会問題となった。その後、消毒薬として使用可能なアルコールの供給増加と独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) が新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に対する代替消毒方法の有効性評価を実施し、家庭用洗剤に含まれる界面活性剤、次亜塩素酸水等の有効性を公表したことで消毒薬の供給不足という社会問題は一段落した。しかし、NITE の検証した物資は医療で常用される消毒薬と生体に用いる薬剤等は対象外としていた。そのため、未評価の薬剤等が多数残された。また、有効性評価は培養上清のウイルス力価測定またはウイルスゲノム量の増加の有無で判定しており、判定には3~5日要することから限定的な条件で評価が行われた。

動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering:

DLS) は、溶液中のナノメートルサイズの微粒子を計測することができる実用的かつ品質マネジメントシステムに関する国際規格 ISO 22412:2017 に記載された簡便な手法である。その原理は、溶液中における粒子の運動速度を計測し、そのデータから各種の数値計算を利用して大きさに換算するというものである。そのため、ウイルスの形態を変化させることでウイルスを不活化させる物資であれば、DLS 解析により物資のスクリーニングが可能と考えられる。そこで、本研究では DLS 解析によるコロナウイルスの粒径測定条件の決定、コロナウイルスの形態変化を引き起こすことが期待される第四級アンモニウム塩 (QAC) のスクリーニング、合わせてダイヤモンドプリンセス号の消毒に用いられた加速化過酸化水素 (APH) とその主たる構成成分である過酸化水素を対象とした。

B. 研究方法

① 候補物資

QAC として塩化ベンザルコニウム (Benzalkonium Chloride, BZC; Sigma-Aldrich)、塩化ベンゼトニウム (Benzethonium Chloride, BZN; 富士フィルム和光純薬)、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム・クロリド [別名: 塩化セチルピリジニウム; Cetylpyridinium chloride, CPC; 富士フィルム和光純薬]、ドミフェンブロミド (Domiphen bromide, DB; Sigma-Aldrich) の4種を用いた。また、衣料用合成洗剤に含まれる界面活性剤として直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (Sodium linear-Alkylbenzenesulfonate, SLA; 富士フィルム和光純薬)、加速化過酸化水素 (AHP) として4.25%のAHPを含有するオキシヴィルファイブ (シーバイエス)、過酸化水素 (Hydrogen Peroxide Solution, HP) として約3w/v%のHPを含有する日本薬局方オキシドール (健栄製薬) を用いた。界面活性剤は精製水に溶解して希釈列を調製し、AHPとHPはウイルス液への添加容量を変えることで終濃度を調整した。

② ウイルス

マウスコロナウイルス (Mouse Hepatitis Virus, MHV) はJHM, F-2D, NuA, Sの4株を用いた。ウイルス培養にはDBT細胞を用い、細胞はウイルス接種後にウシ胎子血清及び Tryptose Phosphate Broth (TPB, Difco) を含まないEMEMで37°C, 5%CO₂下で二晩培養した。培養上清は1,500 ×g, 5分間の遠心により細胞残渣を除去し、0.22

μm 遠心式フィルターユニット (Ultrafree-MC, Millipore) でろ過して-80°Cに保存した。感染価はウイルス液の10倍希釈系列を作製して96ウェルプレートに播種したDBT細胞へ接種し、TCID₅₀を求めた。

③ DLS 解析

DLS 解析は粒子径・ゼータ電位測定装置 Zetasizer Ultra (Malvern) により実施した。試料合計1mlを12mm角ポリスチレンセルに入れてストッパーで密封し、セルホルダーにセットした後に多角度動的光散乱法により測定した。候補物資のスクリーニングでは、セルに0.9mlの0.3%BSA加ウイルス液 (ウイルス液:3%BSA:PBS=0.05ml:0.1ml:0.75ml) を入れ、DLS解析を行う直前に0.1mlの候補物資溶液を加えて軽くピペッティングし、1分間静置した後に測定を行った。

C. 研究結果

① ウイルス及び溶媒の選定

MHV-JHM, MHV-F-2D, MHV-NuA, MHV-SそれぞれをPBSで1:19に希釈してDLS解析を行った結果、粒径分布に差がみられた。比較的均一であったのはMHV-F-2Dで、希釈前のMHV-F-2D溶液の感染価は 6.2×10^6 TCID₅₀/mlであった。なお、DBT細胞でMHVを培養する場合には無血清・10%TPB加EMEMを用いるが、TPB加EMEMでは非特異的な粒径のピークが認められたことから、EMEMのみでMHVの培養を行った [データ未収載]。次に、溶媒の検討をPBSと精製水 (DW) について行った [図1]。

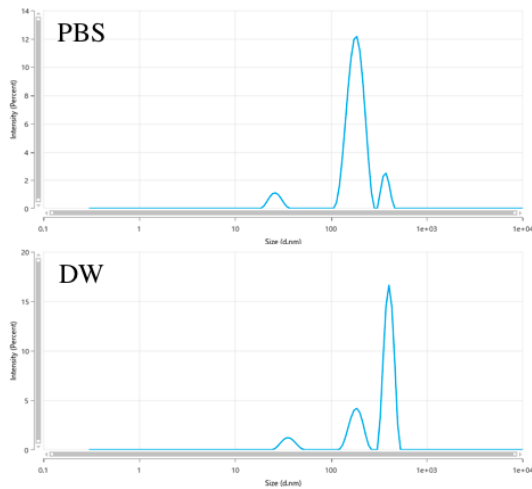


図1 PBSまたは精製水におけるMHVの粒径分布
 PBSでは主たるピーク(86.0%)の粒径は ϕ 182.1nmであったが、DWでは主たるピーク(69.5%)は ϕ 402.6nmであった。MHVの粒径は ϕ 80-169nmとされており(Homberger, F.R. 1997. Lab Anim. 31:97-115)、その粒径に近似するPBSを溶媒として選択した。

次に、ウイルス液に負荷物質として0.3% BSA存在下、2倍希釈列のBZNを添加して室温1分間後、DLS解析を行った[図2]。0.3% BSAは「環境消毒薬の評価指針2020」(一般社団法人日本環境感染学会)に記載された清浄条件の10倍濃度である。それぞれの主たるピークはBZNが0.5%の時 ϕ 1,237nm(69.0%)かつ ϕ 80~200nmにはピークを認めず(最小粒径のピークは ϕ 425.3nm)、0.25%の時 ϕ 1,100nm(91.8%)かつ ϕ 80~200nmにはピークを認めず(最小粒径のピークは ϕ 752.4nm)、0.125%の時 ϕ 1,121nm(77.5%)かつ ϕ 80~200nmにはピークを認めず(最小粒径のピークは ϕ 748.6nm)、0.0625%の時 ϕ 1,064nm

(39.4%)かつ ϕ 80~200nmにはピークを認めず(最小粒径のピークは ϕ 423.5nm)、

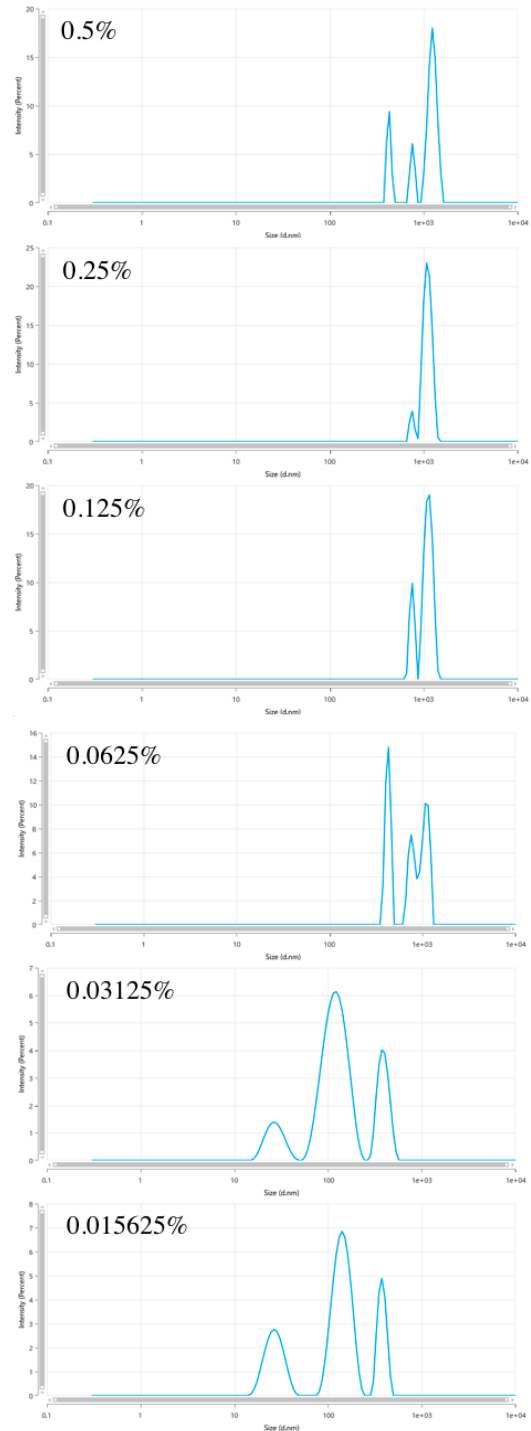


図2 BZN処理によるMHVの粒径分布

0.03125%の時 $\phi 121.9\text{nm}$ (67.0%) と $\phi 80\sim 200\text{nm}$ にピークを認め、0.015625%の時 $\phi 142.0\text{nm}$ (56.7%) と $\phi 80\sim 200\text{nm}$ にピークを認めた。この結果より 0.0625%以上の BZN でウイルス粒子は完全に破壊され、0.03125%以下ではウイルス粒子は形態を保持すると考えられた。

BZC についても同様の解析を行い、0.0625%の時に主たるピークは $\phi 774.6\text{nm}$ (52.8%) かつ $\phi 80\sim 200\text{nm}$ にはピークを認めず (最小粒径のピークは $\phi 425.8\text{nm}$)、0.03125%の時に主たるピークは $\phi 116.7\text{nm}$ (35.2%) と $\phi 80\sim 200\text{nm}$ にピークを認めた [図 3]。この結果より BZC もまた 0.0625%以上の濃度でウイルス粒子は完全に破壊され、0.03125%以下ではウイルス粒子は形態を保持すると考えられた。

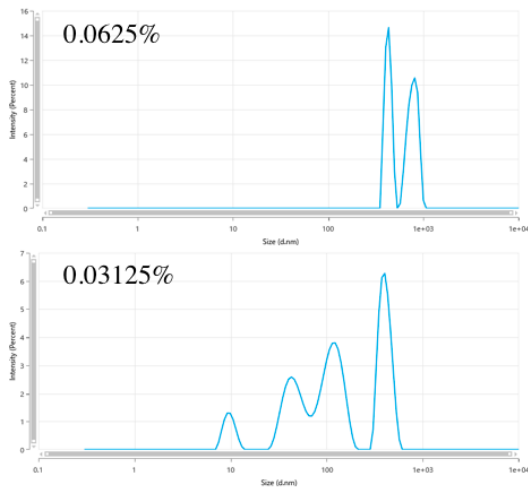


図 3 BZC 処理による MHV の粒径分布

DB についても同様の解析を行い、0.0625%の時に主たるピークは $\phi 1,115\text{nm}$ (49.5%) かつ $\phi 80\sim 200\text{nm}$ にはピークを認めず (最小粒径のピークは $\phi 430.6\text{nm}$)、0.03125%の時に主たるピークは $\phi 185.7\text{nm}$ (98.7%)

と $\phi 80\sim 200\text{nm}$ にピークを認めた [図 4]。この結果より DB も BZN、BZC と同様に 0.0625%以上の濃度でウイルス粒子は破壊され、0.03125%以下ではウイルス粒子は形態を保持すると考えられた。

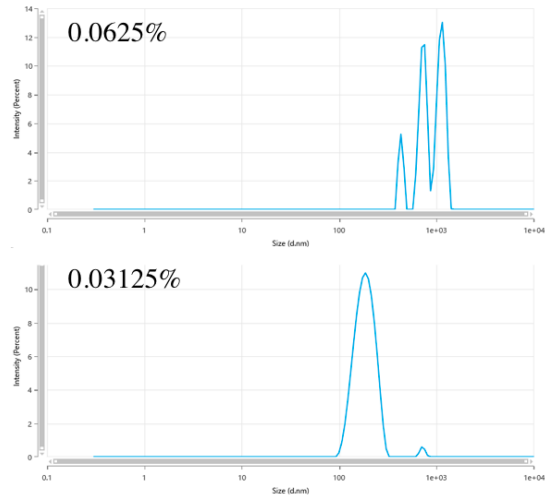


図 4 DB 処理による MHV の粒径分布

一方、CPC [図 5] と SLA [図 6] では 0.5%でも $\phi 80\sim 200\text{nm}$ にピークを認めた。

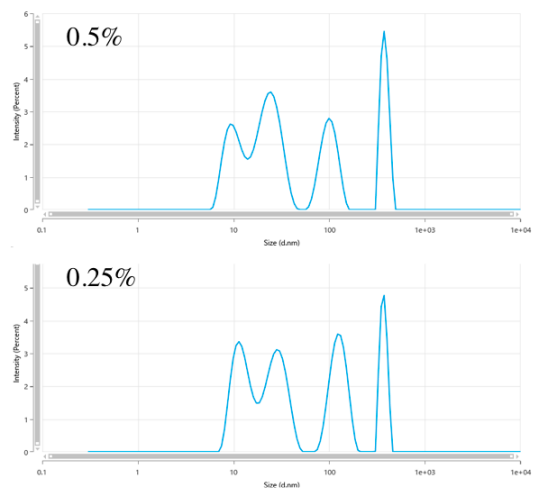


図 5 CPC 処理による MHV の粒径分布

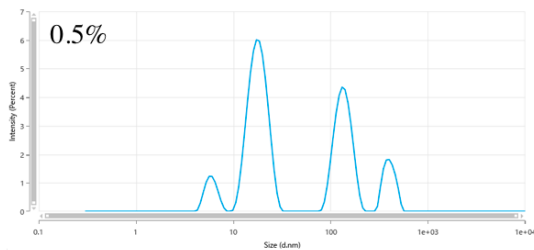


図6 SLA 処理による MHV の粒径分布

AHP は DW で希釈するのみで発泡するため、それにより効力が失われると推定し、ウイルス液と AHP の混合比を変えて評価を行った (1/10 AHP, ウイルス液 : AHP=9 : 1 ; 1/20 AHP, ウイルス液 : AHP=19 : 1 ; 1/40 AHP, ウイルス液 : AHP=39 : 1)。DLS 解析結果を図 7 に示す。

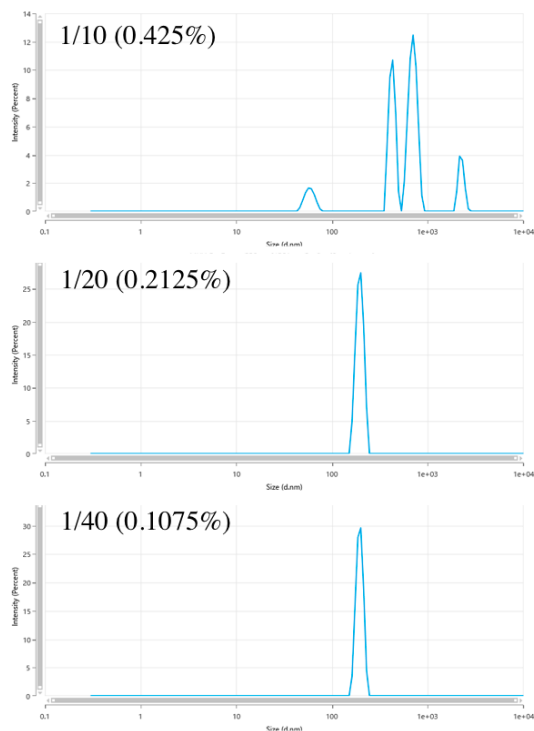


図7 AHP 処理による MHV の粒径分布

1/10 AHP の時に主たるピークは $\phi 699.8\text{nm}$ (48.9%) かつ $\phi 80\sim 200\text{nm}$ にはピークを認めず (80nm 以上の最小粒径

のピークは $\phi 424\text{nm}$; 80nm 未満で認める粒径のピークは $\phi 60.8\text{nm}$)、1/20 および 1/40 AHP の時に認める単一のピークはそれぞれ 195nm (100%)、194.4nm (100%) で、いずれも $\phi 80\sim 200\text{nm}$ にピークを認めた。このことから AHP は 1/10 までの処理ではウイルス粒子を破壊し、1/20 以下ではウイルス粒子は保持されると考えられた。なお、約 1.5% 過酸化水素は主たるピークは $\phi 136.3\text{nm}$ (90.0%) と $\phi 80\sim 200\text{nm}$ にピークを認め、一部 (10%) の粒子が破壊されていると推察される結果であった[図 8]。

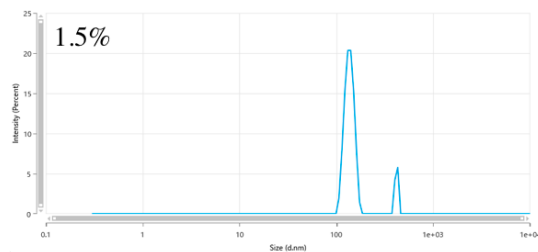


図8 過酸化水素処理による MHV の粒径分布

D. 考察

SARS-CoV-2 をはじめとするエンベロープウイルスは消毒薬等により容易に不活化できる微生物であり、界面活性剤が有効である。そして、QAC は米国環境保護庁が COVID-19 に有効として公表している消毒剤製品リスト N において、573 品目中 257 品目 (44.9%、2021 年 9 月現在) を占めることから取り上げた。また、日本では医薬品指定を受けていないが、AHP は米国 CDC が公表している「医療施設における消毒と滅菌のための CDC ガイドライン 2008」に収載されていることから雑品として取り上げた。

QAC は有機物存在下で効果が減弱する可能性が指摘されていることから(WHO 実験室バイオセーフティマニュアル第 4 版、付属書「除染と廃棄物管理」)、0.3% BSA を負荷して評価を行った。その結果、BZC と BZN は 0.0625% で有効、0.03125% で無効であった。この結果は NITE が公表した SARS-CoV-2 を不活化する有効濃度が 0.05% 以上であったとする報告によく近似していた。また、DB は口腔殺菌消毒剤(ドミフェン臭化物トローチ)として用いられているが、BZC、BZN と同様に 0.0625% で有効、0.03125% で無効であった。一方、CPC もまた口腔殺菌消毒剤(セチルピリジニウム塩化物トローチ)であるが、0.5% でもウイルス粒子を破壊するには不十分であった。なお、CPC の SARS-CoV-2 への有効性は購入元の富士フィルム和光純薬が 0.05% CPC 水溶液とウイルス液の混合比 1 : 9 で 15 秒作用させることで 99%、5 分作用させることで 99.99% 不活化できたと公表している (https://specchem-wako.fujifilm.com/jp/cpc/#disinfection_date)。この差違は有機物の負荷を行っているか否かに起因していると思われた。SLA については、NITE は 0.1% 以上で SARS-CoV-2 へ有効と公表したが、DLS 解析では 0.5% でも MHV を破壊できなかった。結果が異なる理由として、NITE の検証で用いられた SLA は日本石鹼洗剤工業会より提供を受けた実際の洗剤製品の原料であるのに対し、本研究で用いたのは試薬であるために同一品でない(C の数が異なる)可能性が考えられた。

AHP ではウイルス液に 1/10 容の AHP 原

液を加えた場合にのみ有効性が確認された。AHP は原液で使用する製剤であることから、実際の使用方法では終濃度が 10 倍に希釈されることはなく、十分な効果が発揮され则认为。一方、過酸化水素は約 1.5% でもウイルス粒子を破壊することができなかった。これは過酸化水素の作用時間が 1 分、測定時間を含めて 3 分と短く効果が発揮できなかったことが考えられる。なお、AHP には界面活性剤が含まれており、界面活性剤と過酸化水素との相乗効果によりウイルス粒子を破壊したと考えられるが、過酸化水素単独処理によりウイルス粒子を十分に破壊できるかは検討が必要である。

E. 結論

本研究では DLS 解析によりコロナウイルスをはじめとするエンベロープウイルスを不活化する界面活性剤のスクリーニングへ応用できることを明らかにした。特に、口腔殺菌消毒剤として使用される DB と CPC に有効性の顕著な差があることを明らかにしたことは、新しい知見である。DLS 解析は形態変化を伴うウイルス不活化の条件検討に有用であり、今後はどのような消毒、滅菌方法のスクリーニングへ応用を展開できるか検討していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

