

## 次亜塩素酸水の抗ウイルス効果の評価

金沢大学医薬保健研究域医学系  
ウイルス感染症制御学分野  
畢 袖晴、市村 宏

1. 目的：次亜塩素酸水の抗ウイルス効果を検証する。

### 2. 材料

1) 細胞：

- ① RD-SCARB2-2D4 (ヒトスカベンジ受容体 B2 発現の横紋筋肉腫細胞)
- ② MDCK (犬の腎臓細胞)

2) ウイルス：

- ① エンテロウイルス A71 (EVA-71：エンベロープ持たない RNA ウイルス、手足口病小児からの分離株)
- ② インフルエンザウイルス (PR8 株：エンベロープ持つ RNA ウイルス)

3) 次亜塩素酸水

商品名：次亜塩素酸水スーパーメディカルジア (濃度 80 ppm)、  
株式会社メディカルアート

### 3. 方法

#### 1) 次亜塩素酸水の抗 EVA-71 効果の検証

(2020. 7. 9-16、次亜塩素酸水 20200709 製造)

- 2020. 7. 9：RD-SACRB2 細胞 ( $1.6 \times 10^4$  個/100  $\mu$ L of DMEM with 5% Fetal Bovine Serum (FBS)) を 96-well plate の各 well に入れ、37°C 5% CO<sub>2</sub> で培養した。
- 2020. 7. 10：Milli Q 水で次亜塩素酸水を 2 倍 (40 ppm)、4 倍 (20 ppm) に希釈した。
- 各濃度に調整した次亜塩素酸水 (80 ppm, 40 ppm, 20 ppm, 0 ppm) 190  $\mu$ L に EVA-71 ウイルス液を 10  $\mu$ L ( $1.4 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>) を入れ、ピッペティングし、室温で 20 秒間または 1 分間反応させた。
- 次亜塩素酸水の中和処理：反応チューブに 1200  $\mu$ L の 0.01 M チオ硫酸ナトリウム溶液を添加し、ピッペティングする。反応液を 0.22  $\mu$ m フィルターでろ過した。
- 反応液の希釈：maintenance medium (2% FBS DMEM) を用いて反応液を  $10^{-1}$ ~ $10^{-5}$  に希釈した。
- 一晚培養した細胞の培養液を除去、50  $\mu$ L の maintenance medium を添加し、各希釈度の反応液 50  $\mu$ L/well を 4 wells に入れた。震盪攪拌後、37°C 5% CO<sub>2</sub> で 5

日間培養した。

- 2020.7.15：20  $\mu\text{L}$  の 3mg/ml MTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) を添加し、1 分間、震盪攪拌した後、37°C 5%  $\text{CO}_2$  で 20 時間以上培養した。
- 2020.7.16：各 well の吸光度 (波長 600 nm/660 nm) を測定し、ウイルスの  $\text{TCID}_{50}$  を計算した。 $\text{TCID}_{50}$  の減少の割合を次亜塩素酸水の抗ウイルス効果とした。

## 2) 次亜塩素酸水の抗 influenza A virus 効果の検証

(2020.8.21-25、次亜塩素酸水 2020.8.21 製造)

- 2020.8.21：MDCK 細胞 ( $1.0 \times 10^6$  個 in 2 ml of 4% FBS DMEM) を 6-well plate に入れ、37°C 5%  $\text{CO}_2$  で培養した。
- 2020.8.22、抗ウイルス反応：次亜塩素酸水 (80 ppm, 40 ppm, 20 ppm, 0 ppm) 190  $\mu\text{L}$  に influenza virus ウイルス液を 10  $\mu\text{L}$  ( $1.8 \times 10^5$  PFU (plaque forming unit)) を入れ、ピッペティングした後、室温で 20 秒間、または 1 分間反応させた。
- 反応チューブに 1200  $\mu\text{L}$  の 0.01 M チオ硫酸ナトリウム溶液を添加し、ピッペティングした後、反応液を 0.22  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過した。
- 反応液を DMEM を用いて  $10^{-1}$ ~ $10^{-4}$  に希釈した。
- 一晚培養した細胞の培養液を除去し、PBS(-) 2 ml で細胞を洗浄した。
- 各希釈度の反応液 100  $\mu\text{L}$  /well を 2 wells に添加、プレートを揺らして混和し、37°C 5%  $\text{CO}_2$  で 1 時間培養した。反応液を除去し、2 ml PBS(-) で一回洗浄した。
- 4 ml の 0.8% agarose maintenance medium (1x Vitamin, 0.2% albumin, 2.5  $\mu\text{g/ml}$  trypsin DMEM) を各 well に入れ、室温で約 10 分放置し、固相化した後、37°C 5%  $\text{CO}_2$  で 3 日培養した。
- 2020.8.25：2 ml の 5% glutaraldehyde in PBS(-) を各 well に入れ、室温で 1 時間固定した後、水洗しながら、寒天培地を取り除いた。
- 1-2 ml の 1% gentian violet を入れ、10 分間染色後、水洗し、室温で乾燥させた。
- 2020.8.26：プラーク数を数えた。プラーク数の減少の割合を次亜塩素酸水の抗ウイルス効果とした。

## 4. 結果

### 1) 次亜塩素酸水の抗 EVA71 効果

EVA-71 を 40 ppm 及び 80 ppm の次亜塩素酸水で 20 秒間または 1 分間処理することにより、EVA71 の増殖は 99.5% 以上抑制された。20 ppm の次亜塩素酸水で 20 秒間及び 1 分間処理することにより、EVA71 の増殖はそれぞれ 89.1% と 89.2% 抑制された。(表 1 および図 1)

表1 次亜塩素酸水の抗EVA71効果

次亜塩素酸水濃度	反応時間	ウイルス titer	抑制効果 (%)
		TCID <sub>50</sub> /ml	
80 ppm	20 秒	< 20	> 99.5
	1 分	< 20	> 99.6
40 ppm	20 秒	< 20	> 99.5
	1 分	< 20	> 99.6
20 ppm	20 秒	477	89.1
	1 分	580	89.2
0 ppm (水)	20 秒	4387	
	1 分	5378	

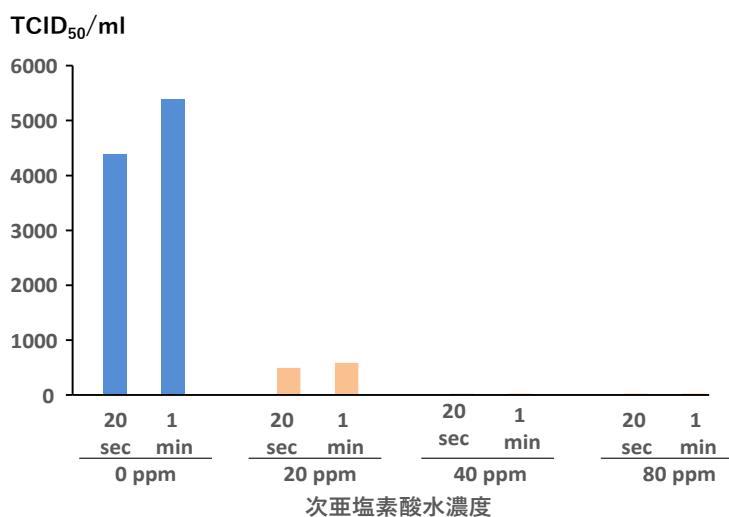


図1. 次亜塩素酸水の抗EVA71効果

## 2) 次亜塩素酸水の抗インフルエンザウイルス A 効果

インフルエンザウイルスを 40 ppm および 80 ppm の次亜塩素酸水で 20 秒間または 1 分間処理することにより、インフルエンザウイルスの増殖は 100%抑制された。20 ppm の次亜塩素酸水で 20 秒間及び 1 分間処理することにより、EVA71 の増殖はそれぞれ 98.0%と 96.3%、抑制された。(表 2 および図 2)

表2 次亜塩素酸水の抗インフルエンザウイルス効果

次亜塩素酸水濃度	反応時間	ウイルス titer	抑制効果
		PFU/ml	%
80 ppm	20 秒	0	100.0
	1 分	0	100.0
40 ppm	20 秒	0	100.0
	1 分	0	100.0
20 ppm	20 秒	1030	98.0
	1 分	830	96.3
0 ppm (水)	20 秒	52500	
	1 分	22500	

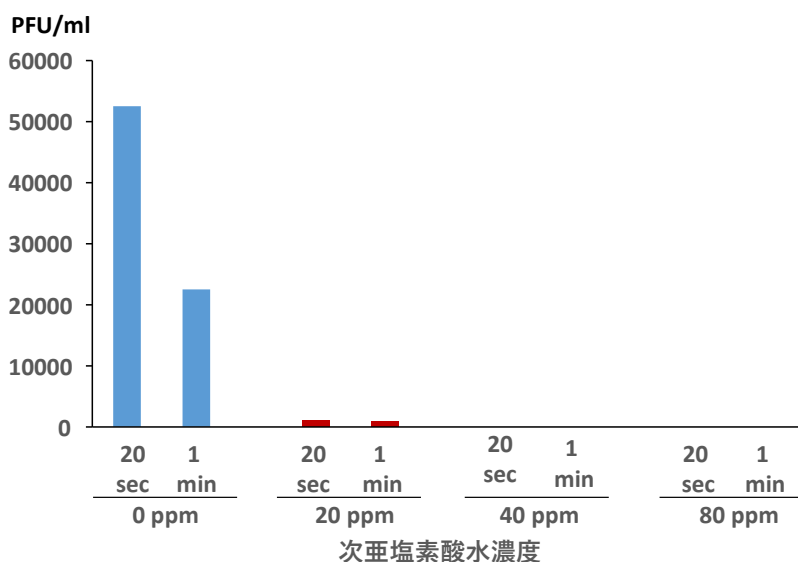


図2. 次亜塩素酸水の抗インフルエンザウイルス効果

## 5. 考察と結論

本実験では、エンベロープ持たない RNA ウイルスとして EVA71 を、そしてエンベロープ持つ RNA ウイルスとして A 型インフルエンザウイルス (PR8 株) を用いて、次亜塩素酸水の抗ウイルス効果を検証した。その結果、ウイルスを 40 ppm 以上の濃度の次亜塩素酸水で 20 秒間以上処理することにより、エンベロープを持たないウイルスの増殖は 99.5% 以上、またエンベロープを持つウイルスの増殖は完全に抑制できることが明らかとなった。以上より、次亜塩素酸水は、ウイルスに対して、特にエンベロープを持つウイルスに対して強い増殖抑制効果を持つことが確認された。

(令和 2 年 9 月 1 1 日)