新型コロナウイルスに対するイオン交換法生成による次亜塩素酸水の効果

2020 年 7 月 16 日

責任者：宮崎大学　獣医学科　教授　山口良二

（宮崎大学　獣医学科　准教授　齊藤　暁と共に実施した）

被検液：ION-HCLO-PKS（エヴァウォーター）
ウイルス：新型ヒトコロナウイルス（SARS-CoV-2）株名：SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020

ウイルス力価：$1.2x10^6$（1200000）PFU/ml
最終濃度：6000－10000PFU

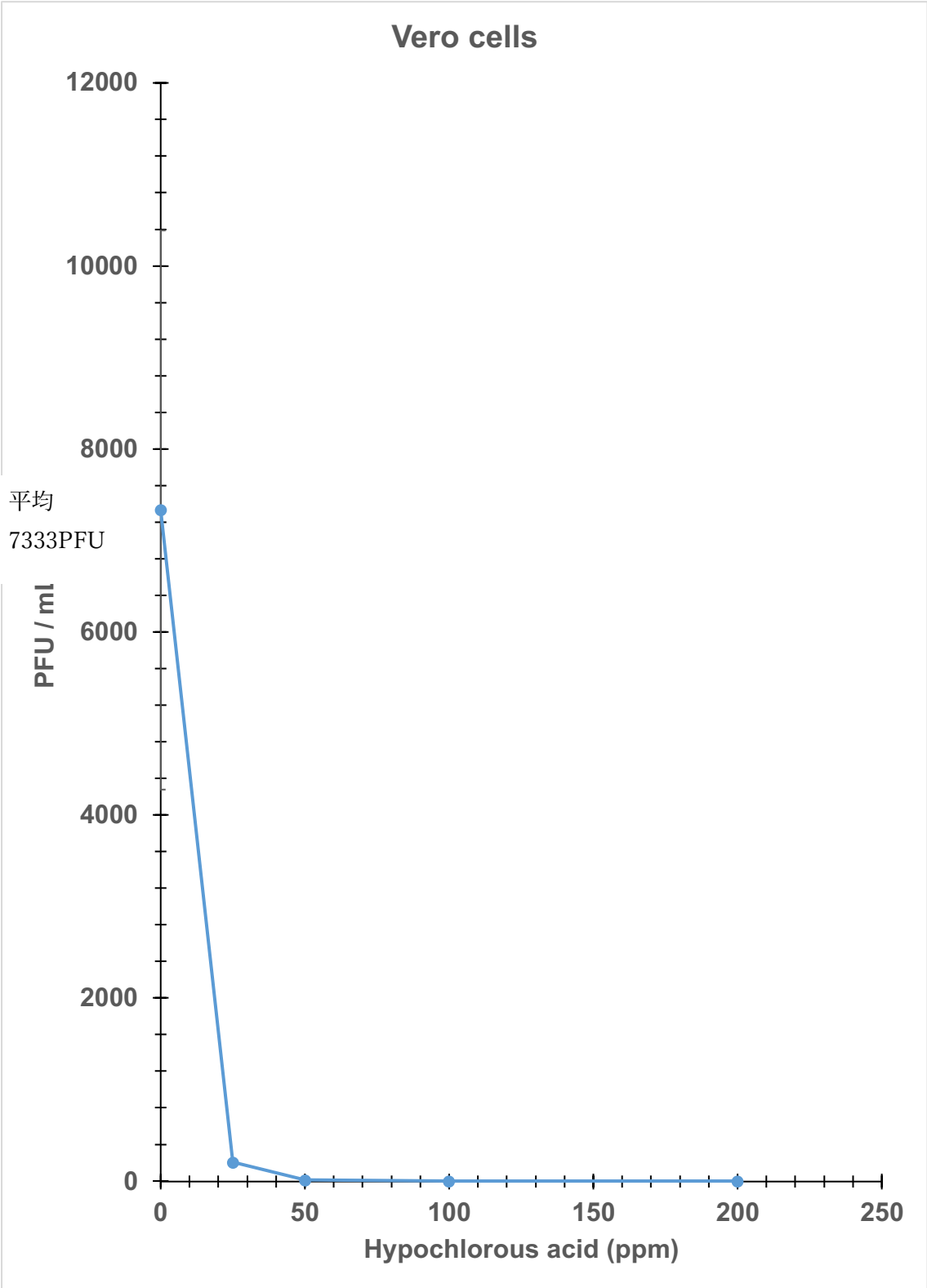
エヴァウオーターの希釈（スタート濃度：236ppm）：200,100,50,25,0　ppm（ﾐﾘ Q で希釈）
pH：5.85

方法：95ul エヴァウオーターに 5ul を添加し（$6.0x10^4$ PFU/ml）、60 秒インキュベート
ストップ液 900ul を添加。それを 500ul ずつ 24 ウェルプレートに 3 ウェルずつ接種しウイルス力価を測る。
最終ウイルス量
$6.0x10^4$ PFU/ml　x 10 分の 1＝$6.0x10^3$ PFU/ml（理論上）　　実際の計測値の平均が 7333.3 PFU/ml

細胞の上清を吸引し、処置したウイルスを接種、2 時間インキュベート後メチルセルロースをオーバーレイする。4 日培養後、PBS(+)で洗浄し、10%ホルマリンで 30 分固定後、水道水であらって、乾燥する。メチレンブルーを 500ul 添加し 30 分間おいて、水道水で洗い、乾燥してプラックを数える。

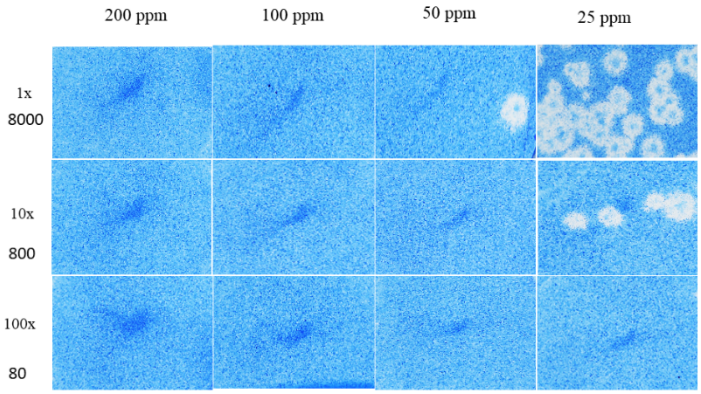
結論
100-200ppm では、完全にウイルスを 0 にする。
50ppm でも 99.9%、25ppm でも 97.2%　抑制した。

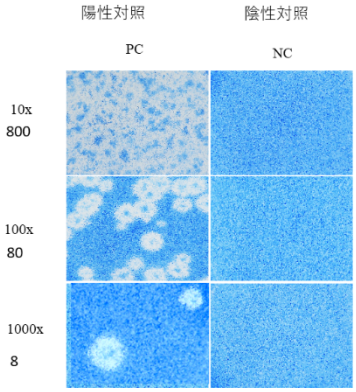
従って 25ppm で 97.2%、50ppm でほぼ 100%のウイルスを殺すことがわかった。


Vero cells
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
PFU / ml
0
50
100
150
200
250
Hypochlorous acid (ppm)

平均
7333PFU

以下は各希釈にみられたプラックの写真を例として撮ったもの。定量的写真ではない。





新型コロナウイルスに対する緩衝法生成による次亜塩素酸水の効果

宮崎大学　獣医学科　山口良二教授

実験内容の解説

実験に使用したコロナウイルスの詳細

- 被検液：ION-HCLO-PKS（エヴァウォーター）
- ウイルス：新型ヒトコロナウイルス（SARS-CoV-2)

株名：SARS-Cov-2/Hu/DP/Kng/19-020

同じ名前の菌・ウイルスを「株名」としてさらに細かい特徴（いつどこでどの生物から分離できたか）ごとに分類したもの

ウイルス力価：1.2×10^{6}（1200000）PFU/mL

プラックフォーミングユニット（ウイルス力価の単位）
1PFUは生きているウイルス1個を意味する

生きているコロナウイルスの数：　/mLは1mL中

最終濃度　：6000－10000PFU/mL

実際に使用される前に測定されたウイルス力価

実験に使用したエヴァウォーターの詳細

- スタート濃度（希釈前の濃度）→236ppm
- このエヴァウォーターを**ミリQ**を用いて

  超純水（不純物を限りなく除去して99.9%H_2Oのみで出来た水）

  200，100，50，25，0ppmの5段階に希釈し、

  それぞれの濃度でのコロナウイルスに対する効果を検証した
- ｐＨ：5.85

実験方法（①予備実験：エヴァウォーターとコロナウイルスの混合）

- 希釈した95μLのエヴァウォーターにコロナウイルス液を5μL加え

  μL（読み方：マイクロリットル）→1μL＝0.001mL、1000ul=1ml

  約20℃の室内で60秒放置。その後、**ストップ液**900μLを添加。

  反応阻害剤：エヴァウォーターの除菌成分を分解して反応を止める

- 上記の液を500μlずつ、細胞（＝実験動物の細胞）を培養した**24ウェルプレート**

  1プレートに24個の穴（＝ウェル）が開いたプラスチック板の細胞を培養する実験器具。

  に3ウェルずつ接種し**プラック測定法**でウイルス力価を測定する。

- ※この実験に使用したウイルス液中のコロナウイルス数実測値＝平均7333.3PFU/mL（3穴平均）

実験方法（②プラック測定法でコロナウイルスの生存数を調べる）-1

1. 前ページ予備実験の補足：24ウェルプレートで培養した細胞の上清**（＝細胞を実験的に培養すると生じる余分な水分、上澄み）**を吸引し、処置した（＝エヴァウォーターと反応させた）コロナウイルスを接種。

2. 上記の細胞を2時間**インキュベート（培養）**し

   細胞に適した、温度・湿度が保たれた専用の室内で培養すること

   その後、**メチルセルロース**で表面を覆う。

   寒天状の物質で、冷えると粘性の高い固体になるため、以下の効果がある
   ウイルスが細胞から細胞に移動するとき、隣り合った細胞にだけ移動できるように制限する（拡散して離れた細胞に移動するのを防ぐ）ウイルス感染細胞のみ死亡する。最後に染色によってプラックとして表現され、死亡した細胞が染まらず白色円形になる。1プラックはウイルス1個から形成される。

3. 4日間培養（＝**ウイルス**に適した、温度・湿度の室内で）後、メチルセルロースを捨て、その後PBS(+)で洗浄する。

   生理食塩水のこと、上記の残ったメチルセルロースを除去することができる

実験方法（②プラック測定法でコロナウイルスの生存数を調べる）-2

4.　10%**ホルマリン**に30分浸し、水道水で洗って、乾燥させる。

次の効果がある
①コロナウイルスを殺す
②細胞を固定する（生のままでは細胞が壊れる）
③後述のメチレンブルーという薬品で細胞の染色を行うとき、細胞が壊れないようにする

5.　**メチレンブルー**を500μl添加し、30分後、水道水で洗って乾燥させる。

健康な細胞：青色に染める(青)
ウイルスに破壊された細胞：透明のまま（白）

6.　**プラック**を数え、PFUとして算出する。

ウイルスが感染し破壊されてしまった細胞群（白）
円形の形をとり、ウイルス1つで1個のプラックを作る。これを目視で数えて生存コロナウイルスの数が算出できる。

グラフの説明

- 縦軸：**ウイルス力価**（＝エヴァウォーターと反応させた後のコロナウイルス液1mL中のコロナウイルスの数）単位はPFU/mL。

※エヴァウォーターと反応させる前の数値→1ml中のコロナウイルス数＝平均7333PFU/mL

※数値が高いほど、生き残ったコロナウイルスの数が多く、エヴァウォーターの除菌効果が低いことになる

- 横軸：希釈した**エヴァウォーターの次亜塩素酸濃度**。単位はppm

※236ppmのエヴァウォーターを200ppm・150ppm・100ppm・50ppm・0ppmの5段階に希釈して、各希釈段階でのコロナウイルスの力価を計測

写真の説明-1

■　写真**上**

上端の数値：希釈したエヴァウォーターの次亜塩素酸濃度。

右から25ppm・50ppm・100ppm・200ppmとなり

左にいくほど、濃度が高くなっている

左端の数値：（エヴァウォーターと反応させる前に）**希釈したコロナウイルス液のウイルス力価**。

上から順に、

・**希釈前**→約8000PFU/mL(≒平均7333PFU/mL)

・**10倍希釈**→約800PFU/mL

・**100倍希釈**→約80PFUmL

※希釈倍率が大きいほどコロナウイルスの数は少なく、感染力も低い。

注）資料の写真はあくまで分かりやすいように添付してあるだけで、**本来は顕微鏡で正確にプラックの数を計測する**。資料の写真から肉眼でプラック数を計測しても、個人の主観に大きく左右されるため定量的（＝科学的根拠のある、正確な数値の）なデータとは言えない。

写真の説明-2

- 写真**下**

左端の数値：前項（写真の説明ー1）と同じ

上端の数値：**コントロール実験**の種類

実験に使用したコロナウイルスやエヴァウォーターが異常なものではないこと、および実験結果の正当性を証明するために行う実験

左列→PC（**ポジティブコントロール**）

：コロナウイルスにエヴァウォーターを反応させず、**コロナウイルスのみで実験を行い**感染能力のある生きたウイルスを使用したことを証明するための実験。

右列→NC（**ネガティブコントロール**）

：コロナウイルスにエヴァウォーターを反応させず、**エヴァウォーターのみで実験を行い**エヴァウォーターが生物の細胞に無害であること、他の雑菌やウイルスが混入してないことを証明するための実験

結論（実験結果）

- **100ppm以上**では、**完全にウイルスを0**にする。
- 50ppmで99.9%のコロナウイルスを抑制する。
  （生存コロナウイルス数：約7333PFU→約7PFU）
- 25ppmで97.2%抑制する。
  （生存コロナウイルス数：約7333PFU→約205PFU）

↓

- 従って、濃度**50ppm以上のエヴァウォーター**で、**ほぼ100%のコロナウイルスを殺せる**ことが分かった