

インフルエンザウイルス感染防止システム開発のための基礎的研究

Fundamental Research for Development of Infection Prevention System to Influenza Virus

学生会員 ○奥邨 大輔 (北海道大学)

正会員 塩崎 一紀 (ダイキン工業)

非会員 三田村 隆 (エコロフロンティア)

非会員 菅野 幸雄 (エコロフロンティア)

正会員 嶋倉 一實 (エコロフロンティア)

正会員 横山 真太郎 (北海道大学)

Daisuke OKUMURA*¹ Kazunori SHIOZAKI*² Takashi MITAMURA*³Yukio KANNO*³ Kazumi SHIMAKURA*³ Shintaro YOKOYAMA*¹*¹Hokkaido University *²Daikin Corporation *³Ecolofrontier Co.Ltd

The present study describes control methods for influenza virus. We verified the effect of slightly acidic electrolyzed water on influenza virus in both fluid condition and aerosol condition. By the hemagglutination test and the TCID₅₀ test, it was confirmed that virus lost its viral activity drastically. In addition, we introduced the new system adopted electrolyzed water into school facilities. Experimental results showed the effect of keeping adequate relative humidity and decreasing airborne common bacteria and fungi.

はじめに

インフルエンザによる被害は甚大である。国立感染症研究所によると、2004/05 シーズンのインフルエンザ感染者数は全国で1,770万人、超過死亡(インフルエンザ流行に関連して生じたと考えられる死亡)は15,100人と推定されている¹⁾。学校施設では、9,183の施設で学級閉鎖が余儀なくされた²⁾。世界的には、1997年に香港で鳥インフルエンザが初めて人から分離されて以来、アジアを中心に感染が相次ぎ、人から人へと感染する新型インフルエンザの大流行(パンデミック)を懸念する声が高まっている。WHOでは、新型インフルエンザが出現した場合、低く見積もって200~700万人、最悪の場合には5,000万人以上が犠牲になるという被害予測を発表している³⁾。以上のように、インフルエンザの流行に伴う個人的・社会的損失は計り知れない。

そこで、本研究では感染防止の手段として食品衛生分野で開発された微酸性電解水に着目し、インフルエンザウイルス感染防止システムの開発に取り組んだ。本稿では、基礎的実験の成果を報告する。

1. 微酸性電解水の特徴

微酸性電解水とは、塩酸を無隔膜電解槽で電気分解することにより得られるpH 5~6.5、有効塩素濃度10~30 ppmの水溶液であり、2002年には殺菌料として食品添加物に認定されている。

特徴としてはまず、低濃度で強い殺菌力を有することが挙げられる。種々の細菌や真菌に対する効果が示されており、さらには高温や従来の消毒薬に強い耐性を示す

細菌芽胞にも効果があることが報告されている。

安全性に関しては、水道法のうち塩素系有害物質を中心とした21項目と、清涼飲料水製造基準の26項目全てにおいて基準を満たしている。さらに、動物に対する急性経口毒性試験や皮膚累積刺激性試験など、各種毒性試験から良好な成績を得ている。

その他の特徴としては、(i) Cl₂としての存在比率が低く気散しにくいいため殺菌効果の安定性が良い。(ii) 手荒れが少ない。(iii) 塩素臭がほとんどない。(iv) NaやKなどの塩を含まないため、乾燥後に析出物が少ないなどが挙げられる。

以上のように、従来の殺菌料にはない利点を有することから、噴霧による空間消毒など、感染症対策として適用可能であると考えた。また、他分野では水産、農業、医療、家庭など各分野での利用が試みられている。

図-1に微酸性電解水生成装置(ピュアスター、Mp-240)の概念図を示す。

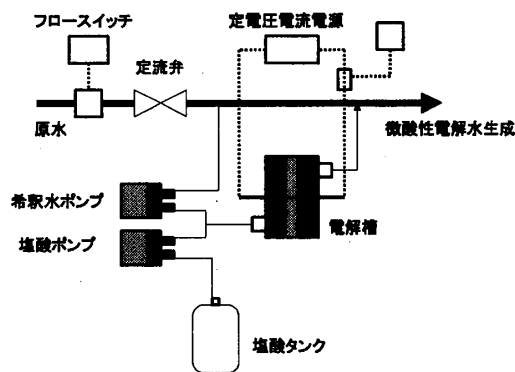


図-1 生成装置の概念図

2. 液相インフルエンザウイルス不活化効果の実証実験

本研究室では、液相中のインフルエンザウイルスに対し、微酸性電解水が不活化効果を有することを実証している⁴⁾。本節では、その概要を報告する。

2.1 実験方法

ウイルスには、A 香港型インフルエンザウイルス (H3) を用いた。微酸性電解水 298.5 μl に培養液中のインフルエンザウイルスを 1.5 μl 加え、インキュベートした。電解水の濃度には 20 ppm、2 ppm、0 ppm (蒸留水) の 3 条件を与え、インキュベート時間についても 1 分間、10 分間、20 分間の 3 条件とした (表-1)。その後、それぞれのサンプルについてウイルス試験を行った。なお、電解水の pH は 6.2 であった。

2.2 結果と考察

蒸留水を作用させた条件では、ウイルス感染力価は 6.3×10^5 [TCID₅₀] であったのに対し、電解水を接触させた全ての条件で感染力価は 0 [TCID₅₀] となった (図-2)。この結果から微酸性電解水のインフルエンザに対する不活化効果が実証された。液相においては、有効塩素濃度 1 ppm、接触時間は 1 分間という、非常に低濃度・短時間で十分な効果を有することが示された。

3. 気相インフルエンザウイルス不活化効果の実証実験

前節では、微酸性電解水の抗インフルエンザウイルス効果について述べた。本節ではさらに、飛沫感染・空気感染の予防を想定し、空気中のインフルエンザウイルスに対する微酸性電解水の効果を検証したので、その成果を報告する。

3.1 実験方法

図-3 に実験装置の概略図を示す。試験では、A 香港型インフルエンザウイルス (H3) を用いた。ウイルス溶液を 3 ml 入れたネブライザーと、電解水用のネブライザーをアクリル円筒型試験槽 (容量約 18 l) に取り付けた。両端はチューブでポンプと繋ぎ、吸引側にはウイルス回収用に、リン酸緩衝液を 150 ml 入れたインピンジャーを設置した。

低湿に保った試験槽内へ微酸性電解水を噴霧し、その後ウイルス噴霧を開始した。噴霧量は約 0.25 ml/min、噴霧のための押出空気量は約 5 l/min である。相対湿度の観点から噴霧時間は 4 分とし、噴霧中は流量約 10 l/min で、ポンプ吸引によるウイルス回収を行った。噴霧停止後は流量約 4 l/min で 5 分間回収を行い、さらに約 10 l/min で 2 分間程度の回収を行った。

ウイルス溶液を 3 ml 全て噴霧するまでこの操作を繰り返した。コントロールとして、電解水の代わりに滅菌蒸留水を噴霧した場合と、ウイルスのみを噴霧した場合の実験を行った。なお、実験は全て安全キャビネット内で行い、バイオハザード対策には万全を期した。

表-1 実験条件のバリエーションと結果

処理水	処理時間		
	1分間	10分間	20分間
微酸性電解水 (20ppm)	-	-	-
微酸性電解水 (2ppm)	-	-	-
コントロール (滅菌蒸留水)	+	+	+

(- : 活性無し, + : 活性有り)

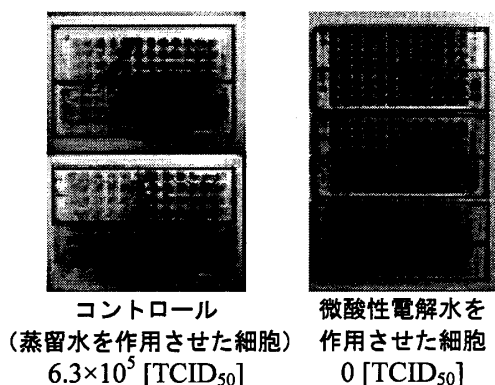


図-2 ウイルス試験結果

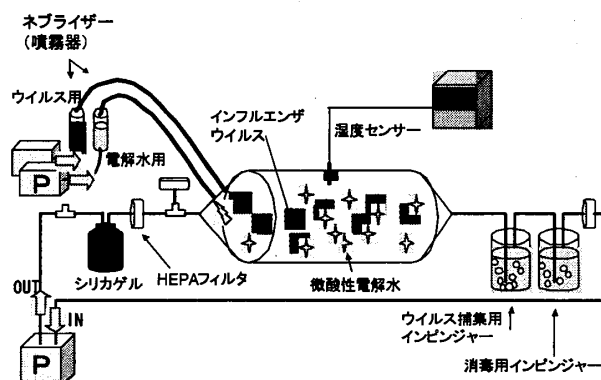


図-3 実験装置の概略図



図-4 実験の様子

使用した微酸性電解水の残留塩素濃度は22.0 ppm、pHは6.05であった。ネブライザーの噴霧粒子径は約1~10 μm であり、ウイルスと電解水の多くはミストの状態接触し回収された。実験の様子を図-4に示す。

3.2 ウイルス試験方法

ウイルスの定量は、大別して赤血球凝集能による方法と感染性を測定する方法がある。赤血球凝集能の測定は不完全粒子を含む全粒子を定量し、感染性の測定は完全粒子のみをみることになる。前者としてHA試験(赤血球凝集試験)、後者としてMDCK細胞を用いたTCID₅₀試験を行った。

HA試験は、ウイルス表面タンパク、HA(ヘマグルチニン)の有無を判別する。HAは細胞感染時の触手の役割を果たし、その存在下では赤血球は凝集される。この現象を利用した方法であり、陽性となるウイルスの最大希釈倍数の逆数をHA価とする。回収液を2倍段階希釈し、それぞれを赤血球浮遊液に加え、4℃で2時間保管後、凝集の有無を判定した。

TCID₅₀試験は、生きた細胞を使用し、段階希釈したウイルス液がどの段階まで細胞変性効果(cytopathic effect: CPE)をもつかを評価する方法である。なお、感染の成立は固体差が大きいいため、誤差が出やすいという特徴がある。1列目のみを5倍希釈、2列目以降を4倍段階希釈したウイルス液をMDCK細胞に接種し、37℃で6日間インキュベート後、CPEを判定した。

3.3 結果と考察

HA試験結果を図-5に示す。ウイルスのみの場合と、蒸留水を噴霧した場合は8[HA]、電解水を噴霧した場合は4[HA]だった。電解水を噴霧した場合は、他の条件よりもHA価が1/2に減少した。

TCID₅₀試験結果を図-6に示す。ウイルスのみの場合の感染力価は 4.87×10^4 [TCID₅₀]、蒸留水噴霧時は 6.12×10^4 [TCID₅₀]、電解水噴霧時は 1.41×10 [TCID₅₀]であった。ウイルスのみを噴霧した場合と比較し、電解水を噴霧した場合のウイルス感染力価は $1/10^3$ 以上減少した(図-7)。また、ウイルスのみの結果を100とすると、電解水の結果は0.03となり、99.97%以上の感染性ウイルスが不活化したことになる。

一般にウイルスは湿度に弱いことが知られているが、今回のような短時間においては、蒸留水との接触でウイルスは活性を失わないことが確かめられた。一方、微酸性電解水については、数秒~10分間程度の接触時間でウイルス感染力を非常に大きく低減させることが確認された。

2種類のウイルス試験結果から、HA価には若干の効果があり、感染力価に対しては大きな効果があった。これは、HAを有するウイルスは少なからず残っているものの、そのほとんどは活性を失っていることを意味する。

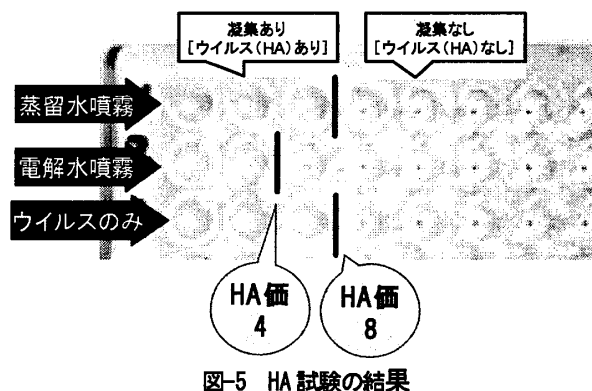


図-5 HA試験の結果

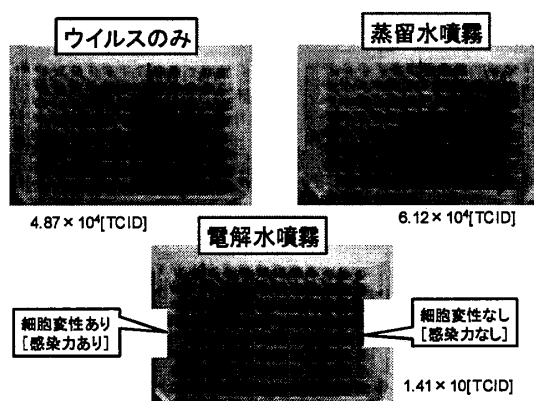


図-6 TCID₅₀試験[写真]

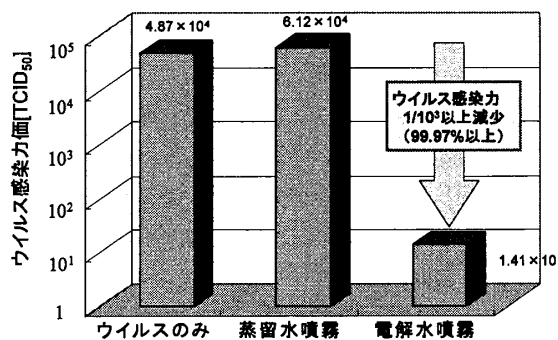


図-7 TCID₅₀試験[グラフ]

このことから、電解水中の次亜塩素酸との反応により、ウイルスHAがある程度破壊や変性がなされ、さらに、それ以上にウイルスの他の要素が強く影響を受けたとも考えられる。エンベロープや核酸などのウイルス中心部を大きく変性した、あるいは、それぞれの要素が少しずつ変性した結果、ウイルス全体としての完全性が失われた、などと考えられる。また、ウイルス外部との物理的反応であるため、抗原特異性の異なる鳥インフルエンザや新型インフルエンザに対しても有効であると予想される。

4. 感染防止システムへの応用展開

これまで、微酸性電解水の有する抗インフルエンザ効果について述べてきた。液相、気相どちらの状態においても、非常に高い効果が得られていることから、微酸性電解水の活用により、インフルエンザウイルス感染防止システムの開発が可能になると考えられる。

実際の室内へ適用するには、いくつかの方法が考えられる。例えば、空気清浄機のように、ファンによって吸いこんだ空気を、電解水中や電解水のフィルターを通し、インフルエンザウイルスが不活化した空気を再び放出する方法が考えられる。従来の空気清浄機に対する利点として、電解水は大量生産が可能であるため、低コストで一度に大量の空気を処理できることが挙げられる。したがって、家庭だけではなく、空気調和設備に組み込むなどすることで、一般ビルなどにおいても適用可能と考えられる。

もうひとつの方法として、微酸性電解水を直接室内へ噴霧する方法が考えられる。実際の室内では、くしゃみなどにより、インフルエンザウイルスが放出されることがあるため、ファンによる方法よりも即効性のある対応策である。本研究室では、加湿器の加湿水に微酸性電解水を採用した、加湿・滅菌同時システムを開発し、学校施設や老人施設へ導入実験を行っている⁴⁾。以下に、装置の構成および、実験結果について報告する。

本システムは、加湿器、湿度センサー、SSR (ソリッド・ステット・リレー)、デジタル調整指示器で構成される。湿度センサーからの入力値と設定値との比較より、加湿器の on-off を切り替えるフィードバック制御を行うものである。このシステムの利点は、浮遊微生物の殺菌と同時に、加湿がなされることである。冬期の低湿度傾向は、呼吸器粘膜の過剰乾燥を引き起こし、ウイルスが長時間浮遊しやすい状態にするため、インフルエンザの感染リスクを高めている。

本システムを札幌市内の小学校の教室⁴⁾、大学教室内に設置し、システム稼働時と停止時に RCS エアサンプラーを使用して浮遊一般細菌・真菌のサンプリングを行うとともに、温湿度を測定した。また、稼働時には乾湿感、5段階臭気強度、臭気に関する快不快感の主観申告調査を実施した。

小学校と大学における浮遊一般細菌数の経時変化をそれぞれ図-8, 9に示す。どちらの場合にも良好な殺菌効果が示された。両者とも停止時には、13:00にピーク値を迎えたが、これは小学校では清掃活動後、大学では講義開始時間だったためであり、稼働による減少効果が顕著に表れた。相対湿度に関して、稼働時には適切な湿度状態が保たれた。主観申告調査からも、おおむね良好な結果が得られていることから、本システムは感染症対策として極めて有効であると考えられた。

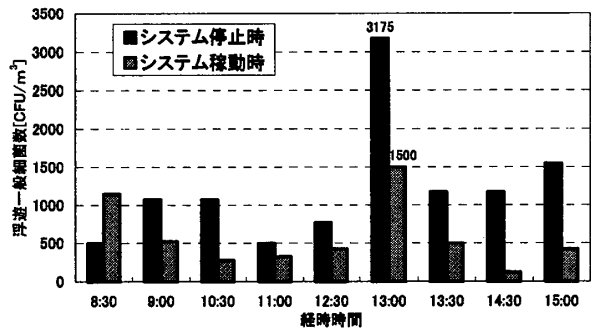


図-8 小学校教室における浮遊一般細菌数の経時変化

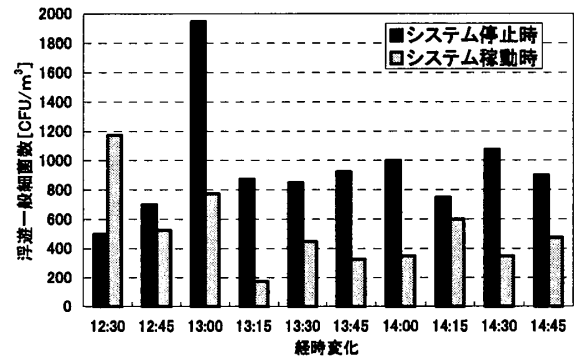


図-9 大学講義室における浮遊一般細菌数の経時変化

5. まとめ

- 1) 培養液中のインフルエンザウイルスに対する、酸性電解水の不活化効果の実証実験を行い、低濃度かつ短時間で不活化効果を有することが確かめられた。
- 2) 空気中のインフルエンザウイルスに対し、微酸性電解水を噴霧することで、ウイルスは短時間で大きく活性を失うことが実証された。
- 3) 実際の室内へ加湿器から電解水を噴霧したところ、浮遊微生物に対する良好な殺菌効果と、低湿度傾向の改善がなされ、感染症対策としての有効性が示された。

謝辞

インフルエンザウイルスのハンドリングについて、多大な御指導と御支援をいただいた、北海道立衛生研究所の伊木繁雄氏、長野秀樹氏に心より感謝いたします。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所, 病原微生物検出情報 (IASR) : <http://idsc.nih.gov/jiasr/index-j.html>
- 2) 国立感染症研究所, 感染症発生動向調査 (IDWR) : <http://idsc.nih.gov/jidwr/index.htm>
- 3) WHO : Estimating the impact of the next influenza pandemic : enhancing preparedness. Geneva, December 8, 2004
- 4) 簾谷・横山ら(2005) : 都市公共施設における室内微生物汚染の対策に関する研究, 平成 17 年度空気調和・衛生工学会大会学術講演論文集, pp. 1633-36