

短報 次亜塩素酸水溶液による A 型インフルエンザウイルスの感染性および赤血球凝集活性の不活化

福崎 智司^{1*}, 中山 幹男², 浦野 博水¹

(¹岡山県工業技術センター, ²NPO法人バイオメディカルサイエンス研究会)

Inactivation of Virus Infectivity and Hemagglutination Activity of Influenza A Viruses by Hypochlorite Solutions

Satoshi Fukuzaki^{1*}, Mikio Nakayama², and Hiromi Urano¹

¹Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, ²Biomedical Science Association

Abstract

The infectivity of influenza A virus was completely inactivated by the exposure to 50 mg/l of hypochlorite solutions of pH 6 and 10 within 30 s, whereas no inactivation was observed in the presence of peptone after prolonging exposure time up to 5 min. It was also found that the hemagglutination activity of influenza A virus was inactivated after 60-s exposure to the hypochlorite solutions of pHs 6 to 10.

Key words: Influenza A virus/ Hypochlorite solution/ Virus titer/ hemagglutination/ Plaque-forming unit

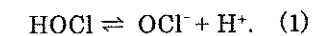
緒言

インフルエンザウイルスは、エンベロープと呼ばれる脂質二重層膜を持つ RNA ウイルスであり、抗原性の差により A, B, C 型の 3 種類に分けられる。このうち、A 型インフルエンザウイルスは、世界中で高い疾病率や死亡率の原因となる医学的にも重要なウイルス病原体である。

A 型インフルエンザウイルスのエンベロープ表面には、ヘマグルチニン(HA)、ノイラミニダーゼ(NA)、イオンチャンネル(M2)の 3 種類のタンパク質の突起がある。HA はヒトの上気道の上皮細胞への吸着に寄与する抗原決定基であり、NA は細胞と HA を切り離す働きを担うなど、いずれも重要な感染因子である。インフルエンザウイルスの感染性の減少は、エンベロープやウイルスおよび RNA 関連酵素の損傷、な

らびに HA や NA の作用の阻害により起こる¹⁾。

次亜塩素酸ナトリウム(NaOCl)は、広い殺菌スペクトルと速効性をもつ殺菌剤であることから、食品産業をはじめ医療・保健施設において長年汎用されてきた^{2,3)}。NaOCl の希釈水溶液中では、pH5~10 の範囲において非解離型である次亜塩素酸(HOCl)と次亜塩素酸イオン(OCl⁻)の間に解離平衡が存在する ($pK_a \approx 7.5$)。



NaOCl 水溶液の殺菌効果は、非解離型次亜塩素酸(HOCl)の濃度に依存することから⁴⁻⁶⁾、HOCl を高比率で含有する弱酸性水溶液の使用が普及し始めている。HOCl は、電氣的に中性な分子であることから、細菌の形質膜(リン脂質二重層)を透過し、細胞内の酵素や核酸に損傷を与えることで不活化する⁷⁾。HOCl の膜透過性はウイルスのエンベロープにおいても同

様であり、HOClの存在比率に依存してA型インフルエンザウイルスの不活化効果も増加する⁸⁾。一方、弱アルカリ性NaOCl水溶液中の次亜塩素酸イオン(OCl⁻)は、強力な洗浄効果およびタンパク質分解作用を持つ^{6, 9)}。仮に、OCl⁻がインフルエンザウイルスの感染の第一段階であるHAの吸着能を不活化するならば、感染価は大きく減少することになる。HAの吸着能の低下は、赤血球凝集反応によって評価できる。

本研究では、弱酸性および弱アルカリ性に調整したNaOCl水溶液を用いて、A型インフルエンザウイルスの感染価および赤血球凝集活性の不活化について検討した。

実験方法

1. ウイルスと培養

インフルエンザウイルス A/thiba/2/09 (PdmH1N1)および A/北九州/159/93 (H3N2)を用いた(-80℃凍結保存)。各ウイルスの培養には、イヌ腎臓細胞(Madin-Darby canine kidney cell: MDCK細胞)を含む組織培養液(MEM培地; 日本製薬㈱)を用い、37℃で42時間培養した。この培養液から遠心分離(1,500×g, 30 min)によりウイルスを含む上清を回収し、さらにこの上清を遠心濃縮(76,000×g, 60 min)にかけ、ウイルスを含む遠心沈さを得た。この遠心沈さを5 mlの10 mMリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate-buffered saline: PBS)に懸濁した後、20~50%ショ糖密度勾配遠心法でウイルスを適宜濃縮してウイルス精製液を得た。

2. 次亜塩素酸ナトリウム

NaOClは、6%の遊離有効塩素(FAC)を含有する試薬(Lot DWF2416; 和光純薬工業㈱)を用いた。NaOClは、イオン交換水を用いてFAC濃度50 mg/lに希釈した。希釈したNaOCl水溶液のpHは、HClおよびNaOHを用いてpH 6~10に調整した。FAC濃度はDPD試薬を用いて測

定した。

3. ウイルスの不活化

インフルエンザウイルス A/thiba/2/09 (PdmH1N1)の不活化実験は、FAC濃度50 mg/l、pH 6およびpH 10に調整したNaOCl水溶液を用いて行った。5 mlの試験管にNaOCl水溶液を900 μlを入れ、続いてウイルス液0.1 mlを添加して直ちに混合した。混合後、10秒、30秒、60秒後に混合液0.1 mlを採取し、2%ペプトンを含む0.01M Na₂S₂O₃溶液0.9 mlを入れた試験管に移して酸化反応を停止した。この液を、MEM培地を用いて10倍希釈系列で希釈調製した後、各希釈液0.1 mlをブラック法によるウイルス感染価の測定に供した。

ウイルス感染価は、MDCK細胞への感染性で評価した。まず、MDCK細胞を6穴プレートの各ウェル(30 mm φ × 6)内で、10%ウシ胎児血清(Fetal calf serum; FCS)を含むMEM培地3 mlを用いて37℃、5% CO₂インキュベーター内で3日間培養した。培養後、10%ウシ胎児血清(FCS)含有MEM培地をピペットで取り除き、各穴プレート底部に付着したMDCK細胞を得た。各ウェルのMDCK細胞を、3 mlのMEM培地で2回洗浄した。次に、ウイルス液の10倍希釈系列(3本/希釈)を調製し、この各希釈液0.1 mlを各ウェルに接種し、1時間静置してウイルスをMDCK細胞に吸着させた。1時間の静置後、0.7%寒天、1%DEAEデキストラン、1 μg/mlトリプシンを含むMEM培地をMDCK細胞上に重層した。寒天が固化後、6穴プレートを反転し、34℃で5%CO₂インキュベーター内で42時間培養した。培養終了後、各ウェルの寒天上に10%ホルマリンを添加してMDCK細胞を固定化した。次に、寒天MEM培地を取り除き、メチレンブルー染色を行った。ここで、ウイルス感染したMDCK細胞はメチレンブルーに染色されず、白色の斑点(ブラック)が形成される(Fig. 1)。各希釈系列3ウェ

結果および考察

1. ウイルス感染価の減少

Table 1に、蒸留水、pH 6およびpH 10に調整したNaOCl水溶液(50 mg/l)中にインフルエンザウイルスを浮遊接触させたときのウイルス感染価の減少を示す。蒸留水の場合、5分間の接触時間内ではウイルス感染価の減少はほとんど見られなかった。pH 6のNaOCl水溶液の場合、感染価はわずか10秒間の接触で検出限界以下となった(<1 log₁₀ PFU/0.1 ml)。pH 10のNaOCl水溶液の場合、ウイルス感染価は10秒後で2.5 log₁₀ PFU/0.1 mlであったが、30秒後には検出限界以下となった。すなわち、pH 6と10のNaOCl水溶液はいずれも、インフルエンザウイルスに対して30秒以内でウイルス感染価を5.6~5.8 log以上減少させる速効的な不活化効果を示した。

pH 6のNaOCl水溶液の方がより強力な不活化力を示したのは、HOClのエンベロープ透過性と内部のウイルスRNAおよび関連酵素への損傷に起因すると考えられる^{1, 7)}。一方、有効塩素のほぼ100%がOCl⁻として存在するpH 10のNaOCl水溶液も優れた不活化効果を持つことも確認された。

これまでに、次亜塩素酸によるタンパク質の酸化反応について、反応率はpH 8.5~10の範囲で最大になること⁷⁾、そしてタンパク質分子鎖のアミノ酸残基(-NH₃⁺)とOCl⁻の反応が酸化分解の開始に寄与していることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。このような結果から、エンベロープ表面に突起したHAに対するOCl⁻の酸化反応が感染価の減少をもたらす原因の一つではないかと推測された。

次に、同様の不活化実験系において、インフルエンザウイルスと同時にペプトン(最終濃度1.0 g/l)を各溶液に添加してウイルス感染価を測定した。その結果、pH 6およびpH 10のNaOCl水溶液においては、蒸留水でのウイルス感染価よりも低いものの、5分間の接触時間内では顕

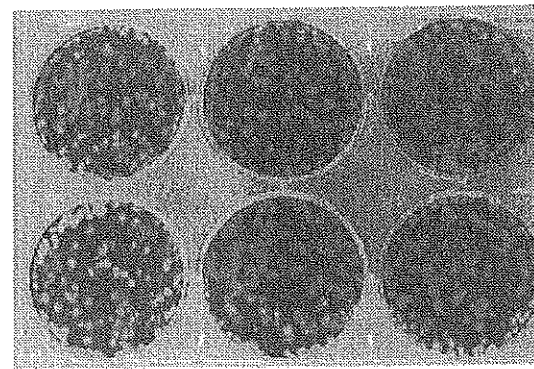


Fig. 1 Plaques formed in MDCK cells.

ルにおけるブラック数と希釈倍率から感染価(平均値)を算出した(Plaque-forming unit: PFU)。

4. 赤血球凝集反応

ニワトリ保存血液(㈱日本バイオテスト研究所)20 mlに10 mM PBSを20 mlを加えて混合し、この混合液を遠心分離(630×g, 20 min)して濃縮後、PBSで2回懸濁洗浄(630×g, 20 min)して血清成分を除去した。洗浄後の血球にPBS 20 mlを加えて懸濁後、この懸濁液1 mlを再度PBS 200 mlに希釈混合して0.5%ニワトリ血球(CRBC)を得た。

FAC濃度50 mg/l、pH 6~10に調整したNaOCl水溶液200 μlを5 mlの試験管に入れ、続いてインフルエンザウイルス A/北九州/159/93 (H3N2)液30 μlを添加して60秒間接触させた。60秒後、直ちに0.1M Na₂S₂O₃溶液30 μlを入れて酸化反応を停止した。この反応液から、PBSを用いて2倍希釈系列のウイルス希釈液を調製した。次に、各希釈ウイルス液50 μlとPBS 50 μlを96穴U字マイクロプレート内で混合した後、赤血球試料30 μlを各ウェルに入れて緩やかに攪拌し、1時間静置してウイルスによる赤血球凝集反応(HA反応)を行った。凝集能を維持し赤血球が分散した状態を示す最大希釈倍率をHA価とした。

Table 1. Inactivation of influenza A virus (H1N1) by pH-controlled hypochlorite solutions^a at 20°C.

Solution	pH	Virus titer (log ₁₀ PUF/0.1 ml)			
		10 s	30 s	60 s	5 min
Distilled water	6	5.80	5.66	—	5.63
NaOCl soln.	6	< 1	< 1	< 1	< 1
	10	2.50	< 1	< 1	< 1

^aFAC concentration was 50 mg/l.

Table 2. Effect of peptone^a on the inactivation of influenza A virus (H1N1) by pH-controlled hypochlorite solutions^b at 20°C.

Solution	pH	Virus titer (log ₁₀ PUF/0.1 ml)			
		10 s	30 s	60 s	5 min
Distilled water	6	5.72	5.76	—	5.54
NaOCl soln.	6	5.17	5.17	—	5.00
	10	5.77	5.54	—	4.69

^aFinal conc. was 1.0 g/l.

^bFAC concentration was 50 mg/l.

著なウイルス感染価の減少は見られなかった (Table 2)。これは、有効塩素 (HOCl+ OCl⁻) がペプトンの分解に消費されたためと考えられる¹²⁾。しかし、pH 10 の場合、ウイルス感染価は5分後に 1.1 log 減少した。これは、タンパク質との反応性に富む OCl⁻がクロラミンを生成し⁷⁾、間接的に感染価の減少に影響したのではないかと考えられる。

2. HA 価の減少

Figure 2 に、pH 調整 NaOCl 水溶液 (50 mg/l)、

蒸留水 (pH 6.0) および 10 mM PBS (pH 7.0) で 60 秒間処理したインフルエンザウイルスの赤血球凝集反応の様子を示す。赤血球がウェル底部に一樣に沈下すると、インフルエンザウイルスが凝集活性を喪失していることを示し、懸濁状態で沈下しないものは凝集活性を維持していることを示す。

蒸留水 (pH 6) および 10 mM PBS (pH 7) で処理した場合、インフルエンザウイルスの凝集能により赤血球が分散した状態を示す最大希釈倍率は一致しており、HA 価は 512 であっ

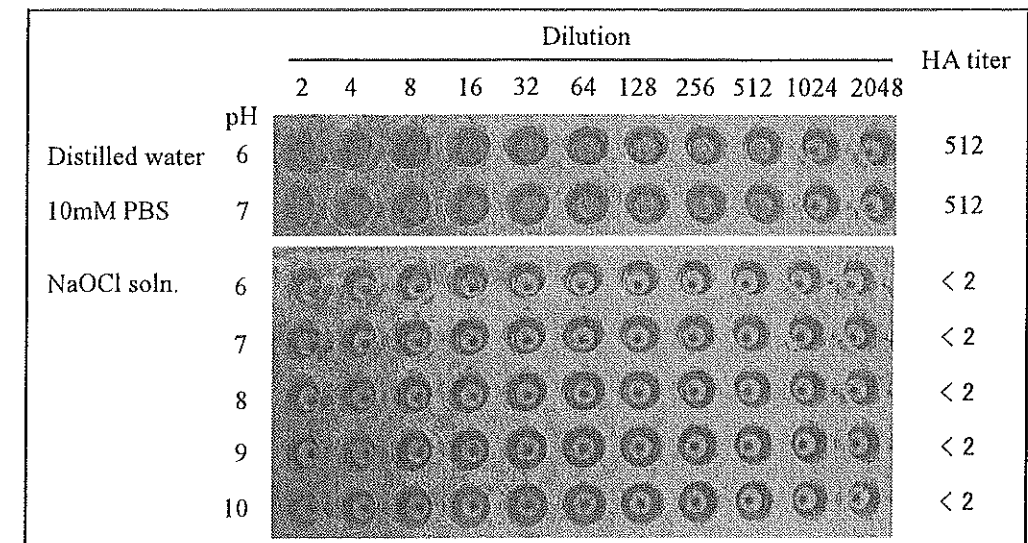


Fig. 2 Hemagglutination activity of influenza A (H3N2) virus after 60-s exposure to hypochlorite solutions (50 mg/l) of various pHs.

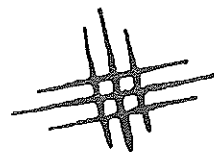
た。一方、pH 6~10 の NaOCl 水溶液で処理したインフルエンザウイルスは、pH に関係なくすべての希釈倍率において凝集能は観察されず、HA 価は < 2 であった。すなわち、各水溶液中の HOCl および OCl⁻ が HA の赤血球吸着セグメントを酸化分解することで、赤血球表面 (シアル酸) への吸着を抑制したと考えられる。

以上の結果から、pH 調整 NaOCl 水溶液による短時間処理では、HOCl はウイルス RNA への損傷と HA 吸着能の不活化により、OCl⁻ は HA 吸着能の不活化によりウイルス感染価を減少させる機構が示唆された。

参考文献

- 1) Weber, T. P., and Stilianakis, N. I.: Inactivation of influenza A virus in the environment and modes of transmission: a critical review. *J. Infect.*, **57**, 361-373 (2008).
- 2) Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garrett, E. H., Farber, J. N., and Busta, F. F.: Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, **2**, 161-173 (2003).
- 3) Rutala, W. A., and Weber, D. J.: Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**, 597-610 (1997).
- 4) Brazis, A. R., Leslie, J. E., Kabler, P. W., and Woodward, R. L. (1958) The inactivation of spores of *Bacillus globigii* and *Bacillus anthracis* by free available chlorine. *Appl. Microbiol.*, **6**, 338-342.
- 5) Fair, G. M., Morris, J. C., Chan, S. L., Weil, I., and Burden, R. P. (1948) The behavior of chlorine as a water disinfectant. *J. Am. Water Works Assoc.*, **40**, 1051-1061.
- 6) Fukuzaki, S., Urano, H., and Yamada, S. (2007) Effect of pH on the efficacy of sodium hypochlorite solution as cleaning and bactericidal agents. *J. Surface Finish.*

- Soc. Jpn.*, 58, 465-469.
- 7) Fukuzaki, S.: Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfecting processes. *Biocontrol Sci.*, 11, 147-157 (2006).
- 8) Rice, E. W., Adcock, N. J., Sivaganesan, M., Brown, J. D., Stallknecht, D. E., and Swayne, D. E.: Chlorine inactivation of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 1568-1570 (2007).
- 9) Urano, H., and Fukuzaki, S. (2005) The mode of action of sodium hypochlorite in the cleaning process. *Biocontrol Sci.*, 10, 21-29.
- 10) Hawkins, C. L., and Davies, M. J.: Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem. J.*, 332, 617-625 (1998).
- 11) Hawkins, C. L., and Davies, M. J.: Hypochlorite-induced oxidation of proteins in plasma: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals and their role in protein fragmentation. *Biochem. J.*, 340, 539-548 (1999).
- 12) Bloomfield, S. F., Arthur, M., Looney, E., Begum, K., and Patel, H.: Comparative testing of disinfectant and antiseptic products using proposed European suspension testing methods. *Lett. Appl. Microbiol.*, 13, 233-237 (1991).



Journal of Environmental Control Technique

環境管理技術

 **microbe-pestology**

vol.30
no. 2

Z16-1320
雑誌
30(2)=172:2012.4



1 2 0 1 2 0 0 4 6 3 0 0 8

