

〈原 著〉

オゾン化ノンアルコール消毒剤の抗アデノウイルス活性について

花岡 希¹⁾・吉田 英一²⁾・藤本 嗣人¹⁾

Evaluation of the Anti-adenoviral Activity of Ozonated Non-alcohol Disinfectant

Nozomu HANAOKA¹⁾, Eiichi YOSHIDA²⁾ and Tsuguto FUJIMOTO¹⁾

¹⁾Center for Emergency Preparedness and Response, National Institute of Infectious Diseases, ²⁾E-TECH Co., Ltd

(2021年5月24日受付・2021年9月7日受理)

要 旨

Human mastadenovirus (HAdV) は、一般的な手指消毒薬には強い抵抗性を示す。HAdV によって引き起こされる流行性角結膜炎や咽頭結膜熱は、院内感染や集団感染など、爆発的な感染を引き起こすことがある。また、HAdV-11 による出血性膀胱炎や DIC も造血幹細胞移植時に大きな問題となっている。HAdV 感染症に対する効果的な抗ウイルス剤は今のところないため、消毒薬による感染拡大の防止が重要である。

オゾンの殺菌、殺ウイルス能力はすでに広く知られている。我々は、2019年に、オゾン化アルコール製剤が高い殺HAdV効果を有することを報告した。一方、アルコール消毒薬は、対象素材の問題等によって使用が難しい場合もある。そこで、本研究では、オゾンアルコールではなく、オイル内に安定化させた薬剤の消毒薬としての能力を評価するため、アデノウイルスを用いて、抗ウイルス活性を評価した。既報と同様に30秒から5分間までの反応時間でウイルスの生存率を評価した。試験の結果、各HAdV型で若干の反応性の違いが確認されたが、薬剤の作用開始から30秒で70%以上ウイルスを死滅し、3分間にウイルス生存率を1/100に低下させ死滅させた。オゾン化ノンアルコール製剤は、殺HAdV効果を有することが確認できた。

Key words : アデノウイルス, オゾン化オイル製剤, ノンアルコール消毒剤

序 文

アデノウイルス (Human mastadenovirus (HAdV)) は A~G の 7 種に分類され、血清型や遺伝型として 100 を超える型が報告されている¹⁾。HAdV は、一般的な手指消毒薬には強い抵抗性を示す²⁾。HAdV は、1 ウイルスが存在するだけでも、ウイルスが増殖すると考えられており、感染力が高い³⁾。HAdV は、病棟閉鎖につながる院内感染など爆発的な感染を引き起こすことが知られている。近年、感染可能な HAdV が唾液や尿から長期間にわたって排出されていることも報告されている⁴⁾。HAdV 感染症に対する抗ウイルス薬は現在まで実用化されてないため、消毒薬による感染拡大の防止が重要である²⁾。

オゾンの殺菌、殺ウイルス能力は、すでに一般的に知られておりオゾン化水溶液による消毒は、上下道の水消毒にも使用されている⁵⁾。腸管系 HAdV として知られる 40 および 41 型の下水処理におけるオゾンの有効性も証明されている⁶⁾。オゾン使用のメリットは、高い抗バクテリア、抗ウイルス作用に限らず、トリハロメタン等の有機塩素化合物を作らず、除鉄、除マンガンが容易、臭気の除去ができる点である。一方、デメリットとしては、残留性がなく、効果が一時的であること(これらはメリットでもある)、比較的低濃度でも細胞毒性が強いこと、腐食性が強く、特にゴム・プラスチックを侵すことである。

近年、オゾンアルコール内に安定的にとどめた消毒薬 (アルタント)⁷⁾、オゾンオイル内にとどめた消毒薬 (イソタント)⁸⁾ が開発された [株式会社 E テック (神戸, 日本)]。本消毒薬は過酢酸、グルタル酸やフタル酸と同等以上の消毒効果を持ち、安全性は急性経口毒性、眼

¹⁾国立感染症研究所感染危機管理研究センター, ²⁾株式会社 E・テック医療機器開発研究所

刺激性、皮膚刺激性、変異原性、口腔粘膜刺激性試験で評価されている⁸⁾。芽胞菌 *Bacillus subtilis* やノロウイルス代替ウイルスである猫カリシウイルス *Feline calicivirus* 等に対する消毒薬効果が検証されており、広範での殺ウイルス効果があると推定されている⁷⁾。我々は、アルタントが高い殺 HAdV 効果を示すことを、日本で流行している主要な HAdV である 1, 2, 3, 4, 5, 6, 37, 53, 54, 56, 64, および 85 型、世界的に重症呼吸器疾患と関連して死亡率が高い 7 型、および出血性膀胱炎と関連する 11 型について既に報告した⁹⁾。しかし、アルコール消毒薬は、対象素材の問題等で使用が難しい場合がある。

そこで、本研究では、オゾンオイル内に安定化させたイソタント (ISOTANT)⁸⁾ の消毒薬としての能力を抗 HAdV 活性により評価した。

材料と方法

ウイルス調整

既報⁹⁾ に従い A549 培養細胞 (CCL-185, American Type Culture Collection (ATCC)) を用いた。細胞の培養には、Minimum Essential Medium 培地 (Eagle's MEM, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) に、非動化濾過滅菌牛胎児血清を 10%, 1% L-Alanine/L-Glutamine (200 mmol/L) (Wako Pure Chemical Industries (Wako), Osaka, Japan), 0.2% gentamicin sulfate solution (50 mg/mL) (Wako) および 0.1% amphotericin B (Wako) を添加した培地を用いた。ウイルスの培養には血清を 5% にした培地を用いた。ウイルスの増殖は顕鏡下での細胞変性効果 cytopathic effect (CPE) を指標とした。HAdV 株は ATCC 株や標準株を用いた⁹⁾。使用した株は咽頭結膜熱関連株として HAdV-1, -2, -3, -4, -5 と、-6 型急性呼吸器疾患と関連する HAdV-7 型、出血性膀胱炎と関連する HAdV-11 型、流行性角結膜炎と関連する HAdV-37, -53, -54, -56, -64, -85 型を用いた。試験用の感染性の HAdV 溶液として、CPE が観察できた培養液を 1,500 × g で 2 分間遠心し、上清を分注後 -80°C で保管した。

ウイルス定量と TCID₅₀ 測定

ウイルスの定量は既報⁹⁾ に従って Real time PCR 法で実施した。96well プレートの 1 ウェル当たり、 1×10^5 copy になるように調整した HAdV 溶液を 2 分の 1 段階希釈法で 23 段階希釈し、コンフルエントになった A549 細胞へ接種した。5% CO₂, 34°C のインキュベータで CPE の出現を 21 日間毎日観察した。Spearman-Kärber 法を用いて median tissue culture infective dose (TCID₅₀) / mL を算出した。

オゾン化オイル製剤の殺アデノウイルス効果判定法

オゾン化オイル製剤は基材がイソパラフィンであるた

め培地との混合には、イソタント 900 uL に対して、0.5% tween 80 を 100 uL 加え、1 分間ボルテックスした溶液をアッセイに使用した。対照として、イソパラフィン 900 uL に 0.5% tween 80 を 100 uL 加えて 1 分間ボルテックスした溶液を用いた。European Committee for Standardization: CEN¹⁰⁾ の EN 14476¹¹⁾ や既報⁹⁾ に従ってエンドポイントアッセイを行った。薬剤の培養細胞への影響を中和するために、薬剤とウイルス混合液に培養培地を添加し中和した。HAdV と薬剤溶液を 30 秒、1 分、3 分、5 分間混合し中和した混合溶液を 2 倍希釈で 23 段階希釈し 21 日間 CPE の観察を行った。すべてのアッセイを独立的に 2 回実施した。

結 果

イソタントは MEM 細胞生育培地で 1/2500 倍希釈した場合では、生育に影響を与えないことが分かった (data not shown)。HAdV の感染力価 (TCID₅₀) は、接種ウイルスコピー数を 1×10^5 に揃えて、求めた。培養後 14-18 日目、希釈限界点の Line 16 前後の時点での CPE の出現を観察し計算した。結果を表に示した。HAdV-54 型は、著しい増殖遅延を示すことから、培養後 Day18 目で観察した CPE を対象とした。株間での若干のばらつきがあった。感染力価はおおよそ 4.36 - 5.27 log₁₀ TCID₅₀/mL であった (表)。2 回の独立した試験では、結果に大きな差は認められなかった。CEN の EN-14476 を基に結果を判定し、表にまとめた。数秒での混合では、アルコール製剤ほどの抗ウイルス作用は確認できなかった。これは、使用している基材の影響と考えられ、アルコールと比較するとオイルとウイルス培養液との親和性が低いためと考えられた。

すべての HAdV 型で、3 分間の反応で 99.9% 以上の殺ウイルス効果が確認できた。5 分間の反応では、EN-14476 で抗ウイルス効果が規定される、 $>4 \log_{10}$ を、すべての試験した HAdV に対して示した。PCF 関連 HAdV (1, 2, 3, 4, 5, 6 型) では、1 分間の反応で 87.5~99.9% の殺ウイルス効果が確認できた。重症呼吸器疾患を関連する HAdV-7 は 30 秒間の反応でも 96.9% の高い殺ウイルス効果感受性を示した。出血性膀胱炎に関連する HAdV-11 も同様に高い感受性を示した。一方、EKC 関連 HAdV のうち、HAdV-37, -53, -54, -56, -64, および 85 で、感受性が PCF 関連 HAdV よりも低く、1 分の反応でも HAdV-53 および HAdV-64 は 75.0% の殺ウイルス効果のみ確認された。しかし同じ EKC 関連の HAdV-37, -54, -56, および 85 はおおよそ 90% 程度の殺ウイルス効果を示し、3 分間の反応では、すべて 99.8% 以上の殺ウイルス効果を示した。

表1 オゾン化オイル製剤の殺アデノウイルス (HAdV : Human adenovirus) 効果

| HAdV type | HAdV titer# Log TCID50/mL | 30''* | | 1'* | | 3'* | | 5'* | |
|-----------|------------------------------|-------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|--------|-------------------|--------|
| | | Log ₁₀ | % | Log ₁₀ | % | Log ₁₀ | % | Log ₁₀ | % |
| 1 | 4.97 | 1.20 | 93.75 | 1.81 | 98.44 | 3.61 | 99.98 | <4.97 | <99.99 |
| 2 | 4.97 | 0.60 | 75.00 | 1.51 | 96.88 | 3.61 | 99.98 | <4.97 | <99.99 |
| 3 | 4.36 | 1.51 | 96.88 | 2.11 | 99.22 | 3.61 | 99.98 | <4.36 | <99.99 |
| 4 | 4.36 | 0.90 | 87.50 | 3.01 | 99.90 | <4.36 | <99.99 | <4.36 | <99.99 |
| 5 | 4.67 | 0.60 | 75.00 | 0.90 | 87.50 | 3.61 | 99.98 | <4.67 | <99.99 |
| 6 | 4.97 | 0.60 | 75.00 | 1.20 | 93.75 | 2.71 | 99.80 | <4.97 | <99.99 |
| 7 | 4.36 | 1.51 | 96.88 | 2.71 | 99.80 | <4.36 | <99.99 | <4.36 | <99.99 |
| 11 | 4.67 | 1.20 | 93.75 | 2.71 | 99.80 | 3.61 | 99.98 | <4.67 | <99.99 |
| 37 | 4.97 | 0.60 | 75.00 | 0.90 | 87.50 | 3.61 | 99.98 | <4.97 | <99.99 |
| 53 | 4.97 | 0.60 | 75.00 | 0.60 | 75.00 | 3.61 | 99.98 | <4.97 | <99.99 |
| 54\$ | 4.36 | 0.60 | 75.00 | 0.90 | 87.50 | 3.61 | 99.98 | <4.36 | <99.99 |
| 56 | 5.27 | 0.60 | 75.00 | 1.51 | 96.88 | 3.61 | 99.98 | <5.27 | <99.99 |
| 64 | 4.97 | 0.60 | 75.00 | 0.60 | 75.00 | 2.71 | 99.80 | <4.97 | <99.99 |
| 85 | 4.97 | 0.60 | 75.00 | 0.90 | 87.50 | 3.61 | 99.98 | <4.97 | <99.99 |

* 30'' は 30 秒を, 1' は 1 分, 3' は 3 分, 5' は 5 分での反応時間を示す。
 #1 × 10⁵ copy の HAdV を培養細胞へ接種し, 培養 14-16 日前後の TCID50 値を求めた。
 \$ HAdV54 は増幅速度が遅いため, 培養後 18 日の TCID50 値を求めた。

考 察

現在 HAdV は 100 を超える型が報告されているが, そのほとんどの表現型が不明である¹⁾。HAdV に対する消毒薬の評価は, ほとんどが 3 型 (B 種) や 5 型 (C 種) と限られた型 (種) でのみ実施されている¹²⁾。近年世界的に組み換え HAdV が流行しているが, 多くの組み換え型の特徴は不明な点が多く, 消毒薬への感受性も不明である。一部の型で実施された報告では, HAdV の血清型によって消毒薬への反応が異なる²⁾ ので, 実際に日本で流行している型に対しての消毒薬の評価が必要である。先行研究では, オゾン化アルコール消毒薬の有効性を評価した⁹⁾。オゾン化アルコール製剤は培養細胞に対して細胞障害性を有するが, 0.5% のチオ硫酸ナトリウムを使用することで中和効果があることがわかった。一方, 本研究で用いたオゾン化オイル製剤では, 培地での 2500 倍希釈のみが有効な中和法であった。CEN の標準化基準 EN1276 におけるバクテリア等での消毒薬評価では, 中和剤が示されているが, ウイルスの場合, 培地成分が宿主細胞の生育に影響を与えるため使用できなかった⁹⁾。

長期間培養観察し, CPE 出現を指標とする本研究で用いたアッセイは, 対照群 (イソパラフィン添加群) と比較することによって, 完全な HAdV 殺効果のエンドポイントを確認できた。一般にウイルスの感染力価の設定は, TCID50, PFU (Plaque Forming Unit), ウィルスコピー数を用いる方法による。一種類のウイルスを用いた試験の場合, 通常一種類の方法で感染力価を固定できるが, 複数種のウイルスを用いた試験の場合, 各ウイルスの生育状況や増殖能力が異なるため共通した感染力

価設定は困難である。HAdV は型間での増殖速度に違いがあること¹⁴⁾, 型間での薬剤感受性が異なる¹⁾ ことから, ウィルス間での統一的な感染力価設定は困難である。そこで観測日を 21 日までとし, 期間内での各 HAdV 型各々の感染力価を算出した。反応ウィルス液を限界希釈し, CPE の観察を行う本方法では, 最大希釈でのウィルス減少率は, 殺ウィルス効果を示している。また, HAdV での 96 ウェルを用いた CPE は, 1 ウェルの CPE が特に HAdV-5 などでは, 1PFU と一致する。計算上 2 段階希釈系列の 16~17 レーン目が 1 ウィルスコピーになる。ほとんどすべての, 株で 14~16 レーンが CPE 出現の限界であった。本試験では, ウィルス核酸コピー数と, 感染力価では, 株間で異なりおおむね一致している型と, 10 倍程度の差がある型が認められた。これは, 以前の報告と一致していた¹³⁾。一般的に消毒薬は, 対象ウィルスやバクテリアが共存する現実の環境下では, 多くのタンパク質や塩などの影響で活性が大きく変化, 特に低下することが知られている¹²⁾。本試験では, 多くの血清成分が存在する条件で薬剤の評価を実施しており, より, 実際の環境に近い条件下での評価ができたと考えられた。しかし, 実際の食品や環境中での検査はできておらず今後の課題である。

本研究では PCF 関連 HAdV としては, HAdV-5 の感受性が少し弱く, オゾン化アルコール製剤の場合は HAdV-3 の感受性が低い⁹⁾ ことと違いが認められた。EKC 関連株が特徴的な反応を示したのは, 既報⁹⁾ と同様であり, EKC 関連型が有する宿主細胞への特異的な侵入機構に起因するかもしれない¹⁴⁾。オゾン化アルコール製剤ほどの抗ウィルス作用は確認できなかったが, す

すべての HAdV がオゾン化ノンアルコール製剤に強い感受性を示したことから、アルコール基材に代わるオイル製剤においても環境消毒等で強い有効性が期待できた。

オゾン化アルコール製剤と比較すると、数秒での混合では、アルコール製剤ほどの抗ウイルス作用は確認できなかった。これは、使用している基材の影響と考えられ、アルコールと比較するとオイルとウイルス培養液との親和性が低いためと考えられた。

以上より、各 HAdV 型で若干の反応性の違いが確認されたが、薬剤の作用開始から 1 分間でウイルス生存率を 1/10-1/100 に低下させ、5 分間ではウイルス減少を示し完全に死滅させていた。オゾン化ノンアルコール製剤 (ISOTANT) は、強い殺 HAdV 効果を有することが確認できた。

利益相反自己申告：本研究は国立感染症研究所と株式会社 E・テックとの共同研究契約に基づいて遂行された研究であるが、結果の解析や考察には影響を与えていない。共著者の吉田英一は、株式会社 E・テックの代表取締役である。

文 献

- 1) Vol.42, No.4 (No.494) April 2021 : <https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-vol42/10304-idx494.html> : 2021 年 7 月 16 日現在
- 2) Sauerbrei A, Sehr K, Brandstädt A, Heim K, Reimer P, Wutzler: Sensitivity of human adenoviruses to different groups of chemical biocides. *J Hosp Infect* 2004; 57: 59-66.
- 3) Enomoto M, Fujimoto T, Konagaya M, Hanaoka N, Chikahira M, Taniguchi K, *et al.*: Cultivation for 21 days should be considered to isolate respiratory adenoviruses from samples containing small numbers of adenoviral genomes. *Jpn J Infect Dis* 2010; 63: 338-41.
- 4) Hanaoka N, Itho S, Nojiri N, Konagaya M, Yasuda M, Deguchi T, *et al.*: Human Adenovirus B7d-Associated Urethritis after Suspected Sexual Transmission, Japan. *Emerg Infect Dis* 2020; 26: 2444-7.
- 5) Kosaka K, Yamada H, Shishida K, Echigo S, Minear A R, Tsuno F, *et al.*: Evaluation of the treatment performance of a multistage ozone/hydrogen peroxide process by decomposition by-products. *Water Res* 2001; 35: 3587-94.
- 6) Thurston-Enriquez JA, Haas NA, Jacangelo J, Gerba CP: Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Res* 2005; 39: 3650-6.
- 7) ALTANT: <http://www.e-teck.co.jp/product/p5/>. accessed July 7, 2021.
- 8) ISOTANT: <http://www.e-teck.co.jp/product/37/#anchor5>. accessed July 7, 2021.
- 9) Hanaoka N, Nojiri N, Takahashi K, Yoshida E, Fujimoto T: Evaluation of the Anti-Adenoviral Activity of ALTANT, an Ozonated Alcohol Disinfectant. *Jpn J Infect Dis* 2020; 73: 349-53.
- 10) European Committee for Standardization: <https://www.cen.eu/Pages/default.aspx>. accessed May 28, 2021.
- 11) EN14476: https://standards.cen.eu/dyn/www/f?p=204:110:0::FSP_PROJECT:69634&cs=148339425C3AEFAF3D8FAB7DAF73080E0. accessed May 28, 2021.
- 12) Kampf G: Efficacy of ethanol against viruses in hand disinfection. *J Hosp Infect* 2018; 98: 331-8.
- 13) Tsukahara-Kawamura T, Hanaoka N, Konagaya M, Uchio E, Fujimoto T: Characteristic of slow growth in cell culture of adenovirus type 54 causing nationwide outbreak epidemic keratoconjunctivitis in Japan. *Jpn J Ophthalmol* 2020; 64: 312-20.
- 14) Stasiak AC, Stehle T: Human adenovirus binding to host cell receptors: a structural view. *Med Microbiol Immunol* 2020; 209: 325-33.

[連絡先 : 〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
国立感染症研究所感染危機管理研究センター 第四室 花岡 希
E-mail: nozomu@nih.go.jp]

Evaluation of the Anti-adenoviral Activity of Ozonated Non-alcohol Disinfectant

Nozomu HANAOKA¹⁾, Eiichi YOSHIDA²⁾ and Tsuguto FUJIMOTO¹⁾

¹⁾*Center for Emergency Preparedness and Response, National Institute of Infectious Diseases,* ²⁾*E-TECH Co., Ltd*

Abstract

Human mastadenovirus (HAdV) is highly resistant to common hand disinfectants. Epidemic keratoconjunctivitis and pharyngoconjunctival fever cause explosive infections in confined spaces, leading to nosocomial infections and other mass infections. Hemorrhagic cystitis and DIC caused by HAdV is also a major problem during hematopoietic stem cell transplantation, and since there are currently no effective antiviral agents against HAdV infection, it is important to control the spread of infection using disinfectants.

The disinfecting and virucidal abilities of ozone are already well known. In 2019, we reported that ozonated alcohol agent has high virucidal potential. Contrarily, alcohol disinfectant is not a disinfectant that can be used universally; there are cases in which it cannot be used due to religious beliefs. Therefore, in this study, we evaluated the antiviral activity of the agent with ozone stabilized in oil using adenovirus to evaluate its ability as a disinfectant. The viability of the virus was evaluated through reaction times ranging from 30 s to 5 min. As a result of this study, slight differences in reactivity were observed among HAdV types, but more than 70% of the virus was killed within 30 s, and the virus survival rate was reduced to 1/100 within 3 min. It was confirmed that the ozonated oil disinfectant is capable of killing HAdVs.

Key words: human adenovirus, ozonated oil, non-alcohol disinfectant