

光触媒による SARS ウィルスの不活化効果の検証

Inactivation of SARS virus by photocatalyst

(¹株)ノリタケカンパニーリミテド、²東京医科歯科大学)

○杉山 高啓¹ 近藤 康市¹ 加藤 真示¹ 吉仲 由之² 山本 直樹²

1. 緒言

世界数十カ国で感染例が報告されている新型肺炎 (SARS : Severe Acute Respiratory Syndrome) ウィルスは、飛沫感染だけでなく空気感染の恐れもあるウィルスである。諸外国におけるSARS患者の多くが病院内で感染したとの報告からも院内感染防止への取り組みが求められる。

一方、酸化チタンの光触媒作用は、インフルエンザウィルスや MRSA などの病原体に対して、高い抗ウイルス・抗菌力を発揮することが確認されているが、未だ SARS ウィルスに対する酸化チタンの抗ウイルス性に関する詳細な報告は見当たらない。ノリタケではセラミックス製光触媒フィルターを用いて空気浄化への取り組みを行ってきた経緯があり、今回、東京医科歯科大学との共同研究によって酸化チタンによる SARS ウィルスの不活化効果を検証した。更にシンドビスウィルス (SV) を用いて光触媒作用によるウイルス不活化の機構について検討するとともに、光触媒フィルターを作製し、実際の空気清浄機に搭載して浮遊菌の除去性能を確認した。

2. 実験方法

ウイルス株はSARS-CoV、フランクフルト株 (FFM-1) を使用し、ウイルス増殖、ブラークアッセイとともにアフリカミドリザル腎由来の細胞株Veroを使用した。30 mm φ の光触媒板 (ノリタケ製TiO₂スラリーをコートしたソーダガラス) に20 μlのウイルス液を滴下し、カバーガラス (紫外線透過率87%) を乗せて3 mW/cm²の紫外線 (ブラックライト) を照射した。照射後、0.1%BSA (ウシ血清アルブミン FV、Sigma) 含有磷酸緩衝食塩水 (PBS) 1 mlにて光触媒板を洗い出し適宜希釈した。6穴培養プレート上で培養液を取り除いたVero細胞 (90%単層形成) に対して、ウイルス希釈液200 μlを接種した。更に細胞表面の乾燥防止のため、室温で10分置きにウイルス希釈液を攪拌し60分間感染させた。感染後、0.8%メチルセルロース (4,000centipoles、Sigma) を含むD-MEM (56°Cで30分非動化した5%FBSを添加) を重層し、CO₂インキュベーター内で静置した。4~5日後にメチルセルロース含有培養液を取り除き、PBSで洗浄後、2.5 %クリスタルバイオレット液 (2.5%、30%エタノール、1%蔥酸アンモニウム) で5分間染色した。次いで、染色液を取り除きPBSで2回洗浄後、安全キャビネット内で紫外線滅菌、乾燥した後に取り出して、ブラーク数をカウントし被検疫中のウイルス量をpfu/mlで算出した。また、精製したSVに対しても同様の試験を行った後、電子顕微鏡によりウイルス粒子の形態変化を観察した。

3. 結果・考察

図 1に紫外線の各照射時間における SARS ウィルスの不活化率を示した。光触媒板を用いた場合 (図 1中▲)、照射開始とともにウイルス濃度が著しく低下し、10 分後には 1×10^2 pfu/ml に達した。これは、紫外線照射のみ (同◆) と比較して 99.9%の不活化率である。照射時間 15 分以上では検出限界 (50 pfu/ml) 以下であった。また、光触媒作用と紫外線の抗ウイルス作用を含めて SARS ウィルスの不活化率を算出すると 15 分間で不活化率は 99.99%であった。以上の結果から、光触媒板は 3 mW/cm² の紫外線下で SARS ウィルスを短時間で不活化できることが明らかになった。

一方、図 2 は SV の不活化試験の結果である。こちらは SARS ウィルスと同様に不活化され、15 分の照射によって不活化率は 99.999998%になった。図 3 には各紫外線照射後の SV の TEM 写真を示した。紫外線未照射ではウイルスのエンベロープの一部であるスパイクが確認できた一方で、紫外線照射を行ったウイルスでは認められなかった。また、紫外線照射時間 10 分の写真では、染色液がウイルス内部に侵入していると考えられる。スパイクは宿主細胞に感染する際に宿主細胞と特異的に吸着するという重要な役割を担っており、光触媒によるウイルスの不活化はスパイク等のエンベロープが光触媒効果により破壊され、ウイルスの感染力が抑制されることによって起きていると推察できる。また、SARS ウィルスもスパイクを持っていることから、SV と同様な機構により不活化されたものと思われる。

次いで、この光触媒板と同様の方法でセラミックフィルター (ノリタケ製) に酸化チタンを担持し、

紫外線強度は試験と同様の 3 mW/cm^2 とした空気清浄機を作製した。この装置に 5m/s の風速で室内空気を流し、吸入側と排出側の浮遊生菌数を測定した（図4）。その結果、装置通過前後において浮遊生菌数は 94.5% 減少することが明らかになった。これは、フィルターへの吸着及び酸化チタンによる不活化効果によるものと考えられる。また、この装置を 45m^3 の空間（大人 6 人在室）で 1 時間運転することにより、浮遊生菌数が約 1/6 に減少することが確認できた。以上の結果から空気中に浮遊する SARS ウィルスを含むウイルス・細菌に対して、光触媒フィルターによって効果的に不活化除去できることが示唆された。

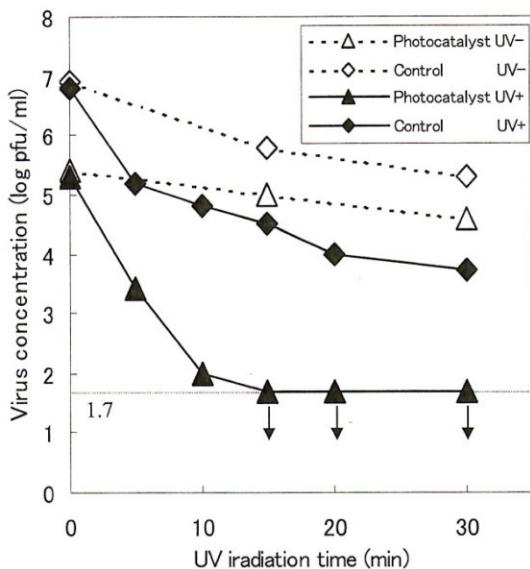


図 1. 各紫外線照射時間における SARS 濃度測定

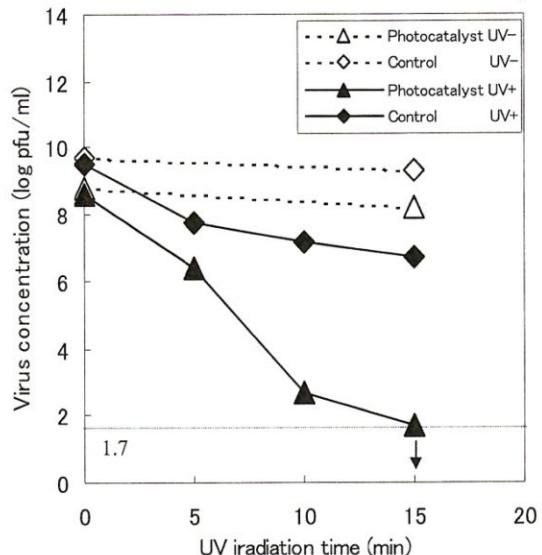
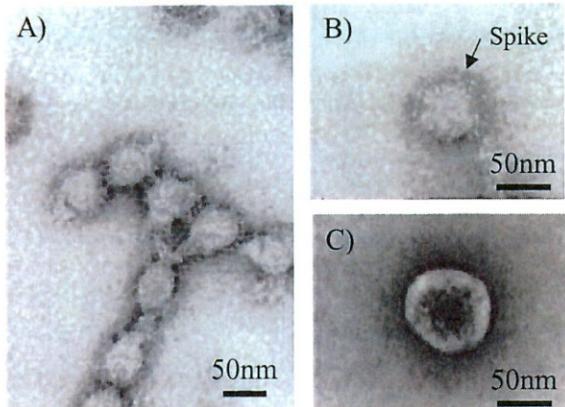


図 2. 各紫外線照射時間における SV 濃度測定



A) 実験に使用した SV
B) 紫外線未照射
C) 紫外線 10 分照射

図 3. TEM 観察結果

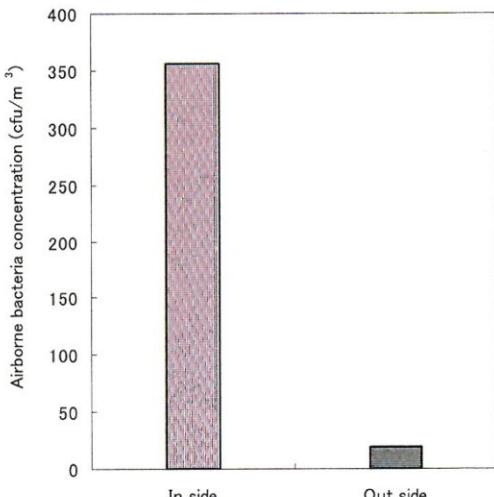


図 4. 空気清浄機 in-out 浮遊菌濃度

連絡先 〒451-8501 愛知県名古屋市西区則武新町三丁目 1 番 36 号

株式会社 ノリタケカンパニーリミテド

研究開発センター 杉山・近藤 Tel:052-561-7185 Fax:052-561-8167

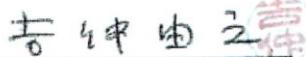
試験報告書

報告日 平成 16 年 11 月 1 日

国立大学法人 東京医科歯科大学

疾患遺伝子実験センター

助教授



[試験項目]

光触媒効果による SARS ウィルス不活化試験

[試験ウイルス株]

SARS-CoV フランクフルト株 (FFM-1)

[試験条件]

検 体 : 30mm φ 光触媒片 (㈱ノリタケカンパニーリミテド製)

光 源 : ブラックライトランプ (10W)

 照 射 条 件 : 検体から 1.5cm の距離から照射 (紫外線強度 : 2.8mW/cm²)

試験方法: 検体にウイルス液 20 μl を滴下し、乾燥防止のためにカバーガラスで覆った状態で所定時間紫外線照射を行った。照射後、1ml の 0.1%アルブミン含有 PBS (リン酸緩衝食塩水) にて検体を洗い出し、適宜希釈した。6穴培養プレート上で培養液を取り除いた Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎由来の細胞株 90% 単層形成) に対して、ウイルス希釈液 200 μl を接種した。更に細胞表面の乾燥防止のため、室温で 10 分置きにウイルス希釈液を攪拌し 60 分間感染させた。感染後、0.8%メチルセルロースを含む D-MEM (56°C で 30 分非動化した 5%FBS を添加) を重層し、CO₂ インキュベーター内で静置した。4~5 日後、メチルセルロース含有培養液を取り除いて、PBS で 1 回洗浄後、2.5%クリスタルパイオレットで 5 分間染色した。そして染色液を取り除いて、0.1%アルブミン含有 PBS で 2 回洗浄後、クリーンベンチ内で乾燥、及び UV 照射をした後にブラーク数をカウントし、ウイルス量を算出した。

[試験結果]

検体 (光触媒片) に対して紫外線を 10 分間照射することにより、対照 (紫外線照射) と比較して SARS ウィルスが 99.98% 不活化^{*1} した。(表 1)

表 1 SARS ウィルス不活化試験結果

試料		ウィルス量 ($\times 10^3$ pfu/ml)					
		0分	5分	10分	15分	20分	30分
対照 ^{*2}	遮光	1,000	—	—	650	—	200
検体	遮光	200	—	—	100	—	40
対照	紫外線照射	1,000	150	70 ^{*3}	30	10	5
検体	紫外線照射	200	2.5	0.1 ^{*3}	<0.05	<0.05	<0.05

*1 不活化率の算出方法・ 不活化率 = B / A × 100 (%)

*2 対照 30mm φ ガラス片