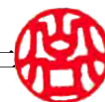


新型コロナウイルスに対するイオン交換法生成による次亜塩素酸水の効果

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 (エヴァウオーター)

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： 1.2×10^6 (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 (シQで希釈)

pH：5.85

方法：95ul エヴァウオーターに 5ul を添加し (6.0×10^4 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

6.0×10^4 PFU/ml x 10 分の 1 = 6.0×10^3 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、乾燥してブラックを数える。

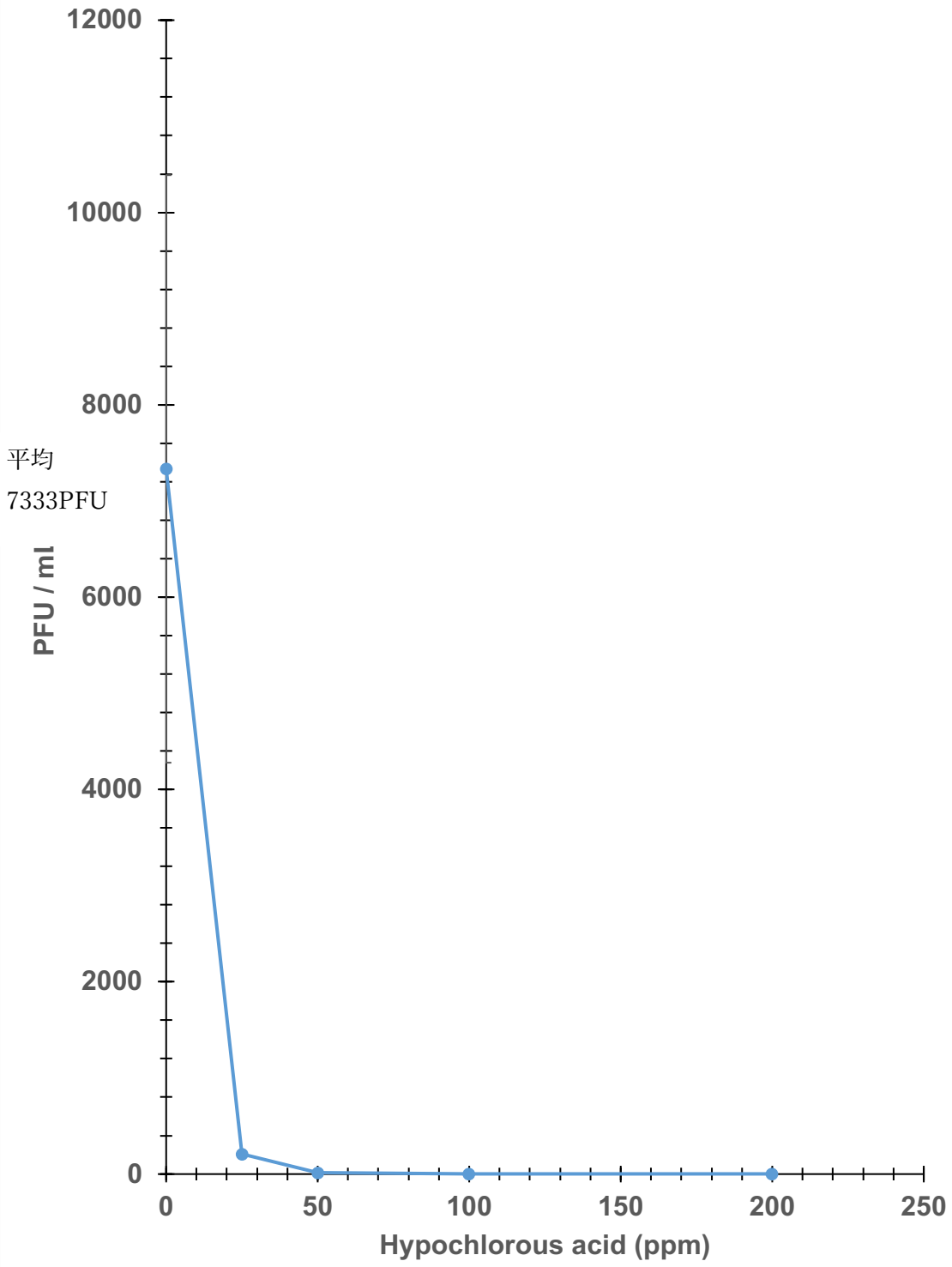
結論

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。

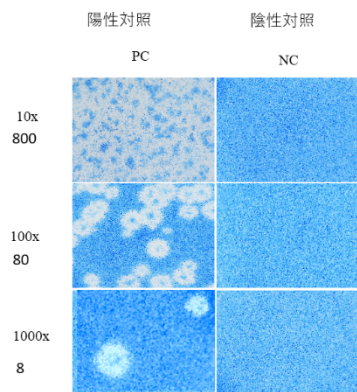
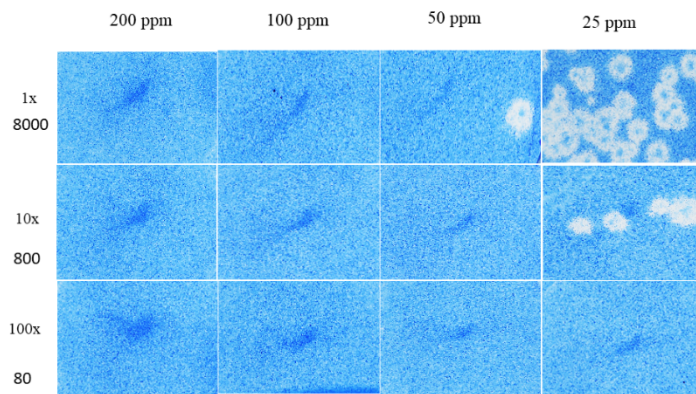
従って 25ppm で 97.2%、50ppm でほぼ 100%のウイルスを殺すことがわかった。

Vero cells



平均
7333PFU

以下は各希釈にみられたブラックの写真为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

ウイルスカ価： 1.2×10^6 （1200000） PFU/mL

プラックフォーミングユニット（ウイルスカ価の単位）
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カ価

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95 μ Lのエヴァウォーターにコロナウイルス液を5 μ L加え

μ L（読み方：マイクロリットル） \rightarrow 1 μ L=0.001mL、1000 μ L=1ml

約20 $^{\circ}$ Cの室内で60秒放置。その後、**ストップ液**900 μ L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500 μ L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**ブラック測定法**でウイルスカ価を測定する。

■ ※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ブ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（=エヴァウオ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ブ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ブラックはウイルス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ブ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500 μ l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. ブラックを数え、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個のブラックを作る**。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：ウイルスカ価**（= **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カ価を計測

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

左に行くほど、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カ価。

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80PFU/mL

※希釈倍率が大きいく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ブラックの数を計測する。**資料の写真から肉眼でブ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-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オ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オ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オーターを反応させず、**エヴァウオーターのみで実験を行い**エヴァウオ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い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以上のエヴァウオーターで、**ほぼ100%のコロナウイルスを殺せる**ことが分かった