

1
2 スーパーアルカリイオン水による SARS-CoV-2 とその他のウイルス、ならびにグラム
3 陰性細菌の効率的な不活化
4
5

6 鈴木陽一^{a, #, *}、日紫喜隆行^{b, #}、江見晶野^a、坂口翔一^a、板村論子^c、山本ライン^d、松澤民男^e、下遠野邦
7 忠^f、溝上雅史^f、中野隆史^a、山本直樹^{f, **}
8
9
10

11 ^a大阪医科薬科大学、医学部、微生物学教室、大阪府高槻市

12 ^b神奈川県衛生研究所、微生物部、神奈川県茅ヶ崎市

13 ^c東京大学大学院、新領域創成科学研究科、人間環境学専攻、東京都

14 ^dIntelligence for Medical and Nutritional Research、東京都

15 ^e株式会社Eプラン、千葉県船橋市

16 ^f国立国際医療研究センター、ゲノム医科学プロジェクト、千葉県市川市

17 [#]同等貢献度
18

19 *責任著者

20 **責任著者

21 Eメールアドレス : californiacircle@gmail.com (鈴木陽一)、lb-20yamamoto@hospk.ncgm.go.jp (山
22 本直樹)
23

要旨

病原体に汚染された環境内の空間および資材表面はしばしばヒトへの感染源となるが、消毒はその汚染レベルの低減に焦点を絞った一般的な介入法である。本試験では、無塩素、高 pH、高濃度溶存水素、および低酸化還元電位の独特な電解水であるスーパーアルカリイオン水 (SAIW) の、いくつかのウイルスおよび細菌を不活化する有効性を検証した。感染価アッセイでは、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス-2 (SARS-CoV-2)、A 型インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス 1 型、ヒトコロナウイルス、ネコカリシウイルス、およびイヌパルボウイルスを含むエンベロープ型ウイルスおよび非エンベロープウイルスの初期ウイルス力価が、SAIW 曝露後 30 秒以内に 2.9~5.5-log₁₀ の減少を示すことが明らかになった。同様に、3 種のグラム陰性細菌 (大腸菌、サルモネラ菌、およびレジオネラ菌) の増殖性も、SAIW 処理後 30 秒以内に 1.9~4.9-log₁₀ の減少を示した。さらに作用機序について検討したところ、SAIW 処理はベロ細胞に対する SARS-CoV-2 の結合 (Binding) およびそれに続く侵入 (Entry) の効率を有意に低下させることが認められた。

最後に、この塩素フリーの電解イオン水はマウスにおいて急性吸入毒性を示さず、SAIW はより安全な抗ウイルス・抗細菌消毒剤として有望であることが実証された。

キーワード : SAIW、消毒、無塩素、エンベロープおよび非エンベロープウイルス、グラム陰性細菌、SDGs

1. はじめに

ウイルスと細菌は、病院、学校、家庭、公共交通機関等の屋内環境で発生する感染症の一般的な原因であり [1]、それゆえヒトの健康に多大な影響を及ぼす。たとえば、現在のヒト感染症の約 60%はウイルスが原因であり、呼吸器系および消化器系ウイルスが最も多く疾病を引き起こしている [2,3]。とりわけ新型ベータコロナウイルスである重症急性呼吸器症候群コロナウイルス-2 (SARS-CoV-2) は、現在世界中で経済的および社会的混乱を巻き起こしている [4]。SARS-CoV-2 が引き起こす COVID-19 (新型コロナウイルス感染症) は、急性呼吸窮迫症候群、血管炎、血栓症、脳卒中、心筋損傷、および急性腎不全を含む多臓器不全等の重度の症状を伴うことが示されている [5,6]。寒い季節には、インフルエンザウイルスのような他の呼吸器系ウイルスに感染する人も多く、これらのウイルスは、上気道の軽い炎症から死に至るおそれのある急性肺炎まで、多様な呼吸障害を引き起こしうる [4]。また、ヒトコロナウイルス OC43 (HCoV-OC43) は、鼻と喉に上気道症状を引き起こす [7]。さらに、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は、主として口腔周囲または創傷、唾液および皮膚表面に存在する HSV-1 との接触を通じて、口腔ヘルペス感染症を引き起こす [8]。一方、ノロウイルスやパルボウイルスのような腸内ウイルスはエンベロープを持たず、エンベロープウイルスよりも消毒用アルコールや有機溶媒による不活化が困難である [9,10]。

グラム陰性細菌も臨床的に重要な病原体である [11]。ある種の大腸菌 (*Escherichia coli* [*E. coli*]) 株は、消化管、尿路、および他の身体部分に感染症を引き起こす。大腸菌感染症は、汚染食品の摂取、感染動物との接触、または水泳プールの汚染水の嚥下によって腸内で発生し、時として重度の出血を伴うこともある下痢と腹痛を引き起こす。レジオネラ (*Legionella*) 属は自然環境内に生息し、その宿主であるアメーバは人工の水循環装置内で増殖するので、噴水などには大量のレジオネラ菌が存在する。サルモネラ菌は、ヒト、ウシ、ブタ、ニワトリ、およびその他の家畜の腸内、ならびに自然界 (川や下水) に広く生息する。そのため、牛肉、豚肉、鶏肉、魚肉等の食肉も、このグラム陰性細菌の汚染源となる。

呼吸器系および腸内病原体の多くについては、それに対抗する抗生物質、抗ウイルス薬、およびワクチンがまだ存在しない。そこで、それらの蔓延を食い止める手段となりうるのが消毒剤である。消毒剤は、一般環境内、特に病院や介護施設において、脆弱な人々を感染症から守るための非常に効果的な手段として古くから利用されている [12]。米国疾病対策センター (CDC) は、感染症対策で用いる消毒剤として塩素 (次亜塩素酸ナトリウム) を推奨している (<https://www.cdc.gov/vhf/ebola/clinicians/non-us-healthcare-settings/chlorine-use.html>)。しかし、塩素は腐食性で刺激臭もあることから健康被害を引き起こすおそれがあり、長期使用に実用的なものとは言えない。今回の研究では、多様なエンベロープおよび非エンベロープウイルスならびにグラム陰性細菌を不活化する新規消毒剤として、SAIW (Super Alkaline Ionized Water [スーパーアルカリイオン水]) を評価した。SAIW は塩素系化学物質を含まないアルカリ性電解水である。重要なこととして、SAIW はごく少量の水酸化カリウム (KOH) しか含有せず、希釈によって容易に普通の水または塩水に戻すことができる。さらに、SAIW は無色透明、無臭でさび付きを起こさないため、環境に優しい消毒剤となる可能性がある。実験の結果は期待どおりであり、SAIW は極めて短い接触時間で強力な抗ウイルスおよび抗細菌効果を示した。またその作用機序として、SAIW 処理は、標的細胞への SARS-CoV-2 の結合 (Binding) および侵入 (Entry) 効率を顕著に抑制した。さらに SAIW は、動物およびヒトに対する *in vivo* テストでも

84 安全性が実証された。

85 2. 材料および方法

86 2.1. SAIW の調製

87 SAIW を生成するために、不純物を取り除く逆浸透 (RO) 膜を用いて水道水を精製し、その
88 精製水を、陽極と陰極を分ける陽イオン交換膜を設置した電解槽内で、電解質として食品等級
89 の炭酸カリウムを使用して電気分解した。この手順により、陰極側で SAIW が得られた。本試
90 験では、電解槽の陰極側に入れる原水の量を少なくして、pH 値が基準値よりも高い強力な電解
91 イオン水を生成した (JP2014/069980)。

92 2.2. 細胞およびウイルス

93 細胞培養は、いずれも 5%CO₂ 下の 37°C で実施した。Vero E6/TMPRSS2 細胞および MRC 細胞
94 (ヒト胎児線維芽細胞、ATCC #CCL-171) は、10%ウシ胎児血清 (FBS) 含有ダルベッコ改
95 変イーグル培地 (DMEM) で培養した。MDCK 細胞株 (NBL-2、イヌ腎、ヒューマンサイエン
96 ス研究資源バンク、JCRB 9029)、HEp-2 細胞株 (ヒト喉頭癌、大日本住友製薬株式会社)、お
97 よび CRFK 細胞株 (クランデル-リースネコ腎、大日本住友製薬株式会社) は、10%FBS 含有イ
98 ーグル最小必須培地 (MEM) を用いて培養した。イヌパルボウイルス (CPV) を用いた一部の
99 実験では、CRFK 細胞を 10%FBS 含有 DMEM で培養した。

100 COVID-19 患者から得られた SARS-CoV-2 の臨床分離株 2 株 (19-865 [ジーンバンクアクセ
101 ヶッション番号 LC546038.1] および OMC-510 [ジーンバンクアクセッション番号 LC633518])
102 は、Vero E6/TMPRSS2 細胞で増殖させた。A 型インフルエンザウイルス (H1N1 A/PR/8/34
103 [ATCC VR-1469]) および HSV-1 (KOS [ATCC VR-1493]) は、それぞれ MDCK 細胞および
104 HEp-2 細胞を用いて増殖させた。HCoV-OC43 (ATCC VR-759) は、MRC 細胞で増殖させて、
105 ウイルス感染価をプラーク形成アッセイで定量した。ネコカリシウイルス (FCV F-9 [ATCC
106 VR-782]) および CPV (北里環境科学センター [神奈川県相模原市] で保存) は CRFK 細胞で
107 増殖させた。

108 ウイルス感染価は、プラーク形成アッセイ (SARS-CoV-2) またはリード-ミュンヒ式を用
109 い、適切な細胞を使用して、50%組織培養感染量 (TCID₅₀) アッセイ (インフルエンザウイル
110 ス、HSV-1、HCoV-OC43、FCV、および CPV) により普通のように定量した。

111 2.3. 抗ウイルス能アッセイ

112 SARS-CoV-2 (19-865) サンプルは、10 倍量の SAIW または滅菌水で処理した。30 秒間また
113 は 2 分間のインキュベーション後、混合物を 10%FBS 含有 DMEM で 10 倍に希釈し、その希釈
114 物を、96 ウェルプレートに 5 x 10⁴/ウェルの細胞数で播種した Vero E6/TMPRSS2 細胞に接種し
115 た。接種から 2 時間後に細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、10%FBS 含有 DMEM
116 で培養した。SARS-CoV-2 の複製量を測定するため、接種から 48 時間後の培養上清からウイル
117 ス RNA を抽出し、SARS-CoV-2 ゲノムのヌクレオカプシド領域に特異的なプライマー/プロー
118 ブセットを用いた定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) 分析を実施した [13]。

119 その他のウイルスの SAIW 処理は、SAIW (または滅菌水) とウイルスサンプルを 10 : 1 の
120 割合で混合し、室温で 30 秒間から 5 分間置くことにより実施した (HCoV-OC43 および CPV 以
121 122 123

124 外)。

125 培養後、混合物を培地で 10 倍に希釈して反応を中和し (CPV 以外)、それをそれぞれの培養
126 細胞に接種して TCID₅₀ アッセイによりウイルス力価を測定した。HCoV-OC43 については、ウ
127 イルスサンプルを 0.2%FBS 含有 DMEM で段階希釈したものを 30 μ l と 30 μ l の SAIW を混合し
128 た。培養後、180 μ l の SCDLP 培地を加えて反応を中和し、その混合物 100 μ l を 96 ウェルプレ
129 ートの MRC5 細胞に接種した。1 時間の曝露の後、細胞を PBS で洗浄し、0.2%FBS 含有
130 DMEM で培養した。接種から 96 時間後に細胞をメタノール固定してメチレンブルー染色し、
131 HCoV-OC43 感染による細胞死を分析した。

132 CPV の抗ウイルスアッセイは、100 μ l のウイルスサンプルと 900 μ l の SAIW を混合すること
133 により実施した。インキュベーション後、混合物を pH 7 の 200 mM リン酸緩衝液で 10 倍に希
134 釈して反応を中和した。PBS を用いてこの混合物の段階希釈を調製し、その 50 μ l を 5%FBS 含
135 有 DMEM の CRFK 細胞に接種した。ウイルス力価は、接種から 7 日後の培養上清のウイルス
136 血球凝集活性による TCID₅₀ として測定した。

137 138 2.4. プラーク減少アッセイ

139 2.5 x 10⁵ PFU のウイルスを含有する SARS-CoV-2 (OMC-510) サンプル 25 μ l を、225 μ l の
140 SAIW (または滅菌水) とともに室温で 30 秒間から 5 分間インキュベートした。インキュベー
141 ション後、この混合物を 30 μ l の 10%FBS 含有 DMEM で中和した。その後、この混合物の 10
142 倍段階希釈の 200 μ l を用いてプラーク形成アッセイを実施した。

143 144 2.5. バインディング (結合) およびエントリー (侵入) アッセイ

145 1.25 x 10⁶ PFU のウイルスを含有する SARS-CoV-2 サンプル 25 μ l を 225 μ l の SAIW (または
146 滅菌水) とともに室温で 2 分間インキュベートした。次にそれを培養した Vero E6/TMPRSS2 細
147 胞 (6 ウェルプレートに 5 x 10⁵/ウェルの細胞数で前日に播種したもの) に 2 ml の DMEM とと
148 もに添加して、氷冷 (バインディング) または 37°C (エントリー) で 2 時間静置した。曝露後
149 の細胞を低温 PBS で 3 回洗浄し、結合していない、または細胞内に侵入していないウイルスを
150 除去した。その後、全 RNA を抽出し、RT-qPCR により細胞結合型 SARS-CoV-2 の RNA を検出
151 した。

152 153 2.6. 抗細菌活性

154 *E. coli* (NBRC 3972) または *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*, GIFU 9134) のサンプル
155 溶液 100 μ l を 10 ml の SAIW と混合して 20°C で 30 秒間から 15 分間置いた後、1 ml あたりのコ
156 ロニー形成単位 (CFU) として生菌数を計数した。生菌数の計数には、B-CYE α 寒天培地 (栄
157 研化学株式会社) を用いた平板塗抹培養法 (35°C、7 日間) を使用した。事前に、被験液を培
158 地で 10 倍に希釈することが生菌数の計数に影響しないことを確認しておいた。

159 *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (*S. arizonae*, ATCC 13314) については、100 μ l の菌液を 10
160 ml の SAIW に添加し、この混合物を 20°C で 30 秒間から 15 分間静置した。その後、各混合物
161 の 1 ml をメンブレンフィルター (孔径 0.45 μ m) に通し、滅菌精製水で洗浄した。このフィル
162 ターを栄養寒天培地に接着させて 35°C で 2 日間培養し、CFU/ml として 1 ml あたりの生菌数を
163 計数した。陽性対照として 150 ppm の次亜塩素酸ナトリウムを用いて同じ操作を実施した。

2.7. 急性吸入毒性

山下らの方法 [14] に従い、ICR 系マウス 10 匹 (雌雄 5 匹ずつ) を容積 0.5 m³ (H120 x D60 x W70 cm) の実験槽の中で SAIW 原液に全身曝露させた。実験槽の中央に金網ケージを設置し、そこにマウスを収容した。曝露は、超音波加湿器を用いて、強の設定で以下の順に行った: 1) 10 分間隔で 20 秒間の噴霧を 3 回行った。2) 30 分間の回復時間を設けた。3) 10 分間隔で 20 秒間の噴霧を 3 回行った。4) 10 分後、5 分間隔で 20 秒間の噴霧を 4 回行った。曝露後 14 日間、動物の生死と一般状態を観察するとともに、体重と摂餌量を測定した。その後、各種臓器の肉眼的観察と肺の病理組織学的検査のため、剖検を実施した。本試験は、株式会社薬物安全性試験センター (埼玉県吉見町) の動物実験倫理規定に準じて適正に遂行した。

2.8. 皮膚パッチテスト

登録した被験者は日本人成人 22 例 (女性 17 例および男性 5 例、本試験への同意の時点で 20 ~60 歳) であった。使用した方法は 24 時間の閉鎖貼付試験であり、観察期間は 3 日間であった [15]。皮膚パッチテストテープに適量 (約 0.03 ml) の被験溶液を含ませ、被験者の背部に貼付した。その 24 時間後にテープを除去してデジタルカメラで写真を撮影し、医師が基準に従って皮膚を評価した (テープ除去の 1 および 24 時間後)。対照として生理食塩水と白色ワセリンを適用した。

本試験のデザインは、ヘルシンキ宣言の倫理的原則を遵守しており、株式会社 SOUKEN (東京都) の倫理委員会に承認されている。パッチテストの前に被験者一人一人から書面でインフォームドコンセントを取得した。被験者には事前に、本試験に参加するか否かは被験者の自由であり、参加に同意しなくとも被験者が不利益を被ることはないことを十分に説明した。パッチテストを実施する前に、被験者の健康状態を、過去の重度の既往歴または皮膚疾患がないことを含めて確認した。

3. 結果

3.1. 新規電解水 SAIW の特性

本試験で調製した SAIW (名称イーウォッシュ) は、溶存水素が高濃度の電解アルカリ水であり、その成分は 99.83% が水、0.17% が KOH である。生成直後の SAIW は遊離塩素を含有せず (検出限界未満)、その酸化還元電位、溶存水素濃度、および pH 値はそれぞれ -700 ~ -900 mV、423 ppb、および 12.5 (約 ±3%) であった。SAIW の平均 pH は、密封状態で 180 日間以上、開封状態で 48 日間以上にわたりほぼ同一で安定していた。

3.2. SAIW による SARS-CoV-2 の不活化

本試験では、第一に SARS-CoV-2 の感染性に対する SAIW 処理の効果を検討した。10 倍量の SAIW で 2 分間処理した SARS-CoV-2 を Vero E6/TMPRSS2 細胞に接種した場合、接種から 48 時間後の培養上清中に検出されたウイルス RNA 量は、滅菌水 (対照) 処理のウイルスサンプルを接種した場合の 10 万分の 1 (5-log₁₀ の減少) であった (図 1A)。SAIW への曝露はビリオン表面の組成物を不活化すると推測されたため、次に SAIW 処理ウイルスのプラーク減少アッセイを実施した。図 1B は、SAIW ではわずか 30 秒間の処理でも SARS-CoV-2 感染によるプラ

204 ーク形成は認められなかったのに対し、滅菌水による前処理では多くのプラーク形成が認めら
205 れたことを示している。

206 次に、ウイルスのバインディング（結合）段階とエントリー（侵入）段階の効率を評価した
207 [16]。すなわち、Vero E6/TMPRSS2 細胞を、SAIW または対照液で処理を施した SARS-CoV-2
208 に氷冷（バインディングアッセイ）または 37°C（エントリーアッセイ）で 2 時間曝露し、低温
209 PBS で洗浄した後、細胞結合型ウイルスの RNA を RT-qPCR で検出した。その結果は、対照処
210 理と比較して SAIW 処理はウイルスの結合プロセスおよびそれに続く侵入プロセスの効率を有
211 意に低下させることを示すものであった（図 1C）。これらのデータを考え合わせると、SAIW
212 処理は SARS-CoV-2 の感染性を制限するが、それはウイルスの細胞接着活性をほぼ完全に失わ
213 せることによるものである可能性が高いと言える。

214 215 3.3. 他のエンベロップおよび非エンベロップウイルスに対する抗ウイルス活性

216 3 種のエンベロップ型ウイルス（A 型インフルエンザウイルス、HSV-1、および HCoV-
217 OC43）ならびに 2 種の非エンベロップ型ウイルス（FCV および CPV）の不活化についても
218 SAIW の有効性を評価した。表 1 に示したとおり、30 秒間の SAIW 処理により、A 型インフル
219 エンザウイルス、HSV-1、HCoV-OC43、FCV、および CPV でそれぞれ 5.5-、3.5-、4.5-、4.5-、
220 および 2.9-log₁₀ PFU/ml または TCID₅₀/ml の感染価の減少が達成された。

221 222 3.4. 抗細菌活性

223 SAIW の抗菌効果は、軟寒天で細菌を培養することによって検証した。*E. coli*、*S. arizonae*、
224 および *L. pneumophila* の 3 種のグラム陰性細菌株を SAIW に 30 秒間曝露したところ、それぞれの
225 菌浮遊液で 4.9-、1.9-、および 2.4-log₁₀ の菌数減少が認められた（表 2）。

226 227 3.5. マウスにおける SAIW の急性吸入毒性

228 ICR マウスを用いて SAIW の急性吸入毒性を検証したところ、雄 5 匹および雌 5 匹のマウス
229 において異常や死亡は認められなかった。体重については、曝露の 1 日後に、雄は 5 匹中 4 匹
230 が減少（0.2、0.4、0.5、および 0.8 g）を示したが、雌で減少を示したのは 5 匹中 1 匹（0.4 g）
231 であった。減少量の平均は 0.25 g、範囲は 0.2~0.8 g であった。ただし、これらのマウスは曝露
232 の 2 または 3 日後に体重増加も示した。14 日間の体重増加量の平均は、雄で 6.58 g、雌で 4.86
233 g であり、対照マウスと同一の傾向を示した。14 日後の体重は、非曝露マウスのものと差がな
234 かった。試験期間中の摂餌量は、雄で 4.2~5.4 g/匹/日、雌で 3.8~4.4 g/匹/日であり、対照マウ
235 スとの間に差は見られなかった。雌雄ともに、剖検時の異常も病理組織学的検査での異常も認
236 められなかった。

237 238 3.6. ヒトにおける皮膚パッチテスト

239 年齢 20~60 歳のヒト志願被験者において、SAIW および対照を連続 24 時間適用する閉鎖パ
240 ッチテストを実施した。その結果、皮膚刺激指数はすべての被験者でゼロであることが確認さ
241 れた。

242 243 4. 考察

244 本試験で私たちは、独特な電解水である SAIW が、エンベロープ型および非エンベロープ型
245 ウイルスならびにグラム陰性細菌に対して効果的な、安全な消毒剤であることを実証した。こ
246 れまで主に試験されてきたのは酸性電解水による抗細菌効果であり、それらの試験の多くは電
247 解水中の遊離塩素 (FAC) の効果に着目していた [17,18]。最近、250 ppm の FAC を含有する中
248 性電解水 (pH 7) が、1 分間の曝露でヒトノロウイルス RNA コピー数を 4.8-log₁₀ 減少させる
249 ことが報告された [19]。また、ブイらは、1.0 ppm の FAC を含有するアルカリ性電解水 (pH
250 12.1) を用いて口蹄疫ウイルスに対する強力な殺ウイルス活性を示したが、その効果は溶液中
251 の塩素レベルとは無関係であることを示唆している [20]。SAIW の際立った特徴の一つは、こ
252 の電解水が塩素系化学物質を一切含有しないことである。さらに、SAIW は無色、無臭、透
253 明、非刺激性、かつ非腐食性である。SAIW は希釈によって容易に水または塩水に戻るため、
254 極めて環境に優しい物質である。加えて、SAIW は長期間 (数か月間以上) にわたり化学的に
255 安定している。SAIW 生成器は市販されており、水道水と炭酸カリウムを使って現場で容易に
256 新鮮な電解水を生成することができるという利点があるため、万一のための防災の備えにも貢
257 献している。本試験で示した *in vivo* 安全性プロファイルを考えると、SAIW は浸漬洗浄液とし
258 てだけではなく、アルコールの使用が許容されない場面における消毒剤としても役立つことが
259 期待される。

260 SAIW がどのようにしてウイルスや細菌を不活化するのかを検討することは興味深い。pH を
261 変えることによるウイルス粒子の変性機構は、タバコモザイクウイルス (TMV) を用いて広く
262 試験されている [21]。電子顕微鏡を用いた試験で、pH 6.8 では均質な TMV 粒子が、低水素イ
263 オン濃度下では凝集は見られないが、桿状ウイルス粒子が折れちぎれ、TMV 粒子の均質性が低
264 下することが示されている [22]。さらに重要なのは、pH 12.4 ではウイルスの桿状構造が破壊
265 されて小さな球状沈着物となり、感染性と抗原性がともに完全に失われることであった [22]。
266 精製した非エンベロープ型のポリオウイルスを用いた同様の試験は、ウイルス粒子を pH 10.0
267 で処理するとウイルスカプシドから VP4 カプシドタンパク質が豊富に含まれる微量構成要素が
268 遊離した。残ったカプシド構造はウイルス RNA を含まない空のカプシドであるにもかかわらず
269 無変化のものと同一の H 抗原性を示した。しかし、pH 12.0 では、より小さな構成要素に分
270 解して、H 抗原性を示さなくなった [23]。これらの結果は、ウイルス粒子の基本構造と抗原性
271 がアルカリ性処理によって大きく損なわれることを示している。今回の試験では、強アルカリ
272 性の SAIW (pH 12.5) が、すべての被験ウイルスの感染性を強力に阻害し (図 1A および表
273 1)、SARS-CoV-2 の標的細胞への結合能を不活化することが示された (図 1C)。同様に、3 種の
274 グラム陰性細菌の発育も、SAIW 処理によってほぼ完全に阻止された (表 2)。ウイルス感染お
275 よび細菌感染は繊細で微妙な事象であり、それらの生物学的活性は生理的 pH 近くで効率的に
276 発揮されるため、病原体の致命的な生物学的変化はそのタンパク質成分が変性する前に起こる
277 と考えられる。

278 結論として、SAIW は効果的かつ安全な消毒剤として有望である。SAIW はほとんどの水と
279 無視できるほど微量の KOH から成っているため、塩素や刺激臭を発生させることがなく、危
280 害や応急処置の必要性をもたらすこともない。また、SAIW は電源さえあればどこでも容易
281 に生成できるため、利用可能性が立地条件に左右されることもない。SAIW は水で薄めると pH
282 が中性になって自然水に戻るため、SDGs の達成要件をよく満たし、環境に優しく持続可能な
283 消毒剤である。以上のことから、私たちは今後、SAIW が将来の感染症対策のための新しい消

284 毒剤として役立つかどうか、特に限られた空間において SAIW の噴霧が空気と環境の安全
285 な除染に適合するかどうかの検討に向けて、研究を進めて行く予定である。

286
287 **競合する利益の宣言**

288 松澤民男は株式会社 E プランの従業員である。

289
290 **謝辞**

291 著者らは、洞察に富んだ技術的助言を与えてくれた松澤竜輔に心よりの謝意を表す。本
292 研究は、日本医療研究開発機構（AMED）の課題番号 JP19fk0108104 の支援を受けて実施
293 した。

296 参考文献

- 297 [1] バーカー, J., スティーブズ, D., ブルームフィールド, S.F.. 公共施設内および家庭
298 内におけるいくつかの一般的なウイルス感染症の広がり と 予防. ジャーナル・オブ・アプ
299 ライド・マイクロバイオロジー. 91 (2001) 7-21.
300
- 301 [2] ウォーカー, C.L.F., ルダン, I., リュー, L., ネア, H., セオドラトゥ, E., ブッタ,
302 Z.A., オブライエン, K.L., キャンベル, H., ブラック, R.E.. 小児の肺炎および下痢の
303 世界的負担. ランセット. 381 (2013) 1405-1416.
304
- 305 [3] ブーン, S.A., ガーバ, C.P.. 呼吸器系および腸内ウイルス性疾患の広がりにおける媒介
306 物の意義. アプライド・アンド・エンバイロンメンタル・マイクロバイオロジー. 73
307 (2007) 1687-1696.
308
- 309 [4] ピーターセン, E., クープマンズ, M., ゴー, U., ハマー, D.H., ペトロシロ, N., カス
310 テリ, F., ストーガード, M., カリリ, S.A., シモンセン, L.. SARS-CoV-2 パンデミック
311 と SARS-CoV およびインフルエンザパンデミックの比較. ランセット・インフェクシ
312 ャス・ディジーズ. 20 (2020) e238-e244.
313
- 314 [5] ウー, C., チェン, X., ツァイ, Y., シア, J., ジョウ, X., シュー, S., ホワン, H.,
315 ジャン, L., ジョウ, X., ドウ, C., ジャン, Y., ソン, J., ワン, S., チャオ, Y., ヤ
316 ン, Z., シュー, J., ジョウ, X., チェン, D., ション, W., シュー, L., ジョウ, F.,
317 ジャン, J., バイ, C., ジェン, J., ソン, Y.. 2019 年中国武漢の新型コロナウイルス感
318 染症患者における急性呼吸窮迫症候群および死亡に関連する危険因子. JAMA インター
319 ナル・メディシン. 180 (2020) 934-943.
320
- 321 [6] コランツォーニ, A., マティーニ, R., カプラリ, P., バレストリ, M., カペッキ,
322 P.L., ナツソ, A., プレスティ, R.L., マルコッキア, A., ロッシ, M., カイミ, G.,
323 COVID-19 敗血症および微小循環機能障害. フロンティアズ・イン・フィジオロジー. 11
324 (2020) 747.
325
- 326 [7] オギミ, C., キム, Y.J., マーティン, E.T., ハ, H.J., チウ, C.-H., イングランド,
327 J.A.. 旧型コロナウイルスの最新情報. ジャーナル・オブ・ザ・ペディアトリック・イン
328 フェクシャス・ディジーズ・ソサイアティ. 9 (2020) 210-217.
329
- 330 [8] ガーランド, S.M., スティーベン, M.. 陰部ヘルペス. ベスト・プラクティス・アン
331 ド・リサーチ: クリニカル・オブステトリクス・アンド・ガynecology. 28 (2014)
332 1098-110.
333
- 334 [9] ハウイー, R., アルファ, M.J., クームズ, K.. 表面上の生存についてのエンベロープお
335 よびノンエンベロープウイルスとその他の微生物の比較ならびに準最適消毒剤曝露の影

響. ジャーナル・オブ・ホスピタル・インфекション. 69 (2008) 368-376.

- [10] ベニヤイ, K., エステズ, M.K., マルテラ, V., パラチャー, U.D.. ウイルス性胃腸炎. ランセット. 392 (2018) 175-186.
- [11] ホームズ, B., コスタズ, M., ガナー, M., オン, S.L., ステューブズ, M.. いくつかの臨床的に重要なグラム陰性細菌の生物学的同定システムの評価. ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクロバイオロジー. 32 (1994) 1970-1975.
- [12] ルタラ, W.A., ウィーバー, D.J.. 医療機関における消毒と滅菌: 総括と現在の問題点. インフェクシャス・ディゼイズ・クリニックス・オブ・ノース・アメリカ. 30 (2016) 609-637.
- [13] シラト, K., ナオ, N., カタノ, H., タカヤマ, I., サイトウ, S., カトウ, F., カトウ, H., サカタ, M., ナカツ, Y., モリ, Y., カゲヤマ, T., マツヤマ, S., タケダ, M.. 日本における新型コロナウイルス (nCoV-2019) の遺伝子診断法の開発. ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・インフェクシャス・ディゼイズ. 73 (2020) 304-307.
- [14] ヤマシタ, M., タナカ, J.. CD-I 系雌マウスにおける防水スプレーエアロゾルの吸入による肺虚脱および肺炎. ジャーナル・オブ・トキシコロジー. クリニカル・トキシコロジー. 33 (1995) 631-637.
- [15] ワールバーグ, J.E., リンドバーグ, M.. パッチテスト. 収載書: フロッシュ, P.J., メンネ, T., レポイトヴァン, J.P. (編) 接触皮膚炎 (Contact Dermatitis), 第4版, Springer 社, ドイツ, 2005, pp366-386.
- [16] ホンウィチト, S., ソンジャイ, W., ジトバオン, K., グリーンウッド, M., グリーンウッド, M.P., ヒタカルン, A., ウィカン, N., マーフィー, D., スミス, D.R.. GRP78 とジカウイルス E タンパク質の機能的相互作用. サイエнтиフィック・リポート. 11 (2021) 393.
- [17] フリコバ, D., スティーン, R., ツヴァイフェル, C.. 電解水および食品産業へのその適用. ジャーナル・オブ・フード・プロテクション. 71 (2016) 1934-1947.
- [18] オグニー, A.D., ダンディー, C.E., フェロ, S., ホール, B., ドリゴ, B., ブルネット, G., ヴェンター, H., マイアズ, B., デオ, P., ドナー, E., ロンビ, E.. 中性電解酸化水とその他の塩素系消毒剤の抗細菌活性の比較. サイエнтиフィック・リポート. 9 (2019) 19955.
- [19] ムアマン, E., モンタゼリ, N., ジェイカス, L.. ヒトノロウイルスの不活化についての

376 中性電解水の有効性. アプライド・アンド・エンバイロンメンタル・マイクロバイオロ
377 ジー. 83 (2017) e00653-17.

378
379 [20] ブイ, V.N., グエン, K.V., ファム, N.T., ブイ, A.N., ダオ, T.D., グエン, T.T., グエ
380 ン, H.T., トリン, D.Q., イヌイ, K., ウチウミ, H., オガワ, H., イマイ, K.. 口蹄疫
381 ウイルスの消毒についての電解水の可能性. ジャーナル・オブ・ヴェテリナリー・メデ
382 イカル・サイエンス. 79 (2017) 16-0614.

383
384 [21] ペルツ, M.. タンパク質における静電効果. サイエンス. 201 (1978) 1187-1191.

385
386 [22] 四方英四郎. 煙草モザイク病ウイルスに対する pH 値の影響. 北海道大学大学院農学研究
387 院邦文紀要. 3 (1958) 154-161.

388
389 [23] カタギリ, S., アイカワ, S., ヒヌマ, Y.. アルカリ処理によるポリオウイルスカプシド
390 の段階的分解. ジャーナル・オブ・ジェネラル・ヴァイロロジー. 13 (1971) 101-109.
391 <https://doi.org/10.1099/0022-1317-13-1-101>.

図キャプション

図 1. SAIW による SARS-CoV-2 の感染性の不活化。(A) 複製アッセイ。SARS-CoV-2 を 10 倍量の SAIW または滅菌水 (対照) に 30 秒間から 2 分間曝露し、Vero E6/TMPRSS2 細胞に接種した。SARS-CoV-2 の複製を、ウイルスゲノムのヌクレオカプシド領域に特異的なプライマー/プローブセットを用いた RT-qPCR 分析でウイルス RNA 量を測定することにより評価した。

(B) プラーク減少アッセイ。SARS-CoV-2 を SAIW または滅菌水 (対照) で 30 秒間から 5 分間処理し、Vero E6/TMPRSS2 細胞を用いてプラーク形成アッセイを実施した。曝露から 2 日後のプラーク形成の代表的な画像を示した。(C) バインディングおよびエントリーアッセイ。

SARS-CoV-2 と SAIW または滅菌水 (対照) を 1:9 の割合で混合して 2 分間置き、それを Vero E6/TMPRSS2 細胞に接種して氷冷 (バインディングアッセイ) または 37°C (エントリーアッセイ) で静置した。2 時間後、細胞を低温 PBS で 3 回洗浄し、その直後に全 RNA を分離した。細胞結合型 SARS-CoV-2 の RNA を RT-qPCR 分析で検出した。3 回の独立実験の平均値を、標準偏差を示すエラーバーとともに示した。統計学的有意差は、JMP Pro ソフトウェア (SAS インスティテュート) を用いてスチューデント t 検定により判定した: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。0.05 未満の P 値を有意とみなした。

表 1. 各種エンベロップおよびノンエンベロップウイルスの感染性に対する SAIW の阻害効果^a

ウイルス	処理	曝露時間 (秒)					
		0	30	120	180	300	
エンベロップ型ウイルス	A 型インフルエンザウイルス H1N1 A/PR/8/34	対照	1×10^7	— ^b	$1 \times 10^{7.3}$	—	—
		SAIW	—	$< 32^c$	< 32	—	—
	単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) KOS	対照	1×10^5	—	$1 \times 10^{5.8}$	—	—
		SAIW	—	$< 32^c$	< 32	—	—
	ヒトコロナウイルス (HCoV) OC43	対照	1×10^6	—	—	—	—
		SAIW	—	$< 32^c$	< 32	—	—
非エンベロップ型ウイルス	ネコカリシウイルス (FCV) F9	対照	1×10^6	—	—	—	$1 \times 10^{5.7}$
		SAIW	—	$< 32^c$	—	—	< 32
	イヌパルボウイルス (CPV)	対照	6.3×10^4	—	—	6.2×10^4	—
		SAIW	—	72	$< 63^c$	—	—

^a ウイルス力価は TCID₅₀/ml によって計数した。

^b 計数せず。

^c 検出限界未満。

表 2. グラム陰性細菌の生存能に対する SAIW の阻害効果 ^a


細菌	処理	曝露時間 (秒)			
		0	30	300	900
<i>Escherichia coli</i>	対照	8.6 × 10 ⁵	— ^b	—	1.1 × 10 ⁶
	SAIW	—	< 10 ^c	< 10	< 10
<i>Salmonella arizonae</i>	対照	7.6 × 10 ²	—	—	—
	SAIW	—	< 10 ^c	< 10	< 10
<i>Legionella pneumophila</i>	対照	1.4 × 10 ⁷	—	—	2.0 × 10 ⁷
	SAIW	—	5.9 × 10 ⁴	< 100 ^c	< 100

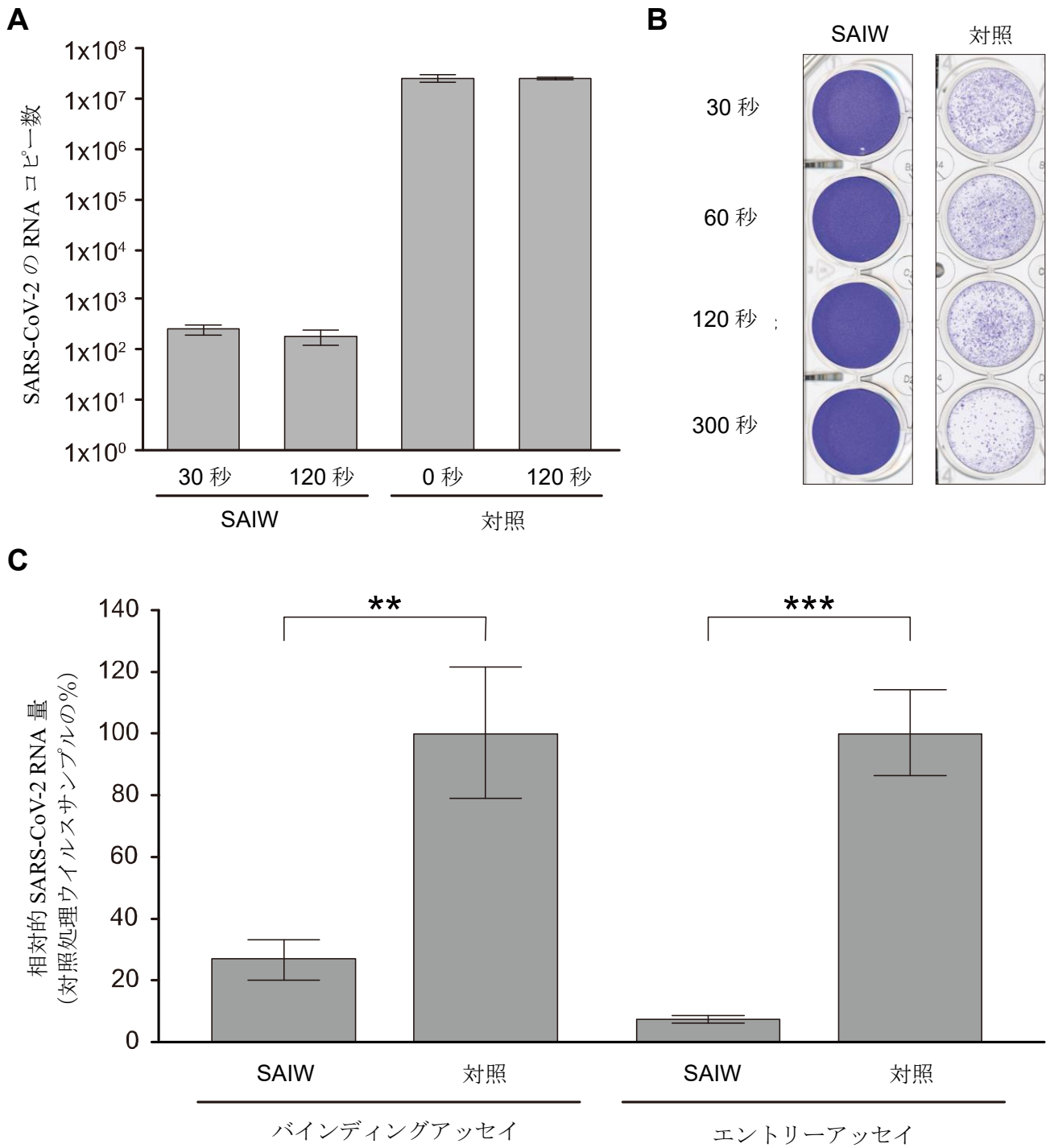
^a 生菌数は CFU/ml として計数した。

^b 計数せず。

^c 検出限界未満。

図 1

図 ; 図 1. pdf の閲覧 / ダウンロードはここをクリック 



利害の宣言

著者らは、本論文で報告した研究に影響したと思われるような既知の競合する金銭的利害関係または個人的関係がないことを宣言する。

著者らは、競合する利害関係の可能性ありとみなされうる以下の金銭的利害関係／個人的関係を宣言する。

山本直樹は日本医療研究開発機構から助成金を受けたことを報告する。松澤民男は株式会社 E プランの従業員である。