

〈一般研究課題〉 抗ウイルス活性を持つ布帛の開発及び
住環境における浮遊ウイルス不活化の検討
助成研究者 中部大学 伊藤 守弘



抗ウイルス活性を持つ布帛の開発

伊藤 守弘
(中部大学)

Development of the new antiviral fabrics

Morihiro Ito
(Chubu University)

Abstract

We developed the new antiviral fabrics. The fabrics were made of cotton tissues with some chemical manipulations. We dropped a solution containing influenza viruses (titer) to the fabrics, and then recovered the solution from the fabrics. Subsequently, the infectivity titers of the solution were measured by using the MDCK cells. The infectivity titers of the solution recovered from the normal cotton tissues and those from the antiviral fabrics were 3.2×10^5 and 8.6×10^2 , respectively. These findings suggested that the newly developed fabrics possessed antiviral activity and could be one of the antiviral fabrics candidates. Furthermore, the anti-viral activity of the fabrics was found to be maintained for 30 days after the chemical manipulations. Verification of the antiviral activity of the fabrics in the living environment is in progress.

緒言

インフルエンザやノロウイルス、口蹄疫などのウイルス感染症が重大な社会問題となっている。人体に付着したウイルスが人の移動と共に広がり、感染が地球規模で伝播していくことが要因だと言われている。手洗いやうがいだけでは防げない感染の拡大を食い止めるには、病院や農場などにとどまらず、感染源となりうる現場の環境と作業従事者の白衣やユニフォームに、抗ウイルス性能を付与することが極めて有用であると考えられる。しかし、繊維の物性を損なわず、安全で確実な効果を発揮できる溶剤はまだ市場に現れておらず、また、長時間の抗ウイルス効果が持続する繊維の実用化も始まっていない。本研究では、抗ウイルス活性を持つ布帛の開発を目的として、薬剤処

理した布帛にインフルエンザウイルスを接触させ、plaque assayを用いて検討した。

今回、特に研究対象としたウイルスはインフルエンザウイルスである。流行性のインフルエンザにはA型とB型があり、A型ウイルスにはさらに、A香港型、Aソ連型などの亜型がある。インフルエンザのウイルスの遺伝子は、頻繁に小変異をおこしているため、2～3年で抗原性の異なる株に置き換わる。小変異により、A型インフルエンザウイルスはヒトの免疫機構により検出されにくくなり、インフルエンザの流行が繰り返される。そこで、今回はこのインフルエンザウイルスの伝播を抑制する目的として、抗ウイルス布帛の開発を行ったので報告する。

材料と方法

ウイルス株と培養細胞

インフルエンザウイルスとして、PR-8 (A/Puerto Rico/8/34)、感染実験にはイヌ腎上皮由来細胞MDCK細胞を使用した。MDCK細胞は5%FBSを含むEMEM培地で37℃、5%CO₂存在下で培養した。

抗インフルエンザウイルス専用液の調整

抗インフルエンザウイルス液として、セントリスE-1 α (エア・ウォーター・マッハ株式会社) 及び浸透液を滅菌水で適宜希釈して使用した。

抗インフルエンザウイルス布帛の準備

綿布に対し、薬剤を含浸させて作製した。含浸量は重量換算で、#1 : 3.0g、#2 : 6.0g、#3 : 7.5gである。

ブラックアッセイ

1) 細胞の準備

培養フラスコ60cm²でコンフルエントのMDCK細胞を12wellプレートに播種後、24時間培養した。

2) ウイルス液の処理

ウイルス液(2.5×10⁵ PFU/ml)を布に50 μl滴下し、4℃で遠心(5000rpm)し、氷上で15分静置した。その後、ウイルス液を回収し、ウイルス液30 μlとMEM(無血清)270 μlの割合で混合した。

3) ウイルスの吸着

処理したウイルス液をMEM(無血清)培地で10倍段階希釈した(10⁻¹～10⁻¹¹)。MDCK細胞のMEM(5%FBSを含む)培地を取り除き、細胞に100 μl/well滴下した。コントロールはMEM(無血清)を同量滴下した。細胞が乾燥しないように注意しながら、37℃、1時間、CO₂インキュベータ内でウイルスを吸着させた。

4) 寒天の重層

寒天(SeaKem ME agar : Lonza)が1%になるように調整し、オートクレーブ後、寒天溶液に同容量の2×MEM、およびアセチルトリプシン(20 μg/ml) (Sigma)を添加したものを、ウイル

スを吸着させたMDCK細胞に1ml/well重層した。寒天が固まるまで静置した後、37℃、2日間、CO₂インキュベータ内で培養した。

5) プラック数のカウント

MDCK細胞に重層している寒天の上に0.1%Neutral Red(Sigma)を6%含む寒天を1ml/well添加し37℃、インキュベータで18時間染色後、plaque数を算出した。結果はplaque数から力価(titre)を求め、pfu/mlで示した。

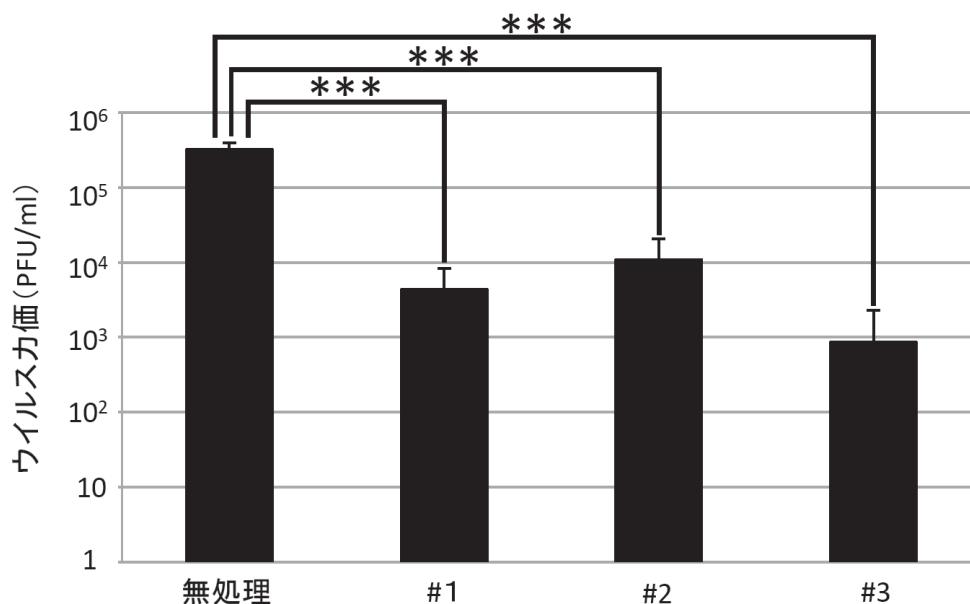
薬剤保持試験

増菌した黄色ブドウ球菌(*S. aureus*: 1×10^8 CFU/ml)を普通寒天培地に100 μ l滴下した。その後、コンラージ棒で播種した後、培地中心に布(1cm \times 1cm)を置いた。菌液の播種後、24時間後に阻止円の直径を計測し、評価した。同様の実験を、薬剤を布帛に含浸乾燥後と含浸乾燥後30日が経過させた布帛を検討した。

結果

布帛の抗インフルエンザ活性

インフルエンザウイルスを3種類の布帛に滴下し放置後、遠心分離にて回収し、MDCK細胞に感染させ形成されたプラック数を計測し、感染可能なウイルス数を算出した。コントロール布帛と比べ、全ての布帛でウイルス量が1/100程度減少する事がわかった(図1)。

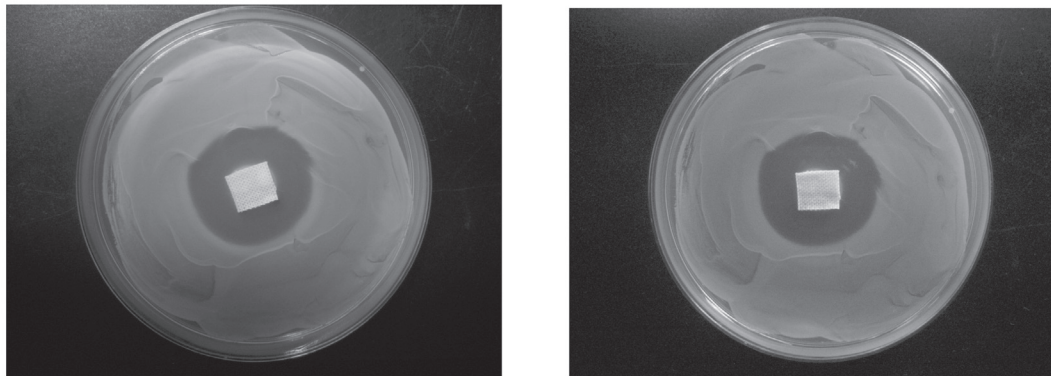


*** $P < 0.001$

図1 感染可能ウイルスの変化

薬剤保持試験

本研究に用いている薬剤は、抗菌活性も併せ持つ。その活性を利用して、布帛が薬剤を保持している事を確認した。その結果、全ての布帛において抗菌活性を有した。さらに、布帛の薬剤加工後30日経過しても、変わらぬ抗菌活性を有した(図2)。



含浸乾燥直後

含浸乾燥後30日経過

図2 薬剤保持試験

考察

本研究の結果、開発した布帛で処理すると、ウイルスの感染性が低下するという興味深い結果が得られた。

インフルエンザウイルスの細胞への感染成立における第1ステップは、ウイルスの細胞への吸着とそれに引き続く細胞内侵入である。細胞への感染初期段階で侵入阻害あるいは抑制されるとウイルス感染は成立しない。A型、B型インフルエンザウイルスは、エンベロープを有し、その表層には2種類のスパイク(HAとNA)が存在する。ウイルスのHAは細胞への吸着に必要な分子であり、またNAは宿主細胞膜のシアル酸を切断する酵素で、これらによりウイルスの細胞内侵入と複製ウイルスの細胞外放出を可能にする重要な分子である。これまでの研究で、本研究の主要薬剤であるセントリスE-1 α はインフルエンザウイルスに作用させると、ウイルス表層のスパイクがダメージを受ける事が分かっており(未発表データ)、本研究結果で得られた抗インフルエンザ活性も本機序と同等であると考ええる。

さらに、30日であるが、布帛の薬剤保持効果が検証された。次なる課題は、本効果がさらに継続する事と、洗濯やクリーニング時にどうなるかを検討する必要がある。

インフルエンザ感染対策として、ワクチン、手洗いとマスク、口腔内衛生、抗インフルエンザ薬により行われている。一方、エアロゾルによる感染がインフルエンザでは重要であると考えられるが、診察室や病室、学校など公共の閉鎖空間におけるエアロゾルによる集団感染対策は十分とは言えない。本研究の基礎結果を基に、抗ウイルス布帛を商品化する事により、集団感染対策の一助を担うと考えている。

まとめ

本研究において、抗インフルエンザウイルス布帛開発の基盤形成が終了した。感染性ウイルスの定量方法も確立された。今後、布帛の実用化を進める必要があると考える。抗インフルエンザウイルス布帛の実用化は、病院等の医療分野のみならず、公共の閉鎖空間において、壁紙やカーテンなどにも応用する事が可能であると考ええる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、データ収集にご協力いただいた入谷康太氏、久保田弘通氏、水野光氏に御礼申し上げます。

