

# 技 術 論 文

## 光触媒・深紫外線・銀イオンの各種ウイルスへの不活化効果 Inactivation Effect of Antiviral Methods against Several Viruses



技術開発センター  
第二開発室 主任技師  
樋口 友彦  
Tomohiko Higuchi

技術開発センター  
第二開発室 主任技師  
博士(工学) 裴 銀榮  
Eunyoung Bae

### 要 旨

抗菌、抗ウイルスの手法として用いられる、光触媒、殺菌灯、銀イオンについて、3種類のウイルスで抗ウイルス効果を確認した。

ウイルスは *Influenza A virus (H3N2)*、*Feline calicivirus Strain F-9*、*Escherichia coli phage MS2* を用いて抗ウイルス試験を行った。

光触媒は *Feline calicivirus Strain F-9*、*Escherichia coli phage MS2* に対して不活化効果が高い傾向があった。殺菌灯は *Influenza A virus (H3N2)* に対して不活化効果が高い傾向があった。銀イオンは *Feline calicivirus Strain F-9* のみ不活化効果が認められ、他のウイルスに対しては不活化効果がほぼ見られなかった。

ウイルスの種類によって有効な抗ウイルス手法は異なっており、目的に応じた抗ウイルス手法の選定及び組み合わせが重要である。

### Synopsis:

In this study, we have studied antibacterial and antiviral materials of various classes such as  $\text{TiO}_2$ , silver ions, and deep ultraviolet (DUV) light source at 254 nm. We used the following three viruses for antiviral : *Influenza A virus (H3N2)*, *Feline calicivirus Strain F-9*, and *Escherichia coli phage MS2*.

The results showed that the photocatalyst had an excellent antiviral activity on the *Feline calicivirus Strain F-9* and *Escherichia coli phage MS2* viruses. The DUV had a high inactivating effect on the *Influenza A virus (H3N2)*. Further silver ions had an inactivating effect only on *Feline calicivirus Strain F-9*, and almost no inactivating effect on other viruses. Our results suggest that effective antiviral methods differ depending on the type of virus, and it is important to select and combine antiviral methods according to the purpose.

### 1. 緒言

昨今の新型コロナウイルス感染症の流行によって、衛生意識の高まりは以前にも増して大きくなっている。

当社は、光触媒技術を用いて空気清浄機 (MaSSC クリーナー) や抗菌タイル (MaSSC シールドタイル)、脱臭グッズ (キラエアー、キラクリーン) など、様々な抗

菌、抗ウイルス、脱臭、衛生関係の光触媒製品を商品化してきた。

これらの製品には光触媒技術を使用しているが、抗菌、抗ウイルスの手法として光触媒以外に深紫外線(波長 200nm~300nm)、有機系材料(塩化ベンザルコニウム、チアベンダゾール等)、無機系抗材料(銀イオン、銅イオン等)等が良く用いられている<sup>1)</sup>。

本報では、これらの抗ウイルス手法の中から、①光触媒、②深紫外線を照射する殺菌灯(以下、DUV)、③無機系抗ウイルス材の銀イオン(以下、Ag<sup>+</sup>)の3種類を選定し、3種類のウイルスに対して、それぞれの抗ウイルス試験を実施した。それらの試験結果より、抗ウイルス手法による抗ウイルス効果の特徴を調査した。

## 2. 実験方法

### 2.1 使用ウイルス

使用したウイルスを Table 1 に示す。使用したウイルスは全て RNA ウィルスであり、エンベロープを持つ有膜ウイルスを1種、エンベロープを持たない無膜ウイルスを2種使用して抗ウイルス試験の対象とした。

Table 1 Summary of utilized various viruses

Virus	Classification of viruses	Envelope	Size <sup>2)~4)</sup>
<i>Influenza A virus (H3N2)</i> ATCC VR-1679	RNA virus	Have	80~120nm
<i>Feline calicivirus Strain F-9</i> ATCC VR-782	RNA virus	None	30~38nm
<i>Escherichia coli phage MS2</i> NBRC 102619	RNA virus	None	23~28nm

### 2.2 抗ウイルス手法

抗ウイルス手法は光触媒、DUV、Ag<sup>+</sup>の3種類を用いた。各手法の試験条件を Table 2 に示す。

光触媒はアナターゼ型酸化チタンで一次粒子径約 20nm、比表面積約 50m<sup>2</sup>/g の粉末を使用した。この粉末を任意の純水に懸濁し、濃度調整後、オートクレーブした。試験時にウイルス懸濁液に対して約 1.0g/L になるように光触媒懸濁液を滴下して試験に用いた。また、光触媒を励起させるための光源はブラックライト (FPL27BLB:SANKYO DENKI) を使用した。光強度は紫外線強度計 (UV POWER METER C9536-02:HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) を用いて約 5.0mW/cm<sup>2</sup> に調整した。光照射時間は 60min、180min でウイルス感染価の減衰を確認した。

DUV は 6W 殺菌灯 (6W UVC:Coospider) を使用し、紫外線強度計 (UVC-254SD ST :サトテック) で光強度が約 1.0mW/cm<sup>2</sup> になるように調整した。*Influenza A virus(H3N2)* (以下、H3N2) を用いて事前試験を行ったところ、15sec の紫外線照射でウイルス感染価が検出下限未満 (<10pfu/mL) となり、5sec の紫外線照射でウイルス感染価が約 1/5,000 となったため、抗ウイルス試験の紫外線照射時間は 5sec とした (Fig.1)。

Table 2 Experimental conditions of antiviral method

Antiviral method	Material	Conditions	Concentration
Photocatalyst	Anatase type titanium oxide (P.S.20nm, SSA.50m <sup>2</sup> /g)	Black light 5.0mW/cm <sup>2</sup> , Irradiation time 60min, 180min	1.0g/L
DUV	Germicidal lamp	1.0mW/cm <sup>2</sup> , Irradiation time 5sec	-
Ag <sup>+</sup>	Silver nitrate	Darkness, Reaction time 60min, 180min	2.0mg/L

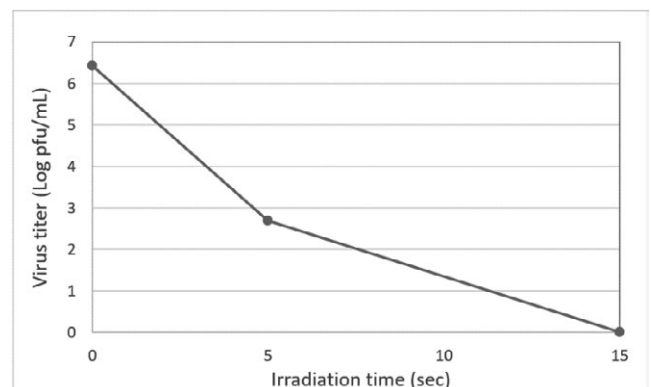


Fig. 1 Virus infectivity titer : Titer of virus as a function of exposure time to DUV

Ag<sup>+</sup>は硝酸銀 (99.8%,富士フィルム和光純薬) を任意の純水に希釈して銀イオン濃度を調整して使用した。*Escherichia coli* ATCC 8739 (以下、E.coli) 及び H3N2 を用いた事前試験の結果、E.coli は 5μg/L の銀イオン濃度で 180min の反応時間後の生菌数が約 1/2 に減少、50μg/L の銀イオン濃度で生菌数が約 1/1,000 に減少、100μg/L の銀イオン濃度で生菌数が約 1/10,000 に減少、250μg/L の銀イオン濃度で生菌数が検出下限未満 (<10cfu/mL) となった (Fig.2)。

H3N2 は銀イオン濃度約 150μg/L で 180min の反応時間後のウイルス感染価が約 20%減少、約 2.0mg/L の銀イオン濃度でウイルス感染価が約 40%減少した (Fig.3)。抗ウイルス試験に用いる銀イオン濃度は事

前試験の最高濃度である 2.0mg/L とした。また、銀イオンとの反応時間は 60min、180min で抗ウイルス試験を行った。

を行い、ウイルス感染価を測定することで、自然減衰についても確認を行った。

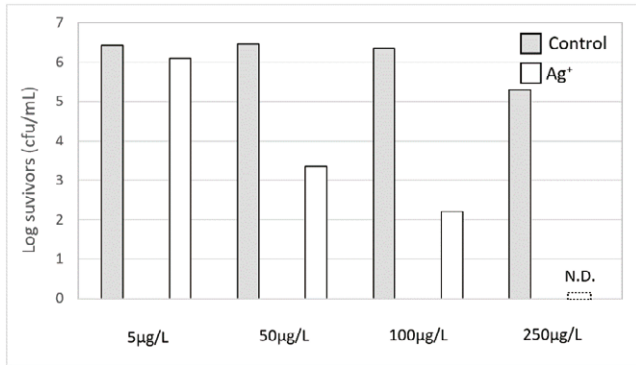


Fig. 2 Antibacterial activities of Ag<sup>+</sup> ions on the E. coli

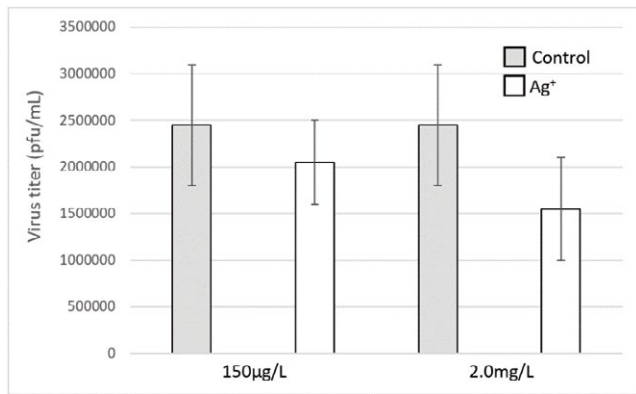


Fig. 3 Antiviral activities of Ag<sup>+</sup> ions on the influenza virus

Table 3 Virus host and medium conditions

Virus	Virus host	Culture medium	Top ager
<i>Influenza A virus (H3N2)</i>	MDCK RCB0995	DMEM +10%FBS +1%NEAA +0.03Trypsin	DMEM +1%NEAA +0.03%Trypsin +0.01%DEAE-Dextran +0.75%Agar
<i>Feline calicivirus Strain F-9</i>	CRFK JCRB9035	DMEM +10%FBS +1%NEAA	DMEM +1%NEAA +0.01%DEAE-Dextran +0.75%Agar
<i>Escherichia coli phage MS2</i>	<i>Escherichia coli</i> NBRC106373	NB + 5%NaCl	NB + 5%NaCl +5%Agar

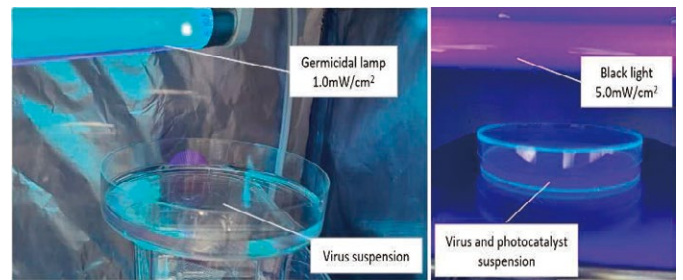


Fig. 4 Picture of the experimental setup with DUV and photocatalyst

### 2.3 抗ウイルス試験方法

抗ウイルス試験に用いるウイルスの宿主として用いた細胞と培地を Table 3 に示す。ただし、*Escherichia coli phage MS2* (以下、MS2) については、宿主として用いた細菌と培地を示す。

ウイルス感染価の測定はプラーク測定法を用いた。

プラーク測定法のウイルス希釈液に MS2 は PBS (-)、MS2 以外の 2 種類のウイルスは維持培地 (DMEM) を使用した。

培養条件は、MS2 は 35°C で 1 日間培養、H3N2 と *Feline calicivirus Strain F-9* (以下、FCV) は CO<sub>2</sub> 濃度 5% 雰囲気 で 37°C × 2 日間培養とした。

宿主にそれぞれのウイルスを感染させ、ウイルスを回収し、ウイルス懸濁液の原液を作製した。ウイルス懸濁液は 10<sup>4</sup>~10<sup>7</sup> pfu/mL の濃度で増殖させたウイルス原液を純水で 10 倍希釈し、10<sup>3</sup>~10<sup>6</sup> pfu/mL としたものを試験に用いた。

抗ウイルス手法毎に 10mL のウイルス懸濁液を φ90mm×15mmH シャーレに入れ、抗ウイルス試験を行った (Fig.4)。また、暗所に保管したブランクのウイルス懸濁液も準備し、60min、180min でのサンプリング

## 3. 結果及び考察

### 3.1 H3N2 の抗ウイルス試験結果

H3N2 の抗ウイルス試験結果を Fig.5、Fig.6 に示す。

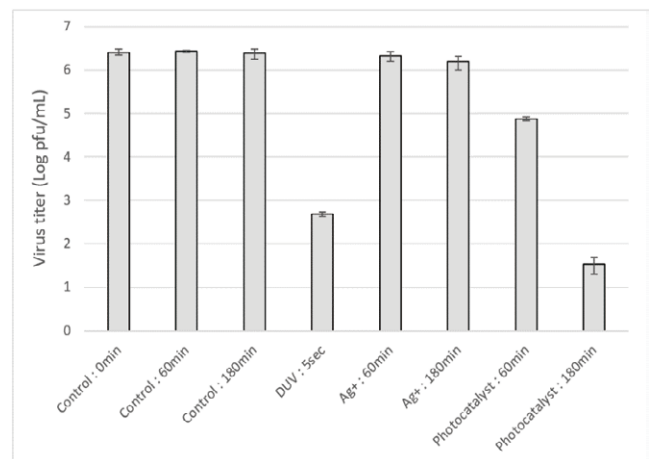


Fig. 5 Antiviral activity against H3N2

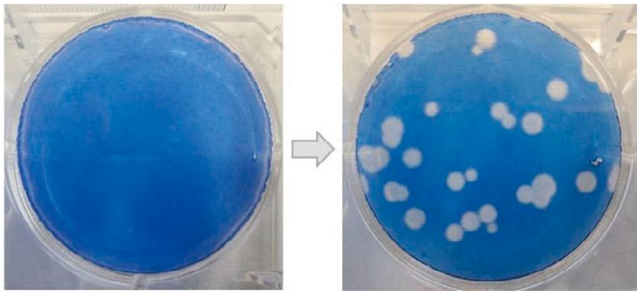


Fig. 6 Plaque morphology in MDCK cells infected with H3N2 virus

H3N2の抗ウイルス試験を行ったところ、DUVはわずか5secの紫外線照射でウイルス感染価が約1/5,000となった。Ag<sup>+</sup>は60minの反応時間でウイルス感染価が約20%減少し、180minの反応時間でウイルス感染価が約40%減少した。光触媒は60minの反応時間でウイルス感染価が約1/30に減少し、180minの反応時間でウイルス感染価が約1/70,000にまで減少した。

### 3.2 FCVの抗ウイルス試験結果

FCVの抗ウイルス試験結果をFig.7、Fig.8に示す。

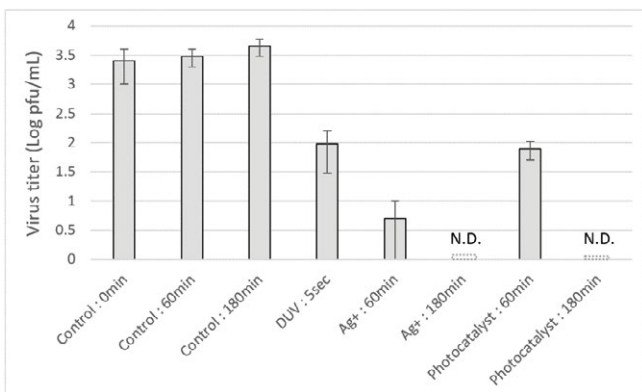


Fig. 7 Antiviral activity against FCV

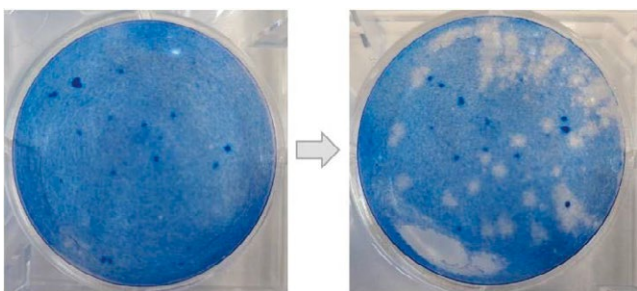


Fig. 8 Plaque morphology in CRFK cells infected with FCV

FCVの抗ウイルス試験を行ったところ、DUVは5secの紫外線照射でウイルス感染価が約1/30になった。Ag<sup>+</sup>は60minの反応時間でウイルス感染価が約1/600に減少し、180minの反応時間でウイルス感染価が検出下限未満(<10pfu/mL)となった。光触媒は60minの反応時間でウイルス感染価が約1/40に減少し、180min

の反応時間でウイルス感染価が検出下限未満(<10pfu/mL)となった。

### 3.3 MS2の抗ウイルス試験結果

MS2の抗ウイルス試験結果をFig.9、Fig.10に示す。

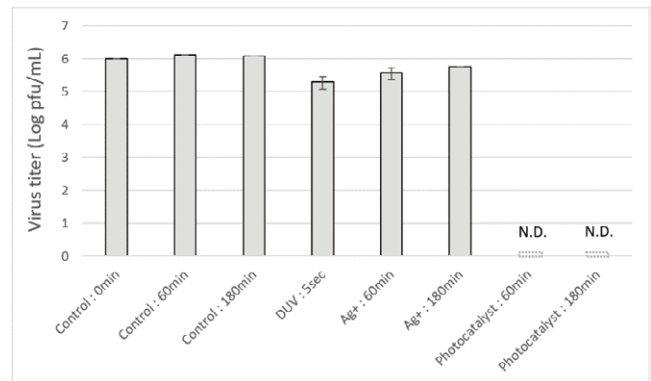


Fig. 9 Antiviral activity against MS2

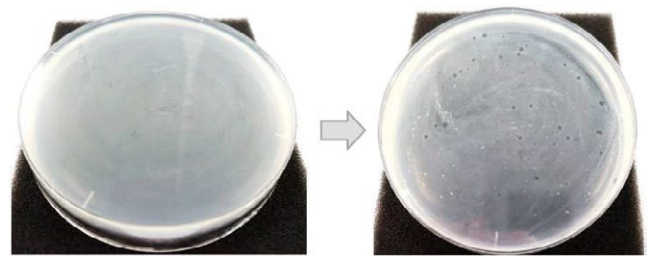


Fig. 10 Plaque morphology in E. coli cells infected with MS2 virus

MS2の抗ウイルス試験を行ったところ、DUVは5secの紫外線照射でウイルス感染価が約1/5減少した。Ag<sup>+</sup>は60minの反応時間でウイルス感染価が約1/3に減少し、180minの反応時間でウイルス感染価が約1/2となった。光触媒は60min、180minの両方の反応時間でウイルス感染価が検出下限未満(<10pfu/mL)となった。

### 3.4 ウイルスの種類による抗ウイルス手法の効果比較

ウイルスの種類と抗ウイルス手法毎の試験結果をFig.11、Fig.12、Fig.13に示す。ただし、Ag<sup>+</sup>、光触媒の試験結果は反応時間180minの結果を示す。

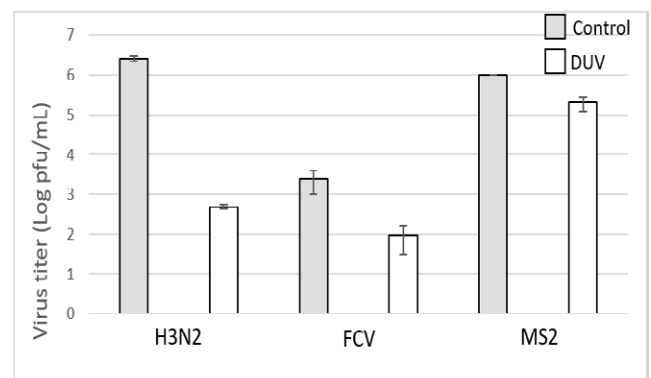


Fig. 11 Antiviral activity of DUV against viruses

DUV は H3N2 には 3 桁以上の大きなウイルス感染価の減少効果が見られた。FCV 及び MS2 には 0~1 桁程度のウイルス感染価の低減効果となっており、H3N2 と比較すると DUV の抗ウイルス効果は低かった。

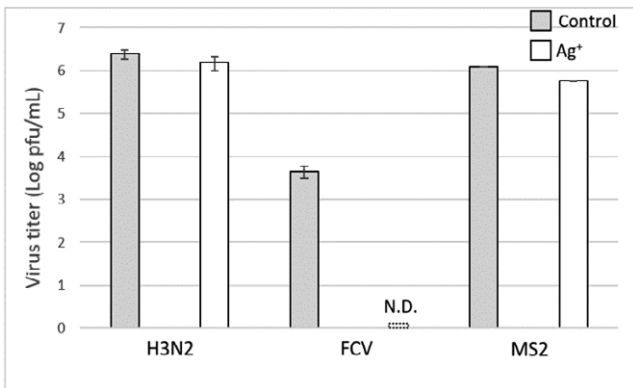


Fig. 12 Antiviral activity of Ag<sup>+</sup> ions against viruses

Ag<sup>+</sup>は FVC に対して 3 桁以上の大きなウイルス感染価の減少効果が見られた。H3N2 及び MS2 には 0~1 桁程度のウイルス感染価の低減効果となっており、FVC と比較すると Ag<sup>+</sup>の抗ウイルス効果は低かった。

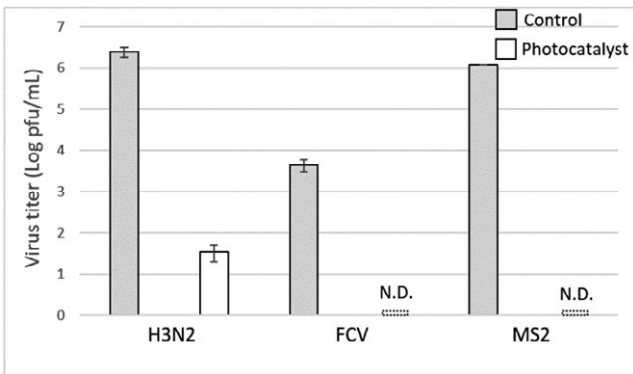


Fig. 13 Antiviral activity of photocatalyst against viruses

光触媒はすべてのウイルスに対し 3 桁以上の大きなウイルス感染価の減少効果が見られた。

Fig.11、Fig.12、Fig.13 の抗ウイルス試験結果をまとめたものを Table 4 に示す。

Table 4 The comparison of antiviral properties of various viruses

Virus	Decrease of virus titer (Log pfu/mL)		
	DUV	Ag <sup>+</sup>	Photocatalyst
Influenza A virus (H3N2)	3.72	0.20	4.85
Feline calicivirus Strain F-9	1.42	3.65	3.65
Escherichia coli phage MS2	0.7	0.32	6.08

#### 4. 結言

DUV、Ag<sup>+</sup>、光触媒の 3 種類の抗ウイルス手法を用いて、3 種類のウイルスの抗ウイルス試験を行ったところ、以下の結果が得られた。

- 1) DUV の抗ウイルス効果は H3N2 に高いウイルス不活化効果を発揮した。FCV 及び MS2 は H3N2 と比較するとウイルス不活化効果が低いものとなった。H3N2 はエンベロップを持ち、最表面のスパイクタンパク質が DUV によって変性されることで迅速に不活化されたと考えられる。エンベロップを持たない FCV、MS2 は DUV がウイルスの再表面であるカプシドを通過した後、RNA を変性する必要があるため、不活化に時間がかかると考えられる。
- 2) Ag<sup>+</sup>は FCV のみ高いウイルス不活化効果が認められた。FCV はウイルス感染価のイニシャルが他の 2 種類のウイルスと比較して少なく、銀イオンとウイルス粒子の比率が他の抗ウイルス試験と比較して銀イオンのバランスが多いため、不活化効果が認められた可能性がある。事前試験の結果からも細菌と比較して、ウイルスは銀イオンで十分な不活化効果を発揮するためには、多量の銀イオンを必要とする可能性があると考えられる。
- 3) 光触媒は全てのウイルスに対して高いウイルス不活化効果が得られた。エンベロップを持たず、粒子径が小さいウイルスである FCV 及び MS2 に対して不活化効果が高い傾向が見られた。

本報の試験結果より、ウイルスの種類によって各種抗ウイルス手法の不活化効果に違いがあることが分かった。目的によって抗ウイルス手法を選択、若しくは組み合わせる必要がある。本試験データを今後の当社抗菌抗ウイルス製品の開発に活かしていきたい。

#### 参考文献

- 1) 富岡 敏一: 抗ウイルス・抗菌 製品開発 基礎、作用メカニズムから評価、認証、商品化まで、(株)エヌ・ディー・エス (2021) 27
- 2) T. Noda, Native morphology of influenza virions. *Front Microbiol.*, 2012, 2, 1-5.
- 3) M. J. Hosie and M. J. Conley, Feline Calicivirus (Caliciviridae), *Encyclopedia of Virology*, 4<sup>th</sup> edition., 2021, 2, 294-299.
- 4) Y. Wu, Y. D. Liang, K. Wei, W. Li, M. Yao, J. Zhang, S. A. Grinshpun, MS2 Virus Inactivation by Atmospheric-Pressure Cold Plasma Using Different Gas Carriers and Power Levels, *Applied and Environmental Microbiology.*, 2015, 81, 996-1002.