

紫外線 C 波照射による SARS-CoV-2 の迅速かつ完全な不活化 (Rapid and complete inactivation of SARS-CoV-2 by ultraviolet-C irradiation)

Nadia Storm

ボストン大学

Lindsay McKay

ボストン大学

Sierra Downs

ボストン大学

Rebecca Johnson

ボストン大学

Dagnachew Birra

Signify Research

Marc de Samber

Signify Research

Walter Willaert

Signify Research

Giovanni Cennini

Signify Research

Anthony Griffiths (✉ ahgriff@bu.edu)

ボストン大学 <https://orcid.org/0000-0001-5435-8364>

論文

キーワード : SARS-CoV-2、照射、Signify 紫外線 (UV) C 波ライト、除菌

DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-65742/v1>

ライセンス: © ⓘ 本論文は、Creative Commons Attribution 4.0 International License のもとでライセンスされている。 [ライセンス全文を読む](#)

要約

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) の世界的流行により、世界の公衆衛生システムと経済が打撃を受け、感染者数は 2,300 万人以上、失業者数と倒産企業数は数百万に上り、今日までに 80 万人以上の死者が確認されている。ウイルスは表面で長時間生存可能であるため、感染者の呼気、発話、咳、くしゃみによって生成される飛沫で汚染された面への接触が、SARS-CoV-2 の伝播を促す主な要因となっている。このような伝染の連鎖を遮断するため、直近に汚染された表面、ならびに既に汚染された表面の両方における、ウイルス不活化に利用可能なデバイスの実現が急務となっている。本論文では、市販の Signify 紫外線 C 波 (UV-C) ライトで発生させた波長 254 nm の光線照射による、湿潤状態および乾燥状態両方の SARS-CoV-2 の不活化について記述する。汚染された表面を完全に不活化させるには、わずか数秒の露光を行うだけでよく、除菌作業に容易に導入可能であることを示す。

はじめに

2019 年末にかけて、中国湖北省では新型ベータコロナウイルスにより発症する、致死性肺炎が大発生した¹。このウイルスは、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) と呼ばれ、驚異的な速度で世界中に広まり、消耗性の症状をもたらす現在進行しているパンデミックを引き起こし、現在までに感染の報告がない地域は、わずかな島々を残すのみとなっている。SARS-CoV-2 の感染源は人畜共通であると考えられているが²、強烈かつ広範なヒトからヒトへの感染は、主として呼吸飛沫や空気中に飛散するウイルスを含む粒子の吸入によって³、あるいは飛沫の付着によって汚染された表面への接触によって⁴発生している。世界中の学術機関や製薬会社が一丸となってウイルスへの対抗策開発に取り組んでいるものの、いまだワクチンや治療法の認可には至っていない。したがって、流行に対処し、感染拡大を防止するためにも、感染の連鎖を断ち切ることが重要となる。

紫外線 (UV) 照射は、ウイルス性病原体の不活化に有効な非接触的方法として、広範な試験が行われ、広く用いられている^{5~7}。UV は波長によって UV-A (315 ~ 400 nm)、UV-B (280 ~ 315 nm)、UV-C (100 ~ 280 nm) の 3 種類に分けられ、UV-C は殺菌用途で最も一般的に使用されている。波長 254 nm において、UV-C 光の直接吸収と核酸への光化学的損傷により、ウイルス複製が途絶することで、ウイルスの不活化に至るものと特定できる⁸。UV-C は幅広く利用されているにも関わらず、汚染された表面における、湿潤状態および乾燥状態の SARS-CoV-2 を不活化する際の有効性に関するデータは少ない。特に、流体成分の UV 吸収特性は、ウイルスの完全不活化実現に必要な照射量に影響を及ぼす可能性があるため、流体中の SARS-CoV-2 不活化にあたっては、UV-C の有効性を特定することが必要となる。

本論文では、波長 254 nm の UV-C 照射使用による、湿潤状態ならびに乾燥状態の飛沫における、SARS-CoV-2 の完全かつ迅速な不活化について説明する。我々の結論によれば、UV-C は SARS-CoV-2 の接触感染防止のための、低価格かつ効果的な手段であり、コロナウイルス感染症の蔓延に対する対応策として容易に配備可能であることを示している。

結果および考察

ウイルス減衰時間の推計

UV-C による SARS-CoV-2 の不活化効果を検証するため、60 mm のプラスチック皿にウイルスを塗布し、湿潤状態の飛沫または乾燥状態の飛沫に対して、照射時間を 0.8 ~ 120 秒の範囲で変化させて紫外線照射を実施した。0.849 mW / cm で UV-C を照射した場合²、SARS-CoV-2 ウイルスの感染力には、0.8 秒の曝露で部分的に不活化が見られたほか、乾燥状態のウイルス (図1A) では最短 9 秒、湿潤状態のウイルス (図1B) では最短 4 秒で、検出可能レベルを下回った。UV 光によるウイルス不活化の経過は、指数関数的過程を辿るものと考えられる⁹。したがって、減衰時間の計算にあたって、単一 / 二重指数関数的減衰関数による線形回帰法を用いた (図1)。単一

指数関数的減衰関数の式は $y = e^{-t/\tau}$ となり、二重指数関数の式 $y = (1 - f)e^{-t/\tau_1} + fe^{-t/\tau_2}$ 。 τ , τ_1 and τ_2 は、線形回帰で予測した減衰時間である。二重指数関数的減衰において、 f は最初の減衰における残存ウイルスの割合を表す。分析にあたり、初期条件である $t = 0$ が、照射量ゼロの時点における 100% の感染性に対応するよう、データポイントを正規化した。

乾燥状態の飛沫に関する線形回帰では、減少後の二重指数関数的減衰 (0.36) に対応する χ^2 値が、単一指数的減衰 (0.52) の場合を下回った。二重指数の R^2 は、単一指数の R^2 を上回った。したがって、減衰時間の計算にあたっては二重指数関数的減衰を使用し、

$\tau_1 = 0.48 \pm 0.09$ seconds, and $\tau_2 = 1.60 \pm 1.17$ seconds. が得られた。湿潤状態の飛沫では、これとは逆の結果が観察され、二重指数関数 (1.0) に対応する χ^2 値が、単一指数的関数 (0.8) の場合を上回った。 R^2 の値は、二重指数関数と単一指数的関数において同一であった (0.9)。したがって、減衰時間の計算にあたっては、単一指数的関数的減衰を回帰直線として用い、平均減衰時間は式 $\tau = 1.0 \pm 0.1$ seconds で表される。標準偏差 1 以下において、湿潤状態の飛沫ならびに乾燥状態の飛沫における減衰時間は合致した。これは専ら、測定の分解能上の制限に由来するものと考えられる。さらに、観察限界を考慮するならば、このことは、媒体成分による UV-C 吸収が波長 254 nm におけるウイルス不活化に有意な影響を及ぼさなかったことを示している。

この研究のための実験は、特定の制御された条件下で行われたことに留意されたい。湿度、凹凸のある表面、埃その他の粒子の存在などといった要因は、UV-C の有効性を低下させ、完全なウイルス不活化の達成に必要な照射量に影響を及ぼす可能性がある⁶。波長 254 nm の UV-C 照射に関する有効性を評価する際は、呼吸飛沫の組成を考慮することも重要である。飛沫は、ウイルス性糖タンパク質を含む可能性のある呼吸粘液 (痰) など、他のさまざまな体液中に融解している可能性が高く、こうした体液や粒子が UV-C を吸収することにより、ウイルス不活化効率が低下する可能性がある。したがって、この研究により得られた結果は、ウイルス不活化の実現にあたって必要となる最低照射量として解釈されるべきである。

本研究の範囲を超えてはいるが、将来的には、不活化に必要な UV-C 照射量に対して、ウイルスが残存する可能性のある湿度、表面形態、および天然基質が及ぼす影響についても研究していく必要があるだろう。

皮膚と目を 254 nm の UV-C 光に直接暴露させると、深刻な健康被害につながる。¹⁰ そのため、波長 254 nm の UV-C ライトは、適切な訓練を受けている場合、または人々が暴露される危険がない場合に限り使用されたい。今後の研究では、波長 254 nm の UV-C 光に代わるより安全な代替手段として提案されている、遠紫外線 (far UV-C)、波長 (207 ~ 222 nm) のウイルス不活化効果を探る予定である。⁷

SARS-CoV-2 を不活化するための手法はいくつか存在するが、実証済みの有効なツールと治療介入がないために、管理できないまま人間集団内でのウイルス蔓延を許してきた。本研究で得られた結果は、UV-C が、病院、養護施設、職場、学校、空港、ショッピングセンターなどのさまざまな公共機関において、汚染された機器や表面を消毒する際に幅広く適用可能な、SARS-CoV-2 の接触伝播を防止、削減するための強力なツールであることを示している。

方法

UV-C照射装置

試験装置は、試験試料に対して正確かつ制御された形で UV-C 処理を可能にするよう、設計、最適化、製造、校正されている。平行ビーム装置は、デュアルチャンバー構造をベースに製造した。上部チャンバーには、UV-C 光源、電子的駆動装置、およびランプ出力を安定させながら試料の暴露時間を制御するシャッターシステムが格納されている。Mercury タイプの従来型 TUV PLL 35W 光源で生成させた深紫外 (deep UV-C) 光を用い、254 nm でピーク波長を生成させて、試料を下部チャンバーで調製した。センサーベースの安全対策を複数適用して、UV-C 照射への偶発的な暴露からユーザーを保護した。処理チャンバー内の 3 種類のランプの照射量を、キャリブレーション済み UV-C センサーシステム (分光放射計 GL Optic Spectis 5.0 Touch と、検出器 GL Opti Probe 5.1.50 の組み合わせ) を用いて測定し、得られた照射パターンと照射レベルをもとに、最適の調製場所を導き出した。

ウイルス不活化手順

実験はすべて、ボストン大学国立新興感染症研究所 (National Emerging Infectious Diseases Laboratories of Boston University) のバイオセーフティレベル 4 (BSL-4) 研究施設で行われた。100 μ l の SARS-CoV-2 (7.33×10^3 PFU / ml) (USA / WA1-2020)¹¹ を、60 mm プラスチック製細胞培養ディッシュ (TPP) の表面に 5 μ l ずつプレーティングした。ウイルスをプレーティングしたディッシュの一部を約 2 時間乾燥させ、残りのディッシュは UV-C デバイスのプロトタイプで直ちに処理した。概要を説明すると、ディッシュ 1 組 (1 つは調製済み、もう 1 つは比較対照用にアルミホイルで厳重に包装) のうち、前者を UV-C デバイスの中央に、後者をデバイスの側方にそれぞれ配置し、0.849 mW / cm² で照射を行った。0.8 秒 / 2 秒 / 3 秒 / 4 秒 / 5 秒 / 6 秒 / 9 秒 / 15 秒 / 30 秒 / 120 秒のいずれかでディッシュの UV-C 調製を実施し、それぞれの調製時間につき 3 回テストを繰り返した。乾燥状態のウイルス

を含むディッシュについても、同じ方法で調製を行った。調製後、湿潤状態のウイルスを 1.9 ml の、また乾燥状態のウイルスを 2 ml の、0.04 mM フェノールレッド、抗生物質-抗真菌剤 (Gibco) 1 単位、非必須アミノ酸 (Gibco) 1 単位、GlutaMAX-I (Gibco) 1 単位、1 mM ピルビン酸ナトリウム (Gibco)、2% ウシ胎児血清 (FBS) (Gibco) を含有する、高グルコースのダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Gibco) に、それぞれ再懸濁させた。次に、再懸濁させたウイルスを、クリスタルバイオレットプラークアッセイについて Half-Log 段階希釈法を用いて 1×10^0 から $1 \times 10^{-2.5}$ まで希釈する、あるいは、抗 SARS-CoV-2 抗体プラークアッセイについて 10 倍段階希釈法を用いて 1×10^0 から 1×10^{-5} まで希釈した。実験の都度、ウイルスの逆滴定を行った。

プラークアッセイによるウイルス不活化の確認

a) クリスタルバイオレット使用によるプラークの存在検証

$1 \times$ GlutaMAX-I、1 mM ピルビン酸ナトリウム、10% FBS (Gibco)、 $1 \times$ 非必須アミノ酸 (Gibco) のサプリメントを加えた高グルコース DMEM (Gibco) で培養した Vero E6 細胞を、6 ウェル CellBIND プレート (Corning) に 1 ウェルあたりの細胞数 8.0×10^5 の密度になるよう播種した。細胞を 37°C、5% CO₂ で一晩培養した。ウェルからそれぞれ培地を取り出し、再懸濁させたウイルスから調製した希釈液を 200 μ l ずつ、6 ウェルプレートのウェルに加えた。各プレートには対照用として、2% FBS を含む DMEM のみ入ったウェルを 1 つ残した。6 ウェルプレートのウェルそれぞれにおいて、 1×10^{-2} から 1×10^{-6} でウイルスを希釈することにより、60 mm ディッシュの調製に使用したウイルスを 3 通りの形で逆滴定した。プレートを断続的にロッキング振とうさせながら、37°C、5% CO₂ の環境で 1 時間培養した。次に、2.5% Avicel RC-591 (DuPont Nutrition and Health) の 1:1 溶液 2 ml と、フェノールレッドを含まない Temin's Modified Eagle Medium (Gibco) 2 単位に、10% FBS (Gibco)、抗生物質-抗真菌剤 (Gibco) 2 単位、GlutaMAX-I (Gibco) 2 単位を添加したものを、細胞に重層させた。細胞を 37°C、5% CO₂ で 2 日間培養した。10% 中性緩衝ホルマリン (ThermoFisher Scientific) 内にプレートを固定した後、10% 中性緩衝ホルマリンに 0.2% Gentian Violet (Ricca Chemical) を加えたもので染色した。ウイルス希釈物あたりのプラーク数を目視で特定し、次の式を用いてウイルスのカ価を算出した。

PFU / ml におけるウイルスカ価 = プラーク数 / (ウェル内のウイルス希釈物 \times プレーティング量 [単位: ml])

統計的分析

データの分析には、統計パッケージ Microcal Origin® を使用した。使用した統計手法に関する詳細は、結果の項に記載した。

データの利用

本研究結果の裏付けとなるその他のデータは、要望があれば該当する著者より入手可能である。

申告

謝辞

技術的支援について、Lauren E. Malsick 氏に著者一同感謝申し上げます。本論文は、Signify Research の援助を受けて行われた。

著者の貢献内容

AG、SND、NS、LGAM は、研究デザインの概念化を行った。SND、NS、LGAM、RIJ は、実験を担当した。NS、SND、LGAM、GC、AG はデータ分析を行い、また DB、MdS、WW による入力内容を使用して、論文の最初のドラフトを作成した。最終的な論文に、すべての著者が目を通し、改訂、承認を行った。

利益相反

AG、NS、LGAM、SND、RIJ は、利益相反がないことを宣言する。MdS、GC、DB、WW は、Signify Research の従業員である。

資料および通信

問い合わせおよび資料請求について、AG を宛先とされたい。

参考文献

1. Zhu, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New Engl J Med* 382, 727–733, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017> (2020).
2. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> (2020).
3. Zhang, R. et al. Identifying airborne transmission as the dominant route for the spread of COVID-19. *Proc Natl Acad Sci* 117, 14857–14863, <https://doi.org/10.1073/pnas.2009637117> (2020).
4. Chia, P.Y. et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nat Commun* 11, 2800, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16670-2> (2020).
5. Darnell, M.E.R. et al. Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. *J Virol Methods* 121, 85–91, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.06.00> (2004).
6. McDevitt, J.J. et al. Aerosol susceptibility of influenza virus to UV-C light. *Appl Environ Microbiol* 78, 1666–1669, <https://doi.org/10.1128/AEM.06960-11> (2012).

7. Buonanno, M., et al. Far-UVC light (222 nm) efficiently and safely inactivates airborne human coronaviruses. *Sci Rep* 10, 10285, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67211-2> (2020).
8. Ariza-Mateos, A. et al. RNA self-cleavage activated by ultraviolet light-induced oxidation. *Nucleic Acid Res* 40, 1748–1766, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr822> (2012).
9. Kowalski, W.J. et al. Mathematical modeling of ultraviolet germicidal irradiation for air disinfection. *Quant Microbiol* 2, 249–270, <https://doi.org/10.1023/A:1013951313398> (2002).
10. Zaffina, S. et al. Accidental exposure to UV radiation produced by germicidal lamp: case report and risk assessment. *Photochem Photobiol* 88, 1001–1004, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01151.x> (2012).
11. Harcourt, J. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from patient with coronavirus disease, United States. *Emerg Infect Dis* 26, 1266–1273. <https://doi.org/10.3201/eid2606.200516> (2020).

図版

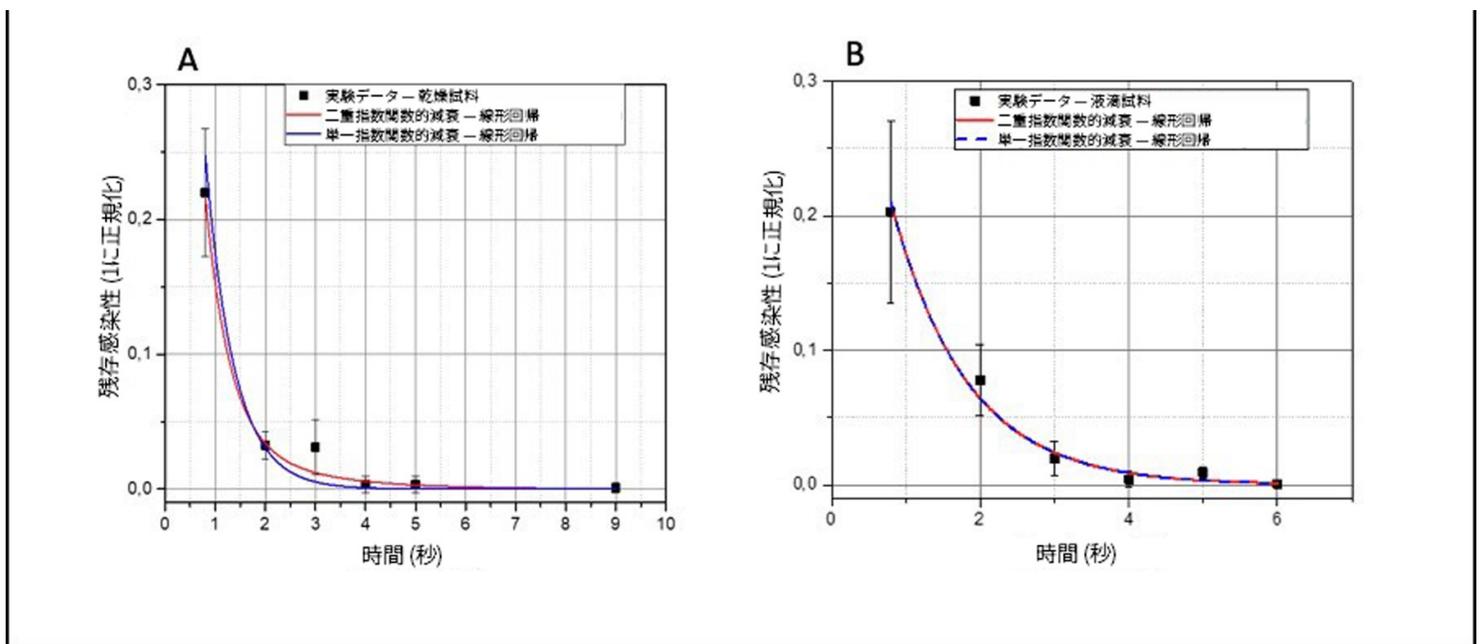


図 1

UV-C 照射後の SARS-CoV-2 感染力低下。乾燥飛沫 (A) または液滴飛沫 (B) として、ウイルスを UV-C に暴露させた。各データセット (乾燥試料と液滴試料) において、残存感染性は時間に応じて減少した (1に正規化)。青のグラフは単一指数関数的減衰を示し、赤のグラフは、二重指数関数的減衰を示している。