

【速報】

マウスコロナウイルスに対するポビドンヨード製剤の抗ウイルス活性

田口 文広¹⁾・陸 青¹⁾・清水 正樹²⁾¹⁾国立精神・神経センター神経研究所*／国立感染症研究所**²⁾明治製菓株式会社薬品総合研究所

(平成 15 年 7 月 23 日受付・平成 15 年 8 月 7 日受理)

マウスコロナウイルス (マウス肝炎ウイルス, MHV) A-59 株に対するポビドンヨード (PVP-I) を主成分とする各製剤の *in vitro* 殺ウイルス効果を検討した。PVP-I 消毒液, PVP-I 含嗽液, PVP-I 手指消毒液, 速乾性 PVP-I 手指消毒液および PVP-I 喉用液 (0.1~5% PVP-I) の 5 秒間処理により, ウイルス感染価が $1/10^4$ 以下に減少した。このことは, PVP-I 各製剤はマウスコロナウイルスに対して強い殺ウイルス効果をもつことを示している。

Key words: コロナウイルス, ポビドンヨード, 抗ウイルス活性

2003 年 3 月より中国広東省, 香港およびベトナムにおいて院内感染としての非定型肺炎発生が報告され, 世界保健機関 (WHO) は本肺炎を重症急性呼吸器症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) と命名し, 緊急対策に乗り出した。その後 WHO は SARS の病原体をコロナウイルスの新種と断定し, 本病原体は現在 SARS 関連コロナウイルス (SARS-associated coronavirus) などと表現されている^{1,2)}。SARS-associated coronavirus は自然環境下で長期間生存が可能であり, また既知のコロナウイルスと異なりヒトに対する強い病原性が報告されている^{1,2)}。

本ウイルスに対して有効な消毒薬として国立感染症研究所の指針 (2003 年 5 月 22 日改訂版) では, 80% 消毒用エタノール, 0.001~0.2% 過酢酸, 2% グルタルアルデヒド, およびヨウ素系消毒薬などを挙げている²⁾。

ヨウ素系消毒薬であるポビドンヨード (PVP-I) 製剤は, グラム陽性菌から陰性菌, さらにウイルスに至るまで幅広い作用スペクトルを示し^{3~5)}, 消毒薬として大きな役割を果たしている。ヨウ素系消毒薬のコロナウイルスに対する *in vitro* 有効性については, ヨードホルのマウスコロナウイルスおよびイヌコロナウイルスに対する抗ウイルス活性の報告があるのみで⁶⁾, PVP-I 製剤についての報告はない。

2003 年 6 月現在, 諸事情により国内において臨床分離 SARS-associated coronavirus 株を用いた有効性試験実施が不可能であるため, コロナウイルス属のなかでもっとも研究が進んでいるマウス肝炎ウイルスを用い, PVP-I を主成分とする各市販製剤の本ウイルスに対する *in vitro* 有効性を検討したので報告する。

PVP-I 製剤として PVP-I 消毒液 (イソジン[®]液, 製剤原液中の PVP-I 含有量: 10 W/V%), PVP-I 含嗽液

(イソジン[®]ガーグル, 同: 7.0 W/V%), PVP-I 手指消毒液 (イソジン[®]スクラブ, 同: 7.5 W/V%), 速乾性 PVP-I 手指消毒液 (イソジン[®]バーム, 同: 0.5 W/V%) および PVP-I 喉用液 (イソジン[®]のどフレッシュ, 同: 0.45 W/V%) (いずれも明治製菓) を用いた。各 PVP-I 製剤は, 使用説明書に示された標準使用濃度を中心に, 原液または滅菌精製水で使用直前に適宜希釈した溶液を用いた。被験ウイルスとしてはコロナウイルスに属するマウス肝炎ウイルス (murine hepatitis virus, MHV A-59 株) を用いた。MHV A-59 株は, 5% 牛胎児血清添加 Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM, 日水製薬) で培養した Delayed Brain Tumor (DBT)⁷⁾細胞に接種し, 37°C で 12~15 時間培養後に細胞培養液中に放出されたウイルスを用いた。方法は Taguchi and Matsuyama⁸⁾ および川名ら⁹⁾の報告を参考にした。すなわち MHV A-59 株浮遊液 20 μ L に所定濃度の各 PVP-I 製剤 20 μ L を添加し, 25°C で 5, 10 または 30 秒反応後, PVP-I 中和液として 0.5% sodium thiosulfate (和光純薬工業) を含むリン酸緩衝液, pH 7.2 (PBS) 360 μ L を添加して PVP-I を失活させた。サンプルを 10 倍階段希釈し, その 20 μ L を 24 穴プレート (Iwaki) に培養した DBT 細胞に接種した。接種後, 細胞は 37°C で 50 分間培養後, 0.5% メチルセルロース含有 DMEM を重層し, さらに 37°C, 15~20 時間培養した。培養後の細胞を 5% ホルマリン固定, クリスタルバイオレット染色処理を行い, 細胞上の syncytium (合胞性巨細胞) 数を測定し, ウイルス感染価を算出した。なお, 対照としては PVP-I 製剤のかわりに滅菌 PBS を用いた。

MHV A-59 株に対する各 PVP-I 製剤の *in vitro* 有効性を Table 1 に示した。1 および 0.1% PVP-I 消毒液,

*東京都小平市小川東町 4-1-1

**東京都武蔵村山市学園 4-7-1

Table 1. Virucidal activity of PVP-I against murine coronavirus strain A-59

PVP-I ^a product	PVP-I concentration (%)	Mean number of viruses remained (PFU/0.02 mL, n = 2) (s)		
		5	10	30
PVP-I solution	5	<10 ^b	<10	NT ^c
	1	1.5	0	NT
	0.1	1	1	0
PVP-I gargle	0.47	0	0	NT
	0.23	0	0	NT
PVP-I scrub	3.75	<10 ^{2 b}	<10 ²	NT
	1	<10	<10	NT
	0.1	<10	<10	NT
PVP-I palm	0.25	0	0	NT
PVP-I throat spray	0.23	0	0	NT
Control (PBS)	0	6.5×10 ⁴	6.5×10 ⁴	6.5×10 ⁴

^apovidone-iodine, ^bbelow detection limit, ^cnot tested

PVP-I 含嗽液, 0.25% 速乾性 PVP-I 手指消毒液および 0.23% PVP-I 喉用液の 5 秒間の処理により, 残存ウイルス感染価は 0~2 PFU/0.02 mL となり, 対照と比較して 1/10⁴ 以下に減少した。5% PVP-I 消毒液および 3.75, 1 および 0.1% PVP-I 手指消毒液では界面活性剤などの製剤含有成分が細胞毒性を示すため, 10 あるいは 100 倍希釈液を細胞に接種したが, いずれも作用 5 秒後で残存ウイルスは検出されなかった。

国立感染症研究所の指針 (2003 年 5 月 22 日改訂版) によれば, SARS-associated coronavirus に対する消毒薬の適応例として, ヨードホルムなどのヨウ素系消毒薬など手指消毒薬が推奨されている²⁾。今回の実験結果から, うがいなどの口腔内に使用可能なヨウ素系消毒薬の PVP-I 製剤は MHV に対して十分な *in vitro* 殺ウイルス効果を示すことが明らかになった。

本試験に用いた MHV はコロナウイルス属のなかでウシコロナウイルスと同じグループ 2 に分類されていることが知られている⁹⁾。一方 SARS-associated coronavirus の遺伝子構成は Urbani 株を用いて, 11 個の ORF より構成されているエンベロープを有するコロナウイルスであり, かつ既知のコロナウイルスとの構成タンパク質に対するホモロジー比較で既存の 3 つのグループ (グループ 1~3) のいずれとも異なることが報告されている⁹⁾。川名らによれば PVP-I は RNA および DNA 型ウイルスのいずれにも優れた抗ウイルス効果を示すこと, さらにエンベロープの有無にかかわらず優れた抗ウイルス効果を示し, エンベロープを有するウイルスは PVP-I に対して特に高感受性を示すと報告がある⁵⁾。PVP-I の作用メカニズムとして, PVP-I 溶液中における遊離ヨウ素のラジカル生成による酸化作用が考えられており, 本作用は細胞またはウイルス膜表面に対して非特異的に作用することが報告されている¹⁰⁾。これらの報告^{5,9,10)}ならびに今回の試験結果から判断し,

SARS-associated coronavirus に対する PVP-I 製剤の *in vitro* 有効性は十分期待できるものと考えられる。

文 献

- 川名明彦, 照屋勝治, 山下 望: 重症急性呼吸器症候群 (SARS; Severe Acute Respiratory Syndrome) に関する知見。感染症学雑誌 77: 303~309, 2003
- 国立感染症研究所感染症情報センター (2003 年 5 月 22 日改訂) 掲載 (<http://idsc.nih.gov.jp/others/urgent/desinfect04a.html>)
- 国定孝夫, 山田恵子, 織田志保美, 他: MRSA に対する各種消毒剤の殺菌効果。環境感染 14: 142~147, 1999
- Shimizu M, Okuzumi K, Yoneyama A, et al.: *In vitro* antiseptic susceptibility of clinical isolates from nosocomial infections Dermatology 204 (Suppl. 1) 21~27, 2002
- 川名林治, 北村 敬, 千葉峻三, 他: ポビドンヨード (PVP-I) によるウイルスの不活化に関する研究—市販の消毒剤との比較。臨床とウイルス 26: 371~386, 1998
- Saknimit M, Inatsuki I, Sugiyama Y, et al.: Virucidal efficacy of physico-chemical treatments against coronavirus and parvovirus of laboratory animals. Exp. Anim. 37: 341~345, 1988
- Kumanishi T: Brain tumors induced with Rous sarcoma virus, Schmidt-Ruppin strain. 1. Induction of brain tumors in adult mice with Rous chicken sarcoma cells. Jpn. J. Exp. Med. 37: 461~474, 1967
- Taguchi F, Matsuyama S: Soluble receptor potentiates receptor-independent infection by murine coronavirus. J. Virol. 76: 950~958, 2002
- Rota P A, Oberste M S, Monroe S S, et al.: Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Science May 30; 300 (5624): 1394~1399, 2003
- Hsu Y C, Nomura S, Kruse C W: Some bactericidal and virucidal properties of iodine not affecting infectious RNA and DNA. Am J Epidemiol. 82: 317~328, 1965

Antiviral activity of povidone–iodine products against murine coronavirus

Fumihiko Taguchi¹⁾, Lu Qing¹⁾ and Masaki Shimizu²⁾

¹⁾National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4–1–1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo, Japan/National Institute of Infectious Diseases, 4–7 Gakuen, Musashi–Murayama, Tokyo, Japan

²⁾Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.

We studied the *in vitro* antiviral activity of commercially available povidone–iodine (PVP–I) products against murine hepatitis virus (MHV) A–59 strain, a murine coronavirus. All commercial products, i.e., PVP–I solution, PVP–I gargle, PVP–I scrub, PVP–I palm, and PVP–I throat spray, decreased viral infectivity titer beyond 4 logs within 5 seconds at concentrations of 0.1% to 5% of PVP–I. These results demonstrate the strong antiviral activity of PVP–I products against murine coronavirus.