



受託研究報告書

水酸化カルシウム（ホタテ貝殻由来）溶液による
新型コロナウイルスに対する不活化効果の評価



2020年12月8日
公立大学法人
奈良県立医科大学医学部
微生物感染症学講座



この度、御社の受託研究における標記の件につきまして、ご報告申し上げます。

記

1. 研究目的

水酸化カルシウム（ホタテ貝殻由来）溶液が持つ抗菌・抗ウイルス効果によって、新型コロナウイルスの不活化効果があるか明らかにすること。

2. 試験品

水酸化カルシウム（ホタテ貝殻由来）溶液： pH12.5～pH13.44 のアルカリ水

3. 試験微生物：新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）

新型コロナウイルスを VeroE6/TMPRSS2 細胞に感染させ、細胞変性効果が確認されたものを回収し、-80°Cのフリーザーに凍結保存した。凍結融解を2回繰り返したものを遠心分離し、上清を限外濾過膜で濃縮・精製した。これを試験ウイルス液とし、試験まで-80°C のフリーザーに凍結保存した。

なお、SARS-CoV-2 は国立感染症研究所より、VeroE6/TMPRSS2 細胞は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクよりそれぞれ入手した。

4. 試験内容

- 日本薬局方の「試験菌懸濁法(Time-kill 法)」を参考に、次の手順で抗ウイルス効果を評価した。
- ウイルス 10 µl に対して試験品 190 µl を混合させた。
- 試験品に対してよく攪拌後、表1の作用時間で静置した。
- 反応温度（室温）は 20～25°Cに設定した。
- 反応時間後に BSA 含有 DMEM 培地を 1.8ml 加え、反応を停止させた。
- 回収液を用いてウイルス感染価をプラーク法にて測定した。

不活化効果は以下のように算出した。

$$\begin{aligned} \text{不活化効果 (Mv)} &= \log(\text{Ct}/\text{C}_0) - \log(\text{Nt}/\text{N}_0) \\ &= \log\text{Ct}/\text{Nt} \end{aligned}$$

Ct: コントロール t 時間後の感染価

C₀: コントロール 0 時間後の感染価

Nt: 試験品 t 時間後の感染価

N₀: 試験品 0 時間後の感染価

減少率は対数減少値より次の通り算出した。

$$\text{減少率} = (1 - 1/10^{\text{対数減少値}}) \times 100\%$$

なお全試験は、本学内のバイオセーフティレベル3 (BSL3)の実験施設において、適切な病原体封じ込め措置のもとに行なった。

表 1. 試験品とウイルスの作用時間

試験品	作用時間#				
	0 秒	15 秒	30 秒	60 秒	180 秒
コントロール (PBS)				○	○
水酸化カルシウム (ホタテ貝殻由来) 溶液	○	○	○	○	○

#: 15 秒と 30 秒のコントロールは 60 秒を代用した

○: 測定 7 ポイント x 実施 2 回

5. 結果

結果を表 2~3 と図 1 に示した。

新型コロナウイルスに対して、試験品は時間経過とともに感染価は減少し、180 秒で $< 2.00 \times 10^2$ PFU/ml (減少率 $> 99.996\%$) と検出限界未満まで感染価が減少した。

表 2. 試験品によるウイルス感染価の推移

	0 分	15 秒	30 秒	60 秒	180 秒
コントロール	7.75E+06	-	-	6.75E+06	6.50E+06
水酸化カルシウム	7.75E+06	9.50E+04	1.80E+04	3.50E+03	$< 2.00E+02$

検出限界値: $< 2.00E+02$

表 3. 試験品によるウイルスの不活化効果と減少率

	0 分	15 秒	30 秒	60 秒	180 秒
不活化効果 (Mv)	-	1.85	2.57E+00	3.29	4.51
減少率 (%)	-	98.592%	99.733%	99.948%	$> 99.996\%$

減少率(%)は小数点第 4 位以下切り捨て

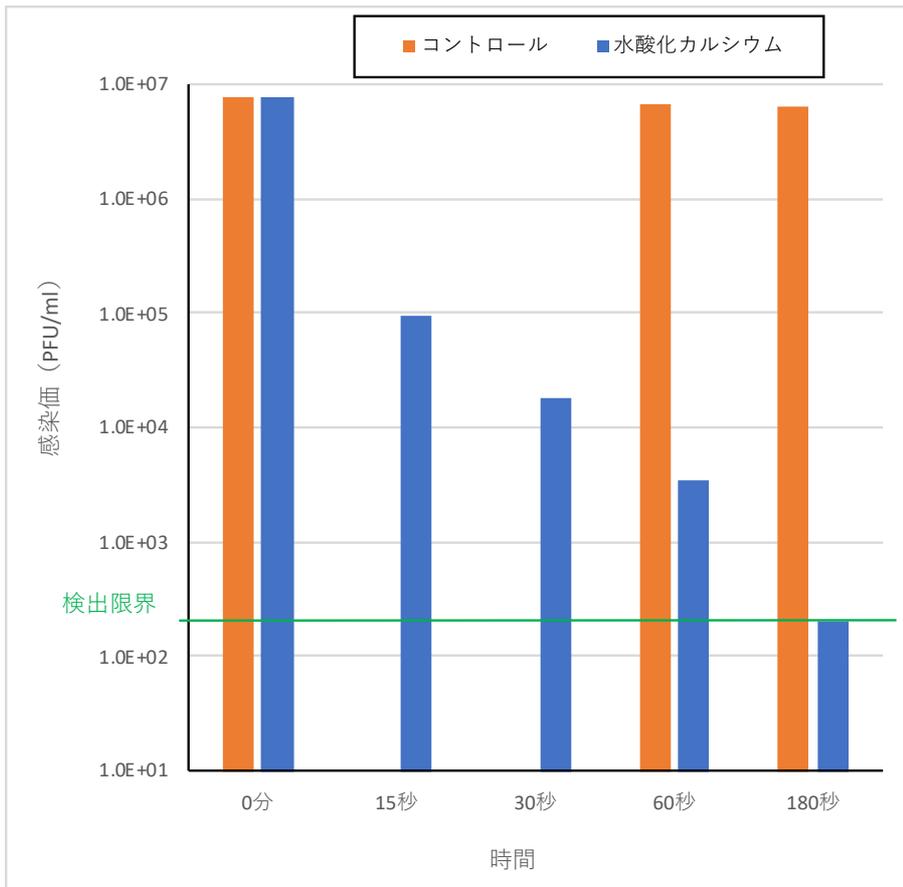


図1. 試験品によるウイルス感染価の推移

6. まとめ

本試験で使用した水酸化カルシウム（ホタテ貝殻由来）溶液は新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を速やかに不活化することが判明した。本試験品を使用することにより、物質の表面についた新型コロナウイルスによる接触感染防止に有効である可能性が考えられた。なお、浮遊するウイルス、人体への影響については検証を行っていない。

本試験結果は本報告書の通りであることを証明いたします。

公立大学法人
 奈良県立医科大学医学部
 微生物感染症学講座

