

UVD ROBOTS®

臨床研究

SARS-COV-2

報告書ID：uvdr-ict/SC2



WWW.UVD-ROBOTS.COM

UV-C 照射による SARS-CoV-2の急速かつ 完全な不活性化

■本書は、www.researchsquare.com/article/rs-65742/v1で
発表された一次資料をそのまま複製したものである

■複製許可：www.creativecommons.org/licenses/by/4.0/

著者

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 Birru- シグニファイリサーチ
Marc de Samber- シグニファイリサーチ
Walter Willaert- シグニファイリサーチ
Giovanni Cennini - シグニファイリサーチ
Anthony Griffiths - ボストン大学

要旨

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(SARS-CoV-2)のパンデミックは世界中の公衆衛生システムや経済を疲弊させ、これまでに感染者2300万人以上、失業者数百万人、死者80万人以上(2020年10月21日現在、感染者数4050万人以上、失業者数2億人以上、死者111万人以上)を記録している。SARS-CoV-2の主たる感染源は感染者の呼気、発話、咳、くしゃみによる飛沫で汚染された表面との接触であり、付着したウイルスは長時間表面上で生き続ける。この感染の連鎖を断ち切るためには、直近に汚染された表面と以前から汚染されている表面の両方のウイルスの不活性化に用いることのできる装置が早急に必要である。本稿では、オランダ・Signify社製254 nm紫外線UV-C光源による照射を利用した湿式、乾式両方のSARS-CoV-2の不活性化について説明する。汚染表面に対してわずか数秒の照射で完全に不活性化することができるため、除染作業を簡単に実施できる。

はじめに

2019年の年末に向けて、新型ベータコロナウイルスによる命にかかわる肺炎の集団発生が中国湖北省で起きた¹。重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(SARS-CoV-2)と名付けられたこのウイルスは驚異的な勢いで世界中に拡散し、人々を疲弊させるパンデミックが現在も続いており、これまで一例も報告されていないのは数カ所の島嶼部に限られる。SARS-CoV-2は動物から人に伝染する感染症が起源と考えられており²、人から人への強力かつ広範な感染は、主に、空気中に飛散する呼吸器飛沫やウイルスが付着した粒子の吸い込みによって³、あるいは飛沫が付着した表面への接触によって進行する⁴。世界中の学術機関や製薬会社が一致団結してウイルス対策を講じてきたものの、いまだワクチンや治療法で認可されたものはない。したがって、集団発生をコントロールしこれ以上の感染を防ぐためには、感染の連鎖を断ち切ることが何より重要である。

ウイルス病原体を不活性化する方法としては、紫外線(UV)照射が、これまで大々的に試験され広範に利用されてきた有効な非接触法である⁵⁻⁷。紫外線には、UV-A(315-400 nm)、UV-B(280-315 nm)、UV-C(100-280 nm)の3種類があり、そのうちUV-Cは殺菌用に最も一般的に利用されている。波長254 nmでのウイ

ルス不活性化は、UV-C光の直接吸収と核酸の光化学損傷によるものと考えられ、ウイルス複製の崩壊につながる⁸。その幅広い使用にも関わらず、汚染表面上の湿ったSARS-CoV-2や乾燥したSARS-CoV-2のUV-Cによる不活性化の効果については限られたデータしか存在しない。

特に、(呼吸器飛沫による)流体中のSARS-CoV-2を不活性化するUV-Cの効力は重要である。というのは、完全なウイルス不活性化の達成に必要な照射量には、流体成分のUV吸収特性が影響している可能性があるためである。

本稿では、254 nm UV-C照射を利用した湿った飛沫と乾燥した飛沫双方のSARS-CoV-2の完全かつ急速な不活性化について説明する。我々の研究結果は、UV-CはSARS-CoV-2の接触感染防止に手頃で効果的なツールであり、コロナウイルス感染症の大発生の防止に容易に用いることができることを示唆するものである。

結果と考察 - ウイルス崩壊時間の推定

UV-CのSARS-CoV-2不活性化効力を調べるため、ウイルスを60 mmプラスチック皿に塗布し、湿ったまたは乾燥した飛沫として0.8秒から120秒までの試験時間でUV照射を実施した。0.849 mW/cm²のUV-C照射では、照射時間0.8秒から一部不活性化が生じ、SARS-CoV-2ウイルス感染は乾燥したウイルスの場合でわずか9秒(図1A)、湿ったウイルスでは4秒で(図1B)検出不能レベルに下がった。紫外線によるウイルス不活性化は指数関数的プロセスになると予測される⁹。

よって、崩壊時間の推定には、一重および二重指数関数型崩壊関数(図1)による線形回帰法を用いた。一重指数関数型崩壊関数は $y = e^{-t/\tau}$ となり、二重指数関数型崩壊関数は $y = (1 - f)e^{-t/\tau_1} + f e^{-t/\tau_2}$ となる。 τ 、 τ_1 、 τ_2 は、線形回帰の崩壊時間である。二重指数関数型崩壊の場合、 f は最初の崩壊を生き延びたウイルスである。解析では、初期条件 $t=0$ が照射なしでの100%感染率に対応するようデータ点を正規化した。

乾燥した飛沫の線形回帰では、二重指数関数型崩壊の換算 $X^2(0.36)$ が一重指数関数型崩壊のそれ(0.52)より小さくなった。二重指数関数の R^2 は一重指数関数の R^2 より大きくなった。よって、二重指数関数型崩壊を用いて崩壊時間を

予測し、 $T_1 = 0.48 \pm 0.09$ 秒および $T_2 = 1.60 \pm 1.17$ 秒が得られた。湿った飛沫では、さきほどと反対の様子がみられた。
二重指数関数の $X^2(1.0)$ は一重指数関数のそれ (0.8) より大きくなった。また、二重指数関数の R^2 と一重指数関数の R^2 は同じになった (0.9)。

よって、崩壊時間を推定するデータのベストフィットとして一重指数関数型崩壊を用い、平均崩壊時間は $T = 1.0 \pm 0.1$ 秒となった。同じ標準偏差内では、湿った飛沫と乾燥した飛沫の崩壊時間は一致している。これは、測定分解能が限定されていることによる可能性が最も大きい。さらに、観察限界を考えると、培地成分による UV-C 吸収が、波長 254 nm でのウイルス不活性化に大幅に影響したわけではないことも示唆している。

今回の研究の実験は、特定の管理された条件下で実施されたことに留意すべきである。湿度、テクスチャー加工した表面、粉塵その他の粒子の存在などの要因が UV-C の効果を低下させるおそれがあり、完全なウイルス不活性化に必要な照射量に影響する可能性もある⁶。また、254 nm UV-C 照射の効果を評価する際には、呼吸器飛沫の成分を検討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呼吸器粘液(痰)のような他のさまざまな生物学的流体が入り混じった溶解物になりやすく、こうした流体や粒子の UV-C 吸収がウイルス不活性化の効率低下を招く可能性がある。したがって、今回の研究で得られた結果は、ウイルス不活性化の達成に必要な最低照射量と解釈すべきである。

今回の研究範囲を超えるが、今後の研究では、湿度の影響、表面構造、また必要な UV-C 不活性化照射量でウイルスが存在する可能性のある天然マトリックスに取り組むことが望ましい。

皮膚や目に 254 nm の UV-C 光が直接当たると深刻な健康危害などが生じるため¹⁰、254 nm UV-C 光は必要な訓練とともに用いるか、人が紫外線に当たるリスクのない場所で実施すべきである。来たる研究では、254 nm UV-C 光に代わる安全な紫外線として提案されている UV-C 遠紫外線波長 (207~222 nm) のウイルス不活性化効果を探っていく⁷。

SARS-CoV-2 不活性化の方法は何種類もあるものの、有効性が証明されたツールや操作が存在しないため、人々の間に收拾のつかないウイルス拡散を許してしまっている。我々の研究結果は、UV-C は有力なツールであり、病院、介護施設、職場、学校、空港、ショッピングセンターなど幅広い公共施設に広範に用いることにより、汚染された機器や表面を殺菌し、SARS-CoV-2 の接触感染を防止、低減できることを示している。

方法 - UV-C装置

正確で実施された試験サンプルの UV-C 処理が可能な試験装置を設計、最適化、製作および校正した。構造的には、二重チャンバー方式の平行ビーム装置を製作した。上部チャンバーには UV-C 光源、電子ドライバー、シャッターシステムを収納し、サンプルの照射時間を制御しながらランプ出力を安定させるようにした。サンプルは下部チャンバーにて、ピーク波長 254 nm の古典的な水銀タイプの TUV PLL 35W 光源で発生させた UV-C 深紫外線によって処理した。ユーザーが誤って UV-C 照射を受けるのを防ぐため、複数のセンサー方式の安全対策を適用した。処理チャンバー内の 3 本のランプの放射レベルを校正済み UV-C センサーシステム (分光測光器 GL Optic Spectis 5.0 Touch、検出器 GL Opti Probe 5.1.50 付き) で測定し、最適な処理位置を導き出せる放射パターンと放射レベルが得られた。

ウイルス不活性化手順

実験はすべて、ボストン大学国立新興感染症研究所 (NEIDL) のバイオセーフティレベル 4 の実験室で実施した。10 μ l 量の SARS-CoV-2 (7.33×10^3 PFU/ml) (USA/WA1-2020)¹¹ を、5 μ l のアリコットで 60 mm プラスチック組織培養皿 (TPP) に植え付けた。培養皿に入れたウイルスの一部はそのまま約 2 時間乾燥させ、残りはただちに試作品の UV-C 装置で処理した。一時的に 2 枚の皿 (1 枚は処理用、1 枚はアルミホイルでしっかりと巻いた対照標準用) を放射レベル 0.849 mW/cm² の装置中央に置き、それぞれ UV-C 装置の側面に向けた。これらの皿を、0.8 秒、2 秒、3 秒、4 秒、5 秒、6 秒、9 秒、15 秒、30 秒、120 秒間、UV-C 処理にかけ、各処理時間の試験回数は 3 回とした。乾燥したウイルスが入った皿も同じように処理した。

処理後、湿ったウイルスと乾燥したウイルスを、0.04 mM フェノールレッド、1×抗生物質-抗真菌剤 (Gibco)、1×非必須アミノ酸 (Gibco)、1×GlutaMAX-I (Gibco)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (Gibco) および 2 % ウシ胎児血清 (FBS) (Gibco) を含む 1.9 ml または 2 ml の高グルコースダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Gibco) 中でそれぞれ再度懸濁させた。

この再懸濁ウイルスを、クリスタルバイオレットブランク検定用に半対数希釈で 1×10^0 から $1 \times 10^{-2.5}$ に、あるいは Anti-SARS-CoV-2 抗体ブランク検定用に 10 倍希釈で 1×10^0 から 1×10^{-5} に連続希釈した。実験ごとにウイルスの逆滴定を組み込んだ。

ブランク検定によるウイルス不活性化の確認 - イルス力価 PFU/ml = ブランク数 / (ウェル内のウイルス希釈液 × プレート量 ml) クリスタルバイオレットを用いたブランク同定

1×GlutaMAX-I、1 mM ピルビン酸ナトリウム、10 % ウシ胎児血清 (FBS) (Gibco)、1×非必須アミノ酸 (Gibco) を

添加した高グルコースDMEM (Gibco) に保持された Vero E6 細胞を、6 ウェル CellBIND プレート (コーニング) にウェル当たり 8.0×10^5 の密度で種付けした。これらの細胞を 37°C 、5 % CO_2 で一晩培養した。各ウェルから培地を除去し、再懸濁ウイルスから作成した $200 \mu\text{l}$ の各希釈液を 6 ウェルプレートのそれぞれのウェルに入れた。プレートごとに、2 % FBS を含む DMEM のみが入ったウェル 1 つを対照標準とした。60 mm 皿の作成に用いたウイルスの逆滴定を、 1×10^{-2} から 1×10^{-6} のウイルス希釈液が入った⁶-ウェルプレートの各ウェルにそれぞれ接種することで 3 回実施した。

プレートを 37°C 、5 % CO_2 にて、時々揺らしながら 1 時間培養した。その後細胞に、フェノールレッドなしの 10 % FBS (Gibco)、2 × 抗生物質-抗真菌剤 (Gibco)、2 × GlutaMAX-I (Gibco) を添加した 2.5 % Avicel RC-591 (DuPont Nutrition and Health) と 2 × Temin 改変イーグル培地 (Gibco) の 1:1 溶液 2 ml を上から注いだ。これらの細胞を 37°C 、5 % CO_2 で 2 日間培養した。プレートは 10 % 中性緩衝ホルマリン (サーモフィッシャーサイエンティフィック) に固定し、その後 10 % 中性緩衝ホルマリン内で 0.2 % ゲンチアナバイオレット (Ricca Chemical) による染色を行った。ウイルス希釈液ごとのプラーク数を目視で数え、次の式によるウイルスの力価の計算に用いた。ウイルス力価 PFU/ml = プラーク数 / (ウェル内のウイルス希釈液 × プレート量 ml)

統計分析

統計パッケージ Microcal Origin® を用いてデータ分析を行った。使用した統計法の詳細説明は、分析結果とともに提供する。

データの可用性

ご要望に応じ、本研究の知見を裏付ける補足データを、該当する著者より提供可能である。

申告 / 宣言 - 謝辞

Lauren E. Malsick 氏の技術的支援に感謝する。この論文は、シグニファイリサーチの支援を受けた。文への各著者の貢献研究デザインの概念化は、AG、SND、NS、LGAM が行った。実験は、SND、NS、LGAM、RIJ が実施した。NS、SND、LGAM、GC、AG がデータを分析し、DB、MdS、WW からのインプットで論文の初稿を作成した。著者全員が論文の最終稿を読み、改訂し、承認した。

利益相反

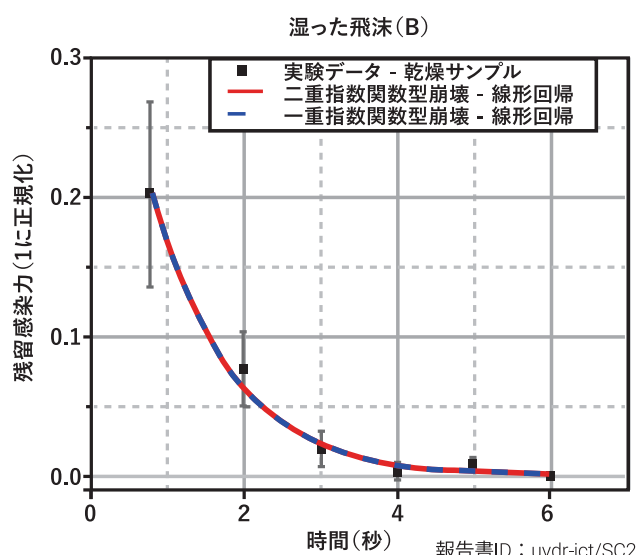
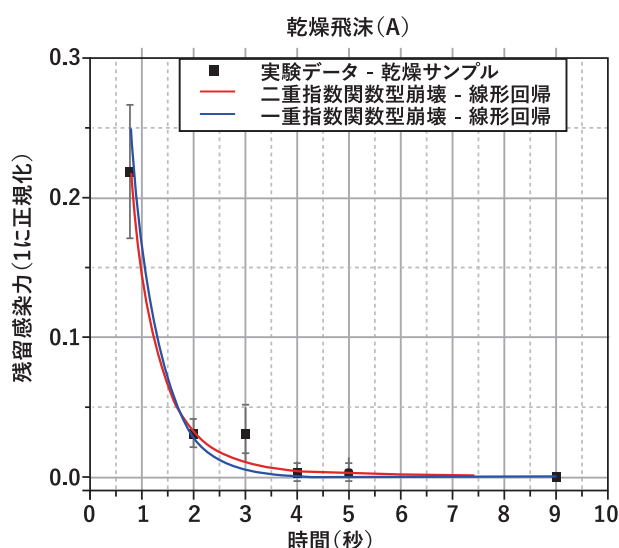
AG、NS、LGAM、SND、RIJ に、宣言すべき利益相反はない。MdS、GC、DB、WW は、シグニファイリサーチの社員である。

資料、投書

投書や資料の依頼は、AG宛てに連絡のこと。

図1

UV-C 照射後の SARS-CoV-2 の感染力の低下。ウイルスを、乾燥飛沫 (A) または湿った飛沫 (B) として UV-C に露出した。各データ (乾燥サンプルと湿ったサンプル) は、残留感染力の低下を、1 に正規化した時間関数として示している。青のグラフは一重指数関数型崩壊関数を、赤のグラフは二重指数関数型崩壊関数を示す。



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. McDewitt, 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. Zana, 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).

シグニファイランプによる UV-C 光の SARS-CoV-2 ウイルスに 対する効果



英国マンチェスター・メトロポリタン大学
医学微生物学名誉教授
Val Edwards-Jones 教授

背景

2020年にベータコロナウイルスSARS-CoV-2が引き起こしたパンデミックでは、レジャーや仕事で多くの人が集まるさまざまな産業部門で感染制御が大問題になっている。このウイルスは、空気中に飛散する呼吸器飛沫やウイルスが付着した粒子の吸い込み、あるいは付着した飛沫で汚染された表面への接触による人から人への伝染によって広がる。感染制御対策の多くは、社会的距離の確保、感染者の隔離、マスクの着用、手指の消毒に依っている。集団発生をコントロールし、これ以上の感染を防ぐためには、感染経路を断ち切ることが何より重要であるため、多くの産業にとって引き続き環境の除染が最も重要となる。

ウイルス病原体を不活性化する方法としては、紫外線(UV)照射が、これまで大々的に試験され広範に利用されてきた有効な非接触法である。最も幅広く選択されている波長は254 nmであり、UV-C光の直接吸収と核酸の光化学損傷がウイルス複製の崩壊につながり、ウイルスが不活性化されると考えられている。

ボストン大学とシグニファイ UV-Cランプメーカーによる研究

同封の研究は、汚染された表面の湿ったSARS-CoV-2と乾燥したSARS-CoV-2の不活性化に対するUV-Cの効果を実証したものである。特に、(呼吸器飛沫による)流体中のSARS-CoV-2を不活性化するUV-Cの効力は重要である。というのは、完全なウイルス不活性化の達成に必要な照射量には、流体成分のUV吸収特性が影響している可能性があるためである。

シグニファイとUVDロボット®との関係について

UVDロボットには、シグニファイ提供の254 nm UV-Cランプが8本備わっている。1メートルの距離から、このランプが毎秒2.7 mW/cm²または2.7 mJ/cm²の複合エネルギーを放つ。UV-Cランプメーカーのシグニファイはボストン大学の研究者との共同研究により、0.849mW/cm²しか放出しない低出力UV-Cランプが乾燥条件では9秒、湿式条件では4秒でSARS-CoV-2を殺傷することを実証した。

方法

作業はすべて、ボストン大学のバイオセーフティレベル4の封じ込め設備を利用して実施した。正確で管理された試験サンプルのUV-C(254 nm)処理が可能な試験装置を設計、最適化、製作および校正した。試験サンプルは、100 μ l量のSARS-CoV-2(7.33 $\times$ 10³ PFU/ml)(USA/WA1-2020)を5 μ lのアリコットで60 mmプラスチック組織培養皿(TPP)に分けて用意した。

培養皿に入れたウイルスの一部はそのまま約2時間乾燥させ、残りはただちに試作品のUV-C装置で処理した。一時的に2枚の皿(1枚は処理用、1枚はアルミホイルでしっかりと巻いた対照標準用)を放射レベル0.849 mW/cm²の装置中央に置き、それぞれUV-C装置の側面に向けた。

これらの皿を、0.8秒、2秒、3秒、4秒、5秒、6秒、9秒、15秒、30秒、120秒間、UV-C処理にかけ、各処理時間の試験回数は3回とした。乾燥したウイルスが入った皿も同じように処理した。処理後、湿ったウイルスと乾燥したウイルスを、1.9 mlまたは2 mlの懸濁培地で懸濁させてから、クリスタルバイオレットプラーク検定用に半対数希釈で1 $\times$ 100から1 $\times$ 10^{-2.5}に、あるいはAnti-SARS-CoV-2抗体プラーク検定用に10倍希釈で1 $\times$ 100から1 $\times$ 10⁻⁵に連続希釈した。

実験ごとにウイルスの逆滴定を組み込み、プラーク検定でウイルスの不活性化を確認した。

■このサマリーは、本報告書に同封の Research Square の論文から作成した。

実験結果

0.849mW/cm²のUV-C照射では、照射時間0.8秒から部分不活性化がみられ、SARS-CoV-2ウイルス感染は乾燥したウイルスの場合でわずか9秒(図1A)、湿ったウイルスの場合では4秒で検出不能レベルに下がった(同封の論文を参照:図1B)。

Val Edwards-Jones教授のコメント

今回の研究では、多くのUV-C装置で通常使用されているのと同じ波長でUV-C光を照射した。実験は封じ込めレベル4で実施し、密閉チャンバー内のウイルスに0.848 mW/cm²のUVCを照射した。この結果、乾燥したウイルスは9秒、湿ったウイルスは4秒というごく短時間で死滅した。UV-Cは、ピリミジン二量体を形成することでDNA/RNAを破壊してウイルスを死滅させる。これが増殖と複製の停止につながり、急速な細胞死を招く。図1B)。

ほとんどのUV-C装置は、これと同じ効力の急速死滅を起こすのに十分なエネルギーをランプから放出する。UVDロボット®はこれに加えて移動性という特長によって死角をなくし、狭い場所にも移動することができる。

UVDロボット®はこのメーカー(Signify)のランプを採用しているが、UVDロボットは今回の研究で使用した小型装置内よりもかなり広い場所で運用する必要があるため、ランプの出力やサイズをもっと大きくする必要がある。密閉チャンバー内で照射した有効照射量は0.848 mW/cm²(254 nmのUV-C)だったが、UVDロボットは1メートルの距離から2.7 mW/cm²(254 nmのUV-C)を照射する。これは、試験照射の4倍以上のエネルギーである。

UVDロボットが放つエネルギーの光子量は、汚染表面から1メートル離れた環境にて乾燥ウイルスで2.25秒、湿ったウイルスで1秒に類似した結果が得られる充分なものであることが望ましい。

結び

以上の結果は、UV-Cは有力なツールであり、病院、介護施設、職場、学校、空港、ショッピングセンターなど幅広い公共施設に広範に用いることにより、汚染された機器や表面を殺菌し、SARS-CoV-2の接触感染を防止、低減できることを示している。

V. Edwards Jones

UVD Robots® ApS

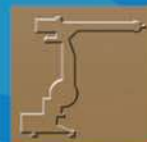
info@uvd-robots.com
www.uvd-robots.com



輸入総代理店

カンタム・ウシカタ株式会社

〒224-0053 神奈川県横浜市都筑区池辺町4666
Tel: 045-345-0002 Fax: 045-345-0012
www.kantum.co.jp E-mail: info@kantum.co.jp



IERA AWARD.

Innovation and Entrepreneurship in Robotics and Automation

The UVD Robot is highly effective in the inactivation of harmful microorganisms and it is deployed by hospitals all over the world to protect vulnerable patients from hospital acquired infections. The clinical efficacy of the UVD Robot has been independently tested and validated at the following institutes:

