

# 放電プラズマにより生成したクラスターイオンを用いた空中浮遊高病原性H5N1型トリインフルエンザウイルス感染機能低減技術

Inactivation of Airborne Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus with Cluster Ions Generated in a Discharge Plasma

松岡 憲 弘\*      西川 和 男\*  
Norihiro Matsuoka      Kazuo Nishikawa

## 要 旨

大気圧下でのプラズマ放電により生成したクラスターイオンにより、高病原性H5N1型トリインフルエンザウイルスの感染機能が低下することを確認した。空気中の高病原性H5N1型トリインフルエンザウイルスに対するクラスターイオンの効果を、MDCK細胞を用いた50%細胞感染量測定法(TCID50)及び免疫蛍光抗体分析法(IF法)により調べた。この結果、これらのイオンをH5N1型トリインフルエンザウイルスに作用させることで、ウイルスの感染力が大きく低下することを確認した。

Inactivation of highly pathogenic H5N1 Avian Influenza virus was verified using cluster ions generated in an atmospheric discharge plasma. TCID50 and immuno-fluorescence methods were used to evaluate the effects of the cluster ions on the virus infecting MDCK cells. It was observed that the cluster ions significantly reduce the viral titer of Avian Influenza H5N1 virus.

## まえがき

東南アジアを中心に高病原性H5N1型トリインフルエンザウイルス感染による被害が発生し続けており、養鶏業に甚大な被害をもたらすのみならず、人への感染が確認されている。本ウイルスは人が免疫を持たないため、変異により人へ感染しやすい状態に変化することで、高致死率の新型ウイルスとしてパンデミックを引き起こす可能性が懸念されている<sup>1)</sup>。対策として、ワクチンの開発や抗インフルエンザ薬の備蓄検討などが進められている。一方、我々はこれまでに、大気圧放電プラズマで生成した正負クラスターイオンを用いて、空气中に浮遊する細菌や真菌、H1N1型ヒトインフルエンザウイルス、ネココロナウイルスの感染機能を消失できる特性を見出している<sup>2)~5)</sup>。

今回、クラスターイオンによる空中浮遊状態での高病原性H5N1型トリインフルエンザウイルス感染力低減効能について検証実験を行った結果、正と負のクラスターイオンの相互作用で空中ウイルス感染機能を大

きく低減でき、空気環境の浄化効果があることを見出した。本論文では、開発したクラスターイオンの空中トリインフルエンザウイルス感染機能低減効果について報告する。

## 1. 実験装置および方法

### 1・1 イオン発生素子

試験に用いたイオン発生素子の写真を図1に示す。平板状誘電体の表面に電極を形成し、交流高電圧を印加することによって、表面にプラズマ放電状態を形成する。放電プラズマによって大気中の分子を電離や解離させることで、正極性および負極性イオンを発生させている。試験では送風により生成したイオンを空間に拡散させた。

また、生成したイオン種は $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_m$ ( $m$ は整数)正クラスターイオンおよび $\text{O}_2^-(\text{H}_2\text{O})_n$ ( $n$ は整数)負クラスターイオンであった。

\* 電化システム事業本部 電化商品開発センター 第1開発室

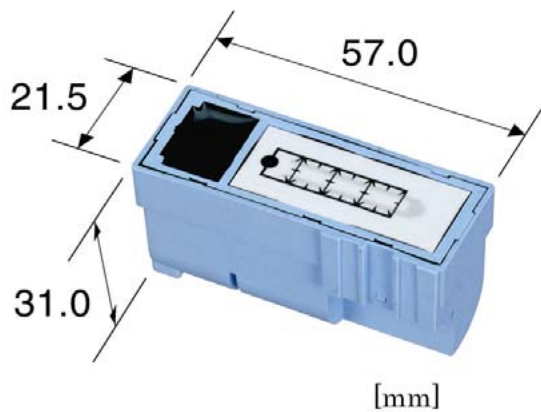


図1 イオン発生素子の写真

Fig. 1 Photograph of the ion generation device.

### 1・2 試験装置

図2は、ウイルス試験装置の概略図を示す。内容積1m<sup>3</sup>(1×1×1m)ボックス内にイオン発生素子を設置し、イオン発生素子表面に風が当たるように送風ファンを配置した。また、試験ボックスに、ウイルス液噴霧用アトマイザーと内部ウイルス回収用インピンジャーを取り付けた。

### 1・3 ウイルス試験方法

ウイルスは、高病原性H5N1型トリインフルエンザウイルス(Avian Influenza A H5N1 NIBRG-14, Vietnam/1194/2004)を用いた。ウイルス溶液を6ml入れたアトマイザーにより0.13ml/min.の速度でウイルスをボックス内に噴霧した。噴霧終了5分経過後、内部の空気を10L/min.の速度で吸引し、インピンジャーにより10分間ウイルスの回収を行った。

イオンを発生させない場合をコントロールとして、イオンを発生させた場合のウイルス量と比較した。なお、イオン発生素子駆動時のボックス内イオン濃度は7千個/cm<sup>3</sup>とした。また、イオンを発生させない場合もイオンを発生させた場合と同様に送風ファンを駆動させた。

### 1・4 ウイルス感染力評価方法

インピンジャーで回収したウイルス液を10倍段階希釈し、MDCK細胞に接種し、3～5日での細胞変異効果を調べウイルス感染力価(TCID<sub>50</sub>)を評価した。なお、ウイルス感染力価はウイルス分野で一般的なKarberの式より算出した。

また、細胞のウイルス感染状態を視覚的に評価する

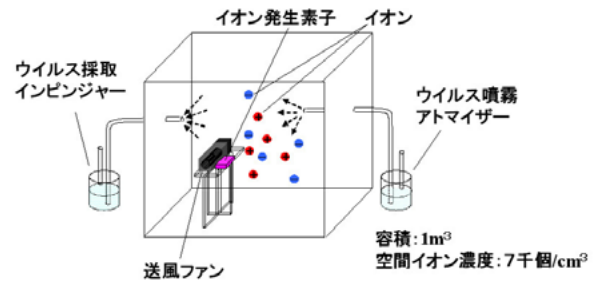


図2 試験装置の概略図

Fig. 2 Schematic diagram of the test apparatus.

ために、ウイルス接種細胞を免疫蛍光抗体分析法(IF法)により評価を行った。本分析法は、ウイルスと結合する蛍光色素で細胞を染色することにより、細胞の感染状態を評価する方法で、ウイルス分野で一般的に用いられる方法である。

## 2. 実験結果および考察

### 2・1 ウイルス感染力価の評価

クラスターイオン非発生時の試験ボックス内空中トリインフルエンザウイルスの感染力価は、噴霧終了5～15分後、10<sup>4.29</sup>TCID<sub>50</sub>/mLであった。一方、クラスターイオン発生時の空中トリインフルエンザウイルス感染力価は、10<sup>2.33</sup>TCID<sub>50</sub>/mLで、クラスターイオン非発生時に比べ、ウイルス感染力価が99%低下することが確認された(図3)。

図4は、イオンを作用させていないトリインフルエンザウイルスと作用させたトリインフルエンザを細胞に接種し、細胞変化の様子を観察した写真である。プ

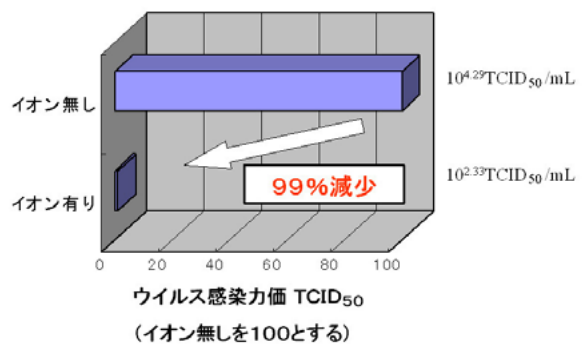


図3 ウイルス感染力価評価結果

Fig. 3 Virus titer evaluation result.

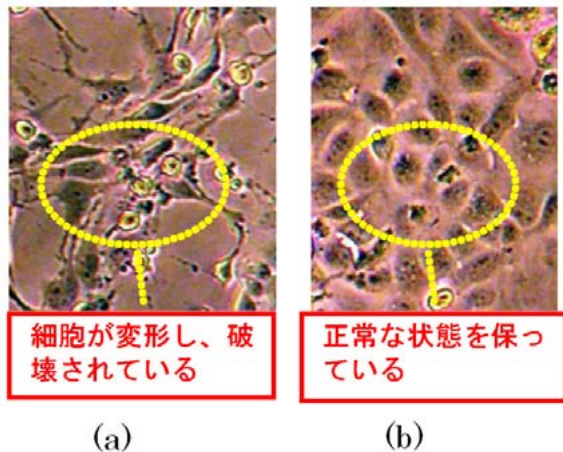


図4 ウイルスを接種し4日経過後の細胞 (MDCK 細胞) の観察写真  
 (a) イオンを作用させていないウイルスを接種、  
 (b) イオンを作用させたウイルスを接種  
 Fig. 4 Photographs of MDCK cells passed 4days from inoculation.  
 (a) inoculated with virus not treated with ions.  
 (b) inoculated with virus treated with ions.

ラズマクラスターイオンを作用させていないウイルスを接種した細胞 (a) では、ウイルス接種4日後細胞が変形し破壊されている。一方、プラズマクラスターイオンを作用させたウイルスを接種した細胞 (b) では、ウイルス接種4日後でも細胞が正常な形状を保っており、イオンがウイルスの感染力を低下させていることが確認された。

### 2・2 免疫蛍光抗体分析法による評価

図5はイオンを作用させていないトリインフルエンザウイルスと作用させたトリインフルエンザを細胞に接種し、4日後のウイルス感染細胞を撮影した写真で、各写真の左側は明視野で撮影した写真、右側は蛍光色素でウイルス感染細胞を染色し蛍光発光状態を撮影した写真である。

(a) はイオンを作用させていないウイルスを接種した細胞の写真で、明視野写真から細胞が変形していることが確認された。また、蛍光染色し発光状態を撮影した写真からは、蛍光発光部分がたくさん観察され、細胞にウイルスが感染していることを確認した。

一方、(b) はイオンを作用させたウイルスを接種した細胞で、明視野写真で細胞の変形がほとんど見られず、蛍光染色写真でも発光部分が見られなかった。

本結果から、正負クラスターイオンの作用によりウイルスの感染力が消失していることが確認された。

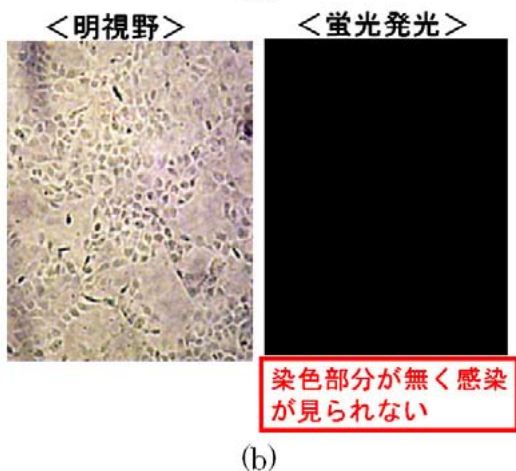
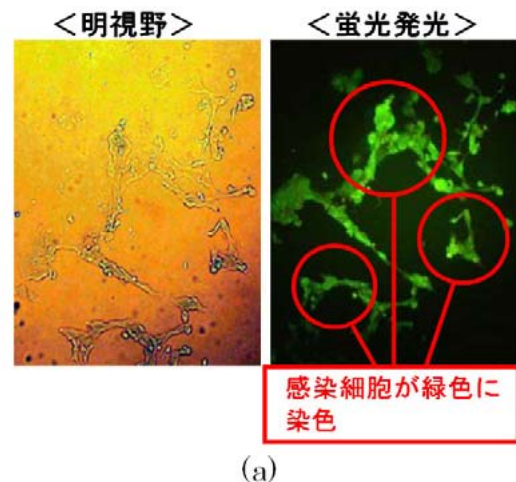


図5 免疫蛍光抗体分析法による評価結果  
 (a) イオンを作用させていないウイルスを接種  
 (b) イオンを作用させたウイルスを接種  
 Fig. 5 Immuno-Fluorescence (IF) Test Results.  
 (a) inoculated with virus not treated with ions.  
 (b) inoculated with virus treated with ions.

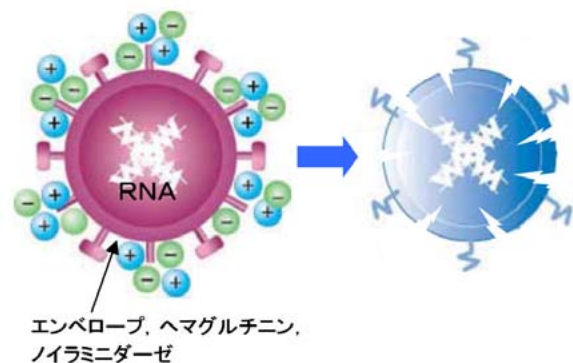


図6 ウイルス不活化モデル  
 Fig. 6 Model for inactivation of infection capacity from viruses.

### 2・3 クラスターイオンによるウイルス作用メカニズムモデル

これまで述べたように、正極性および負極性クラスターイオンによる気中トリインフルエンザウイルスの感染力低減効果を実証した。図6は正負クラスターイオンによる気中トリインフルエンザウイルス不活化モデルを示す。気中ウイルスにクラスターイオンが衝突して、ウイルスを取り囲み、正極性クラスターイオン  $H^+ (H_2O)_m$  ( $m$ は整数) と負極性クラスターイオン  $O_2^- (H_2O)_n$  ( $n$ は整数) がウイルスの表面で反応してOHラジカル等の活性種が生成していると考えられる。この活性種はウイルス表面のエンベロープ、ヘマグルチニン、ノイラミニダーゼのタンパクと反応してタンパクを変性し、ウイルスの感染機能を消失させるものと考えられる。

#### むすび

イオン発生素子より生成された正および負イオンによる高病原性H5N1型トリインフルエンザウイルスの感染機能消失効果について調べた。その結果、次の点が明らかになった。

(1) ウイルス感染力価 ( $TCID_{50}$ ) 評価の結果、イオン発生素子動作時では、イオン発生素子を動作させない状態と比べると、気中ウイルス感染力価の大幅な減少が認められ、5～15分で99%減少することを確認した。

(2) 免疫蛍光抗体分析法 (IF法) による評価の結果、正と負のクラスターイオンを作用させたウイルスを接

種した細胞において4日経過後、蛍光染色が見られず、感染力が低下していることを確認した。

今回、正負クラスターイオンにより高病原性H5N1型トリインフルエンザウイルスの感染機能低減効果を確認した。この結果よりプラズマクラスターイオンは、室内環境の浄化に大きな効果を発揮するものと考えられる。

#### 謝辞

気中高病原性H5N1型トリインフルエンザウイルスの不活化試験において、イギリス レトロスクリーン・バイロロジー社の John Oxford 教授、Kim Pham 氏、Robert Lambkin 氏、Alex Mann 氏にご協力頂きましたので、ここに感謝致します。

#### 参考文献

- 岡田晴恵, “鳥インフルエンザの脅威”, pp.54-63(2004).
- K. Nishikawa, H. Nojima, “Jpn. J. Appl. Phys.” 40, L835-L836, (2001).
- K. Nishikawa, H. Nojima, “Air Purification Effect of Cluster Ions Generated by Plasma Discharge at Atmospheric Pressure”, pp699-700, PSS-2001/SPP-18, (2001).
- K. Nishikawa, H. Nojima et al., “Development of Novel Air Purification Technology Using Ions Generated by Discharge Plasma”, pp660-665, HB2003 (2003).
- 松岡憲弘, 西川和男, 鈴木達夫, 小林憲忠, “放電プラズマにより生成したクラスターイオンを用いた気中コロナウイルス不活化技術”, pp261, 2P041, 日本ウイルス学会第52回学術集会予稿集 (2004). (2006年6月8日受理)