

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03040

研究課題名(和文) 飛沫・喀痰の粘性研究を基盤としたインフルエンザウイルス伝播機構解明

研究課題名(英文) Study on the transmission system of influenza virus due to the viscosity of aerosol

研究代表者

中屋 隆明 (NAKAYA, TAKAAKI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80271633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：粘液中のインフルエンザウイルスに対するエタノール阻害剤の有効性が生理食塩水中のウイルスと比較して低下する分子機構について論文発表した。また、解剖献体由来の培養皮膚による病原体安定性評価モデル「ヒト皮膚モデル」を構築し、皮膚上におけるSARS-CoV-2およびインフルエンザウイルスの生存時間をシミュレートした結果、SARS-CoV-2の検出限界は10時間程度であり、インフルエンザウイルスの2時間以内と比較すると、約5倍長く感染ウイルスが残ることを論文発表した。さらに、現行の消毒薬の成分濃度が、ヒト皮膚表面上のSARS-CoV-2に対して有効な効果を示すことを明らかにし、論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルスやSARS-CoV-2などによる接触、飛沫(空気)感染は、迅速かつ広範に感染拡大が起こることが特徴である。上記ウイルスの生体内(細胞内)における感染・増殖機構については集中的な研究が行われている一方で、その伝播経路については未だ不明な点が多い。本研究は、解剖献体由来の組織を用いて、皮膚モデルを構築し、「皮膚表面上におけるウイルスの感染・伝播動態を明らかにしようとする点」が最大の特色である。本研究の遂行により、ヒト皮膚表面上の(喀痰中)ウイルス感染性の経時的変化と各種消毒薬に対する感染性失活について知見を得、論文発表することができた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the efficacy of hand-washing using ethanol-based disinfectant against mucus is greatly reduced until infectious mucus adhering to the hands/fingers has completely dried. We also evaluated the stability of SARS-CoV-2 and influenza A virus (IAV), mixed with culture medium or upper respiratory mucus, on human skin surfaces and the dermal disinfection effectiveness of 80% (w/w) ethanol against each virus. The results showed that SARS-CoV-2 and IAV were inactivated more rapidly on skin surfaces than on other surfaces (stainless steel/glass/plastic); the survival time was significantly longer for SARS-CoV-2 than for IAV [9.04 h (95% confidence interval: 7.96-10.2 h) vs. 1.82 h (1.65-2.00 h)]. In addition, our further investigations showed that high concentrations of benzalkonium chloride and chlorhexidine gluconate-based disinfectants may be applicable to hand hygiene targeting SARS-CoV-2 as an alternative to alcohol-based disinfectants.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス 飛沫感染 エアロゾル COVID-19 SARS-CoV-2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

一般に季節性インフルエンザは上気道に感染を引き起こす感染症であり、咳嗽や咽頭痛などの上気道症状等を引き起こす。しかし症例の中には、腹痛、嘔吐、下痢といった腹部症状を認める症例が散見される。我々はこれまでに、季節性インフルエンザウイルス (A 型 H3N2 および B 型) 感染により、呼吸器症状だけではなく、“腸管感染”によるウイルス増殖、および (それに伴う) 消化器症状が現れる症例を報告した (Clin. Microbiol. Infect., 2016, 2017)。さらに、このような呼吸器ウイルスが胃や腸内の胃酸・消化液に曝されるにもかかわらず、感染性を保持し腸管感染するメカニズムについて検証を進め、(ウイルスを有する) 喀痰 (ムチン) の“粘弾性”が重要な因子であることを見出した (J Infect Dis. 2017)。即ち、呼吸器上皮細胞から産生されたウイルスが粘液と混合することにより、嚥下後の胃酸や小腸消化液による分解 (不活性化) からウイルスを保護する効果があることを *in vitro* 実験系 (レオロジー解析と感染試験) で報告した (Sci Rep. 2017)。

加えて、ヒト喀痰が有する“粘弾性”についてレオメーターによる動的粘弾性を計測し、キサンタンガム等の“人工粘液”を用いたモデル試験系を構築し、(アルコール噴霧に代わる) 飛沫や喀痰の消毒法の評価システムを確立した。

## 2. 研究の目的

インフルエンザウイルス伝播における飛沫粒子、喀痰のレオロジー (粘弾性) 特性および気中動態を解析し、バイオエアロゾルのインターフェース (界面) ダイナミクスとウイルス伝播性との関連を解明することを目指す。そのためにエアロゾルウイルスの閉鎖感染実験系を用いて、飛沫・空気感染のシミュレーションおよびウイルス不活化法の評価・開発を行う。

加えて、ウイルス不活化のための手指消毒法の評価試験 (臨床研究) および解剖献体を用いた皮膚モデルの創出を通して、唾液・喀痰の「粘弾性」と皮膚の「ウイルス保護作用および不活化作用」の関連を明らかにする。

一方、2020 年初めより新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) のパンデミック発生に伴い、その原因ウイルスである SARS-CoV-2 の研究が喫緊の課題となった。そのため本研究ではインフルエンザウイルスに加えて SARS-CoV-2 も研究対象とした。

本研究を遂行することにより、咳嗽、吐息、呼気に含まれる病原体に対する検査法・消毒法の開発、および呼吸器ウイルスの飛沫・空気感染、二次伝播に関する知見を集積し、これらを制御する新規システムの開発につながることを期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) バイオエアロゾルの粒度動態分析: エアロゾルの粒度分布について、レーザー回折式測定およびパーティクルカウンターを用い、エアロゾル (人工粘液を含む) 発生装置と組み合わせることにより、飛沫などバイオエアロゾルの粒径 (粒度) 分布を測定するシステムを開発し、本研究において使用した。

(2) 粘液中のウイルスに対する手指消毒の効果判定: インフルエンザウイルス (A 型) に感

染者の上気道由来粘液を使用して、ウイルスの不活化試験とエタノール濃度測定を実施した。さらに、エタノールベース阻害剤 (Ethanol-Based Disinfectants; EBDs) および流水による手洗いによる手指衛生の有効性を評価した。

(3) ヒト皮膚モデル: 法医解剖献体由来の培養皮膚による病原体安定性評価モデル「ヒト皮膚モデル」を構築し、皮膚上における SARS-CoV-2 およびインフルエンザウイルスの生存時間をシミュレートした。また、本皮膚モデルを用いて EBDs によるウイルス不活化実験を行った。

#### 4. 研究成果

(1) バイオエアロゾルの粒度動態分析:

研究当初の加圧ポンプに代えて、建物(研究室)内圧縮空気配管に直結する工事を行ったことにより、より安定的な吸気システムを設置することができた。このシステムを用いてウイルス濃度とエアロゾルの感染(暴露)時間をパラメーターとして各条件下での感染実験を行った結果、当初想定した30分間の噴霧時間を大幅に短縮した3分間の暴露により細胞に感染することを明らかにした。この「閉鎖空間中の感染実験系」を用いて、空間中に滞留したミスト化ウイルス(インフルエンザウイルス、コロナウイルス、パラミクソウイルス)の感染力測定系の基盤を構築することに成功した。

(2) 粘液中のウイルスに対する手指消毒の効果判定:

粘液中のウイルスに対する手指消毒の効果判定について、投稿論文を発表した (Situations Leading to Reduced Effectiveness of Current Hand Hygiene against Infectious Mucus from Influenza Virus-Infected Patients. Hirose R, Nakaya T. et al., mSphere. 2019 Sep 18;4(5). pii: e00474-19.)。手指衛生の効果評価では、粘液中のインフルエンザウイルスに対するエタノール阻害剤 (EBDs) の有効性が生理食塩水中のウイルスと比較して低下することを報告した。即ち、対照とした生理食塩水中のウイルスは30秒以内に不活性化されたが、粘液中のウイルスは、120秒間のエタノールを使用した手指衛生にもかかわらず感染力を維持したままであり、現行の手指衛生プロトコルでは感染性粘液を完全に不活化することは困難であることが考えられた。一方で、感染性粘液が完全に乾燥し固化するとハイドロゲルの特性は失われ、消毒効果の低下は生じないことも明らかにした。さらに、物理的に感染性粘液を洗い流す流水による手洗いによる手指衛生は、30秒以内にウイルスを不活性化することを報告した。

本研究により、感染性粘液が手指などの体表に付着して完全に乾くまでの間は(本研究では約30-40分間と想定)、EBDsを使用した適切な手指衛生 施行後でも感染力を維持した病原体が体表に残存し、周囲に感染が広がるリスクがあることが明らかとなった。本論文発表後に様々な議論があり、代表的な質問に対する回答を後日発表した

(Reply to Peters and Pittet, Hirose R, Nakaya T. et al., mSphere. 4(6):e00745-19)。

(3) ヒト皮膚モデル:

2020年初めに発生したCOVID-19パンデミックに伴い、インフルエンザウイルスに加えてCOVID-19の原因ウイルスであるSARS-CoV-2を用いた研究を行った。

インフルエンザウイルスおよびSARS-CoV-2の物質・皮膚表面上における感染動態 ステンレス、ガラス、ポリスチレン表面上におけるウイルス感染性の経時変化を評価した。そ

の結果、SARS-CoV-2 は 4 日間静置後も感染性ウイルスが確認された一方で、インフルエンザウイルスは 6-8 時間で検出限界となった。次に解剖献体由来の培養皮膚による病原体安定性評価モデル「ヒト皮膚モデル」を構築し、皮膚上における SARS-CoV-2 およびインフルエンザウイルスの生存時間をシミュレートした。その結果、SARS-CoV-2 の検出限界は 10 時間程度であり、インフルエンザウイルスの 2 時間以内と比較すると、約 5 倍長く感染ウイルスが残ることが示唆された。

#### 皮膚モデルを用いたインフルエンザウイルスおよび SARS-CoV-2 の消毒効果評価

皮膚モデルを用いて 80% (W/W) エタノールによる不活化実験を行ったところ、15 秒以内に両ウイルスとも感染性が完全に喪失することが明らかとなった。さらに、ウイルス粒子を懸濁する培地に代えてヒト(非感染)喀痰と混合し、上述したウイルス残存性評価を行ったところ、インフルエンザウイルスでは感染性ウイルスの検出限界時間が、培地と混合した群と比較して、1/3~1/6 へと大幅に短縮された。一方で、SARS-CoV-2 では喀痰群と培地群との違いはほぼ認められなかった。

以上の成果を投稿論文に発表した ( Survival of SARS-CoV-2 and influenza virus on the human skin: Importance of hand hygiene in COVID-19. Hirose R, Nakaya T. et al., Clin Infect Dis. 2020 Oct 3:ciaa1517. : 本論文は発表後 3 週間以内にオルトメトリクス Attention Score が 3000 を超えた)。本論文についても様々な議論があり、代表的な質問に対する回答を後日発表した ( Reply to Gracely, Hirose R, Nakaya T. et al., Clin Infect Dis. 2021 Jan 13:ciab023 )。

また、ヒト皮膚表面上の SARS-CoV-2 は、上記実験より低濃度の 40% (w/w) 以上のエタノールの 5 秒間の暴露により検出感度以下までに不活化されることを明らかにした。EBDs は濃度が 52-75% (w/w) のエタノールが主成分であるため、EBDs はヒト皮膚上の SARS-CoV-2 にも十分有効であることが確認された。さらに、イソプロパノールもエタノールと同様に有効であることが明らかとなり、実使用に最も近い条件での SARS-CoV-2 感染制御効果を検証することができた。一方、低水準消毒薬に分類されるグルクロン酸ヘキシジン・塩化ベンザルコニウムは、40% (w/w) 以上のエタノールやイソプロパノールに比して SARS-CoV-2 に対する消毒効果が劣ることが示された。しかしながら、比較的高濃度である (実使用濃度の) 1.0% (w/v) グルクロン酸ヘキシジン・0.2% (w/v) 塩化ベンザルコニウムは、ヒト皮膚表面上の SARS-CoV-2 に対してやや強い消毒効果を示すことを明らかにした。

これらの成果を投稿論文に発表した ( Disinfectant effectiveness against SARS-CoV-2 and influenza viruses present on human skin: model-based evaluation. Hirose R, Nakaya T. et al., Clin Microbiol Infect. 2021 Apr 24:S1198-743X(21)00192-0. )。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Hirose Ryohei, Bandou Risa, Ikegaya Hiroshi, Watanabe Naoto, Yoshida Takuma, Daidoji Tomo, Naito Yuji, Itoh Yoshito, Nakaya Takaaki	4. 巻 in-press
2. 論文標題 Disinfectant effectiveness against SARS-CoV-2 and influenza viruses present on human skin: model-based evaluation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Microbiology and Infection	6. 最初と最後の頁 in-press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmi.2021.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishioka Keisuke, Kyo Michihito, Nakaya Takaaki, Shime Nobuaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Proteins produced by Streptococcus species in the lower respiratory tract can modify antiviral responses against influenza virus in respiratory epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Infection	6. 最初と最後の頁 104764 - 104764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micinf.2020.09.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hirose Ryohei, Ikegaya Hiroshi, Naito Yuji, Watanabe Naoto, Yoshida Takuma, Bandou Risa, Daidoji Tomo, Itoh Yoshito, Nakaya Takaaki	4. 巻 in-press
2. 論文標題 Reply to Gracely	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 ciab023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cid/ciab023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hirose Ryohei, Ikegaya Hiroshi, Naito Yuji, Watanabe Naoto, Yoshida Takuma, Bandou Risa, Daidoji Tomo, Itoh Yoshito, Nakaya Takaaki	4. 巻 in-press
2. 論文標題 Survival of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Influenza Virus on Human Skin: Importance of Hand Hygiene in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 ciaa1517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cid/ciaa1517	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ryohei Hirose, Takaaki Nakaya	4. 巻 4 (6)
2. 論文標題 Reply to Peters and Pittet, "Influenza and Alcohol-Based Handrub: The Danger of Ignoring Clinical Relevance," and Boyce, "Alcohol-Based Handrubs and Influenza A"	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00745-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00745-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Keisuke Nishioka, Tomo Daidoji, Takaaki Nakaya	4. 巻 520(2)
2. 論文標題 Demethylation around the transcriptional start site of the IFN- gene induces IFN- production and protection against influenza virus infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 269-276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.136.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ryohei Hirose, Takaaki Nakaya, Yuji Naito, Tomo Daidoji, Risa Bandou, Ken Inoue, Osamu Dohi, Naohisa Yoshida, Hideyuki Konishi, Yoshito Itoh	4. 巻 4(5)
2. 論文標題 Situations Leading to Reduced Effectiveness of Current Hand Hygiene against Infectious Mucus from Influenza Virus-Infected Patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00474-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00474-19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuha Arai, Norihito Kawashita, Madiha Salah Ibrahim, Emad Mohamed Elgendy, Tomo Daidoji, Takao Ono, Tatsuya Takagi, Takaaki Nakaya, Kazuhiko Matsumoto, Yohei Watanabe	4. 巻 15(7)
2. 論文標題 PB2 mutations arising during H9N2 influenza evolution in the Middle East confer enhanced replication and growth in mammals.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Pathog	6. 最初と最後の頁 e1007919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1007919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yasuha Arai , Madiha S Ibrahim, Emad M Elgendy , Tomo Daidoji, Takao Ono , Yasuo Suzuki, Takaaki Nakaya, Kazuhiko Matsumoto, Yohei Watanabe	4. 巻 93(4)
2. 論文標題 Genetic Compatibility of Reassortants between Avian H5N1 and H9N2 Influenza Viruses with Higher Pathogenicity in Mammals.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e01969-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01969-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shirasugi M, Nakagawa M, Nishioka K, Yamamoto T, Nakaya T, Kanamura N.	4. 巻 38
2. 論文標題 Relationship between periodontal disease and butyric acid produced by periodontopathic bacteria.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-018-0081-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishisaka-Nonaka R, Mawatari K, Yamamoto T, Kojima M, Shimohata T, Uebanso T, Nakahashi M, Emoto T, Akutagawa M, Kinouchi Y, Wada T, Okamoto M, Ito H, Yoshida KI, Daidoji T, Nakaya T, Takahashi A.	4. 巻 189
2. 論文標題 Irradiation by ultraviolet light-emitting diodes inactivates influenza A viruses by inhibiting replication and transcription of viral RNA in host cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Photochem Photobiol B.	6. 最初と最後の頁 193-200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphotobiol.2018.10.017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中屋隆明
2. 発表標題 コロナウイルスと呼吸不全
3. 学会等名 第42回日本呼吸療法医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中屋隆明
2. 発表標題 熱帯地域（タイ国）における網羅的病原体検出法開発の共同研究推進課題の成果について
3. 学会等名 NRCT- JSPS-JAAT Seminar at Research Expo 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都府立医科大学 感染病態学 www.f.kpu-m.ac.jp/k/did/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	廣瀬 亮平 (HIROSE RYOHEI) (50795383)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教  (24303)	
研究分担者	白杉 迪洋 (SHIRASUGI MICHHIRO) (80807727)	京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医  (24303)	削除：令和2年3月31日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------