



京都府立医科大学
日本製紙株式会社

銅担持 TEMPO 酸化セルロースを原料とする抗ウイルス紙の開発

～正確かつ客観的な抗ウイルス表面の性能評価方法を構築～

京都府立医科大学大学院医学研究科 廣瀬亮平助教らと日本製紙株式会社(東京都千代田区、代表取締役社長：野沢徹)は、銅担持 TEMPO 酸化セルロースを原料とする汎用性の高い抗ウイルス紙を開発しました (TEMPO : 2, 2, 6, 6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシラジカル)。さらに、これらの抗ウイルス紙はその表面上に付着したウイルスの生存時間を大幅に減少させることを実証し、その抗ウイルス活性が発揮されるメカニズムを解明しました。本研究に関する論文が科学雑誌「Journal of Environmental Chemical Engineering」に掲載されましたのでお知らせします。本研究で開発された抗ウイルス紙は、表面上のウイルスの生存時間を大幅に短縮することで接触感染リスクを低減することが期待され、今後の感染制御の発展に大いに貢献します。

本研究成果のポイント

- # 紙は不特定多数の人が直接接触する機会が多く、接触感染の媒介となる可能性がある材料である。一方で、高い抗ウイルス活性を有する紙は未だ開発されていない。
- # 本研究では銅担持 TEMPO 酸化セルロースと従来の製紙用セルロースを混合し抄紙することで抗ウイルス紙を作り出し、それらが強い抗ウイルス活性を有することを実証した。
- # 抗ウイルス紙の表面上に付着したウイルス(インフルエンザウイルス・新型コロナウイルス・ネコカリシウイルス)の生存時間は大幅に短縮した。
- # 抗ウイルス紙は、表面上に付着した感染性体液(ウイルス液)に銅イオンを溶出することで抗ウイルス活性を発揮することが解明された。

掲載誌情報	Journal of Environmental Chemical Engineering [現地時間 2023年7月28日公開] 雑誌発行元国：英国 URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343723013313
論文情報	論文タイトル : Antiviral papers generated from copper-supported TEMPO-oxide cellulose: Antiviral surface objective performance evaluation and underlying mechanisms [日本語 : 銅担持 TEMPO 酸化セルロースから生成された抗ウイルス紙 : 客観的な抗ウイルス性能評価および抗ウイルス活性を発揮するメカニズムの解明]

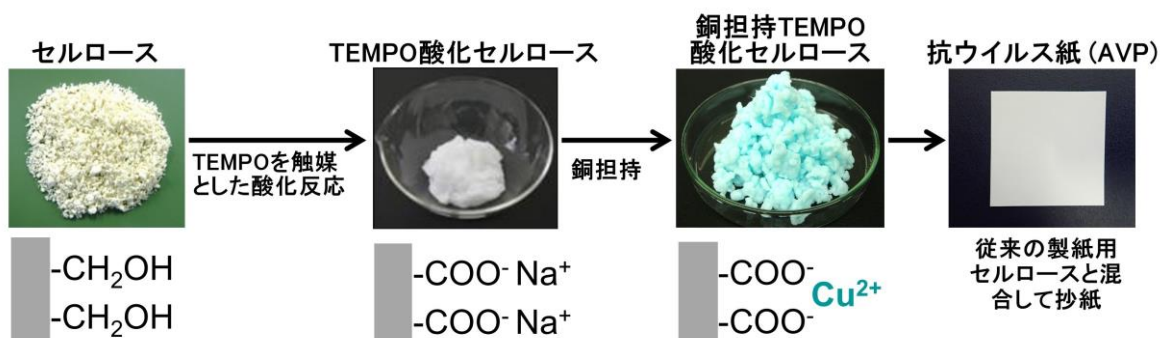
著者情報	筆頭著者・責任著者 京都府立医科大学 大学院医学研究科 消化器内科学 廣瀬亮平
	主な共同著者 日本製紙株式会社 研究開発本部 富士革新素材研究所 吉松文博 日本製紙株式会社 研究開発本部 富士革新素材研究所 深沢光司 日本製紙株式会社 研究開発本部 富士革新素材研究所 三浦克也 京都府立医科大学 大学院医学研究科 消化器内科学 伊藤義人 京都府立医科大学 大学院医学研究科 感染症態学 中屋隆明

【研究の背景・目的】

ウイルスの主な伝播経路として接触・飛沫・空気伝播の3つがあります。接触伝播(接触感染)は、カリシウイルス(ノロウイルス)やアデノウイルスなどの消化管感染ウイルスでは極めて重要な伝播経路です。また頻度はそれほど高くないものの、接触感染はインフルエンザウイルスや新型コロナウイルスなどの気道感染ウイルスにおいても重要な伝播経路です。表面上に存在するウイルス量が少ないほど接触感染のリスクは低くなり、ウイルスがなくなれば接触感染リスクも消失します。そのため抗ウイルス表面をもつ材料の開発や抗ウイルス表面加工の開発が進められています。

近年、世界的に Sustainable Development Goals (SDGs)が掲げられ、持続可能な循環型社会の実現が広く求められており、石油資源製品の代替として紙などの木質資源が注目を集めています。一方で、紙は不特定多数の人々が直接接触する材料であり、接触感染の原因(媒介)となりうる材料であるにもかかわらず、紙の表面を抗ウイルス表面にする技術は確立していませんでした。そこで我々は、TEMPO(2, 2, 6, 6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシラジカル)酸化セルロースに銅イオンを吸着させて銅担持 TEMPO 酸化セルロース(Cu-TOC)を作製し、Cu-TOC と従来の製紙用セルロースを混合し抄紙することで抗ウイルス紙(AVP: antiviral paper)を開発しました(図1)。

図1：抗ウイルス紙を作り出す過程



【研究の方法】

物体表面上のウイルスの生存時間(すなわちウイルスが感染性を維持する時間)は、接触感染を予防するために極めて重要な情報です。我々は表面上でのウイルス生存時間を指標とすることで、実際の使用状況を忠実に再現した状況での正確な抗ウイルス活性評価を実現しました。具体的には、抗ウイルス加工のなされていない一般的な普通紙(PP: plain paper)と AVP 表面上のウイルス生存時間を比較し、AVP の抗ウイルス性能を評価しました。ウイルス生存時間の測定・算出は、廣瀬らに

よって構築された方法に基づいて行われました(文献1、2、3)。

本研究では表1に示すように、AVP として物理的特性・表面性状の異なるものを4種作成し(AVP1~4)、コントロールとして同一表面性状をもつ PP を用意しました(PP1~4)。抗ウイルス性能評価として、これらの計8種の紙表面上での各種ウイルスの生存時間を解析しました。評価対象ウイルスとして、環境安定性の低いエンベロープウイルスであるインフルエンザウイルス(IFV)、環境安定性のやや高いエンベロープウイルスである新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)、環境安定性の高いノンエンベロープウイルスであるネコカリシウイルス(FCV)を本研究では使用しました。さらに、これらの紙表面から溶出される銅イオン濃度および抗ウイルス活性を評価しました。これらのデータに基づき、AVP の抗ウイルス性能評価および抗ウイルス活性を発揮するメカニズムの解明を行いました。

表1：解析に使用した普通紙および抗ウイルス紙

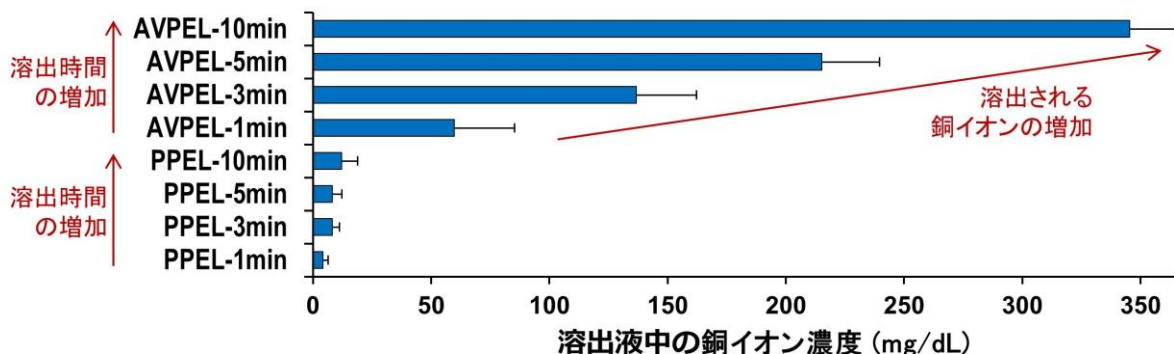
	PP1	AVP1	PP2	AVP2	PP3	AVP3	PP4	AVP4
坪量(g/m ²)	80	80	80	80	70	70	181	181
接触角	37°	38°	96°	91°	92°	92°	100°	102°
耐水浸透性(秒)	0	0	10	18	40	48	341	337
平滑度(秒)	105	91	88	87	65	85	90	70
銅担持	×	○	×	○	×	○	×	○

PP: plain paper (普通紙), AVP: antiviral paper (抗ウイルス紙)

【研究の主な結果と考察】

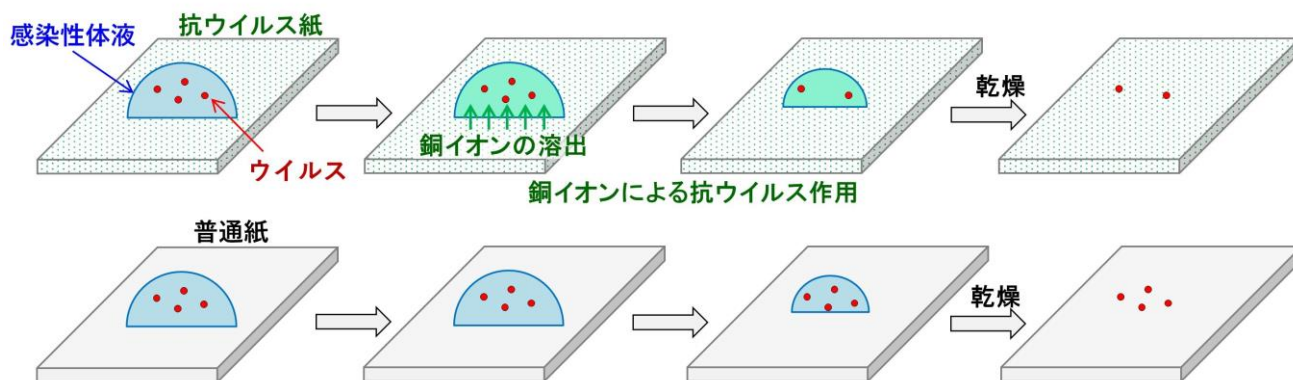
① 抗ウイルス紙を純水に1、3、5、10分間浸透させた溶出液(AVPEL:AVP extraction liquid)である AVPEL-1min、AVPEL-3min、AVPEL-5min、AVPEL-10min の銅イオン濃度は、それぞれ 59.7、137、215、345 $\mu\text{g}/\text{dL}$ でした。AVPEL 中の銅イオン濃度は、溶出時間が増加するにつれて増加しました。これに対し、普通紙を純水に1、3、5、10分間浸透させた溶出液(PPEL:PP extraction liquid)である PPEL-1min、PPEL-3min、PPEL-5min、PPEL-10min の銅イオン濃度はそれぞれ 4.1、8.1、8.2、12.1 $\mu\text{g}/\text{dL}$ であり、銅イオンの溶出はほとんどありませんでした(図2)。このように水分との接触時に AVP から速やかに銅イオンが放出されることで抗ウイルス活性を発揮すると推測されました(図3)。

図2：抗ウイルス紙・普通紙から溶出される銅イオン



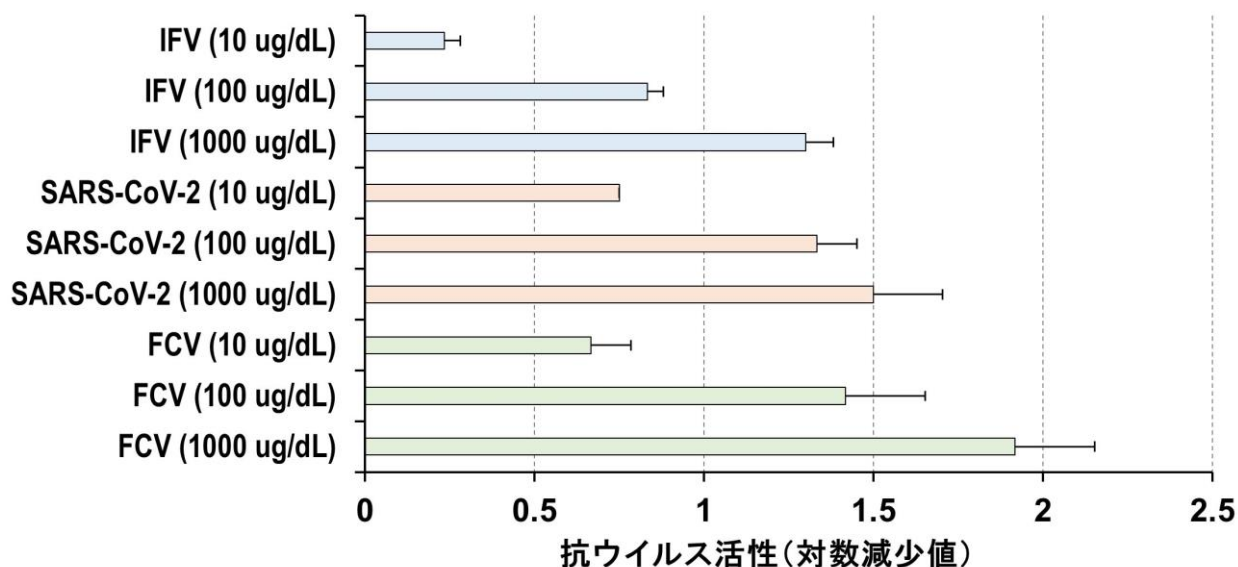
AVPEL:AVP extraction liquid (抗ウイルス紙を1~10分間浸透させた溶出液)
PPEL:PP extraction liquid (普通紙を1~10分間浸透させた溶出液)

図3：抗ウイルス紙が抗ウイルス活性を発揮するメカニズム



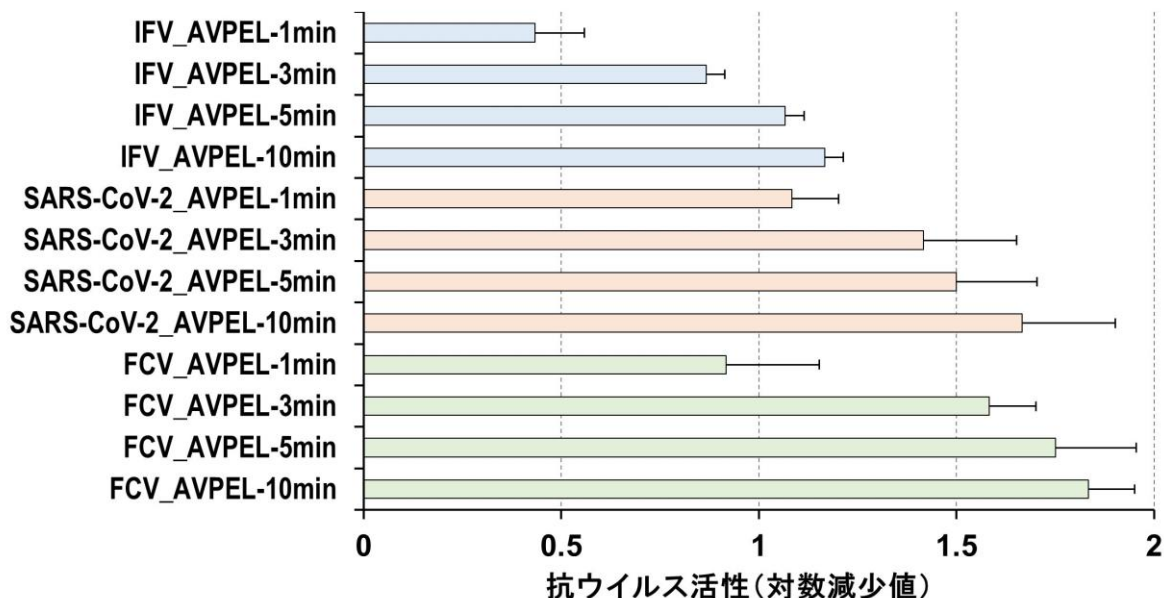
② 銅イオンには抗ウイルス活性があることが複数の報告で示唆されていますが、様々な銅イオン濃度条件および反応時間条件における抗ウイルス活性を網羅的に解析した研究はほとんどありません。本研究では、10,100,1000 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 銅イオン水溶液のIFV・SARS-CoV-2・FCVに対する抗ウイルス活性(対数減少値)を評価しました。その結果、銅イオン水溶液とウイルスを30分間反応させた抗ウイルス活性は、銅イオン濃度の増加とともに増加し、銅イオン濃度と抗ウイルス活性の間に強い相関関係が観察されました(図4)。

図4：各濃度の銅イオン水溶液における抗ウイルス活性



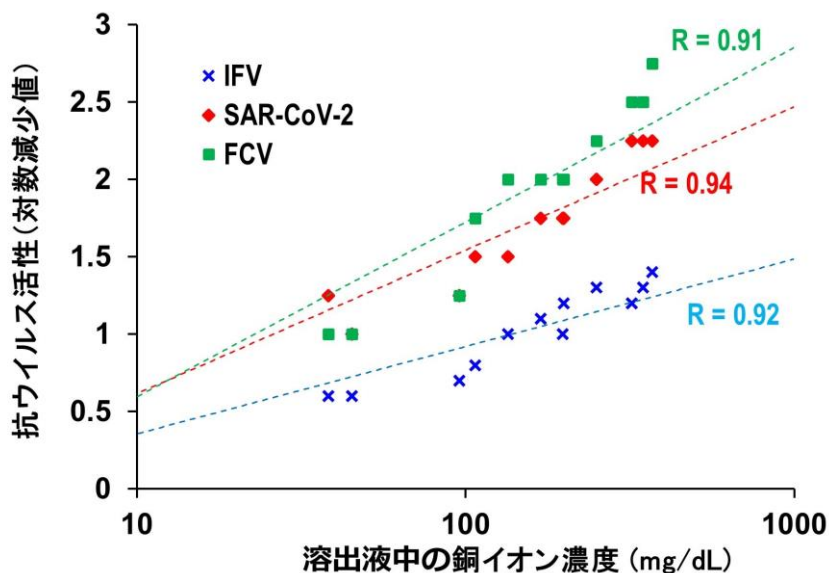
続いて、AVPEL および PPEL の IFV・SARS-CoV-2・FCV に対する抗ウイルス活性(対数減少値)を評価しました。その結果、AVPEL とウイルスを 30 分間反応させた抗ウイルス活性は銅イオン濃度の増加(つまり、溶出時間の増加)とともに増加し、銅イオン濃度と抗ウイルス活性の間に強い相関関係が観察されました(図5, 図6)。

図5：抗ウイルス紙からの溶出液における抗ウイルス活性



AVPEL: AVP extraction liquid (抗ウイルス紙を1~10 分間浸透させた溶出液)
 PPEL: PP extraction liquid (普通紙を1~10 分間浸透させた溶出液)

図6：抗ウイルス紙からの溶出液における抗ウイルス活性と銅イオン濃度の相関解析



対照的に PPEL の対数減少値は 0.5 未満であり、PPEL の抗ウイルス活性は非常に低い結果となりました。さらに上記のデータから、AVPEL や銅イオン水溶液はノンエンベロップウイルスに対してもエンベロップウイルスと同程度の抗ウイルス活性を発揮することが明らかになりました。そのため様々なウイルスに対して有効な抗ウイルス表面の開発において、銅イオンを抗ウイルス成分として使用することは理にかなっています。

③ ウイルス生存時間は、各経過時間における AVP と PP の表面に残っているウイルス量(力価)から算出されました。AVP1・AVP2・AVP3 においてはすべてのウイルスの生存時間が 1 時間未満でした。また、AVP 表面上のウイルスの生存時間は、同じ物理化学的特性をもつ PP 表面上のウイルスの生存時間に比して大幅に短縮されました(表2)。AVP1・AVP2・AVP3・AVP4 いずれの AVP においても IFV, SARS-CoV-2, and FCV の生存時間短縮率はそれぞれ 63-88%、89-99%、90-99%でした(表3)。このように AVP 上の主要ウイルスの生存時間は非常に短くなることが示され、接触伝播のリスクを低減させることが期待されます。

表2：各種紙表面上でのウイルス生存時間

	生存時間 中央値		
	IFV	SARS-CoV-2	FCV
PP1	33分	70分	45分
AVP1	8.9分	7.4分	4.6分
PP2	110分	2.6日*	24日*
AVP2	34分	46分	48分
PP3	92分	920分	4.9日*
AVP3	34分	43分	45分
PP4	1.9日*	7.1日*	100日* 以上
AVP4	320分	300分	97分

*1日=1440分、ウイルス生存時間は「ウイルスが感染力を維持する時間」と定義しています。

表3：抗ウイルス紙によるウイルス生存時間短縮率

	生存時間短縮率 (%)		
	IFV	SARS-CoV-2	FCV
PP1	72.6	89.4	89.8
AVP1			
PP2	70.2	98.8	99.9
AVP2			
PP3	63.3	95.3	99.4
AVP3			
PP4	88.4	97.1	> 99.9
AVP4			

ウイルス生存時間は「ウイルスが感染力を維持する時間」と定義しています。

$$\text{生存時間短縮率} = 100 \times \frac{\text{PP上での生存時間} - \text{AVP上での生存時間}}{\text{PP上での生存時間}}$$

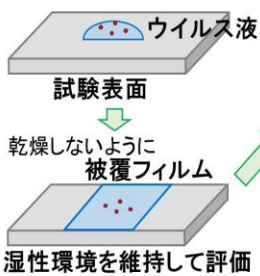
【本研究のまとめ】

本研究ではAVPの抗ウイルス性能を解析し、抗ウイルス活性を発揮するメカニズムを解明しました。同じ物理化学的特性を持つPPと比較して、AVP上のウイルス(IFV、SARS-CoV-2、FCV)の生存時間は大幅に短縮されました。したがって、AVPを使用すると、接触感染のリスクを軽減できると考えられます。この研究では、PP上でのFCVの生存期間が非常に長く、数日以上であることも示されました。食中毒やウイルス性胃腸炎の原因となるFCVなどのノンエンベロープウイルスは、消毒剤に対して耐性があり且つ環境安定性が極めて高いため、感染制御に難渋することが多く問題となっております。しかし、本研究では、AVP上のFCVの生存時間は100分未満に大幅に短縮されました。したがって、AVPの導入は、ノンエンベロープウイルスの長期にわたる接触感染のリスクを大幅に軽減し、食中毒やウイルス性胃腸炎の予防に貢献できます。さらに、本技術は紙の原料であるセルロースにCu-TOCを介して抗ウイルス活性を付与することができるため、従来の製紙プロセスを変更することなく、様々な物理化学的性質を有するAVPを製造できるという利点もあります。

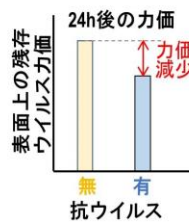
【今後の展開（京都府立医科大学が確立した抗ウイルス表面性能の評価系）】

これまでは、抗ウイルス表面の性能を正確に評価し、客観的に比較することは困難でした。従来の評価方法では、表面に残留するウイルスの力価を抗ウイルス表面の性能の指標としていましたが、力価値は時間の経過とともに大きく変動するため、指標パラメータとしては適していません。廣瀬らの研究グループでは、抗ウイルス活性の指標パラメータとしてウイルス生存時間を使用して、抗ウイルス表面の正確かつ客観的な性能評価方法を新たに構築しました。加えて、生存時間はウイルスが実際に表面で感染力を維持する時間を表すため、この新しい性能評価は抗ウイルス表面の性能を直接反映し、抗ウイルス表面の導入により接触感染リスクにさらされる時間がどの程度短縮されるかを容易に把握できます。この新しい評価系は、様々な抗ウイルス表面の開発に大きく貢献します。評価依頼・相談は京都府立医科大学 廣瀬までお問い合わせください。

既存の評価系 (ISO等)



24時間後に表面上のウイルスを回収して力価を測定、抗ウイルス加工有りの条件で表面上の残存ウイルスが少ない
⇒**抗ウイルス効果ありと判断**
※ ISO規格：一定以上(2以上)の力価減少を示せば有効



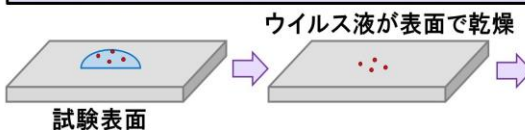
デメリット

- # 湿性環境下での評価のため、本来の状況(ウイルス液が表面に付着したのち自然に乾燥する状況)から乖離している。
- # 抗ウイルス加工無し条件に比してどれくらい力価が減少すれば、どの程度の抗ウイルス効果が実際に期待できるか推測できない。
- # 経過時間が24時間後などの1点のみの測定なので、短時間条件の抗ウイルス効果(実際の現場では重要!)が評価できない。

メリット

- # 湿性環境での評価は難易度が低く、標準化可能(一般的な施設で評価可)

京都府立医科大学の廣瀬らが構築した新しい評価系



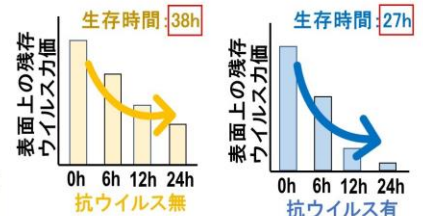
0, 1, 2, 4, 6, 12, 24... 時間経過後の条件(必要に応じて24時間以降の条件も追加)の表面上のウイルスを回収し、力価を測定し、各経過時間の力価値から生存時間を算出する。

デメリット

- # 評価が煩雑かつ難易度が高い、特にウイルスの生存時間に影響を与える条件を各測定で一定に保つのが難しい。そのため評価法を標準化するのが現段階では困難である。

メリット

- # 本来の状況(ウイルス液が表面に付着したのち自然に乾燥する状況)を忠実に再現しているため、実際の環境中で発揮する抗ウイルス効果を容易に推測できる。
- # 生存時間という単一のパラメータでそれぞれの条件(材料・加工・表面)を比較できるため、正確かつ客観的な評価が可能である。



生存時間の比較で抗ウイルス効果の有無だけでなく程度も評価可能、性能比較が容易である。
(例:この抗ウイルス加工はウイルスの生存時間を**11時間短縮**させる)

【文献】

1. Hirose R, Ikegaya H, Naito Y, Watanabe N, Yoshida T, Bandou R, Daidoji T, Itoh Y, Nakaya T. Survival of SARS-CoV-2 and influenza virus on the human skin: Importance of hand hygiene in COVID-19. *Clinical infectious diseases*. 2021;73(11):e4329-e4335.
2. Hirose R, Itoh Y, Ikegaya H, Miyazaki H, Watanabe N, Yoshida T, Bandou R, Daidoji T, Nakaya T. Evaluation of the residual disinfection effects of commonly used skin disinfectants against viruses: An innovative contact transmission control method. *Environmental Science & Technology*. 2021;55(23):16044-16055.
3. Hirose R, Itoh Y, Ikegaya H, Miyazaki H, Watanabe N, Yoshida T, Bandou R, Daidoji T, Nakaya T. Differences in environmental stability among SARS-CoV-2 variants of concern: Both Omicron BA.1 and BA.2 have higher stability. *Clinical microbiology and infection*. 2022;28(11):1486-1491.

<研究に関すること>

京都府立医科大学大学院医学研究科 消化器内科学 廣瀬亮平

Tel : 075-251-5325 E-mail : ryo-hiro@koto.kpu-m.ac.jp

<広報に関すること>

京都府立医科大学 企画広報課 担当：堤

電話：075-251-5804 E-mail : kouhou@koto.kpu-m.ac.jp

日本製紙株式会社 広報室

電話：03-6665-1016 E-mail : pr@nipponpapergroup.com