



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Antiviral effect of cetylpyridinium chloride in mouthwash on SARS-CoV-2 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	武田, 遼
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15504号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89928
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Takeda_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 武田 遼

学位論文題名

Antiviral effect of cetylpyridinium chloride in mouthwash on SARS-CoV-2
(洗口液中成分セチルピリジニウム塩化物水和物の SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス効果)

キーワード（5つ） COVID-19, SARS-CoV-2, Infection Control, Oral health, Mouthwash

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は 2019 年 12 月に中国で初めて確認され、世界的に未曾有のパンデミックをもたらした。2022 年 11 月現在、累計感染者数は 6.33 億人、累計死者数は 660 万人となっている。3 年が経過する現在も、感染者数・死亡者数は増え続けており、公衆衛生と社会経済活動に深刻な影響を与えている。COVID-19 は SARS-CoV-2 を原因とする感染症であり、これまでに複数の懸念すべき変異株が報告されている。変異株によってはワクチンによる免疫逃避能を獲得しており、ワクチンや治療薬が広く普及した現在も、更なる感染拡大への影響が懸念されている。

口腔粘膜や唾液腺の上皮細胞は SARS-CoV-2 の細胞内侵入に関わる、ヒトアンジオテンシン変換酵素（ACE2）や II 型膜貫通セリンプロテアーゼ（TMPRSS2）を高く発現すると報告されており、これらの細胞に SARS-CoV-2 が感染すると複製され、唾液中に多量に排出されると考えられている。すなわち、SARS-CoV-2 の感染・伝播には口腔が重要な役割を担っている。

一方、SARS-CoV-2 は呼吸器上皮でも複製可能であり、咳によって口腔内に移行すると会話、咳、くしゃみなどによる飛沫を介してヒト間で感染が成立する。あるいは誤嚥により飛沫やエアロゾルを介して口腔内を経てウイルスが肺胞上皮細胞に感染すると、肺胞傷害による重症化を引き起こすと考えられている。重要なことに、SARS-CoV-2 の感染者はウイルスの無症状潜伏期間中であってもウイルスを排出しているため、感染源となる。そのため感染予防が重要であるが、COVID-19 に対する予防策としては現在のところマスク着用が主な手段である。なお、口腔からのウイルス排出量を減らすことにより SARS-CoV-2 の感染予防を目的に口腔ケアの重要性も示唆されている。口腔ケア製品には従来様々な抗菌成分が使用されてきた。その中でもセチルピリジニウム塩化物水和物（以下、CPC）は殺菌成分として洗口液などの商品に含まれ広く普及しており、無味無臭に近いので、多くの含嗽剤のみならずトローチ製剤や歯磨剤など様々な製剤に応用されている。他の洗口液に含まれる殺菌成分であるポビドンヨードのような特有のにおいや味がなく、クロルヘキシジンのような金属腐食作用を持たないことが利点として挙げられる。しかし、SARS-CoV-2 に対する CPC の作用について詳細に検討した報告は少ない。

本研究では、SARS-CoV-2 感染・重症化における CPC 製剤による抗ウイルス効果の基礎的知見を得ることを目的として、CPC 製剤による SARS-CoV-2 の不活化効果について詳細に検討を行った。

はじめに、Vero E6/TMPRSS2 細胞と武漢株、アルファ株、ベータ株、ガンマ株の SARS-CoV-2 を用いて、Plaque assay 法により、CPC の SARS-CoV-2 に対する感染抑制作用を検討した。その結果として、一般的な洗口液に含まれる濃度である 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の CPC が濃度依存的に、SARS-CoV-2 に対して変異の有無によらず感染抑制作用を有することを明らかにした。また、同混合溶液を用いて、qRT-PCR 法にて感染細胞中の SARS-CoV-2 ゲノム RNA 量を定量評価し、ウイルスエンタリーが CPC

濃度依存的に阻害されることを明らかにした。さらに、健常者唾液と SARS-CoV-2 を混合したサンプルを用いて、唾液中においても CPC が濃度依存的に SARS-CoV-2 に対して感染抑制効果を発揮することを Plaque assay 法によって明らかにした。

さらに CPC による SARS-CoV-2 に対する不活化の作用機序がウイルス粒子の破壊によるものかどうかを明らかにするため、50 µg/mL の CPC と SARS-CoV-2 の混合溶液をショ糖勾配遠心法により分画化し、Western blotting 法にて各分画に SARS-CoV-2 ウイルスタンパクが存在するか、定性的な解析を行なった。その結果、PBS で処理したものの分画と同様のパターンを示しており、本濃度では CPC はこれまでに報告されたウイルス脂質膜の破壊といったメカニズムとは異なる機序により抗ウイルス効果を示すことが示唆された。電子顕微鏡による粒子形態解析を行ったところ、250 µg/mL の CPC 処理ではウイルス脂質膜が破壊されていたが、洗口液に含まれるような 10、50 µg/mL といった低濃度の CPC 処理ではウイルス粒子の形態は変化していたものの、ウイルス脂質膜が残存していた。これらのことから、CPC は高濃度ではウイルス脂質膜を破壊して不活化する作用をもつが、50 µg/mL 以下の低濃度ではウイルス脂質膜を完全に破壊することなく不活化することが示された。CPC は脂質膜を破壊する作用を持つことから、正常組織に対する為害性が懸念されているため、口腔製剤に CPC を応用する場合は、濃度を考慮する必要がある。本研究では、本邦で洗口液として使用される一般的な濃度である 50 µg/mL 以下においても CPC が SARS-CoV-2 に対して抗ウイルス効果を発揮することを示した。50 µg/mL 以下の低濃度 CPC は正常組織への為害性が少ないため、口腔内に留置できるタイプの徐放製剤への応用が特に望ましいと考えられる。CPC により口腔内ウイルス量を減少させることによって COVID-19 感染予防・発症予防・重症化予防に効果を示すことが期待され、対面会議等の密集・密接・密閉空間での CPC 製剤の使用が集団感染を防止する可能性がある。あるいは歯科治療、食事時などマスクを着用できない時に使

用可能な CPC 製剤が開発されれば感染症対策の方法の一つと有用であると考えられる。