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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称博士（歯学）氏名　武田　遼

審 査 担 当 者　主査　教授　樋田 京子
副査　教授　北川 善政
副査　教授　大廣 洋一

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）

審査は審査担当者全員出席の下，オンラインの公聴会として行われた．はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われた．その内容を以下に示す．

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は2019年12月に未曾有のパンデミックをもたらした．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，医療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にはSARS-CoV-2の細胞内侵入関連分子，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）が高発現しているため，SARS-CoV-2の感染・複製がおこり，唾液中にウイルス粒子が大量に排出されると考えられている．一方，気道上皮でSARS-CoV-2感染が起こると上気道炎を発症すると考えられ，会話，咳，くしゃみなどによる飛沫を介して感染する．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．また，唾液の誤嚥などによりウイルスが口腔から気管内に移行することも肺炎の原因になると考えられている．重要なことに，SARS-CoV-2感染者は無症状であってもウイルス排出量が多く，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．一方，洗口液等の口腔ケア製品には従来様々な殺菌成分が使用されてきた．洗口液の抗ウイルス効果を検証した報告も複数あり，SARS-CoV-2についてもパンデミック初期より口腔ケア製剤の有用性が示唆されてきた．口腔製剤中の殺菌成分の中でもセチルピリジニウム塩化物水和物（以下，CPC）は洗口液・含嗽剤などに使用され広く普及している．また，CPCは無味無臭に近く，有害事象も殆どないため，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．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．これまで，高濃度（250 μg/mL以上）のCPCがSARS-CoV-2の感染性を抑制するという報告はあったが，本邦の洗口液等に含まれるような低濃度（50 μg/mL以下）での抗SARS-CoV-2効果は不明であった．

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．SARS-CoV-2ウイルスを用いた実験は人獣共通感染症国際共同研究所のBSL3実験室で行った．
はじめに，Vero E6/TMPRSS2細胞にSARS-CoV-2の武漢株，α株，β株，γ株をそれぞれ感染させ，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，50 μg/mL以下においてもCPCが濃度依存的に感染抑制作用を示すことが明らかとなった．なお，SARS-CoV-2の変異株の種類によらず，CPCの抗ウイルス効果が示された．さらに，qRT-PCR法によって感染細胞中のSARS-CoV-2ゲノムRNA量を定量評価し，ウイルスエントリーが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．次に，CPCによるウイルス粒子破壊の有無を検討した． 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って22個の異なる質量のタンパク分画を抽出し，各分画におけるSARS-CoV-2タンパクの有無をWestern blotting法にて定性的に解析した．CPC処理サンプルは陽性対照の界面活性剤Triton X-100とは異なるバンドパターンを示し，ウイルス粒子が壊れていないことが示唆された．このことから，低濃度のCPCによる抗ウイルス作用は既報の「脂質膜損傷によるウイルス粒子の破壊」とは異なる機序であることが示唆された．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処理では粒子の破壊が観察されたが, 10, 50 μg/mLのCPC処理ではウイルス粒子の形態変化は認めたものの, 粒子径は保たれていた．これらのことから，CPCは低濃度では粒子を破壊することなくSARS-CoV-2ウイルスを不活化させる可能性が示された．本研究により我が国の洗口液に一般的に使用されている濃度においてもCPCが抗SARS-CoV-2効果を有することを示した．低濃度CPCは正常組織への為害性が少ないため，口腔内に留置可能な徐放製剤への応用が望ましいと考えられた．次に臨床におけるCPCの有用性を検証するために，札幌市保健所と連携しCOVID-19患者を対象とした臨床研究を行った．CPC製剤，特にCPC含有トローチによってCOVID-19患者唾液におけるウイルス量の減少，唾液中ウイルス感染力価の減弱が得られることを示した．本研究成果から，COVID-19の感染・発症・重症化予防の観点から，CPCの応用が効果的である可能性が示唆された．対面会議等，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．また，歯科治療，食事などの際にも使用可能なCPC製剤の開発が期待される．

審査は審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた．以下にその項目を示す．

1. SARS-CoV-2 に対する CPC の効果について（株間の比較）
2. Material としての SARS-CoV-2 の入手経路について
3. Vero E6/TMPRSS2のACE2発現について
4. 陽性対照として使用した試薬（Triton X-100）について
5. ヒト唾液中の抗菌作用について
6. CPC製剤使用前後の各Ctカットオフ値の設定による陽性率の変化について
7. 人工呼吸器管理下の患者への臨床応用について
8. 鼻腔へのCPC使用について
9. CPC濃度の減衰について
10. CPC の作用機序について
11. CPC の安全性について

本研究の結果は，COVID-19感染制御におけるCPC製剤の可能性に関して重要かつ斬新な基礎科学的情報を提供した．細胞を用いた効果検証についての論文は，Scientific Reports誌に受理され学術的にも評価されている．加えて，上記の質疑応答から，申請者は本研究内容を中心とした専門分野はもとより，関連分野について十分な理解と知識を有していることが確認された．

以上のことから，審査担当者全員は学位申請者が博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認めた．