

## 原著論文

### 亜塩素酸の殺ウイルス活性についての解析

合田学剛<sup>1</sup>、池田敬子<sup>2</sup>、西出充徳<sup>3</sup>、長尾多美子<sup>4</sup>、小山一<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>本部三慶株式会社（大阪府〒540-0001）、<sup>2</sup>和歌山県立医科大学保健看護学部（和歌山県〒641-0011）、<sup>3</sup>和歌山信愛女子短期大学、（和歌山県〒640-0341）、<sup>4</sup>四国大学看護学部（徳島県〒771-1192）、<sup>5</sup>和歌山県立医科大学大学院医学研究科（和歌山県〒641-0011）、日本

**要約:** 亜塩素酸のエンベロープウイルスおよび非エンベロープウイルスに対する殺ウイルス効果（ウイルス不活化効果）について解析した。殺ウイルス活性はエンベロープウイルスにおいて顕著であった。しかし、非エンベロープウイルスにおいてもヒトライノウイルスやネコカリシウイルスなどのウイルスは、亜塩素酸に対して顕著な感受性を示したが、ポリオウイルスやコクサッキーウイルスなどの他のウイルスの感受性は弱く、非エンベロープウイルスにおいては亜塩素酸に対する感受性に2つのクラスがあることが示唆された。それに加えて、亜塩素酸による不活化様式の解析から、ウイルス不活化がウイルス種、夾雑タンパク質、および検査溶媒の構成成分に強く依存することが分かった。亜塩素酸の細胞傷害効果を次亜塩素酸ナトリウムまたはドデシル硫酸ナトリウム（SDS）と比較すると、亜塩素酸はSDSと同程度であり次亜塩素酸ナトリウムより著しく弱いことが判明した。これらの結果は、組織障害作用の弱い殺ウイルス薬として亜塩素酸のユニークな性質を示し、食品衛生分野における殺菌薬や医療分野における消毒薬としての亜塩素酸の利点と使用上の問題点を明らかにした。

## 序論

分子式が  $\text{HClO}_2$  で表される亜塩素酸は弱酸であり、顕著な酸化力を持つことが知られている。亜塩素酸は、タンパク質のトリプトファン残基とチロシン残基を酸化修飾することでタンパク質変性を起こすことが知られている（1）。この同じプロセスで、亜塩素酸は、微生物を効果的に不活化（殺菌）することができる。亜塩素酸は遊離酸としては不安定であるが、亜塩素酸ナトリウムなどの亜塩素酸塩は安定している（引用文献2参照）。我々は、亜塩素酸を水溶液中に安定化するために必要な製造条件と保存条件を開発した。

これまで、亜塩素酸の殺ウイルス作用について解析し、(i) 亜塩素酸がエンベロープウイルスと非エンベロープウイルスの両方に対して明白な殺ウイルス活性を持つこと、(ii) 弱酸性pHで活性がより強いものの酸性から中性、弱アルカリ性までの幅広いpH域でも活性があること、(iii) 次亜塩素酸ナトリウムと比べると、亜塩素酸のポリオウイルスに対する殺ウイルス活性は、中性やアルカリ性のpH域では低い、pH 5.5では著しく高いことを報告できた（3）。亜塩素酸に殺菌力があることも見出した（4）；亜塩素酸は芽胞形成菌を含む幅広い病原微生物を効果的に殺菌した。これらの所見は、亜塩素酸水溶液が食品加工や病院での医療などの分野での殺菌消毒において広範な応用が可能なことを裏付けている。

亜塩素酸によるウイルス不活化の様式について、より詳細に理解するために、異なるウイル

ス粒子構造と疫学特性を持つ様々なウイルスに対する殺ウイルス作用を系統的に評価した。また、過去の研究で使用したウイルス調製物には、ほとんどの殺ウイルス化合物の活性を顕著に阻害する夾雑タンパク質が無視できない量含まれていたことに我々は気付いた。そこで、本研究では夾雑タンパク質の含有率が約 100 分の 1 である新しいウイルス標品を用いて、ウイルス不活化の解析を行った。この新しいウイルス調製物を用いた解析により、非エンベロープウイルスでの亜塩素酸に対する感受性における違いが明らかとなった。更に、亜塩素酸の有効性に加えて、ウイルス不活化には、用いる溶媒も重要であることも明らかとなった。

## 材料および方法

**試薬：**亜塩素酸水溶液と次亜塩素酸ナトリウム溶液は、本部三慶株式会社（大阪府、日本）から入手した。有効塩素濃度は供与元が既述した方法（5）で出荷直前に測定し、蒸留水を用いて 10 mg/mL（10,000 ppm）に希釈した。原液と希釈液とは、それぞれ空気をできるだけ排除するようにして密閉瓶に移し 4℃ で暗所に保存し、1 か月以内に使用した。

**細胞およびウイルス：**Vero 細胞、HEp-2 細胞、HeLa 細胞、CRFK 細胞、MDCK 細胞を 5% ウシ胎児血清（FBS）含有イーグル最小必須培地（MEM）中で培養した。単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）F 株、インフルエンザウイルス A（IAV）/Aichi/68（H3N2）、ヒトアデノウイルス（AdV）2 型、ヒトライノウイルス（HRV）1B 株、ネコカリシウイルス（FCV）F4 株、ポリオウイルス 1 型（PV-1）Sabin ワクチン株、コクサッキー B ウイルス 5 型（CB5）を実験に用いた。HSV-1、PV-1、CB5 は Vero 細胞中で 0.5%FBS を添加した MEM を用いて増殖させ、AdV と HRV は HeLa 細胞中で 1%FBS を添加した MEM を用いて増殖させ、FCV は CRFK 細胞中で 0.5%FBS を添加した MEM を用いて増殖させ、IAV は MDCK 細胞中で 0.1%ウシ血清アルブミン（BSA）とアセチル化トリプシン（5.3 μg/mL）を添加した MEM を用いて増殖させた。IAV を除いて、感染した細胞を培養液と共に 3 サイクルの凍結解凍後にウイルスを収穫した（6,7）。IAV は培養液から収穫した（8）。収穫したウイルス液は 3,500 rpm で 15 分間遠心して細胞残屑を取り除き、上清を通常のウイルス標品として用いるため -80℃ で保存した。感染性ウイルス量は HSV-1、IAV、FCV、CB5、PV-1 についてはブランクアッセイで、AdV と HRV については 50%組織培養感染値量（TCID<sub>50</sub>）アッセイで測定した。通常のウイルス標品でのウイルス濃度は、HSV-1 で  $1.0 \times 10^9$  PFU（ブランク形成単位）/mL、IAV で  $4.2 \times 10^8$  PFU/mL、PV-1 で  $3.4 \times 10^8$  PFU/mL、CB5 で  $8.3 \times 10^8$  PFU/mL、FCV で  $8.0 \times 10^7$  PFU/mL、AdV で  $1.3 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL、HRV で  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL であった。

**殺ウイルス活性の測定：**ウイルス不活化実験の前には、出発材料をすべて氷上に保温した。前述したように（9-11）殺ウイルス化合物を含有する 190 μL の緩衝液に 10 μL のウイルス液を加え 25℃ で 30 分間保温した。保温後、これらのウイルス反応液の一部を直ちに 100 倍に希釈し、それ以上のウイルス不活化を防いだ。希釈には、IAV には 0.1%BSA を、他のウイルスには 0.5%FBS を含む Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> を加えていない氷冷したダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（PBS）を用いた。結果の再現性を確認するために、同様の条件下ですべての実験を 3 回以上繰り返し、もっとも典型的な結果を「結果および考察」での図に示した。

**殺細胞効果の測定：**43 mM クエン酸と 113 mM リン酸水素二ナトリウムを含む pH 5.5 のマッキルベイン緩衝液（12）で単層細胞を 1 回洗浄し、指示濃度の殺ウイルス化合物を含む緩

## 亜塩素酸によるウイルス不活化

衝液中で、氷上で 20 分間保温した。次いで細胞を PBS で洗浄し、単一細胞懸濁液を得るためにトリプシン処理した。細胞死の程度は、トリパンブルーを用いた色素排除法(13)で判定した。

### 結果および考察

**様々なウイルスの感染性に対する亜塩素酸の効果:**エンベロープウイルスが非エンベロープウイルスに比べて塩素系殺菌剤などの殺ウイルス化合物に対する感受性がより高いことは、一般的に知られている。また、既に、亜塩素酸が HSV-1 や IAV などのエンベロープウイルスを効果的に不活化するが、PV-1 のような非エンベロープウイルスの不活化にはそれほど効果的ではないことを示している。しかし、後に、非エンベロープウイルスである FCV が様々な殺ウイルス化合物に対して中程度の感受性を示すことを見出し、そこで、これらのウイルスの亜塩素酸に対する感受性について詳細な解析を行った。

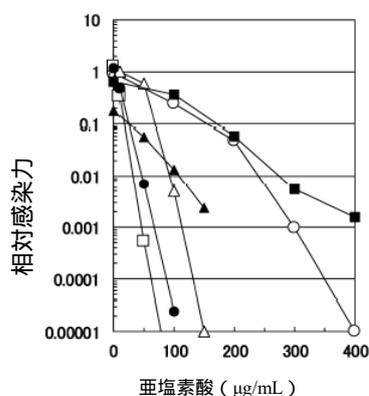


図1. エンベロープウイルスおよび非エンベロープウイルスの感染性に対する亜塩素酸の効果。ウイルス標品原液から直接ウイルスサンプルを採取し、様々な濃度の亜塩素酸を含有するマッキルベイン緩衝液(pH 5.5)中で、各ウイルスを 25 ℃ で 30 分間保温した。保温後、PV-1(○)、FCV(□)、IAV(△)、HSV-1(◇)、CB5(▽)についてはプラークアッセイにより、HRV(◇)については TCID<sub>50</sub>法によりウイルス感染価を求め、亜塩素酸を含まない PBS 中で保温した時のウイルス感染価に対する相対値を算出した。

図1は、数種類のエンベロープウイルスと非エンベロープウイルスの、マッキルベイン緩衝液(クエン酸-リン酸緩衝液)(pH 5.5)中での亜塩素酸による不活化を亜塩素酸の濃度に対する関数として示している。この実験で使用したウイルス標品は、通常のウイルス原液から直接採取されたもので、約 0.6 ~ 1.2 mg/mL の夾雑タンパク質(データは示していない)が含まれている。夾雑タンパク質濃度は TaKaRa BCA Protein Assay kit を用い、マニュアルの手順に従って求めた。この夾雑タンパク質は殺ウイルス活性測定の最終反応液にまで持ち込まれる(約 30 ~ 60 µg/mL のタンパク質濃度)が、すべてのウイルスで亜塩素酸により効果的に不活化された。IAV と HSV-1 の 2 種のエンベロープウイルスは、高い亜塩素酸感受性を示した。100 µg/mL における残存感染価は約  $10^{-5}$  か、それ以下であった。対照的に、PV-1 と CB5 の 2 種の非エンベロープウイルスは、比較的抵抗性を示した; 100 µg/mL で各ウイルスの 10% 未満しか不活化されなかった。しかし、CB5 の残存感染価は 400 µg/mL で  $10^{-3}$ 、PV-1 では  $10^{-5}$  に達した。これらの結果は、亜塩素酸がエンベロープウイルスと非エンベロープウイルスの両方を効果的に不活化することを示しており、これまでの報告(3)に一致し、エンベロープウイルスは非エンベロープウイルスよりも亜塩素酸に対する感受性が高いといえる。しかし、疫学的特性が異なる非エンベロープウイルスである FCV と HRV を調べると、その感受性は PV-1 や CB5 とは大きく異なっていた。緩衝液が酸性であるため HRV は亜塩素酸がなくても緩衝液中で有意に不活化され、FCV と HRV の残存感染価は、100 µg/mL の濃度では約 100 分の 1 であり、エンベロープウイルスの残存感染価に近かった。

非エンベロープウイルス間において見られた差がウイルス種自体によるものであり、かつ夾雑物質の結果生じたものではないことを確認するために、また、ウイルスの亜塩素酸に対する感受性をより正確に決定するために、夾雑タンパク質が大幅に少ない(反応液中タンパク質が1 µg/mL 未満)ウイルス標品を使用した。図1の実験で使用した通常のウイルス標品をPBSで100倍に希釈して感染細胞由来の夾雑物質を低減させ、殺ウイルス活性測定に用いた。図2に示すように、また図1の結果と比較すると、調べたウイルス(PV-1、FCV、HSV-1、IAV)のすべてが、亜塩素酸に対してずっと高い感受性を示した；すなわち、3 µg/mLでも、HSV-1とIAVは $10^{-3}$ 以下(検出限界値以下)の感染価を示した、さらに、FCVとPV-1の両方も、6 µg/mLで有意に不活化された。FCVはPV-1より明らかに感受性が高かった。これらの結果は、亜塩素酸の殺ウイルス薬としての優れた有効性を示しており、FCVとPV-1の感受性に差があることを確認した；6 µg/mLでFCVの感染性が $10^{-2}$ まで下がるのに対し、PV-1では不活化されたのは半数だけだった。

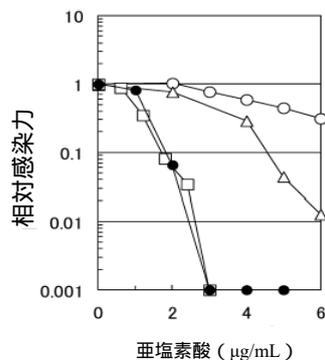


図2. 培養液の持ち込みがない場合のウイルスに対する亜塩素酸の効果。凡例は図1参照。図1の通常のウイルス標品に代わり、通常のウイルス標品をPBSで100倍に希釈したものを反応液に添加するウイルス液として使用した。○：PV-1、□：FCV、△：IAV、●：HSV-1

一般に非エンベロープウイルスはエンベロープウイルスより化学的または物理的殺ウイルス要因に対してより耐性があると広く考えられているが、上記の結果により非エンベロープウイルスは亜塩素酸に対する感受性に基づき2つのクラスに区別されることが示唆された。上記2つのウイルスグループ間では、同様の感受性の違いが、ある種のポリフェノール化合物の殺ウイルス効果に対する感受性についても見られた(Nishide および Koyama、投稿準備中)。糞口経路を通じて感染するウイルスは、まだ飛沫感染や直接接触感染するウイルスよりも抵抗性が高いようである。

## 亜塩素酸によるウイルス不活化

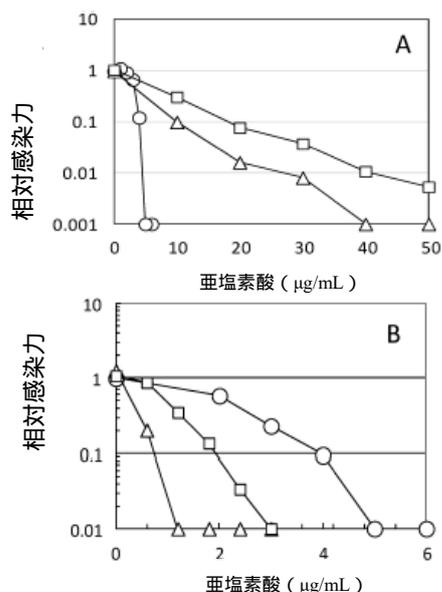


図 3. PV-1 (A) または HSV-1 (B) の不活化に対して、用いる緩衝液組成が及ぼす影響。指示濃度の亜塩素酸を含む 3 つの異なる緩衝液中で、PV-1 または HSV-1 を 25 °C で 30 分間保温した。保温後、プラークアッセイにより感染性ウイルスの数を求め、亜塩素酸を含まない緩衝液中で保温した場合の感染性ウイルス数を 1 として相対値を算出した。□: PBS、○: 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5)、△: マッキルベイン緩衝液 (pH 5.5)。

**亜塩素酸の作用における溶媒の効果:** 図 3 は異なる 3 つの溶媒における亜塩素酸の殺ウイルス活性を示している。亜塩素酸を PBS、クエン酸緩衝液 (10 mM、pH 5.5) およびマッキルベイン緩衝液 (pH 5.5) 中に指示濃度で溶解した。次いで各緩衝液に PV-1 と HSV-1 をそれぞれ添加し、25 °C で 30 分間保温した。図 3A に示すように、PV-1 は PBS 中で最も効果的に不活化され、5  $\mu\text{g/mL}$  での残存感染価は検出限界 ( $10^{-3}$ ) 以下であった。不活化の程度はクエン酸緩衝液の方が低く、マッキルベイン緩衝液が最も低かった。マッキルベイン緩衝液では、PV-1 を検出限界以下まで不活化するのに 50  $\mu\text{g/mL}$  を超える亜塩素酸濃度が必要であった; このような殺ウイルス効果が低い理由としては、マッキルベイン緩衝液中に比較的高濃度のクエン酸 (43 mM) が含まれていることによる溶媒の塩析効果であると説明できる。これらの結果は、亜塩素酸の殺ウイルス効果における溶媒の役割ならびに重要性を明確に示している。

非エンベロープ DNA ウイルスである AdV も PBS 中で PV-1 と同様の感受性を示したことについても記録しておく価値がある。亜塩素酸を溶かした PBS を用いて AdV を 25 °C で 30 分間保温すると、亜塩素酸の濃度に比例して保温後の感染価は一次速度論的に減少した; 残存感染価は 4  $\mu\text{g/mL}$  で 0.075、8  $\mu\text{g/mL}$  で 0.0133、12  $\mu\text{g/mL}$  で 0.0042 であった。

しかし、図 3B に示すように、HSV-1 の不活化の程度はクエン酸緩衝液で最も高く、マッキルベイン緩衝液ではそれに次いでおり、これは、緩衝液の種類に対するウイルス感受性が PV-1 と HSV-1 との間で大きく異なっていることを示している。HSV-1 での実験結果は、ウイルス不活化にとっての用いる溶媒の役割と重要性を確認しただけでなく、溶媒の役割がウイルス種によって異なることを示した。

**共存タンパク質の影響:** 図 1 に示したように、30 ~ 60  $\mu\text{g/mL}$  の夾雑タンパク質が存在していても、亜塩素酸は調べたウイルスすべてを効果的に不活化した。しかし、図 2 に示したように、新たに調製した含有夾雑タンパク質が少ないウイルス標品を用いると、亜塩素酸はより著しく効果的であった。そこで、PV-1 不活化への阻害とタンパク質濃度との関係を解析した。

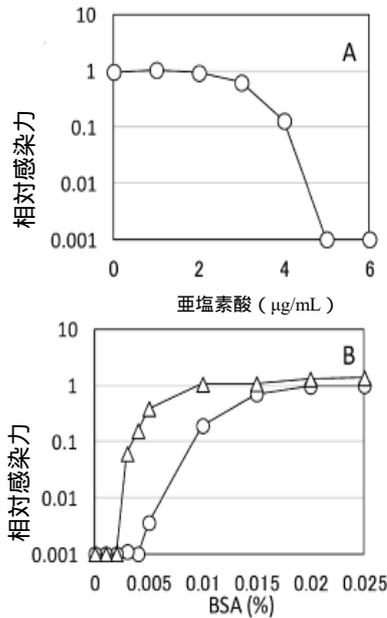


図4. PV-1 不活化に対する反応液中のタンパク質の影響。上図(A)においては、指示濃度の亜塩素酸を含むPBS中で、PV-1を25℃で30分間保温した。下図(B)において、指示濃度のBSAに加えて亜塩素酸50 µg/mL (△)または亜塩素酸100 µg/mL (○)を加えたPBS中で、PV-1を25℃で30分間保温した。保温後、プラークアッセイにより感染性ウイルスの数を求め、亜塩素酸とBSAを含まないPBS中で保温した感染性ウイルス数に対する相対値を算出した。

図4Aは、PBS中での亜塩素酸によるPV-1の不活化での濃度依存曲線を示している。PV-1は、環境由来の化学物質および物理的ストレスに対して抵抗性のウイルスの1つとして知られている(14)。しかし、PV-1は、PBS中で非常に低濃度の亜塩素酸により容易に不活化された；感染性はタンパク質がない状態では5 µg/mLの亜塩素酸で検出限界(10<sup>-3</sup>)以下にまで低下した。

しかし、BSAは亜塩素酸の殺ウイルス作用を大きく阻害した。図4Bに示すように、PV-1をBSA存在下で50 µg/mL亜塩素酸で処理した際に、亜塩素酸の殺ウイルス活性はBSA濃度が0.0025%(25 µg/mL)か、それ以下の濃度では十分に不活化できたが、BSA濃度0.01%以上では完全に不活化活性が見られなかった。BSA存在下で100 µg/mL亜塩素酸でPV-1を保温した場合は、殺ウイルス活性はBSAが0.005%以下では全く阻害されなかったが0.02%BSAでは完全に不活化活性がなくなった。これらの結果は、亜塩素酸濃度が2倍になった時には、亜塩素酸の殺ウイルス活性を阻害するためにBSA濃度も2倍にする必要があることを示している。これらの結果は、亜塩素酸の殺ウイルス作用の阻害における亜塩素酸濃度と共存タンパク質濃度とは1対1で対応する関係であることを示している。

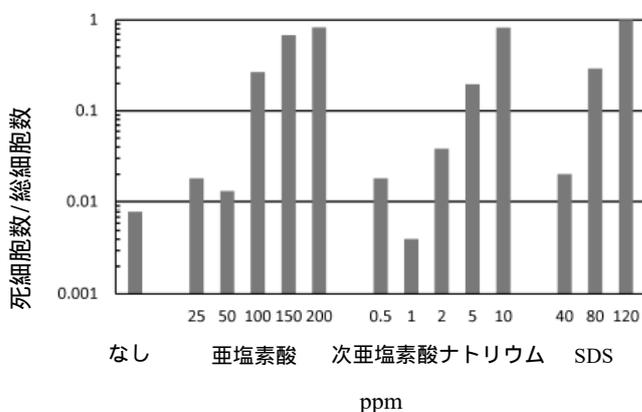


図5. 亜塩素酸、次亜塩素酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の殺細胞作用の比較。上記試薬のうちの1つを指示濃度を含むマッキルベイン緩衝液(pH 5.5)中に単層に培養したHEp-2細胞を氷上で20分間保温した。「材料および方法」での記載通りに、死細胞と生細胞の数を色素排除法により求めた。

## 亜塩素酸によるウイルス不活化

**亜塩素酸の殺細胞作用：**亜塩素酸の殺細胞作用を、代表的な塩素系殺菌薬である次亜塩素酸ナトリウム、および、家庭用衛生用品として一般的に使用されている陰イオン系洗剤であるドデシル硫酸ナトリウム（SDS）と比較した。アッセイには、pH 5.5 のマッキルベイン緩衝液を使用した。この緩衝液中では、亜塩素酸は 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で PV-1 を  $10^{-5}$  まで不活化することができたが、次亜塩素酸ナトリウムは 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で PV-1 を有意に不活化することはできなかった（ $10^{-1}$  未満）(3)。図 5 に示すように、単層培養細胞を氷上で 20 分間保温すると、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下の亜塩素酸で見られた死細胞はごくわずかであり、亜塩素酸の濃度が高くなると死細胞の割合が増加した；100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では約 27%、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 70%、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 80% であった。亜塩素酸とは対照的に、同じ緩衝液中で、次亜塩素酸ナトリウムは、非常に強い細胞変性効果を示した；1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  か、それ以下ではごくわずかの死細胞が見られたが、その割合は 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 4%、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 20%、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 80% であった。SDS は安全な消毒薬であり、シャンプーや練り歯磨きの成分として濃度 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （2.5%）か、それ以下で含まれているが、SDS も *in vitro* で有意の殺細胞作用を示した；死細胞の割合は、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では約 2%、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 29%、120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ではほぼ 100% であった。これらの結果は、次亜塩素酸ナトリウムは pH 5.5 では PV-1 に対する殺ウイルス効果がないが、それでも細胞変性効果は亜塩素酸の 20 倍と高いことを示している。同様の結果は、異なる pH 値（pH 6.5、7.5、8.5）でも得られ、これは次亜塩素酸ナトリウムとの比較において亜塩素酸が比較的安全であり、SDS と同程度であることを示している。同様の結論は、コロニー形成能の消失を指標に細胞死を測定することによっても得られた(3)。

本論文に提示した結果は、亜塩素酸のもつ組織障害の少ない殺ウイルス薬となり得るというユニークな性質を明らかにし、また、食品衛生における殺菌薬および医療における消毒薬としての亜塩素酸の利点と課題を明らかにしている。

**謝辞**                    本研究は和歌山県「高等教育機関コンソーシアム和歌山」から助成を受けたものである。示唆に富んだ討論と論文作成協力を頂いた、桑原知巳博士（香川大学、香川県）、江島大輔博士（味の素株式会社、東京都）、および荒川力博士（Alliance Protein Lab.、米国サンディエゴ）に感謝する。

**利益相反**                合田は本部三慶株式会社の従業員であり、小山は本部三慶株式会社の顧問である。

## 引用文献

1. Ogata N. Denaturation of protein by chlorine dioxide: oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues. *Biochemistry*. 2007; 46:4898-911.
2. Goda H, Yamaoka H, Nakayama-Imahiji H, et al. Microbicidal effects of weakly acidified chlorous acid water against feline calicivirus and *Clostridium difficile* spores under protein-rich conditions. *PLoS One*.2017;12:e0176718.

3. Tsukishiro S, Ikeda K, Nishide M, et al. Analysis of virus-inactivating effect of chlorous acid. *J Wakayama Med Soc.* 2015;66:40-6. Japanese.
4. Horiuchi I, Kawata H, Nagao T, et al. Antimicrobial activity and stability of weakly acidified chlorous acid water. *Biocontrol Sci.* 2015;20:43-51.
5. Ingram PR, Pitt AR, Wilson CG, et al. A comparison of the effects of ocular preservatives on mammalian and microbial ATP and glutathione levels. *Free Radic Res.* 2004;38:739-50.
6. Koyama AH, Uchida T. The effect of ammonium chloride on the multiplication of herpes simplex virus type 1 in Vero cells. *Virus Res.* 1989;13:271-81.
7. Koyama AH, Irie H, Ueno F, et al. Suppression of apoptotic and necrotic cell death by poliovirus. *J Gen Virol.* 2001;82:2965-72.
8. Kurokawa M, Koyama AH, Yasuoka S, et al. Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. *Int J Mol Med.* 1999;3:527-30.
9. Yamasaki H, Tsujimoto K, Koyama AH, et al. Arginine facilitates inactivation of enveloped viruses. *J Pharm Sci.* 2008;97:3063-73.
10. Utsunomiya H, Ichinose M, Tsujimoto K, et al. Co-operative thermal inactivation of herpes simplex virus and influenza virus by arginine and NaCl. *Int J Pharm.* 2009;366:99-102.
11. Tsujimoto K, Uozaki M, Ikeda K, et al. Solvent-induced virus inactivation by acidic solution. *Int J Mol Med.* 2010;25:433-7.
12. McIlvaine TC. A buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem.* 1921;49:183-6.
13. Koyama AH, Miwa Y. Suppression of apoptotic DNA fragmentation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Virol.* 1997;71:2567-71.
14. Racaniello VR. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* 4th ed. New York: Lippincott-Raven; 2001. p.685-722.

投稿日：2018年2月21日採択日：2018年4月2日

J-STAGE 早期公開日：2018年4月27日

DOI:10.7883/yoken.JJID.2018.089

\*責任著者：住所：〒641-0011 和歌山県和歌山市三葛 580 番地 和歌山県立医科大学大学院  
医学研究科生物学教室、電話：81-87-899-6252、Eメール：guskoyama0619@yahoo.com