

## 消毒効果の評価に関する研究

研究分担者 上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長

### 研究要旨

新型コロナウイルス感染症の拡大及び緊急事態宣言等により国民の感染防止意識が高まり、消毒剤へのニーズが非常に高まっている。今後医療分野にとどまらず、一般家庭や事業所等、使用場所に合わせた様々な消毒剤の製造販売への新規参入が予想される中、国内では一般用医薬品として審査を受ける消毒剤の有効性の評価方法が標準化されていない状況にある。本分担研究では、新たに一般用医薬品としての消毒剤の製造販売承認申請が出される際の評価基準等について、特に抗ウイルス効果の評価試験法に関する諸外国の情報を整理すると共に、国際標準として認知される米国の ASTM E1052 及び欧州 EN14476 を参考に実施手順の概要を取り纏めた。また、結果の判定法として、TCID<sub>50</sub> 法、プラーク法及びリアルタイム PCR による遺伝子定量法を比較検証したところ、遺伝子定量法ではウイルスの不活化を正しく評価できず、抗ウイルス試験では感染性ウイルスを直接評価することの重要性が確認された。

### 研究協力者

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所  
食品衛生管理部 部長

定医薬部外品及び一般用医薬品については製造販売のために承認申請が求められる。しかしながら、新指定医薬部外品は使用できる有効成分と濃度範囲が規定されているのに対し、手指消毒及び物品消毒を対象とした一般用医薬品としての消毒剤の承認申請にあたっては、規制当局に提出すべき資料や有効性の評価方法が明確になっていない。

### A. 研究目的

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の拡大により感染防止意識が高まり、消毒剤の使用頻度や使用量が増加し、アルコール消毒剤などが一時不足する事態となった。アフターコロナの時代を見据え、今後もこれらの製造販売に参入する企業は増加すると思われる。

日本においては、殺菌や消毒を標榜する製品は薬機法(医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律)の規制を受け、手指消毒に用いられる新指

消毒効果に関する評価は一般的に細菌を対象にしたものであるが、アフターコロナ時代ではウイルスを対象にした評価も求められることが予想される。しかしながら、本法における承認申請において、消毒剤の抗ウイルス効果に関する評価方法は標準試験法が整備されていないため、迅速な整備

が求められる状況にあると考えられる。

本分担研究では、一般用医薬品としての消毒剤の製造販売承認申請に際して活用可能なガイドライン案の策定に向け、特に抗ウイルス効果を評価する試験法に関する情報を整理した。加えて、新型コロナウイルスを対象とした場合の実施手順案を例示することとした。

## B. 研究方法

### B-1. 日本国内の抗ウイルス試験法

日本国内の抗ウイルス試験法について、JISC（日本産業標準調査会）ホームページ（<https://www.jisc.go.jp>）のデータベース検索を行い、抗ウイルス試験の評価内容を調査した。

### B-2. 日本国内の試験機関で使用されるウイルス種に関する情報収集・整理

ウェブ検索にて抗ウイルス試験を実施している国内試験機関を検索し、使用されているウイルス種について調査した。

### B-3. 海外主要国における抗ウイルス試験法

公的情報である各国（米国、欧州、中国、カナダ、豪州）及び WHO の規格・規制や基準、試験法に関する情報を入手した。

米国、欧州、カナダ、豪州では、評価試験法について ASTM International、European Committee for Standardization (CEN)、AOAC International に依拠した基準を定めているため、各国当局のサイトのほか、これら機関の発信情報を手掛かりに調査を進めた。中国については中国国家標準規格 (GB 規格) を調査対象とした。また、適宜世界保

健機関 (WHO) が 2019 年にまとめた「WHO guidelines on hand hygiene in health care」等の、他機関のガイドラインや論文を参照しながら特にウイルスを対象とした評価方法について調査を進めた。

収集した各国の規格・規制や基準、試験法をもとに、特に新型コロナウイルスに焦点を当て、ウイルスを対象にした評価方法に係るフロー図等を作成した。

### B-4. ウイルス力価測定法の比較

消毒剤等によりウイルスの不活化を確認するには、消毒剤との反応前後で供試ウイルスの力価を測定する必要がある。本研究では感染性ウイルスを直接評価する TCID<sub>50</sub> 法及びプラーク法と、ウイルスの遺伝子量を評価するリアルタイム PCR 等をはじめとする遺伝子定量法の計 3 手法を用いて、判定結果を比較した。

Vero E6/TMPRSS2 細胞を用いて増殖・調整した新型コロナウイルスを 1.5 mL マイクロチューブにて、加熱処理 (50°C 30 分及び 90°C 5 分) を行ったのちに、同一チューブから TCID<sub>50</sub> 法、プラーク法、リアルタイム PCR 法により、結果判定を行った。

TCID<sub>50</sub> 法及びプラーク法についてはそれぞれ図 2 及び図 6、C-4. 試験の概要に具体的手順を示した。リアルタイム PCR 法は、加熱後のウイルス液 200 µL より磁気ビーズ法 (Promega 社製, Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification kit AS1330) にてウイルス RNA を回収し、1 step RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific 社製, TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix, 4444432) を用いて新型コロナウイルスの N 遺伝子を定量検出した。N 遺伝子検出には米国 CDC の

提示するプライマー及びプローブを用いた (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>)。

## C. 研究結果

### C-1. 抗ウイルス試験に関する JIS 規格

JISC (日本産業標準調査会) のデータベースにおいて、「ウイルス」との検索で 46 件が該当し、うち抗ウイルス作用の評価については以下の規格が該当した。JIS 標準法は、工業製品の抗ウイルス性能の評価方法であり、繊維製品やセラミックス製品等の工業製品の性能評価を対象としているため、一般医薬品等に該当する消毒薬には対応していない状況にあることが確認された。

- ・ JIS R1706 ファインセラミックスー光触媒材料の抗ウイルス性試験方法ーバクテリオファージ QB を用いる方法。
- ・ JIS R1756 ファインセラミックスー可視光応答形光触媒材料の抗ウイルス性試験方法ーバクテリオファージ QB を用いる方法。
- ・ JIS Z2801 プラスチックの抗ウイルス試験。
- ・ JIS L1922 繊維製品の抗ウイルス試験方法 (インフルエンザ、ネコカリシウイルス、ポリオウイルス)。ISO 18184 に対応。

国内試験機関におけるウイルス試験実態を調査したところ、消毒剤等に対する抗ウイルス評価試験は複数機関で実施されており、その評価法は EN や ASTM 等に準じていた。但し、それらの多くは主として雑貨の付加価値の一つとして示されている状況で

あった。

C-2. 国内試験機関で使用されるウイルスウェブ検索を通じ、以下に記載するウイルスが使用されている状況にあることを確認した。

インフルエンザウイルス A 型

ネコカリシウイルス

ブタコロナウイルス

ウシコロナウイルス

マウス白血病ウイルス

シミアンウイルス 40

レオウイルス 3 型

仮性狂犬病ウイルス

ヘルペスウイルス 1 型

ヒトアデノウイルス 3 型

ヒトアデノウイルス 5 型

イヌパルボウイルス

ネコ腸管コロナウイルス

ウシウイルス性下痢症ウイルス

ヒトライノウイルス

ヒトポリオウイルス 1 型

ヒトポリオウイルス 3 型

エコーウイルス 5 型

コクサッキーウイルス B6 型

バクテリオファージ QB

上記のうち、汎用されるエンベロープウイルスとしては、インフルエンザウイルス A 型、非エンベロープウイルスとしてはネコカリシウイルスであった。

また、COVID-19 の影響をうけ、新型コロナウイルスを用いた試験を受託する試験検査機関も徐々に増えてきていた。但し、新型コロナウイルスの取扱いは、BSL3 施設内で行う必要があるため、急激な増加は見込み難い状況にあると想定された。

### C-3. 海外主要国での抗ウイルス試験法

米国、欧州、カナダ、豪州で標準となっている抗ウイルス試験法としては、ASTM E1052、E1053 及び EN14476 が標準試験法として採用されていた。

ASTM E1052 及び EN14476 では懸濁液中でのウイルス不活化評価方法（サスペンション法<sup>\*</sup>）が、ASTM E1053 では環境表面でのウイルス不活化評価方法がそれぞれ示されていた。手指消毒への適用を想定した場合にはサスペンション法での評価が基本となると考えられたため、評価方法の検討にあたっては前者を参考とすることとし、以下に供試ウイルスに関する留意点を纏めた。

・一般的な手指消毒剤について抗ウイルス作用を評価する場合、エンベロープウイルスと非エンベロープウイルス両方を用いて評価することとされる。ASTM や EN では表 1 のウイルス種が例示されている。

・特定のウイルス、例えば新型コロナウイルスに対する有効性を標榜する場合には、標榜対象となるウイルスそのものを用いた評価が求められる。ノロウイルスは食中毒や感染性胃腸炎の主要な原因物質であり、抗ノロウイルス作用のある消毒剤のニーズは非常に高いが、現時点では抗ウイルス作用を評価するための実用的な細胞培養系がないため、代替ウイルス（ネコカリシウイルスなど）を用いた評価が現実的には行われている。

<sup>\*</sup>サスペンション法: ウイルスと供試対象とする消毒剤を例えばウイルス：消毒剤＝1：9 の割合で溶液中に混合し、任意の時間（手指消毒剤の場合には概ね 30 秒から 1 分な

ど）反応させる手法を指す。

### C-4. 試験の概要

ここでは、主として新型コロナウイルスを対象ウイルスとした場合の抗ウイルス評価試験を例示すると共に、TCID<sub>50</sub>法について概説した。

#### C-4-1. 細胞の維持管理

自己複製能を有する細菌とは異なり、ウイルスは感受性細胞でのみ増殖するため、使用ウイルスに適した細胞の維持管理は欠かせない。新型コロナウイルスを用いる場合、国内では Vero E6/TMPRSS2 細胞が国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手可能であり（JCRB1819）、維持管理も容易である。

#### C-4-2. ストックウイルスの調整

新型コロナウイルスは国立感染症研究所等から入手できる。評価にあたってはできるだけ同じロットのウイルスを用いることが望ましいため、入手後は大型のフラスコ複数本に細胞を準備し、0.5 mL や 1 mL 程度ずつ小分けして -70 °C 以下の低温フリーザーで保存したものを評価に用いることが一般的である。新型コロナウイルスの場合、Vero E6/TMPRSS2 細胞がおおよそフラスコ底面積の 80-90 % まで増殖した状態でウイルスを接種し 24-48 時間培養液を 3,000 x g で 5 分程度遠心し、上清をストックウイルス液とすることが多い。

#### C-4-3. 評価試験（TCID<sub>50</sub>法）

消毒剤を用いる状況を想定し、ウイルス液と消毒剤を直接混合するサスペンション

法にて実施する。手指の消毒等であればウイルスに対し十分量の消毒剤を用いることを想定して、ウイルス液：消毒剤=1：9の比率で混合することが一般的である。

また、消毒効果が高く、少量使用での抗ウイルス効果を示す場合にはウイルス液：消毒剤の比率を1：1等としたり、逆に大量の消毒剤を必要とする場合には同比率を1:19等に設定する等、想定される使用方法に合わせて調整が必要となる。

反応時間は消毒剤の想定する使用方法に合わせて任意に設定するが、手指の消毒や洗浄への適用を想定する場合は、概ね30秒から1分までのタイムポイント設定が一般的である。

それぞれの消毒剤に対し、次の1)から4)の試験区を実施するほか、マイクロプレート上にウイルスや消毒剤、中和剤を含まない培養細胞コントロールを設定する。

#### 1) 不活化反応 (図1)

ウイルス：消毒剤=1：9で混合・反応させた後、中和剤を含む培地を加える、あるいは10倍希釈することで反応を停止する。その後、ウイルス/消毒剤混合液について、培地を用いて10倍階段希釈を作成する。あらかじめ96穴プレート等に播種した細胞に、作成した各希釈列について最低4穴ずつ混合液を接種し、CO<sub>2</sub>インキュベータにて細胞変性効果(CPE)が出るまで培養する。CPEの出た穴数と希釈倍率から反応で生残したウイルスの力価を算出する。

#### 2) ウイルス力価コントロール (図2)

消毒剤を含まない培地でウイルスの希釈列を作成し、上記と同様に96穴プレート等を用いてウイルスの力価を算出する。1)と2)でそれぞれ求められたウイルス力価の差

が供試対象とした消毒剤によるウイルスの減少量となる。

#### 3) 細胞毒性コントロール (図3)

培地：消毒剤=1：9で混合したのち、中和剤によって消毒剤を中和する。これを10倍階段希釈を行い、各希釈列について96穴プレートの細胞へ接種し、細胞変性を確認する。毒性が見られた場合は、1)と3)の差がウイルスの減少度となる。

#### 4) 中和コントロール (図4)

ウイルス：中和済み消毒剤=1：9で混合し、その後10倍階段希釈を作成し、各希釈列を96穴プレートの細胞へ接種し、ウイルス力価を測定する。通常、2)と4)ではほぼ同程度の数値となる場合が多いが、差が認められた際には中和方法を再検討する必要がある。

#### 5) ウイルス力価の算出法 (図5)

最終的なウイルス力価の算出は、以下に示すSpearman-Kärber法によって算出することがASTM E1052で示されている。

$TCID_{50} = (\text{ウイルスの最大濃度の希釈倍率の対数値}) - [(\text{各希釈倍率の陽性ウェル数} / \text{検体数の和}) - 0.5] \times (\text{希釈倍率の対数値})$

なお、EN14476ではCPEを確認できるウェルについて、CPE出現程度を1-4のスコアをつけ、評価する形式をとっている。上記計算式では、CPEの有無のみを判定要件とするため、各ウェルのスコア化は不要となっている。

#### 6) 結果の判定基準

一般的に、2)と4)のウイルス力価が同程度であることを確認した上で、1)と2)の力価の差が $4 \log_{10}$ 以上あった場合に有効と判定する。なお、3)で細胞毒性が確認された希釈倍率ではCPE等の出現が生残ウ

ウイルスによるものか、残存消毒剤によるものかが判別できなくなるため、同濃度での有効性の判定は困難となる場合もある。また、 $4 \log_{10}$ 以上の力価減少を判定基準とする場合、通常はウイルス/消毒剤混合液中に少なくとも  $6 \log_{10}$  の力価のウイルスが含まれる必要があることに注意が必要である。

#### C-4. プラーク法による評価試験 (図 6)

ウイルスと消毒剤の混合比、反応時間、試験区等は TCID<sub>50</sub> 法と同様に設定する。同法は各試験区の反応停止後の混合液を細胞に感染させた後、アガロース等を重層し培養する。TCID<sub>50</sub> 法と同様に培養後、固定・染色を行うことでウイルス感染により死滅した細胞が染色されず、白色プラークとして観察される原理を応用した手法である。

ウイルスの力価測定に、TCID<sub>50</sub> 法に比べ、より多くのプレートを準備する必要がある、ウイルス接種後に培地交換やアガロース重層、培養後に固定、染色工程があるなど、手間がかかる手法であるが、CPE の判別が難しいウイルス種を用いる場合に感染判定がしやすいなど、より客観的な結果を示すことができる利点もある。

#### C-5. 加熱処理を通じた、TCID<sub>50</sub> 法とプラーク法、遺伝子定量法間でのウイルス不活化効果に関する結果の比較

50°C及び90°C保持による新型コロナウイルスの不活化状況について、TCID<sub>50</sub> 法とプラーク法、リアルタイム PCR による遺伝子定量法でそれぞれ評価した結果を表 2 に示した。

ストックウイルス(非加熱)の力価は TCID<sub>50</sub> 法では  $3.2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL、プラーク

法では  $1.2 \times 10^6$  PFU/mL、リアルタイム PCR を用いた遺伝子定量法では  $6.0 \times 10^8$  copies/mL となった。50°Cで30分間加熱処理を行った群では、TCID<sub>50</sub> 法及びプラーク法では共に検出限界以下となったが、遺伝子定量法では  $3.0 \times 10^8$  copies/mL となり、ウイルスの不活化が結果に反映されていないことが示された。

次に、より不活化が亢進されると想定される 90°C・5 分の加熱処理を行い、処理後の同ウイルスの不活化状況の評価した。結果として、TCID<sub>50</sub> 法及びプラーク法では共に検出限界以下となったが、遺伝子定量法では、 $5.0 \times 10^7$  copies/mL と判定された。以上の結果より、新型コロナウイルスの不活化を評価するにあたってはウイルス感染性を基とした評価法の選択が不可欠であることが示された。

#### D. 考察

国内では、工業製品を対象にした抗ウイルス作用の評価試験法が JIS 規格の方法として複数存在したが、手指消毒に用いる一般医薬品に対応する標準的な評価試験法は整備されていない状況にあった。

諸外国では、ASTM E1052、E1053、EN14476 等で、一般的な消毒剤による抗ウイルス作用の評価試験法が示されている。但し、外国では一般医薬品としての消毒剤はその成分がモノグラフとして限定されており、今後モノグラフの登録に変化がなければ試験法も大きくは変わらないと思われる。

また殺菌及び消毒の対象にはウイルスも含まれ、抗ウイルス作用の確認には試験機関で使用可能なウイルス株を使用したデー

タが示される状況であった。ASTM E1052 で例示されるウイルスは 12 種あり (表 1)、製品として、特定のウイルスへの効果を確認する場合には当該ウイルスを用いた試験が求められる。入手や取扱いの容易さ等から、主にインフルエンザウイルスやネコカリシウイルスが汎用されている。一方、ヒトノロウイルスのように評価試験のニーズはあるものの細胞培養系が存在しないウイルスについては、代替ウイルスを用いた評価試験を実施する以外の手立てはない。こうした細胞培養不能なウイルスに対する不活化効果を直接的に評価することは現時点では困難な状況にあるため、それらのウイルスの増殖を可能とする細胞培養系の構築が望まれる。

海外における消毒剤等による抗ウイルス作用の標準的な評価試験法は、ウイルス液と消毒剤を試験管内で直接混合するサスペンション法が一般的であり、混合比や反応時間は消毒剤の使用状況に合わせて設定することとなっている。

ウイルス力価の測定法は、感受性細胞に対する感染性によって判定する TCID<sub>50</sub> 法やプラーク法に拠ることが必須であり、遺伝子定量値からウイルス感染性を推定する手法を用いるべきではないことが本研究の成果からも確認されたといえる。

新型コロナウイルスについては、2019 年のパンデミック発生直後と現在では、ウイルスの遺伝子変異を通じた感染性や病原性の変化も報告されている。こうした変異ウイルスについては薬剤感受性の変化が生じているおそれもあることから、今後検証を行う必要があると思われる。

## E. 結論

一般用医薬品又は新指定医薬部外品として製造販売が承認されている消毒薬はアルコールを主成分とするものが多い。新型コロナウイルスはエンベロープウイルスであり、エタノールによる抗ウイルス作用は十分期待されるが、代替的に用いられる薬剤の開発も重要な社会的課題である。更に、アルコール単味剤の非エンベロープウイルスに対する抗ウイルス作用は大きくはなく、新たな作用機序の消毒剤、新規有効成分を含む消毒剤の開発は今後も増加する可能性がある。本研究における成果は、今後、新たに抗ウイルス効果を有する一般用医薬品の承認申請が出された際に科学的根拠として活用されることが期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

