

(別添 4)

厚生労働行政推進調査事業費補助金

(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業の総合的推進に関する研究

(分担) 研究年度終了報告書

「新型コロナウイルスの消毒法の検証等に関する研究」

研究分担者 花木 賢一 国立感染症研究所 安全実験管理部 部長
研究協力者 高木 弘隆 国立感染症研究所 安全実験管理部 主任研究官
田原口元子 国立感染症研究所 安全実験管理部 主任研究官

研究要旨：新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、飛沫感染と接触感染により伝播すると考えられている。接触感染については、物品に付着した新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染力の持続時間に関心が集まるが、日本の気候条件を考慮した検証は行われていない。そこで、その検証を行うための準備を行った。また、衣類に付着した SARS-CoV-2 を能動的に不活化させる物資を探索するため、柔軟仕上げ剤の主成分であるジアルキルアンモニウム塩と食品添加物であり汎用洗浄剤として使用されているクエン酸について検討した。その結果、クエン酸は 100mM (約 0.2%) 以上、1 分前後の処理で SARS-CoV-2 の感染価を 4 桁以上低下させる作用があることが明らかになった。

A. 研究目的

2019 年末に発生した中国・武漢市の新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は世界的な大流行 (パンデミック) となり、1 年以上経過した現在も変異株の出現を伴いながら国内外で感染拡大が続いている。その原因である新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は飛沫と接触により伝播すると考えられており、接触感染については身の回りの物品や素材へウイルスを接種して感染力の持続時間の検証が行われている。しかし、それら検証結果は日本の気候風土と異なる条件で得られており、調べられた素材も限定的である。そして、知見が乏しいため、病院等では過剰な環境消毒や再利用可能な医療用リネン類の焼却廃棄が行われている。そのた

め、各種衣類素材における SARS-CoV-2 の感染力持続時間を検証して結果を発信することは、COVID-19 への適正な対応に寄与すると考えられる。また、衣類に付着した SARS-CoV-2 の消毒については、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) が「新型コロナウイルスに対する代替消毒方法の有効性評価 (最終報告)」において、家庭用洗剤に含まれる 9 種の界面活性剤が有効であることを公表しており、その中には布用除菌消臭スプレーの主成分である塩化ベンザルコニウム (第四級アンモニウム塩) が含まれており、それら製剤で衣類を予め処理することにより抗ウイルス作用を付与できることが期待される。そこで、本研究では①日本の気候条件下での SARS-CoV-2 の各種

素材上での感染力の持続時間の検証と②衣類を浸漬するあるいは衣類に吹き付けることで衣類に抗ウイルス作用を付与できる物資を検索してその有効性を明らかにする。本研究ではこれら2項目について取り組み、国民へCOVID-19の制御に有効な対処法についての情報を提供することを目的とする。

B. 研究方法

① 衣類素材へのウイルス接種実験

被検体である衣類断片を24ウェルプレートに各ウェルへ入れてSARS-CoV-2のモデルウイルスであるマウスコロナウイルス(マウス肝炎ウイルス, MHV)を接種し、恒温恒湿器IW223(ヤマト科学)において、温度15°C・相対湿度45%(春を想定)、温度35°C・相対湿度70%(夏を想定)、温度20°C・相対湿度60%(秋を想定)に維持して0, 1, 3, 6時間、1, 2, 3, 4, 7日間静置する。規定の時間後に10%トリプトースホスフェートブローズ(TPB)加イーグル最小必須培地(EMEM)を0.5ml加えてピペッティングを行い、ウイルスを含むEMEMは遠心式フィルターユニットUltrafree-MC(0.22 μm; Millipore)でろ過滅菌し、96ウェルプレートに播種したDBT細胞へ50 μl/wellを接種する(N=3)。1時間後に5%FBS・10%TPB加EMEMを150 μl/well加えて37°C, 5% CO₂下で4日間培養して細胞変性効果(CPE)の有無により感染性ウイルスの残存を判定する。

② 抗ウイルス作用付与剤の検討

a. ジアルキルアンモニウム塩(TES)

SARS-CoV-2 培養上清(2-4 × 10⁶ TCID₅₀/50 μl)とTES-85E(0.1%または0.2%)を1:9で混合(合計0.3ml)して5, 10, 20, 40または60分後に30 μlを分取した(N=2)。レジン(SM-2® beads)を加えて穏和かつ十分に攪拌した後に180 μlの中和培地[0.375% Bicaを含む3%FBS加イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)]を添加して5分間静置した。その後、7倍希釈列を作成してVeroE6/TMRPSS2に接種し、37°C, 5% CO₂下で4日間培養してCPEの有無を確認し、感染価を算定した。

b. クエン酸

SARS-CoV-2 培養上清(2-4 × 10⁶ TCID₅₀/50 μl)とクエン酸(50, 100, 200mM)を1:9で混合(合計0.3ml)して120秒後に30 μlを分取し、180 μlの中和培地を添加して穏和かつ十分に攪拌した。続いて、7倍希釈列を作成してVeroE6/TMRPSS2に接種し、37°C, 5% CO₂下で4日間培養してCPEの有無を確認し、感染価を算定した。

C. 研究結果

① 衣類素材のウイルス接種実験

恒温恒湿器IW223をBSL-3実験室に搬入するためには、BSL-3実験区域が除染され、定期点検期間に入るまで待つ必要があった。そのため、2月15日にIW223をBSL-3実験室へ搬入設置し、その後に試運転を行った。温湿度設定において、15°Cでの相対湿度制御可能範囲の下限は55%であった。そのため、乾燥剤により45%まで

除湿できるか検討する必要があることが明らかになった。なお、35℃・相対湿度 70%、20℃・相対湿度 60%は制御可能範囲内である。

② 抗ウイルス作用付与剤の検討

エステル化されたジアルキルアンモニウム塩 (TES) は、柔軟剤の主成分として使用されている第四級アンモニウム塩である。そのため、既に衣類を柔軟剤処理することで抗ウイルス作用が付与されることが期待されたため、TES について SARS-CoV-2 の不活化効果を検討した。ウイルスと TES を 1:9 で混合することによる経時的感染価の推移を図 1 に示す (N=2)。

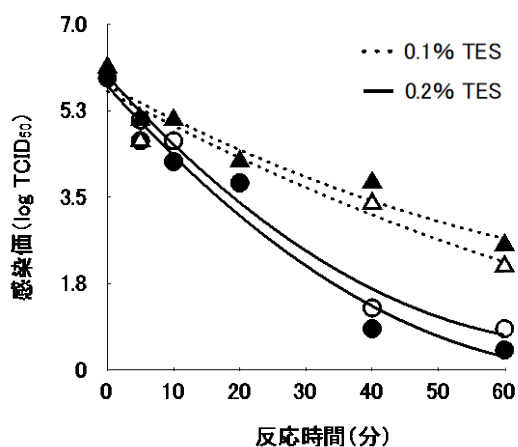


図 1. TES-85E の SARS-CoV-2 不活化効果

0.1% TES-85E 処理では 10 分後に 1 桁、20 分後に 1.9 桁、1 時間後に 3.5-4 桁の感染価低下となり、時間は要するがウイルス不活化効果を確認した。0.2%TES-85E 処理では 10 分後に 1.2-1.7 桁、20 分後に 2.1 桁、1 時間後に 5.5 桁の感染価低下となり、

濃度を 2 倍にしても大幅な時間短縮はできないが、ウイルス不活化効果の増強を確認した。

次に、アルコール製剤の pH 調整に用いられているクエン酸について TES と同様に抗ウイルス作用の検討を行った。ウイルスとクエン酸を 1:9 で混合することによる経時的感染価の推移を図 2 に示す (N=2)。50mM クエン酸処理では 5 分後に 3 桁の感染価低下を認め、100mM クエン酸処理では 1 分前後で 4 桁の感染価低下を引き起こした。また、150mM クエン酸処理では 40 秒で感染価測定限界である 4.8 桁の感染価低下を引き起こした。

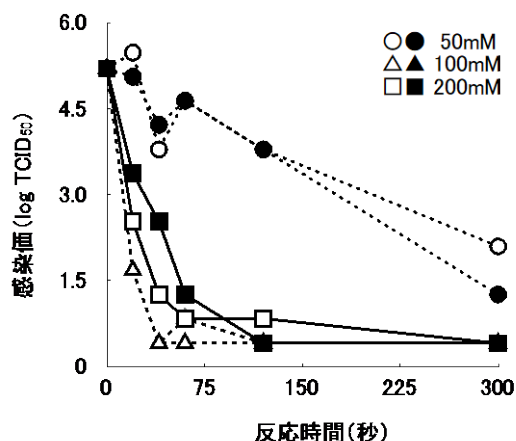


図 2. クエン酸の SARS-CoV-2 不活化効果

D. 考察

本研究は①日本の気候条件下での SARS-CoV-2 の各種素材上での感染力の持続時間の検証と②衣類に抗ウイルス作用を付与できる物資の検索とその有効性を明らかにすることを目的として実施した。

①については、恒温恒湿器の導入、設置に時間を要したため、今年度は恒温恒湿

条件の設定に関する試験実施に止まった。来年度以降に MHV 並びに SARS-CoV-2 を用いた検討を行う。

②については、除菌消臭剤の主成分として第四級アンモニウム塩である塩化ベンザルコニウムを用いている製品があること、NITE の報告書「新型コロナウイルスに対する代替消毒方法の有効性評価」において、塩化ベンザルコニウムは SARS-CoV-2 の不活化に有効であること、衣類の柔軟仕上げ剤の主成分である TES もまた第四級アンモニウム塩であることから注目した。そして、0.2%の TES-85E により 1 時間を要するが感染価を 4 桁低下させることが明らかになった。しかし、柔軟仕上げ剤の標準仕様濃度は原液の 0.03%であり、その内の TES の占める割合は公表されていないが、本実験では 10 倍を超える高濃度で試験を行っていると思われる。従って、柔軟仕上げ剤のみで SARS-CoV-2 を不活化したい場合には浸漬時間を十二分に設定する必要があり、通常の使用で衣類に残存する柔軟仕上げ剤成分により衣類に抗ウイルス作用を付与することは難しいと考えられた。

クエン酸 (MW. 192.124) は食品添加物であり、アルコール製剤の pH 調整に用いられている。また、ヒトノロウイルスは 70% エタノールでは不活化できないが、1% クエン酸を添加することにより酸性化した 70%エタノールで不活化できることが報告されていること (Sato et al. 2020. Scientific Rep. 10: 15878)、NITE の報告書「新型コロナウイルスに対する代替消毒方法の有効性評価」では、次亜塩素酸水は酸性

のものでウイルス不活化効果が高いことから、クエン酸に注目した。そして、100mM 以上のクエン酸により約 1 分で 4 桁の感染価低下を引き起こすことから、即効性のある強力なウイルス不活化剤となることが期待された。クエン酸は食品添加物としてだけではなく、身の回りの洗浄剤としても活用されており、その際の濃度はクエン酸水として 4-5%、掃除スプレー用途で 2%が紹介されている。100mM クエン酸は 1.92% クエン酸水に相当するため、家庭で日常的に使用されているクエン酸の濃度で十分に SARS-CoV-2 を不活化できると考えられた。なお、0.1M クエン酸ナトリウムの安全データシートによると、保存に関して避けるべき条件として「高温、直射日光」とあるが、安定性については「法規制に従った保管及び取扱においては安定と考えられる。」とあるのみであり、実際の有効期限は別途検証する必要がある。また、衣類への適用については、浸漬することで消臭や除菌効果があるとして既に利用されている。しかし、pH2-3 という酸性であることから、浸漬後に水洗いせずにクエン酸を衣類に残留させる、あるいはクエン酸水を吹き付けることにより衣類へ抗ウイルス作用を付与させることについては、使用者によって肌荒れを引き起こすことが予想されるため、安全性の観点で慎重な検討が必要である。

E. 結論

衣類の柔軟仕上げ剤の主成分である TES は SARS-CoV-2 の不活化効果を有するが、柔軟仕上げに使用される濃度ではその効果

を発揮できないことが考えられること。食品添加物であり汎用洗剤として使用されるクエン酸は、一般的な使用濃度（2%）で SARS-CoV-2 に対して即効性の高い不活化効果を発揮する物資であることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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