

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)
(分担) 研究年度終了報告書

薬剤による新型コロナウイルス不活化条件に関する研究

研究分担者 森川 茂 岡山理科大学・獣医学部・教授

研究要旨

ウイルス液を Sephadex G25 カラムによる限外ろ過法で DMEM から生理食塩水に置換して、次亜塩素酸水による不活化度を検討した。その結果、培地成分を置換しないウイルスを用いた試験では、20ppm 以下では不活化度が低く、50ppm 以上で検出限界未満になった。一方、生理食塩水で置換したウイルス液を用いて同様に不活化度を検討した結果、5ppm でも検出限界未満になった。

エンベロープウイルスの不活化効果の高い SDS による不活化を、FBS を含まない DMEM 培地で調製した SARS-CoV-2 を用いて調べた。その結果、0.01% SDS では 25℃、3 分間の処理では不活化効果は 50% 程度、0.1% SDS では 99.2%、1% SDS では 99.9% であった。1% SDS 処理では 100℃、10 分間の処理では検出限界未満まで不活化されるという報告があるが、25℃、3 分間の処理ではかなり不活化されるが完全には不活化できなかった。

血清の非働化では 56℃、30 分間の熱処理がされる。この熱処理での不活化と血清濃度との関係を調べた結果、FBS を 1%、90% 含む DMEM 中の SARS-CoV-2 のいずれも 10 分間処理で 99.8~99.9%、30 分間処理ではほぼ検出限界まで不活化されたことから、非働化により感染リスクはほとんどなくなると考えられた。

A. 研究目的

令和 2 年 1 月末に WHO が国際緊急事態宣言を出した新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、わが国では同年 2 月に「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (感染症法)」の指定感染症に指定され、現在も全国で新規感染者の報告が続いている。感染症の伝播抑制には、病原体で汚染された器機、環境の消毒・滅菌を適切かつ迅速に行う必要がある。感染症法第 27 条及び第 29 条に基づく病原体に汚染された場所等の消毒・滅菌は、平成 30 年 12 月 27 日付で改訂された「感染症法に基

づく消毒・滅菌の手引き」によって行われ、COVID-19 へは SARS・MERS の記載が準用されている。しかし、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は他のウイルスと不活化条件の異なる例が報告されている。

COVID-19 の流行は消毒薬需要の急増を招き、消毒薬の供給不足は社会問題となった。独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) は、経済産業省の依頼により消毒薬の不足に対処するため、専門家による検討委員会を設置して SARS-CoV-2 に汚染された物の消毒に有効な物資を選定して公表した。同様の物資の公表は海外でも行われ

ている。ただし、NITE は評価対象物資から医療機関で通常使用されている物資を除外したため、未検証の物資が多く残されている。また、市中には SARS-CoV-2 の消毒効果を検証することなく、その有効性を謳う物資が出回っている。そこで、本研究は令和 2 年度中に、①SARS-CoV-2 に対する一般的な消毒・滅菌方法の条件を実験的に明らかにすること。②マスクや防護服といった个人防护具の再利用に資する新たな消毒方法を確立すること。そして、それらを基に③SARS-CoV-2 の消毒・滅菌の手引きを作成することを目的とする。併せて、④COVID-19 パンデミックによる消毒薬の供給不足を省み、他の感染症についても「感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き」に記載されていない消毒・滅菌方法の追加が必要であり、主に文献調査を行って手引きを改訂することを目的とする。それらの内、本研究では SARS-CoV-2 の各種消毒剤等の成分による不活化条件を検討してその有効性を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) ウイルス溶液中に含まれる細胞培養用培地成分による次亜塩素酸 Na 溶液や次亜塩素酸水中の遊離残留塩素の低下：

厚生労働省の「新型コロナウイルスに関する Q&A (一般の方向け)」では、使用方法として、「市販の家庭用漂白剤を、次亜塩素酸ナトリウムの濃度が 0.05% になるように薄めて拭きます。その後、水拭きしましょう。」と記載されている。0.05% は 500ppm であるが、市販の次亜塩素酸 Na を含む漂白剤などの使用推奨濃度に相当する。ウイルスは通常、細胞培養用の培地に非働化ウ

シ胎児血清 (FBS) や抗生物質を添加した液中に含まれる形態で使用される。本研究では、細胞培養用培地成分が次亜塩素酸ナトリウム液の遊離残留塩素に影響するかを検証した。また、NITE で取りまとめた次亜塩素酸水による SARS-CoV-2 に不活化効果は、複数の研究機関で実施された結果をとりまとめて 99.9% 以上の不活化効果がある 35ppm 以上を有効濃度と判断している。この 35ppm は理論値であり、残留塩素濃度を測定しているわけではない。この試験では、ウイルスは培地に FBS を 1% から 5% 含む液に含まれているものを用いている。そこで、培地成分が次亜塩素酸水の有効塩素濃度に与える影響を調べた。培地をそのままあるいは蒸留水で希釈して 1,000ppm の次亜塩素酸ナトリウム 1/100 と混合して、遊離残留塩素濃度を測定した。また、分子量 5,000 以下の低分子物質を除去できる Sephadex-G25 の市販カラムである PD-10 脱塩カラムまたは PD MidiTrap G-25 カラムを用いて、DMEM 培地あるいは 1% FBS を添加した DMEM 培地の低分子物質を除去して生理食塩水 (0.9% NaCl) に置換した。これらに次亜塩素酸 Na や次亜塩素酸水を添加して遊離残留塩素を測定した。

2) 培地の低分子物質を除去した SARS-CoV-2 の不活化に要する次亜塩素酸 Na や次亜塩素酸水の濃度：

1) で用いた PD-10 脱塩カラムまたは PD MidiTrap G-25 カラムを用いて、分子量 5,000 以下の低分子物を除去して生理食塩水に置換したウイルス液を作製し、不活化に要する次亜塩素酸 Na や次亜塩素酸水の濃度を調べた。通常の培地に含まれるウイルスまたは低分子物を除去したウイルスの 1 容に、各種濃度の

次亜塩素酸 Na や次亜塩素酸水の 19 容を混合して、室温で 1 分間反応させた。反応後直ちにチオ硫酸 Na で中和して 1%FBS 添加 DMEM 培地で 10 倍階段希釈し、VeroE6/TMPRSS2 細胞を培養したマイクロプレートに各希釈ウイルス液 40 μ L/well x 6 wells/dilution 接種して 4 日後に CPE の出現を指標にウイルス力価 (TCID₅₀/mL) を Reed & Muench 法で求め、mock 反応対象に対する力価の減少により不活化効果を求めた。

3) SDS による不活化効果:

比較的ウイルス不活化効果の強い界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) による不活化効果を調べた。FBS 無添加 DMEM 培地で調製した SARS-CoV-2 液に SDS を 0.01、0.1、1% になるように添加して室温 25°C で 3 分間処理後、JIS L1922 に準じて不活化度を解析した。

4) 熱不活化と FBS 濃度:

SARS-CoV-2 は、ウイルス血症をほとんど起こさないとされるが 1% 程度の感染者の血中にウイルスが検出される。そこで、通常の 1% FBS 添加 DMEM 中のウイルスと 90% FBS 添加 DMEM 中のウイルスで 56°C での不活化を比較した。

(倫理面への配慮)

特記事項なし

C. 研究結果

1) ウイルス溶液中に含まれる細胞培養用培地成分による次亜塩素酸 Na 溶液や次亜塩素酸水中の遊離残留塩素の低下:

SARS-CoV-2 の増殖に使用する DMEM 培地を 20mL と 1,000ppm の次亜塩素酸ナトリウム 0.2mL を混合すると理論値は

9.90ppm となるが、残留遊離塩素濃度の実測値は測定限界未満であった。そこで、DMEM 培地を蒸留水で 100 倍希釈したものの 20mL と 1,000ppm の次亜塩素酸ナトリウム 0.2mL を混合すると有効塩素濃度の実測値は 0.14ppm と理論値の 9.90ppm の 1/70 の値となった。次亜塩素酸水を用いて同様の試験を行うと同様の結果が得られた。また、PD-10 脱塩カラムで DMEM を生理食塩水に置換したものでは、同様に試験で実測値は理論値の約 1/2 となった。このことは、DMEM 培地中に大量に含まれるアミノ酸と有効塩素が反応して塩素が消費されるためと考えられた。

2) 培地の低分子物質を除去した SARS-CoV-2 の不活化に要する次亜塩素酸 Na や次亜塩素酸水の濃度:FBS を含まない DMEM 培地で調製したウイルス、1%FBS 添加 DMEM 培地で調製したウイルス、脱塩カラムで DMEM を生理食塩水に置換したウイルスで次亜塩素酸 Na や次亜塩素酸水による不活化効果を調べた結果、FBS を含まない DMEM 培地で調製したウイルス、1%FBS 添加 DMEM 培地で調製したウイルスでは優位差はなく、理論値 20ppm では不活化度が低く、理論値 50ppm 以上で検出限界未満 (log₁₀ 値で >5.3 の力価減少) まで不活化され、NITE の報告と一致した。一方、FBS を含まない DMEM で調製したウイルス液を 100 倍希釈して、次亜塩素酸ナトリウムの実測値でのウイルス不活化度を検証した結果、ネココロナウイルスでは、実測値の残留遊離塩素濃度 0.14ppm で 5 分間以上の処理で検出限界未満に、0.25ppm 以上では 1 分間以上で検出限界未満まで不活化できた。一方、SARS-CoV-2 では、実測値の残留遊離塩素濃度 0.25ppm の 1 分間処理では

log₁₀ 値で 3.6 の力価減少、20 分間で検出限界未満(>4.1)まで不活化された。

また、ウイルス液を Sephadex G25 カラムにより DMEM から生理食塩水に置換したウイルスを用い、NITE で報告されたウイルス液:次亜塩素酸水=1:19, 1 分間処理で不活化試験を行うと、5ppm でも検出限界未満(log₁₀ 値で>5.3 の力価減少)であった。SARS-CoV-2 は唾液や痰などからの飛沫が主な感染源となるが、これらにはタンパク質やアミノ酸はあまり含まれていないため、これらによる汚染部位の SARS-CoV-2 の不活化は、比較的低濃度の次亜塩素酸 Na で可能であると考えられた。

3) SDS による不活化効果:

界面活性剤によるウイルスの不活化は、ウイルスが含まれる液中のタンパク質濃度が影響することがわかっている。タンパク質濃度が高いと界面活性剤が消費されるからである。そこで、特にエンベロープウイルスの不活化効果の高い SDS による不活化を FBS を含まない DMEM 培地で調製した SARS-CoV-2 を用いて調べた。その結果、0.01% SDS では 25°C、3 分間の処理では不活化効果は 50% 程度で有効ではなかった。0.1% SDS では、99.2% (log₁₀ 値で 2.1 の力価減少)、1% SDS では、99.9% (log₁₀ 値で 2.9 の力価減少)であった。1% SDS 処理では 100°C、10 分間の処理では検出限界未満まで不活化されるという報告があるが、25°C、3 分間の処理ではかなり不活化されるが完全には不活化できなかった。

4) 熱不活化と FBS 濃度:

FBS を 1%、90% 含む DMEM 中の SARS-CoV-2 の 56°C による熱不活化を比較検討した結果、いずれも 10 分間処理で 99.8 ~ 99.9% (log₁₀ 値で 3 の力価減少)、30 分間

処理ではほぼ検出限界(log₁₀ 値で 4 桁以上の力価減少)まで不活化された。

D. 考察

汚染箇所の不活化によく用いられる次亜塩素酸 Na や次亜塩素酸水による不活化の報告では、通常ウイルス液を用いて行われているが、本研究で培地中に含まれるアミノ酸などの低分子物が残留有利塩素を著しく減少させることがわかった SARS-CoV-2 では感染源は主に感染者からの飛沫に含まれるウイルスであることから、飛沫中にはアミノ酸などはあまり含まれていないことから、これまでの報告より実際には家内低濃度でも不活化されることがわかった。不活化試験は実際の感染源となる状況に近い状態での評価が必要であると考えられた。また、タンパク質をほとんど含まないウイルス液の SDS による不活化も室温で短時間では完全には不活化できなかった。一方、血清の非働化には 56°C、30 分間の熱処理が用いられるが、ウイルスによっては血清タンパク質濃度により熱不活化度が異なる場合がある。SARS-CoV-2 は感染者の 1% 程しか血清中に検出されないが、血清の熱不活化では血清タンパク質濃度にかかわらず、56°C、30 分間の非働化でほぼ検出限界あるいは検出限界未満まで不活化されたことから、非働化された血清は感染源にはならないと考えられた。

E. 結論

各種不活化法とそれに影響する因子を明らかにした。これらは、汚染除去や感染防御に有用な情報である。

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

なし

