

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

新型コロナウイルスの不活性化評価系の改良と有効物資探索に関する研究

研究分担者 高木 弘隆 国立感染症研究所安全実験管理部主任研究官

研究要旨

未だ感染拡大の周期を頻繁に繰り返す新型コロナウイルス感染症の感染制御の一環として、現状に即した実効性の高い制御手法の検討を行った。口腔ケア用品や薬用トローチなどに含有される塩化セチルピリジニウム(CPC)25-100ppm による新型コロナウイルス(nCoV)の不活性化は緩やかではあるが経時的感染価減衰が認められた。紫外線 UV-C 照射による CoV の感受性は  $\alpha$  CoV と  $\beta$  CoV で大きな差異が認められ、 $\beta$  CoV である nCoV は感受性が非常に高かった。ヒト唾液に nCoV を加えた試料に対し、エタノール(EtOH)、次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)および塩化ベンザルコニウム(BZC)による経時的感染価減衰を検討したところ、いずれも速やかに減衰し、20-40 秒で 99.8-99.999%の減衰率を示した。

A. 研究目的

2009 年より感染が拡大し、現在も全世界的に感染の拡大・縮小、および変異株の出現を繰り返している新型コロナウイルス感染症(COVID-19)はワクチン接種が進んでいる現在でも、その勢いはとどまらない。またワクチンによる獲得免疫をかいくぐるかのごとく、変異株が出現し、現時点で主流となっているオミクロン株はこれまで感染・発症に至りにくいとされていた 12 歳以下の年齢層でも感染するようになり、これを発端する家庭内感染数が増加している。このようにワクチン接種率の伸び悩みや治療薬の普及がままならない状況において、これまでの感染対策の継続と徹底はもちろんであるが、より効率的かつ実効性の高い方法は渴望されている。そうした状況を鑑み、新型コロナウイルス(nCoV)に対し、①口腔ケアや咽頭の消毒に使用されている塩化セチ

ルピリジニウム(CPC)、②紫外線 UV-C に対する感受性、および③ヒト唾液に nCoV を含有させての基本消毒剤の効果、について検討することとした。

B. 研究方法

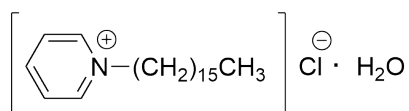
(1)塩化セチルピリジニウム(CPC)による nCoV 不活性化の検討

CPC は咽頭うがい液、マウスウォッシュ、歯磨き剤や薬用ドロップなど含まれており、主に口腔内の殺菌を目的とした医薬品として使用されている。本剤は陽イオン界面活性剤であるため、塩化ベンザルコニウム(BZC)や塩化ベンゼトニウム(BZN)と同様に新型コロナウイルスに対する不活性化効果が期待できる。

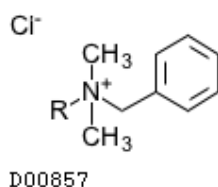
一方、含有量から想定される CPC 濃度は 25-50ppm と低濃度であるため、この濃度範囲をカバーする濃度-時間での感染価減衰

の検証が必要となる。また構造式においても BZC や BZN とかなり異なる(図 1)ため、吸着レジンの選定も必要と考えられた。

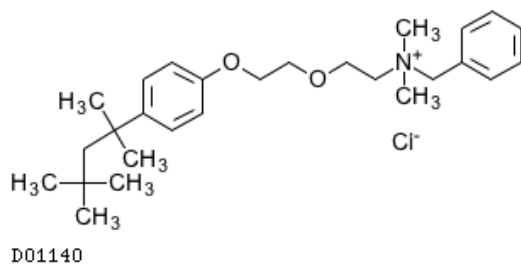
図 1. 各種陽イオン界面活性剤の構造式  
CPC



BZC



BZN



今回①CPC 除去用吸着レジンの選定とそれに伴う試験プロトコールの見直し、②見直したプロトコールに基づき、CPC25-100ppmでの新型コロナウイルス感染価減衰 time-course を検証した。

CPC 原体は東京化成工業より入手 (A5161)し、精製水にて 2%w/v に調製後φ 0.2 μ m フィルターにてろ過滅菌したものを test-stock とした。使用時にこれを滅菌水で希釈して必要な濃度に再調製した。選定用吸着レジンは SM-2(BIORAD)、SP-850、HP-

20(DIAION)、XAD-7,-18,-1180、FPX66 (Amberlite)の 7 種類を用い、各レジンの bed-volume 100 μ L に CPC 溶液(250-1000ppm)30 μ L と 5%FBS 含有 DMEM180 μ L を混合したものを加えて混合して 5 分静置後、陽イオン界面活性剤検出試験紙(QC-1001、MICRO ESSENTIAL Lab)に上清を滴下しその黄→緑への変色が最も生じにくいものを探した。

供試 nCoV は SARS-CoV-2\_#521(Wuhan)とし、 $1.6 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/50 μ L に調製し、CPC との反応比は 1:9、吸着レジンは先に選定したものを、NITE 報告の既報となっているプロトコールに従い実施した。

(2)紫外線 UV-C に対するコロナウイルスの感受性の検討

実験動物への免疫用不活化全粒子抗原を作成する上で有効とされる紫外線(UV-C)照射について、αコロナウイルスとして豚伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV)とβコロナウイルスである SARS-CoV-2 について、感受性比較を行った。

供試 CoV 及び培養細胞は TGEV 弱毒 h-5 株/ST 細胞、SARS-CoV-2\_#521(Wuhan)/E6-TMPRSS2 細胞とし、照射装置は SUV-6(アズワン、λ 254nm ; 6W×1)および CL-206(コスモバイオ、λ 254nm ; 6W×2)を用いた。氷冷下のアルミブロック上で 0.2mL チューブに各々のウイルス液 60 μ L ずつ分注し、安全キャビネット内にて、紫外線強度 0.8 ないし 1.5mW/cm<sup>2</sup> で照射した。経時的にチューブを回収し、マイクロプレート/end-point assay により、各々の感染力価を算出した。

(3)ヒト唾液中 nCoV に対する基本的な消毒による不活性化検討

nCoV の重要な感染源のひとつとして、ウイルスが含まれる唾液飛沫が挙げられる。特に飲食業界や家庭内における感染制御対策として、こうした飛沫の消毒は重要であるが、これまでヒト唾液を素材とした消毒効果の検証はされていない。今回ヒトプール唾液に nCoV をスパイクした試料を作成し、60%v/v エタノール(EtOH)、136ppm 次亜塩素酸ナトリウムおよび 0.05% BZC による不活性効果を検討した。

供試 nCoV 及び培養細胞は SARS-CoV-2\_#521(Wuhan)/E6・TMPRSS2 細胞とし、ヒトプール唾液は Normal Saliva pooled Human Donors(LEE BIOSOLUTIONS ; コスモバイオ)を購入して使用した(以降 プール唾液)。プール唾液は解凍して数日冷蔵静置後、PCR によるマイコプラズマ陰性を確認して、 $\phi 0.2 \mu m$  フィルターにてろ過滅菌した。プール唾液:ウイルス液を 9:1 で混合し、nCoV 含有プール唾液を作成した(以降 nCoV 唾液)。この唾液サンプルに EtOH 及び NaClO は混合比(nCoV 唾液 : 薬剤)1 : 9 で、BZC は混合比 1 : 1 で反応させ、NITE 報告の既報となっているプロトコールに従い経時的感染価減衰を検討した。

(倫理面への配慮)

該当なし

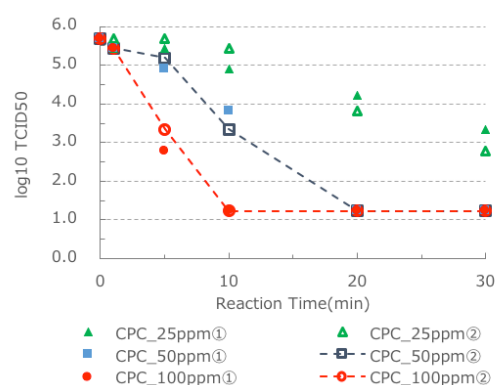
### C. 研究結果

#### (1)CPC による nCoV 不活性化効果

吸着レジジン選定により FPX-66 が CPC 吸着に優れていることが示され、プロトコールに採用した。感染価減衰 time-course 試験において、CPC-100ppm では反応後 10 分、CPC-50ppm では 20 分で  $4\log_{10} \text{TCID}_{50}$  以上の減衰を示し、検出限界以下となった。25ppm で

は緩やかな減衰を示し、最長 30 分の反応でも  $2\log_{10} \text{TCID}_{50}$  の減衰に止まった(図 2)。

図 2. CPC による SARS-CoV-2 感染価減衰(濃度×時間)



ここで break-point を  $2\log_{10}$  減衰(99%減衰)とした場合、100ppm では 5 分、50ppm では 10 分となり、一般的な使用方法・濃度を鑑みた場合、これまで BZC や BZN 0.05%(500ppm)でみられたような即応性は認められなかった。

#### (2)紫外線 UV-C に対する CoV 感受性

紫外線強度と照射時間から joule 換算を行い、感染価減衰グラフを作成した(図 3a, 3b)。

図 3a. TGEV( $\alpha$  CoV)の UV-C 感受性

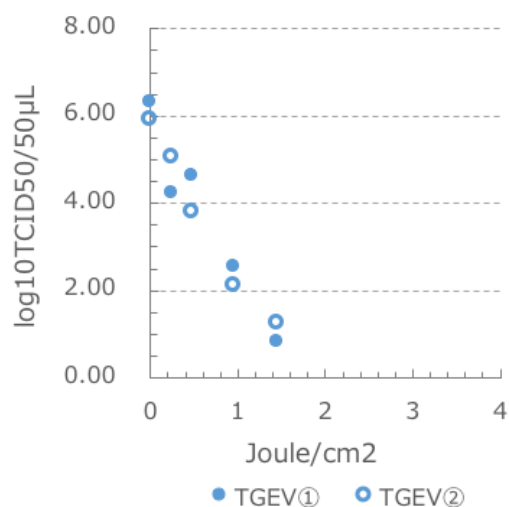
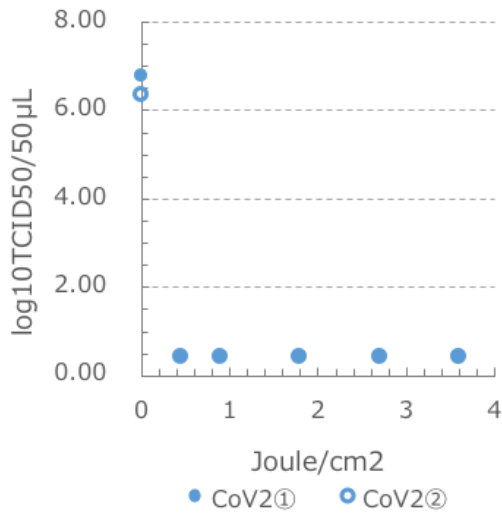


図 3b. SARS-CoV-2( $\beta$  CoV)の UV-C 感受性



グラフからも明らかに nCoV のほうが感受性が非常に高いことがわかる。さらに各ウイルス 1TCID<sub>50</sub> を不活性化するのに必要なエネルギー量(J/cm<sup>2</sup>)を計算すると、TGEV で  $9.59 \times 10^{-7}$ 、nCoV で  $\leq 1.13 \times 10^{-7}$  となり、TGEV( $\alpha$  CoV)のほうが8.5倍以上のエネルギーを要することが示された。

(3)nCoV 唾液の基本消毒剤による不活性化

60%v/v EtOH、136ppm NaClO、および 0.05% BZC による唾液中 nCoV の不活性化について、唾液を PBS(-)とした control と比較したところ、60%v/v EtOH で反応 20 秒後でのみ感染価減衰にバラツキが認められたものの、それ以上の反応時間では速やかに検出限界(0.42log<sub>10</sub>)以下となった(図 4a、4b)。NaClO (図 5a、5b) と BZC (図 6a、6b) では反応 20 秒後に速やかに検出限界(NaClO : 0.42log<sub>10</sub>、BZC : 1.27log<sub>10</sub>)以下となり、control との差異も認められなかった(図 6a、6b、6c)。nCoV 唾液における感染価減衰率は初発ウイルス力価が低下した BZC で 99.8%以上/20 秒、NaClO で 99.996%以上/20 秒、EtOH では 99.999%以上/40 秒となった。

図 4a. 60%v/v EtOH による nCoV 唾液の感染価減衰

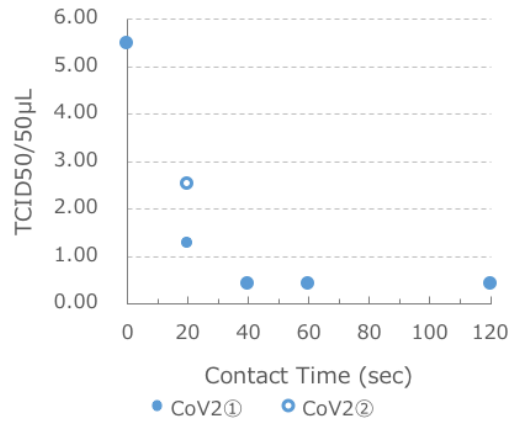


図 4b. 60%v/v EtOH による nCoV 含有 PBS(-) の感染価減衰(control)

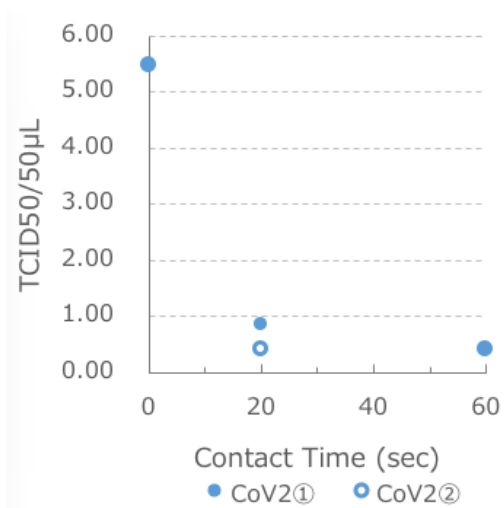


図 5a. 60%v/v EtOH による nCoV 唾液の感染価減衰

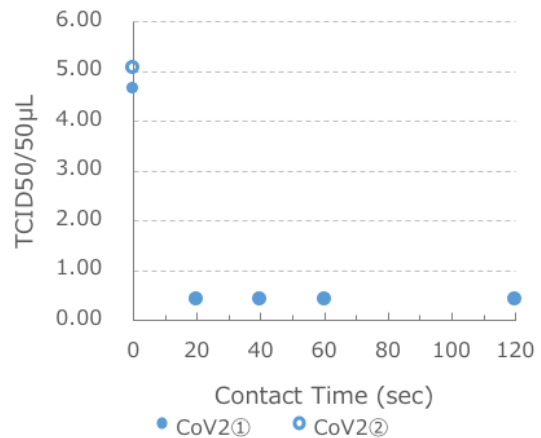


図 5b. 60%v/v EtOH による nCoV 含有 PBS(-) の感染価減衰(control)

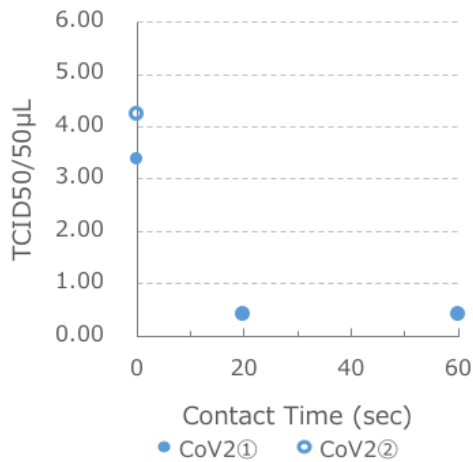


図 6a. 0.05% BZC による nCoV 唾液の感染価減衰

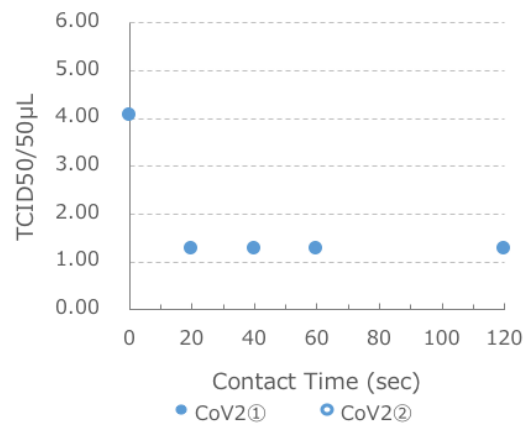
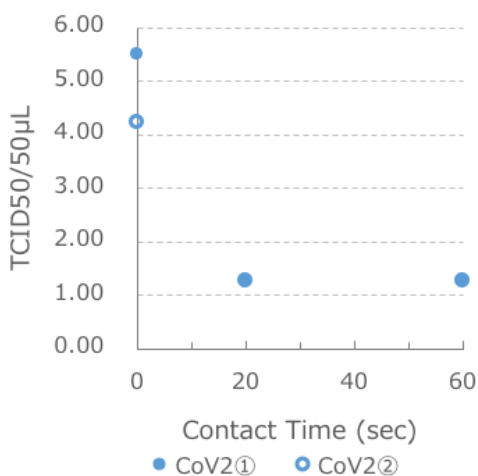


図 6b. 0.05% BZC による nCoV 含有 PBS(-) の感染価減衰(control)



#### D. 考察

(1)CPC の nCoV 不活性化効果については、大学や受託試験機関からの報告が散見されるが、いずれも口腔ケアや咽頭消毒に用いられる濃度の 5 倍から 10 倍程度の濃度によるものがほとんどであった。今回より実効性の高い手法として検証したところ、即応性はないものの一定の不活性化効果が認められている。医療従事者や介護従事者、また家庭内でのケアなど、コンタクトリスクの高い状況下で対応にあたる方々にとっては、一定の頻度での口腔すすぎや CPC 含有薬用トローチの活用などでリスク低減につながる可能性が考えられる。

(2)紫外線による不活性化についても、様々な報告が散見されるが、照射条件が明確でないケースや特定のデバイスによる広告的な報告も少なくない。また今回  $\alpha$  CoV と  $\beta$  CoV とで感受性に大きな差異があることも確認されており、当該手法による消毒などに当たる場合は、紫外線強度管理や対象物資の特性などを踏まえ、かつ、これからも出現するであろう変異株での感受性についてなど、バリデーションに必要なバックグラウンドデータの蓄積が必要と考える。

(3)nCoV 唾液の化学的不活性化については、血清や培地でみられるクエンチング成分などの影響は認められず、反応後速やかに不活性化されることが示された。エタノール製剤でのふき取りが困難なアクリル板(頻回で曇りが生じる)などの除染については、製剤の選択肢が増えたといってもよいであろう。NaClO については培養上清を試料とした不活性化検討の結果よりも、低濃度で速やかに感染価減衰することが確認されたが、飲食業などでの除染では食品由来有機物も考慮し、複数回の

清拭での対応が望ましい。また BZC などは消臭剤にも含有されていることが多く、構造的にも安定なため、事前塗布によるコーティングでの感染価減衰およびリスク低減が期待できるかもしれない。

#### E. 結論

今回検証した新たな製剤として、CPC は医療・介護従事者や家庭内における感染制御の一助になる可能性が示唆された。また紫外線 UV-C については nCoV での高い感受性が認められたものの、使用時のバリデーションにおける継続的なデータ収集の必要性が考えられた。そしてヒト唾液中の nCoV については、従来使用されている基本的な消毒剤で速やかに不活性化されることが確認できた。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし