

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とインフルエンザウイルスに有効な消毒法に関する研究

研究分担者 伊木 繁雄 国立感染症研究所安全実験管理部主任研究官
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
研究協力者 牛村 英里 国立感染症研究所安全実験管理部技術補助員

研究要旨

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に対する消毒効果が報告されている市販の化学物質 (加速化過酸化水素を含む市販の除菌剤 3 種類及び界面活性剤 4 種類 : 0.1% 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、0.0125%ヘキサデシルピリジニウムクロリド、0.05%塩化ベンゼトニウム及び 0.05%ドミフェン臭化物) について、加速化過酸化水素についてはメーカー推奨濃度で、界面活性剤については SARS-CoV-2 の不活化に有効とされる濃度において季節性インフルエンザウイルス (A/H1N1 型、A/H3N2 型及び B 型) に対する不活化効果を検討したところ、加速化過酸化水素を含む除菌剤 3 剤及び 0.1%直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムの 4 剤については 3 種類の季節性インフルエンザウイルスに対し十分な不活化効果も備えている可能性を見出した。また、同一の薬剤・濃度であってもウイルスの型・亜型により有効性が異なることが確認された。

A. 研究目的

インフルエンザはわが国では毎年冬季に流行し、高齢者では肺炎による死亡例も多い。今後、冬季における COVID-19 とインフルエンザの混合流行が懸念されているが、医療現場はもとより介護施設や学校、飲食店、商業施設など人が多く集まる場所のほか、一般家庭においても継続的に消毒の徹底が図られることは言うまでもない。同一空間に COVID-19 とインフルエンザ両方の患者が共存する場面も増えることが見込まれることから、いずれのウイルスに対しても有効な消毒薬の需要が高まることが予想される。現在、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) への有効性を謳った多くの薬剤が紹介されている。しかし、薬剤の種類は非常に多く複雑

であるため、適切な手順を把握していなければ消毒効果が期待できなくなるばかりでなく、ケミカルハザードの原因ともなり得る。

本研究では、SARS-CoV-2 とインフルエンザウイルスの両方に対し同時に効果を発揮できる消毒薬の種類・濃度・時間について検証し、正確な情報を普及させることを目的とした。

B. 研究方法

加速化過酸化水素には、A: オキシヴィルファイブ (C×S (株)、有効濃度 4.25%)、B: オキシヴィル Tb (C×S (株)、有効濃度 0.5%) 及び C: オキシライト PRO ((株) カイコー

ポレーション、有効濃度 0.5%) を用いた。これらはいずれも製品使用時のメーカー推奨濃度である。また A については、濃度を他の 2 剤に合わせ 0.5% となるよう希釈した溶液も用いて比較した。

界面活性剤には、D: 0.1%直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬) ①、E: 0.0125%ヘキサデシルピリジニウムクロリド (富士フィルム和光純薬) ②、F: 0.05%塩化ベンゼトニウム (富士フィルム和光純薬) ①及び G: 0.05%ドミフェン臭化物 (SIGMA) を用いた。これらについては、粉末試薬を各濃度になるよう超純水にて調製し、これを基準濃度とした。なお、各薬剤について 5 倍濃度の溶液も同様に調製して有効性を比較した。

各薬剤と $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$ /mL TCID₅₀ のインフルエンザウイルス (AH1 型(A/New Caledonia/20/99(H1N1))、AH3 型(A/Panama/2007/99(H3N2))または B 型(B/Shangdong/7/97)) を 80 μ L ずつ混合し、室温にて一定時間 (A は 3 分以上、B 及び C は 1 分以上、D 及び F は 1 分、E は 5 分) 放置後、界面活性剤 4 種については 160mg のバイオビーズ SM-2 (Bio-Rad) にて 5 分間処理して界面活性剤を除去した。ウイルスと薬剤の混合液はその後直ちに PBS(-) にて 10 倍階段希釈し、96 well プレート上の MDCK 細胞に 20 μ L / well 接種後、37°C で 30 分間吸着させた。吸着後は混合液を取り除き、100 μ L / well の PBS(-) にて 2 回洗浄し、0.05%アセチルトリプシンを含む E-MEM (ウイルス増殖培地) にて 4~6 日間培養した。陽性コントロール (PC) については、ウイルス液を薬剤と混合する際 2 倍に希釈されることから、希釈倍数 10^0 の well

に接種されるウイルス濃度が原液の 1/2 となるよう PBS(-) にて調製した。各々 1 希釈倍数につき 4 well 使用した。

薬剤のインフルエンザウイルス不活化効果については、まず毒性の有無を目視にて判定した。なお、毒性の程度と毒性を呈する際の細胞の形状については、同濃度の薬剤のみで細胞を処理した場合と比較し判定した。続いて上清を除去後 100 μ L / well の PBS(-) にて 2 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液にて細胞を固定した。プレートに残った細胞をメチレンブルーにて染色し、以下の式から TCID₅₀ を求め、1mL あたりの単位に換算した。PC についても同様に TCID₅₀ を算出した。

$$\text{TCID}_{50} = (1 \text{ 列目の希釈倍率}) \times (\text{希釈倍率})^{\Sigma-0.5}$$

Σ =各希釈段階における(変性 50%以上の well 数)/(検体数)の総和

各薬剤の有効性については、以下の式より算出した。

$$\text{有効性} = (\text{ウイルス力価}) / (\text{薬剤処理した際の TCID}_{50} \text{ (または細胞毒性)})$$

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

加速化過酸化水素は細胞毒性が強く、A では希釈倍数 2×10^3 まで、B 及び C では 2×10^2 まで毒性が見られた。この毒性はウイルスの細胞吸着に必要な 30 分間の接触に対する結果であるが、7 日間接触させた場合も結果は変わらなかった。A の濃度を 0.5% となるよう希釈すると、毒性は 2×10^2 に低下した。加速化過酸化水素を含む各薬剤は界面活性剤を含むが、界面活性剤除去

剤で処理しても毒性に変化は見られなかった。この結果から、加速化過酸化水素に含まれる界面活性剤の毒性はわずかであり、観察された毒性のほとんどは加速化過酸化水素によるものと判断した。このため加速化過酸化水素の SM-2 処理は行わず、細胞接種終了後混合液を除去するまで薬剤効果が持続している可能性がある。したがって、A～C の処理時間は所定の時間以上という表記とした。

メーカー推奨濃度における加速化過酸化水素のインフルエンザウイルス不活化効果を表 1a に示す。毒性が見られなかった well にはいずれも CPE は観察されなかった。有効濃度が最も高い薬剤 A のみ 10^2 以上の不活化効果であったが、薬剤 B 及び C では 10^3 以上の不活化効果が見られた。ただし薬剤 A も薬剤 B 及び C と同じ 0.5% に希釈すると細胞毒性が弱くなり、 10^3 TCID₅₀ 以上の不活化効果が見られた。これらの結果から、濃度 0.5% 以下においてインフルエンザウイルス A/H1N1 型、A/H3N2 型及び B 型に対し少なくとも 10^3 TCID₅₀ 以上の不活化効果があることが明らかとなった。

界面活性剤 4 種については、界面活性剤除去剤で処理しなかった場合は加速化過酸化水素同様 30 分処理でいずれも希釈倍数 2×10^2 まで毒性が見られたが、界面活性剤除去剤での処理により細胞毒性は検出されなくなった。

なお、D～F については SARS-CoV-2 の不活化に有効な濃度が報告されているためこれを基準濃度としたが、G についての報告はない。ドミフェン臭化物はトローチに含まれる成分であり、1錠あたり 0.5mg 程度含まれている。一方、1分間あたりの安静

時唾液分泌量については、一般に成人で 0.3mL、小児で 0.7mL 程度³⁻⁴⁾であるが、トローチ溶解までの時間を 3 分程度と仮定し、この間分泌される唾液量を 1mL 程度として $0.5\text{mg}/1\text{mL}=0.05\%$ を基準濃度とした。

基準濃度におけるインフルエンザウイルス不活化効果の結果を表 1b に示す。E、F、G で $1 \times 10^0 \sim 2 \times 10^2$ TCID₅₀ の不活化効果であったのに対し、D では A/H1N1 型及び B 型に対し 3×10^6 TCID₅₀ の不活化効果が見られた。ただし D であっても A/H3N2 型に対しては 6×10^3 TCID₅₀ の不活化効果に留まった。

基準濃度の 5 倍濃度では、D では基準濃度に比べ A/H1N1 型及び B 型に対する不活化効果の上昇が見られず、A/H3N2 型に対しても 10^1 TCID₅₀ 程度の上昇に留まった。一方 E、F、G では、B 型ウイルスに対し基準濃度に比べ 10^2 TCID₅₀ 以上の上昇をもたらした。F では 1×10^3 、G では 1×10^4 の不活化効果をもたらした。ただし A/H1N1 型ウイルスに対しては 10^2 TCID₅₀ 以下の上昇に留まり、G で 1×10^3 の不活化効果が見られたのみであった。

D. 考察

今回用いた界面活性剤のうち、基準濃度以上の濃度であればインフルエンザウイルス A/H1N1 型及び B 型ウイルスに対し 10^5 TCID₅₀ 以上の、A/H3N2 型ウイルスに対しては 10^3 TCID₅₀ 以上の不活化効果をもたらすことが明らかとなった。ただし、この薬剤は濃度を 5 倍に上げても有効性が大きく上昇することがなかったことから、有効性の限界があるのかも知れない。一方 E、F、G については、基準濃度でのインフルエンザ

ウイルス不活化効果は D に比べ低かったが、5 倍濃度では F で B 型ウイルスに対し、G において A/H1N1 型及び B 型ウイルスに対し 10^3 TCID₅₀ 以上の不活化効果をもたらすことが明らかとなった。また今回検証した界面活性剤はいずれも、インフルエンザウイルスの型・亜型により有効性が異なり、特に A/H3N2 型ウイルスに対しては有効性が低くなる傾向が見られた。

E. 結論

本研究により、SARS-CoV-2 に対し消毒効果が見いだされる薬剤のうち、A、B、C 及び D の 4 剤については季節性インフルエンザウイルスに対する有効性も備えており、さらに F 及び G についてもインフルエンザウイルス A/H1N1 型または B 型であれば SARS-CoV-2 と同時に対応できる可能性を見出だした。本研究結果は、「感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き」の改訂において有益な情報となるものと考えられる。

参考文献：

1) 独立行政法人製品評価技術基盤機構. 新型コロナウイルスに有効な界面活性剤を公表します (第二弾) .

<https://www.meti.go.jp/press/2020/05/20200529005/20200529005.html>.

2) 大正製薬(株), 熊本大学. セチルピリジニウム塩化物水和物 (CPC) の新型コロナウイルス不活化作用を確認

<https://www.kumamoto-u.ac.jp/daigakujouhou/kouhou/pressrelease/2021-file/rerease211025.pdf>.

3) 中村昭博ら. 口腔内の異なった部位における唾液 pH の長時間モニタリング. 明海

歯科医学. 2020; 49(1): 15-22.

4) 工藤典代ら. 小児の安静時唾液分泌量の検討. 小児耳鼻咽喉科. 2014; 35(1): 17-20.

F. 研究発表

Iki S, Sekiguchi K, Kurata Y, Shimizu E, Sugiura A, Yuasa H, Hanaki KI. Effects of various physical and chemical disinfection methods on the fine particle collection efficiency of N95 respirators and surgical masks. Jpn J Infect Dis. 2021. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2021.663

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 加速化過酸化水素及び界面活性剤のインフルエンザウイルスに対する不活化効果

a) 加速化過酸化水素

型	薬剤の有効性*				ウイルス 力価 (TCID ₅₀ /mL)
	A(4.25%) **	A(0.5%) ***	B****	C****	
A/H1N1	≥1×10 ²	≥1×10 ³	≥1×10 ³	≥1×10 ³	1×10 ⁸
A/H3N2	≥6×10 ²	≥6×10 ³	≥6×10 ³	≥6×10 ³	7×10 ⁸
B	≥2×10 ²	≥2×10 ³	≥2×10 ³	≥2×10 ³	2×10 ⁸

b) 界面活性剤（基準濃度）

型	薬剤の有効性*				ウイルス 力価 (TCID ₅₀ /mL)
	D	E	F	G	
A/H1N1	3×10 ⁶	3×10 ⁰	2×10 ⁰	3×10 ¹	2×10 ⁹
A/H3N2	6×10 ³	2×10 ¹	2×10 ¹	3×10 ¹	2×10 ⁸
B	3×10 ⁶	1×10 ⁰	6×10 ⁰	2×10 ²	7×10 ⁸

c) 界面活性剤（5倍濃度）

型	薬剤の有効性*				ウイルス 力価 (TCID ₅₀ /mL)
	D	E	F	G	
A/H1N1	6×10 ⁵	6×10 ¹	2×10 ²	1×10 ³	7×10 ⁸
A/H3N2	6×10 ⁴	1×10 ¹	6×10 ¹	1×10 ²	2×10 ⁹
B	6×10 ⁵	2×10 ²	1×10 ³	1×10 ⁴	1×10 ⁹

細胞毒性が現れた場合で CPE が観察されなかったケースについては、細胞毒性が見られた希釈倍数を TCID₅₀ の式に当てはめ薬剤の有効性*を算出し、不等号を用いた表記とした。

* (ウイルス力価) / (薬剤処理した際の TCID₅₀ (または細胞毒性)) より算出した。

***希釈倍数 10³ (1 well あたりのウイルス量 10²~10⁵/mL) まで細胞毒性あり。

****希釈倍数 10² (1 well あたりのウイルス量 10²~10⁴/mL) まで細胞毒性あり。

