

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）
（総括）研究報告書

感染症法に基づく消毒・滅菌の手引きの改訂に関する研究

研究代表者 花木 賢一 国立感染症研究所安全実験管理部長

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の国内流行により、消毒薬や個人防護具（PPE）、特にマスクの供給不足が社会問題となった。独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）は雑品から新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に汚染されたモノの消毒に有効な物資を選定して公表したが、それらは一般国民向けを想定したもので、医療現場や介護施設向けではなかった。そこで、医療現場や介護施設で参照される「COVID-19の消毒・滅菌の手引き」の策定、さらに「感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き」の改訂を行うことを目的として研究を実施した。そして、ウイルスの不活化が粒子破壊による場合には有効性評価に動的光散乱法（DLS）解析が応用できること、塩素系消毒薬はウイルス液に含まれるアミノ酸の影響を受けて有効性が過小評価されていたこと、クエン酸がSARS-CoV-2の消毒剤として有効な物資となること、第四級アンモニウム塩の一つで口腔用薬の主成分であるドミフェンブロミドが塩化ベンザルコニウムと同等の有効性があること、空気中のウイルスの不活化に用いるオゾンガス、二酸化塩素ガス、および次亜塩素酸ガスの使用条件、PPEの消毒に用いる過酸化水素ガスの条件、環境中のSARS-CoV-2の生残性は夏季に短いこと等を明らかにした。

研究分担者

森川茂・岡山理科大学獣医学部教授
西村秀一・国立病院機構仙台医療センター臨床研究部ウイルス疾患研究室長
早坂大輔・国立大学法人山口大学共同獣医学部教授
黒崎陽平・国立大学法人長崎大学高度感染症研究センター准教授
河合康洋・国立感染症研究所安全実験管理部第一室長
高木弘隆・国立感染症研究所安全実験管理部主任研究官
伊木繁雄・国立感染症研究所安全実験管理部主任研究官
原田俊彦・国立感染症研究所安全実験管理部主任研究官

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、令和3年2月より新型インフルエンザ等感染症へ変更されている。その間、感染状況の沈静化、変異株出現と流行株置換による感染再拡大がみられ、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機器、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 へは重症急性呼吸器症候群 (SARS)・中東呼吸器症候群 (MERS) の記載が準用されている。しかし、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 の流行により消毒薬の需要が高まり、その供給不足が社会問題となった。そこで、NITE は雑品から SARS-CoV-2 に汚染されたモノの消毒に有効な物資を選定して令和 2 年 6 月に公表した。同様の物資の公表は海外でも行われている。しかし、未検証の物資が多く残されており、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 PPE 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③COVID-19 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等の需給逼迫を省み、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。

B. 研究方法

1. ウイルスと細胞

本研究で用いたウイルスは SARS-CoV-2 (NIID 512, WK-521, QK002, TY8-612)、ヒトコロナウイルス (229E, OC43)、マウスコロナウイルス (MHV; JHM, NuA, F-

2D, S)、ネココロナウイルス、ブタ伝染性胃腸炎 (TGE) ウイルス、インフルエンザウイルス (A/H1N1, A/H3N2, B)、重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルス、コクサッキーウイルス、エンテロウイルス、ネコカリシウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、トフラウイルスである。そして、SARS-CoV-2 は TMRPSS2 発現 Vero E6 (VeroE6/TMRPSS2) 細胞、229E ウイルスはアカゲザル腎臓細胞由来 LLC-MK2 細胞、OC43 ウイルスはヒト直腸腺癌由来 HRT-18 細胞、マウスコロナウイルスはマウス脳腫瘍由来 DBT 細胞、ネココロナウイルスはネコ単核球由来 fcwf-4 細胞、インフルエンザウイルスはイヌ腎臓尿管上皮細胞由来 MDCK 細胞で培養する等、それぞれのウイルスの培養に最適な培養細胞を用いて増殖させて実験に供した。また、ウイルス感染価は 50% 組織培養細胞感染率 (TCID₅₀)、プラーク形成単位 (PFU)、またはフォーカス形成単位 (FFU) により算定した。

2. 薬剤等

SARS-CoV-2 の不活化試験に用いた薬剤等は、次亜塩素酸水、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム (SDIC)、塩化ベンザルコニウム (BZC)、塩化セチルピリジニウム (CPC)、エタノール (EtOH)、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO)、有機酸 (クエン酸、酢酸、シュウ酸、リンゴ酸、酒石酸、グルコン酸)、石鹼である。

SARS-CoV-2 以外のウイルス不活化試験に用いた薬剤等は、オゾンガス、二酸化塩素

ガス、次亜塩素酸ガス、BZC、塩化ベンゼトニウム (BZN)、CPC、ドミフェンブロミド (DB)、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、加速化過酸化水素 (AHP)、過酸化水素である。

3. 紫外線

光源には 222nm LED ランプ、254nm 水銀ランプ、254nm LED ランプ、UV-C (260nm) ランプ、265nm LED ランプ、275nm LED ランプ、280nm 水銀ランプを用いた。

4. DLS 解析

DLS 解析は粒子径・ゼータ電位測定装置 Zetasizer Ultra (Malvern) により実施した。試料合計 1ml を 12mm 角ポリスチレンセルに入れてストッパーで密封し、セルホルダーにセットした後に多角度動的光散乱法により測定した。候補物資のスクリーニングでは、セルに 0.9ml の 0.3% BSA 加ウイルス液 (ウイルス液 : 3% BSA : PBS = 0.05ml : 0.1ml : 0.75ml) を入れ、DLS 解析を行う直前に 0.1ml の候補物資溶液を加えて軽くピペティングし、1 分間静置した後に測定した。

5. 消毒ガス

25 m³の密閉空間中に低濃度の二酸化塩素ガス、オゾンガスまたは次亜塩素酸ガスを発生させ、ネブライザーでウイルスのエアロゾルを発生させて一定時間経過後、空中浮遊ウイルスをゼラチン膜フィルター上に回収し、環境表面並びに空中から回収されたウイルスの感染価を測定した。なお、ウイルスにはインフルエンザウイルス、229E ウイルス、OC43 ウイルスを用いた。

6. 過酸化水素蒸気

N95 マスク等の PPE を再利用するための消毒方法として、ミストジェネレーター、密閉容器、過酸化水素濃度を測定するためのセンサーモジュール、エアーポンプから成るミスト発生除染装置を製作し、チャンバー内に静置した N95 または DS2 規格のマスクを種々の濃度の過酸化水素水を用いてミストを発生させて任意の時間暴露し、強制換気後にそれぞれのマスクにおける残留過酸化水素を過酸化水素簡易測定器により測定した。また、チャンバー内にはバイオリジカルインジケータとケミカルインジケータを設置し、除染効果の判定に用いた。

7. 環境表面のウイルス感染価

環境中のウイルス感染価の推移は、プラスチック、ステンレス、木材等の基板にウイルス液を接種し、温湿度統御下または非統御下で一定時間静置した。ウイルスは培地に再溶解させて回収し、感染価を測定した。

8. 文献調査

「感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き」に記載されている物資を整理し、それ以外のもので国内にて利用可能な物資の探索、WHO をはじめとする海外機関が公開する実験室バイオセーフティ指針に記載されている消毒・滅菌法に関する情報収集、高病原性ウイルスを対象とした消毒・滅菌法に関する学術論文からの情報収集を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は人を対象とする医学系研究、遺伝子治療等臨床研究に該当せず、ヒトゲノム・遺伝子解析、動物実験を含まない。そのため、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

1. 塩素系消毒薬評価における溶媒の影響

令和2年に次亜塩素酸水の SARS-CoV-2 の消毒効果について NITE や大学等研究機関が検証実験を行って公表した。しかし、実施機関毎に実験条件が異なるために有効性の結果にばらつきがみられた。その原因として、次亜塩素酸水の有効塩素濃度はウイルス液と混合させる前に確認するのみで、ウイルス液と混合させた後の有効塩素濃度について確認していないこと、ウイルス液に有効塩素濃度を下げる物質の存在が考えられた。そこで、SARS-CoV-2 の培養で用いる培地 (DMEM) を蒸留水で 100 倍希釈したもの 20 mL と 1,000 ppm の次亜塩素酸ナトリウム 0.2 mL を混合すると、有効塩素濃度は理論値の 1/70 に止まった。そこで、Sephadex G25 カラムを用いた限外濾過法によりウイルス液の溶媒である DMEM を生理食塩水へ置換してウイルス液：次亜塩素酸水=1：19 で 1 分間処理すると、有効塩素濃度 5 ppm であっても SARS-CoV-2 の感染価は検出限界未満になった。

2. SDIC

SDIC もまた NITE が SARS-CoV-2 の消毒効果について検証実験を行っているが、感染価測定で培養細胞を用いることからシアヌル酸の細胞毒性が問題であった。そこで、シアヌル酸を除去するための吸着レジンを検討し、最適なレジンを採用した試験系により SDIC は NaClO と同等以上の SARS-CoV-2 の不活性化効果を発揮することが明らかになった。

3. 有機酸

NITE の検証実験において、SARS-CoV-2 が酸性の次亜塩素酸水により効果的に不活化されることが示され、SARS-CoV-2 の不活性化に酸性条件が相乗効果をもたらしていると考えられた。そこで、雑貨として入手可能な有機酸による SARS-CoV-2 の不活化効果を検討した。クエン酸、リンゴ酸、酒石酸、グルコン酸において、グルコン酸の不活化効果はわずかであったが、他の有機酸は十分な不活化効果を認め、クエン酸では 100 mM 以上で 60 秒以内に 4 桁以上の感染価減衰が確認された。また、酢酸、クエン酸、シュウ酸について、pH を 2, 4, 6 に調整して SARS-CoV-2 の不活化効果を検討した。その結果、シュウ酸は pH2 でわずかな不活化効果を認めたが、酢酸は pH2 と pH4、クエン酸では pH2 で検出限界以下まで SARS-CoV-2 の不活化効果が確認された。

4. 紫外線

紫外線では従来の 254nm 水銀ランプと同様の SARS-CoV-2 不活化効果を 265nm 深紫外線 LED ランプで認めた。なお、OC43 ウイルスでは 254nm よりも 275nm の波長の紫外線で有意に高いウイルス不活化効果が認められたこと、β コロナウイルス属 (SARS-CoV-2) は α コロナウイルス属 (TGEV) よりも UV-C に対して非常に感受性が高いことが明らかになった。

5. DLS 解析による薬剤等スクリーニング

SARS-CoV-2 の代用として MHV に対する第四級アンモニウム塩 (QAC) の有効性を 0.3% ウシ血清アルブミン存在下で 1 分間反応させて DLS 解析により評価した。QAC

は 0.5%溶液の 2 倍希釈液を調製して用いた。その結果、0.0625%以上の BZC、BZN、及び DB は有効であったが、CPC は 0.5%でも無効であった。QAC 以外では 1/10 容 (0.425%) AHP は有効であったが、1.5%過酸化水素水、0.5%直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムは無効であった。

6. 空中浮遊ウイルスの不活化

空中に浮遊するインフルエンザウイルス、229E ウイルス並びに OC43 ウイルスの何れも感染力の維持に湿度依存性があることを確認された。そして、空中浮遊インフルエンザウイルスと OC43 ウイルスは低濃度オゾンで湿度依存的に感染力が低下すること、低濃度二酸化塩素については比較的高い湿度が必要で、湿度依存的に感染力が低下することを確認した。一方、低濃度次亜塩素酸ガスは湿度非依存性で空中に浮遊するウイルスの感染力が低下することを確認した。

7. 過酸化水素蒸気

PPE、特に N95 または DS2 マスクを再利用するための安価な装置を試作し、過酸化水素蒸気の有効性と実用性を検討した。装置の仕組みはミスト発生装置で過酸化水素蒸気を発生させ、密閉容器内の過酸化水素濃度は蒸気供給源である過酸化水素水の濃度で制御する。ウイルスが不活化できるまでの時間、密閉容器内の過酸化水素濃度を一定に保ち、その後は強制換気により PPE に残留する過酸化水素を除去するというものである。そして、バイオリジカルインジケータとケミカルインジケータを指標として、7.5%の過酸化水素水では 30 分以上、30%の過酸化水素水では 15 分以上過酸化

水素蒸気に暴露することで除染効果が得られること。N95 または DS2 マスクへの残留過酸化水素は 48 時間の強制換気後に 1 ppm 以下となることが明らかになった。

8. 環境中の SARS-CoV-2 の生残性

環境中または物品に付着した SARS-CoV-2 への対策を検討するため、SARS-CoV-2 を様々な素材に接種してその生残性を経時的に評価した。ポリスチレン上にウイルス液を接種して乾燥させたものを 20°C・相対湿度 40% (春・秋季または標準的室内環境モデル) と 30°C・相対湿度 80% (夏季モデル) に放置して感染価の推移を評価すると、24 時間後に春・秋季モデルでは 1/10、夏季モデルでは 1/1,000 へ低下と温湿度条件により顕著な差違を認めた。

9. 文献調査

「感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き」の改訂に向けた情報収集は、令和 2 年 12 月に WHO 実験室バイオセーフティマニュアル(第 4 版)が改訂されたことが大きな情報であった。また、国内で入手可能な物資の検索では、クルーズ船ダイヤモンドプリンセス号の消毒で利用された AHP、有機物存在下において NaClO よりも消毒効果の減衰が小さい有機物等異物の影響を受けにくいとされる亜塩素酸水等が候補として見出された。

D. 考察

令和 2 年のアルコール製剤をはじめとする消毒薬の供給不足により、その代替として最も注目を集めた物資が次亜塩素酸水である。食品添加物として認可されている次

亜塩素酸水は電気分解により生成したものであるが、NaClO 液に希塩酸等を混合して生成したのも市中に流通した。その結果、一般家庭へ短期間に普及利用されることになり、NITE や大学等研究機関が SARS-CoV-2 の消毒効果について検証実験を行って公表した。しかし、実施機関毎に実験条件が異なるため、有効性の結果にばらつきがみられた。その原因として、次亜塩素酸水の有効塩素濃度はウイルス液と混合させる前に確認するのみで、ウイルス液と混合させた後の有効塩素濃度について確認しておらず、ウイルス液に有効塩素濃度を下げる物質の存在が疑われた。そこで、ウイルス液の溶媒である DMEM を生理食塩水へ置換して評価を行うと、有効塩素濃度 5 ppm であっても SARS-CoV-2 の感染価は検出限界未満になった。そのため、次亜塩素酸水や NaClO による SARS-CoV-2 の消毒では、公表されているよりも低濃度で十分な不活化効果が得られると考えられた。なお、SARS-CoV-2 は唾液に含まれており、感染者の唾液飛沫と共に排泄される。そこで、市販のプール唾液に SARS-CoV-2 をスパイクして NaClO 等の有効性を検証したが、唾液成分による影響は認められなかった。

SDIC は NaClO と同等以上の SARS-CoV-2 の不活性化効果を発揮することが確認された。SDIC の剤型は固形で要時調製が可能であり、液体である NaClO に比べて可搬性と保存性において遙かに優れている。そのため、SDIC は災害対策等の備蓄において最適な消毒用物資と考えられた。

評価した有機酸の内、クエン酸は純品が

家庭用洗浄剤として市販されているために入手が容易で、洗浄に用いられる濃度未満で SARS-CoV-2 を不活化できること、無臭であることから、一般人でも安全に取り扱うことができる SARS-CoV-2 の消毒剤として推奨できる物資と考えられる。

紫外線による殺ウイルス効果は、単波長の LED ランプが多波長の水銀ランプと同等であることが確認された。そして、LED ランプは水銀ランプに比べて寿命が長いことから、今後、紫外線光源は LED ランプへ置換されることが予想される。なお、対象微生物によって効果の高い波長が異なることが確認されたため、感受性を考慮した波長の選択と紫外線強度管理が必要と考えられる。

DLS 解析は溶液中における粒子の運動速度を計測し、そのデータから各種の数値計算を利用して大きさに換算するというものであり、消毒薬等によりウイルス粒子が破壊されることで粒径が変化し、その変化を捉えることで SARS-CoV-2 の不活化に有効な薬剤と処理条件を感染価測定に依らずに評価できると考えた。その期待通りに BZC と BZN は NITE が SARS-CoV-2 の不活化に有効とした濃度 0.05% 以上と近似する結果 (0.065% 以上) が SARS-CoV-2 と同じ β コロナウイルス属の MHV で得られた。また、口腔殺菌消毒剤の成分である QAC において、0.065% の DB は BZC、BZN と同等に有効であったが、CPC は 0.5% の高濃度でも反応 1 分でウイルス粒子すべてを破壊することはできなかった。DB がコロナウイルスに有効であることを示したのは本研究

が初めてであり、感染者や医療従事者が市販の DB トローチを摂取することで、感染拡大阻止、感染予防に寄与することが期待される。

QAC について、季節性インフルエンザウイルス (A/H1N1、A/H3N2 及び B) に対する不活化効果を感染価測定により検討した。十分な不活化効果が確認されたが、同一の薬剤・濃度であって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 に対しては有効性が低くなる傾向がみられた。

空中に浮遊するインフルエンザウイルスとコロナウイルスは低濃度オゾンでは湿度依存的に、低濃度二酸化塩素では比較的高い湿度で湿度依存的に、低濃度次亜塩素酸ガスでは湿度非依存的に不活化できることが明らかになった。WHO や厚生労働省は空気中のウイルス対策として有人環境での消毒薬等の空間噴霧は推奨していないが、無人の空間で低濃度のオゾン、二酸化塩素、次亜塩素酸ガスにより空間消毒を行うことは積極的ウイルス対策として有効と考える。

過酸化水素蒸気による N95、DS2 マスクの消毒は、比較的簡単な構造のミスト発生装置により 7.5%の過酸化水素水を蒸気発生源とした場合には 30 分以上、30%の過酸化水素水を蒸気発生源とした場合には 15 分以上、蒸気に暴露することで除染効果が得られること、48 時間の強制換気後により残留過酸化水素は 1 ppm 以下になることが確認された。製作したミスト発生装置は小型のためにマスクのような小物の PPE の消毒に限定されるが、密閉容器を大型化する

ことで、つなぎ等の大物の PPE の消毒に応用可能と考える。

環境中の SARS-CoV-2 の生残性は、20°C 相対湿度 40%と比較して 30°C/相対湿度 80%中では 100 倍程度早く不活化された。そして、48 時間で感染性は検出限界になることが明らかとなった。温湿度条件と比較すると株間に明らかな差異はなかったが、TY8-612 はやや安定性が高いように思われた。

諸外国の消毒剤に関する公表内容は、有効性が期待される成分や市販製品を広くリスト化するなど、一般消費者にとって身近な、具体的な情報であった。COVID-19 に限っては NITE が有効性の期待される市販製品をリスト化して公表したが、「感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き」の改訂に当たっては、諸外国の記述事例、情報提供の形態を参考にすることで利用者の範囲が広がることを期待される。

E. 結論

本研究ではウイルスの不活化が粒子破壊による場合には DLS 解析が応用できること、NaClO をはじめとする塩素系消毒薬はウイルス液に含まれる培地成分、アミノ酸に影響を受けて有効性を過小評価していたこと、クエン酸が SARS-CoV-2 の消毒に用いる物資となること、DB が BZC、BZN と同等のコロナウイルスに対する有効性が確認され、DB トローチが飛沫感染の防除へ活用されることが期待されること、空気中のウイルスの不活化に用いるオゾン、二酸化塩素、および次亜塩素酸ガスの使用条件、

PPEの消毒に用いる過酸化水素ガスの条件、環境中の SARS-CoV-2 の生残性は夏季に48時間以内と短いこと等を明らかにした。これらの知見並びに文献等調査結果を基に、感染症法に基づく消毒・滅菌の手引きの改訂のための案を提案したい。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shimoda H, Matsuda J, Iwasaki T, Hayasaka D*. Efficacy of 265-nm ultraviolet light in inactivating infectious SARS-CoV-2. *Journal of Photochem Photobiol.* 7: 100050, 2021.

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

Hasegawa G, Sakai W, Chiaki T, Tachibana S, Kakita A, Kato T, Nishimura H, Yamakage M. Investigation into the efficacy of a novel extubation-aerosol shield: a cough model study. *Infect Prev Pract.* 4:100193, 2022.

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

発明の名称 ウイルス不活化装置並びにウイルス不活化装置付き空気処理装置 共同開発者 ダイニチ工業株式会社 出願日 R2.12.1 出願

発明の名称 空気殺菌・ウイルス不活化装置 共同開発者 株式会社 AiDeal Tech 出願日 R3.1.12 出願 R3.7.12 国際特許出願 R3.11.12 国際特許 19 条補正

発明の名称 オゾン検知システム及びオゾン発生器 共同開発者 日本特殊陶業株式会社 出願日 R3.5.3 出願

発明の名称 加湿システム、オゾン発生器、及び加湿方法 共同開発者 日本特殊陶業株式会社 出願日 R3.5.3 出願

発明の名称 評価システム、オゾン発生器、加湿器、電子看板システム、及び情報提供システム 共同開発者 日本特殊陶業株式会社 R3.5.31 出願

発明の名称 空気殺菌・ウイルス不活性化装置 共同開発者 株式会社 AiDeal Tech R3.5.31 出願【発明 2 関連の新規出願】

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし