

新型コロナウイルスを用いた有効性 評価にかかる検証試験の計画①

検証試験において評価対象とする物資

令和2年4月30日

新型コロナウイルスに対する代替消毒方法の
有効性評価に関する検討委員会 事務局

インフルエンザウイルスを用いた検証試験における対象物資

インフルエンザウイルスを用いた検証試験において対象としたサンプルは以下のとおり

サンプル番号	界面活性剤の種類の名称を示す用語	界面活性剤の区分
界面活性剤①	純石けん分(脂肪酸カリウム)	陰イオン系界面活性剤
界面活性剤②	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム	
界面活性剤③	アルキルグリコシド	非イオン系界面活性剤
界面活性剤④	脂肪酸アルカノールアミド ¹⁾	
界面活性剤⑤	ポリオキシエチレンアルキルエーテル	
界面活性剤⑥	アルキルベタイン ¹⁾	両性イオン系界面活性剤
界面活性剤⑦	アルキルアミノオキシド	
界面活性剤⑧ 第4級アンモニウム塩①	塩化ベンザルコニウム ^{1,2)}	陽イオン系界面活性剤

1) インフルエンザウイルスに対して感染価対数減少値が3桁未満であったサンプル

2) 界面活性剤⑧は第4級アンモニウム塩でもある

サンプル番号	名称	電解質	pH**	有効塩素濃度** (ppm)
次亜塩素酸水①	強酸性電解水	食塩	2.7	50
次亜塩素酸水②	弱酸性電解水	食塩	3.5	42
次亜塩素酸水③	微酸性電解水	塩酸	5.83	30
次亜塩素酸水④	微酸性電解水	塩酸 + 食塩	5.35	40

**試験に提供されたサンプルの実測値

新型コロナウイルスを用いた検証試験において 評価対象とする物資の追加について

委員等から追加候補物資として提案があった物資のうち、新型コロナウイルスと同様のRNA型エンベロープウイルスに対する抗ウイルス効果に関する文献調査等において、新型コロナウイルスに対して有効である可能性があると考えられる物資を追加することとしてはどうか。

物資追加候補

● 委員提案物資のうち、文献調査等において有効である可能性があると考えられるもの

界面活性剤

・アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム（陰イオン界面活性剤）

第4級アンモニウム塩

・塩化ベンゼトニウム

・塩化ジアルキルジメチルアンモニウム

アルカリ系洗浄剤

・過炭酸ナトリウム

● 委員提案物資のうち、文献調査等において有効である可能性があるとは判断できなかったもの

炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、塩化アルキルトリメチルアンモニウム、電解次亜水、中性電解水

● その他、有効性を示す文献等が確認されていない物資（参考資料）

追加物資に関する文献調査結果

陰イオン系界面活性剤：アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム

- 2003年に国立感染症研究所が発出した「SARSに関する消毒（三訂版）」において、台所用合成洗剤がSARSコロナウイルスの処理に効果が高いことが実験的に確認されたとして、家庭などで使用する際の一般的な消毒薬として界面活性剤をぬるま湯に溶かしたもの（台所用合成洗剤として濃度0.5%以上）の使用が推奨されている。ここで、効果が確認されている家庭用合成洗剤は、成分として直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムもしくはアルキルエーテル硫酸エステルナトリウムを16%以上含むものとされている。
- この他にも、アルキルエーテル硫酸エステルナトリウムを含有する製品がエンベロープウイルスに対して効果があるとの報告があり、一般的に脂質二重膜や膜タンパクを変化させることによるとされている。
- 台所用洗剤の半数以上はアルキルエーテル硫酸エステルナトリウムが主基剤（製品中の界面活性剤で最も多い）として使用されている。

追加物資に関する文献調査結果

第4級アンモニウム塩：塩化ベンゼトニウム、塩化ジアルキルジメチルアンモニウム

- 第4級アンモニウム塩として塩化ベンザルコニウムと同様に代表的な成分として知られている塩化ベンゼトニウムにおいてもウイルスへの効果を示す論文がある。

塩化ベンゼトニウムのエンベロープウイルスに対する効果 Gyoby Kenkyu, 26, 195-200, 1991

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsfp1966/26/4/26_4_195/pdf

(参考情報) 塩化ベンゼトニウムに関してFDAは、消費者向け手指消毒薬に使用するためのFDAのOTC Drug Reviewに基づく評価の対象外であるという以前の決定を2019年に確定した。

- 塩化ジアルキルジメチルアンモニウムは動物用消毒薬として使用されており（0.005～0.02%濃度）、エンベロープ型ウイルスに対する効果についても報告されており、有効性が示唆される。

エンベロープウイルスに対する第4級アンモニウム塩の効果 J Vet Med Sci. (2000) 62: 85-92

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676896/>

(参考情報) 代表的化合物である塩化ジデシルジメチルアンモニウム及びこれを含有する製剤に対して、令和元年6月19日付で、0.4%を超えてを含有するものは劇物に指定された（0.4%以下を含有するものを除く）

追加物資に関する文献調査結果

過炭酸ナトリウム

- 過炭酸ナトリウムは、炭酸ナトリウムと過酸化水素が 2:3 のモル比で混合された付加化合物。法令上の名称は炭酸ナトリウム過酸化水素付加物。
- 粉末の酸素系漂白剤の主成分として、洗濯物やキッチン用品の漂白、除菌・消臭などの主基剤として使われている。広く流通しており、安価で、使用後は酸素、水、炭酸ナトリウムに分解し、環境への負荷が少ない。
- ノロウイルスの不活化を目的とした検証としてネコカリシウイルス（非エンベロープウイルス）を用いた試験で、有機物が存在しない状態では、1%過炭酸ナトリウム、40秒以上の反応で4log値以上のウイルス感染価の低減が見られると報告がある。

ノロウイルスの不活化条件に関する調査（国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部）平成19-21年度報告書
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/kanren/yobou/040204-1.html
- 令和2年4月17日付で発出された北里研究所からのプレスリリース（医薬部外品および雑貨の新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）不活化効果について）において、過炭酸ナトリウムを含有する製品がウイルス不活化効果を有する可能性が示された。

新型コロナウイルスを用いた検証試験における対象物資 界面活性剤

界面活性剤として以下の11サンプルを検証試験の対象としてはどうか。

サンプル番号	界面活性剤の種類の名称を示す用語	界面活性剤の区分
界面活性剤①	純石けん分(脂肪酸カリウム)	陰イオン系界面活性剤
界面活性剤②	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム	
界面活性剤③	アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム	
界面活性剤④	アルキルグリコシド	非イオン系界面活性剤
界面活性剤⑤	脂肪酸アルカノールアミド ¹⁾	
界面活性剤⑥	ポリオキシエチレンアルキルエーテル	
界面活性剤⑦	アルキルベタイン ¹⁾	両性イオン系界面活性剤
界面活性剤⑧	アルキルアミンオキシド	
界面活性剤⑨ 第4級アンモニウム塩①	塩化ベンザルコニウム ^{1,2)}	陽イオン系界面活性剤
界面活性剤⑩ 第4級アンモニウム塩②	塩化ベンゼトニウム ²⁾	
界面活性剤⑪ 第4級アンモニウム塩③	塩化ジアルキルジメチルアンモニウム ²⁾	

赤色は追加したサンプル

1) インフルエンザウイルスに対して感染価の低下が3桁未満であったサンプル。新型コロナウイルスに対する効果を検証するため試験対象に含めてはどうか

2) 界面活性剤⑨～⑪は第4級アンモニウム塩のカテゴリーでもある（第4級アンモニウム塩のページ参照）

新型コロナウイルスを用いた検証試験における対象物資 次亜塩素酸水（電気分解で生成したもの）

次亜塩素酸水（電気分解で生成したもの）として以下の4サンプルを検証試験の対象としてはどうか。

サンプル番号	名称	電解質	pH**	有効塩素濃度** (ppm)
次亜塩素酸水①	強酸性電解水	食塩	~2.7	20~60
次亜塩素酸水②	弱酸性電解水	食塩	2.7~5.0	10~60
次亜塩素酸水③	微酸性電解水	塩酸	5.0~6.5	10~80
次亜塩素酸水④	微酸性電解水	塩酸 + 食塩	5.0~6.5	10~80

**食品添加物（殺菌料）として指定されている範囲
（提供サンプルの実測値は別途測定予定）

新型コロナウイルスを用いた検証試験における対象物資

第4級アンモニウム塩

第4級アンモニウム塩として以下の3サンプルを検証試験の対象としてはどうか。

サンプル番号	界面活性剤の種類の名称を示す用語	界面活性剤の区分*
第4級アンモニウム塩① 界面活性剤⑨	塩化ベンザルコニウム ¹⁾	陽イオン系界面活性剤
第4級アンモニウム塩② 界面活性剤⑩	塩化ベンゼトニウム	
第4級アンモニウム塩③ 界面活性剤⑪	塩化ジアルキルジメチルアンモニウム	

赤色は追加したサンプル

1) インフルエンザウイルスに対して感染価の低下が3桁未満であったサンプル。新型コロナウイルスに対する効果を検証するため試験対象に含めてはどうか

* 第4級アンモニウム塩は陽イオン系界面活性剤の区分でもある（界面活性剤のページ参照）

新型コロナウイルスを用いた検証試験における対象物資 過炭酸ナトリウム

先述の3カテゴリーに加えて、酸素系漂白剤である過炭酸ナトリウムを検証試験の対象としてはどうか。

サンプル番号	物質名	カテゴリー
過炭酸ナトリウム①	過炭酸ナトリウム	酸素系漂白剤

赤色は追加したサンプル

新型コロナウイルスを用いた有効性 評価にかかる検証試験の計画②

新型コロナウイルスを用いた検証試験の Protokol

令和 2 年 4 月 30 日

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を用いた検証試験の概要

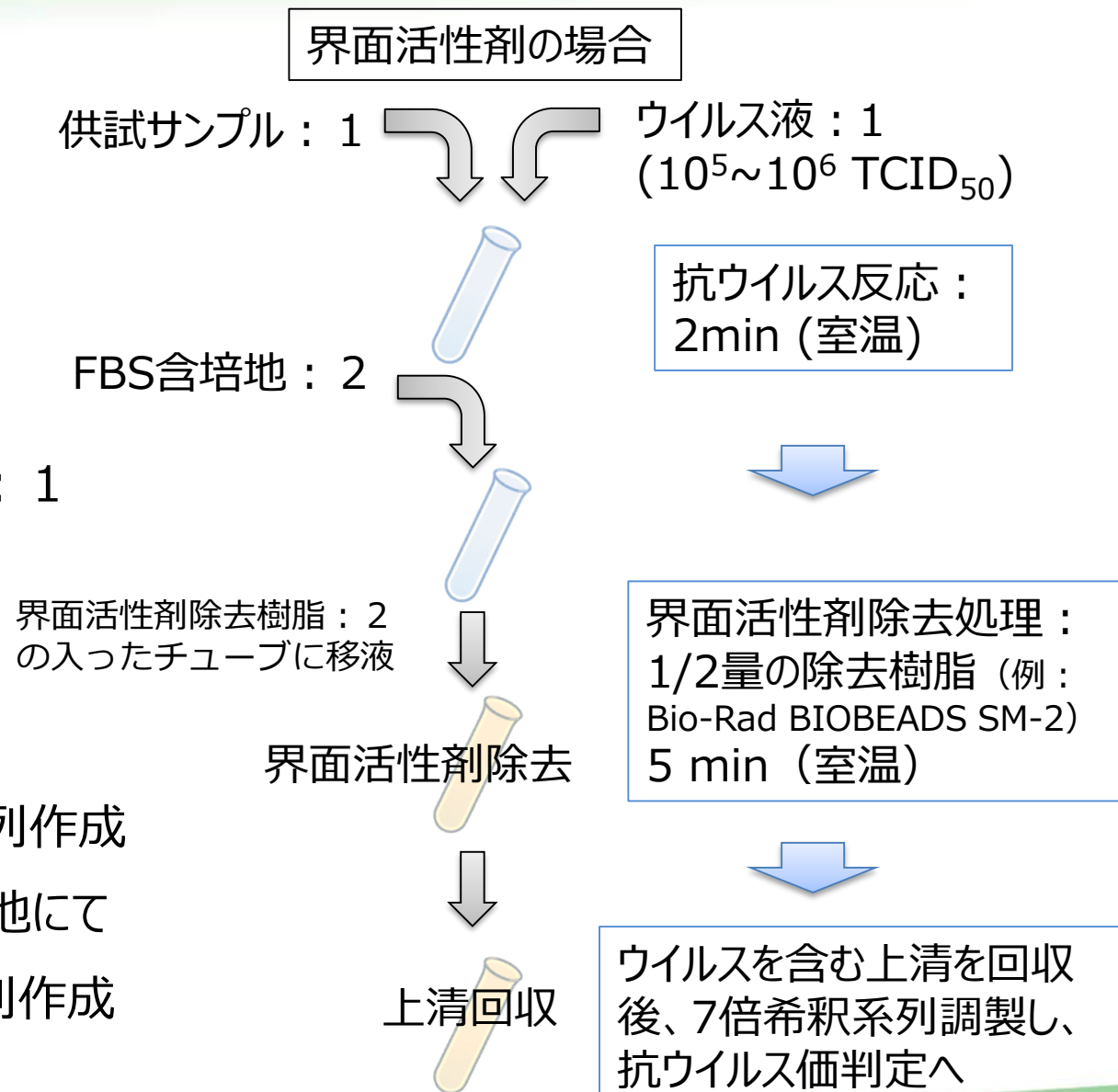
- インフルエンザウイルスを用いた検証試験の結果を踏まえて、新型コロナウイルスを用いた検証試験を実施する。
- 国立感染症研究所及び北里大学大村智記念研究所に協力をいただき、両機関がそれぞれ保有する評価系を用いて、並行して検証試験を実施する。

国立感染症研究所での試験計画

感染研安全実験管理部における 抗ウイルス評価試験アウトライン

資料 5

- 宿主細胞培養およびウイルス培養
- 供試サンプルの調製
 - 界面活性剤を滅菌水にて数段階に希釈
 - 次亜塩素酸水は有効塩素濃度を数段階に設定
- 抗ウイルス反応
 - 界面活性剤； 供試サンプル：ウイルス液 = 1 : 1
 - 次亜塩素酸水； 試験水：ウイルス液 = 9 : 1
 - 室温、2分（サンプルに応じて変更）
- 供試サンプルの除去・中和処理
 - 界面活性剤：除去樹脂にて除去後、7倍希釈系列作成
 - 次亜塩素酸水：0.01Mチオ硫酸ナトリウム含有培地にて7倍希釈(7⁻¹) →以下希釈系列作成



**国立感染症研究所で実施した豚コロナウイルス等を用いた
試験結果のご紹介（資料非公開）**

北里大学大村智記念研究所での試験計画

<薬剤の細胞毒性確認、quenching条件決定>

- 消毒剤候補はあらかじめ、10倍、100倍、1000倍、10000倍希釈液を準備し、細胞への影響を確かめておく。
- ウイルス原液に接触させる薬剤の希釈倍率（quenching条件）を決定する。

<方法>

- 試験当日Vero E6/TMPRSS2 細胞が90% confluentになるように、96 well plateに準備する。試験直前に血清無しDMEMで3回洗浄し、DMEM 2% FBSを180uLずつ培地を入れる。
- サンプル液（希釈済み消毒剤）を27uLずつ 空の96well plateに入れる。
- そこにウイルス液（stock原液）を3uL（約 10^4 pfu）ずつ（マルチピペットを用いる）入れて、所定時間反応（1分 or 10分）
- 反応後に、反応停止後液として、2%FBS培地を270uL添加し、ピペッティング。
- そこから20uLずつとり、事前に180uL培地を入れたウェル（8ウェル）に添加する。
- 37°C CO₂ incubatorで1時間感染させる。
- 200uLで2回Washする。
- 200uLのDMEM 2% FBSを添加し、37°C CO₂ incubatorで培養する
- 培地添加直後（Day 0）、培養1日後、2日後、3日後のCPEを観察する。
- 必要に応じて、qRT-PCR（TOYOBO kit）にて3日後のSARS-CoV-2 RNA titerを測定する

<評価・消毒効果判定>

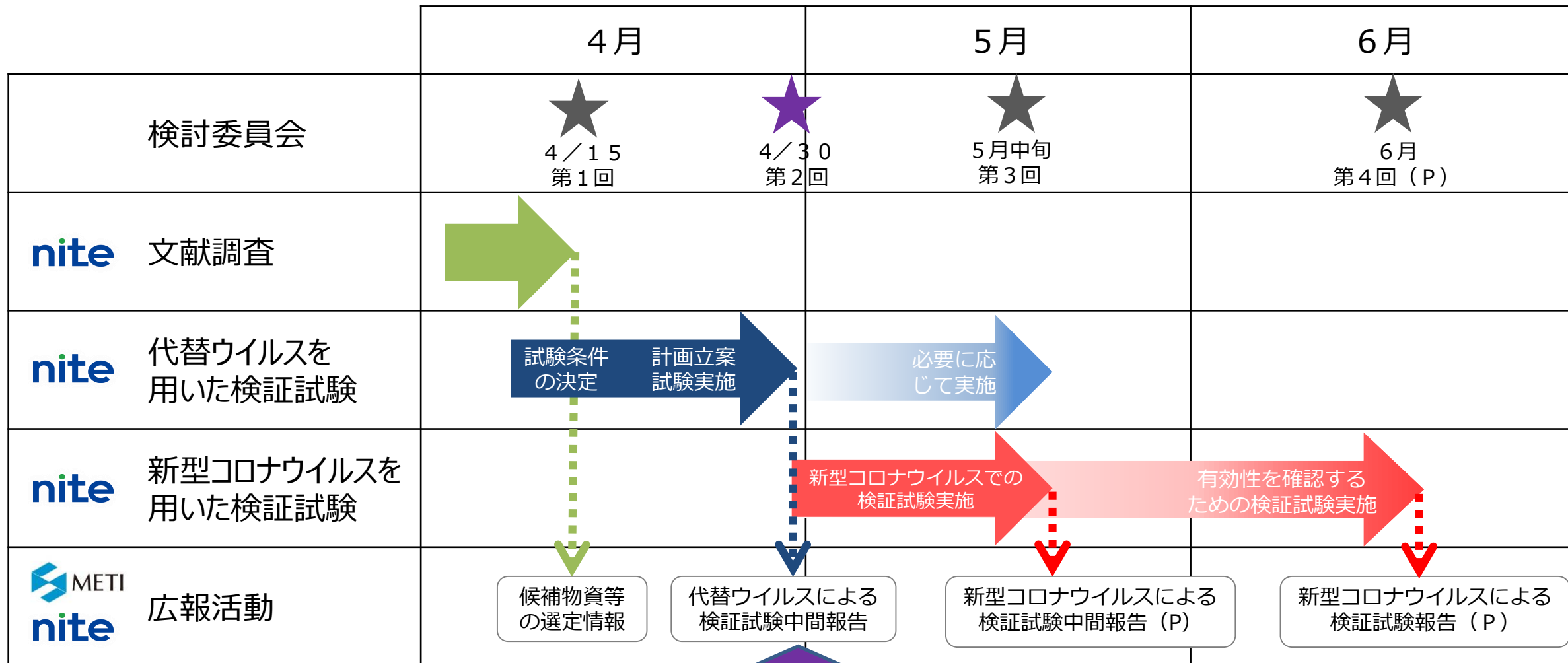
- 8ウェルの内、3日目までに一つでもCPEが確認された場合、そのウェルの q RT-PCR値を確認し、RNA titerの上昇が認められた場合、その剤の消毒効果は無しとする。
- CPEが確認されても、RNA titerの上昇が認められなかった場合、細胞毒性試験から再検討を行う。
- 全てのウェルでCPEが観察されず、且つRNA titerの上昇が認められなかった場合のみ、消毒効果有り判定する。
- 約10000個の感染性ウイルスを消毒できるかどうかを評価していることになる。

**北里大学大村智記念研究所における新型コロナウイルスを用いた
抗ウイルス評価試験プロトコルのご紹介（資料非公開）**

今後のスケジュール

今後のスケジュール

新型コロナウイルスを用いた検証試験を以下のスケジュールで進める。



本日

(注) 上記は、4月30日現在の状況を踏まえて想定している案