

新型コロナウイルスを用いた代替消毒候補物資の 有効性評価にかかる検証試験の中間結果について

令和2年5月28日

独立行政法人製品評価技術基盤機構

第 3 回委員会を確認された事項

＜新型コロナウイルスを用いた代替消毒候補物資の有効性評価に係る検証試験の途中経過＞

第2回委員会で選定した対象物資のうち、界面活性剤11種（第4級アンモニウム塩3種を含む）及び過炭酸ナトリウムについて、新型コロナウイルスを用いて国立感染症研究所及び北里大学大村智記念研究所での試験プロトコルに沿って実施された検証試験の途中経過が報告された。

（検証試験の中間結果）

- 今回報告された検証試験結果について検討を行い、委員会として現時点では、新型コロナウイルスに対する除去効果について、99.99%以上の感染価減少率を示した物資を有効と判断した。
- 試験結果からは、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（0.1%以上）、アルキルグリコシド（0.1%以上）、アルキルアミノオキシド（0.05%以上）、塩化ベンザルコニウム（0.05%以上）、ポリオキシエチレンアルキルエーテル（0.2%以上）の界面活性剤5種が新型コロナウイルスに対して有効と判断された。
- 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について、北里大学での検証試験において「不活化効果あり」との結果が出ていることから、これらの物質についても新型コロナウイルスに対して有望であると判断された。今後、国立感染症研究所での検証試験結果を踏まえて最終的な判断を行う。
- 上記以外の物資（純石けん分（脂肪酸カリウム、脂肪酸ナトリウム））、アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム、脂肪酸アルカノールアミド、アルキルベタイン、過炭酸ナトリウム）については、引き続き評価を進めることとされた。

(代替消毒候補物資の広報及び注意喚起)

- 検証試験によって新型コロナウイルスに対する除去効果が確認された界面活性剤については、実際に代替消毒方法として活用するにあたっては安全性や適正な使用法への配慮について十分に留意し、国民に向けた広報・注意喚起を行う必要があるとされた。

<今後の検証試験の計画>

- 第2回委員会で選定した次亜塩素酸水（電気分解法で生成したもの）4種については、引き続き検証試験を実施することとする。
- 市場の実態に合わせ、次亜塩素酸水（電気分解法で生成したもの）4種に加えて次亜塩素酸水（電気分解法以外で生成したもの）を検証試験の対象に追加した。この際、有効塩素濃度と溶液のpHが同等であれば消毒効果は同等と考えられることから、特定の製法で生成された次亜塩素酸水の検証結果に基づいて、他の製法で生成されたものの効果も同等とみなすものとされた。
- その他の候補物資については、現段階での追加は行わないこととした。

検証試験の中間結果について (続報)

新型コロナウイルスを用いた検証試験の概要

- 第2回及び第3回検討委員会で選定された対象物資について、国立感染症研究所及び北里大学大村智記念研究所（以下、北里大学）にご協力をいただき、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しているところ。
- 検証試験の対象物資と進捗状況は次ページのとおり。

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（1）

資料 3

対象物資の 카테고리	対象物資の種類の名称を示す用語 ¹⁾	国立感染症研究所で実施した検証試験の結果報告	北里大学で実施した検証試験の結果報告
陰イオン系界面活性剤	純石けん分(脂肪酸(ラウリン酸)カリウム)		第3回
	純石けん分(脂肪酸(ラウリン酸)ナトリウム)		✓
	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム	第3回	第3回
	アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム		第3回
非イオン系界面活性剤	アルキルグリコシド	第3回、✓	第3回
	脂肪酸アルカノールアミド		第3回
	ポリオキシエチレンアルキルエーテル	第3回	第3回
両性イオン系界面活性剤	アルキルベタイン	✓	第3回
	アルキルアミノオキシド	第3回、✓	第3回
陽イオン系界面活性剤 (第4級アンモニウム塩)	塩化ベンザルコニウム	第3回	第3回
	塩化ベンゼトニウム	✓	第3回
	塩化ジアルキルジメチルアンモニウム	✓	第3回
酸素系漂白剤	過炭酸ナトリウム ²⁾	X	✓

1) 家庭用品品質表示法に基づく表記

2) 実験系の都合で北里大でのみ実施

✓ 今回（第4回）の委員会で結果報告
第3回 第3回委員会（5月21日開催）で報告済み

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（2）

資料 3

カテゴリー	電解質	pH*	有効塩素濃度 (ACC)* (ppm)	国立感染症研究所で実施した検証試験の結果報告	北里大学で実施した検証試験の結果報告
強酸性電解水 (次亜塩素酸水①)	食塩水	2.5	50	✓	
			25	✓	
弱酸性電解水 (次亜塩素酸水②)	食塩水	3.0	50	✓	
			25		
		4.0	50	✓	
			25	✓	
微酸性電解水 (次亜塩素酸水③)	塩酸	5.0	50	✓	✓
			25		
		6.0	50		✓
			25		
微酸性電解水 (次亜塩素酸水④)	塩酸+食塩水	5.0	50	✓	✓
			25		
		6.0	50		✓
			25		

pHや有効塩素濃度がウイルス除去にどのような影響を及ぼすのかを検証するため、サンプルを最大14種類設定

* pHと有効塩素濃度は試験実施時に改めて測定

✓ 今回（第4回）の委員会で結果報告

【国立感染症研究所】

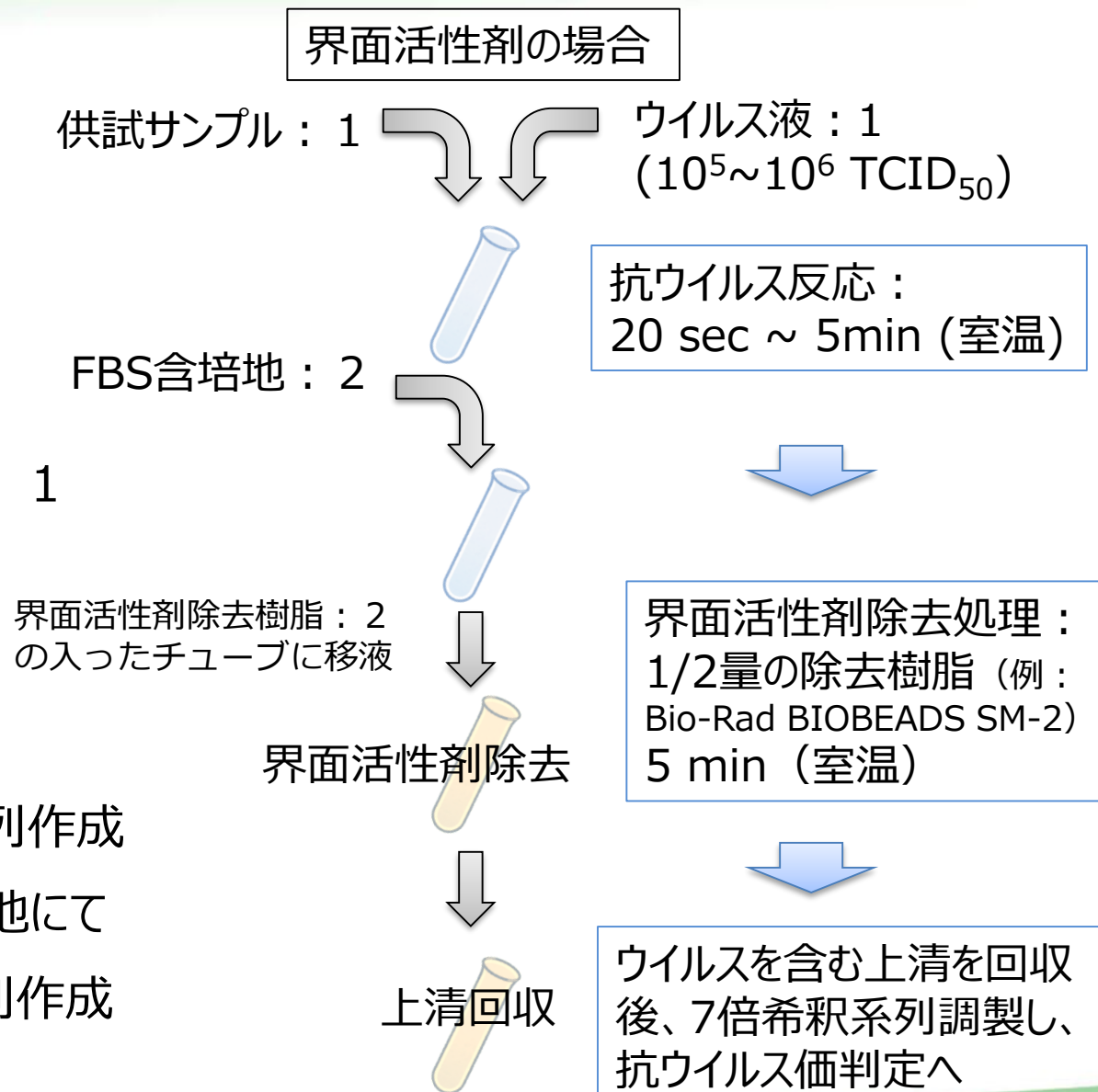
- 宿主細胞を用いた50%細胞感染価算出法(TCID50法)に基づき、サンプル添加により感染性ウイルスの感染価を何%（10の何乗）減少させることができたかを数値で記載（詳細は10ページ参照）
- 反応液における供試サンプル液とウイルス液の混合比率
 - 界面活性剤 <供試サンプル：ウイルス = 1：1>
 - 次亜塩素酸水（電気分解法で生成したもの） <供試サンプル：ウイルス = 19：1>

【北里大学】

- あらかじめサンプルの細胞毒性を確認し、サンプルの希釈条件を決定。サンプルとウイルスを反応後の希釈液を宿主細胞に添加し、3日間培養後の細胞変性効果とqRT-PCRによるウイルスのRNA titerを測定。約10,000個のウイルスをほぼ完全に不活化(検出限界以下まで)させた場合に「不活化効果あり」と判断（詳細は19～20ページ参照）
- 反応液における供試サンプル液とウイルス液の混合比率
 - 界面活性剤、過炭酸ナトリウム <供試サンプル：ウイルス = 9：1>
 - 次亜塩素酸水（電気分解法で生成したもの） <供試サンプル：ウイルス = 9：1>

国立感染症研究所での検証試験の中間結果 (続報)

- 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 = 19 : 1
 - 室温、20、40秒、1、2、5分
- 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



資料構成

- 次亜塩素酸水（電気分解によるもの）7種についてのSARS-CoV-2に対する不活性化効果
- 塩化ベンゼトニウム(BZN)及び塩化ジアルキルジメチルアンモニウム (DDAC) によるSARS-CoV-2に対する不活性化効果
- Extra data
アルキルアミノオキシド (AAO) 及びアルキルグリコシド (AG) 各 0.05%、アルキルベタイン(ALBT)0.1～0.5%によるSARS-CoV-2に対する不活性化効果

供試サンプルおよび試験条件

- **次亜塩素酸水（電気分解によるもの）**：値は全て試験実施当日の実測値

	高ACC群	低ACC群	ACC: 有効塩素濃度
強酸性電解水	(1)pH2.5_ACC 40ppm、	(2)pH2.4_ACC 19ppm	
弱酸性電解水	—	(3)pH2.9_ACC 26ppm	
弱酸性電解水	(4)pH4.3_ACC 43ppm、	(5)pH4.2_ACC 24ppm	
微酸性電解水	(6)pH5.0_ACC 49ppm	—	
微酸性電解水	(7)pH4.9_AAC 39ppm	—	

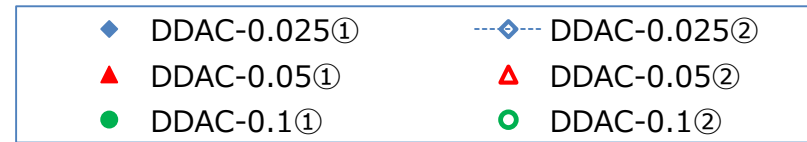
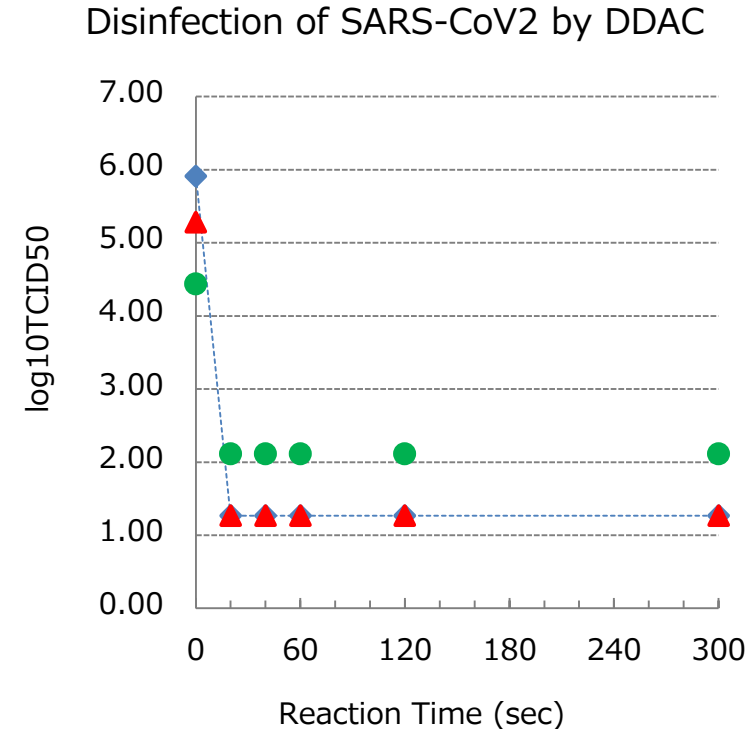
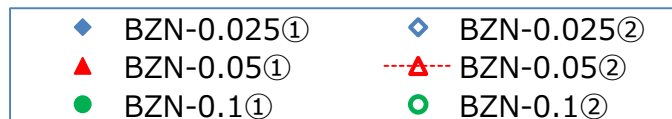
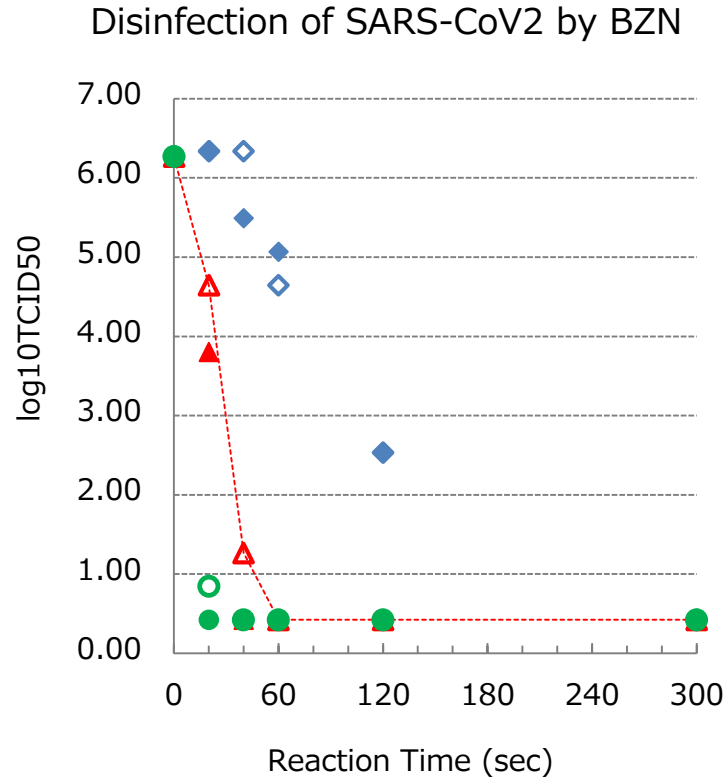
※(6)の電解質は塩酸のみ、(7)の電解質は塩酸 + 食塩水

☆反応比率 1:19、cell plateへの接種量は0.1ml/well

⇒ 結果については、P24の中間結果のまとめに掲載

- **塩化ベンゼトニウム（BZN）**：0.025%、0.05%、0.1%
- **塩化ジアルキルジメチルアンモニウム（DDAC）**：0.025%、0.05%、0.1%

塩化ベンゼトニウム(BZN)及び 塩化ジアルキルジメチルアンモニウム(DDAC)による SARS-CoV-2不活性化効果(ratio 1:1)



※DDACは0.05%以上でレジンによる吸着除去ができていないため、初発感染価減少および細胞毒性発現による検出限界値の上昇が認められている

Extra data

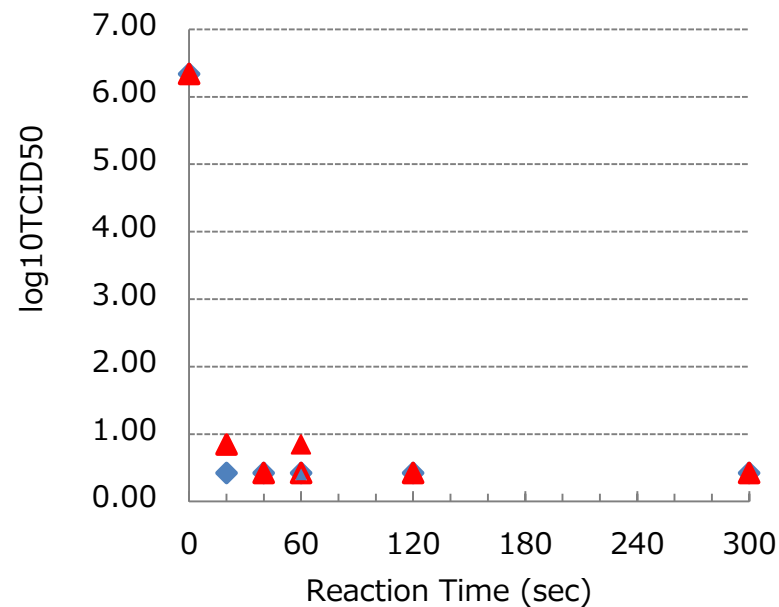
- ・アルキルアミノオキシド (AAO) 及びアルキルグリコシド (AG) 各 0.05%によるSARS-CoV-2不活性化効果
- ・アルキルベタイン(ALBT)によるSARS-CoV-2不活性化効果

アルキルアミンオキシド (AAO)、アルキルグリコシド (AG)、 及びアルキルベタイン (ALBT) によるSARS-CoV-2不活性化効果

AAO・AGでは反応20秒で感染価5log減衰
ALBTでは0.5%以下・5分以内での不活性化効果なし
☆ただしALBT0.1%で感染価減衰の傾向あり

Disinfection of SARS-CoV2 by AAO & AG

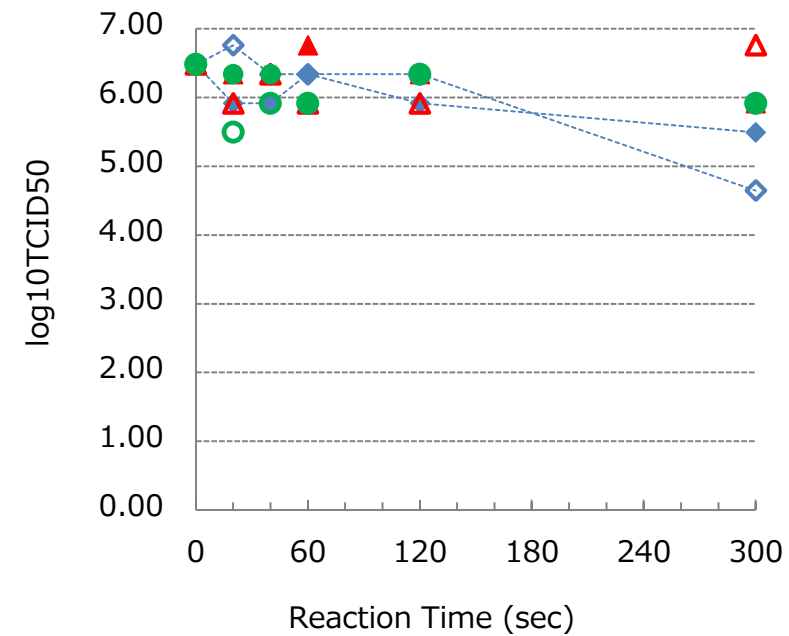
Final conc 0.05%(ratio 1:1)



◆ AAO-0.05① ◆ AAO-0.05②
▲ AG-0.05① ▲ AG-0.05②

Disinfection of SARS-CoV2 by ALBT

(ratio 1:1)



◆ ALBT-0.1① ◆ ALBT-0.1② ▲ ALBT-0.2①
▲ ALBT-0.2② ● ALBT-0.5① ○ ALBT-0.5②

北里大学での検証試験の中間結果 (続報)

資料構成

- 界面活性剤および過炭酸ナトリウムについてのSARS-CoV-2に対する不活性化効果
- 次亜塩素酸水（電気分解法で生成したもの） 4種についてのSARS-CoV-2に対する不活性化効果

<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、1,000倍、10,000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 以上の感染性粒子）ずつ（マルチピペットを用いる）入れて、所定時間反応（1分、5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（14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。
- 3日目に全てのウェルを、qRT-PCR（TOYOBO kit）で調べ、SARS-CoV-2 RNA titerを測定する

<評価・消毒効果判定>

- 播き込んだウェルの内、3日目までに一つでもCPEが確認され、そのウェルの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、細胞毒性によるCPEとし、そのウェルを評価対象から除外する。
- 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、消毒効果有りとは判定する。
- 約10,000個の感染性ウイルスをほぼ完全に消毒（検出限界以下まで）できるかどうかを評価していることになる。
- 患者検体の測定値から飛沫一滴に含まれる感染性ウイルス数を10,000個と想定している

界面活性剤、過炭酸ナトリウムの結果

家表法		試験実施濃度 (%)	結果	
界面活性剤の区分	界面活性剤の種類の名称を示す用語		1 min	5 min
陰イオン系界面活性剤	純石けん分 (ラウリン酸 (脂肪酸) ナトリウム)	0.1	×	×
		0.05	×	×
		0.01	×	×
	高純度 (ラウリン酸 (脂肪酸) ナトリウム)	同上 (ただし1min, 10min)		
過炭酸ナトリウム系	過炭酸ナトリウム (NITE提供)	1.0	× ^{注1}	×
		0.5	×	×
		0.1	×	×

○, 約10,000個のウイルスがほぼ完全に消毒され、ウイルス増殖を認めない

×, ウイルスの増殖により細胞が死滅した

ウイルスの増殖は、qRT-PCRによって確認した。

注 (1) 1ウェルのみRNA titerの上昇が認められず、薬剤による細胞死が観察された

全てのウェル (注 (1) 以外) でCPEが確認され、それら全てのウェルのRNA titerの上昇が上限値に達した。

なお、コントロールの70%エタノール処理群は、全てのウェルで細胞生存、PCR (-) であり、消毒効果は有効であった。

次亜塩素酸水（微酸性域）

次亜塩素酸水の区分	次亜塩素酸水のpH, ACC	1 min	5 min
微酸性電解水 (HCl)	5.0, 50	×	×
	6.0, 50	×	×
微酸性電解水 (HCl + NaCl)	5.0, 50	×	×
	6.0, 50	×	×

○, 約10,000個のウイルスがほぼ完全に消毒され、ウイルス増殖を認めない

×, ウイルスの増殖により細胞が死滅した

ウイルスの増殖は、qRT-PCRによって確認した。

試験品は、試験直前にACCを測定し、メーカー測定値と齟齬が無いことを確認して、試験を実施した。

全てのウェルでCPEが確認され、それら全てのウェルのRNA titerの上昇が上限値に達した。

なお、コントロールの70%エタノール処理群は、全てのウェルで細胞生存、PCR (-) であり、消毒効果は有効であった。

中間結果のまとめ (続報、事務局案)

• 界面活性剤

- 陰イオン系界面活性剤
 - **脂肪酸ナトリウム**
 - 0.1%濃度、5分で不活化効果は見られなかった（北里大データ）
- 非イオン系界面活性剤
 - **アルキルグリコシド（0.05% 5/28当日データ）**
 - 0.05%濃度、20秒で99.999%以上の感染価減少が見られた（感染研データ、速報値）
 - 【第3回委員会報告】 0.1%濃度、1分で不活化効果あり、0.05%濃度、1分で不活化効果なし（北里大データ）
- 両性イオン系界面活性剤
 - **アルキルベタイン（0.1, 0.2, & 0.5% 5/28当日データ）**
 - 0.5%濃度、5分での感染価減少率は99.9%未満であった（感染研データ、速報値）
 - 【第3回委員会報告】 0.1%濃度、5分で不活化効果なし（北里大データ）
 - **アルキルアミノオキシド（0.05% 5/28当日データ）**
 - 0.05%濃度、20秒で99.999%以上の感染価減少が見られた（感染研データ、速報値）
 - 【第3回委員会報告】 0.05%濃度、1分で不活化効果あり（北里大データ）
- 陽イオン系界面活性剤
 - **塩化ベンゼトニウム**
 - 0.05%濃度、1分で99.999%以上の感染価減少が見られた（感染研データ）
 - 【第3回委員会報告】 0.05%濃度、5分で不活化効果あり（北里大データ）
 - **塩化ジアルキルジメチルアンモニウム**
 - 0.025%濃度、20秒で99.99%以上の感染価減少が見られた（0.05%以上で細胞毒性がみられた）（感染研データ）
 - 【第3回委員会報告】 0.01%濃度、5分で不活化効果あり（0.05%以上で細胞障害を観察）（北里大データ）

• 酸素系漂白剤

- **過炭酸ナトリウム**
 - 1.0%濃度、5分で不活化効果は見られなかった（北里大データ）

• 次亜塩素酸水（電気分解で生成したもの）

- 国立感染症研究所の検証試験において、酸性電解水 7 サンプルの結果は以下のとおりであった（反応液におけるウイルス液とサンプル液の比率 1 : 19）
 - 微酸性電解水（実測値：pH5.0、ACC 49ppm）では、測定したすべての反応時間において99.9%以上の感染価減少が認められた。1分及び5分においては99.99%以上の感染価減少であった。
 - 一方、ACC低値群の3サンプル（実測値：pH2.4、ACC 19ppm、pH2.9、ACC 26ppm、pH4.2、ACC 24ppm）においては、ほぼすべての反応時間において感染価減少率は99.9%未満であった。
 - それ以外の3サンプル（実測値：pH2.5、ACC 40ppm、pH4.3、ACC 43ppm、pH4.9、ACC 39ppm）については、現時点で感染価減少にかかる一定の傾向を捉えることは困難であった。
- 北里大の検証試験において、微酸性電解水 4 サンプル（pH5.0及び6.0、ACC 各50ppm）にウイルス不活化効果は認められなかった（反応液におけるウイルス液とサンプル液の比率 1 : 9）

注釈) ACC : 有効塩素濃度

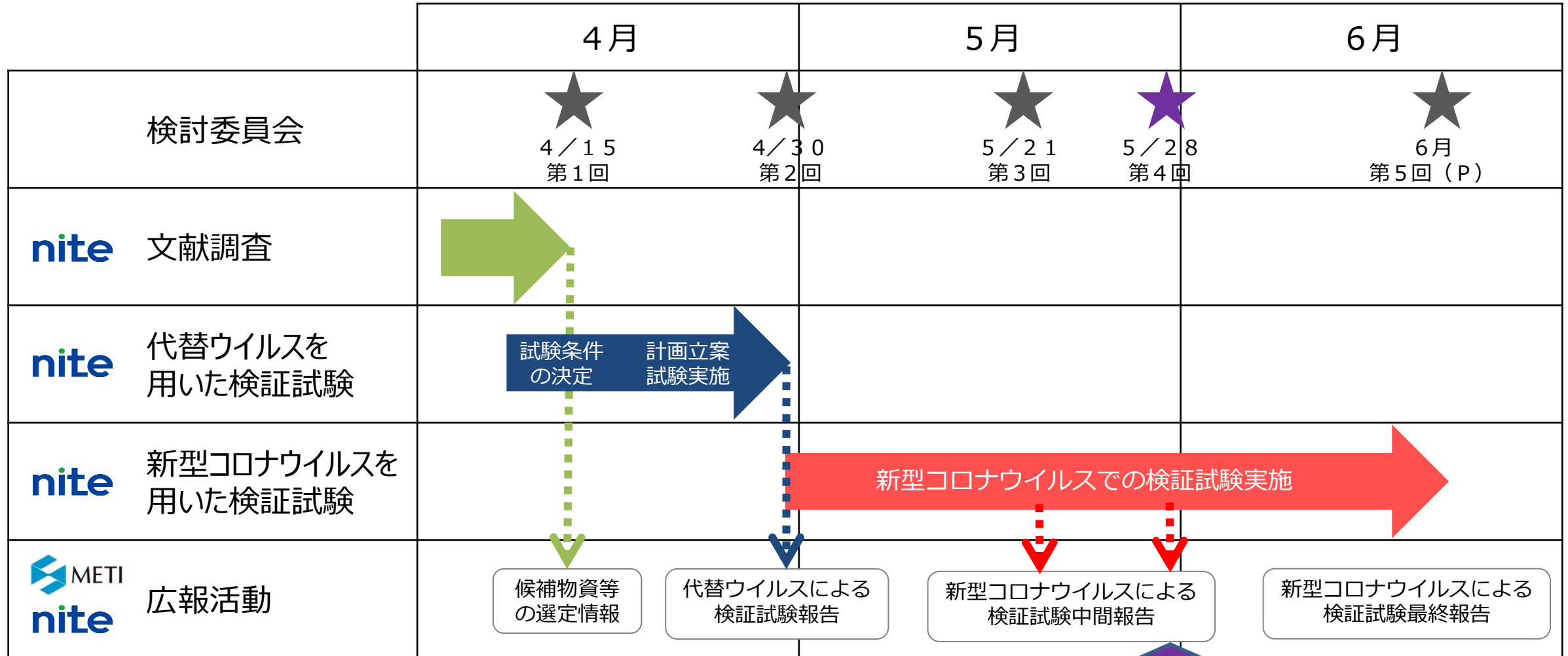
今後の予定（事務局案）

- **界面活性剤（継続検討）**
 - 脂肪酸カリウム、脂肪酸ナトリウム
 - 脂肪酸アルコールアミド
 - アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム

- **次亜塩素酸水（継続検討）**
 - 電気分解法で生成したもの
 - 電気分解法以外で生成したもの

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。



(注) 上記は、5月28日現在の状況を踏まえて想定している案