

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21日

独立行政法人製品評価技術基盤機構

第 2 回委員会を確認された事項

<インフルエンザ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結果>

新型コロナウイルスの代替として使用可能なインフルエンザウイルスを用いた検証試験を、第1回委員会で選定した界面活性剤8種、次亜塩素酸水（電気分解法で生成したもの）4種、第4級アンモニウム塩1種について、試験プロトコルに沿って検証試験を実施した。

（検証試験の結果）

○ 4機関での検証試験の結果は以下のとおりであった。（濃度0.1%、反応時間5分での結果。桁数は感染価対数減少値）

➤ 界面活性剤

4桁（99.99%）以上：直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキルグリコシド、
ポリオキシエチレンアルキルエーテル、アルキルアミンオキシド

3桁（99.9%）以上：脂肪酸カリウム

2桁（99%）以上：脂肪酸アルカノールアミド、塩化ベンザルコニウム

感染価の減少を認めず：アルキルベタイン

➤ 次亜塩素酸水（電気分解法で生成したもの）（4種）：いずれも4桁（99.99%）以上

➤ 第4級アンモニウム塩（塩化ベンザルコニウム）：2桁（99%）以上

○実施した複数の試験機関の結果は相関しており、試験は成立したと判断された。

<候補物資の検証試験>

- インフルエンザウイルスに対する検証試験により、下記の物資は新型コロナウイルスに対してウイルス除去効果を有する可能性が一定程度あると考えられることから、これら物資についてまずは優先的に新型コロナウイルスを用いた検証試験を進めることとされた。
 - 界面活性剤 5種（直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキルグリコシド、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、アルキルアミノキシド、脂肪酸カリウム）
 - 次亜塩素酸水 4種（電気分解法で生成したもの）

<新型コロナウイルスによる検証試験の計画>

- 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の協力を得て、両機関がそれぞれ保有する評価系を用い、並行して検証試験を実施することとされた。
- 検証試験に供するサンプルとして、インフルエンザウイルスを用いた試験に供した界面活性剤8種（第4級アンモニウム塩1種を含む）、及び次亜塩素酸水（電気分解で生成したもの）4種に加えて、文献調査の結果等を踏まえて、界面活性剤1種、第4級アンモニウム塩2種、及び過炭酸ナトリウムの計4種を追加した。
- 次亜塩素酸水について、現在の4サンプルによる試験成果の適用範囲などを考慮しつつ、追加的な検証試験実施の必要性を事務局で検討し、必要に応じて委員会に諮ることとした。

新型コロナウイルスを用いた検証試験の 中間結果について

新型コロナウイルスを用いた検証試験の概要

- 第2回検討委員会で選定された候補物資について、新型コロナウイルスを用いた検証試験を、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、並行して実施しているところ。
- 検証対象物資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）

対象物資のカテゴリー	対象物資の種類の名称を示す用語
陰イオン系界面活性剤	純石けん分(脂肪酸カリウム、脂肪酸ナトリウム)
	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム
	アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム
非イオン系界面活性剤	アルキルグリコシド
	脂肪酸アルカノールアミド
	ポリオキシエチレンアルキルエーテル
両性イオン系界面活性剤	アルキルベタイン
	アルキルアミンオキシド
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
	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
酸素系漂白剤	過炭酸ナトリウム

- 赤色は第2回委員会で新たに追加した物資

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）

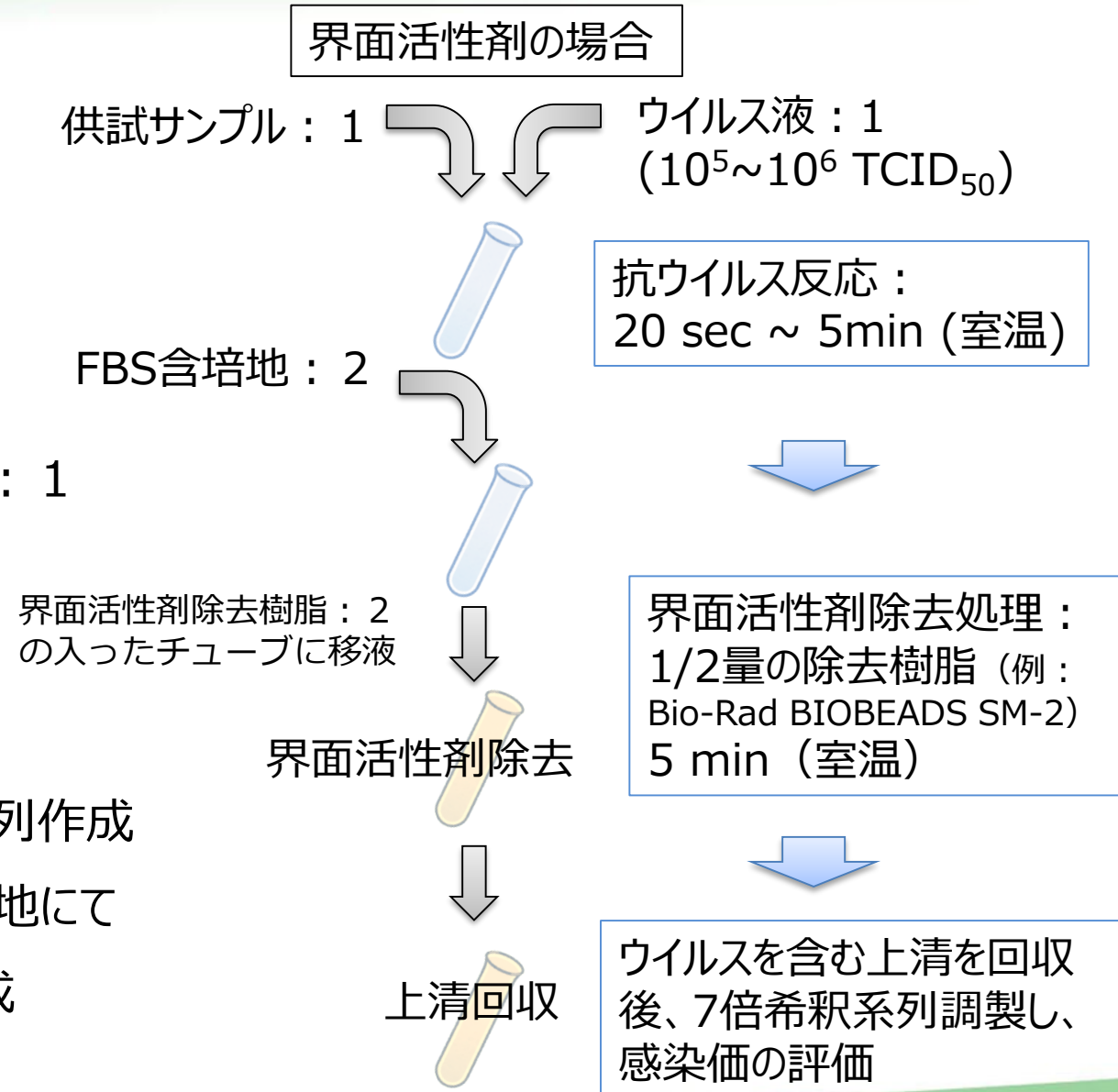
カテゴリー	電解質	pH	有効塩素濃度 (ppm)
強酸性電解水	NaCl	2.5	50
			25
弱酸性電解水	NaCl	3.0	50
			25
		4.0	50
			25
微酸性電解水	HCl	5.0	50
			25
		6.0	50
			25
微酸性電解水	HCl+NaCl	5.0	50
			25
		6.0	50
			25

電解水カテゴリーと電解質の違いにより次亜塩素酸水（電気分解法により生成されたもの）を分類し、新型コロナウイルスの試験において、pHと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できるよう、左記のようにpHと有効塩素濃度を振って、14通りのサンプルを設定した。

各試験系に応じて適宜選択の上、試験を実施する。

国立感染症研究所での検証試験の中間結果

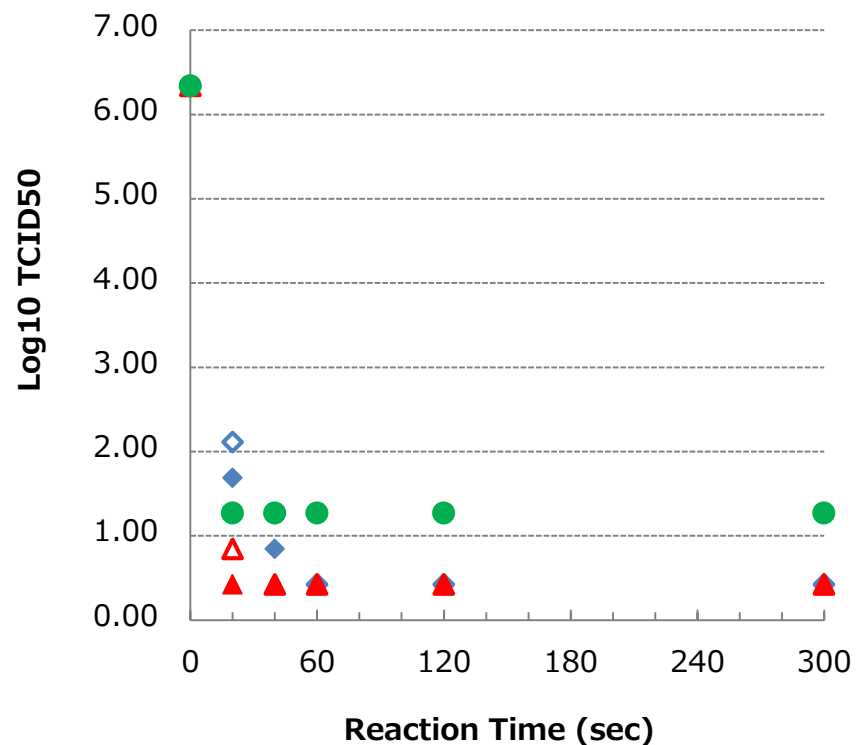
- 宿主細胞培養およびウイルス培養
- 供試サンプルの調製
 - 界面活性剤を滅菌水にて数段階に希釈
 - 次亜塩素酸水は有効塩素濃度を数段階に設定
- 抗ウイルス反応
 - 界面活性剤； 供試サンプル：ウイルス液 = 1 : 1
 - 次亜塩素酸水； 試験水：ウイルス液 = 9 : 1
 - 20秒、40秒、1分、2分、5分（室温）
- 供試サンプルの除去・中和処理
 - 界面活性剤：除去樹脂にて除去後、7倍希釈系列作成
 - 次亜塩素酸水：0.01Mチオ硫酸ナトリウム含有培地にて
7倍希釈 → 以下希釈系列作成



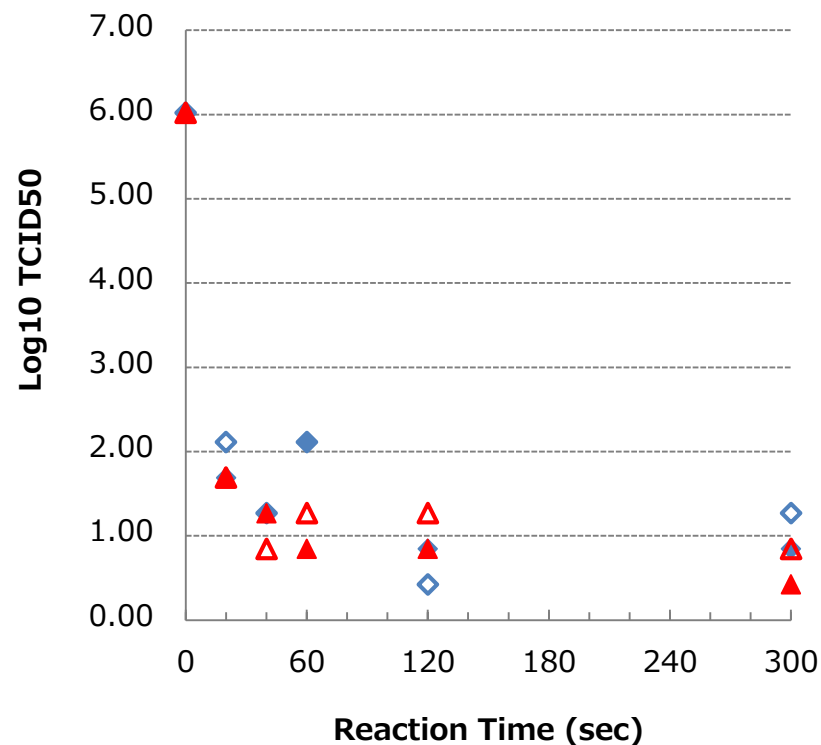
- 高い有効性が想定された界面活性剤5剤についての新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に対する不活性化効果

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)及び ポリオキシエチレンアルキルエーテル(POE)による SARS-CoV-2不活性化効果(ratio 1:1)

Disinfection of SARS-CoV2 by LAS



Disinfection of SARS-CoV2 by POE

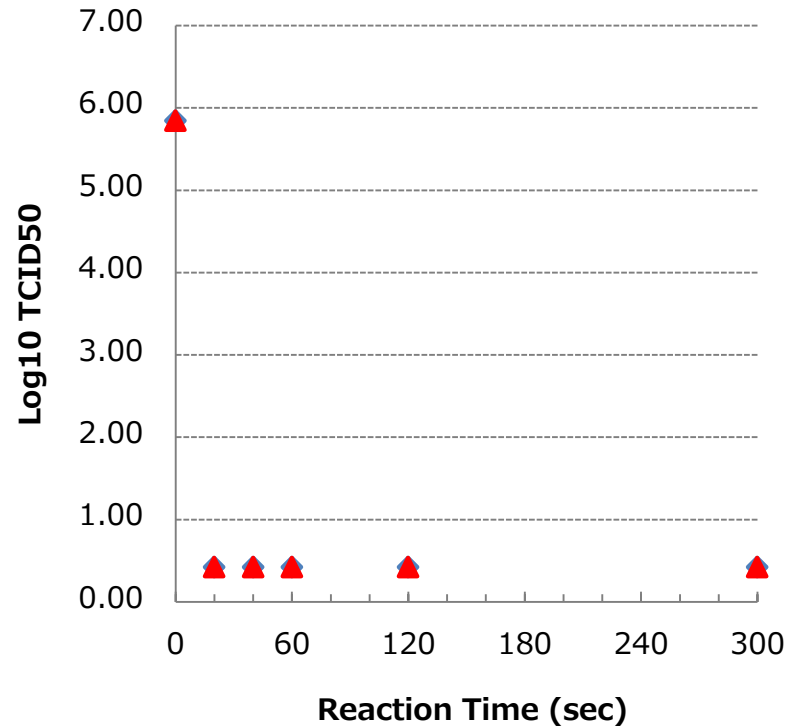


◆ LAS-0.05① ◆ LAS-0.05② ▲ LAS-0.1①
▲ LAS-0.1② ● LAS-0.25① ○ LAS-0.25②

◆ POE-0.1① ◆ POE-0.1②
▲ POE-0.2① ▲ POE-0.2②

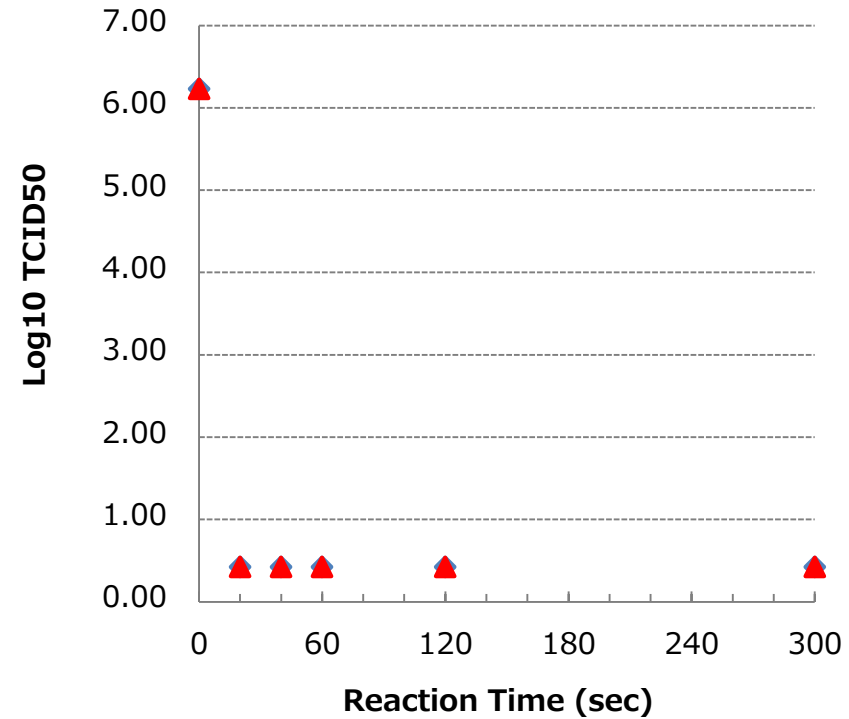
アルキルアミンオキシド(AAO)及び アルキルグリコシド(AG)による SARS-CoV-2不活性化効果(ratio 1:1)

Disinfection of SARS-CoV2 by AAO



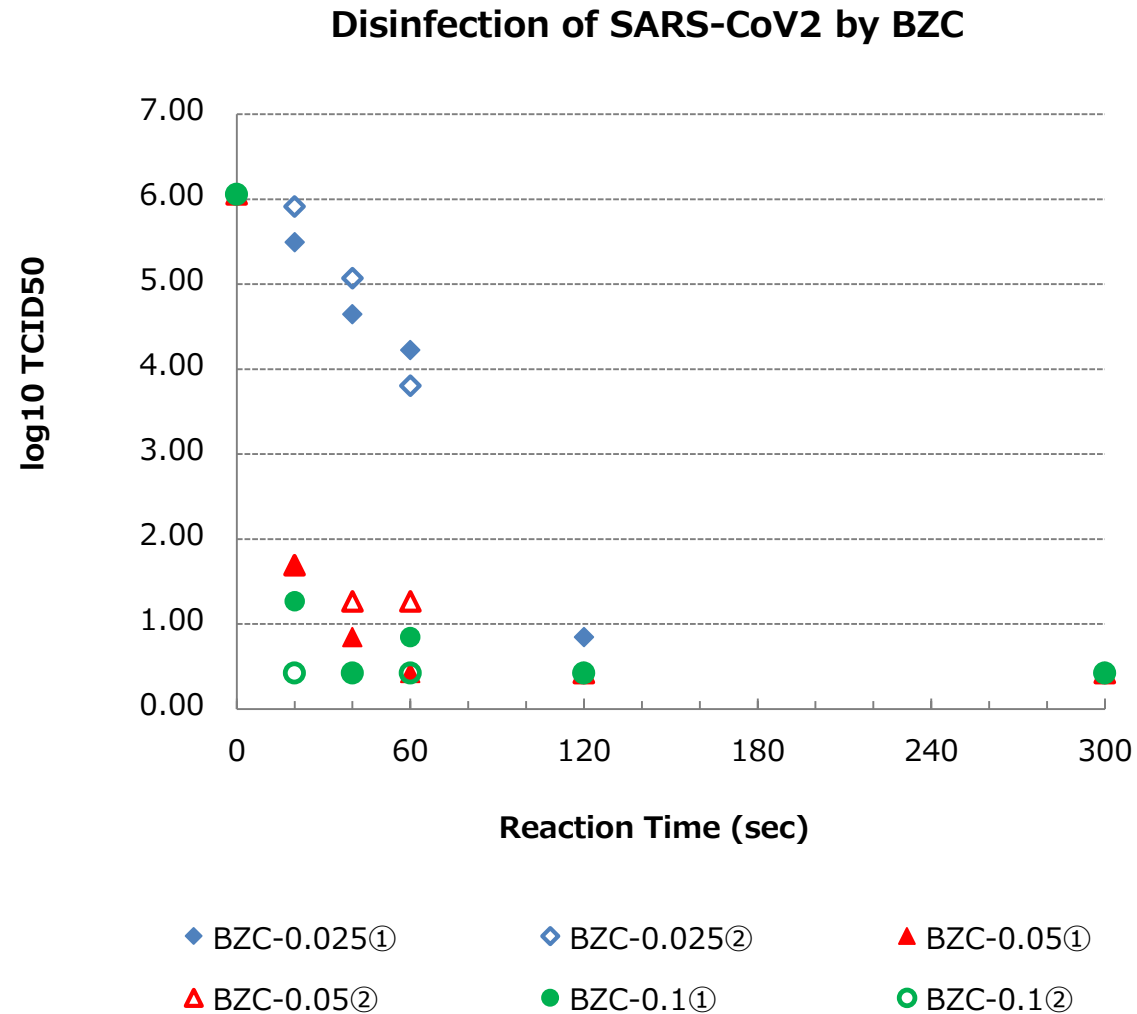
◆ AAO-0.1① ◆ AAO-0.1② ▲ AAO-0.2① ▲ AAO-0.2②

Disinfection of SARS-CoV2 by AG



◆ AG-0.1① ◆ AG-0.1② ▲ AG-0.2① ▲ AG-0.2②

塩化ベンザルコニウム(BZC)及びによる SARS-CoV-2不活性化効果(ratio 1:1)



北里大学大村智記念研究所での 検証試験の中間結果

北里大学大村智記念研究所ウイルス感染制御学研究室における 抗ウイルス評価試験アウトライン

<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（1～10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（3ウェル以上）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

北里大学大村智記念研究所ウイルス感染制御学研究室における 抗ウイルス評価試験アウトライン

資料 3

<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（これまでの分離培養の経験上、これ以上の数値を経験したことはない）

界面活性剤の結果（1）

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前を示す用語		1 min	5 min
陰イオン系界面活性剤	純石けん分（脂肪酸カリウム）	0.1	×	×
		0.05	×	×
		0.01	×	×
	純石けん分（脂肪酸ナトリウム）	実施中		
	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム	0.1	×	○
		0.05	×	×
		0.01	×	×
	アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム	0.1	×	×
		0.05	×	×
		0.01	×	×
非イオン系界面活性剤	アルキルグリコシド	0.1	○	未実施
		0.05	×	未実施
		0.01	×	未実施
	脂肪酸アルカノールアミド	0.1	×	×
		0.05	×	×
		0.01	×	×
	ポリオキシエチレンアルキルエーテル	0.1	×	×
		0.05	×	×
		0.01	×	×

○ 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。

界面活性剤の結果（２）

資料 3

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前を示す用語		1 min	5 min
両性イオン系界面活性剤	アルキルベタイン	0.1	×	×
		0.05	×	×
		0.01	×	×
	アルキルアミノオキシド	0.1	○	未実施
		0.05	○	未実施
		0.01	×	未実施
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	0.1	○	○
		0.05	○	○
		0.01	×	○
	塩化ベンゼトニウム	0.1	○	○
		0.05	×	○
		0.01	×	×
	塩化ジアルキルジメチルアンモニウム	0.1	細胞障害	細胞障害
		0.05	細胞障害	細胞障害
		0.01	×	○
酸素系漂白剤	過炭酸ナトリウム	実施中		

○ 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。

細胞障害： qRT-PCR値が検出限界以下であり、ウイルスの増殖が認められなかった

中間結果のまとめ

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、2機関での検証試験の中間結果は以下のとおり

界面活性剤 （*は第4級アンモニウム塩でもある）	国立感染症研究所		北里大学	
	濃度(%)	感染価減少率\$)	濃度(%)	不活化効果#)
直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム	0.1 ¹⁾	99.999%	0.1 ⁴⁾	あり
アルキルグリコシド	0.1 ¹⁾	99.999%	0.1 ²⁾	あり
アルキルアミノキシド	0.1 ¹⁾	99.999%	0.05 ²⁾	あり
塩化ベンザルコニウム*	0.05 ³⁾	99.999%	0.05 ²⁾	あり

\$) 国立感染症研究所における検証試験は、50%細胞感染価(TCID50)算出法によりウイルスの感染価を何%以上減少させることができたかについて数値で記載している。

#) 北里大学大村智記念研究所（本スライドでは北里大学と略）における検証試験では、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」と記載している。

- 記載された濃度で当該効果を発揮するために必要なウイルスと界面活性剤の最短接触時間：1) 20秒、2) 1分、3) 2分、4) 5分

中間結果のまとめ つづき

- 塩化ベンゼトニウム（0.05%、5分）、塩化ジアルキルジメチルアンモニウム（0.01%、5分）については、北里大学での検証試験において不活化効果が認められた。現在、国立感染症研究所においても検証試験を実施中。
- ポリオキシエチレンアルキルエーテル（0.1%、5分）については、国立感染症研究所において99.99%の感染価減少率が認められたが、北里大学大村智記念研究所での検証試験において不活化効果が認められなかった。同剤（0.2%、5分）については、国立感染症研究所において99.999%の感染価減少率が認められた。
- 北里大学での検証試験において、純石けん分（脂肪酸カリウム）、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、アルキルベタインについては、0.1%濃度、接触時間5分の条件において不活化効果が認められなかった。現在、国立感染症研究所においても検証試験を実施中。
- 純石けん分（脂肪酸ナトリウム）、過炭酸ナトリウムについては検証試験を実施中。

今後の予定

- **国立感染症研究所**

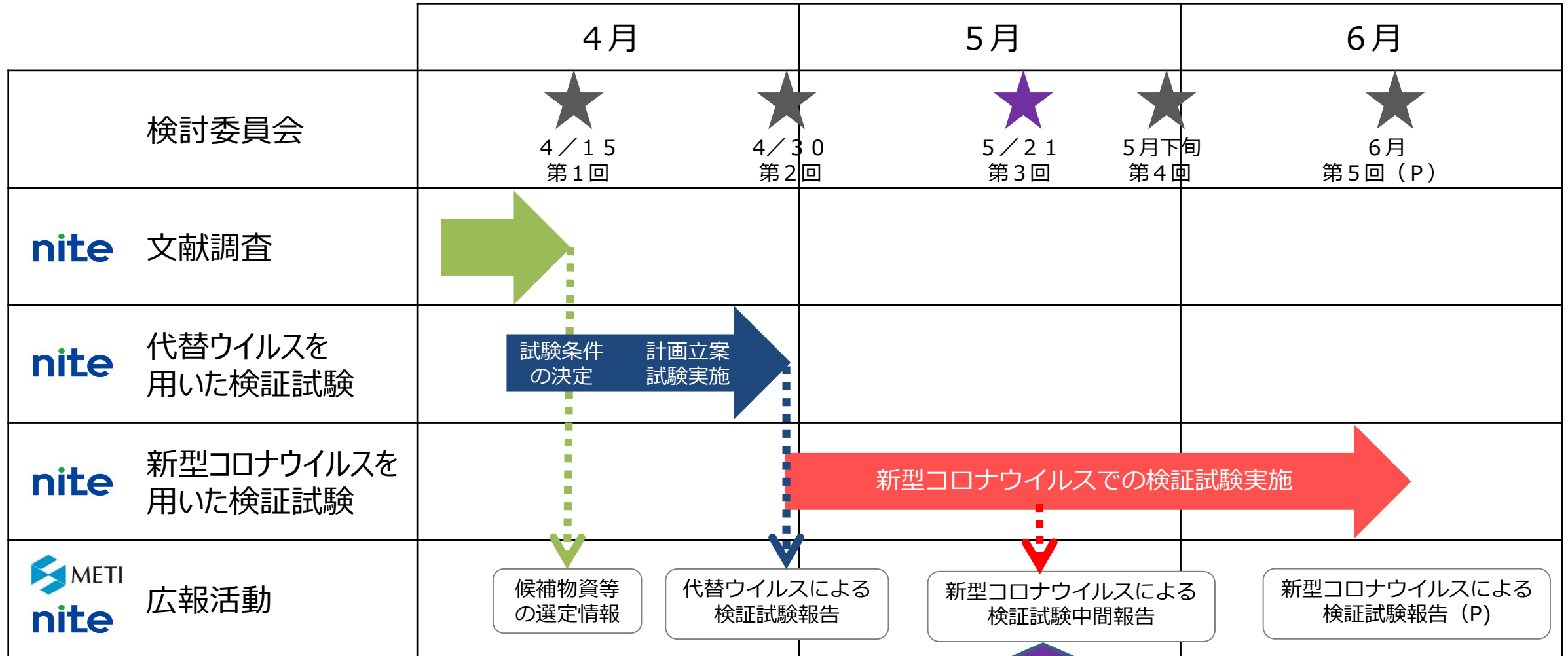
- 界面活性剤（7種）
- 次亜塩素酸水（電気分解法で生成したもの）（8種）

- **北里大学大村智記念研究所**

- 界面活性剤（1種）
- 過炭酸ナトリウム
- 次亜塩素酸水（電気分解法で生成したもの）（4種）

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21日現在の状況を踏まえて想定している案

新型コロナウイルスを用いた有効性評価にかかる 検証試験において評価対象とする物資

令和2年5月21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

新型コロナウイルスを用いた検証試験において 評価対象とする追加物資について

物資追加候補

- 市場の実態を踏まえ、検証試験の範囲の追加・拡大が必要と考えられるもの

次亜塩素酸水

(電気分解法以外で生成したもの)

有効塩素濃度が高い次亜塩素酸水（広義）

- ・二液混合によって生成されたもの
- ・イオン交換によって生成されたもの
- ・粉末や錠剤から生成されたもの

- 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）

検証試験の範囲の追加・拡大が必要と考えられるもの (次亜塩素酸水について①)

- 第2回検討委員会において、次亜塩素酸水については、「現在の4サンプルによる試験結果の適用範囲などを考慮しつつ、追加的な検証試験実施の必要性を事務局で検討し、必要に応じて委員会に諮ることとする。」とされたところ。
- 調査を実施したところ、次亜塩素酸を主成分とする水溶液（本資料では、「次亜塩素酸水(広義)」とする）として、以下のようなものが入手可能であることが確認された。
 - 食塩水や塩酸を電気分解して生成したもの（食品添加物の「次亜塩素酸水」を含む）
 - 次亜塩素酸塩に酸（pH調整剤）を混和して希釈したもの（二液混合法）
 - 次亜塩素酸塩水溶液をイオン交換することにより生成したもの
 - 塩素化イソシアヌル酸塩から生成されたもの
- さらに、市場にある製品の中には、検証に用いた4サンプルよりも有効塩素濃度が高いものが多数存在することが確認された。

検証試験の範囲の追加・拡大が必要と考えられるもの (次亜塩素酸水について②)

- 調査結果を踏まえ、市場の実態に合わせ、検証試験の範囲を追加・拡大することとしてはどうか。
- 有効塩素濃度が高い次亜塩素酸水（広義）への試験を行う場合、サンプルとして電気分解法以外の製法によるものを用いることとなる。
- 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期待されることから、特定の製法で生成されたサンプルで行った検証試験の結果に基づいて、他の製法で生成されたものの効果も同等とみなせるのではないか。

(参考)

- 次亜塩素酸水（広義）中に含まれる有効塩素は、塩素 (Cl_2)、非解離型次亜塩素酸 (HClO)、次亜塩素酸イオン (ClO^-) のいずれかの形で存在しており、その存在比率は溶液のpHに依存している。そのため、溶液の有効塩素濃度とpHが同等である次亜塩素酸水（広義）は、これを消毒に用いる場合、理論上、同程度の効力が期待できる。さらに、サンプルにおいて新型コロナウイルスへの有効性が確認できた場合、サンプルとpHが同等で、有効塩素濃度がより高い次亜塩素酸水（広義）も、効力を有することとなる。

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（広義）

次亜塩素酸水（電気分解法で生成したもの）

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	食塩水	~3.0	20~60
次亜塩素酸水②	弱酸性電解水	食塩水	3.0~5.0	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 + 食塩水	5.0~6.5	10~80

次亜塩素酸水（電気分解法以外で生成したもの）

サンプル番号	製法	原料	pH*	有効塩素濃度* (ppm)
次亜塩素酸水⑤	二液混合	次亜塩素酸ナトリウム + 塩酸	5.0~6.5	100~300
次亜塩素酸水⑥	二液混合	次亜塩素酸ナトリウム + 炭酸	5.0~6.5	100~300
次亜塩素酸水⑦	二液混合	次亜塩素酸ナトリウム + 酢酸	5.0~6.5	100~300
次亜塩素酸水⑧	イオン交換	次亜塩素酸ナトリウム	5.0~6.5	100~300
次亜塩素酸水⑨	粉末・錠剤	ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	5.0~6.5	100~300

注：試験の進捗、サンプルの準備状況その他に応じ、適宜選択する。なお、塩酸を用いたタイプ（⑤）が最も基本的な製法とみられ、種類も多い。

* pH、有効塩素濃度は、サンプルの上限・下限を示したものを。検証試験の際にはサンプルを実測する。

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、第4級アンモニウム塩 過炭酸ナトリウム

資料 4

サンプル番号	名称	備考
界面活性剤①	純石けん分(脂肪酸カリウム、脂肪酸ナトリウム)	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	
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	両性イオン系界面活性剤
界面活性剤⑧	アルキルアミノオキシド	
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	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	
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	
過炭酸ナトリウム①	過炭酸ナトリウム	酸素系漂白剤