〈原 著〉

アルコール消毒薬のノンエンベロープウイルスに対する有効性改善策

岡本 一毅・奥西 淳二・渡邊 幸彦・西原 豊・池田 雅裕

Improvement of Effectiveness of New Alcohol-based Hand Rubs Against Nonenveloped Viruses

Kazuki OKAMOTO, Junji OKUNISHI, Yukihiko WATANABE, Yutaka NISHIHARA and Masahiro IKEDA

Maruishi Pharmaceutical Co., Ltd., Central Research Laboratories

(2009年11月9日 受付・2010年1月15日 受理)

要 旨

現在、アルコールベースの消毒薬は手指衛生において重要な役割を担っている。しかし、臨床的なニーズを充足できていない点も有している。その一つとして、近年その感染拡大が社会問題となっているノロウイルスなどのノンエンベロープウイルスに対する薬効が挙げられる。今回、我々はアルコールに有機酸と亜鉛化合物を組み合わせた処方を用いノンエンベロープウイルスに対する薬効(*in vitro*)と皮膚刺激性(*in vivo*)に着目した検討を行った。アルコールに有機酸を添加した処方では、ネコカリシウイルスに対して接触時間30秒以内に4 log以上の不活化効果を示したが、アデノウイルスに対しては消毒用エタノールと同程度の薬効であった。一方、アルコールに有機酸と亜鉛化合物を添加した場合、ネコカリシウイルスとアデノウイルスの両ウイルスに対して30秒以内に4 log以上の不活化効果を示し、消毒用エタノールよりも優れた薬効を示した。また、ウサギ皮膚を用いてこれら処方の皮膚刺激性試験を実施した結果、アルコールに有機酸と亜鉛化合物を組み合わせた場合、刺激をほとんど示さないことが明らかとなった。このように、アルコールに有機酸と亜鉛化合物を組み合わせた処方は、ノンエンベロープウイルスに対して従来にない有効性を示すと共に、スキンケアの観点から皮膚への刺激にも配慮した新しいアルコールベースの消毒薬を創出できる可能性が示唆された。

Key words : アルコール系消毒薬, ノンエンベロープウイルス, 皮膚への影響, 有機酸, 亜鉛化合物

はじめに

消毒用エタノールをはじめとするアルコールベースの消毒薬は、各種細菌、真菌類に対して迅速で強い殺菌力を示し且つ、速乾性であることから、水道の無い場所で使用できる(ウォーターレス)などの利点を有し、従来の石けん・流水に代わる手指衛生の手段として重要な役割を担っている。各国においても、米国では2002年にCenters for Disease Control and Prevention (CDC)より公表された「保健医療現場における手指衛生のためのガイドライン」¹⁾、厚生労働省からは2005年に通知された「医療施設における院内感染の防止について」²⁾において、医療施設での感染管理にアルコールベースの消毒薬

の使用を推奨している。しかしながら、アルコールベースの消毒薬はインフルエンザ等のエンベロープウイルスに対しては明確な有効性を示すものの、近年、高齢者を中心に重篤な症状を示すことがある感染性胃腸炎の原因となるノロウイルスや、ウイルス性結膜炎の原因ウイルスとして眼科領域での感染管理が難しいアデノウイルスなどのノンエンベロープウイルスに対して十分な薬効を有しない^{3,4)}。よって、ノンエンベロープウイルスに対する感染制御は大きな課題となっている。これまでに長時間作用により有効性を示すとする報告はあるが、速乾性であることと即効性を併せ持つことがアルコールベースの消毒薬に求められる特性であり、実際の感染防止に有用な薬効を持っているとはいえない。そこで、我々は有効成分としてエタノールをベースに消毒用エタノール

を製剤改良することにより、細菌、真菌及びノンエンベロープウイルスも含む各種微生物群に対し即効性を示す消毒薬の創出を試みた。

また、製剤評価として消毒効果の他、手指消毒薬等で問題とされる皮膚への影響についても、ウサギを用いた皮膚刺激性試験を実施し、有効性と安全性の両面から評価を行ったので報告する。

材料と方法

使用薬剤

処方 A: 有効成分として 83 v/v% エタノール、添加剤として 1% 乳酸、1% クエン酸及びイソプロパノールを添加したものを A1 (pH 3.6)、A1 を pH 3.9 に調整した処方を A2, A1 を pH 4.2 に調整した処方を A3 とした。

処方 Z: 有効成分として 83 v/v% エタノール、添加剤として 1% 乳酸、0.1% クエン酸、0.1% 硫酸亜鉛及びイソプロパノールを添加したものを Z1 (pH 3.4)、Z1 を pH 3.8 に調整した処方を Z2 とした。

また、ウイルス不活化効果の対照薬剤として消毒用エタノール(日局消毒用エタノール、丸石製薬㈱)及びリン酸緩衝液(PBS)を、ウサギ皮膚刺激性試験の対照薬剤として消毒用エタノールゲル(ゴージョー®MHS、ゴージョージャパン㈱)、変性消毒用エタノール(消毒用エタプロコール®, 丸石製薬㈱)を使用した。

1. ウイルス不活化効果

1) 使用ウイルス

ヒトアデノウイルス 5 型(ADV-5 ATCC VR-5)およびノロウイルスの代替としてネコカリシウイルス(Feline calicivirus F9(FCV) VR-782)を用いた。

2) 評価方法

1. 消毒薬中和の確認

ウイルス不活化効果の評価における消毒薬中和の確認は、反応液を細胞培養用 MEM 培地(Eagle's MEM 培地)で 100 倍希釈することにより反応停止した。

2. ウイルス不活化効果の評価

ウイルスに対する薬効評価は、Time-kill 法により行った。ADV-5 の評価は、ウイルス液 10 μ L に 190 μ L の薬剤を混和後、所定時間に一部をサンプリングして反応を停止した。その後、反応液中のウイルス力価は 96 穴マイクロプレートにて前培養したヒト肺癌由来株細胞(A549)に感染後の細胞変性(CPE)効果を 50%組織培養感染価(TCID₅₀)として求め、TCID₅₀ が 4 log 減少(1/10000)した時間をウイルス不活化時間とした。また、FCV の評価にはネコ腎由来株細胞(CRFK)を用い、ADV-5 と同様の操作を行い、ウイルス不活化効果を判定した。

3. ウサギ累積皮膚刺激性試験

1) 使用動物

日本白色種雄性 SPF ウサギ(Kbl: JW)を北山ラベス㈱より 17 週齢で購入し、検疫・順化後、各処方を適用する 3 日前に背部体毛をバリカンで剪毛し、アイランドスキンがなく順調に発育した健康動物を 18 週齢で試験に供した。

本試験は無麻酔下で実施し、実施に当たっては社内の規定に則り動物倫理委員会の承認を受けて実施した。

2) 方法

各処方とも 3 羽のウサギを用い、背部皮膚 2.5×2.5 cm の面積に各処方 0.1 mL を均一に塗布し、1 時間間隔で 1 日計 5 回開放塗布を行った。1 日の最終塗布後、1 時間後に微温水をしみ込ませた脱脂綿を用いて、塗布部位を清拭し、被験物質を除去した。これらの操作を 5 日間連続して実施し、その後 3 日間の回復期間を設けた。塗布部位の観察は、投与期間中は被験物質除去後 1 時間以内に、回復期間は最終投与終了後 3 日目に 1 回、池田ら^{5,6)}の皮膚反応の評価方法に従って、紅斑、浮腫及び痂皮形成について観察した。

結 果

1. 薬効評価

1) ウイルス不活化効果

処方 A1, 2 及び Z1, 2 は、ネコカリシウイルス(Feline calicivirus F9(FCV) VR-782, ノロウイルス代替)に対し、いずれも 30 秒で 4 log 以上の不活化効果を示した。また、pH 4.2 の処方 A3 においても 1 分後に 3.5 log の不活化効果を示し、1 分後に 1 log 程度の消毒用エタノールを上回る効果を示した(表 1)。

一方、ヒトアデノウイルス 5 型(ADV-5 ATCC VR-

表 1 各種アルコールベース消毒薬のネコカリシウイルス(FCV)に対する不活化効果

処 方	log ₁₀ reduction	
	30 sec	1 min
A1 ^{a)}	>4.67	>4.67
A2 ^{a)}	4.67	>4.67
A3 ^{a)}	3.67	3.50
Z1 ^{b)}	>4.50	>4.50
Z2 ^{b)}	>4.50	>4.50
消毒用エタノール	0.33	1.17
リン酸緩衝液	0.17	0.33

^{a)} 処方 A1: 有効成分 83 v/v% エタノール、添加剤 1% 乳酸、1% クエン酸、イソプロパノール(pH 3.6)、処方 A2: (pH 3.9)、処方 A3: (pH 4.2)

^{b)} 処方 Z1: 有効成分 83 v/v% エタノール、添加剤 1% 乳酸、0.1% クエン酸、0.1% 硫酸亜鉛、イソプロパノール(pH 3.4)、処方 Z2: (pH 3.8)

5)に対して、処方 A type では A1 で消毒用エタノールと同程度(1分で3 log 程度)の効果を示したが、A2, 3では1分後においても1 log 程度の効果しか認められなかった。しかし、亜鉛化合物を含む処方 Z1, 2は、いずれも30秒で4 log 以上の効果を示し高い不活化効果が認められた(表2)。

2. 皮膚への影響評価

1) ウサギ累積皮膚刺激性試験

各処方をウサギ皮膚に1日計5回、5日間連続塗布後の皮膚の状態を観察した結果、最も平均評点が高く推移した処方では消毒用エタノールゲルで、投与期間中継続して軽微な紅斑が観察され平均評点1.0を示したが、回復期間3日目には平均評点は0.33となり回復傾向が認められた。次いで、処方 A1 が各処方中で最高の平均評点1.33を投与開始後2日目に示したが3日目には0.33となり、回復期間3日目までに症状は消失した。変性消毒用エタノールでは投与期間中平均評点はほぼ0.33を

示したが、回復期間3日目までに症状は消失した。一方、硫酸亜鉛を配合した処方 Z1 では投与1日目に軽微な紅斑が認められ平均評点0.33を示したが、2日目以降刺激性はみられなかった。何れの処方とも刺激性は軽度であり、連続5日間塗布による刺激性の増強は認められなかった(表3)。

考 察

アルコールベースの消毒薬は様々な製品が上市され、多様な剤形(液剤、ゲル剤など)や機能(保湿性や持続性など)の製品が利用可能となっている。消毒薬の薬効評価は、これまでメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)などの細菌に焦点が当てられてきたが、現在ではインフルエンザウイルスやノロウイルスの感染拡大に伴いウイルスに対する評価の重要性が高まってきている。アルコールベースの消毒薬は一般的にインフルエンザウイルスをはじめとするエンベロープを有するウイルスに対しては十分な薬効を有するが、ノンエンベロープウイルスには十分な有効性を示さないことが指摘されている^{7,8)}。つまり、医療機関の様々な診療科で種々のアルコールベースの消毒薬が汎用に使われているが、一部のウイルスに対し十分な効力が得られていない可能性がある。これまでもアルコールベースの消毒薬の有効性改善策について報告があるが、有効性に加え手指皮膚への安全性に関する纏まった報告は見受けられない。そこで、我々は消毒用エタノールを製剤改良することにより、細菌、真菌及びノンエンベロープウイルスも含む各種微生物群に対し即効性を示し且つ皮膚への影響を軽減できる消毒薬の創出を試みた。

ノロウイルスに対する有効性評価として、細胞培養系が確立されていないノロウイルスに代わり近縁ウイルスであるネコカリシウイルスを用い評価を行った結果、消毒用エタノールが1分の作用で1 log の不活化しか認めなかったのに対し、エタノールに有機酸を組み合わせた処方 A1, A2 は30秒で4 log 以上の不活化効果を認めた。これらの現象は、ウイルスに対する薬効が pH に依存するとされる Duizer ら⁹⁾の報告内容とも合致する。また、エタノールに有機酸と亜鉛含有化合物を加えた処方 Z1, Z2 においても同様に高い有効性が確認された。よって、ネコカリシウイルスはエタノールの pH をコントロールすることで制御できる可能性が示唆された。一方、アデノウイルスに対する不活化効果は、エタノールに有機酸を組み合わせた処方 A type では、消毒用エタノールと比較して同等若しくは減弱する傾向にあり、ノンエンベロープウイルスに対する薬効は pH を低下させることで容易に増強できるものではないことが示された。一方、エタノールに有機酸と亜鉛含有化合物を加えた処方 Z type では、30秒で4 log 以上の不活化を示

表2 各種アルコールベース消毒薬のアデノウイルス(ADV-5)に対する不活化効果

処 方	log ₁₀ reduction	
	30 sec	1 min
A1 ^{a)}	1.00	2.83
A2 ^{a)}	0.66	1.33
A3 ^{a)}	0.66	1.00
Z1 ^{b)}	>5.00	>5.00
Z2 ^{b)}	>5.00	>5.00
消毒用エタノール	0.17	3.17
リン酸緩衝液	0.00	-0.17

a) 処方 A1：有効成分 83 v/v%エタノール、添加剤 1%乳酸、1%クエン酸、イソプロパノール(pH 3.6)、処方 A2：(pH 3.9)、処方 A3：(pH 4.2)

b) 処方 Z1：有効成分 83 v/v%エタノール、添加剤 1%乳酸、0.1%クエン酸、0.1%硫酸亜鉛、イソプロパノール(pH 3.4)、処方 Z2：(pH 3.8)

表3 ウサギ皮膚刺激性試験

投 与 液	皮膚刺激性(総平均評点) ^{c)}					
	投与開始日数					回復期間 3日目
	1	2	3	4	5	
処方 A1 ^{d)}	0.33	1.33	0.33	0.33	0.33	0.00
処方 Z1 ^{e)}	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
消毒用エタノールゲル	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.33
変性消毒用エタノール	0.33	0.00	0.33	0.33	0.33	0.00

c) 皮膚刺激性の評点は3羽の平均値

d) 処方 A1：有効成分 83 v/v%エタノール、添加剤 1%乳酸、1%クエン酸、イソプロパノール(pH 3.6)

e) 処方 Z1：有効成分 83 v/v%エタノール、添加剤 1%乳酸、0.1%クエン酸、0.1%硫酸亜鉛、イソプロパノール(pH 3.4)

し、処方 Z type の高い有効性が確認された。有機酸、硫酸亜鉛単独においてもノンエンベロープウイルスに対する薬効が認められず(データ未掲載)、エタノールにいずれか一方を組み合わせた場合においてもアデノウイルスとネコカリシウイルスの両方に効果を示す処方を確認することが出来なかったことから、ノンエンベロープウイルスに対し広域な有効性を発揮するためには、有機酸のみならず亜鉛含有化合物の添加も必要であることが明らかとなった。しかし、現段階では、これらの現象を説明できる知見は存在せず、詳細な作用メカニズムに関しては不明である。

さらに、消毒薬の適用部位となる手指皮膚への影響評価は、実使用の場面で特に重要な要因であることから、今回我々はウサギ皮膚に対する製剤の刺激性を評価した^{1,2,10)}。エタノールに有機酸と亜鉛含有化合物を加えた処方 Z1 においては、投与期間中及び回復期間後のいずれにおいても刺激の上昇は認められず、高い安全性が示された。亜鉛化合物は古くから皮膚疾患の治療薬として汎用されており、皮膚機能の正常化維持に様々な機能(収斂、消炎及び保護作用)を有することが知られ、上記のような結果に結びついたものと推測される。

アルコールベースの消毒薬の薬効は、即効的かつスペクトラムが広いことに加え、速乾性であるという特性¹¹⁾を有することから、感染対策上、非常に重要な薬剤である。しかし、既存のアルコール製剤は、従前の石けん・流水という手法と比較して物理的な洗浄効果は低いことから、一部薬効が不十分なウイルスなどの病原体に対するリスクが懸念されていた。今回、本検討を通じて、アルコールに有機酸および亜鉛含有化合物を添加することによりノンエンベロープウイルスに対する薬効を増強できることが明らかとなった。更に、薬効面からの利点のみではなく、皮膚への安全性にも配慮したアルコールベースの消毒薬は、手指衛生のコンプライアンス向上にも繋がり、感染制御において新たな付加価値を提供できるものと考えられる¹²⁾。

利益相反について：利益相反はない。

文 献

- 1) Boyce JM, Pittet D; Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force: Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Am J Infect Control 2002; 30(8): S1-46.
- 2) 厚生労働省医政局指導課長：医療施設における院内感染の防止について。医政指発第 0201004 号, 2005.
- 3) Lages SL, Ramakrishnan MA, Goyal SM: *In-vivo* efficacy of hand sanitizers against feline calicivirus: a surrogate for norovirus. J Hosp Infect 2008; 68: 159-63.
- 4) 塩田 洋, 大野重昭, 青木功喜, 安積 淳, 石古博昭, 井上幸次, 他：アデノウイルス結膜炎院内感染対策ガイドライン。日眼会誌 2009; 113(1): 25-46.
- 5) Draize JH, Wood G, Calvery HO: Methods of the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharmacol Exp Ther 1944; 82: 377-90.
- 6) 池田良雄, 堀内茂友, 吉本浜子, 降矢 強, 川俣一也, 金子豊蔵：皮膚刺激試験法の検討。医薬品研究 1970; 1(1): 23-27.
- 7) Gehrke C, Steinmann J, Goroncy-Bermes P: Inactivation of feline calicivirus, a surrogate of norovirus (formerly Norwalk-like viruses), by different types of alcohol *in vitro* and *in vivo*. J Hosp Infect 2004; 56(1): 49-55.
- 8) 佐藤隆一, 和田秀巳, 滝沢真紀, 横田勝弘：各種アルコール系消毒薬の評価。医学と薬学 2003; 49(5): 713-24.
- 9) Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M: Inactivation of Caliciviruses. Appl Environ Microbiol 2004; 70(8): 4538-43.
- 10) 辻 明良, 三野宮文子, 八代純子, 中島祥吉, 五島瑳智子：ウサギを用いた各種医療用消毒剤の皮膚刺激性に関する比較検討。環感染誌 1996; 11(3): 207-20.
- 11) 山下 勝：アルコール類の微生物に対する作用。防菌防黴 1996; 24: 195-219.
- 12) 消毒剤：特許第 4163249 号。

〔連絡先〕〒538-0042 大阪市鶴見区今津中 2-2-18
丸石製薬株式会社中央研究所 岡本一毅
E-mail: kazuki_okamoto@maruishi-pharm.co.jp

Improvement of Effectiveness of New Alcohol-based Hand Rubs Against Nonenveloped Viruses

Kazuki OKAMOTO, Junji OKUNISHI, Yukihiro WATANABE, Yutaka NISHIHARA and Masahiro IKEDA

Maruishi Pharmaceutical Co., Ltd., Central Research Laboratories

Abstract

Alcohol-based disinfectants are now widely used, including in some key roles for hand hygiene, but have not yet satisfied clinical needs. For example, the spread of nonenveloped viruses such as norovirus sometimes causes social problems, but alcohol-based disinfectants do not have sufficient effect against nonenveloped viruses. This study investigated inactivation of nonenveloped viruses (*in vitro*) and skin irritation (*in vivo*) by a series of new alcohol-based disinfectants containing organic acids and zinc compounds. Addition of organic acids showed efficacy against the human norovirus surrogate feline calicivirus (FCV) by inactivation of 4 log reduction or more within 30 seconds of exposure time and almost the same efficacy against adenovirus as ethanol for disinfection. On the other hand, addition of organic acid and zinc compound showed efficacy for inactivation of the virus of more than 4 log reduction against FCV and adenovirus within 30 seconds. Alcohol-based formulations combined with some organic acids and zinc compound reduced skin irritation of the rabbit. We conclude that new alcohol-based disinfectants containing organic acids and zinc compounds have improved effectiveness against nonenveloped viruses and better skin care.

Key words : alcohol-based disinfectant, nonenveloped virus, effects on the skin, organic acid, zinc compound