

アルコール類のウイルス不活化作用に関する研究 エタノール消毒における生体試料の影響

岐阜県衛生研究所

渡辺 実 野田 伸司 山田不二造

北里大学衛生学部

藤 本 進

(昭和55年12月10日受付)

(昭和56年2月10日受理)

Key words: Ethyl alcohol, Virucidal activity, Organic materials, Water content of material

要 旨

生体試料中のウイルスに対するエタノールの不活化作用について研究を行った。

エタノールの反応に十分な水分が含まれている限り、液相および固相、いずれの生体試料中においても、エタノールのウイルス不活化作用は、エタノールの濃度に比例して上昇する。血清原液およびPBS中のポリオウイルスは、いずれも90%エタノールによつて10秒で不活化を受けるが、70%エタノールによつては、前者は1分、後者は10分、即ち10倍の感作時間を必要とし、血清による阻害効果が著明であつた。また凝固家兎血液およびHeLa細胞に感染したポリオウイルスは、いずれも90~99.5%エタノールにより速やかに感染価の低下が示されるが、80%以下の濃度では不活化の進行は緩やかであつた。

これに対し乾燥血清中のウイルスには、高濃度のエタノールによる不活化効果は低く、99.5%エタノールには殆どウイルス不活化作用は認められなかつた。しかしこの条件下においても70~80%エタノールのウイルス不活化効果は最強ではなく、乾燥血清中のNDVおよびワクチニアウイルスは40~60%エタノールによつて最も高い不活化効果が示された。

最も効果的な消毒が要求される場合には、被消毒物件の水分およびウイルスの種類に応じたエタノール濃度の選択が必要と思われる。

はじめに

エタノールは多くの古典的な消毒薬が、新たな消毒剤の開発に伴い、姿を消してゆく中で、その速やかな殺菌性と低毒性、低腐蝕性等の利点から、医療機関および微生物類を取扱う研究機関で、身近な消毒剤として高い頻度で使用されている。

我々はこれ迄に蒸留水およびリン酸緩衝液(以下PBS)中のエンテロウイルスに対するエタノールの不活化効果について検討を行つてきた^{1,2)}が、現実に消毒の対象となるウイルスは、精製ウイルスを除き、全て生体試料(実験動物および組織培養を含む)中に存在することを考慮して、本報においては、各種の生体試料中に含まれるウイルスに対する、エタノールの不活化効力について研究を行った。またエタノール消毒における至適濃度については、Beyer³⁾(1911)の乾燥材料中のプ

ドウ球菌に対するエタノール消毒の研究から、70%最強説が提唱されたが、その後 Morton⁴⁾ (1950) は湿じゆんな状態の球菌および桿菌を用い、95%エタノールが最も効果的であることを認めた。また Smith⁵⁾ (1947) は生喀痰中の結核菌に対しては95~100%エタノール、乾燥喀痰中においては50%エタノールが最強であることを述べている。我国においては、今日なお多くの成書指針の中に、条件を無視した70%最強説が見うけられる。本報においてはこれらの観点からも、液相および固相の含水物件および乾燥物件中におけるエタノールの至適殺ウイルス濃度についても検討を加えた。

材料と方法

ウイルス、Polio 1 型 (Mahoney 株), Enterovirus 70 (G-10/72株), NDV (佐藤株), Vaccinia (大連 I 株) の各ウイルスを HeLa 細胞に接種し、細胞変性効果 (CPE) 出現後、細胞の脱落前に維持液 (M.M) を PBS に換え、凍結融解後にその遠沈上清を -20°C に保存した。ウイルス感染価は、 10^{5-6} TCID₅₀ になるように PBS を用い調整した。

不活化実験

1. 液相；液性の生体試料、血清、脱線維血、尿、涙液 (乳児)、および PBS 9 に対し上記ウイルス液を 1 の割に混合し、その 0.1ml に各濃度のエタノールを 0.9ml 加え、一定感作時間毎に蒸留水 9.0ml を加え反応の停止および培養細胞に対する毒性の除去を行つた。血清および脱線維血はエタノールにより沈澱を生ずるが蒸留水を加えることにより速やかに溶解し、可視的な沈澱物は認めなかつた。対照として生体試料と同量の PBS を用いた。全ての試料は反応停止後、バイブレーターおよびピペット操作により十分攪拌し、HeLa 細胞に接種された。全ての操作は 20°C の恒温水槽中で行われた。

2. 凝固血および感染細胞：Polio-1 型ウイルスを含む凝固家兎血液 0.2ml を管底に入れた試験管および同ウイルス感染 6 時間後に PBS で洗浄し PBS を完全に除去した HeLa 細胞試験管

に、各濃度のエタノールを満し、一定感作時間毎にエタノールを除き M.M 2.0ml を加えアセトドライアイスで凍結し反応を停止させた。同試料を超音波処理 (10 KC 10分) した後、遠沈し、その上清中の残存ウイルス感染価を試験管法により測定した。全ての操作は 20°C の恒温水槽中で行われた。

3. 乾燥試料：NDV または Vaccinia ウイルスを含む仔牛血清 0.1ml を 30ml の広口びんの底面に拡げ、室温 (20~25°C) で 3~5 時間乾燥を行つた。この乾燥血清フィルムの全面を覆うように各濃度のエタノール 1.0ml を加え、一定感作時間ごとに、蒸留水 9.0ml を加え、直ちにバイブレーターおよびピペットで十分攪拌、反応を停止し、生残ウイルスの感染価を試験管法で測定した。全ての操作は室温 (20~25°C) で行われた。

成績

1. 液体試料 各種の液性の生体試料、および PBS 中のポリオウイルスに対する、エタノールの不活化作用は、Table 1 に示す通りである。高濃度のエタノールによるウイルスの不活化には、生体試料による阻害の程度は低く、90%エタノールは、血清および尿中のウイルスを、PBS 中と同様に 10 秒で不活化し、全血中のウイルスも 30 秒で不活化が認められた。これに対し低濃度のエタノールは、生体試料によりウイルス不活化効果の阻害をうけ易く、60%エタノールでは、PBS 中のポリオウイルスは 5 分で不活化をうけるが、血清および尿中では 60 分を必要とし、全血中では 60 分の感作では生残が認められた。表には示さなれいが、涙液中の Ent-70 (AHC) ウイルスは PBS 中と同様 50%エタノールによつて 10 秒で不活化をうけ、涙液による阻害効果は認められなかつた。

2. 凝固血 感染価 $10^{5.5}$ TCID₅₀ のポリオウイルスを含む凝固家兎血液 0.2ml に対するエタノールの作用は、Fig. 1 に示す通りである。60 分感作においては 99.5%エタノールによつては、生残ウイルスの感染価は $10^{1.8}$ TCID₅₀ に低下が認められるが、70~90%エタノールによつては、

Table 1 Virucidal Effect of Ethanol on Polio Virus Type 1 in Liquid Organic Materials. 20°C

Organic Material	Duration of Contact	Ethanol % by vol.				
		90	80	70	60	50
Urine	10 sec	-	+	+	+	+
	30	-	+	+	+	+
	1 min	-	+	+	+	+
	5	-	-	+	+	+
	10	-	-	-	+	+
	30	-	-	-	+	+
	60	-	-	-	-	+
Calf Serum	10 sec	-	+	+	+	+
	30	-	+	+	+	+
	1 min	-	-	+	+	+
	5	-	-	+	+	+
	10	-	-	-	+	+
	30	-	-	-	+	+
	60	-	-	-	-	+
Defibrinated Rabbit Blood	10 sec	+	+	+	+	+
	30	-	+	+	+	+
	1 min	-	+	+	+	+
	5	-	-	+	+	+
	10	-	-	+	+	+
	30	-	-	-	+	+
	60	-	-	-	+	+

- Inactivation + Survival
 - - - Range of Inactivation in PBS

10^{3.5}~10^{4.8} TCID₅₀ の比較的高い感染価の維持が認められた。120分感作では、99.5%エタノールによつては、完全不活化がみられ、90%エタノールによつても、わずかに10^{0.5} TCID₅₀ の感染価が示されるのみであった。これに対し70%および80%エタノールによつては、不活化の進行は緩徐であり、生残ウイルスはなお10^{3.5} TCID₅₀ および10^{4.0} TCID₅₀ の感染価を示した。

3. 感染細胞 感染 HeLa 細胞中のポリオウイルスのエタノールによる不活化は、Fig. 2に示すように概ね凝固血中のウイルスと同様の傾向が認められる。90および99.5%エタノールによる不活化は極めて速やかで、1分後の感染価はい

Fig. 1 Virucidal Effect of Ethanol on Polio virus type 1 in Rabbit Blood Clot

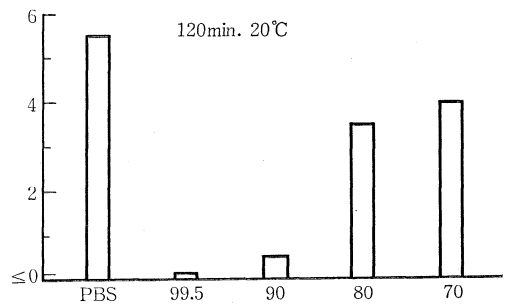
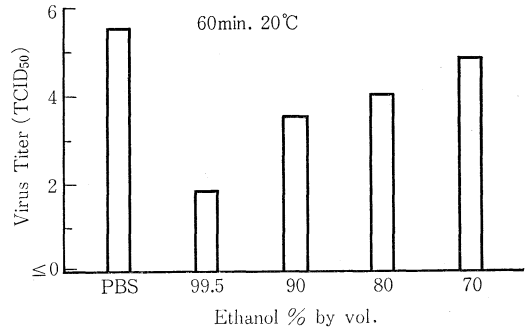
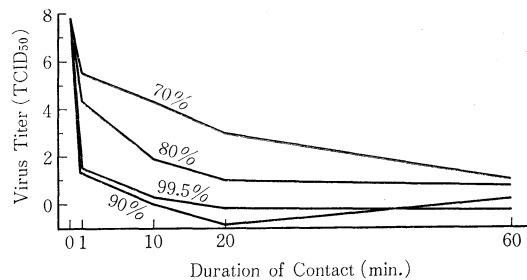


Fig. 2 Virucidal Effect of Ethanol on Polio Virus Type 1 in Infected HeLa Cell Sheet (20°C)



ずれも10^{1.3} TCID₅₀ であり、対照の10^{7.8} TCID₅₀ に比べ、10⁶以上の感染価の低下が示された。70%および80%エタノールによつては、それぞれ：10^{5.5}および10^{4.3} TCID₅₀ の感染価が認められた。さらに20分感作においては、90%および99.5%エタノールによつて、感作価は10⁰ TCID₅₀ 以下に低下するが、70%および80%エタノールによつては、それぞれ、10^{3.0} TCID₅₀ および10^{1.0} TCID₅₀ の感染価が認められた。

Fig. 3 Virucidal Effect of Ethanol on NDV in Dry Smear of Calf Serum (room temp.)

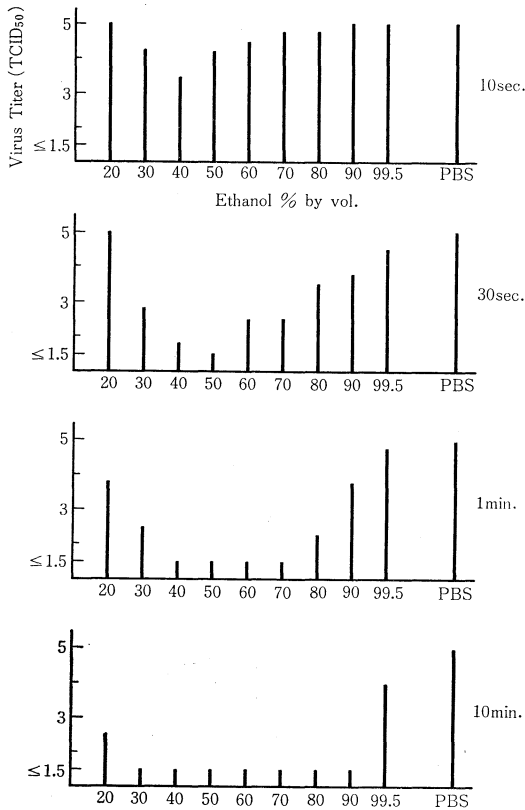
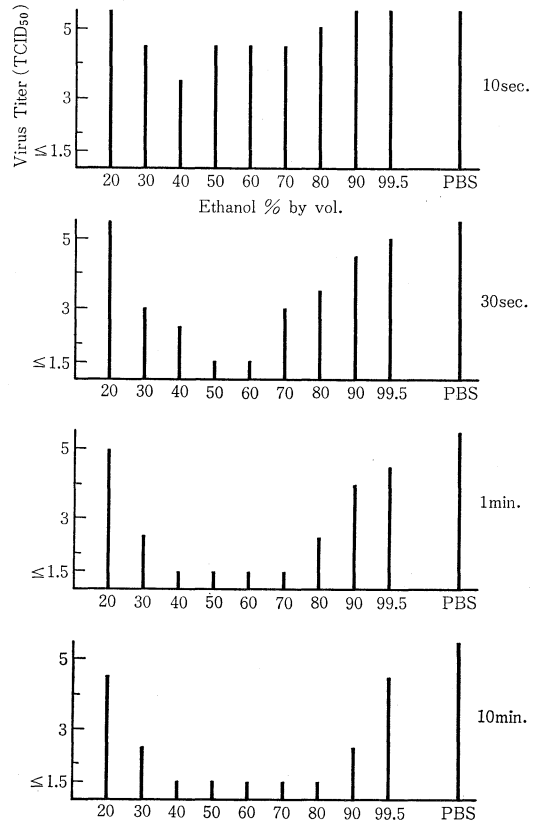


Fig. 4 Virucidal Effect of Ethanol on Vaccinia Virus in Dry Smear of Calf Serum (room temp.)



4. 乾燥血清 NDV およびワクチニアウイルスを含む乾燥仔牛血清に対する、エタノール処理の成績は、Fig. 3, Fig. 4 に示す通りである。乾燥血清中のウイルスに対しては、高濃度のエタノールには反つて不活化効力の低下が示され、99.5%エタノールには、10分感作においても、いずれのウイルスに対しても、殆んど不活化効果は示されなかつた。最も高い不活化効果の示されるエタノール濃度は、NDV は10秒感作では40%、30秒感作では50%、ワクチニアウイルスでは10秒感作では40%、30秒感作では50~60%であり、30秒感作ではいずれのウイルスも検出限界以下に感染価は低下した。70~80%エタノールによつては、10秒感作ではいずれのウイルスにも感染価の低下はみられず、1分感作では70%エタノールは両ウイルスの感染価を検出限界以下に低下せしめたが、

80%エタノールでは NDV $10^{2.3}$ TCID₅₀ およびワクチニア $10^{2.5}$ TCID₅₀ の感染価が認められた。

考 察

本研究の前報において、各種の親水性および親油脂性ウイルスは、全てエタノールの濃度に正比例的に不活化をうけることを報告した。本報においても、水分を含む生体試料中に存在するウイルスは90~99.5%の高濃度エタノールにより、最も高い不活化作用をうける、即ち90%エタノールは血清、尿等の液性試料中に存在するポリオウイルスを、PBS 中の同ウイルスと同様、10秒以内で不活化し、生体試料による不活化の障害を殆どうけない。これに対し80%以下のエタノールでは、生体試料による不活化の障害がみられ、その影響は低濃度のエタノールに著明に認められた。

凝固血、感染細胞等の固相の生体試料中におい

ても、ほぼ同様の傾向がみられるが、90%以上の濃度のエタノールおよび80%以下のエタノールの間には、著しい不活化効力の差が認められた。これらの成績は Smith⁵⁾ の喀痰中の結核菌についての研究および Morton⁶⁾ の動物組織中のチフス菌に対するエタノール消毒に関する研究の成績と一致し、ウイルスにおいても細菌類と同様に、エタノールの反応に十分な水分を含む状態においては、エタノール濃度の高いほど、不活化効力の高いことが認められる。

しかし乾燥物件中のウイルスに対しては、高濃度のエタノールにはかえつて不活化効力の低下がみられ、乾燥血清フィルム中の NDV およびワクチニアウイルスに対しては40~60%エタノールの不活化効果が最大であり、30秒感作で本実験条件下では検出限界以下に不活化をうける。80%エタノールによつて同程度に感染価を低下せしめるには、10分即ち20倍の感作時間を要した。同様の傾向が Smith⁵⁾ および Croshaw⁷⁾ により、乾燥喀痰中の結核菌について認められている。乾燥血清中のウイルスにエタノールが接触するには、まず血清の溶解が必要であり、溶解効率エタノール中の水分量に比例し、ウイルス不活化効果はエタノール含量に比例するため、試料の溶解効率およびウイルスのエタノール感受性の相関により、至適濃度は決められるものと思われる。

日本薬局法の消毒用エタノールは、76~81%の濃度が決められており、多くの成書、指針もこの濃度を中心とした70~80%エタノールの使用を指示している。日本薬局法注解⁸⁾によれば、この濃度の至適性の理由として、一つは皮膚に対する刺激および脱脂等の副作用を避けることをあげているが、同時に至適不活化濃度の根拠として、Price⁹⁾の研究においてエタノールの *St. albus* に対する不活化作用のピークが70~80%にあることを引用している。しかし同論文は、*St. aureus* に対しては90%エタノールは70~80%エタノールと同程度の不活化を示し、*E. coli* に対しては90%エタノールが勝る成績を示している。

エタノールの副作用を無視し得る条件、即ちウ

イルスを含む排泄物、生体試料等によつて汚染をうけた器具、施設等の迅速な消毒に際しては、より高濃度のエタノールの使用が合理的であろう。特にエタノール抵抗性の強い特定のエンテロウイルス、Cox. A-16. Ent-71 等およびアデノウイルスに対しては消毒用エタノールによる短時間の不活化は不可能である。

現実には被消毒物件に付着する微生物の種類および含水状態の不明な場合が多いことから、あらゆる条件に対応するための便宜的な濃度として、70~80%の使用を否定するものではないが、この濃度は含水、乾燥いずれの条件下においても最強の殺ウイルス濃度ではないことを強調しておきたい。

御校閲をいただきました岐阜大学医学部鈴木祥一郎教授に深甚なる謝意を表します。

なお、本論文の要旨は第54回日本感染症学会総会において報告した。

文 献

- 1) 渡辺 実, 野田伸司, 山田不二造, 藤本 進: エンテロウイルスに対する消毒薬の効果. 岐阜衛研所報, 20: 1—5, 1975.
- 2) 野田伸司, 渡辺 実, 山田不二造, 藤本 進: アルコール類のウイルス不活化に関する研究. I. ウイルスに対する各種アルコールの不活化効果について, 感染症誌, 55: 10—21, 1981.
- 3) Beyer, A.: *Alkohol-desinfektion*, Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr., 70: 225, 1911.
- 4) Morton, H.E.: The relationship of concentration and germicidal efficiency of ethyl alcohol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 53: 191—196, 1950.
- 5) Smith, C.R.: Alcohol as a disinfectant against the tubercle bacillus. *Public Health Rept.*, 62: 1285—1295, 1949.
- 6) Morton, H.E.: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1968, 237—252.
- 7) Croshaw, B.: *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell*, Hugo, W.B. Acad. Press. London, 1971, 430.
- 8) 日本公定書協会: 日本薬局法解説書, 第9改正, 広川書店, 1976, p. D-85~86.
- 9) Price, P.B.: Reevaluation of ethylalcohol as germicide. *Arch. Surg.*, 60: 492—502, 1950.

Virucidal Activity of Alcohols
Virucidal Efficiency of Ethanol on Viruses in Organic Materials

Minoru WATANABE, Nobuji NODA & Fujizo YAMADA

Gifu Prefectural Institute of Public Health, Noishiki 4 Chome, Gifu, Japan

Susumu FUJIMOTO

Department of Hygiene, Kitasato University, Sagamihara, Kanagawa, Japan

The inactivation of viruses by ethanol in organic materials was investigated.

Viral inactivation in liquid materials was determined by mixing 0.9 ml of ethanol with 0.1 ml of Polio virus in undiluted materials. At the end of the test period 9.0 ml of distilled water was added to stop the action of ethanol and to avoid toxicity for cell culture. The percentages of ethanol recorded in the tables indicate final concentrations diluted with the virus material. Inactivation of Polio virus in a clotted rabbit blood and Hela cell sheet were carried out by filling a test tubes containing these materials with ethanol. At the end of sensitization, it was replaced immediately by 2.0 ml of M.M. and was frozen by acetone dry ice. After sonication these materials were centrifuged and the supernatant were used for estimation of surviving viruses. Inactivation of viruses in dry materials was determined by pouring 1.0 ml of ethanol on dry calfserum smear containing known titer of NDV and Vaccinia virus on the bottom of wide mouth bottle. At the end of test period 9.0 ml of distilled water was added for dilution of toxicity and cessation of the action of ethanol.

The virucidal activity of ethanol on viruses in either humoral or solid organic materials increased with the increase of concentration of ethanol, when these materials contained water sufficient for the action of ethanol. By 90% ethanol Poliovirus type 1 in an undiluted calfserum was inactivated so rapidly as in PBS, but 70% ethanol required more than ten times of sensitizing period, compared with in PBS. A similar phenomenon was observed in solid materials. Polio virus in an infected Hela cell sheet having titer of $10^{7.8}$ TCD, reduced its infectivity to $10^{1.5}$ TCD, by exposure to 99.5% ethanol for one minute, whereas by 70% ethanol it remained at the titer of $10^{5.5}$ TCD. Polio virus in blood clot was inactivated almost similarly as in Hela cell sheet.

On the other hand when viruses were in dry materials rather low concentration (40-60%) of ethanol was more effective than the higher concentrations, though the highest efficiency depended on the susceptibility of the each viruses to ethanol.
