

# 塩化ベンザルコニウムを有効成分とする手指消毒剤の ウイルスに対する有効性

柳曾 聡美<sup>1)</sup>, 戸部 聖一<sup>2)</sup>, 山下 知佳<sup>1)</sup>, 尾谷 明希<sup>1)</sup>,  
古賀 丈一郎<sup>1)</sup>, 柿澤 恭史<sup>2)</sup>

ライオン株式会社<sup>1)</sup> ビューティケア研究所, <sup>2)</sup> 先進解析科学研究所  
(〒132-0035 東京都江戸川区平井 7-2-1)

## Virucidal Activity of Sanitizers Containing Benzalkonium Chloride

Satomi Yanaso<sup>1</sup>, Seiichi Tobe<sup>2</sup>, Chika Yamashita<sup>1</sup>, Aki Otani<sup>1</sup>,  
Takeichiro Koga<sup>1</sup>, Yasushi Kakizawa<sup>2</sup>

### Abstract

To prevent the infectious disease from spreading, hand hygiene such as hand washing or using disinfections is one of the most effective ways to cut off the route of transmission. In this study, we evaluated the virucidal activity of benzalkonium chloride solution with and without certain additives. Our findings suggested that the inclusion of a specific amount of lauryl amine oxide did not significantly affect the effectiveness of benzalkonium chloride, unlike polyoxyethylene lauryl ethers and hydrogenated castor oil. It was also demonstrated that commercially available sanitizers containing 0.05 w/v% benzalkonium chloride showed more than 4 log<sub>10</sub> reduction against influenza A virus (H1N1) and SARS-CoV-2 even without ethanol. As a result, using appropriate disinfection is effective measure to reduce the risk of infection.

**Keywords** : Sanitizer, Influenza, SARS-CoV-2, Benzalkonium chloride, Lauryl amine oxide

Received June 12, 2023; accepted July 3, 2023

---

<sup>1)</sup> Beauty Care Research Laboratories, LION Corporation

<sup>2)</sup> Advanced Analytical Science Research Laboratories, LION Corporation  
7-2-1, Hirai, Edogawa-ku, Tokyo, 132-0035, Japan

## 1. 緒言

近年、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) による感染症 (COVID-19) が全世界に拡大し<sup>1)</sup>, パンデミックが引き起こされた. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は 2023 年 5 月より感染症法上 2 類相当から 5 類への移行されたものの<sup>2)</sup>, 未だ世界的感染者数が多い状態である<sup>3)</sup>. インフルエンザやノロウイルス等によるウイルス性の感染症はこれまでも繰り返し流行しており, これらのウイルスに感染すると高熱や激しい嘔吐, 下痢などの重い症状を発症するため, 感染予防に対する生活者の意識は非常に高い. 感染予防のためには (1) 感染源の排除, (2) 感染経路の遮断, (3) 宿主抵抗力の向上が有効であるが, COVID-19 のように新しい病原体または変異を繰り返すウイルスによる感染症の場合, 短期での免疫形成は困難であり, また特效薬が存在しない. そのため感染拡大を抑えるためには感染経路への対策が重要であり, とくに接触感染リスクを低減するためには手洗いや手指消毒が有効とされている<sup>4)</sup>.

指定医薬部外品としての外皮消毒剤ではエタノール (76.9-81.4 vol%) または塩化ベンザルコニウム (BC) 0.05 w/v% などが有効成分として認められている<sup>5)</sup>. 市販の手指消毒剤ではエタノール製剤, または低濃度のエタノールと BC を含む製剤が一般的であり, エンベロープ型ウイルスの不活化効果が確認されている<sup>6-8)</sup>. エタノールはアルコール過敏症の人や手に傷がある人にとってはかゆみや痛みを引き起こす原因となることもあり, 手指消毒の習慣化に繋がりにくい. そこでエタノールを含まず, BC のみを有効成分とした製剤について検討した. 一般的に製剤の安定化や使用性確保のために溶剤や高分子, 界面活性剤等が活用される. しかし BC は陽イオン性であるため, 陰イオン性の高分子や界面活性剤が系内に存在すると BC の本来の機能を発揮できない場合がある. また非イオン性の界面活性剤の場合であってもミセル内に取り込まれることなどによって同様の影響がある場合があることが分かっている<sup>9,10)</sup>. そこで今回 BC と種々の非イオ

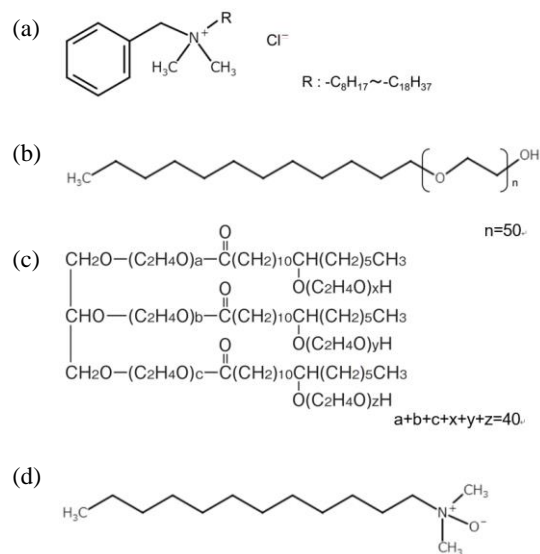
ン性界面活性剤の組み合わせにおける機能として, インフルエンザウイルス不活化性能を検証した. その結果, 一般的なポリオキシエチレンラウリルエーテルやポリオキシエチレン硬化ヒマシ油と異なり, 中性付近で非イオン性の特徴を示すラウリルアミノオキッドは BC の効果を阻害しないことが分かったため報告する.

## 2. 試料と方法

### 2.1 モデル水溶液のインフルエンザウイルス不活化試験

#### 2.1.1 試料

インフルエンザウイルス Influenza A virus A/PR/8/34 (H1N1) ATCC VR-1469 および培養細胞 Madin-Darby canine kidney cell (MDCK 細胞) ATCC CCL-34 はアメリカンタイプカルチャーコレクションより入手した. 牛血清由来アルブミン (BSA) は富士フィルム和光純薬社のフラクション V を用い, その 0.3 g を 9.7 mL の水に溶解して 3% 溶液とした. 培養液の E-MEM は富士フィルム和光純薬社より入手し, シグマアルドリッチ社のペニシリンストレプトマイシン溶液を 1/100 量添加して使用した.



**Fig. 1** Molecular structure of surfactants. (a) Benzalkonium chloride, (b) Polyoxyethylene lauryl ethers, (c) PEG-40 hydrogenated castor oil, (d) Lauryl amine oxide

BC はナカライ社の試薬を使用した。ラウリルアミノオキシドはグローバル・アミンズ・ジャパン社より、ポリオキシエチレンラウリルエーテルはエチレンオキシド平均付加モル数 50 となる EMALOX 750 を日本エマルジョン社より、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油はエチレンオキシド平均付加モル数 40 となるユニオックス HC-40 を日油社より入手し、滅菌水で希釈して各試料を調製した。各界面活性剤の化学構造式を Fig. 1 に示す。

### 2.1.2 試験方法

インフルエンザウイルス液の調製および不活化の評価は SARS-CoV-2 に対する各界面活性剤の不活化効果を評価した製品評価技術基盤機構 (nite) の試験法<sup>11)</sup>に準じて次のとおり実施した。MDCK 細胞にインフルエンザウイルスを播種して培養し、インフルエンザウイルスの分散する培養液を遠心分離して上清を分取してポアサイズ 0.2 ミクロンのフィルターでろ過し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。解凍後に E-MEM を 0~9 倍量および BSA 3% 溶液を 0~9 倍量添加して反応に供した。試料の対照は E-MEM とした。反応は試料 0.27 mL に対してウイルス液を 0.03 mL 混合して室温で 30 秒静置し、その 0.05 mL を SCDLP 培地 0.45 mL に添加して反応を停止し、さらに E-MEM にて順次 10 倍希釈した ( $n=3$ )。試料と SCDLP 培地を予め混合した後にウイルス液を添加して  $\text{TCID}_{50}$  法にて感染価を測定したところ細胞毒性の影響を受けずにウイルス感染が認められたことから本法を用いて各反応後の感染価を測定した。ウイルス不活化の指標となる  $\Delta \log$  値は次のとおりとし、検出限界となる  $\Delta \log$  値の最大を 4.3 とした。

$\Delta \log$  値：対照の感染価の対数值 - 試料の感染価の対数值

ラウリルアミノオキシドの臨界ミセル濃度 (cmc) は MicroCal 社の等温滴定型カロリメータ VP-ITC システム (ITC) を用いて 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 中で求めた<sup>12)</sup>。

## 2.2 製剤のウイルス不活化試験

### 2.2.1 試料

製剤のウイルス不活化試験は一般財団法人日本繊維製品品質技術センターにて実施した。インフルエンザウイルスと宿主細胞は 2.1.1 と同様のものであるを使用した。Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) NIID 分離株; JPN/TY/WK-521 は国立感染症研究所より、宿主細胞 VeroE6/TMPRSS2 は JCRB 細胞バンクより入手した。牛血清由来アルブミン (BSA) フラクシオン V 及び培養液の E-MEM, D-MEM はシグマアルドリッチ社より入手した。市販手指消毒剤 (いずれも指定医薬部外品, 有効成分 0.05 w/v% BC) には製剤 A: ライオン薬用ハンドジェル, 製剤 B: ライオン薬用消毒ハンドスプレー, 製剤 C: ハセコールミスト, 製剤 D: ライオン薬用消毒ハンドジェルプラスを用いた。

### 2.2.2 試験方法

製剤のウイルス不活化効果試験は EN14476:2013+A2:2019<sup>13)</sup> 及び ASTM E1052-20<sup>14)</sup> に準じて次のとおり実施した。E-MEM で懸濁したウイルス液に 0.3% BSA を含有させたものと試験サンプルを 1:9 で混合し、十分に攪拌したのちに  $25^{\circ}\text{C}$  で 30 秒静置したものを試験液とした。インフルエンザウイルスの場合はその 0.5 mL を SCDLP 培地 4.5 mL に添加して反応を停止、E-MEM で 10 倍希釈系列を作製し、試験液 1 mL あたりのウイルス感染価を算出した ( $n=3$ )。SARS-CoV-2 の場合は停止液に SCDLP 培地を 2% FBS 含有 D-MEM で 10 倍希釈した溶液を用い、10 倍希釈系列は 2% FBS 含有 D-MEM にて作製した。試料の対照は滅菌超純水とした。試料と停止液を予め混合した後にウイルス液を添加してプラークアッセイ法にて感染価を測定したところ、細胞毒性の影響を受けずにウイルス感染が認められたことから本法を用いて各反応後の感染価を測定した。ウイルス不活化の指標となる  $\Delta \log$  値は、2.1.2 に記載の式と同様に算出した。

### 3. 結果

BC 0.05 w/v% の示す不活化効果は Table 1 のとおりで、BSA を含まないウイルス液に BC 0.05 w/v% を反応させた場合の  $\Delta \log$  値は 2.8 を示した。

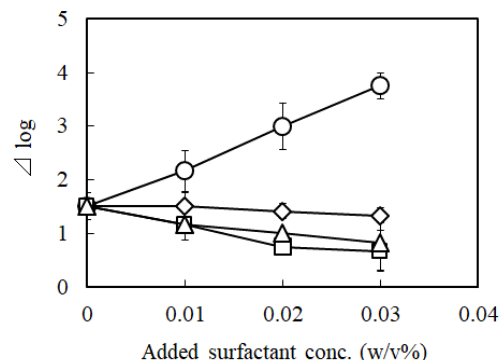
**Table 1.** Virucidal effect of BC solutions. Each sample included Influenza A virus (H1N1) was incubated for 0.5 min at room temperature. BC: benzalkonium chloride, BSA: bovine serum albumin.

BC (w/v%)	BSA (w/v%)	$\Delta \log$	
		Mean	SD
0.05	—	2.8	0.43
0.05	0.03	1.5	0.25
0.05	0.09	1.1	0.25
0.05	0.27	0.4	0.25

そこで  $\Delta \log$  値の検出限界値 4.3 を鑑みてより幅広い強度の不活化効果を把握するために、不活化効果を抑制する BSA を添加した。その結果、BSA の濃度が高まるほど  $\Delta \log$  値は低下した。今回の評価においては BSA を 0.03 w/v% 添加した  $\Delta \log$  値 1.5 が基準値として適切と判断し、以降の各界面活性剤の評価は BSA 0.03 w/v% を添加して実施した。

その結果、Fig. 2 に示すとおり BC 0.05 w/v% に同界面活性剤を 0.01~0.03 w/v% 上乘せしても  $\Delta \log$  値は同等の数値を示した。同様にポリオキシエチレンラウリルエーテルおよびポリオキシエチレン硬化ヒマシ油を混合したところ混合濃度が高まるほど  $\Delta \log$  値は低下し、0.03 w/v% 混合した場合は 0.67 および 0.83 まで低下した。一方でラウリルアミンオキシドを混合した場合には  $\Delta \log$  値の低下は認められなかった。ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、およびラウリルアミンオキシドのみ 0.01~0.03 w/v% の濃度で評価したところ Table 2 に示すとおり  $\Delta \log$  値は 1 以下であった。

ラウリルアミンオキシドの cmc は ITC の



**Fig. 2** Virucidal effect of BC solutions with each surfactant. ○: Lauryl amine oxide, ◇: BC, □: polyoxyethylene lauryl ethers, △: hydrogenated castor oil. Each sample included Influenza A virus (H1N1) was incubated with 0.03 w/v% BSA for 0.5 min at room temperature.

**Table 2.** Virucidal effect of various surfactant solutions. Each sample included Influenza A virus (H1N1) was incubated with 0.03 w/v% BSA for 0.5 min at room temperature. LE: Polyoxyethylene lauryl ethers, HCO: hydrogenated castor oil, AO: Lauryl amine oxide.

	LE	HCO	AO	$\Delta \log$	
				Mean	SD
	0.01			0	0.25
	0.02			-0.4	0.63
	0.03			-0.2	0.29
		0.01		0	0.25
		0.02		-0.1	0.14
		0.03		-0.3	0.29
			0.01	0.6	0.14
			0.02	0.5	0
			0.03	0.5	0

測定結果より約 0.04 w/v% (1.7 mM) と見積もられた。

以上より、ラウリルアミンオキシドは他の非イオン性界面活性剤と異なり、BC の不活化効果を阻害しないことが判明した。そこでエタノールを抜去しラウリルアミンオキシドを添加した製剤Dのウイルス試験を実施した。BC とエタノールを含有した製剤A~C及びエタ

**Table 3.** Virucidal effect of hand sanitizers against Influenza A virus (H1N1) and SARS-CoV-2. Tested in Japan Textile Products Quality and Technology Center (QTEC), each sample was incubated with 0.03 w/v% BSA for 0.5 min at 25°C.

Sanitizer	BC (w/v%)	Ethanol (v/v%)	AO (w/v%)	$\Delta \log$		Other ingredients
				Influenza A virus	SARS-CoV-2	
A	0.05	40	—	>5.6	>4.1	D-Sorbitol, Carbomer, KOH, Polyoxyethylene hydrogenated castor oil, Sodium hyaluronic acid
B	0.05	68	—	>5.6	>4.1	D-Sorbitol, KOH, Polyoxyethylene hydrogenated castor oil, Sodium hyaluronic acid
C	0.05	64	—	>5.6	>5.3	Glycerine
D	0.05	—	0.15	>5.4	>4.1	Propylene glycol, Phenoxyethanol, Carbomer, KOH, Fragrance

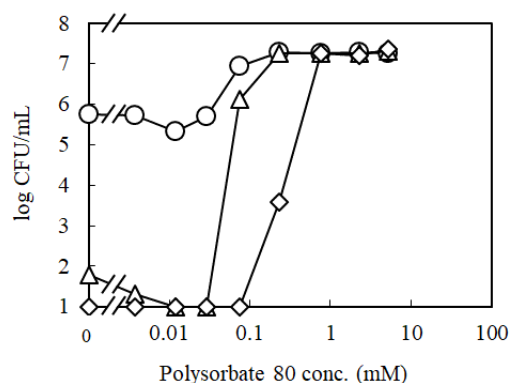
ノール非含有の製剤Dについて、エンベロープ型ウイルスであるインフルエンザ A 及び SARS-CoV-2 に対するウイルス不活化試験結果を Table 3 に示す。BC 0.05 w/v% 及びエタノール 40~68 vol% を含有する製剤A~Cは両ウイルスに対して  $\Delta 4 \log$  以上の高い不活化効果を示した。一方エタノールを含有しない製剤DにおいてもインフルエンザAウイルスに対して 5.4 以上、SARS-CoV-2 に対して 4.1 以上と高い  $\Delta \log$  値を示すことが明らかとなった。

#### 4. 考察

BC はインフルエンザウイルスや SARS-CoV-2 をはじめとしたエンベロープ型のウイルスに対して不活化効果を示すことが知られている<sup>6, 15, 16</sup>。本実験条件においても BC のインフルエンザウイルス不活化効果は認められ、BC 0.05 w/v% の不活化効果は BSA を含まない反応条件で  $\Delta \log$  値として 2 以上を示した。BC の不活化効果は BSA をはじめとして有機物の存在によって抑制されることが知られている<sup>11, 13</sup>。本評価では BSA を 0.03 w/v% 添加することによって範囲幅の広い不活化効果を把握することができた。

BC にノニオン界面活性剤であるポリオキシエチレンラウリルエーテルおよびポリオキシエチレン硬化ヒマシ油を混合した場合、そ

の濃度が高まるほど  $\Delta \log$  値は低下する傾向を示した。ノニオン界面活性剤はその cmc 以上で BC の殺傷効果を抑制することが知られている<sup>9, 10</sup>。例えば BC の殺菌および抗ウイルス効果の反応を停止させる SCDLP 培地にはノニオン界面活性剤であるポリソルベート 80 が 5 mM (0.7 w/v%) となる様に配合されている<sup>17</sup>。Fig. 3 に示すとおり、その cmc と想定される 0.012 mM 付近<sup>18</sup> より高濃度となる 5 mM の濃度として添加されると BC の殺菌効果は抑制されて生菌数 (log CFU/mL) は初発の状態を維持している。そのメカニズムとしてノニオン界面活性剤のミセル中に BC が抱合されて菌体への吸着が抑制されることが挙げ



**Fig. 3** Bactericidal effect of BC solutions with polysorbate 80<sup>10</sup>. BC concentration ○: 4.5 $\mu$ M,  $\Delta$ : 13.5 $\mu$ M,  $\diamond$ : 22.5 $\mu$ M. *E. coli* was incubated for 10 min at 25°C.

られている。ポリオキシエチレンラウリルエーテルおよびポリオキシエチレン硬化ヒマシ油の cmc は 0.01 w/v% 付近と見積もられる<sup>19,20)</sup>。BC の cmc はその主成分となるアルキル炭素数 12 における知見から 0.09 w/v% 付近と見積もられる<sup>19)</sup>。本評価における BC の濃度は 0.05 w/v% であって cmc 以下となることから、ポリオキシエチレンラウリルエーテルおよびポリオキシエチレン硬化ヒマシ油を 0.01~0.03 w/v% 添加するとそれらノニオン界面活性剤のミセルに BC が抱合されて不活化効果の抑制が生じたと考えられる。BC の殺菌効果を抑制する現象はエチレンオキシド付加モル数が大きくなるほど顕著である。本評価に用いたノニオン界面活性剤のそれぞれのエチレンオキシド平均付加モル数は 40 及び 50 であり、同様の現象が大きく現れたと考えられる。

一方、本評価系はウイルス液となる E-MEM の緩衝作用によって pH 7~7.5 でありラウリルアミンオキシドは非イオン性を示すにも関わらず、ラウリルアミンオキシドを混合した場合 BC の不活化効果は生じなかった<sup>21)</sup>。ラウリルアミンオキシドの cmc は 0.04 w/v% 付近と見積もられた。その結果から Fig.2 および Table 2 におけるラウリルアミンオキシドの濃度は cmc 以下となる。

ラウリルアミンオキシドは 0.05 w/v% におけるウイルス不活化効果が知られている<sup>11)</sup>。ラウリルアミンオキシド 0.01~0.03 w/v% ではウイルス不活化効果はほとんど示されなかった。ラウリルアミンオキシド自体のウイルス不活化効果は cmc 以上において生成したミセルがウイルス表面のリン脂質で構成されているエンベロープを可溶化してウイルスを破壊するなどのメカニズムが働いているのではないかと考えられる。

市販消毒剤 A~D は全て  $\geq 4 \log$  以上の高い不活化効果を示した (Table 3)。これまで 40 v/v% 以上のエタノール及び BC 0.05 w/v% と低濃度エタノールの組み合わせがエンベロープ型ウイルスに対して効果があることは知られていたが<sup>6)</sup>、本研究ではエタノールを含有

しない製剤 D においても A~C と同様に高い不活化効果が認められ、エタノールを含有しない製剤の開発に成功した。

## 5. 結言

本研究では BC を含有する液剤に対してインフルエンザウイルス不活化効果を検証した。また市販消毒剤においても、インフルエンザウイルス及び SARS-CoV-2 に対して高い効果を確認し、とくにエタノールを含有しない製剤においても高い不活化効果が認められた。エタノールはアルコール過敏症の人や手に傷がある人にとってはかゆみや痛みを引き起こす原因となることもある。このような有訴者にとって、エタノール非含有であっても高いウイルス不活化効果を有する本製剤は、手指の衛生を保つ習慣づくりに繋がり、非常に有用であると考えられる。

## 謝辞

本論文の作成におきましては、一般財団法人日本繊維製品品質技術センターのご協力のもとで、製剤のウイルス試験を実施しました。厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) World Health Organization, Origin of SARS-CoV-2, 26 March 2020.
- 2) 厚生労働省, 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) に係る新型インフルエンザ等感染症から 5 類感染症への移行について, <https://www.mhlw.go.jp/content/001091810.pdf>, (アクセス日:2023 年 5 月 1 日).
- 3) World Health Organization, COVID-19 Weekly Epidemiological Update, <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---27-april-2023>, 27 April 2023, (アクセス日:2023 年 5 月 1 日).
- 4) 厚生労働省, 新型コロナウイルス感染予防 の た め に , <https://www.mhlw.go.jp/stf/covid-19/kenkou-iryousoudan.html> l#yobou, (ア ク セ ス

日:2023年5月9日).

- 5) 厚生省医薬安全局長, 新指定医薬部外品の製造(輸入)承認基準等について, 平成11年3月12日.
- 6) 増川克典, 白石晶子, 高田郁美, 早瀬温子, 森卓也, 田中紀行, 藤井健吉, *リスク学研究*, **2022** 32, 57-64.
- 7) T. Takami, M. Nishida, T. Ono, A. Fujimoto, Y. Harada, Y. Kumashita, R. Mastumura, Y. Hirata, *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, **2023**, 51, 13-16.
- 8) 南貴大, 多賀康仁, 岡村善裕, *医学と薬学*, **2022**, 79, 697-702.
- 9) S. Tobe, T. Majima, H. Tadenuma, T. Suekuni, K. Sakai, H. Sakai, M. Abe, *J. Oleo Science*, **2015**, 64, 61-68.
- 10) 技術情報協会編, “界面活性剤の選び方, 使い方, 事例集”, 技術情報協会, **2019**, 535-541.
- 11) 製品評価技術基盤機構, 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最終報告, **2020**.
- 12) Zaiguo Li, Evan Mintzer, Robert Bittman, *Chemistry and Physics of Lipids*, **2004**, 130, 197-201.
- 13) European Committee for Standardization, **2019**, EN14476:2013+A2:2019.
- 14) ASTM international, **2020**, ASTM E1052-20.
- 15) M. Abe, K. Kaneko, A. Ueda, H. Otsuka, K. Shiosaki, C. Nozaki and S. Goto, *Jp. J. Infect. Dis.*, **2007**, 60, 342-346.
- 16) E. V. Karamov, V. F. Larichev, G. V. Kornilaeva, I. T. Fedyakina, A. S. Turgiev, A. V. Shibaev, V. S. Molchanov, O.E. Philippova and A. R. Khokhlov, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 6645-6656.
- 17) 青木大, 鎌田皎, 松本光雄, 長谷川和子, 伊佐幸雄, *薬学雑誌*, **1957**, 77, 1071-1075.
- 18) D. K. Chou, R. Krishnamurthy, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, and M. C. Manning, *J. Pharmaceutical Science*, **2005**, 94, 1368-1381.
- 19) 吉田時行, 進藤信一, 大垣忠義, 山中樹好編, “新版界面活性剤ハンドブック”, 工学図書, **1991**, 124-125.
- 20) 斎藤好廣, 佐藤孝俊, *薬学雑誌*, **1992**, 112, 763-767.
- 21) J. F. Rathman, S. D. Christian, *Langmuir*, **1990**, 6, 391-395.