

日本医療研究開発機構 ウイルス等感染症対策技術開発事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）医療用 N95 マスクの性能評価手順と再利用条件の確定に関する研究
（英 語） Setting of standard procedures for evaluating bioaerosol prevention capacity
and safe reusing of medical N95 respirator

研究開発実施期間：令和 2 年 4 月 1 日～令和 3 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）御手洗 聡
（英 語） Satoshi Mitarai

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語）公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部部長

（英 語） Professor/Head, Department of Mycobacterium Reference and Research, the Research Institute of Tuberculosis,
Japan Anti-Tuberculosis Association

II 研究開発の概要

背景及び目的

N95 レスピレーターは使い捨てを前提にしており、一定の使用で交換するのが原則である。しかし、2021 年現在 SARS-CoV-2 の流行により医療資源が極端に不足し、多くの医療機関で同じ N95 レスピレーターを明確な根拠もなく消毒・滅菌しながら反復利用せざるをえない現実がある。場合により N95 レスピレーター使用者を感染の危険に曝してしまう状況であり、これは病院での感染防御のみならず、N95 レスピレーターを使用する研究機関（結核等）でも共通の問題である。西村らはエタノール溶液噴霧での不活性化が N95 レスピレーターの通過阻止能を著しく損なうと報告（日経メディカル, 2020/4/24）しているが、結核研究所ではエタノール噴霧にて再現性が得られなかった（内部データ）。そこで、本研究では、基本的に二つの目標を設定した。

- ① 本研究では、N95 レスピレーターの性能に影響を与えない安全な消毒あるいは滅菌法の標準的手順の確立を目的とする。対象とする N95 レスピレーターのメーカーとして 3M、興研、重松、ホギ、小津を候補とする。消毒あるいは滅菌法として、一般病院でも利用可能な方法を用い、各 N95 マスクについて使用前・消毒/滅菌後の粒径別バイオエアロゾルのろ過性能を相対的に比較検討する。
- ② 本研究では、主要な複数の N95 レスピレーター製品の性能を擬似大気チャンバーに浮遊させたウイルスや細菌のバイオエアロゾルを用いて評価する。本研究ではどのような方法が N95 レスピレーターの性能評価手順となるか、またバイオエアロゾルを効率的に捕集除去可能か、その方法を確立する。

実施内容（方法）

対象とした N95 レスピレーター

対象とする N95 レスピレーターのメーカーとして 3M、興研、重松及びホギを候補とした。小津は N95 レスピレーターの入手そのものが不可であったため除外した。各メーカーの N95 レスピレーターは、それぞれ 8210(3M)、ハイラック 350（興研）、DD02-N95-2K（重松）及び HPR-R（ホギ）を評価対象として使用した。

消毒及び滅菌法と効果の評価

消毒あるいは滅菌法として、一般病院でも利用可能な方法を用いた。70%エタノール、0.1%次亜塩素酸、0.3%過酢酸、0.2%アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩水溶液、強酸性水、植物ミネラル活性化水（テラ・プロテクト、オリックス、東京）による浸漬（10 min）、オートクレーブ（121°C, 30min）、パスチュライゼーション（65°C, 30min）及び過酸化水素プラズマ滅菌（ステリエース 100, サラヤ）を用い、各 N95 レスピレーターについて使用前・消毒/滅菌後の 0.3 µm 以上のエアロゾルのろ過性能を相対的に比較検討した（n=3）。また、N95 レスピレーターの性能を劣化させない方法について、滅菌法の繰り返しによる性能劣化を評価した。

滅菌あるいは消毒の効果を評価するため、牛コロナウイルス、*Pasteurella multocida*、*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra を 2x2 cm にカットした各 N95 レスピレーターに 100 µl ずつ滴下し、乾燥後リン酸バッファー 5 ml に浸漬し、ボルテックスで 2 分間震盪して各病原体を回収した（n=3）。牛コロナウイルスについては処理前後の TCID₅₀ を評価し、*P. multocida* 及び *M. tuberculosis* H37Ra についてはそれぞれ血液寒天培地（BD）及び Middlebrook 7H10 培地+OADC サプリメント（BD）にて前後の菌数をカウントした。

バイオエアロゾルによる N95 レスピレーター性能評価

本研究では、4 社から市販されている N95 レスピレーターにおけるバイオエアロゾルの透過率という観点から性能評価を行った。実際に使用した微生物はパストツレラ菌、結核菌（Ra/BCG）牛コロナウイルスであり、これらの生菌・生ウイルスをモデルバイオエアロゾルとして評価に用いた。ネブライザーユニットにてこれらの被験微生物をエアロゾル化し、擬似大気チャンバー内に 3 分間噴霧し、さらに 3 分間対流させることでバイオエアロゾルの粒径を安定させてから評価に使用した。擬似大気チャンバー内のバイオエアロゾルを NILU ホルダー内に N95

レスピレーターの装填が有り、無し状態で一定量吸引し、透過したバイオエアロゾルを定量的に捕集した。透過したバイオエアロゾルの捕集にはバイオサンプラー（インピンジャー型液体バイオエアロゾル捕集装置）をNILUホルダーの下流部に設置した。捕集液体はリン酸緩衝液（PBS）を使用した。N95レスピレーターの有無で捕集された牛コロナウイルスのTCID50値を評価し、パスツレラ菌及びRa/BCGについてはそれぞれを血液寒天培地（BD）及びMiddlebrook 7H10培地+OADCサプリメント（BD）にて菌数をカウントして比較した。

結果

滅菌・消毒によるN95レスピレーターの性能変化

各滅菌あるいは消毒法によるN95レスピレーターの性能変化は、製品毎に異なっていた。70%エタノール、0.1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液、0.3%過酢酸水溶液、オートクレーブ（121°C, 30分）、強酸性水及び植物ミネラル活性化水（テラ・プロテクト）では何れかの製品で有意な性能低下（透過率の上昇）が認められた。0.2%アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩水溶液及び過酸化水素プラズマ滅菌では全ての製品で有意に50~70%当透過性能が劣化した。唯一パステライゼーション（65°C, 30分）のみが性能の劣化を示さなかった。表1に全ての製品をまとめて評価した結果を示した。

表1 滅菌あるいは消毒処理前後での透過率の変化

消毒法別透過率変化	処理前	処理後	p value
70%エタノール	0.01418	0.11363	0.00051
0.1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液	0.01418	0.01664	0.62144*
0.3%過酢酸水溶液	0.01418	0.19900	0.01426
オートクレーブ（121°C, 30分）	0.01418	0.13919	0.00909
強酸性水	0.01418	0.03015	0.03354
植物ミネラル活性化水（テラ・プロテクト）	0.01418	0.14622	0.01227
0.2%アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩水溶液	0.01418	0.57769	2.1692E-08
過酸化水素プラズマ滅菌	0.01418	0.71380	2.4292E-08
パステライゼーション（65°C, 30分）	0.01418	0.01612	0.71910

*全体ではp value > 0.05 であるが、8210（3M）で有意な透過率上昇を示した（p=0.0251）。

パステライゼーションのみが全ての製品で性能劣化を示さなかった。パステライゼーションは10回繰り返しても有意な性能低下を示さなかった。

滅菌・消毒法の効果

牛コロナウイルスの力価測定はduplicateで実施した。HRT-18G細胞に原液力価 $1 \times 10^{5.5}$ TCID50/25ulのウイルスを感染させ、5日後に判定した。全ての滅菌消毒法で検出限界以下まで力価の低下が認められた。ただし、0.2%アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩水溶液処理後のサンプル原液で細胞毒性が認められ、力価の評価が実施できなかった。*P. multocida*では接種菌量は 1.41×10^6 CFUであり、回収率0.85-1.02%であった。少なくとも99.99%は滅菌されていることが示された。さらに*M. tuberculosis* H37Raでは接種菌量は 0.83×10^5 CFUであり、回収率0.23-0.96%であった。このことから、少なくとも99.95%は滅菌効果があったと考えられた。

透過率測定の結果

牛コロナウイルスの透過率は4.47-20.18%と高く、パスツレラ菌では0.02-6.13%、結核菌（Ra/BCG）は0.02-1.19%と低値を示した。4社のレスピレーターの違いにおいては、牛コロナウイルスでは、3/4社で有意に透過するウイ

ルス力価が減少していた、パストツレ菌、結核菌（Ra/BCG）では4社全てで有意に透過する細菌数（CFU）の減少が確認された（n=3）。透過バイオエアロゾルに対し、4社のN95レスピレーターの使用で透過率が有意に減少する性能が確認された。また、牛コロナウイルスは2種の細菌より高い透過率を示す傾向が全てのN95レスピレーターで見られた。このことから、N95レスピレーターの製造者による性能差が確認された。

考察

N95レスピレーターの再利用のための滅菌方法の検証では、現在推奨されている過酸化水素プラズマ滅菌は1回の処置で透過性を50%以上低下させるため、不適切であることが判明した。また透過率の低下にセルロース素材の使用が関係しているとする報告があるが、今回の3Mのレスピレーター（8210）はセルロースを使用していないとされており、さらなる検討が必要と考えられた。今回の検証では65°C、30分のパストライゼーションが最適な滅菌方法であることが判明した。およそ99%のウイルスあるいは細菌がレスピレーター内部に捕獲されて洗浄では回収できないことから浸漬法ではレスピレーター内部の病原体が滅菌・消毒されているかは不明であるが、熱処理であれば内部も殺菌されていると容易に推察される。65°Cを30分間維持可能なインキュベーターは10万円以下でも購入可能であり、極めて現実的なN95レスピレーターの再利用法を提供すると考える。

N95レスピレーターの性能評価手順をウイルスや細菌のバイオエアロゾル粒子を用いて確立した。N95レスピレーターは一定サイズの非生物由来粒子による95%以上の捕集効率が試験基準に用いられているが、実際には医療現場など感染性微生物の曝露からヒトを保護する目的でも使用されている。そこで、生存しているバイオエアロゾル粒子を用いてN95レスピレーターの性能評価手順の確立を行い、4社の市販されているN95レスピレーターにて性能評価を行った。評価には生存しているウイルス、2種の細菌をそれぞれバイオエアロゾル化し、擬似大気チャンバーに対流させた粒子を用いた。3種のバイオエアロゾルの捕集効率を4社のN95レスピレーターで検証した結果、ウイルスは細菌より低い捕集効率を示す傾向が全てのN95レスピレーターで見られた。また、使用したバイオエアロゾルごとの比較でも4社のN95レスピレーターによって捕集効率に違いが確認された。既存のN95レスピレーターの評価手順において基準を満たしている製品であっても透過率に違いが見られたことから、バイオエアロゾル粒子を使用した新たな性能評価の必要性が示唆された。今回の測定では、通常の大気中に想定されるウイルス、細菌の濃度（タイター）より高いそれらを使用する試験であるため、濃度の影響を考慮した検証などとの比較が今後は必要である。

Title:

Setting of standard procedures for evaluating bioaerosol prevention capacity and safe reusing of medical N95 respirator

Background:

N95 respirator is commonly used for the protection of bioaerosol infection. However, due to the pandemic of SARS-CoV-2, the supply of the N95 respirator is stagnant in many settings. It causes the re-use of N95 respirator, which is originally disposable, with non-evidence based sterilization/disinfection methods. It will be necessary to establish appropriate sterilization/disinfection method to re-use N95 respirator without reducing its bioaerosol protection capacity. It is also necessary to establish an appropriate method to evaluate the bioaerosol protection capacity of the N95 respirator because it is originally not for bioaerosol protection use.

Objectives:

The primary objective of this study was to establish a standard procedure for safe disinfection or sterilization that does not affect the performance of the N95 respirator. As the second objective, we establish a method for evaluating the performance of N95 respirators using bioaerosol.

Methods:

N95 respirators evaluated

3M, KOKEN, Shigematsu, and Hogi were selected as the manufacturers of N95 respirators. The N95 respirators of each manufacturer used were 8210 (3M), Hiraac 350 (Koken), DD02-N95-2K (Shigematsu), and HPR-R (Hogi), respectively.

Evaluation of damage and effectiveness sterilization or disinfection methods

As a disinfection or sterilization method, 10 min of immersion in 70% ethanol, 0.1% hypochlorous acid, 0.3% peracetic acid, 0.2% alkyldiaminoethylglycine hydrochloride aqueous solution, hypochlorous acid water, plant mineral activated water (Tera Protect, ORIX, Tokyo), autoclave (121 °C, 30 min), pasteurization (65 °C, 30 min) and hydrogen peroxide plasma sterilization (Steriace 100, Saraya) were used. After sterilization/disinfection, the filtration capacity of each N95 respirator was examined (n = 3).

To evaluate the effect of sterilization/disinfection, 100 µl of bovine coronavirus, *Pasteurella multocida*, and *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra were dropped into each N95 respirator. They were once dried and immersed in 5 ml of phosphate buffer (PB) and vortexed. Each pathogen was recovered by vortex mixing for 2 minutes (n = 3). For bovine coronavirus, TCID₅₀ before and after treatment was evaluated, and for *P. multocida* and *M. tuberculosis* H37Ra, the number of bacteria before and after sterilization/disinfection was counted with blood agar medium (BD) and Middlebrook 7H10 medium + OADC supplement (BD), respectively.

N95 respirator performance evaluation using bioaerosol

The viable bacteria and virus were used for evaluation as model bioaerosols. These test microorganisms were aerosolized with a nebulizer unit, sprayed into a simulated atmospheric chamber for 3 minutes, and convected for another 3 minutes to stabilize the particle size of the bioaerosol before evaluation. The bioaerosol in the simulated atmosphere chamber was aspirated in a certain amount with or without the N95 respirator loaded in the NILU holder, and the permeated bioaerosol was quantitatively collected. Biological quantification was performed as described in the previous sub-section.

Results:

Performance changes of N95 respirator due to sterilization/disinfection

The performance changes of the N95 respirator due to each sterilization/disinfection method differed for each maker's product. 70% ethanol, 0.1% sodium hypochlorite aqueous solution, 0.3% peracetic acid aqueous solution, autoclaving, hypochlorous acid water, and plant mineral activated water have significantly deteriorated the performance in any of the N95 respirators. Performance degradation (increased permeability) was observed in 0.2% alkyldiaminoethylglycine hydrochloride aqueous

solution and hydrogen peroxide plasma sterilization, and the permeation performance was significantly deteriorated by 50 to 70% in all N95 respirators tested. Only pasteurization showed no deterioration in performance, even after 10 times of repeated sterilizations.

Effect of sterilization/disinfection

All sterilization and disinfection methods showed a decrease in virus titer below the detection limit. In *P. multocida*, the inoculum volume was 1.41×10^6 CFU and the recovery rate was 0.85–1.02%. At least 99.99% was shown to be sterilized. Furthermore, in *M. tuberculosis* H37Ra, the inoculum amount was 0.83×10^5 CFU, and the recovery rate was 0.23–0.96%. It was considered that at least 99.95% had a sterilizing effect.

Results of transmittance measurement

The transmittance of bovine coronavirus was as high as 4.47–20.18%, that of Pasteurella was as low as 0.02–6.13%, and that of *M. tuberculosis* (H37Ra / BCG) was as low as 0.02–1.19%. Regarding the difference between the respirators of the four manufactures, bovine coronavirus had a significantly reduced virus titer that permeated in 3/4 companies, and Pasteurella and tubercle bacilli significantly permeated in all four N95 respirators. A decrease in the number of bacteria (CFU) was confirmed ($n = 3$). It was confirmed that the N95 respirators significantly reduced the transmittance of bioaerosols. In addition, bovine coronavirus tended to show higher transmittance than the two bacteria in all N95 respirators. It was confirmed that there was a difference in performance depending on the manufacturer of the N95 respirator.

Conclusion:

Verification of sterilization/disinfection methods for the re-use of N95 respirators has shown that the currently recommended hydrogen peroxide plasma sterilization is inadequate as it increases permeability by more than 50% with a single treatment. In this verification, pasteurization was found to be the optimal sterilization method.

A performance evaluation procedure for the N95 respirator was established using viral and bacterial bioaerosol particles. As a result of examining the collection efficiency of three bioaerosols with N95 respirators, the virus tended to show a lower collection efficiency than bacteria in all N95 respirators. In addition, a comparison of each bioaerosol used also confirmed a difference in collection efficiency among the four approved N95 respirators, suggesting the need for new performance evaluation using bioaerosol particles. Since this investigation was conducted with a relatively high concentration of virus and bacteria, it is necessary to compare the results with a similar investigation at a lower concentration.