

試験資材のウイルスに対する不活化効果試験

—試験報告書—

試験番号：207605N

株式会社 食環境衛生研究所

〒379-2107

群馬県前橋市荒口町 561-21

Tel027-230-3411

Fax027-230-3412

1. 表題

試験資材のウイルスに対する不活化効果試験

2. 試験番号

No.207605N

3. 目的

資材とウイルス（インフルエンザウイルス、豚コロナウイルス（PEDV）及びネコカリシウイルス（ノロウイルス代替）を反応させた時のウイルス不活化効果を確認するために実施した。

4. 試験管理組織

試験依頼者の名称及び所在地

名称 株式会社 ドクトルウォーター

所在地 〒601-8104 京都府京都市南区上鳥羽角田町 52

実施機関の名称、所在地及びその長の氏名

名称 株式会社 食環境衛生研究所

所在地 群馬県前橋市荒口町 561-21

氏名 代表取締役 久保 一弘

試験実施責任者の氏名

松本 彰平

試験担当者の氏名

近藤 実紀

5. 試験スケジュール

試験受託日 2020年12月17日

試験開始日 2021年3月4日

試験終了日 2021年4月5日

6. 試験資材

銀イオン 50ppm 安定化水

※試験資材は原液で使用した。また、対照資材として滅菌リン酸緩衝液を使

用した。

7. 供試微生物

インフルエンザウイルス：swine influenza virus H1N1 IOWA 株

培養細胞：MDCK 細胞（イヌ腎臓由来株化細胞）

PED ウイルス：Porcine epidemic diarrhea virus P-5V 株

※豚感染性のコロナウイルス

培養細胞：vero 細胞（アフリカミドリザルの腎臓上皮由来株化細胞）

ネコカリシウイルス：feline calicivirus F9 株

培養細胞：CRFK 細胞（ネコ腎臓由来株化細胞）

8. 区の設定

区	処置	感作時間
対照区	リン酸緩衝液 1mL にウイルス液 0.1mL 添加	試験開始後 0 分、3 時間、6 時間
試験区	試験資材 1mL にウイルス液 0.1mL 添加	試験開始後 3 時間、6 時間

9. 試験方法

「ウイルス実験学 総論 改訂二版 丸善株式会社 ウイルス中和試験法」を参考として実施した。

10. 試験手順

①予備試験：

試験に先立って、試験資材が培養細胞に与える影響（細胞毒性）を調査した。

試験資材をリン酸緩衝液で 10 倍段階希釈した後、培養細胞に接種し、培養後の細胞の正常な状態を示す最高濃度を確認し、試験に使用するウイルス濃度を決定した。その結果、細胞毒性について、いずれの細胞に対しても試験資材 10 倍液において細胞の発育不良が確認された。このため、試験に際しては、試験資材とウイルス液の混合液を 10 倍以上希釈した後細胞に接種する必要があると判明した。また、ウイルス添加濃度は 10^5 TCID₅₀/mL 以上とした。

②本試験・試験液混合：

試験区分に従い、試験資材及びリン酸緩衝液の各 1mL をそれぞれ分取し、予備試験で決定した濃度にウイルス液を添加した。

ウイルス液添加後、混合液として室温（25℃）にて所定の時間静置した。

③本試験・細胞接種及び測定：

試験区分ごとに感作が終了した混合液をそれぞれ 10 倍段階希釈し、96well プレートに培養した細胞に 100 μ L ずつ接種した。

判定は、37 $^{\circ}$ C、炭酸ガス培養（5%）で 5 日間培養した後、インフルエンザウイルスの場合は、各ウェル内の培養上清を回収し、赤血球凝集反応によりウイルスの増殖の有無を確認し、その濃度を算出した。また、PED ウイルス及びネコカリシウイルスの場合は、培養細胞を顕微鏡観察し、培養細胞に現れる CPE（細胞変性）をもってウイルス増殖の有無を確認し、その濃度を算出した。

④評価

試験結果において、検査時点ごとに、対照区に対する試験区の減少率（%）を算出し、効果を確認した。

なお、本試験において減少率は以下の式で算出した。

$$\text{減少率（\%）} = \frac{\text{対照区} - \text{試験区}}{\text{対照区}} \times 100$$

11. 結果

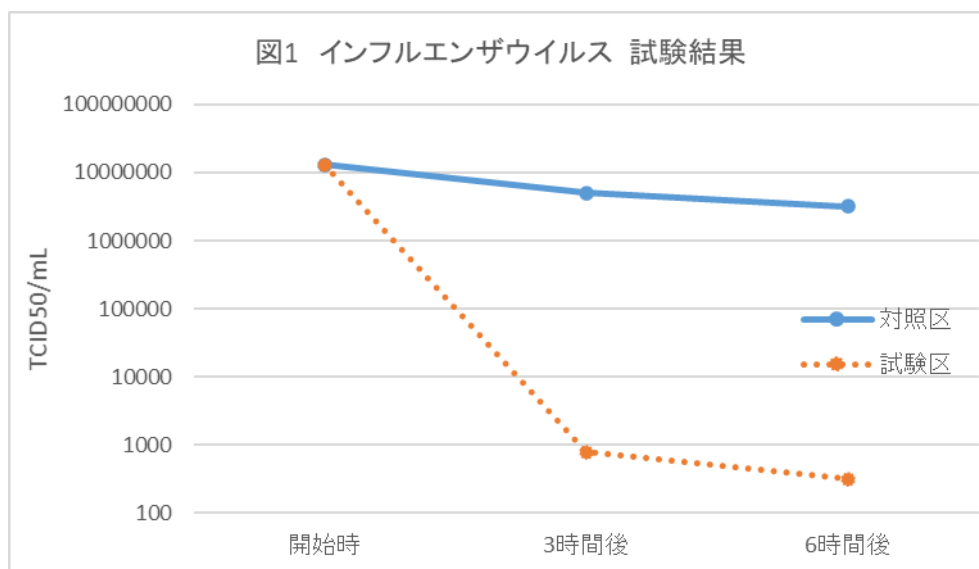
①インフルエンザウイルス

インフルエンザウイルスに対する試験結果を表 1 及び図 1 に示した。

試験開始時は ($10^{7.1}$ TCID₅₀/mL) であった。6 時間後まで対照区では自然衰退がみられ ($\rightarrow 10^{6.5}$ TCID₅₀/mL)、試験区では開始後 3 時間で ($10^{2.9}$ TCID₅₀/mL) となり 6 時間後には $< 10^{2.5}$ TCID₅₀/mL (検出限界未満 : 99.99%以上減少) となった。

表 1 インフルエンザウイルス試験結果(TCID₅₀/mL)

区	試験開始時	開始後 3 時間	開始後 6 時間
対照区	$10^{7.1}$	$10^{6.7}$ (5000000)	$10^{6.5}$ (3200000)
試験区		$10^{2.9}$ (790)	$< 10^{2.5}$ (< 320)



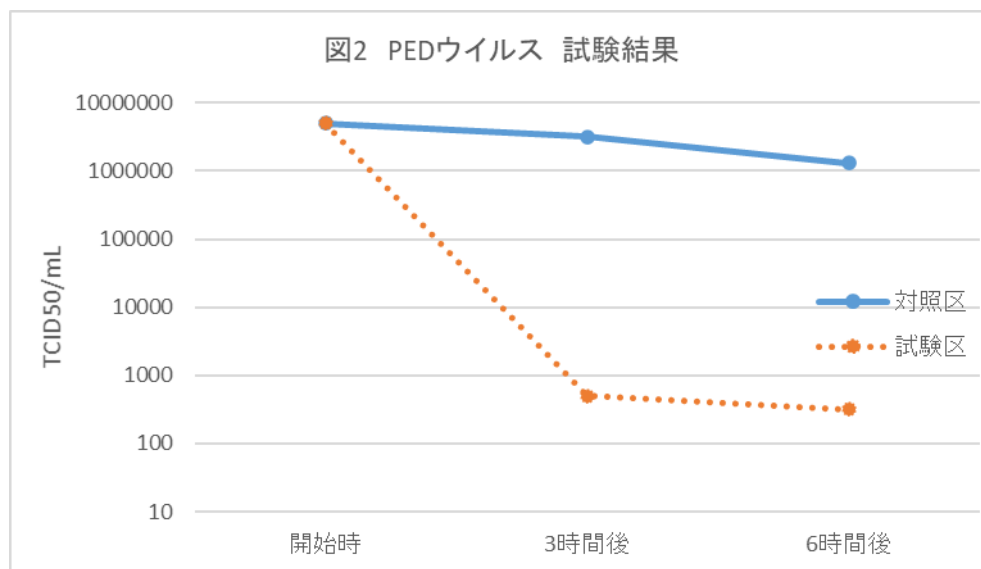
②PED ウイルス

PED ウイルスに対する試験結果を表 2 及び図 2 に示した。

試験開始時は ($10^{6.7}$ TCID₅₀/mL) であった。6 時間後まで対照区では自然衰退がみられ ($\rightarrow 10^{6.1}$ TCID₅₀/mL)、試験区では開始後 3 時間で ($10^{2.7}$ TCID₅₀/mL) となり 6 時間後には $<10^{2.5}$ TCID₅₀/mL (検出限界未満 : 99.97%以上減少) となった。

表 2 PED ウイルス試験結果(TCID₅₀/mL)

区	試験開始時	開始後 3 時間	開始後 6 時間
対照区	$10^{6.7}$	$10^{6.5}$ (3200000)	$10^{6.1}$ (1300000)
試験区		$10^{2.7}$ (500)	$<10^{2.5}$ (<320)



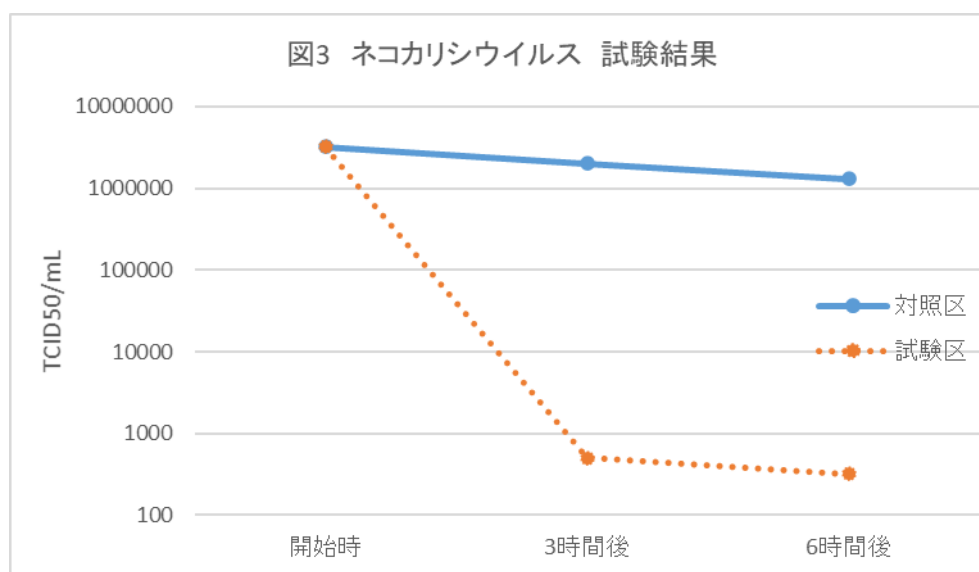
③ネコカリシウイルス

ネコカリシウイルスに対する試験結果を表3及び図3に示した。

試験開始時は ($10^{6.5}$ TCID₅₀/mL) であった。6時間後まで対照区では自然衰退がみられ ($\rightarrow 10^{6.1}$ TCID₅₀/mL)、試験区では開始後3時間で ($10^{2.7}$ TCID₅₀/mL) となり6時間後には $< 10^{2.5}$ TCID₅₀/mL (検出限界未満 : 99.97%以上減少) となった。

表3 ネコカリシウイルス試験結果(TCID₅₀/mL)

区	試験開始時	開始後3時間	開始後6時間
対照区	$10^{6.5}$	$10^{6.3}$ (2000000)	$10^{6.1}$ (1300000)
試験区		$10^{2.7}$ (500)	$< 10^{2.5}$ (< 320)



12. 考察

今回、試験資材のインフルエンザウイルス、PED ウイルス（豚感染コロナウイルス）及びネコカリシウイルス（ノロウイルス代替）に対する不活化効果試験を実施した。

その結果、6 時間の接触で、インフルエンザウイルスに対しては 99.99%以上不活化効果があることが判明した。また、PED ウイルスに対しては、6 時間の反応で 99.97%以上の不活化効果が、ネコカリシウイルスに対しては、6 時間の反応で 99.97%の不活化効果があることが判明した。