

2020年06月21日

ウイルス (SARS-CoV-2) 不活化 (除去) 効果確認試験報告書 (1) <有機物非存在条件下>

目的：新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) が世界的に流行し、世界中で新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) を不活化する消毒剤並びにその使用方法が研究されている。そこで、亜塩素酸水 (製剤) を用いて、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に対する不活化 (除去) 効果を確認し、効果が認められる亜塩素酸水 (製剤) の遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) [製剤の希釈倍率] を確認することを目的として本試験を実施することにした。なお、「Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008 (Update : May 2019)」や、「感染症に基づく消毒・滅菌の手引き」においては、最大の消毒時間が 10 分間程度であるが故に、まずは消毒時間を「10 分間」に設定して実施することにした。

試験検体：亜塩素酸水製剤

含量 (亜塩素酸 HClO_2 =68.46) として 0.8% (8,000ppm) [製造時]

遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 200 mg/L 以上

ウイルス：SARS-CoV-2(2019-nCoV/Japan/AI/I-004/2020)株

(国立感染症研究所より分与)

細胞：VeroE6/TMPRSS2 細胞 (JCRB1819)

試薬：Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (富士フィルム和光純薬)、

試験方法：試験検体：亜塩素酸水製剤をポリスチレンチューブを用いて蒸留水で希釈した。

ウイルスとの反応もポリスチレンチューブ内で行った。このウイルス液と試験検体：亜塩素酸水製剤の希釈液を (1:9) の比で混合して反応させた。

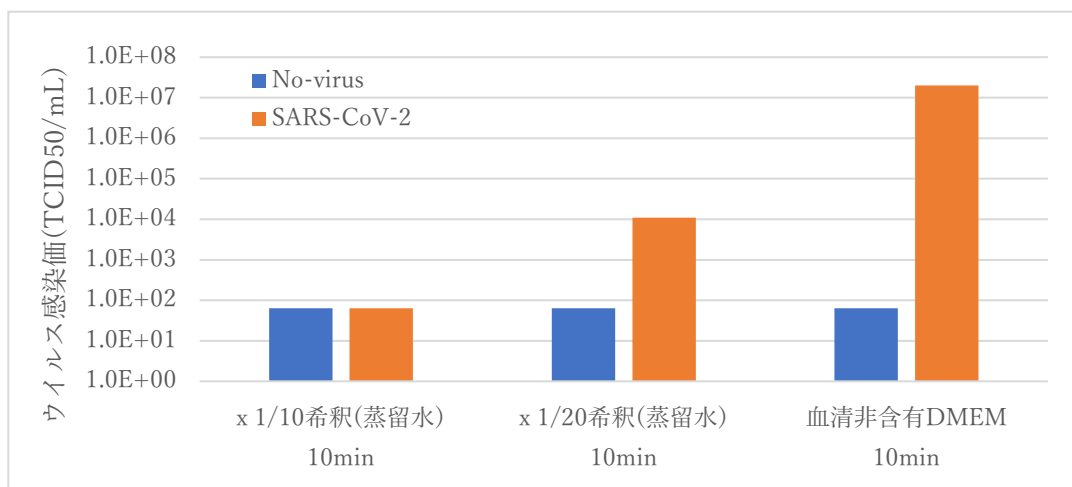
ウイルス液の調製は以下のように行った。VeroE6/TMPRSS2 細胞 (10-cm デイッシュ) に m.o.i. が約 0.01 になるようにウイルス液を細胞に接種して、1 時間後に接種液を吸引除去して血清非含有 DMEM (5 mL) を入れて培養した。細胞変性効果が細胞全体に広がって細胞がはがれ始めたところで培養上清を回収し、低速遠心と 5- μm フィルターで細胞を完全に除いてウイルス液とした。

ウイルス除去試験の方法は以下のように行った。ウイルス液と試薬を (1:9) の比率で混合し、室温で所定の時間反応させたのちに血清非含有 DMEM で 10 倍希釈して反応を止めたのちに、さらに 10^{-8} まで 10 倍段階希釈をおこなった。VeroE6/TMPRSS2 細胞 (96 ウェルプレート) の 4 個のウェルに各希釈のウイルス液を 50 μL /well で接種し、一時間後に吸引除去して 100 μL /well の血清非含有 DMEM に置換して培養した。3 日後に各ウェルの感染の有無を判定して、Behrens-Karber 法で 50% 感染希釈を計算し、ウイルス感染価 [50% Tissue culture infectious dose (TCID₅₀)/mL] を求めた。

結果：

[ウイルス不活化（除去）効果確認試験]

試験試薬・反応条件	【設定】 遊離塩素濃度 (Cl=35.45として)	No-virus (Blank)	SARS- CoV-2	log	Δlog	減少率 (%)
Test 区 x 1/10 希釈(蒸留水), 10 min	20 mg/l	6.3.E+01	6.3E+01	1.8	-5.50	≧99.999
Test 区 x 1/20 希釈(蒸留水), 10 min	10 mg/l	6.3.E+01	1.1.E+04	4.1	-3.25	99.945
Cont.区 血清非含有 DMEM, 10 min	0 mg/l	6.3.E+01	2.0.E+07	7.3	基準	—



試験検体：亜塩素酸水製剤 1/10 希釈液（遊離塩素濃度(CI=35.45 として)20 mg/L）でウイルス感染価は検出限界(6.3×10) 以下にまで低下[5.5Log 以上(≧99.999%)が除去]していた。なお、この感染価は検出限界であり、ウイルス感染細胞は全く観察されていない。よって、実際の感染価はこれよりも低く、このウイルスは完全に除去（不活化）されたと考えることができる。また、試験検体：亜塩素酸水製剤 1/20 希釈（遊離塩素濃度(CI=35.45 として)10 mg/L）でも未処理(血清非含有 DMEM)に比べると、ウイルス感染価を 1/1000 以下にまで低下[3.25Log (99.945%)が除去]しており、SARS-CoV-2 に対する除去（不活化）効果※はあるといえる。

※平成 27 年度 ノロウイルス不活化条件に関する調査報告書(国立医薬品食品衛生研究所)の評価基準に準じている。

本試験の結果は、広島大学大学院医系科学研究科ウイルス学研究室において実施された試験の結果報告書に基づき、三慶グループが作成したものである。

ウイルス不活化(除去)効果確認試験条件 (1) <有機物非存在条件下>


試験検体	亜塩素酸水製剤 含量 (HClO ₂ =68.46)として 8,000 ppm (0.8%) [製造時] 遊離塩素濃度(Cl=35.45として) 200 mg / L以上
ウイルス株	SARS-CoV-2(2019-nCoV/Japan/AI/I-004/2020)株 [国立感染症研究所より分与]
宿主細胞	VeroE6/TMPRSS2細胞 (JCRB1819)
ウイルス液FBS濃度	0%
ウイルス培養時の培地	ダルベッコ改変イーグル培地 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
ウイルス力価検出方法	TCID ₅₀
ウイルス液：サンプル液 反応液比率	1:9
初発ウイルス濃度	2×10^7 TCID ₅₀ / mL

ウイルス不活化（除去）効果確認試験アウトライン（1） <有機物非存在条件下>

亜塩素酸水製剤の場合


- ・ 宿主細胞培養およびウイルス培養
 - ・ ウイルス培養時のFBS濃度：0%
- ・ 供試サンプルの調製
 - ・ 亜塩素酸水製剤を遊離塩素濃度(CI=35.45として)を蒸留水で数段階に設定
- ・ 抗ウイルス反応
 - ・ 供試サンプル：ウイルス液 = 9 : 1
 - ・ 室温10分
- ・ 供試サンプルの除去・中和処理
 - ・ DMEMで10倍希釈した後、直ちに 10^{-8} まで10段階希釈列を作成

ウイルス液：1
(約 10^8 TCID₅₀ / ml)

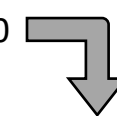


供試サンプル：9

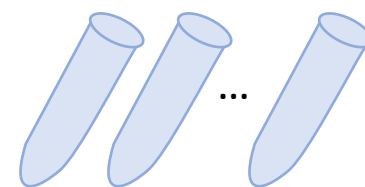
抗ウイルス反応：
10min(室温)



DMEM培地：90



DMEMで10倍希釈



10倍希釈列を 10^{-8} まで調製し、抗ウイルス価判定へ