

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 (2) <有機物存在条件下>

目的:『ウイルス (SARS-CoV-2) 不活化 (除去) 効果確認試験報告書 (1)』において、亜塩素酸水 (製剤) は、ウイルス (SARS-CoV-2) に対して有効な消毒剤であることが分かった。しかしながら、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 患者の糞便や污水处理場から新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) が検出されており、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は糞便やトイレを介して感染する可能性があり、ノロウイルス同様に、糞便や嘔吐物、吐しゃ物の処理やトイレの消毒が必要であると考へた。そこで、有機物存在条件下における新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に対する不活化 (除去) 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、『海外における殺菌・消毒薬の効力評価法 - 欧州、米国の試験規格の比較』における軽度の汚れの指標として 0.03% の牛血清アルブミン (BSA) を選定し、『平成 27 年ノロウイルス不活化条件に関する調査報告書』では、糞便代替物として 0.5% のポリペプトンを用いていることからこれらの有機物並びに濃度を設定して実施することにした。

試験検体: 亜塩素酸水製剤 (第 2 類医薬品 「クロラス酸・N バリア」)

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)、ハイポリペプトン N (富士フィルム和光純薬)、牛血清アルブミン、Faraction V 特級 (片山化学工業)

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。

蛋白質負荷のためのポリペプトンは、10% (w/v) 水溶液を調製し、 $0.1 \mu m$ -フィルターでろ過滅菌した。これと等量のウイルス液を混合し、試験に用いた。ウイルスとの混合液中では、ポリペプトンの濃度は 5% となり、ウイルスは 1/2 に希釈されている。このウイルス混合液と試験検体: 亜塩素酸水製剤等の試薬を (1:9) の比で混合して反応させると、反応液中のポリペプトンの終濃度は 0.5% となる。

牛血清アルブミン (BSA) では同様に 0.6% (w/v) 水溶液を調製し、反応液中の終濃度が 0.03% となるようにした。

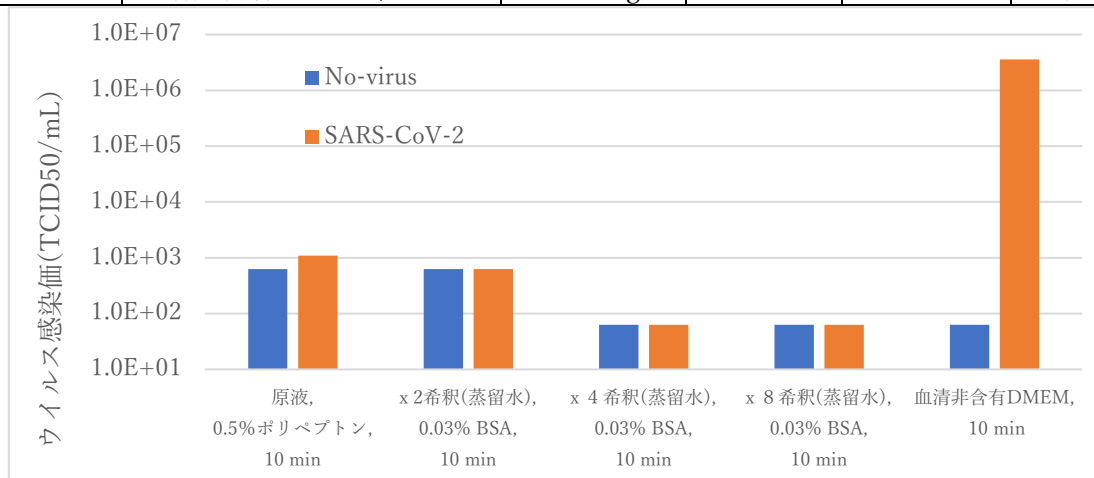
ウイルス液の調製は以下のように行った。VeroE6/TMPRSS2 細胞 (10-cm ディッシュ) に m.o.i. が約 0.01 になるようにウイルス液を細胞に接種して、1 時間後に接種液を吸引除去して血清非含有 DMEM (5 mL) を入れて培養した。細胞変性効果が細胞全体に広がって細胞がはがれ始めたところで培養上清を回収し、低速遠心と 5- μ m フィルターで細胞を完全に除いてウイルス液とした。

ウイルス不活化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 μ L/well で接種し、一時間後に吸引除去して 100 μ L/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：

[有機物存在条件下（蛋白質負荷）によるウイルス不活化（除去）効果確認試験]

有機物濃度	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	減少量 Δlog	減少率 (%)	
Test 区	0.5% ポリペプトン	原液, 10min	200 mg/L	6.3.E+02	1.1.E+03	-3.5	99.969%
Test 区	0.03% ウシ血清アルブミン	x 1/2 希釈(蒸留水), 10 min	100 mg/L	6.3.E+02	6.3.E+02	-3.8	≧99.983%
		x 1/4 希釈(蒸留水), 10 min	50 mg/L	6.3.E+01	6.3.E+01	-4.8	≧99.998%
		x 1/8 希釈(蒸留水), 10 min	25 mg/L	6.3.E+01	6.3.E+01	-4.8	≧99.998%
Cont.区	—	血清非含有 DMEM, 10 min	0 mg/L	6.3.E+01	3.6.E+06	基準	—



有機物存在条件として0.5%ポリペプトン存在下において、試験検体：亜塩素酸水製剤原液（遊離塩素濃度(CI=35.45として)200 mg/L）では、1 ウェルだけウイルス感染を引き起こしてしまい、その効果は検出限界までは達しなかったが、強い不活化（除去）効果を示しており、ウイルス感染価は1/1000以下にまで低下[3.5Log（99.969%）が除去]していた。次に有機物存在条件として0.03%ウシ血清アルブミン(BSA)存在下において、試験検体：亜塩素酸水製剤の1/2希釈液（遊離塩素濃度(CI=35.45として)100 mg/L）、1/4希釈液（遊離塩素濃度(CI=35.45として)50 mg/L）、1/8希釈液以下（遊離塩素濃度(CI=35.45として)25 mg/L以上）のいずれの希釈液でも、それぞれ検出限界にまで低下[3.8^注~4.8Log以上（≧99.983%~≧99.998%）が除去]しており、蛋白質がある有機物存在条件下であってもSARS-CoV-2に対する不活化（除去）効果^{*}が認められていた。

注:亜塩素酸水製剤の1/2希釈液（遊離塩素濃度(CI=35.45として)100 mg/L）のウイルス無添加時の細胞変性効果

(CPE)によって検出限界値が10倍(1Log)高くなった為、不活化（除去）効果は10倍(1Log)低くなっていた。

※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。

なお、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(2) <有機物存在条件下>

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
有機物負荷条件	終濃度0.5%ポリペプトン、終濃度0.03%牛血清アルブミン(BSA)
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	3.6 × 10 ⁶ TCID ₅₀ / mL

ウイルス不活化（除去）効果確認試験アウトライン(2) <有機物存在条件下>

・ 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%

<有機物存在条件下の場合>

- ・ 10%(w/v)ポリペプトン：1 + ウイルス液：1
(終濃度としては5%ポリペプトン含有ウイルス液)
- ・ 0.6%(w/v)BSA：1 + ウイルス液：1
(終濃度としては0.3%BSA含有ウイルス液)

・ 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

<有機物存在条件下の場合>

- ・ ポリペプトンは終濃度としては0.5%の存在条件下になる。
- ・ BSAは終濃度としては0.03%の存在条件下になる。

・ 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

亜塩素酸水製剤の場合

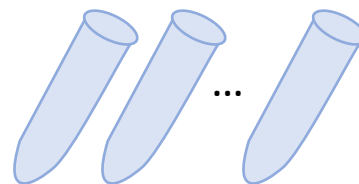
ウイルス液：1 (約 10^8 TCID₅₀/ml) 供試サンプル：9

[有機物存在条件下の場合のウイルス濃度は、1/2希釈される。(約 10^7 TCID₅₀/ml)]

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