

2020年8月31日

ウイルス (SARS-CoV-2) 不活化 (除去) 効果確認試験報告書 (3) <有機物非存在条件下>

目的：『ウイルス (SARS-CoV-2) 不活化 (除去) 効果確認試験報告書 (1)』並びに『ウイルス (SARS-CoV-2) 不活化 (除去) 効果確認試験報告書 (2)』において、有機物非存在条件下及び、有機物存在条件下において、亜塩素酸水 (製剤) は、新型コロナウイルス (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、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) において、界面活性剤や次亜塩素酸水を用いて、1分間～5分間という処理時間で、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) を不活化 (除去) 出来るという報告が上げられた。そこで、亜塩素酸水 (製剤) でも、短時間 (1分間～5分間) の処理時間で、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) をどの程度、不活化 (除去) できるのかどうか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。

試験検体：亜塩素酸水製剤

含量 (亜塩素酸 $\text{HClO}_2=68.46$)として 0.8% (8,000ppm) [製造時]
遊離塩素濃度 ($\text{Cl}=35.45$ 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)、牛胎児血清 (FBS; biosera 社)

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。

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 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。

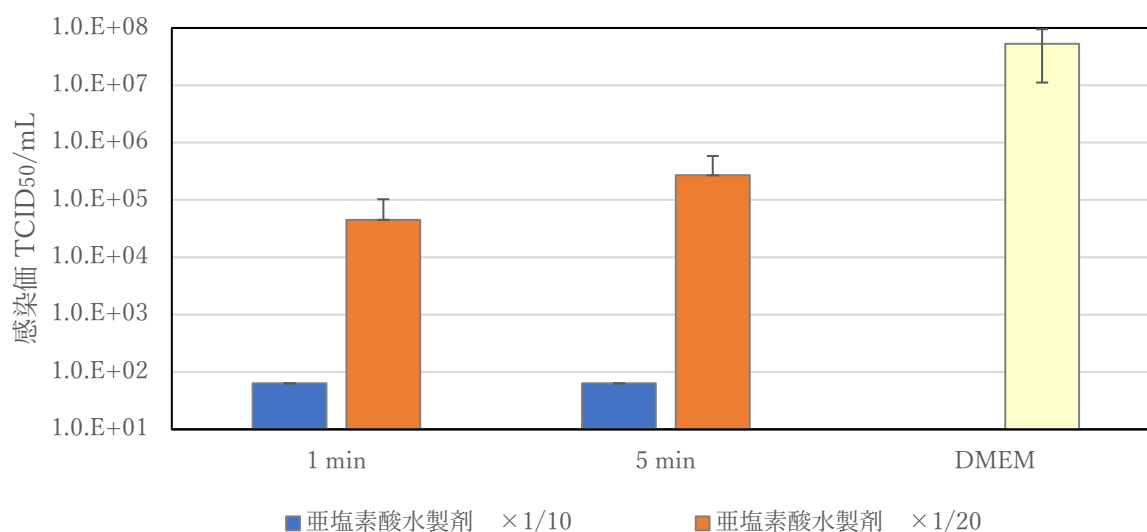
抗ウイルス試験の方法は以下のように行った。ウイルス液と試薬を (1:9) の比率で混合し、室温で所定の時間反応させたのちに 10% FBS 含有 DMEM で 100 倍希釈して反応を止めたのちに、さらに 10^{-8} まで 10 倍段階希釈をおこなった。

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 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：

[有機物非存在条件下における反応時間によるウイルス不活化（除去）効果確認試験]

試験試薬・遊離塩素濃度(CI=35.45として)	反応時間 (min)	感染価(TCID ₅₀ /mL)		Δ log	減少率(%)
		平均値	標準偏差		
Test区 x 1/10 希釈(蒸留水), 20 mg/L	1 min	6.3.E+01	8.7.E-15	5.92	≧99.9999
	5 min	6.3.E+01	8.7.E-15	5.92	≧99.9999
Test区 x 1/20 希釈(蒸留水), 10 mg/L	1 min	4.5.E+04	5.8.E+04	3.07	99.9152
	5 min	2.7.E+05	3.2.E+05	2.29	99.4923
Cont.区 血清非含有 DMEM, 0 mg/L	—	5.3.E+07	4.2.E+07	基準	—



亜塩素酸水製剤 1/10 希釈液でウイルス感染価は検出限界まで低下していた。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、ウイルスは完全に不活化（≧99.9999%除去）されたと考えられる。次に、亜塩素酸水製剤 1/20 希釈液では、Cont.区（血清非含有 DMEM）に比べると、ウイルス感染価は、2Log～3 Log にまで低減（99.4%～99.9%除去）されていた。

また、反応時間 1 分間と 5 分間とでは、ウイルスの不活化（除去）効果に有意差はみられず、1 分間処理で、すでに相当な除去効果があることが判った。

以上の結果は、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(3) <有機物非存在下>

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	<u>5.3</u> × 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(3) <有機物非存在下>

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1分間、5分間
- ・ 供試サンプルの除去・中和処理
 - ・ 10% FBS含有DMEMで100倍希釈した

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)

10%FBS含有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

