

2023年04月24日

ウイルス (SARS-CoV-2) 不活化 (除去) 効果確認試験報告書 (6)

～指定有機物存在条件下における新型コロナウイルスに対する亜塩素酸水の不活化効果確認試験～
(接触時間5分以内の次亜塩素酸ナトリウム500ppm液での効果と同等の効果が得られる亜塩素酸水の濃度とその接触時間の探索試験)

- 試験目的：①環境消毒薬の評価指針(2020)[環境感染学会]において、汚濁条件に設定されている終濃度として0.3%羊血球含有0.3%牛血清アルブミン添加条件下(以下、終濃度0.3%BSA+羊血球0.3%と省略します。)で、亜塩素酸水製剤の各希釈液での除去効果を確認することにした。
- ②新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)は呼吸器感染症である為、人工唾液(ASTEM E2720-16に準ずる)の添加(終濃度ムチン0.03%)条件下における亜塩素酸水製剤の各希釈液での除去効果を確認することにした。

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)200mg/L以上

ウイルス：SARS-CoV-2 (B.1.1, EPI_ISL_6289932を使用。)

細胞：VeroE6/TMPRSS2細胞(JCRB1819)

試薬 Dulbecco's Modified Eagle Medium (High glucose) [DMEM(High glucose)](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。

なお、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 (High glucose) (5ml)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(DMEM由来の有機物が含まれる)とした。

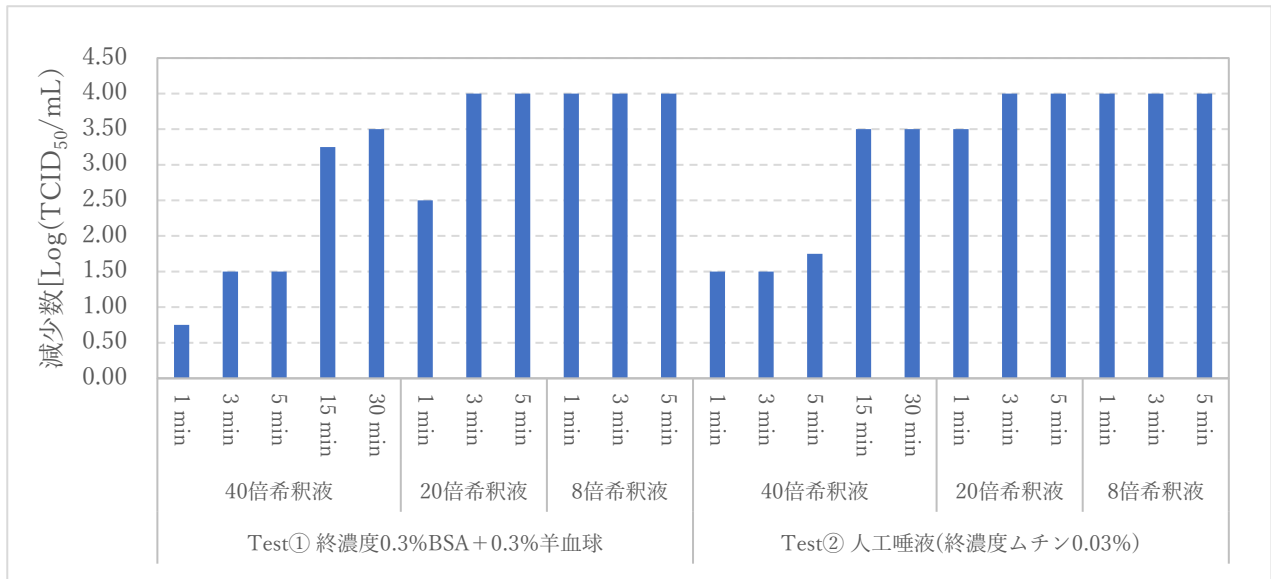
さらに得られたウイルス液に、終濃度10%(w/w)になるようにPEG8000を加えて、氷上で6時間放置し、3000rpmで30分遠心分離後に生理食塩水に懸濁して分注し、 -80°C で凍結保存した。ウイルス液を使用直前に生理食塩水で10倍に希釈して、精製ウイルス液(DMEM由来の有機物を含まない)として用いた。

抗ウイルス試験の方法は以下のように行った。各有機物：精製ウイルス液：試薬を1:1:8の比率で混合し、室温で所定の時間反応させたのちに、50 μL 被検液を450 μL の10 μM チオ硫酸ナトリウム液を含む10%FBS含有DMEM (High glucose)に添加し、反応を止めた(10倍希釈)。その後、さらに10%FBS含有DMEM (High glucose)を用いて 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、1時間後に吸引除去して100 μl /wellのDMEM (High glucose)に置換して培養した。また、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：

有機物負荷と種類	検体名	接触時間	Log(TCID ₅₀ /mL)		▲Log	除去効果 (%)	
			No-virus (Blank)	SARS-CoV-2			
汚濁条件 終濃度：	滅菌水(Blank 区)	1~5min	1.80	5.80	—	—	
		15~30min	1.80	5.30	—	—	
0.3%BSA + 0.3%羊血球	亜塩素酸水製剤×1/40 液	1 min	1.80	5.05	0.75	82.22%	
		遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 5 mg/L : 測定値	3 min	1.80	4.30	1.50	96.84%
	含量 亜塩素酸(HCO ₂ =68.46)として 200 ppm : 計算値	5 min	1.80	4.30	1.50	99.84%	
		15 min	1.80	2.05	3.25	99.95%	
		30 min	1.80	2.05	3.25	99.95%	
	亜塩素酸水製剤×1/20 液	1 min	1.80	3.30	2.50	99.68%	
		遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 10 mg/L : 測定値	3 min	1.80	1.80	>4.00	>99.99%
	含量 亜塩素酸(HCO ₂ =68.46)として 400 ppm : 計算値	5 min	1.80	1.80	>4.00	>99.99%	
	亜塩素酸水製剤×1/8 液	1 min	1.80	1.80	>4.00	>99.99%	
		遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 25 mg/L : 測定値	3 min	1.80	1.80	>4.00	>99.99%
	含量 亜塩素酸(HCO ₂ =68.46)として 1000 ppm : 計算値	10 min	1.80	1.80	>4.00	>99.99%	
	人工唾液： 終濃度ムチン	滅菌水(Blank 区)	1~5min	1.80	5.80	—	—
			15~30min	1.80	5.30	—	—
	0.03%	亜塩素酸水製剤×1/40 液	1 min	1.80	4.30	1.50	96.84%
遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 5 mg/L : 測定値			3min	1.80	4.30	1.50	96.84%
含量 亜塩素酸(HCO ₂ =68.46)として 200 ppm : 計算値		5 min	1.80	4.05	1.75	98.22%	
		15 min	1.80	1.80	3.50	>99.97%	
		30 min	1.80	1.80	3.50	>99.97%	
亜塩素酸水製剤×1/20 液		1 min	1.80	2.30	3.50	99.97%	
		遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 10 mg/L : 測定値	3min	1.80	1.80	>4.00	>99.99%
含量 亜塩素酸(HCO ₂ =68.46)として 400 ppm : 計算値		5 min	1.80	1.80	>4.00	>99.99%	
亜塩素酸水製剤×1/8 液		1 min	1.80	1.80	>4.00	>99.99%	
		遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 25 mg/L : 測定値	3min	1.80	1.80	>4.00	>99.99%
含量 亜塩素酸(HCO ₂ =68.46)として 1000 ppm : 計算値		5 min	1.80	1.80	>4.00	>99.99%	



※ 遊離塩素濃度(CI=35.45 として)並びに含量 亜塩素酸(HClO₂=68.46)としての値は表の結果を参照。

【Test①】

環境中の汚濁条件下（終濃度 0.3%BSA+0.3%羊血球）において、亜塩素酸水製剤の 1/20 希釈液 [遊離塩素濃度 (CI=35.45 として) 10 mg/L、含量 亜塩素酸 (HClO₂=68.46) として 400 ppm：計算値] で5分以内という短時間の接触時間でウイルス感染価は検出限界まで低減（99.99%以上除去）されることが判った。

なお、亜塩素酸水製剤の 1/40 希釈液 [遊離塩素濃度 (CI=35.45 として) 5 mg/L、含量 亜塩素酸 (HClO₂=68.46) として 200 ppm：計算値] であっても、処理時間を 15 分間以上に延長することでウイルス感染価は 3 Log 以上（99.9%以上）低減されることが判った。

【Test②】

人工唾液（ASTEM E2720-16 に準ずる）の添加（終濃度ムチン 0.03%）条件下において、亜塩素酸水製剤の 1/20 希釈液 [遊離塩素濃度 (CI=35.45 として) 10 mg/L、含量 亜塩素酸 (HClO₂=68.46) として 400 ppm：計算値] で5分以内という短時間の接触時間でウイルス感染価は検出限界まで低減（99.99%以上除去）されることが判った。

なお、亜塩素酸水製剤の 1/40 希釈液 [遊離塩素濃度 (CI=35.45 として) 5 mg/L、含量 亜塩素酸 (HClO₂=68.46) として 200 ppm：計算値] であっても、処理時間を 15 分間以上に延長することでウイルス感染価は 3 Log 以上（99.9%以上）低減されることが判った。

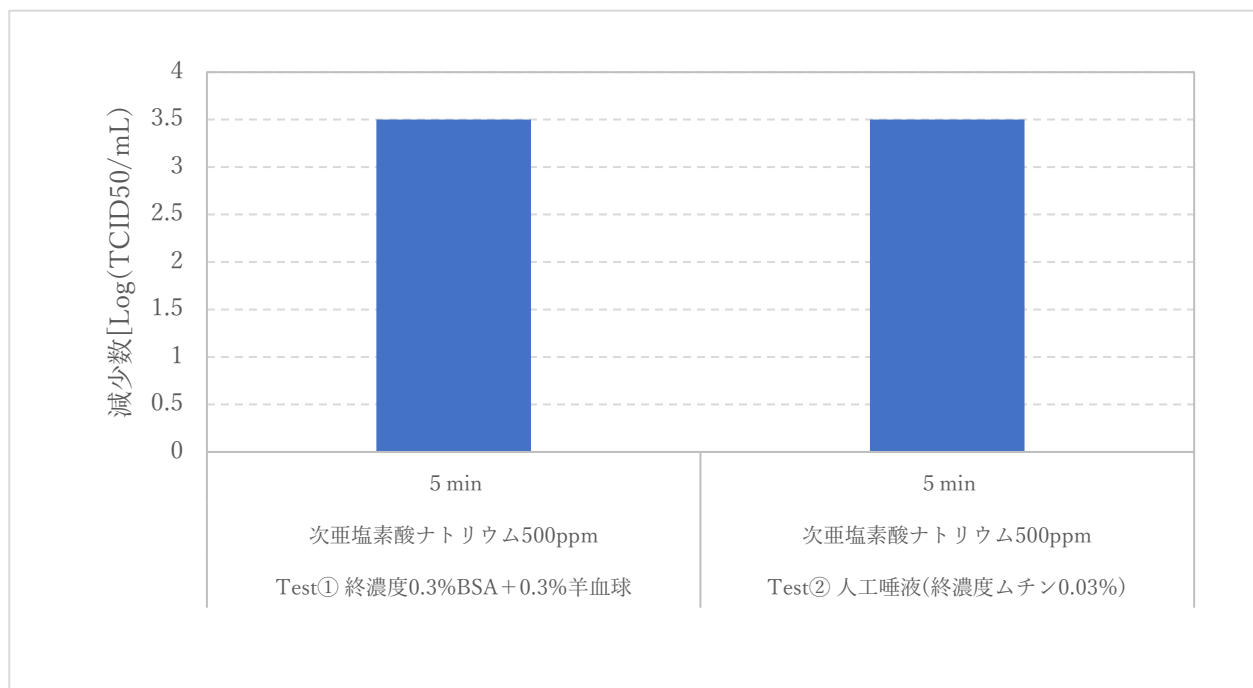
結果として、いずれの有機物負荷条件下であっても、次亜塩素酸ナトリウム 500ppm（有効塩素濃度・遊離塩素濃度 500 mg/L）液・5分以内の処理の代替利用に、亜塩素酸水を用いるとした場合、遊離塩素濃度 10 mg/L・含量 400ppm 液でなら同等の効果を享受していただけると考える。

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 (SARS-CoV-2) 不活化 (除去) 効果確認試験報告書 (6) 【補足資料】

結果：次亜塩素酸ナトリウム液における新型コロナウイルスに対する不活化効果

有機物負荷と種類	検体名	接触 時間	Log(TCID ₅₀ /mL)		▲Log	除去効果 (%)
			No-virus (Blank)	SARS- CoV-2		
汚濁条件	滅菌水(Blank区)	5min	1.80	5.30	—	—
終濃度： 0.3%BSA+ 0.3%羊血球	次亜塩素酸ナトリウム 遊離塩素濃度 (Cl=35.45として) 500ppm：測定値 有効塩素濃度 500ppm：計算値	5 min	1.80	1.80	>3.5	>99.97%
人工唾液： 終濃度ムチン 0.03%	滅菌水(Blank区) 次亜塩素酸ナトリウム 遊離塩素濃度 (Cl=35.45として) 500ppm：測定値 有効塩素濃度 500ppm：計算値	5min 5min	1.80 1.80	5.30 1.80	— >3.5	— >99.97%



<有機物非存在下> (EN 14476準拠)

試験検体 (薬剤) Cont. 次亜塩素酸ナトリウム液 [有効塩素濃度500ppm (終濃度)]
Test. 亜塩素酸水製剤※¹ (次亜塩素酸ナトリウム液と同等の効果を有する濃度※²)

※¹: 医薬品と同等の遊離塩素濃度(CI=35.45として)200mg/L以上、含量 亜塩素酸(HClO₂=68.46)として0.8%品 (製造時) を使用。
確認濃度 (遊離塩素濃度 (CI=35.45 として) (終濃度) : 5mg/L、10mg/L、25mg/L

※²: 4 Log以上 (最低 3 Log以上) の減少効果が認められる濃度を示す。

ウイルス株 SARS-CoV-2 [B.1.1, EPI_ISL_6289932、他複数株にて確認予定]

宿主細胞 VeroE6/TMPRSS2細胞 (JCRB1819)

ウイルス液FBS濃度 0%

(精製ウイルス液: DMEM由来の有機物が含まれない。)

ウイルス培養時の培地 ダルベッコ改変イーグル培地 (高グルコース)
Dulbecco's Modified Eagle Medium [DMEM (High glucose)]

有機物負荷条件 ①BSA0.3% + 羊血球0.3% (終濃度)

②人工唾液注) : ムチン0.03% (0.3g/L) (終濃度)

注) : [Artificial Saliva (ムチン0.3% (3.0g/L)) を使用 <別添3参照>]

ウイルス力価検出方法 TCID₅₀ (もしくはプラーク法)

薬剤 : 有機物 : ウイルス液 8 : 1 : 1 (もしくは 17 : 2 : 1)

※薬剤は終濃度になるように1.25倍の濃度で調整する。
(例.500ppm × 1.25 = 625ppmの薬剤液を調製)

初発ウイルス濃度 10⁷ TCID₅₀ / mL

ウイルス不活化(除去)効果確認試験 (6) のアウトライン (EN 14476準拠)

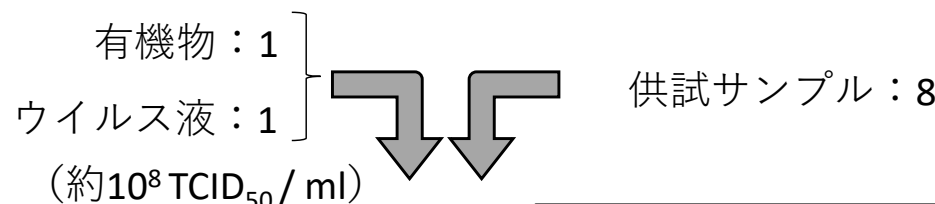
・ 宿主細胞培養およびウイルス培養

- ・ ウイルス培養時のFBS濃度：0% (注)

<有機物存在条件下の場合>

- ・ ① 3.0%BSA+3.0%羊血球： 1 + ウイルス液：1
(終濃度は0.3%BSA + 0.3%羊血球になる)
- ・ ②人工唾液 [Artificial Saliva]：1 + ウイルス液：1
(終濃度として0.03% (0.3g/L) になる)

(注：ウイルス精製することで、DMEM由来の有機物も含まれない。)



・ 供試サンプルの調製

- ・ 薬剤は蒸留水で終濃度の1.25倍濃度の希釈液を調製する。

例.) 次亜塩素酸ナトリウム液

有効塩素濃度625ppm (ウイルス接触時の終濃度は500ppm)

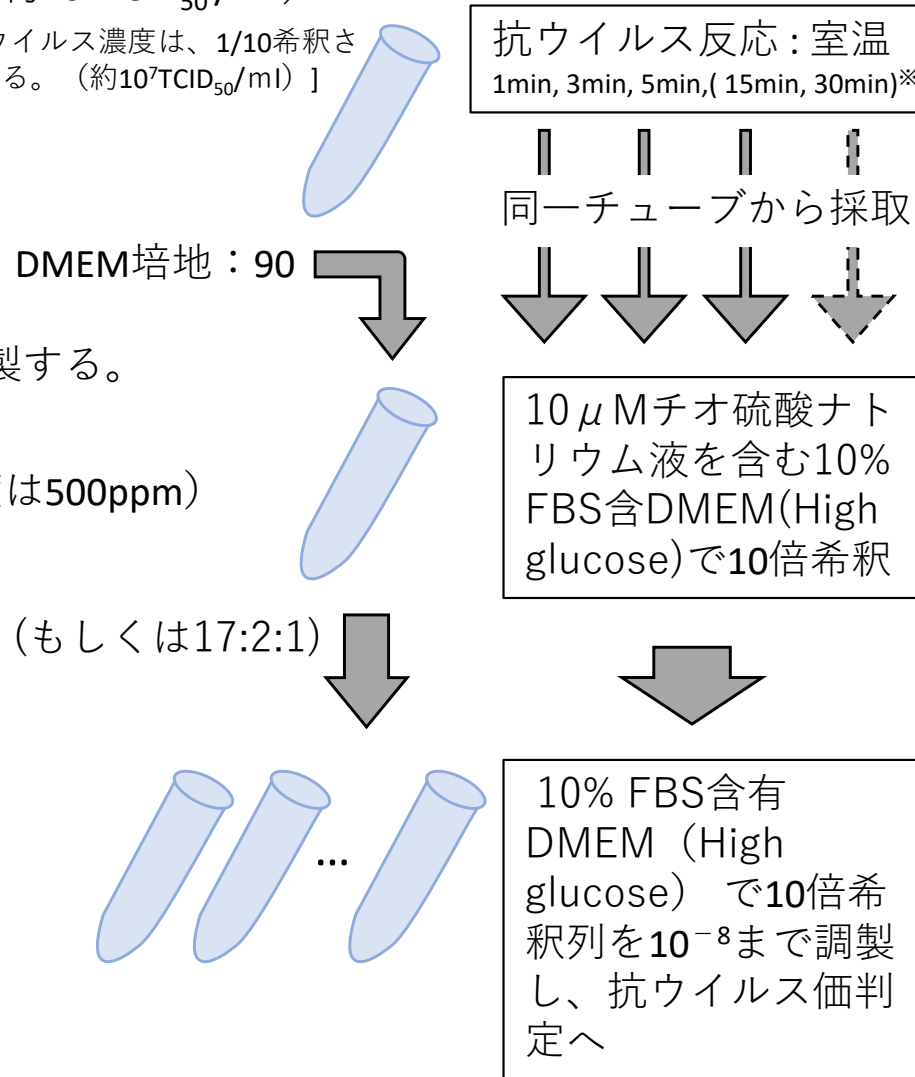
・ 抗ウイルス反応

- ・ 供試サンプル：有機物：ウイルス液 = 8 : 1 : 1 (もしくは17:2:1)
- ・ 室温 1分、3分、5分、(15分、30分) ※

※長時間 (15分~30分) の処理時間は、遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 5mg/L (終濃度) のみを確認濃度として設定した。

・ 供試サンプルの除去・中和処理

- ・ 10 μMチオ硫酸ナトリウム液を含む10% FBS含有DMEM(High glucose)で中和後、10% FBS含有DMEM (High glucose) で10倍希釈列を 10^{-8} まで希釈調製した



ウイルス不活化(除去)効果確認試験条件(6)の人工唾液の調製方法 (EN 14476準拠)

ASTEM E2720-16 (E2721-16)の培地 (Artificial Saliva) 組成

Reagent	Amount
MgCl ₂ · 7 H ₂ O	0.04 g
CaCl ₂ · H ₂ O	0.13 g
NaHCO ₃	0.42 g
0.2 M KH ₂ PO ₄	7.70 mL
0.2 M K ₂ HPO ₄	12.3 mL
NH ₄ Cl	0.11 g
KSCN	0.19 g
(NH ₂) ₂ CO	0.12 g
NaCl	0.88 g
KCl	1.04 g
Mucin	3.00 g ※2
Distilled water	1000 mL
pH	7

※2：終濃度としてムチンを0.03% (0.3g/L) になるように Artificial Saliva (ムチン0.3%(3.0g/L)) を 1/10 (有機物：ウイルス液：薬剤 = 1:1:8) で使用する。