

2023年8月30日

鳥インフルエンザウイルスに対する効果確認試験報告書（1）
～有機物非存在条件下における亜塩素酸水の除去効果～

試験目的：鳥インフルエンザウイルスに対する有機物非存在条件下における亜塩素酸水製剤による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）200 mg/L 以上

ウイルス：Avian Influenza H5N3（A/Swan/Shimane/499/83）

細胞：MDCK（+） [Noma et al., Arch Virol 143: 1893-1909,1998]

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)、トリプシン(メルク社)

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。発育鶏卵にウイルス液を接種し、培養後、尿膜腔液を回収し、ウイルス浮遊液とした。

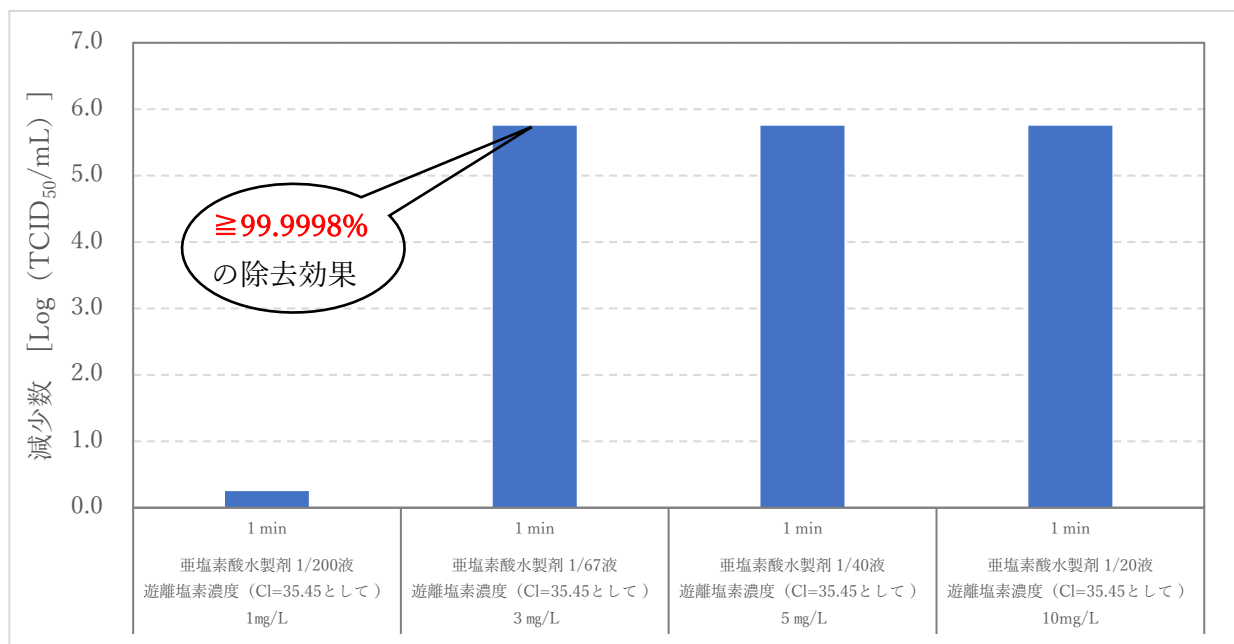
さらに得られたウイルス浮遊液は、超遠心チューブ内の 20% (w/w) ショ糖/PBS 液上に重層し、超遠心 (SW32Ti, 22,000rpm, 90min) によって、上清(夾雑物)を除去し、沈殿しているウイルスを生理食塩水で懸濁し、これをウイルス原液(約 $10^9 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$) とし、試験時に 10 倍に希釈したウイルス液(約 $10^8 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$) を供試ウイルス液とした。

抗ウイルス試験の方法は以下のように行った。精製ウイルス液：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、 $50 \mu\text{L}$ 被検液を $450 \mu\text{L}$ の $10 \mu\text{M}$ 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。MDCK (+) 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 $50 \mu\text{l}/\text{well}$ で接種し、一時間後に吸引除去して $100 \mu\text{l}/\text{well}$ の $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ トリプシン含有 DMEM (High glucose) に置換して培養した。また、5 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 [$50\% \text{ Tissue culture infectious dose (TCID}_{50})/\text{ml}$] を求めた。

結果：

有機物非存在条件下における鳥インフルエンザウイルスに対する除去効果

検体名	接触時間	Log(TCID ₅₀ /mL)		▲Log	除去効果 (低減率%)
		No-virus (Blank)	Avian Influenza virus		
滅菌水(Blank区)	1 min	1.80	7.55	—	—
亜塩素酸水製剤 1/200液 遊離塩素濃度 (Cl=35.45として) 1ppm：測定値 含量 亜塩素酸(HClO ₂ =68.46)として 40 ppm：計算値	1 min	1.80	7.30	0.25	43.77%
亜塩素酸水製剤 1/67液 遊離塩素濃度 (Cl=35.45として) 3ppm：測定値 含量 亜塩素酸(HClO ₂ =68.46)として 120 ppm：計算値	1 min	1.80	1.80	>5.75	>99.99%
亜塩素酸水製剤 1/40液 遊離塩素濃度 (Cl=35.45として) 5ppm：測定値 含量 亜塩素酸(HClO ₂ =68.46)として 200 ppm：計算値	1 min	1.80	1.80	>5.75	>99.99%
亜塩素酸水製剤 1/20液 遊離塩素濃度 (Cl=35.45として) 10ppm：測定値 含量 亜塩素酸(HClO ₂ =68.46)として 400 ppm：計算値	1 min	1.80	1.80	>5.75	>99.99%



有機物非存在条件下において、試験検体として今回用いた亜塩素酸水製剤の1/67希釈液〔遊離塩素濃度 (Cl=35.45として) 3 mg/L、含量 亜塩素酸 (HClO₂=68.46)として 120 ppm：計算値の濃度〕以上であれば、1分間という短い接触時間でウイルスの感染力価は検出限界値にまで低減 (99.998%以上除去) されることが判った。

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。

試験検体
(薬剤) 亜塩素酸水製剤 ※1※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）：1mg/L、3mg/L、5mg/L、10mg/L

※2：除去効果の基準値：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 Avian Influenza H5N3 (A/Swan/Shimane/499/83)

ウイルス増殖 発育鶏卵を用いて増殖させ、尿膜腔液をウイルス浮遊液とした。

ウイルス液中のFBS濃度 0% (超遠心により発育鶏卵内の尿膜腔液中の夾雑物を除去した。)

宿主細胞 MDCK(+)細胞 [Noma et al., Arch Virol 143: 1893-1909,1998]

ウイルス培養時の培地 20 μg/mLトリプシン含有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)]

ウイルス力価検出方法 TCID₅₀法

薬剤：ウイルス液 9：1

初発ウイルス濃度 約10⁹ TCID₅₀ / mL

<別添2> 鳥インフルエンザウイルスに対する不活化効果確認試験 1 のアウトライン（有機物非存在条件下）

2023/08/30初版
2023/09/26改訂

・ 宿主細胞培養およびウイルス培養

・ ウイルス培養時

発育鶏卵を使用（超遠心により発育鶏卵内の尿膜腔液中の夾雑物を除去した。）

試験時に約 10^8 PFU/mL (TCID₅₀/mL)にまで希釈する。

・ 不活化効果確認試験

MDCK (+) 細胞を用いて、TCID₅₀法に基づき確認した。

・ 供試サンプルの調製

薬剤は蒸留水で各濃度の希釈液を調製する。

- ・ 亜塩素酸水製剤を水で遊離塩素濃度1 mg/L、3 mg/L、5 mg/L、10 mg/Lにそれぞれ調製した。

・ ウイルス反応

- ・ 供試サンプル：ウイルス液 = 9：1

- ・ 室温 1分間

・ 供試サンプルの除去・中和処理

- ・ $10\mu\text{M}$ 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

