

2020年12月11日	初版
2021年01月19日	改訂
2022年10月17日	改訂
2022年11月07日	改訂

2020年11月27日

#### ウイルス (SARS-CoV-2) 不活化 (除去) 効果確認試験報告書 (4)

- 試験目的：①有機物非添加区で、ユーザーが使用している遊離塩素濃度(CI=35.45として)である5mg/L [含量 亜塩素酸 (HClO<sub>2</sub>=68.46)として200ppm] で1分間という短時間での除去効果が認められるのかどうかを確認することにした。
- ②『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、終濃度0.03%のBSA添加区で亜塩素酸水製剤の1/8希釈液を用いて、10分間接触させた時、除去効果が認められた。そこで、今回は1分間という短時間での除去効果を確認することにした。
- ③『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、終濃度0.5%のポリペプトン添加区で亜塩素酸水製剤原液(遊離塩素濃度(CI=35.45として)200mg/L)を用いて、10分間接触させた時、除去効果が認められた。そこで今回は、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 HClO<sub>2</sub>=68.46)として0.8% (8,000ppm) [製造時]  
遊離塩素濃度 (CI=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- $\mu$ m 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。

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、50 $\mu$ L被検液を450 $\mu$ Lの10 $\mu$ 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<sup>-8</sup>まで10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 $\mu$ l/wellで接種し、1時間後に吸引除去して100 $\mu$ l/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、

2020年12月11日

初版

2021年01月19日

改訂

2022年10月17日

改訂

2022年11月07日

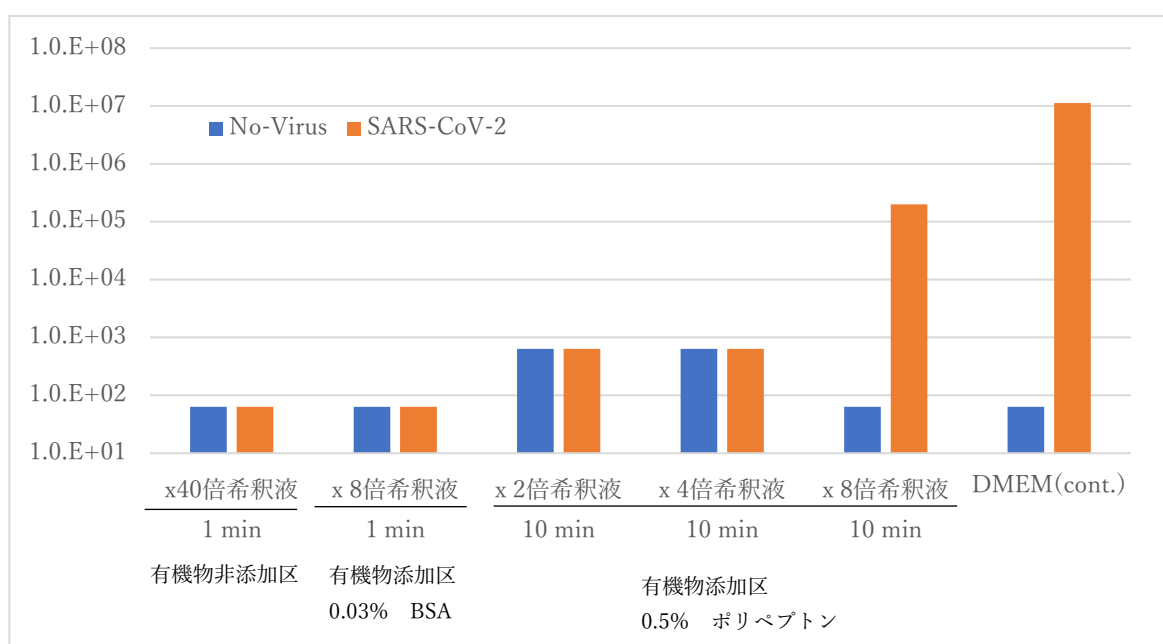
改訂

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 (TCID<sub>50</sub>)/ml] を求めた。

結果：

	検体名	有機物の付加と種類	接触時間	Log(TCID <sub>50</sub> /mL)		▲Log	除去効果 (%)	
				No-virus (Blank)	SARS-CoV-2			
Test ①	亜塩素酸水製剤×1/40 液 遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 5 mg/L : 計算値 含量 亜塩素酸(HCO <sub>2</sub> =68.46)として 200 ppm : 計算値	無 :	0% (注)	1min	1.8	1.8	≧5.3	≧99.999%
Test ②	亜塩素酸水製剤×1/8 液 遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 25 mg/L : 計算値 含量 亜塩素酸(HCO <sub>2</sub> =68.46)として 1000 ppm : 計算値	有 : BSA	0.03% (注)	10min	1.8	1.8	≧5.3	≧99.999%
Test ③	亜塩素酸水製剤×1/8 液 遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 25 mg/L : 計算値 含量 亜塩素酸(HCO <sub>2</sub> =68.46)として 1000 ppm : 計算値	有 : ポリペプトン	0.5% (注)	10min	1.8	5.3	1.8	98.2217%
	亜塩素酸水製剤×1/4 液 遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 50 mg/L : 計算値 含量 亜塩素酸(HCO <sub>2</sub> =68.46)として 2000 ppm : 計算値	有 : ポリペプトン	0.5% (注)	10min	2.8	2.8	≧4.3	≧99.994%
	亜塩素酸水製剤×1/2 液 遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 100 mg/L : 計算値 含量 亜塩素酸(HCO <sub>2</sub> =68.46)として 4000 ppm : 計算値	有 : ポリペプトン	0.5% (注)	10min	2.8	2.8	≧4.3	≧99.994%
Cont.区	DMEM (High glucose)	—	— (注)	10min	1.8	7.1	—	—

(注：ウイルス液には DMEM 由来の有機物が含まれる。)



※ 遊離塩素濃度(Cl=35.45 として)並びに含量 亜塩素酸(HClO<sub>2</sub>=68.46)としての計算値は表の結果を参照。

2020年12月11日	初版
2021年01月19日	改訂
2022年10月17日	改訂
2022年11月07日	改訂

#### 【Test①】

亜塩素酸水製剤の1/40希釈液〔遊離塩素濃度（Cl=35.45として）5 mg/L：計算値、含量 亜塩素酸（HClO<sub>2</sub>=68.46）として200ppm：計算値〕であっても1分間という接触時間でウイルス感染価は検出限界まで低減（99.999%以上除去）されることが判った。

#### 【Test②】

終濃度0.03%のBSA添加区であれば、亜塩素酸水製剤の1/8希釈液〔遊離塩素濃度（Cl=35.45として）25 mg/L：計算値、含量 亜塩素酸（HClO<sub>2</sub>=68.46）として1000ppm：計算値〕で、1分間という接触時間であっても、ウイルス感染価は検出限界まで低減（99.999%以上除去）されることが判った。

#### 【Test③】

終濃度0.5%のポリペプトン添加区だと、亜塩素酸水製剤の1/8希釈液〔遊離塩素濃度（Cl=35.45として）25 mg/L：計算値、含量 亜塩素酸（HClO<sub>2</sub>=68.46）として1000ppm：計算値〕で10分間という接触時間では、ウイルス感染価は1.8Logまでしか低減（98%除去）されなかった。

しかし、亜塩素酸水製剤の1/4希釈液〔遊離塩素濃度（Cl=35.45として）50 mg/L：計算値、含量 亜塩素酸（HClO<sub>2</sub>=68.46）として4000ppm：計算値〕以上という濃度であれば、ウイルス感染価は検出限界まで低減（99.994%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。

## ウイルス不活化(除去)効果確認試験条件(4) <有機物非添加区>

---

試験検体	<b>亜塩素酸水製剤</b> 含量 (HClO <sub>2</sub> =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 [B.1.1, EPI_ISL_6289932を使用]
宿主細胞	VeroE6/TMPRSS2細胞 (JCRB1819)
ウイルス液FBS濃度	0% (ウイルス液にはDMEM由来の有機物が含まれる。)
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)]
ウイルス力価検出方法	TCID <sub>50</sub>
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>1.1 × 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> / mL</u>

---

## ウイルス不活化(除去)効果確認試験条件(4) <有機物添加区>

---

試験検体	<b>亜塩素酸水製剤</b> 含量 (HClO <sub>2</sub> =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 [B.1.1, EPI_ISL_6289932を使用]
宿主細胞	VeroE6/TMPRSS2細胞 (JCRB1819)
ウイルス液FBS濃度	0% (ウイルス液にはDMEM由来の有機物が含まれる。)
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)]
ウイルス力価検出方法	TCID <sub>50</sub>
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	<u>1.1 × 10<sup>7</sup></u> TCID <sub>50</sub> / mL

---

## ウイルス不活化（除去）効果確認試験アウトライン(4) <有機物非添加区>

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%<sup>(注)</sup>

(注：ウイルス液にはDMEM由来の有機物が含まれる。)

### ・ 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

### ・ 供試サンプルの除去・中和処理

- ・ 10  $\mu$ 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

ウイルス液：1  
(約 $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml)

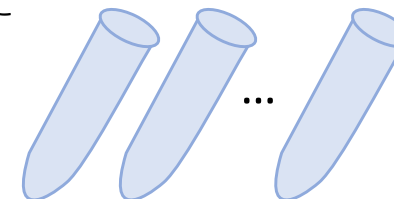
供試サンプル：9

抗ウイルス反応：  
1min(室温)

10%FBS含有DMEM培地：90

10  $\mu$ Mチオ硫酸ナトリウム液を含む10% FBS含DMEM(High glucose)で10倍希釈

10% FBS含有DMEM (High glucose) で10倍希釈列を $10^{-8}$ まで調製し、抗ウイルス価判定へ



## ウイルス不活化（除去）効果確認試験アウトライン(4) <有機物添加区>

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%（注）

<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）

（注：ウイルス液にはDMEM由来の有機物が含まれる。）

ウイルス液：1 供試サンプル：9

（約 $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml）

[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 $10^7$ TCID<sub>50</sub>/ml）]

抗ウイルス反応：  
10min(室温)

DMEM培地：90

10 $\mu$ Mチオ硫酸ナトリウム液を含む10% FBS含DMEM(High glucose)で10倍希釈

### ・ 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

- ・ 10 $\mu$ 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

10% FBS含有DMEM (High glucose) で10倍希釈列を $10^{-8}$ まで調製し、抗ウイルス価判定へ