

新時代化学 株式会社 様

試験報告書

次亜塩素酸系〔ウイルス・細菌〕除菌剤「コレスゴ!」の
イヌパルボウイルスに対する不活化効果検討

北環発 26_0038 号

平成 26 年 10 月 9 日

神奈川県相模原市南区北里 1 丁目 15 番 1 号
一般財団法人 北里環境科学センター
理事長 伊藤 俊洋

試験内容を公表する際は、結果の表記等について専門的な立場から確認させていただいております。なお、確認目的と申込様式は、ホームページに掲載しております。
(http://www.kitasato-e.or.jp/?page_id=87)

1. 試験目的

貴社提供、次亜塩素酸系〔ウイルス・細菌〕除菌剤「コレスゴ!」によるイヌパルボウウイルスに対する不活化効果を評価した。

2. 依頼者

名称：新時代化学 株式会社

所在地：〒680-1441 鳥取県鳥取市良田 894

3. 試験機関

名称：一般財団法人 北里環境科学センター

所在地：〒252-0329 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1

担当：ウイルス部ウイルス課

4. 試験期間

平成 26 年 8 月 11 日～平成 26 年 8 月 19 日

5. 試験品および、試験水の調製法

1) 試験品

次亜塩素酸系〔ウイルス・細菌〕除菌剤「コレスゴ!」

ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム、硫酸ナトリウムなどを含む混合粉末の分包タイプ。

2) 試験水の調製法

試験品 2 包を 500mL の硬水 [JIS K3362 3 °DH 硬水 (CaCO₃ 換算 53.58mg/L、以下硬水と記載した)] に溶解し、有効塩素濃度が 200～210mg/mL になるよう調製したものを試験水として用いた。以下、「調製試験水」と記した。

6. 試験条件

作用時間：0 (初期)、15 分間

作用温度：25°C±2°C

7. 供試ウイルスとウイルス液の調製方法

イヌパルボウイルス (*Canine parvovirus*, strain: Cornell-780916-80)

ウイルスをネコ腎臓細胞 (CRFK : Crandell-Rees feline kidney) に感染させ、細胞培養面積の約 90%以上が細胞変性効果 (CPE : Cytopathic effect) を示したとき-30°Cの冷凍庫に凍結保存した。その後、凍結融解操作を行い、3,500 rpm で 10 分間遠心した

上澄みを採取し、限外ろ過膜で濃縮したウイルスを供試ウイルス液とした。

8. 試験方法

1) 有効塩素濃度およびpH測定

試験前に「調製試験水」の有効塩素濃度をハンディ水質計AQUAB AQ-102（柴田科学、ヨウ素試薬による吸光光度法）で、pH をpH メータ D-52（HORIBA、ガラス電極法）で測定した。

2) ウイルス不活化試験

ウイルスの不活化効果試験は以下の手順により行った。

試験管内に「調製試験水」0.9 mL と供試ウイルス液 0.1 mL を加え、試験管ミキサーでゆるやかに混合して、室温で所定の時間作用させた。所定時間作用後、0.1 mL を採取し、0.5%チオ硫酸ナトリウム液で 100 倍に希釈して作用を停止させたものを感染価測定用試料の原液としてウイルス感染価を測定した*。なお、作用時間 0（初期）および対照は試験水の代わりに「硬水」を用いた。

※ 作用停止の有効性を確認した。手順と結果を 11 項に示した。

3) ウイルス感染価の測定

ウイルス感染価測定用試料原液をリン酸緩衝生理食塩水（PBS：phosphate buffered saline）で 10 倍段階希釈した後、感染価測定用試料原液または PBS で 10 倍段階希釈したウイルス液 50 μ L と 5 %ウシ胎児血清（FBS：fetal bovine serum）添加細胞維持培地（DMEM：Dulbecco's Modified Eagle's Medium）に懸濁した CRFK 細胞 50 μ L を、96 ウエルマイクロプレートに植え込んだ。その後、37°C の炭酸ガスふ卵器内で 7 日間培養を行った。

イヌパルボウイルスの増殖は細胞変性効果による確認が困難なため、ブタ赤血球を用いた血球凝集法によりウイルスの増殖を確認した。以下に手順を示した。

ブタ保存血液 5 mL に生理食塩水 10 mL を加え、2,000 rpm、4°C、10 分間遠心し、赤血球を洗浄した。上清を除去し、生理食塩水 10 mL を加えて穏やかに攪拌し、2,000 rpm、4°C、10 分間遠心した。この操作を 2 回繰り返して洗浄ブタ血球を調製した。ブタ洗浄血球をペロナール緩衝生理食塩水に 0.8 %になるよう加え、血球浮遊液を調製した。

丸底 96 ウエルプレートに、培養プレートと同じ配置で培養上清 50 μ L を移し、さらに、各ウエルにペロナール緩衝生理食塩水 50 μ L と 0.8 %血球浮遊液 50 μ L 加え、プレートミキサーで攪拌した後、4°C で 1 時間静置した。1 時間後、血球の凝集像を観察し、Reed-Muench 法で TCID₅₀/mL を求めた。

なお、「調製試験水」の作用停止後の溶液が CRFK 細胞に対し毒性を示す場合、

感染価の測定が困難になるため、毒性確認を行った。「調製試験水」の作用停止後の細胞毒性確認試験手順と結果を12項に示した。

9. 試験結果

調製試験水の有効塩素濃度およびpHの測定結果を表-1、ウイルス不活化試験の結果を表-2に示した。試験結果は、ウイルス感染価測定用試料1mLあたりのウイルス感染価および、初期感染価と試験水作用後の感染価対数値の差から求めたウイルス感染価対数減少値(LRV: log reduction value)を記載した。

初期ウイルス感染価は、 2.9×10^3 TCID₅₀/mLであった。「硬水(対照)」に15分間作用させたウイルス感染価は 8.4×10^3 TCID₅₀/mLであり、大きな感染価の変動は認められなかった。

「調製試験水」をウイルスに作用させた場合、15分間の作用で検出限界値(6.3 TCID₅₀/mL)以下となり、LRVは2.6 log₁₀以上を示した。

10. コメント

本試験では、貴社ご提供、[次亜塩素酸系〔ウイルス・細菌〕除菌剤「コレスゴ!」]の調製試験水によるイヌパルボウイルスに対する不活化効果を検討した。

消毒薬などの欧州標準試験法であるEN14476:2005 (Chemical disinfectants and antiseptics. Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine.)による消毒効果の判定基準は、初期感染価から4.0 log₁₀以上のLRVをもって不活化効果ありと判定している。本試験で用いたウイルス液は低い感染価であったため、4.0 log₁₀以上の減少を確認することが出来なかったが、LRVは2.6 log₁₀以上を示し、ウイルス感染価は検出限界値以下となった。

塩素系の消毒剤は、有機物含むウイルス液を用いた不活化試験において、有機物の濃度によりウイルス不活化効果が影響を受けることが報告されている。使用環境によっては、有機物質(汚れ)によって消毒効果が影響を受ける可能性があり、適切な使い方を考慮することが重要である。

参考文献

- 1) E. Duizer *et al.*, Inactivation of caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 4538-4543: 2004.

以上

表-1 試験水の有効塩素濃度および pH

試験水	有効塩素濃度 ^{※1} (mg/L)	pH ^{※2}
「調製試験水」	205	6.5 (25.1°C)

※1 : AQUAB AQ-102

(柴田科学、ヨウ素試薬による吸光光度法、測定範囲 0~300 mg/L)

※2 : HORIBA pH メータ D-52 (ガラス電極法)

表-2 「調製試験水」によるイヌパルボウイルスの不活化効果

試験水	作用時間		LRV [※]
	0 (初期)	15 分間	15 分後
調製試験水	/	< 6.3	> 2.6
硬水 (対照)	2.9×10^3	8.4×10^3	-0.5

使用ウイルス : *Canine parvovirus* (Cornell-780916-80)

供試ウイルス原液の感染価 : 5.4×10^6 TCID₅₀/mL

感染価単位 : TCID₅₀/mL

検出限界値 : 6.3 TCID₅₀/mL

※ LRV (log reduction value) : \log_{10} (初期感染価 / 15 分間作用後の感染価)

11. 作用停止液の有効性確認試験

1) 目的

試験水による供試ウイルスへの不活化作用を停止させる目的で使用する作用停止液の有効性を確認した。

2) 方法

作用停止液として調製試験水を0.5%チオ硫酸ナトリウム液で100倍に希釈して塩素を中和する方法を採用した。

調製試験水0.9 mLにPBS 0.1 mLを加えたのち、0.5%チオ硫酸ナトリウム水溶液で100倍に希釈した液を試験試料とした。試験試料10 mLにウイルス液0.1 mLを添加し、室温で15分間作用させた。この溶液を原液とし、PBSで10倍に希釈してウイルス感染価を測定した。作用停止液の有効性は、硬水（対照）と比較して、感染価が $0.5 \log_{10}$ 以上減少しない場合を有効と判定した。

3) 結果

結果を表-3に示した。

作用停止液で希釈した試験水にウイルスを作用させた感染価を、「硬水（対照）」と比較した場合、差が認められなかった。以上の結果から、作用停止液は、試験に対して有効であると判定した。

表-3 作用停止液の有効性確認

試験水	15分間作用後	感染価の差 ^{※1}	作用停止の有効性 ^{※2}
調製試験水 [※] の中和液	7.4×10^4	-0.1	有効
硬水（対照）	6.3×10^4		

感染価単位：TCID₅₀/mL

調製試験水の有効塩素濃度 207 mg/L、pH 6.6（26.2℃）

※1： \log_{10} （対照の感染価／試験水の感染価）

※2：対照に対し、 $0.5 \log_{10}$ 以上減少していない場合を有効と判定した。

12. 細胞毒性確認試験

1) 目的

試験水が供試ウイルスを培養する細胞に対して細胞毒性を示す場合、ウイルス感染価の測定が困難になるため、中和後の試験水による CRFK 細胞に対する毒性を調べた。

2) 方法

調製試験水 0.9 mL に PBS 0.1 mL を加えたのち、0.5 %チオ硫酸ナトリウム水溶液で 100 倍に希釈した液を細胞毒性確認用試料の原液とした。PBS で 10 倍段階希釈した後、細胞毒性確認用試料の原液および希釈試料 50 μ L と 5% FBS を添加した DMEM に懸濁した細胞 50 μ L を 96 ウェルプレートに植え込んだ。炭酸ガスふ卵器で 4 日間培養した後、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、各ウェルの染色の度合いにより細胞毒性を確認した。細胞毒性は、PBS を加えて培養したものを生細胞率 100%として、各試験水の生細胞率を求め、50%以下となった場合、細胞毒性“あり”と判定した。

3) 結果

試験結果を表-4、図-1 に示した。

今回の試験では、各種試験水の細胞毒性確認用試料原液の生細胞率は 50%以上であった。以上の結果から、CRFK 細胞に対する毒性は認められず、感染価測定系は影響を受けないと判断した。

表-4 試験試料の CRFK 細胞に対する細胞毒性

試験水	生細胞率 (%) * (平均値±標準偏差)
細胞毒性確認用試料原液	97 ± 8
10 倍希釈液	102 ± 5
100 倍希釈液	97 ± 10
1,000 倍希釈液	101 ± 5
PBS	100 ± 11

※ 6 ウェルの平均値で算出した。

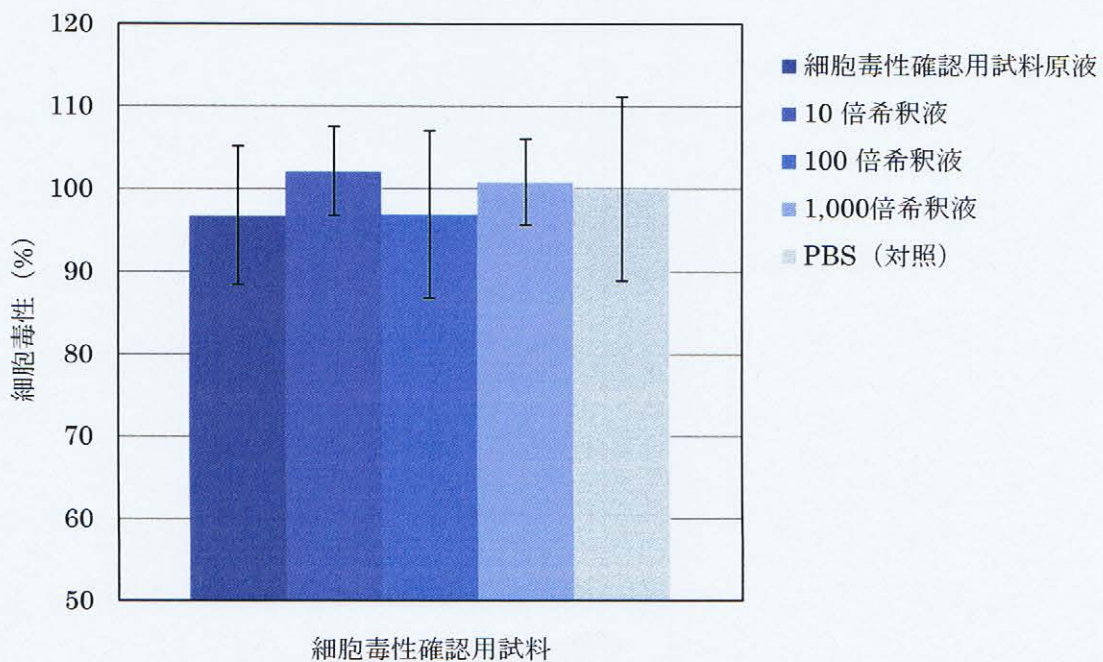


図-1 試験試料の CRFK 細胞に対する細胞毒性