

試験資材のウイルスに対する不活化効果試験

—試験報告書—

試験番号:207124N

株式会社 食環境衛生研究所

〒379-2107

群馬県前橋市荒口町 561-21

Tel027-230-3411

Fax027-230-3412

1. 表題

試験資材のウイルスに対する不活化効果試験

2. 試験番号

No.207124N

3. 目的

試験資材とウイルス(インフルエンザウイルス:H1N1 及び豚コロナウイルス(PEDV))を反応させた時の不活化効果を確認するために実施した。

4. 試験管理組織

試験依頼者の名称及び所在地

名称 ニイヌマ株式会社

所在地 〒986-0853 宮城県石巻市門脇字元浦屋敷 2-20

実施機関の名称、所在地及びその長の氏名

名称 株式会社 食環境衛生研究所

所在地 群馬県前橋市荒口町 561-21

氏名 代表取締役 久保 一弘

試験実施責任者の氏名

松本 彰平

試験担当者の氏名

近藤 実紀

5. 試験スケジュール

試験受託日 2020年5月21日

試験開始日 2020年6月20日

試験終了日 2020年8月5日

6. 試験資材

① : NPW

② : ロハスマイルハンドジェル・クリーンエッグハンドジェル
対照資材として滅菌リン酸緩衝液を用いた。

7. 供試微生物

インフルエンザウイルス：swine influenza virus H1N1 IOWA 株

培養細胞：MDCK 細胞（イヌ腎臓由来株化細胞）

豚コロナウイルス（PEDV）：Porcine epidemic diarrhea virus P-5V 株）

培養細胞：vero 細胞（アフリカミドリザルの腎臓上皮由来株化細胞）

8. 区の設定

区	処置	感作時間
試験区	試験資材 1.0mL に試験菌液 0.1mL 添加	試験開始後 15 秒、10 分
対照区	対照資材 1.0mL に試験菌液 0.1mL 添加	試験開始後 0 分、15 秒、10 分

9. 試験方法

「ウイルス実験学 総論 改訂二版 丸善株式会社 ウイルス中和試験法」を参考として実施した。

10. 試験手順

①予備試験：

試験に先立って、試験資材が培養細胞に与える影響（細胞毒性）を調査した。

試験資材をリン酸緩衝液で 10 倍段階希釈した後、培養細胞に接種し、培養後の細胞の正常な状態を示す最高濃度を確認し、試験に使用するウイルス濃度を決定した。

その結果、細胞毒性について、試験資材①では細胞に影響はみられなかった。

試験資材②では MDCK 細胞では試験資材を 10000 倍、vero 細胞では 10 倍まで希釈しても細胞の発育不良が確認された。このため、試験に際して、試験資材②については MDCK 細胞では 10000 倍、vero 細胞では 10 倍以上希釈してから培養細胞に接種する必要があることが判明した。この為、インフルエンザウイルス添加濃度は 10^7 TCID₅₀/mL 以上、PEDウイルス添加濃度は 10^5 TCID₅₀/mL 以上とした。

②本試験・試験液混合：

試験区分に従い、試験資材及び対照資材の各 1mL をそれぞれ分取し、予備試験で決定した濃度にウイルス液を添加した。

ウイルス液添加後、混合液として室温（25℃）にて所定の時間静置した。

③本試験・細胞接種及び菌数測定：

試験区分ごとに感作が終了した混合液をそれぞれ 10 倍段階希釈し、96well プレートに培養した MDCK 細胞または vero 細胞に 100μL ずつ接種した。

判定は、37℃、炭酸ガス培養(5%)で5日間培養した後、培養細胞を顕微鏡観察し、培養細胞に現れるCPE(細胞変性)の確認をもってウイルス増殖の有無を判定し、その濃度を算出した。

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL

11. 結果

【インフルエンザウイルス】

インフルエンザウイルスに対する試験結果を表 1 及び図 1 に示した。

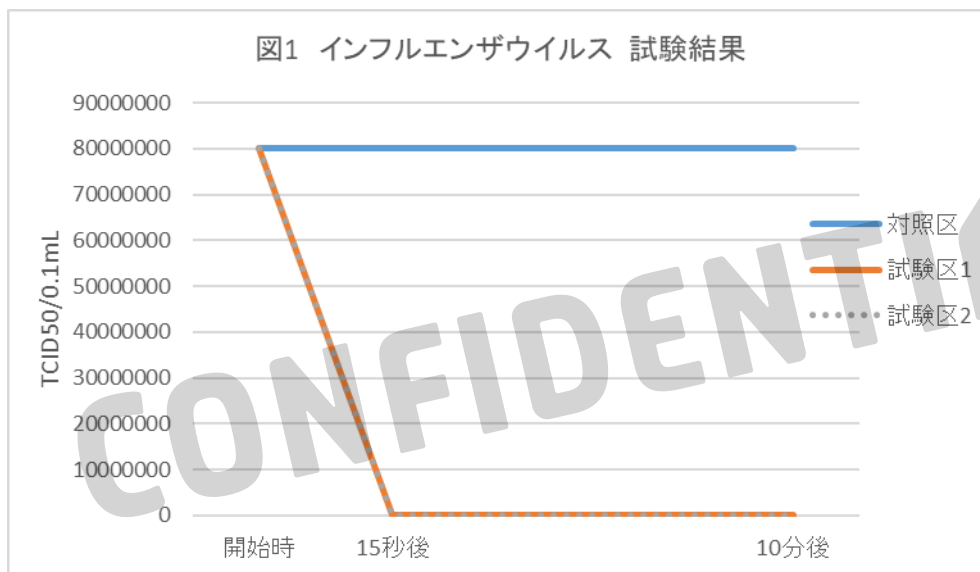
対照区では試験開始後から、試験開始 10 分後までの間にウイルス量の変化はほぼ見られなかった($10^{7.9}$ TCID₅₀/0.1mL)。

試験区 1 では開始 15 秒後で $10^{0.5}$ TCID₅₀/0.1mL 未満(検出限界以下、99.99999%以上減少)となった。

試験区 2 では開始 15 秒後で $10^{5.5}$ TCID₅₀/0.1mL 未満(検出限界以下、99.96%以上減少)となった。

表 1 インフルエンザウイルス試験結果(TCID₅₀/0.1mL)

区	試験開始時	15 秒後	10 分後
対照区		$10^{7.9}$ (80000000)	$10^{7.9}$ (80000000)
試験区 1	$10^{7.9}$	$<10^{0.5}$ (3 未満)	$<10^{0.5}$ (3 未満)
試験区 2		$<10^{4.5}$ (32000 未満)	$<10^{4.5}$ (32000 未満)



【PED ウイルス】

PED ウイルスに対する試験結果を表 2 及び図 2 に示した。

対照区では試験開始後から、試験開始 10 分後までの間にウイルス量の変化はほぼ見られなかった($10^{6.9}$ TCID₅₀/0.1mL)。

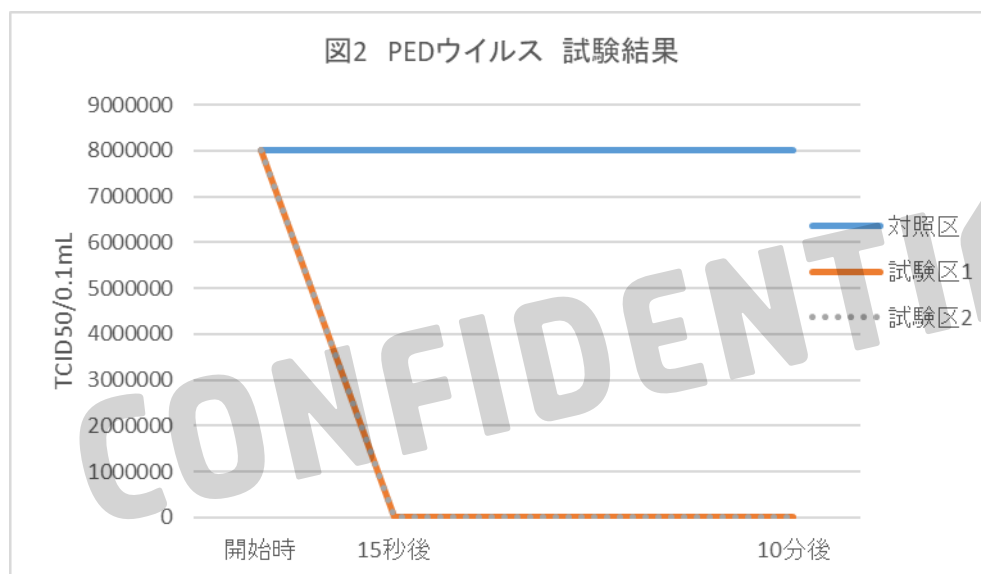
試験区 1 では開始 15 秒後で $10^{0.5}$ TCID₅₀/0.1mL 未満(検出限界以下、99.9999%以上減少)となった。

試験区 2 では開始 15 秒後で $10^{2.1}$ TCID₅₀/0.1mL(99.99%減少)、10 分後で $10^{1.5}$ TCID₅₀/0.1mL 未満(検出限界以下、99.999%以上減少)となった。

表 2 PED ウイルス試験結果(TCID₅₀/0.1mL)

区	試験開始時	15 秒後	10 分後
対照区		$10^{6.9}$ (8000000)	$10^{6.9}$ (8000000)
試験区 1	$10^{6.9}$	$<10^{0.5}$ (3 未満)	$<10^{0.5}$ (3 未満)
試験区 2		$10^{2.1}$ (130)	$<10^{1.5}$ (32 未満)

図2 PEDウイルス 試験結果



12. 考察

今回、試験液のインフルエンザウイルス及び豚コロナウイルスである PED ウイルスに対する不活化効果試験を実施した。

その結果、試験資材①では両ウイルスに対して 15 秒以上の接触で 99.9999%以上の不活化効果があることが判明した。また、試験資材②ではインフルエンザウイルスに対しては 15 秒以上の接触で 99.96%以上、PEDウイルスに対しては 15 秒以上で 99.99%、10 分以上で 99.999%以上の不活化効果があることが判明した。

以上の結果から、試験資材①はインフルエンザウイルス及び PED ウイルスに対して顕著な不活化効果が確認され、試験資材②についても両ウイルスに対する不活化効果が確認された。

また、試験資材①では、50%のエタノールに 1 分または 10 分以上浸漬することで 100 万コピーウイルス RNA/ μL の新型コロナウイルスの不活化効果が認められた事例※と同等であると推察された。

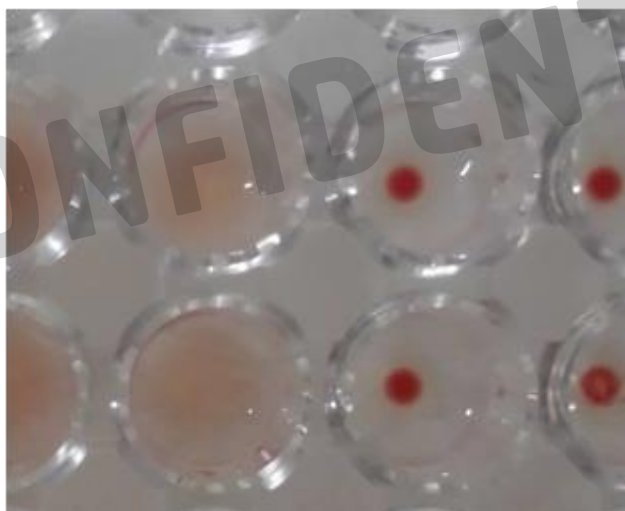
※北里大学大村智記念研究所感染制御研究センタープレスリリース(2020.4.17)

【参考写真】

インフルエンザウイルス

血球凝集反応

左：凝集あり：ウイルス陽性 右：凝集なし：ウイルス陰性



PEDウイルス

細胞像(CPE:細胞変性反応)

左：CPE あり：ウイルス陽性

右：CPE なし：ウイルス陰性

