



20 安全研 第 号

平成 21 年 4 月 1 日

殿

財団法人

理事長

畜産生物科学安全研究所

松原 謙



試験報告書の提出について

時下益々ご清栄のこととお慶び申し上げます。

平成 21 年 2 月 10 日付けをもって受託契約をいたしました下記の試験について、契約書第 5 条の規定により別紙のとおり、試験成績を報告します。

記

試験名

安定型複合塩素除菌消臭剤のウイルスに対する不活化効果試験

試験名 [ハセキ]

[試験番号]

試験報告書

安定型複合塩素除菌消臭剤のウイルスに対する

不活化効果試験
商標名「ハナセ」

(試験番号：)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

試験責任者の署名

財団法人 畜産生物科学安全研究所

生物工学研究部 主任研究員

西 村 昌 晃

平成 21 年 4 月 1 日

試験の表題

商品名「ピナセP」

安定型複合塩素除菌消臭剤のウイルス不活化効果試験
(試験番号: 08-154-1)

試験委託者

名 称:

所 在 地:

委託責任者:

試験実施施設

名 称: 財団法人 畜産生物科学安全研究所

所 在 地: 神奈川県相模原市橋本台 3-7-11

代 表 者: 理事長 松原謙一

試験責任者: 生物工学研究部 主任研究員 西村昌晃

試験担当者: 生物工学研究部 中島隆二

同 遠田千穂

試験経過

試験品受領: 平成 21 年 2 月 2 日

インフルエンザウイルスを用いた試験

MDCK 細胞の継代培養: 平成 21 年 3 月 13 日

試験品調製: 平成 21 年 3 月 17 日

感作および接種: 平成 21 年 3 月 17 日

判定: 平成 21 年 3 月 20 日

豚伝染性胃腸炎ウイルスを用いた試験

CPK 細胞の継代培養: 平成 21 年 3 月 2 日

試験品調製: 平成 21 年 3 月 5 日

感作および接種: 平成 21 年 3 月 5 日

判定: 平成 21 年 3 月 12 日

イヌパルボウイルスを用いた試験

CRFK 細胞の継代培養: 平成 21 年 2 月 26 日

試験品調製: 平成 21 年 2 月 26 日

感作および接種: 平成 21 年 2 月 26 日

判定: 平成 21 年 3 月 6 日

報告書案提示: 平成 21 年 3 月 25 日

報告書提出: 平成 21 年 4 月 1 日

試験の目的

安定型複合塩素除菌消臭剤について、インフルエンザウイルス、パルボウイルス、コロナウイルスに対する不活化効果を調べた。

試験材料

1. 試験品

名 称：安定型複合塩素除菌消臭剤
性 状：有効塩素濃度 1,250mg/L
入手年月日：2009年2月2日
入 手 量：褐色プラスチックボトル1容器
供給担当者：

2. 供試ウイルス

試験施設で継代培養した以下のウイルスを用いた。

1) 犬パルボウイルス(CPV) Cp49 株

分 類：パルボウイルス科 (DNA ウィルス)
由 来：東京大学大学院生命科学研究科・農学部 獣医微生物学教室から分
与を受けたものを、試験実施施設にて CRFK 細胞で 2 代継代した
もの。
ウイルス含有量： $10^{7.75}$ TCID₅₀/mL (ストック調製時に測定した力価)
牛胎子血清 (FBS) 含有量：2%
保 存 条 件：-80°C以下
保 管 場 所：財団法人 畜産生物科学安全研究所

2) 豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) 浮羽株

分 類：コロナウイルス科 (RNA ウィルス)
由 来：社団法人 日本動物用医薬品協会が配布する家畜衛生菌株で、試験
実施施設にて CPK 細胞で 4 代継代したもの。
ウイルス含有量： $10^{6.75}$ TCID₅₀/mL (ストック調製時に測定した力価)
FBS 含有量：2%
保 存 条 件：-80°C以下
保 管 場 所：財団法人 畜産生物科学安全研究所

3) インフルエンザウイルス (IFV) A/Aichi/2/68 株 (亜型：H3N2)

分 類：オルソミクソウイルス科 (RNA ウィルス)
由 来：北海道大学 大学院獣医学研究科・獣医学部 微生物学教室より分
与を受けたウイルス株で、当研究所にて SPF 発育鶏卵を用いて 1
代継代・増殖させたものを、さらに MDCK 細胞で 1 代継代培養し
たもの。

ウイルス含有量： 5.0×10^8 PFU/mL (ストック調製時に測定した力価)
FBS 濃度：ストックウイルス液は FBS を含まない。ただし、牛血清アルブミンを 0.4w/v% 含有する。
保存条件：-80°C以下
保管場所：財団法人 畜産生物科学安全研究所

3. 供試細胞

供試ウイルスの定量に、以下の細胞を用いた。

1) 猫腎継代細胞 (CRFK 細胞) (Y 系)

対象：CPV の定量に用いる。

由来：農林水産省 動物医薬品検査所より分与を受け、試験実施施設において維持しているもの。

2) 豚腎継代細胞 (CPK 細胞)

対象：TGEV の定量に用いる。

由来：農林水産省 動物医薬品検査所より分与を受け、試験実施施設において維持しているもの。

3) 犬腎継代細胞 (MDCK 細胞)

対象：IFV の定量に用いる。

由来：農林水産省 動物医薬品検査所より分与を受け、試験実施施設において維持しているもの。

試験方法

1. 試験液の調製

試験品を、滅菌 MilliQ 水を用いて 10 倍および 15 倍希釈した。(それぞれ、「10 倍希釈試験液」、「15 倍希釈試験液」とした。)

2. 供試ウイルス液の調製

CPV および TGEV について、ストックウイルス液に FBS を添加し、ウイルス液中の FBS 含有量を 10% に調製した。IFV については、ストックウイルス液をウイルス増殖用培養液 [付記 2] で 10 倍希釈したもの用いた。

3. 感作

供試ウイルス液と各試験液を 1:99 の割合に混合 (以下「試験サンプル液」とした。) した後(これを 0 分とした)、室温で 1 および 3 分間静置して感作した。対照として、供試ウイルス液と滅菌精製水とを 1:99 の割合に混合したもの同様に処理した(以下「対照サンプル液」とした。)。

4. ウイルス含有量の測定

感作終了後の試験サンプル液および対照サンプル液について、[別紙] の記載に従って、ウイルス含有量を測定した。

5. 評価

以下の方法で Log Reduction Value(LRV)を算出した。

$$LRV = \log_{10}A - \log_{10}B$$

A : 対照サンプル液のウイルス含有量 (TCID₅₀/mL または PFU/mL)

B : 試験サンプル液のウイルス含有量 (TCID₅₀/mL または PFU/mL)

LRV が 2 以上のとき有効と判定した。また、LRV が 1 以下の場合、試験品はウイルス不活化効果がないものと判断した。

6. 試験の繰り返し

試験回数は 3 回 (n=3) とした。

試験成績および考察

1. CPV を用いた試験

試験成績を表 1 に示す。

混合直後（感作時間 0 分）における、試験サンプル液のウイルス含有量の平均値は、10 倍希釈試験液では 10^{3.1}TCID₅₀/mL、15 倍希釈試験液では 10^{3.4}TCID₅₀/mL であった。このときの LRV は、10 倍希釈試験液では 2.6、15 倍希釈試験液では 2.3 であった。感作時間を 1 分とした場合、10 倍希釈試験液では、繰り返し 3 回中 2 回が、15 倍希釈試験液では繰り返し 3 回のすべてにおいて、試験サンプル液のウイルス含有量は検出限界 (10^{1.5}TCID₅₀/mL) 以下まで減少した。このときの LRV は、10 倍希釈試験液では 4.2 (以上)、15 倍希釈試験液では 4.3 (以上) であった。感作時間をさらに 3 分まで延長すると、10 倍および 15 倍希釈試験液におけるすべての繰り返しで、試験サンプル液のウイルス含有量は検出限界以下まで減少した。このときの LRV は、10 倍および 15 倍希釈試験液ともに 4.2 (以上) であった。

2. TGEV を用いた試験

試験成績を表 2 に示す。

TGEV を用いた試験では、10 倍および 15 倍希釈試験液において、混合直後から試験サンプル液のウイルス含有量は検出限界 (10^{1.5}TCID₅₀/mL) 以下まで減少した。このときの LRV は、10 倍および 15 倍希釈試験液とともに 3.9 (以上) であった。

3. IFV を用いた試験

試験成績を表 3 に示す。

IFV を用いた試験では、10 倍および 15 倍希釈試験液において、混合直後から試験試料のウイルス含有量は検出限界 ($10^{2.0}$ PFU/mL) 未満まで減少した。このときの LRV は、10 倍および 15 倍希釈試験液ともに 2.8 (より大きい) と算出された。

商品名「ハセア」

以上の成績から、今回の試験に用いた安定型複合塩素除菌消臭剤は、エンベロープをもつウイルス (インフルエンザウイルスおよび豚伝染性胃腸炎ウイルス) に対しては、混合直後から高い不活化効果を示すことが明らかとなった。また、犬パルボウイルスに対しても、混合直後から LRV で 2 以上の不活化作用を認めた。しかしながら、混合直後では CPV が残存することから、作用時間を十分に取ることが必要であると考えられた。

[別紙] ウイルス含有量の測定方法

1. 犬パルボウイルス (CPV) 含有量の測定

1)CRFK 細胞の継代培養

細胞培養フラスコに単層を形成した CRFK 細胞をトリプシン処理し、細胞増殖用培養液 [付記 1] で細胞濃度を約 2×10^5 個/mL に調製する。この細胞浮遊液を 24 ウェルマルチプレートの各ウェルに 0.5mL ずつ播きこみ、試料接種までの間、37°C, 5% 炭酸ガス孵卵器中に静置する。

2)ウイルス含有量の測定

感作終了後の試験試料および対照試料を、細胞増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、以下の方法でウイルス含有量を測定する。

24 ウェルマルチプレートに分注した CRFK 細胞に、各希釈試料液を 1 ウェル当たり 0.1mL、1 希釈当たり 4 ウェルに接種する。37°C, 5% 炭酸ガス孵卵器で 20±4 時間培養した後、培養液を吸引除去し、0.5mL のウイルス増殖用培養液 [付記 2] を加え、37°C, 5% 炭酸ガス孵卵器で 6 日間培養する。培養最終日に各ウェルから培養上清を 0.025mL 採取し、96 ウェル V 底プレートに移す。これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液 [付記 5] を加え、この混合液に、VAD6.0 液 [付記 6] で調製した 0.5vol% 豚赤血球浮遊液 [付記 7] を 0.05mL 加えて 4°C で一晩静置し、赤血球凝集(HA)の有無を観察する。HA が認められた培養液をウイルス陽性とみなし、ベーレンス・ケルバー法にてウイルス含有量を算出する。

2. 豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) 含有量の測定

1)CPK 細胞の継代培養

細胞培養フラスコに単層を形成した CPK 細胞をトリプシン処理し、細胞増殖用培養液 [付記 1] で細胞濃度を約 2×10^5 個/mL に調製する。この細胞浮遊液を 24 ウェルマルチプレートの各ウェルに 0.5mL ずつ播きこみ、37°C, 5% 炭酸ガス孵卵器で 2~3 日間培養する。

2)ウイルス含有量の測定

感作終了後の試験試料および対照試料を、ウイルス増殖用培養液 [付記 2] で 10 倍階段希釈し、以下の方法でウイルス含有量を測定する。

24 ウェルプレートに単層を形成した CPK 細胞から培養液を除き、細胞表面を PBS(-) [付記 4] で 1 回洗浄する。PBS(-)を除去し、各希釈段階の試料を 1 ウェル当たり 0.1mL、1 希釈当たり 4 ウェルに接種し、37°C, 5% 炭酸ガス孵卵器中で 1 時間吸着させる。吸着終了後、接種試料を除去してからウイルス増殖用培養液を 0.5mL ずつ注加し、37°C, 5% 炭酸ガス孵卵器で 7 日間培養する。

細胞に細胞変性効果 (CPE) が認められたウェルをウイルス陽性と見なし、ベーレンス・ケルバー法にてウイルス含有量を算出する。

3. インフルエンザウイルス (IFV) 含有量の測定

1) MDCK 細胞の継代培養

細胞培養フラスコに単層を形成した MDCK 細胞をトリプシン処理し、細胞増殖用培養液 [付記 1] に浮遊させ、これを 6 ウェルプレートの各ウェルに 2~4mL 播きこみ、36~37°C, 5% 炭酸ガス孵卵器で 2~4 日間培養する。

2) ウィルス含有量の測定

感作終了後の試験試料および対照試料を、ウィルス増殖用培養液 [付記 2] で 10 倍階段希釈し、以下の方法でウィルス含有量を測定する。

6 ウェルプレートに単層を形成した MDCK 細胞から培養液を除き、細胞表面を PBS(-) で 1 回洗浄する。PBS(-) を除去し、各希釈段階の試料を 1 ウェル当たり 0.1mL、1 希釈当たり 2 ウェルに接種し、室温で 60 分間吸着させる。吸着終了後、接種液を除去し、1 次重層寒天培地 [付記 8] を 2~3mL 注加する。寒天が固まったらプレートを裏返し、34~36°C, 5% 炭酸ガス孵卵器で 2 日間培養する。さらに、2 次重層寒天培地 [付記 9] を 1~2mL 注加し、寒天が固まったらプレートを裏返して 34~36°C, 5% 炭酸ガス孵卵器で一晩培養する。

各希釈段階のブラック数を計測し、ウィルス含有量を算出する。

[付記 1] 細胞増殖用培養液

A. 犬パルボウイルス (CPV) 含有量の測定

1,000mL 中

イーグル MEM (TPB 含有) [付記 3] 880mL

牛胎子血清 100mL

7%炭酸水素ナトリウム液 20mL

B. 豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) 含有量の測定

1,000mL 中

イーグル MEM (TPB 含有) [付記 3] 880～930mL

牛胎子血清 50～100mL

7%炭酸水素ナトリウム液 20mL

C. インフルエンザウイルス (IFV) 含有量の測定

1,000mL 中

イーグル MEM (TPB 含有) [付記 3] 880～950mL

牛胎子血清 30～100mL

7%炭酸水素ナトリウム液 20mL

[付記 2] ウイルス増殖用培養液

A. 犬パルボウイルス (CPV) 含有量の測定

1,000mL 中

イーグル MEM (TPB 含有) [付記 3] 950～960mL

牛胎子血清 20～30mL

7%炭酸水素ナトリウム液 20mL

B. 豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) 含有量の測定

1,000mL 中

イーグル MEM (TPB 含有) [付記 3] 950～960mL

牛胎子血清 20～30mL

7%炭酸水素ナトリウム液 20mL

C. インフルエンザウイルス (IFV) 含有量の測定

2×ウイルス増殖用培養液

500mL 中

×10MEM 100mL

滅菌 MilliQ 水 336.2mL

7%炭酸水素ナトリウム液 32.1mL

L-グルタミン(200mM) 15mL

30%アルブミン 6.7mL

100×PS

10mL

ウイルス増殖用培養液

2×ウイルス増殖用培養液を滅菌 MilliQ 水で 2 倍希釈して使用する。

[付記 3] イーグル MEM (TPB 含有)

イーグル MEM「ニッスイ」①(カナマイシン含有, 日水製薬株式会社 製) 9.4g 及びトリプトースホスフェイトプロス (Difco) 3.0g を 1L の MilliQ 水に溶解後、121°C, 15 分間高压蒸気滅菌し、室温まで冷ました後、L-グルタミン液 (200mM) 10mL 及びペニシリнстレプトマイシン液(ペニシリン 10,000IU/mL, ストレプトマイシン 10,000μg 力価/mL)10mL を添加したもの。

[付記 4] PBS(-)

PBS(-)粉末「ニッスイ」(日水製薬株式会社 製) 9.6g を 1L の MilliQ 水に溶解し、121°Cで 15 分間、高压蒸気滅菌したもの。9.6g(1L 分)中の成分組成は以下のとおりである。

塩化ナトリウム	8,000mg
塩化カリウム	200mg
リン酸一水素ナトリウム(無水)	1,150mg
リン酸二水素カリウム(無水)	200mg

[付記 5] 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	7.01 g
ホウ酸	3.05 g
水酸化ナトリウム	0.96 g
水	残 量

牛血清アルブミンを 0.2w/v% となるように加えた後、水酸化ナトリウムで pH を 9.0 に調整する。

[付記 6] VAD6.0 液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8.77 g
無水リン酸水素二ナトリウム	5.68 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	40.56 g
水	残 量

牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合したとき、pH9.0 にな

るよう調製する。

[付記 7] 0.5vol% 豚赤血球浮遊液

健康な豚からアルスバー液中に採血して得た血液を、VAD6.0 液[付記 6]で 3 回洗浄した後、VAD6.0 液で 0.5vol% となるように調製したもの。

[付記 8] 1 次重層寒天培地

組成

滅菌 MilliQ 水	7.8mL
2×ウイルス増殖用培養液	50mL
10% グルコース	1mL
結晶トリプシン(5mg/mL)	0.05mL
2% アガロースまたは高純度寒天	40mL

[付記 9] 2 次重層寒天培地

組成

2×ウイルス増殖用培養液	49mL
2% アガロースまたは高純度寒天	50mL
1% ニュートラルレッド	1mL

表1 安定型複合塩素除菌消臭剤の犬パルボウイルスに対する不活化効果試験

試験群	試験の 繰り返し	感作時間とウイルス含有量の推移		
		0	1	3(分)
対照群	1	5.50	6.25	5.75
	2	5.50	5.25	5.50
	3	6.00	6.00	5.75
	平均値	5.7	5.8	5.7
10倍希釀試験液	1	2.75	≤1.50	≤1.50
	2	3.50	≤1.50	≤1.50
	3	3.00	≤1.75	≤1.50
	平均値	3.1	≤1.6	≤1.5
15倍希釀試験液	1	3.00	≤1.50	≤1.50
	2	3.75	≤1.50	≤1.50
	3	3.50	≤1.50	≤1.50
	平均値	3.4	≤1.5	≤1.5
LRV	LRV	2.6	≥4.2	≥4.2
	LRV	2.3	≥4.3	≥4.2

ウイルス含有量は、試料1mLあたりの値を対数変換して記載した。

表2 安定型複合塩素除菌消臭剤の豚伝染性胃腸炎ウイルスに対する不活化効果試験

試験群	試験の繰り返し	感作時間とウイルス含有量の推移		
		0	1	3(分)
対照群	1	5.50	5.00	5.25
	2	5.50	5.50	5.50
	3	5.25	5.25	5.75
	平均値	5.4	5.3	5.5
10倍希釈試験液	1	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	2	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	3	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	平均値	≤1.5	≤1.5	≤1.5
15倍希釈試験液	LRV	≥3.9	≥3.8	≥4.0
	1	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	2	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	3	≤1.50	≤1.50	≤1.50
平均値	平均値	≤1.5	≤1.5	≤1.5
	LRV	≥3.9	≥3.8	≥4.0

ウイルス含有量は、試料1mLあたりの値を対数変換して記載した。

表3 安定型複合塩素除菌消臭剤のインフルエンザウイルスに対する不活化効果試験

試験群	試験の繰り返し	感作時間とウイルス含有量の推移		
		0	1	3(分)
対照群	1	3.5×10^4	1.4×10^5	1.0×10^5
	2	6.0×10^4	9.0×10^4	6.0×10^4
	3	8.0×10^4	8.5×10^4	1.1×10^5
	平均値	5.83×10^4	1.05×10^5	9.00×10^4
10倍希釀試験液	対数変換値	4.77	5.02	4.95
	1	<10 ²	<10 ²	<10 ²
	2	<10 ²	<10 ²	<10 ²
	3	<10 ²	<10 ²	<10 ²
15倍希釀試験液	平均値	<10 ²	<10 ²	<10 ²
	対数変換値	<2.00	<2.00	<2.00
	LRV	>2.8	>3.0	>3.0
	1	<10 ²	<10 ²	<10 ²
	2	<10 ²	<10 ²	<10 ²
	3	<10 ²	<10 ²	<10 ²
	平均値	<10 ²	<10 ²	<10 ²
	対数変換値	<2.00	<2.00	<2.00
	LRV	>2.8	>3.0	>3.0

ウイルス含有量は、試料1mLあたりの値を記載した。