

試 験 報 告 書

Kitasato Research Center for Environmental Science

一般財団法人 北里環境科学センター

〒252-0329 神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号

TEL : 042(778)9208 FAX : 042(778)4551

* * * 試験内容を公表する場合は、事前の承諾が必要です。 * * *

株式会社エコ・コンパス 殿

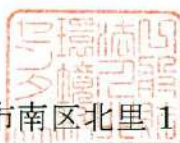
試験報告書

ウイルス不活化試験

北環発 2020_0310 号

2020年9月7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 山田 陽城



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. 表題

ウイルス不活化試験

2. 試験番号

依頼書番号：20207068 号

報告書番号：北環発 2020_0310 号

3. 目的

貴社ご提供試験品「エコ・ウォッシュ 掃除王」のウイルスに対する不活化効果を調べた。なお本試験は、試験品の基本的なウイルス不活化効果を調べる試験系として、試験品に直接ウイルス液を接種する方法を用いた。

4. 依頼者

名 称：株式会社エコ・コンパス

所在地：〒243-0125 神奈川県厚木市小野 603-1

5. 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

6. 試験実施期間

2020年7月27日～2020年7月31日

7. 試験品

エコ・ウォッシュ 掃除王

8. 試験条件

作用時間：対照；0（初期）、1 分間、5 分間

試験品；1 分間、5 分間

9. 供試ウイルスおよび感染価測定用細胞

1) 供試ウイルス

A 型インフルエンザウイルス (Influenza A virus, H1N1, A/PR/8/34, ATCC VR-1469)

B 型インフルエンザウイルス (Influenza B virus, B/Lee/40, ATCC VR-101)

2) 感染価測定用細胞

イヌ腎臓由来細胞株 (MDCK : Madin-Darby Canine Kidney) を感染価測定用細胞として用いた。細胞は、ウシ胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium で継代した。

10. 主な試薬、培地および機材

1) 培地

- ・ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、SIGMA)
- ・ イーグル MEM 培地「ニッスイ」① (MEM、日水製薬)

2) 試薬

- ・ ウシ胎児血清 (FBS : Fetal Bovine Serum、SIGMA)
- ・ ウシ血清アルブミン (BSA : Bovine Serum Albumin、SIGMA)
- ・ Dulbecco's PBS (-) "Nissui" (PBS : Phosphate buffered saline、日水製薬)
- ・ トリプシン (SIGMA)
- ・ HEPES (ナカライテスク)

3) 機材

- ・ マイクロピペット 200 μ L、1000 μ L (ギルソン)
- ・ 電動 8 連マルチチャンネルピペット (10 ~ 300 μ L、ザルトリウス)
- ・ 電動 8 連マルチチャンネルピペット (50 ~ 1200 μ L、ザルトリウス)
- ・ 安全キャビネット (BHC-1902 IIB、エアーテック)
- ・ CO₂ インキュベータ (MCO-20AIC、三洋)

11. 試験方法

1) ウイルス液の調製方法

①A 型インフルエンザウイルス

ウイルスは、発育鶏卵の漿尿膜腔に接種し、ふ卵器で培養後、漿尿液を採取し限外濾過膜で濃縮した後、ショ糖密度勾配遠心法 (遠心条件 : 108,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 3 時間) により精製したウイルス液を保存ウイルス液とした。試験には、PBS で 20 倍に希釈したウイルス液を供試ウイルス液として用いた。

②B 型インフルエンザウイルス

ウイルスを MDCK 細胞に感染させ、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 $^{\circ}$ C の冷凍庫に凍結保存した。その後、凍結融解操作を行い、2,380 \times g 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液を保存ウイルス液とした。試験には、保存ウイルス液の原液を用

いた。

2) ウイルス不活化試験

試験管内に試験品 1 mL と供試ウイルス液 0.1 mL を加え、試験管ミキサーで混合して、室温で作用させた。所定の時間作用させた後、試験液 0.1 mL を採取し、0.1 M HEPES (pH 7.0) で 20 倍に希釈し^{*}、ウイルス感染価測定用試料の原液とした。なお、作用時間 0 (初期) および「対照」は試験品の代わりに PBS を用いた。

※試験品の作用停止液としての有効性を確認済み。また、作用停止後の液が感染価測定に対し阻害的に作用しないことを確認済み。

3) 感染価測定法

ウイルス感染価は、TCID₅₀ 法により測定した。ウイルス感染価測定用試料の原液を PBS で 10 倍段階希釈した後、あらかじめ 96 ウェルプレートで培養した MDCK 細胞に 1 ウェルあたり 25 μL を接種し 37°C の CO₂ インキュベータで 1 時間静置した後、接種ウイルス液を除去し、0.1 mL の PBS で各ウェルを洗浄した後、0.42% ウシ血清アルブミンおよび 2.5 μg/mL トリプシン加^{*} MEM を 1 ウェルあたり 0.1 mL 加え、37°C の CO₂ インキュベータで 4 日間培養した。培養後、倒立顕微鏡下で細胞変性効果 (CPE : Cytopathic effect) を確認し、Reed-Muench 法を用いて感染価を算出した。感染価は、作用停止後の液 1 mL の感染価として記載した。

※A 型インフルエンザウイルス : 2.5 μg/mL

B 型インフルエンザウイルス : 5 μg/mL

4) 感染価対数減少値の算出

対照の初期感染価と試験品作用後の感染価から、下記式を用いてウイルス感染価対数減少値 (=LRV ; log reduction value) を算出した。なお、LRV は小数点以下 1 桁 (小数点以下 2 桁目を切り捨て) で表記した。

$$\text{LRV (ウイルス感染価対数減少値)} = \log_{10} (\text{初期感染価} \div \text{試験品作用後の感染価})$$

12. 試験結果

試験品作用後のウイルス感染価を表 1、2 に示し、感染価から算出した LRV を表 3、4 に示した。

1) A 型インフルエンザウイルス

初期ウイルス感染価は、 1.8×10^7 TCID₅₀/mL であった。「対照 (PBS)」に 5 分間作用させた感染価は 1.5×10^7 TCID₅₀/mL となり感染価に大きな変動は認められなかった。

一方、試験品にウイルスを 1 分間および 5 分間作用させたところ、1 分間の作用で検出限界値 (1.3×10^1 TCID₅₀/mL) 未満となった。初期値からの LRV を算出すると、1 分間で > 6.1 となった。

2) B 型インフルエンザウイルス

初期ウイルス感染価は、 2.1×10^5 TCID₅₀/mL であった。「対照 (PBS)」に 5 分間作用させた感染価は 5.9×10^5 TCID₅₀/mL となり感染価に大きな変動は認められなかった。

一方、試験品にウイルスを 1 分間および 5 分間作用させたところ、1 分間の作用で検出限界値 (1.3×10^1 TCID₅₀/mL) 未満となった。初期値からの LRV を算出すると、1 分間で > 4.2 となった。

13. コメント

本試験は、貴社提供「エコ・ウォッシュ 掃除王」の A 型インフルエンザウイルス及び B 型インフルエンザウイルスに対するウイルス不活化効果を懸濁試験法により評価した。消毒薬などの欧州標準試験法である EN 14476:2013+A1:2015 (Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area. Test method and requirements (Phase 2/Step 1)) による消毒効果の判定基準は、初期感染価から 4.0 以上の LRV をもって不活化効果ありと判定している。本試験において、「エコ・ウォッシュ 掃除王」は A 型インフルエンザウイルス及び B 型インフルエンザウイルスに 1 分間作用させると LRV が 4.0 より大きくなり、上記の判定基準を適用するとウイルス不活化効果ありと判定された。

以上

表 1 試験品作用後の A 型インフルエンザウイルス感染価の減少

試験品	作用時間		
	0 (初期)	1 分間	5 分間
対照 (PBS)	1.8×10^7	—	1.5×10^7
エコ・ウォッシュ 掃除王	—	$< 1.3 \times 10^1$	$< 1.3 \times 10^1$

感染価単位：TCID₅₀/mL

試験ウイルス：Influenza A virus, H1N1, A/PR/8/34, ATCC VR-1469

ウイルス感染価測定用試料 1mL 当たりの検出限界値： 1.3×10^1 TCID₅₀/mL

表 2 試験品作用後の B 型インフルエンザウイルス感染価の減少

試験品	作用時間		
	0 (初期)	1 分間	5 分間
対照 (PBS)	2.1×10^5	—	5.9×10^5
エコ・ウォッシュ 掃除王	—	$< 1.3 \times 10^1$	$< 1.3 \times 10^1$

感染価単位：TCID₅₀/mL

試験ウイルス：Influenza B virus, B/Lec/40, ATCC VR-101

ウイルス感染価測定用試料 1mL 当たりの検出限界値： 1.3×10^1 TCID₅₀/mL

表 3 試験品作用後の感染価対数減少値 (A 型インフルエンザウイルス)

試験品	LRV ^{a)}	
	1 分後	5 分後
対照 (PBS)	—	0.0
エコ・ウォッシュ 掃除王	> 6.1	> 6.1

a) \log_{10} (初期感染価/作用後の感染価)

感染価対数減少値 (LRV) は、小数点以下 2 桁目を切り捨てて表記した。

表 4 試験品作用後の感染価対数減少値 (B 型インフルエンザウイルス)

試験品	LRV ^{a)}	
	1 分後	5 分後
対照 (PBS)	—	-0.4
エコ・ウォッシュ 掃除王	> 4.2	> 4.2

a) \log_{10} (初期感染価/作用後の感染価)

感染価対数減少値 (LRV) は、小数点以下 2 桁目を切り捨てて表記した。