

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：207282N

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.207282N

3. 目的

資材とインフルエンザウイルス及び豚コロナウイルス（PEDV）を反応させた時のウイルス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 サンクスアイ株式会社

所在地 〒861-8035 熊本県熊本市東区御領 6-1-6

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7月20日

試験開始日 2020年10月28日

試験終了日 2020年12月14日

6. 試験資材

パーフェクトミネラルアイ

※試験資材は原液（試験資材①）及び精製水10倍希釈液（試験資材②）で使用した。また、対照資材として滅菌リン酸緩衝液を使用した。

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）

PED ウイルス：Porcine epidemic diarrhea virus P-5V 株

※豚感染性のコロナウイルス

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
対照区	リン酸緩衝液 1mL にウイルス液 0.1mL 添加	試験開始後 0 分、1 分、6 時間
試験区 1	試験資材①1mL にウイルス液 0.1mL 添加	試験開始後 1 分、6 時間
試験区 2	試験資材②1mL にウイルス液 0.1mL 添加	試験開始後 1 分、6 時間

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、試験資材原液の場合において細胞の発育不良が確認された。このため、試験に際しては、試験資材とウイルス液の混合液を 10 倍以上希釈した後細胞に接種する必要があると判明した。この為、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、試験資材及びリン酸緩衝液の各 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、インフルエンザウイルスの場合は、各ウェル内の培養上清を回収し、赤血球凝集反応によりウイルスの増殖の有無を確認し、その濃度を算出した。また、PEDウイルスの場合は、培養細胞を顕微鏡観察し、培養細胞に現れるCPE（細胞変性）をもってウイルス増殖の有無を確認し、その濃度を算出した。

11. 結果

①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。

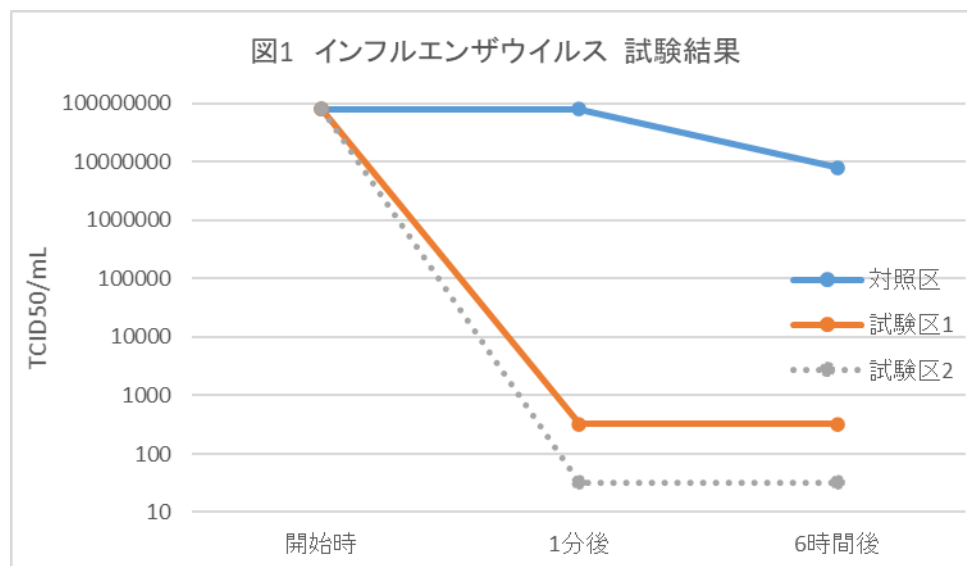
対照区では試験開始後から、試験開始後6時間分までの間にウイルス量の自然減衰と思われる現象が見られた($10^{7.9} \rightarrow 6.9$ TCID₅₀/mL)。

試験区1(原液)では開始後1分で $<10^{2.5}$ TCID₅₀/mL、(検出限界未満:99.999%以上減少)となった。

試験区2(10倍希釈液)では開始後1分で $<10^{1.5}$ TCID₅₀/mL、(検出限界未満:99.9999%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/mL)

区	試験開始時	開始後1分	開始後6時間
対照区		$10^{7.9}$ (80000000)	$10^{6.9}$ (8000000)
試験区1	$10^{7.9}$	$<10^{2.5}$ (<320)	$<10^{2.5}$ (<320)
試験区2		$<10^{1.5}$ (<32)	$<10^{1.5}$ (<32)



②PED 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。

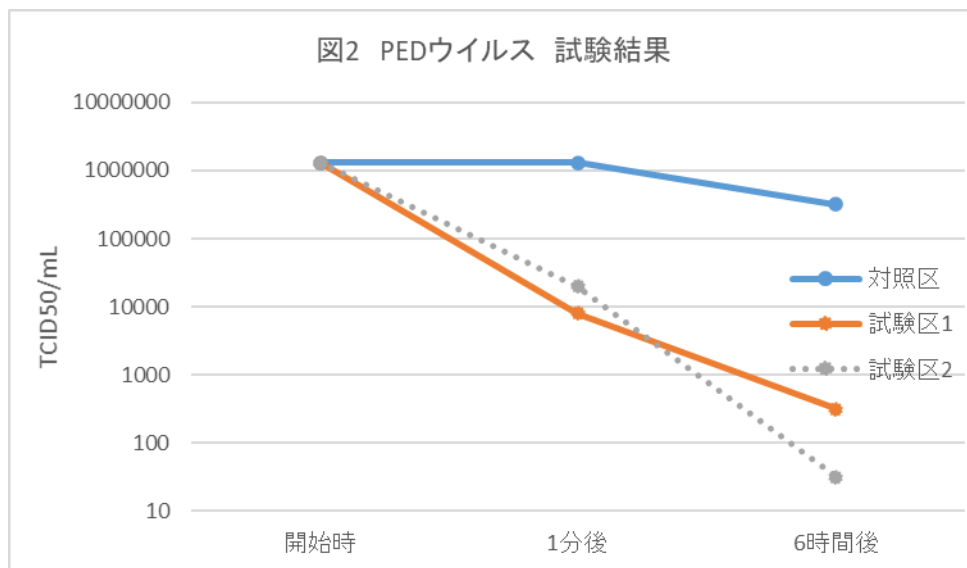
対照区では試験開始後から、試験開始後 6 時間分までの間にウイルス量の自然減衰と思われる現象が見られた($10^{6.1} \rightarrow 5.5$ TCID₅₀/mL)。

試験区 1 (原液) では開始後 1 分で $10^{3.9}$ TCID₅₀/mL (99.38%減少)、開始後 6 時間で $<10^{2.5}$ TCID₅₀/mL、(検出限界未満 : 99.90%以上減少) となった。

試験区 2 (10 倍希釈液) では開始後 1 分で $10^{4.3}$ TCID₅₀/mL (98.46%減少)、開始後 6 時間で $<10^{1.5}$ TCID₅₀/mL、(検出限界未満 : 99.99%以上減少) となった。

表 2 PED ウイルス試験結果(TCID₅₀/mL)

区	試験開始時	開始後 1 分	開始後 6 時間
対照区		$10^{6.1}$ (1300000)	$10^{5.5}$ (320000)
試験区 1	$10^{6.1}$	$10^{3.9}$ (8000)	$<10^{2.5}$ (<320)
試験区 2		$10^{4.3}$ (20000)	$<10^{1.5}$ (<32)



12. 考察

今回、試験資材のインフルエンザウイルス及び PED ウイルス（豚感染コロナウイルス）に対する不活化効果試験を実施した。

その結果、試験資材原液及び 10 倍希釈液は、インフルエンザウイルスに対しては 1 分で 99.999%以上及び 99.9999%以上の不活化効果があることが判明した。また、PED ウイルスに対しては 1 分で 99.38%及び 98.46%、6 時間で 99.90%以上及び 99.99%以上の不活化効果があることが判明した。