

株式会社 RO プラス 様

## 試験報告書

二酸化塩素ガス発生ゲル「クローツジェル」

によるウイルス不活化試験

北環発 25\_0049 号

平成 26 年 2 月 3 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](http://www.kitasato-e.or.jp/?page_id=87))

## 1. 試験目的

25 m<sup>3</sup>の試験空間に二酸化塩素発生剤「クローツジェル」を設置し、同じ試験空間に設置した A 型インフルエンザウイルスおよびネコカリシウイルスの不活化効果を評価した。

## 2. 依頼者

名称：株式会社 RO プラス

所在地：〒101-0052 東京都千代田区神田小川町 2-2

## 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 1 月 10 日～平成 26 年 1 月 15 日

## 5. 試験品

二酸化塩素ガス発生剤「クローツジェル」

## 6. 試験条件

作用時間：0（初期）、6 時間

作用温度：25 °C

## 7. 供試ウイルスとウイルス液の調製方法

- 1) A 型インフルエンザウイルス (*Influenza A virus*, H1N1, A/PR/8/34, ATCC<sup>®</sup> VR-95<sup>™</sup>)

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、漿尿液を採取し密度勾配遠心法により精製したウイルス液を供試ウイルス液とした。

- 2) ネコカリシウイルス (*Feline calicivirus* F-9, ATCC<sup>®</sup> VR-782<sup>™</sup>)

ウイルスをネコ腎臓由来細胞 (CRFK : Crandell-Reese 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 -80 °C の冷凍庫に凍結保存した。その後、凍結融解操作を 2 回繰り返し、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液を供試ウイルスとした。

## 8. 試験方法

### 1) ウイルス不活化試験

ウイルスの不活化試験は以下の手順により行った。

25 m<sup>3</sup> 試験チャンバー内中央に試験品を設置し、試験品から約 125 cm の距離に試験ウイルス液 2 mL を入れた φ60 mm シャーレを蓋を開けた状態で配置した(写真-1)。チャンバーを密閉し、室温(約 25℃)で 6 時間保存後、シャーレからウイルス液を採取し、感染価測定用試料原液とした。なお試験対照として、試験品を設置しない空間で同様に操作した。

### 2) 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(希釈ウイルス液と記す)、感染価測定用試料原液または希釈ウイルス液 50 μL と 5 % ウシ胎児血清(FBS: fetal bovine serum)添加 Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) に懸濁した感染価測定用の細胞\* 50 μL 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 4 日間培養を行った。培養後、ウイルスの増殖による CPE を倒立顕微鏡で観察して Reed-Muench 法を用いてウイルス感染価(TCID<sub>50</sub>/mL)を求めた。

※ 感染価測定用の細胞は以下の通り。

#### A 型インフルエンザウイルス

イヌ腎臓由来細胞株 (MDCK : Madin-Darby canine kidney)

#### ネコカリシウイルス

CRFK 細胞

### 3) 二酸化塩素濃度の測定

所定時間作用後に二酸化塩素検知管で試験チャンバー内の空気を吸引し、チャンバー内の二酸化塩素濃度を測定した。

## 9. 試験結果

A 型インフルエンザウイルスに対する試験結果を表-1、ネコカリシウイルスに対する試験結果を表-2 に示した。また、参考データとして、試験中におけるチャンバー内の二酸化塩素濃度を表-1、温湿度を図-1 に示した。また、A 型インフルエンザウイルス感染による MDCK 細胞の細胞変性効果を写真-2、ネコカリシウイルス感染による CRFK 細胞の細胞変性効果を写真-3 に示した。

## 1) A 型インフルエンザウイルスに対する不活化効果

初期ウイルス感染価は、 $2.0 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL であった。「試験品なし（対照）」の 6 時間静置後の感染価は  $8.9 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL となり、感染価に大きな減少は認められなかった。一方、「クローツジェル」の 6 時間静置後の感染価は  $1.4 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL となった。6 時間作用後の感染価対数減少値（LRV: log reduction value）は  $3.8 \log_{10}$  であった。LRV より算出した減少率は 99.9% 以上であった。

## 2) ネコカリシウイルスに対する不活化効果

初期ウイルス感染価は、 $6.3 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL であった。「試験品なし（対照）」の 6 時間静置後の感染価は  $2.5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL となり、感染価に大きな減少は認められなかった。一方、「クローツジェル」を設置し 6 時間静置した場合の感染価は  $3.5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL となった。6 時間作用後の感染価対数減少値（LRV: log reduction value）は  $0.9 \log_{10}$  であった。LRV より算出した減少率は 87.4% であった。

## 10. コメント

本試験では、貴社ご提供の「クローツジェル」を 25 m<sup>3</sup> の試験空間に設置し、同じ試験空間に設置した A 型インフルエンザウイルスおよびネコカリシウイルスの不活化効果を評価した。

本試験の結果、A 型インフルエンザウイルスに対して  $3.8 \log_{10}$ （減少率 99.9% 以上）の減少がみとめられた。一方、ネコカリシウイルスの減少値は  $0.9 \log_{10}$ （減少率 87.4%）であった。日本電機工業会規格 JEM 1467：家庭用空気清浄機「室内付着ウイルスに対する抑制性能評価試験」においては、「対数減少値が 2.0 以上のとき抑制効果あるものと判断する。」と規定されている。本試験品は、空気清浄機に類するものではないが、判定基準を適用した場合、A 型インフルエンザウイルスの抑制効果は認められるが、ネコカリシウイルスに対する抑制効果はなしと判定された。

二酸化塩素ガスによるウイルスの不活化効果は、湿度（水分）や有機物の存在により影響を受ける事が報告されている<sup>1)</sup>。実使用に当たっては、湿度や有機物によって影響をうける可能性を考慮して適切な使用方法が必要である。

## 参考文献

- 1) Morino H *et al.*, Inactivation of feline calicivirus by chlorine dioxide gas-generating gel. *Yakugaku Zasshi*. 133(9):1017-22, 2013.

表-1 「クローツジェル」による A 型インフルエンザウイルスの不活化効果

試験品	作用時間		減少値 (対照との差)	
	0 (初期)	6 時間	対数減少値 <sup>a)</sup>	減少率 % <sup>b)</sup>
「クローツジェル」		$1.4 \times 10^4$	3.8	> 99.9
試験品なし (対照)	$2.0 \times 10^8$	$8.9 \times 10^7$		

使用ウイルス : *Influenza A virus* (H1N1, A/PR/8/34, ATCC<sup>®</sup> VR-95<sup>TM</sup>)

供試ウイルス原液の感染価 :  $6.3 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL

感染価単位 : TCID<sub>50</sub>/mL

検出限界値 : 6.3 TCID<sub>50</sub>/mL

a) 6 時間作用後の対照との差 :  $\log_{10}$  (対照の感染価 / 「クローツジェル」の感染価)

b) 対数減少値を減少率に換算した数値 :  $(1 - 1/10^{\text{対数減少値}}) \times 100$  (%)

表-2 「クローツジェル」による ネコカリシウイルスの不活化効果

試験品	作用時間		減少値 (対照との差)	
	0 (初期)	6 時間	対数減少値 a)	減少率 % <sup>b)</sup>
「クローツジェル」		$3.5 \times 10^6$	0.9	87.4
試験品なし (対照)	$6.3 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$		

使用ウイルス： *Feline calicivirus* (F-9, ATCC® VR-782™)

供試ウイルス原液の感染価：  $1.0 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL

感染価単位：TCID<sub>50</sub>/mL

検出限界値：6.3 TCID<sub>50</sub>/mL

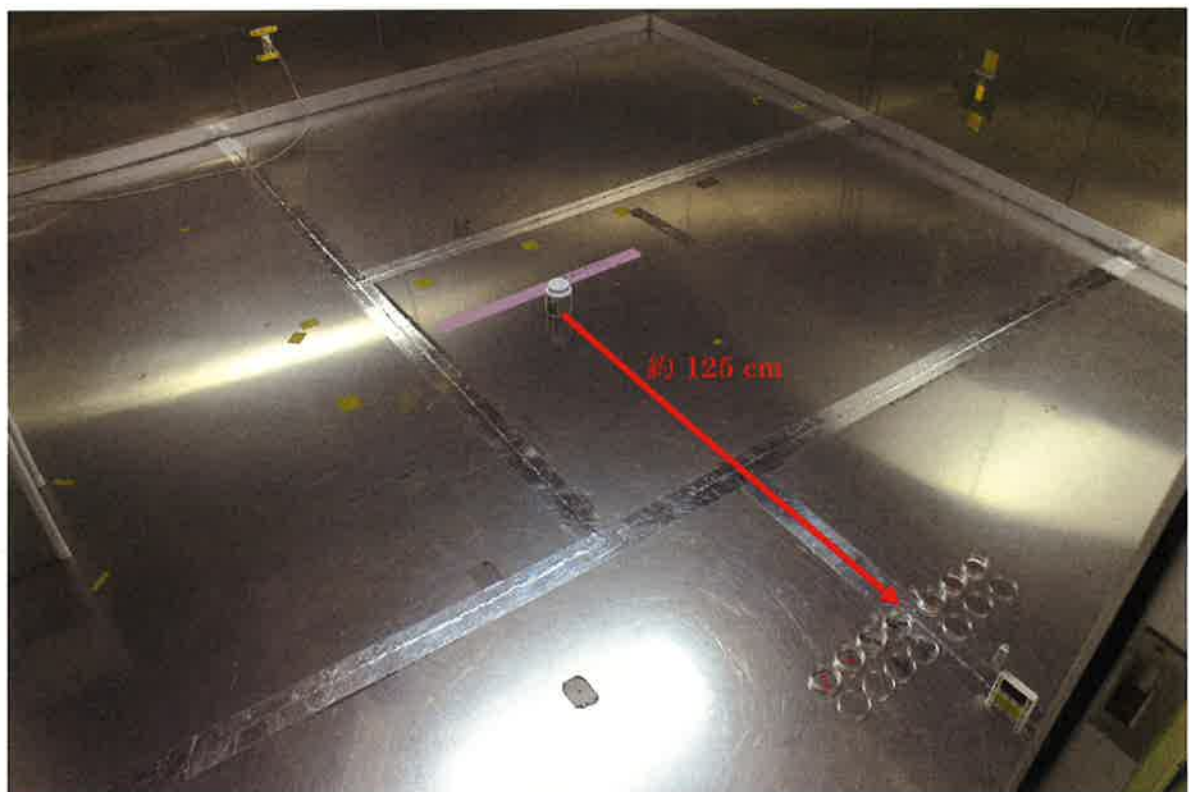
a) 6 時間作用後の対照との差：  $\log_{10}$  (対照の感染価 / 「クローツジェル」の感染価)

b) 対数減少値を減少率に換算した数値：  $(1 - 1/10^{\text{対数減少値}}) \times 100$  (%)

表-3 試験中の試験チャンバー内の二酸化塩素濃度

二酸化塩素濃度 (ppm)	作用時間 (時間)						
	0	1	2	3	4	5	6
	0	0.020	0.025	0.030	0.040	0.045	0.050

測定器：二酸化塩素検知管 (No.23L、ガステック)

写真-1 25 m<sup>3</sup>チャンバー内の試験状況

## 参考データ

1. 試験中のチャンバー内の温湿度を図-1 に示した。

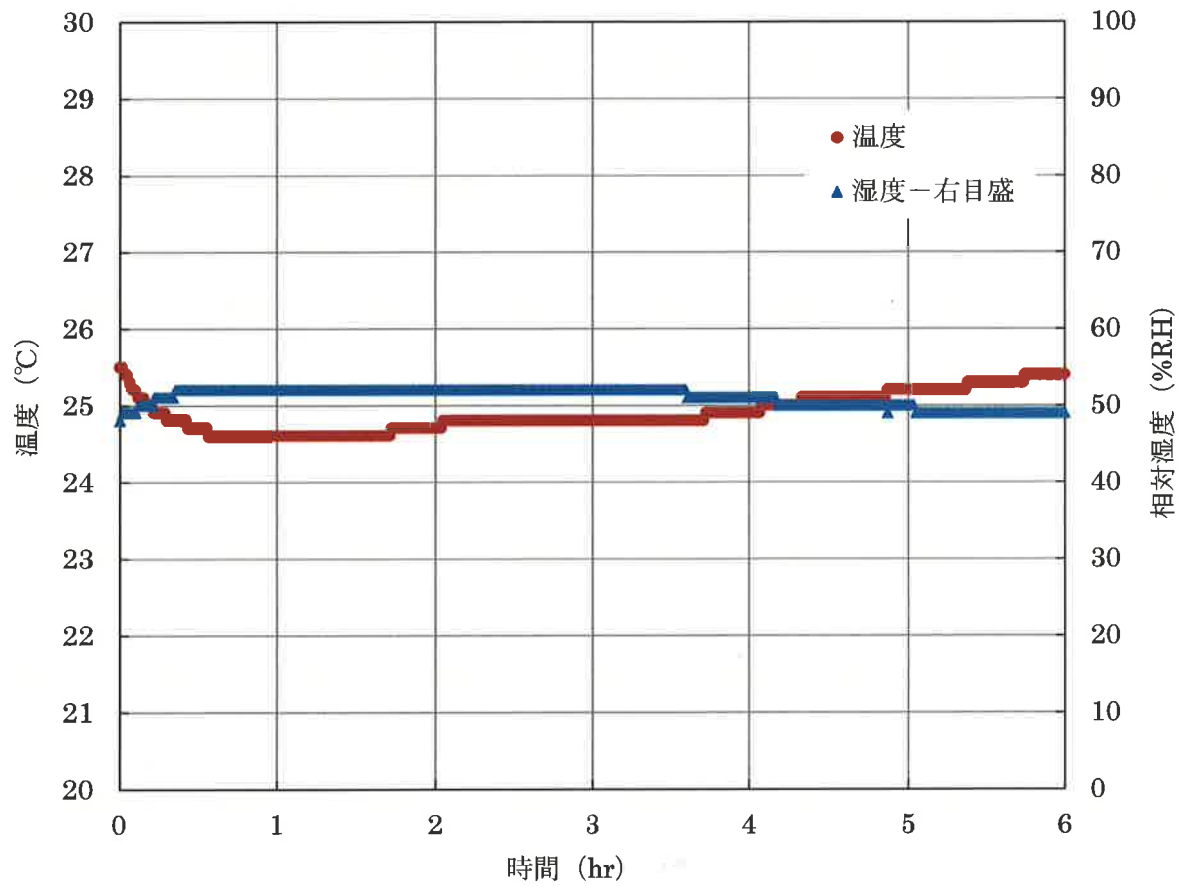
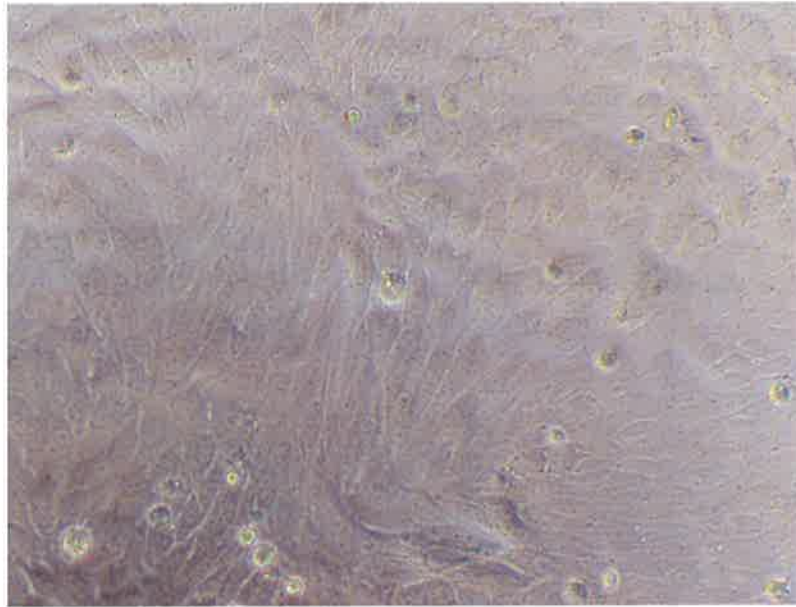


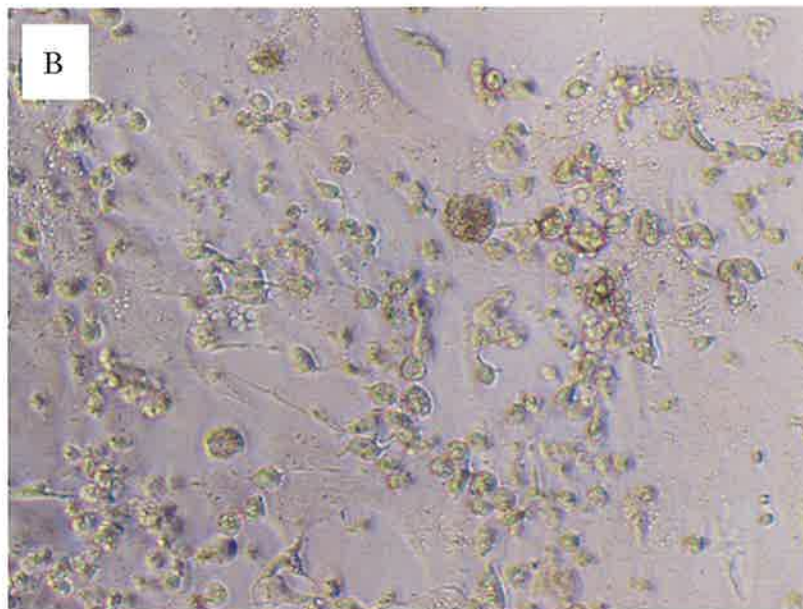
図-1 試験チャンバー内の温湿度の変動



2. ウイルス感染による細胞変性効果を示した。



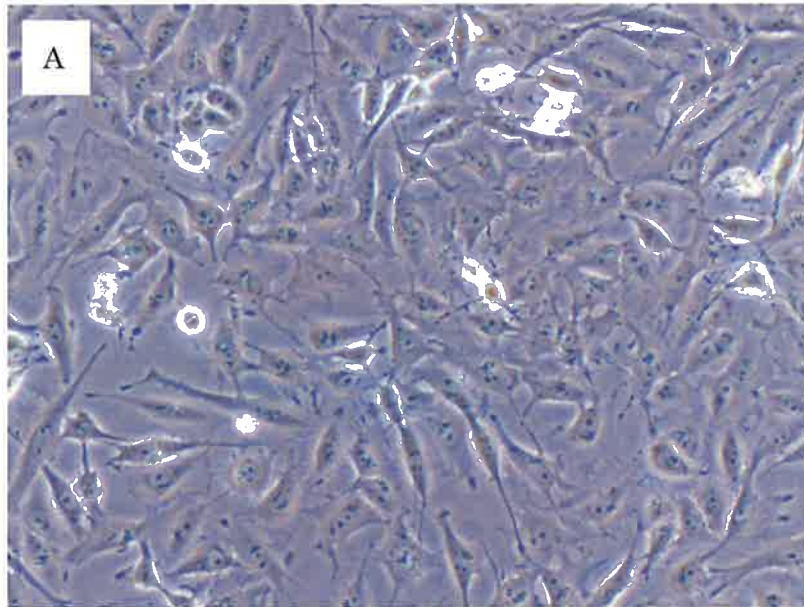
ウイルス非感染 MDCK 細胞



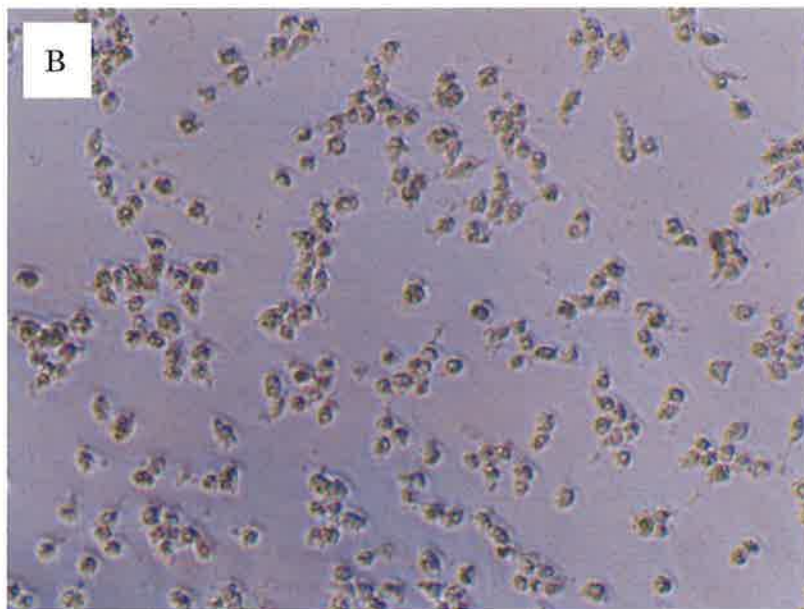
ウイルス感染細胞（培養 4 日目）

写真-2 A 型インフルエンザウイルス感染による細胞変性効果

ウイルス非感染細胞はタイル状に生育するが（写真 A）、ウイルスに感染した細胞は、ウイルスの増殖により細胞の形態変化が認められる（写真 B）。



ウイルス非感染 CRFK 細胞



ウイルス感染細胞（培養 4 日目）

写真-3 ネコカリシウイルス感染による細胞変性効果

ウイルス非感染細胞はタイル状に生育するが（写真 A）、ウイルスに感染した細胞は、ウイルスの増殖により細胞の形態変化が認められる（写真 B）。