

株式会社 RO プラス 様

## 試験報告書

「クローツ（液）」によるウイルス不活性化試験

北環発 25\_0044 号

平成 25 年 12 月 12 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

貴社提供、「クローツ（液）」による 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（ノロウイルス代替）に対する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 25 年 11 月 25 日～平成 25 年 11 月 29 日

## 5. 試験液

「クローツ（液）」

1) 200 ppm

2) 100 ppm

3) 50 ppm

## 6. 試験条件

作用時間：0（初期）、5 分間

作用温度：25±2 °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® VR-95™)

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® VR-782™)

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

ウイルスの不活化効果試験は以下の手順により行った。

試験管内に試験液 0.9 mL を入れ、供試ウイルス液 0.1 mL を加え、試験管ミキサーでゆるやかに混合して、室温で所定の時間作用させた。所定時間作用後、0.1 mL を採取し、あらかじめ有効性を確認した作用停止液<sup>\*</sup>で 10 倍に希釈してウイルスに対する作用を停止させたのち、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS: phosphate buffered saline) で 10 倍に希釈して感染価測定用試料原液としてウイルス感染価を測定した。なお、作用時間 0 (初期) および「対照」は試験液の代わりに滅菌蒸留水を用いた。

※作用停止液には、0.5% チオ硫酸ナトリウムを添加した PBS を用いた。作用停止の確認試験手順と結果を 11 項に示した。

### 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 PBS で 10 倍段階希釈した後 (希釈ウイルス液)、感染価測定用試料原液または希釈ウイルス液 50  $\mu$ L と 5 % FBS 添加 DMEM に懸濁した感染価測定用の細胞<sup>\*</sup> 50  $\mu$ L を、96 ウエルマイクロプレートに植え込んだ。その後、37  $^{\circ}$ 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。なお、試験液の作用停止後の溶液が感染価測定用の細胞 (MDCK 細胞および CRFK 細胞) に対し毒性を示す場合、感染価の測定が困難になるため、毒性確認を行った。各試験液の作用停止後の細胞毒性確認試験手順と結果を 12 項に示した。

※ 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

## 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（ノロウイルス代替）に対する試験結果を表-2 に示した。結果には、対照の感染価と試験液作用後の感染価の差から求めたウイルス感染価対数減少値（LRV: log reduction value）と、試験時における各試験液の pH を表内に示した。

### 1) A 型インフルエンザに対する不活化効果

初期ウイルス感染価は、 $2.9 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL であった。「対照（滅菌蒸留水）」に 5 分間作用させたウイルス感染価は  $1.6 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL であり、初期値からほとんど変動しなかった。

一方、最も濃度の低い「クローツ（液）」50 ppm にウイルスを 5 分間作用させたところ、検出限界値（6.3 TCID<sub>50</sub>/mL）以下となり、LRV は  $5.4 \log_{10}$  以上を示した。

### 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、 $8.4 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL であった。「対照（滅菌蒸留水）」に 5 分間作用させたウイルス感染価は  $9.7 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL であり、初期値からほとんど変動しなかった。

一方、最も濃度の低い「クローツ（液）」50 ppm にウイルスを 5 分間作用させたところ、検出限界値（6.3 TCID<sub>50</sub>/mL）以下となり、LRV は  $4.1 \log_{10}$  以上を示した。

## 10. コメント

本試験では、貴社ご提供の「クローツ（液）」による 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（ノロウイルス代替）に対する不活化効果を検討した。

消毒薬などの欧州標準試験法である EN14476:2005（Chemical disinfectants and antiseptics. Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine.）による消毒効果は陰性対照と比較して  $4.0 \log_{10}$  以上の LRV をもって不活化効果ありと判定している。本試験においては、「クローツ（液）」は 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に対して LRV が  $4.0 \log_{10}$  以上を示したことから“ウイルス不活化効果あり”と判定された。

塩素系の消毒剤は、有機物含むウイルス液を用いた不活化試験において、有機物の濃度によりウイルス不活化効果が影響を受けることが報告されている。実使用に当たっては、有機物質によって影響を受ける可能性があることを考慮して、適切な使い方が必要である。

参考文献

- 1) E.Duizer *et al.*, Inactivation of caliciviruses. Appl. Environ. Microbiol., 4538-4543: 2004.

以上

表-1 試験液による A 型インフルエンザウイルスの不活化効果

試験液	pH <sup>*1</sup>	作用時間		LRV <sup>*2</sup> 5 分後
		0 (初期)	5 分	
クローツ (液)	200ppm 10.6 (24.4°C)	/	< 6.3	> 5.4
	100ppm 10.4 (24.9°C)	/	< 6.3	> 5.4
	50ppm 10.3 (24.5°C)	/	< 6.3	> 5.4
対照 (滅菌蒸留水)		$2.9 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$	/

※1 ; HORIBA pH meter D52 ガラス電極法

※2 ; LRV (感染価対数減少値) :  $\log_{10}$  (5 分作用後の対照の感染価 / 各試験液作用後の感染価)

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

供試ウイルス原液の感染価 :  $1.2 \times 10^9$  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

表-2 試験液によるネコカリシウイルスの不活化効果

試験液	pH <sup>*1</sup>	作用時間		LRV <sup>*2</sup> 5分後
		0 (初期)	5分	
クローツ (液)	200ppm (24.4°C)	/	< 6.3	> 4.1
	100ppm (24.9°C)	/	< 6.3	> 4.1
	50ppm (24.5°C)	/	< 6.3	> 4.1
対照 (滅菌蒸留水)		$8.4 \times 10^4$	$9.7 \times 10^4$	/

※1 ; HORIBA pH meter D52 ガラス電極法

※2 ; LRV (感染価対数減少値) :  $\log_{10}$  (5分作用後の対照の感染価 / 各試験液作用後の感染価)

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 :  $2.0 \times 10^8$  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

## 11. 作用停止液の有効性確認試験

### 1) 目的

試験液による供試ウイルスへの不活化作用を停止させる目的で使用する作用停止液の有効性を確認した。

### 2) 方法

作用停止液として 0.5% チオ硫酸ナトリウムを溶解した PBS を用いて、試験液の塩素を中和する方法を採用した。なお、試験は、二酸化塩素濃度の高い「クローツ（液）」について調べた。

試験液 0.9 mL に 滅菌蒸留水 0.1 mL を添加した後、作用停止液で 10 倍に希釈した液を試験溶液とした。試験溶液 10 mL にウイルス液 0.1 mL を添加し、室温で 10 分間作用させた。この溶液を PBS で 10 倍に希釈してウイルス感染価測定用試料の原液としてウイルス感染価を測定した。作用停止液の有効性は、「対照（滅菌蒸留水）」と比較して、感染価が  $0.5 \log_{10}$  以上減少しない場合を有効と判定した。

### 3) 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-3、ネコカリシウイルス（ノロウイルス代替）に対する結果を表-4 に示した。

作用停止液で希釈した試験液にウイルスを作用させた感染価を、「対照（滅菌蒸留水）」と比較した場合、A 型インフルエンザウイルスでは  $-0.4 \log_{10}$ 、ネコカリシウイルスでは  $0.3 \log_{10}$  であった。以上の結果から、作用停止液は、試験に対して有効であると判定した。

表-3 作用停止液の有効性確認 (A型インフルエンザウイルス)

試験液	10分間作用後	感染価の差 <sup>※1</sup>	作用停止の有効性 <sup>※2</sup>
クローツ (液) 200 ppm	$2.0 \times 10^7$	-0.4	有効
対照 (滅菌蒸留水)	$7.2 \times 10^6$		

感染価単位：TCID<sub>50</sub>/mL

※1：  $\log_{10}$  (対照の感染価 / 試験液の感染価)

※2： 対照に対し、 $0.5\log_{10}$  以上減少していない場合を有効と判定した

表-4 作用停止液の有効性確認 (ネコカリシウイルス)

試験液	10分間作用後	感染価の差 <sup>※1</sup>	作用停止の有効性 <sup>※2</sup>
クローツ (液) 200 ppm	$5.6 \times 10^5$	0.3	有効
対照 (滅菌蒸留水)	$1.0 \times 10^6$		

感染価単位：TCID<sub>50</sub>/mL

※1：  $\log_{10}$  (対照の感染価 / 試験液の感染価)

※2： 対照に対し、 $0.5\log_{10}$  以上減少していない場合を有効と判定した

## 12. 細胞毒性確認試験

### 1) 目的

試験液が供試ウイルスを培養する細胞に対して細胞毒性を示す場合、ウイルス感染価の測定が困難になるため、試験液中和後の MDCK 細胞および CRFK 細胞に対する毒性を調べた。

### 2) 方法

試験液 0.9 mL に 滅菌蒸留水 0.1 mL を添加し、試験管ミキサーで攪拌した後、0.5% チオ硫酸ナトリウムを溶解した PBS で 10 倍に希釈し、さらに PBS で 10 倍に希釈した。この液を細胞毒性確認用試料の原液とした。細胞毒性確認用試料の原液を PBS で 10 倍段階希釈した後、細胞毒性確認用試料の原液および希釈試料 50  $\mu$ L と 5% FBS を添加した DMEM に懸濁した細胞 50  $\mu$ L を 96 ウエルプレートに植え込んだ。炭酸ガスふ卵器で 4 日間培養した後、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、各ウエルの染色の度合いにより細胞毒性を確認した。細胞毒性は、PBS を加えて培養したウエルの生細胞率 100% として、各試験品の生細胞率を求め、細胞毒性確認用試料を加えて培養したウエルの生細胞率が 50% 以下となった場合、細胞毒性“あり”と判定した。

### 3) 結果

MDCK 細胞に対する試験結果を表-5 および図-1、CRFK 細胞に対する試験結果を表-6、図-2 に示した。

今回の試験では、各種試験液の細胞毒性確認用試料原液の生細胞率は 50% 以上であった。以上の結果から、MDCK 細胞および CRFK 細胞に対する毒性は認められず、感染価測定系は影響を受けないと判断した。

表-5 試験液の MDCK 細胞に対する細胞毒性

試験液	生細胞率 % (平均値±標準偏差)
細胞確認用試料原液	85 ± 5
10 倍希釈液	88 ± 3
100 倍希釈液	87 ± 8
PBS	100 ± 9

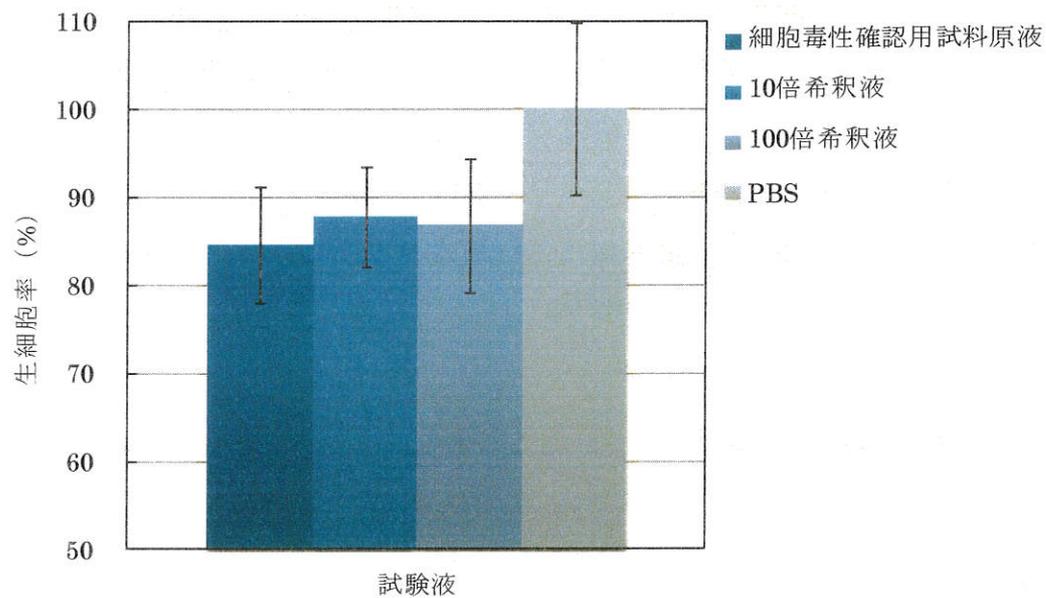


図-1 試験液の MDCK 細胞に対する細胞毒性

表-6 試験品の CRFK 細胞に対する細胞毒性

試験液	生細胞率 % (平均値±標準偏差)
細胞確認用試料原液	103 ± 7
10 倍希釈液	101 ± 6
100 倍希釈液	96 ± 3
PBS	100 ± 10

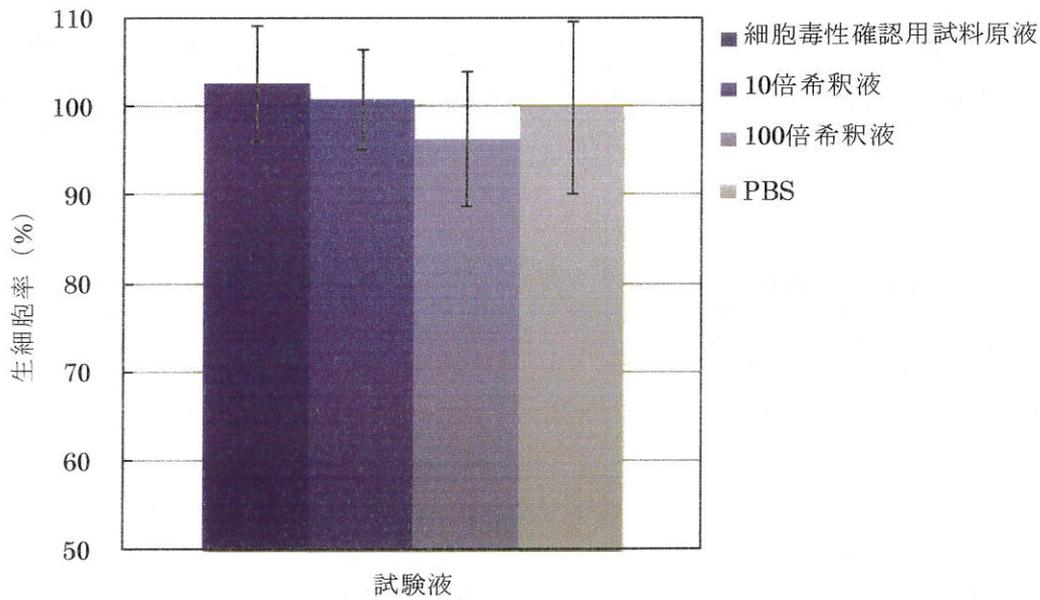


図-2 試験液の CRFK 細胞に対する細胞毒性