

第2報

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 不活化 (除去) 効果確認試験報告書 (3)

試験条件

試験検体	亜塩素酸水製剤 含量 亜塩素酸 ($\text{HClO}_2=68.46$) として 0.8% (8,000ppm) [製造時] 遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 200 mg/L 以上
ウイルス株	SARS-CoV-2(2019-nCoV/Japan/AI/1-004/2020) 株 (国立感染症研究所より分与)
宿主細胞	VeroE6/TMPRSS2 細胞(JCRB1819)
ウイルス液中 FBS 濃度	0%
ウイルス培養時の培地	ダルベッコ改編イーグル培地 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (富士フィルム和光純薬)
ウイルス力価検出法	TCID ₅₀
ウイルス液: サンプル液 反応液比率	1:9
初発ウイルス濃度	約 7.7×10^7 TCID ₅₀ / mL
供試サンプルの 除去・中和処理	10%FBS 含有 DMEM で 100 倍希釈した

検体の調整

亜塩素酸水製剤をポリスチレンチューブを用いて蒸留水で希釈した。ウイルスとの反応もポリスチレンチューブ内で行った。

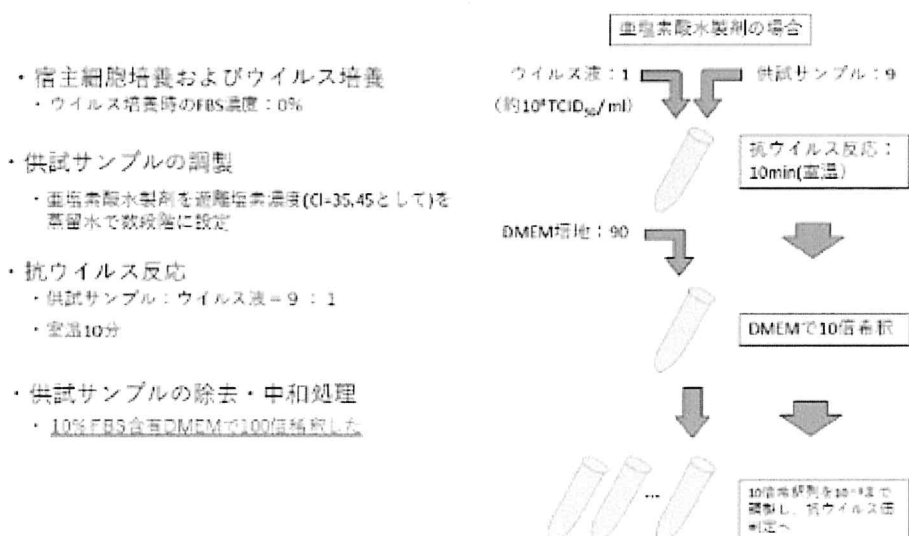
ウイルス液の調製

VeroE6/TMPRSS2細胞 (10-cmディッシュ) に m.o.i. が約 0.01 になるようにウイルス液を細胞に接種して、1 時間後に接種液を吸引除去して DMEM (5ml) を入れて培養した。細胞変性効果が細胞全体に広がって細胞がはがれ始めたところで培養上清を回収し、低速遠心と 5- μm フィルターで細胞を完全に除いてウイルス液とした。

ウイルス不活化(除去)効果確認試験の方法

抗ウイルス試験の方法は以下のように行った。ウイルス液と試薬を(1:9)の比率で混合し、室温で所定の時間反応させたのちに10%FBS含有DMEMで100倍希釈して反応を止めたのちに、さらに 10^{-8} まで10段階希釈をおこなった。VeroE6/TMPRSS2細胞(96ウェルプレート)の4個のウェルに各希釈のウイルス液を50 μ l/wellで接種し、一時間後に吸引除去して100 μ l/wellのDMEMに置換して培養した。3日後に各ウェルの感染の有無を判定して、Benrens-Karber法で50%感染希釈を計算し、ウイルス感染価[50%Tissue culture infectious dose(TCID₅₀)/ml]を求めた。

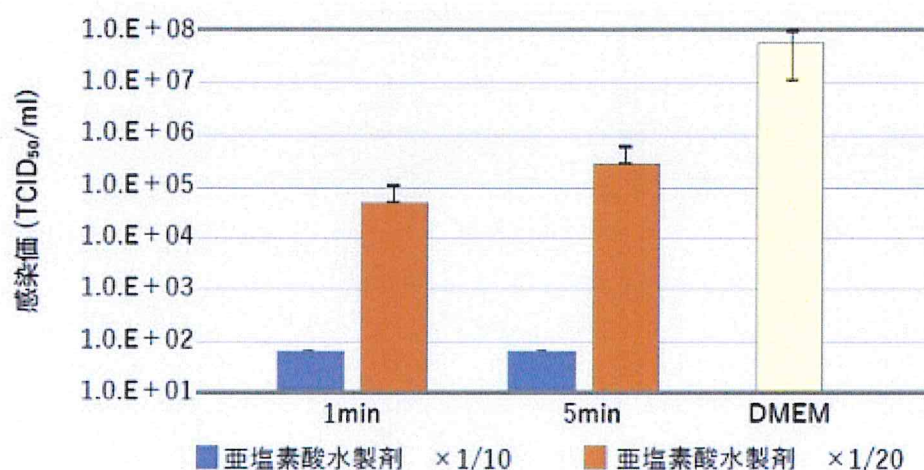
ウイルス不活化(除去)効果確認試験アウトライン



ウイルス不活化(除去)効果確認試験の方法

[非有機物存在条件下における反応時間によるウイルス不活化(除去)効果確認試験]

試験試薬・遊離塩素濃度 (Cl=35.45として)	反応時間 (min)	感染価 (TCID ₅₀ /mL)		Δlog	減少率 (%)
		平均値	標準偏差		
Test 区 x 1/10 希釈 (蒸留水), 20mg/L	1min	6.3.E+01	8.7.E-15	5.92	≧99.9999
	5min	6.3.E+01	8.7.E-15	5.92	≧99.9999
Test 区 x 1/20 希釈 (蒸留水), 10mg/L	1min	4.5.E+04	5.8.E+04	3.07	99.9152
	5min	2.7.E+05	3.2.E+05	2.29	99.4923
Cont. 区 血清非含有 DMEM, 0mg/L	—	5.3.E+07	4.2.E+07	基準	—



亜塩素酸水製剤1/10希釈液でウイルス感染価は検出限界まで低下していた。なお、この感染価は検出限界であり、ウイルス感染細胞は全く観察されていない。よって、実際の感染価はこれよりも低く、ウイルスは完全に不活化(≧99.9999%除去)されたと考えられる。次に、亜塩素酸水製剤1/20希釈液では、Cont.区(血清非含有DMEM)に比べると、ウイルス感染価は、2Log~3Logにまで低減(99.4%~99.9%除去)されていた。また、反応時間1分間と5分間とでは、ウイルスの不活化(除去)効果に有意差はみられず、1分間処理で、すでに相当な除去効果があることが判った。

※効果の評価は、平成27年度ノロウイルス不活化条件に関する調査報告書(国立医薬品食品衛生研究所)の評価基準に準じている。

以上の結果は、広島大学大学院医系科学研究科ウイルス学研究室において実施された試験の結果報告書に基づき、三度グループが作成したものである。