

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。 * * *

有限会社 アミコーポレーション 殿

試験報告書

「チャームズワッシュ」によるウシウイルス性下痢症ウイルス
(C型肝炎ウイルス代替) 不活化試験

北環発 2015_0053 号

2015年12月28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、ホームページに収載しております。

(http://www.kitasato-e.or.jp/?page_id=87)

1. 目的

貴社ご提供試験品「チャームズワッシュ」(強アルカリイオン水)によるウシウイルス性下痢症ウイルス(C型肝炎ウイルス代替)に対する不活化効果を調べた。

2. 依頼者

名称: 有限会社 アミコーポレーション

所在地: 〒297-0037 千葉県茂原市早野 2360

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. 実施期間

2015年11月6日～2015年11月26日

5. 試験品および試験条件

1) 試験品

強アルカリイオン水 (pH12.8) [チャームズ ワッシュ®、Germs WASH®]

[原材料: 純水、炭酸カリウム、焼成貝殻カルシウム]

2) 作用時間

0 (初期)、10 分間、30 分間

6. 供試ウイルスとウイルス液の調製方法

ウシウイルス性下痢症ウイルス (BVDV : *Bovine Viral Diarrhea virus*)

ウイルスをウシ腎臓細胞 (MDBK : Madin-Darby bovine 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 -30℃ の冷凍庫に凍結保存した。その後、凍結融解操作を行い、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を供試ウイルス液とした。

7. 試験方法

試験は、貴社担当者との打合せにより作成した仕様書に従って実施した。

1) ウイルス不活化試験

試験品 0.9 mL にウイルス液 0.1 mL を接種し、試験管ミキサーで穏やかに攪拌した後、室温で 10 分間および 30 分間作用させた。所定時間作用後、0.1 mL 採取し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS : phosphate buffered saline) で 100 倍に希釈して試験品のウイルスに対する作用を停止させ、ウイルス感染価測定用の試料原液として用いた。なお、初期ウイルス感染価は PBS にウイルス液を接種した後、直ちに採取したものを用いた。作用停止の有効性は別途試験で確認した。手順と結果を 10 項に示した。

2) ウイルス感染価測定法

ウイルス感染価の測定は、プラーク法を用いた。以下に方法の詳細を示した。

ウイルス感染価測定用細胞を感染価測定前日に 12 ウェルプレートに播種して炭酸ガスふ卵器で培養した。次いで、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。培養液を除いたウェルに、感染価測定用試料の原液または PBS で 10 倍段階希釈したウイルス感染価測定用試料 0.1 mL を接種し、37°C で 1 時間、ウイルスを細胞に感染させた。ウイルス接種後、乾燥の防止および、ウイルスを細胞にむらなく吸着させるため、プレートを 15 分ごとにティルティングした。1 時間後、1% 低融点アガロース加 Minimum Essential Medium (MEM) を各ウェルに 2.0 mL 加え、アガロースを固化させないで炭酸ガスふ卵器に入れ、4 日間培養した。培養後、アガロースを固化させたのち、12 ウェルプレートの各ウェルに、4% ホルマリン加 PBS (4% ホルマリン/PBS) を 1 mL 加え、室温で 1 時間静置した後、4% ホルマリン/PBS およびアガロースを除去し 5% クリスタルバイオレット加メタノール 1 mL を各ウェルに添加して細胞を染色した。水道水でウェルを洗浄後、風乾してウイルスの増殖により形成されたプラーク数を計測してウイルス感染価 (PFU/mL) を計算した。なお、試験品の作用停止後の溶液が MDBK 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。試験品の作用停止後の細胞毒性確認試験手順と結果を 11 項に示した。

8. 試験結果

1) ウイルス不活化試験

試験結果を表-1 に示した。また、試験品の pH を表-4 に示した。

初期感染価は、 2.4×10^5 PFU/mL であった。「対照 (PBS)」にウイルスを 10 分間および 30 分間作用させた場合、感染価はそれぞれ 2.4×10^5 PFU/mL および 2.5×10^5 PFU/mL となり、感染価の変動はほとんど認められなかった。一方、「チャームズワッシュ®」にウイルスを 10 分間および 30 分間作用させた場合、感染価はそれぞれ、 7.6×10^3 PFU/mL および 8.0×10^1 PFU/mL となり、感染価対数減少値はそれぞれ、 $1.4 \log_{10}$ および $3.4 \log_{10}$ となった。

9. コメント

本試験では、貴社ご提供「チャームズワッシュ®」によるウシウイルス性下痢症ウイルス（C型肝炎ウイルス代替）不活化効果を検討した。

抗菌試験においては、抗菌加工製品における抗菌効果の判定基準として抗菌活性値が2.0以上、消毒剤などの消毒効果の判定基準としては4.0以上を“効果あり”と規定している。

本試験においては、初期感染価からの感染価対数減少値（LRV : log reduction value）の差を求めて不活化効果を判定している。ウイルス試験においては素材によるウイルス不活化効果の判定基準は定められていないが、抗菌試験の基準を適用した場合、作用30分後に3.4 log₁₀の感染価減少値が認められ、ウイルス不活化効果“あり”と判定された。

以上

表-1 「チャームズワッシュ®」のウイルス不活化効果

試験品	作用時間			感染価対数減少値 (LRV) *	
	0 (初期)	10 分間	30 分間	10 分後	30 分後
チャームズワッシュ®	/	7.6×10^3	8.0×10^1	1.4	3.4
対照 (PBS)	2.4×10^5	2.4×10^5	2.5×10^5	0.0	0.0

ウイルス感染価単位：PFU/mL

供試ウイルス感染価： 3.3×10^8 PFU/mL

検出限界値： 1.0×10^1 PFU/mL

※感染価対数減少値 (LRV) = \log_{10} (初期感染価 / 各作用時間後の感染価)

10. 作用停止液の有効性確認試験

1) 目的

試験品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 PBS を用いて、試験品を 100 倍希釈する方法を採用した。試験品 0.9 mL にウイルス液の代わりに PBS 0.1 mL を添加した後、PBS で 100 倍に希釈した液を試験溶液とした。試験溶液 1 mL にウイルス液 0.1 mL を接種し、室温で 30 分間作用させた。この溶液を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 (PBS) 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

結果を表-2 に示した。

対照 (PBS) にウイルスを 30 分間作用させた場合、感染価は、 1.8×10^6 PFU/mL であった。また、作用停止液で希釈した試験品にウイルスを作用させた場合の感染価は、 1.6×10^6 PFU/mL となり、対照 (PBS) との感染価対数値の差は、 $0.1 \log_{10}$ であった。感染価対数減少値は判定基準内であったことから、作用停止液は本試験において有効であると判定した。

表-2 作用停止液の確認

試験溶液	30 分間作用後の感染価	感染価対数値の差*	判定
「チャームズワッシュ®」希釈液	1.6×10^6	0.1	有効
対照 (PBS)	1.8×10^6		

ウイルス感染価単位：PFU/mL

※ 感染価対数値の差： \log_{10} (対照の感染価/チャームズワッシュ®希釈液の感染価)

11. 細胞毒性確認試験

1) 目的

試験品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、試験品を作用停止液で希釈後のウイルス感染価測定用細胞に対する毒性を調べた。

2) 方法

試験品 0.9 mL に PBS 0.1 mL を加えたのち、PBS で 100 倍に希釈した液を細胞毒性確認用試料の原液とした。96 ウェルプレートに単層培養した MDBK 細胞の培養上清をすべて除き、細胞毒性確認用試料の原液または、PBS で 10 倍段階希釈した試料を 1 ウェルあたり 25 μ L 加えた後、37°C の CO₂ インキュベータで 1 時間静置した。1 時間後、接種液を除去して細胞維持培地を 1 ウェルあたり 100 μ L 加え 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、各ウェ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 を加えて培養したものを生細胞率 100% として、試験品の生細胞率を求め、50% 以下となった場合、細胞毒性“あり”と判定した。

3) 結果

試験結果を表-3 に示した。

今回の試験では、試験品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、作用停止液で希釈後の試験品の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-3 細胞毒性確認用試料の感染価測定用細胞に対する細胞毒性

細胞毒性確認用試料	生細胞率 (%) \pm 標準偏差*
細胞毒性確認用試料原液	100 \pm 7
10 倍希釈液	107 \pm 7
100 倍希釈液	112 \pm 9

6 ウェルの平均値と標準偏差を示した。

参考データ

貴社ご提供「チャームズワッシュ®」の pH をガラス電極法 (pH メータ、HORIBA D-52) で測定した結果を以下に示した。

表-4 試験品の pH

試験品	pH	測定温度
チャームズワッシュ®	12.9	23.9℃