

試 験 報 告 書

Kitasato Research Center for Environmental Science

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。* * *

株式会社イコル 殿

試験報告書

消毒剤によるネコカリシウイルス不活化試験

北環発 23_0038 号

平成 23 年 10 月 31 日

神奈川県相模原市南区北里 1 丁目 15 番 1 号

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場合は、事前に当センターの確認が必要です。
また、本報告書記載の試験結果は供試品に対するものであり、
荷口(ロット)全体の品質を証明するものではありません。

1. 目的

貴社ご提供消毒剤によるネコカリシウイルス不活化効果を検討した。

2. 依頼者

名 称：株式会社イコル

所在地：〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎 5-7-11-402

3. 試験機関

名 称：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 23 年 10 月 20 日～平成 23 年 10 月 25 日

5. 試験品および試験条件

試験品：アルコール EA-75

作用時間：0（初期）、60 秒

6. 供試ウイルスと調製法

ネコカリシウイルス (*Feline calicivirus* F-9 株)

ネコカリシ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℃ の冷凍庫に凍結保存した。その後、凍結融解操作を 2 回繰り返して、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試験仕様書に従って実施した。

1) 細胞毒性確認試験

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、ウイルス不活化試験の検出限界値に影響を与えるため、CRFK 細胞を用い、細胞毒性を調べた。試験品原液 0.9 mL とリン酸緩衝生理食塩水 (PBS : phosphate buffered saline) 0.1 mL を混合し、所定時間(60 秒)作用させた後、PBS で 100 倍に希釈して、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、原液

または希釈液 50 μL と 5%のウシ胎児血清 (FBS : fetal bovine serum) を添加した Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) に懸濁した CRFK 細胞 50 μL を 96 ウエルプレートに植え込んだ。その後、炭酸ガスふ卵器で 4 日間培養を行った。培養後、4% ホルマリン・0.1% クリスタルバイオレットを溶解した PBS を各ウエルに 90 μL 加えた後、室温で 10 分間静置し、細胞を染色した。染色後、水道水で洗浄・風乾させた後、エタノールを各ウエルに 50 μL 加え、クリスタルバイオレットを溶出させ、585 nm の吸光度を測定した。細胞に PBS を加えたウエルの吸光度を生細胞率 100% として、吸光度が 50 % 未満の場合を「細胞毒性あり」として判定した。

2) ウイルス不活化試験

試験管内に 0.9 mL の試験品と 0.1 mL のウイルス液を加え、ミキサーで穏やかに混合し、室温で静置して所定の時間作用させた後 0.1 mL サンプルングし、直ちに PBS 9.9 mL で希釈してウイルスに対する試験品の作用を停止させた。これらのウイルス液を感染価測定用試料原液とした。なお、作用時間 0 秒の試料および対照は、試験品を作用させる代わりに PBS を用いた。

3) ウイルス定量法

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、測定用試料原液または希釈ウイルス液 50 μL と 5%FBS を含む DMEM に懸濁したウイルス感染価測定用細胞 50 μL を 96 ウエルプレートに植え込んだ。その後、炭酸ガスふ卵器で 4 日間培養を行った。培養後、顕微鏡下で細胞変性効果 (CPE : cytopathic effect) を確認し、Reed-Muench 法を用いてウイルス感染価 (TCID₅₀/mL) を求めた。

8. 試験結果

1) 細胞毒性確認試験

結果を表-1 および図-1 に示した。
細胞毒性確認用試料原液の生細胞率は $100 \pm 6.0\%$ となり、判定基準値である 50% 以上であったため細胞毒性なしと判定した。以上の結果から、本試験における検出限界値は 6.3 TCID₅₀/mL となった。

2) 消毒剤によるウイルス不活化効果

試験結果を表-2、図-2 に示した。
初期ウイルス感染価は 1.4×10^5 TCID₅₀/mL であった。コントロールにおける 60 秒後のウイルス感染価は 1.0×10^5 TCID₅₀/mL となり、初期値から 0.1 log₁₀ の感染価対数減少値 (LRV : log reduction value) を示した。

一方、アルコール EA-75 にウイルスを 60 秒間作用させた場合、感染価は検出限

界値以下となり、陰性対照における 60 秒間作用後のウイルス感染価と比較した場合、 $4.2 \log_{10}$ 以上の LRV を示した。

9. コメント

本試験では、貴社ご提供消毒剤によるウイルス不活化効果を検討した。

米国 EPA（環境保健省）の報告では¹⁾、消毒効果の判定基準として感染価の対数減少値を $4 \log_{10}$ 、またウイルス感染価の測定用細胞に対して細胞毒性のあるものでは少なくとも $3 \log_{10}$ を推奨している。この判定基準を適用した場合、アルコール EA-75 は $4.2 \log_{10}$ 以上のウイルス感染価対数減少値を示したことから、ネコカリシウイルスに対して消毒効果があると判断される。

参考文献

- 1) Antimicrobials Division U.S. EPA, Confirmatory Virucidal Effectiveness Test, Using Feline Calcivirus As Surrogate for Norovirus.

以上

表-1 試験品による CRFK 細胞に対する細胞毒性

希釈倍率	生細胞率 (%)
細胞毒性確認用試料原液	100±6.0
10	100±3.6
100	101.9±5.9
1,000	99.8±6.4
10,000	100±3.7
100,000	100±4.0
添加なし (PBS)	100±9.8

PBS を細胞培養液に添加した場合の生細胞率を 100%とした。
生細胞率 50%未満を細胞毒性ありとして判定した。

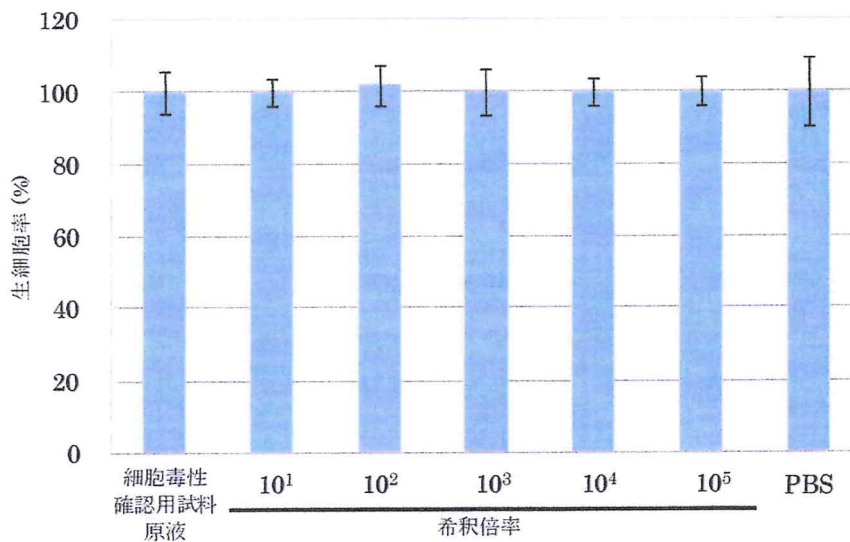


図-1 CRFK 細胞に対する細胞毒性

表-2 ネコカリシウイルスに対するウイルス不活化効果

試験品	作用時間 (秒)		ウイルス感染価 対数減少値	
	0 (初期値)	60	a)	b)
コントロール(PBS)	1.4 × 10 ⁵	1.0 × 10 ⁵	0.1	-
アルコール EA-75		< 6.3	> 4.3	> 4.2

感染価単位：TCID₅₀/mL

検出限界値：6.3 TCID₅₀/mL

感染価対数減少値：

a) 初期値からの LRV：

$$\log_{10}(\text{初期ウイルス感染価} \div \text{試験品 60 秒作用後のウイルス感染価})$$

b) コントロールに対する試験品の LRV：

$$\log_{10}(\text{コントロール 60 秒作用後のウイルス感染価} \div \text{試験品 60 秒作用後のウイルス感染価})$$

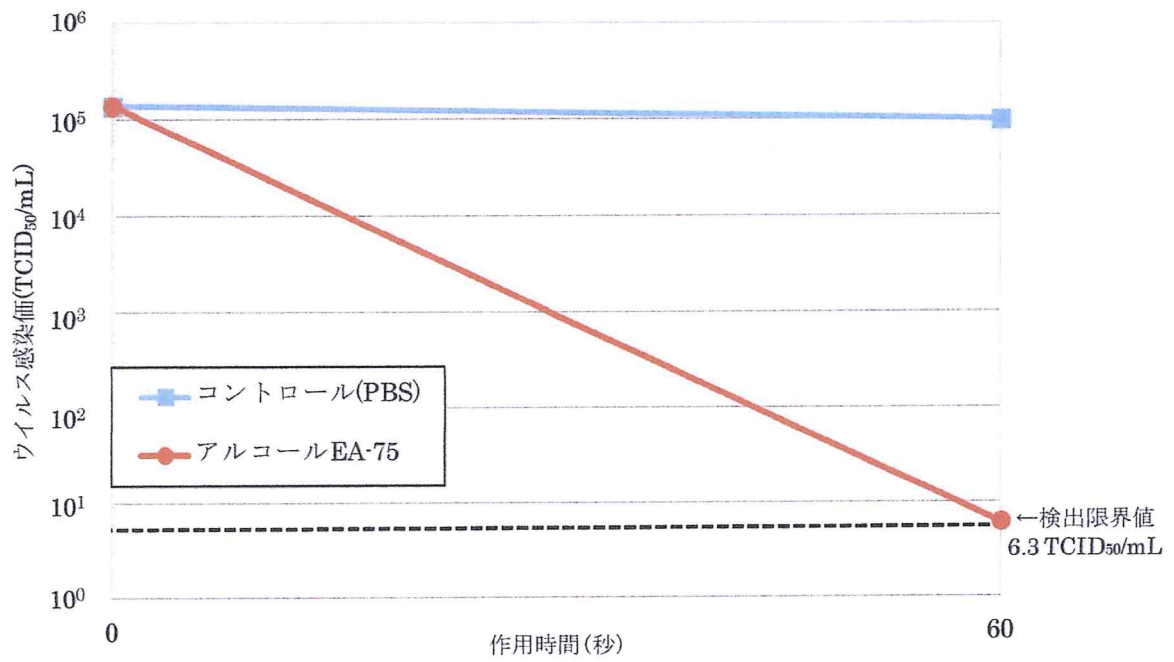


図-2 試験品のネコカリシウイルスに対するウイルス不活化効果