

株式会社 E・テック 殿

試験報告書

「アルタント」によるネコカリシウイルスの不活化試験

北環発 2017_0026 号

2017年9月22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)

1. 試験目的

貴社ご提供、「アルタント」による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 E・テック

所在地：〒650-0045 兵庫県神戸市中央区港島 9-1 神戸インキュベーションオフィス 316

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

2017年9月5日～2017年9月8日

5. 試験品

1) 「アルタント」

2) IPA（対照品）

各試験品は原液を試験に供した。

6. 試験条件

作用温度：25 ± 2 °C

作用時間： 対照；0（初期）、15 秒間、1 分間、5 分間

アルタント、IPA；15 秒間、1 分間、5 分間

7. 供試ウイルス

ネコカリシウイルス（*Feline calicivirus*, F-9, ATCC VR-782）

8. 感染価測定用細胞

ネコ腎臓由来細胞（CRFK：Crandell-Rees feline kidney）

9. 試験方法

1) ウイルス液の調製方法

ウイルスをネコ腎臓細胞（CRFK：Crandell-Rees 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-30℃の冷凍庫に凍結保存した。その後、凍結融解操作を行い、 $2,380 \times g$ 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保存ウイルス液とし、-80℃に保存した。試験には、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS: phosphate buffered saline) で 10 倍に希釈したウイルス液を供試ウイルス液とした。

2) 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。

試験管内に試験品 0.9 mL に供試ウイルス液 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。試験品のウイルスに対する作用停止は、0.1% チオ硫酸ナトリウム加 SCDLP ブイヨン培地で 100 倍に希釈し、ウイルス感染価測定用試料とした。なお、作用時間 0 (初期) および「対照」は試験品の代わりに PBS 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 12 項に示した。

3) ウイルス感染価の測定

CRFK 細胞をあらかじめ 12 ウエルプレートに播種して CO₂ インキュベータで 4 日間培養した。ウイルスを接種する前に、培養上清を除き新しい培養液に交換した。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。培養液を除いたウエルに、感染価測定用試料の原液または PBS で 10 倍段階希釈した試料 0.1 mL を接種し、37℃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 分ごとに揺らした。1 時間後、プラーク形成用培地を各ウエルに加え固化させた後、CO₂ インキュベータで培養した。培養後、12 ウエルプレートの各ウエルに、4% ホルマリン加 PBS (4% ホルマリン/PBS) を 1 mL 加え、室温で 30 分間静置した後、4% ホルマリン/PBS およびアガロスを除去し 5% クリスタルバイオレット加メタノール 1 mL を各ウエルに添加して細胞を染色した。水道水でウエルを洗浄後、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測定用試料 1 mL あたりのウイルス感染価 (PFU/mL) を求めた。

なお、試験品の作用停止後の溶液が感染価測定用細胞に対し毒性を示す場合、感染価の測定が困難になり、検出限界値も変わるため、別途確認試験を行った。手順と結果を 12 項に示した。

4) ウイルス感染価対数減少値の算出

対照の初期感染価と試験品作用後の感染価から、下記計算式を用いて感染価対数減少値 (LRV: log reduction value) を算出した。なお、LRV は小数点以下 1 桁 (2 位以下を切り捨て) で表記した。

計算式

$$\text{LRV} = \log_{10} (\text{対照の初期感染価} \div \text{試験品作用後の感染価})$$

10. 試験結果

試験の結果を表-1 および表-2 に示した。また、参考データとして、写真-1 にプラークの写真を示した。

ウイルス不活化試験の試験結果は、ウイルス感染価測定用試料 1 mL あたりのウイルス感染価および、初期感染価と試験品作用後の感染価対数値の差から求めたウイルス感染価対数減少値 (LRV: log reduction value) を記載した。

初期ウイルス感染価は、 7.2×10^5 PFU/mL であった。「対照 (PBS)」に最長 5 分間作用させてもウイルス感染価の大きな変動は認められなかった。

一方、「アルタント」にウイルスを 15 秒間、1 分間および 5 分間作用させたところ、15 秒間で検出限界値 (10 PFU/mL) 未満となった。各作用時間における LRV を求めると、15 秒間で > 4.8 となった。また「IPA」にウイルスを 15 秒間、1 分間および 5 分間作用させたところ各作用時間の LRV はそれぞれ、0.5、0.9 および 1.2 であった。

11. コメント

本試験では貴社ご提供の「アルタント」による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。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.) による消毒効果の判定基準は、初期感染価から 4.0 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、「アルタント」は 15 秒間の作用で LRV が 4.0 より大きくなり、ウイルス不活化効果が認められた。

一般的に消毒効果は環境中における有機物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。本試験品も使用環境によっては、有機物質 (汚れ) によって消毒効果が影響を受ける可能性があり、適切な使い方を考慮することが重要である。今後、有機物を負荷した条件によるウイルス不活化効果を検討されたい。

参考文献

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

以上

表-1 試験品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			
	0 (初期)	15 秒間	1 分間	5 分間
対照 (PBS)	7.2×10^5	7.8×10^5	8.0×10^5	7.9×10^5
アルタント		< 10	< 10	< 10
IPA		2.2×10^5	8.5×10^4	4.3×10^4

感染価単位 : PFU/mL

試験ウイルス感染価 : 4.7×10^8 PFU/mL

検出限界値 : 10 PFU/mL

表-2 試験品作用後の感染価対数減少値とウイルス不活化効果

試験品	感染価対数減少値 (LRV) ^{a)}		
	15 秒後	1 分後	5 分後
対照 (PBS)	0.0	0.0	0.0
アルタント	> 4.8	> 4.8	> 4.8
IPA	0.5	0.9	1.2

a) \log_{10} (初期感染価 / 所定時間作用後の感染価)

12. 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の不活化効果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

試験品の用停止液として、0.1% チオ硫酸ナトリウム加 SCDLP ブイヨン培地を用い、100 倍に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 を加えたのち、作用停止液で希釈した液を「試験試料」とした。試験試料 1 mL にウイルス液 0.1 mL を接種し室温で 5 分間作用させた。この溶液を原液とし、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-3 に示した。

「作用停止有効性の試験試料」にウイルスを作用させた時の感染価を、「対照 (PBS)」と比較した場合、判定基準内であった。以上の結果から、作用停止液は試験品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

作用停止有効性の 確認試料 a)	ウイルス感染価	感染価 対数減少値 b)	作用停止の 有効性 c)
アルタント	3.3×10^5	0.0	有効
IPA	5.0×10^5	0.0	有効
対照 (PBS)	3.3×10^5		

感染価単位：PFU/mL

a) 試験品を 0.1% チオ硫酸ナトリウム加 SCDLP ブイヨン培地で 100 倍に希釈した液

b) \log_{10} (対照の感染価 / 試験試料の感染価)

c) 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

13. 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、作用停止後の試験品を用いて CRFK 細胞に対する毒性を確認し、本試験における検出限界値を調べた。

2) 方法

試験品 0.9 mL にウイルス液の代わりに、PBS 0.1 mL を加えたのち、作用停止液で希釈した液を「細胞毒性確認用試料」とした。この液をあらかじめ 96 ウエルプレートに単層培養しておいた CRFK 細胞に測定用試料原液または希釈ウイルス液を 1 ウエルあたり 25 μ L を接種し、37°C の CO₂ インキュベータで 1 時間静置した後、接種液を除き、1 % FBS 加 DMEM を 1 ウエルあたり 100 μ L ずつ加え、CO₂ インキュベータで 1 日間培養した。培養後、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 を加えて培養したものを生細胞率 100 % として、細胞毒性確認用試料を添加して培養した細胞の生細胞率を求め、50 % 未満となった場合、細胞毒性“あり”と判定した。

3) 結果

試験結果を表-4 に示した。今回の試験では、細胞毒性確認用試料の原液でも細胞毒性が認められなかった。従って、本試験における検出限界値は 10 PFU/mL となった。

表-4 試験品の CRFK 細胞に対する毒性

細胞毒性確認用試料 ^{a)}	生細胞率 ^{b)} (平均値 \pm 標準偏差)		細胞毒性 の判定 ^{c)}
	原液	10 倍希釈液	
アルタント	95 \pm 0	118 \pm 2	毒性なし
IPA	111 \pm 3	116 \pm 3	毒性なし

a) 試験品を 0.1 % チオ硫酸ナトリウム加 SCDLP ブイヨン培地で 100 倍に希釈した液

b) 4 ウエルの平均値と標準偏差を示した

c) 生細胞率が 50% 未満を細胞毒性“あり”と判定した

参考データ

ネコカリシウイルスのプラーク写真

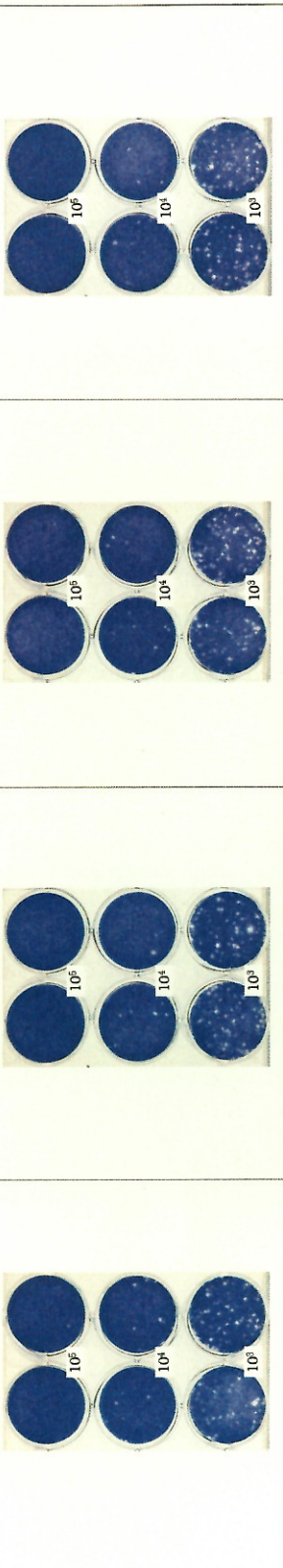
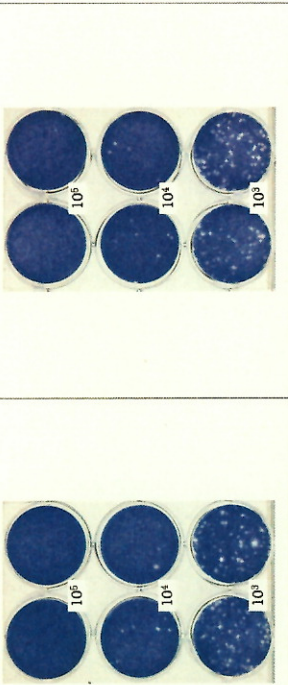
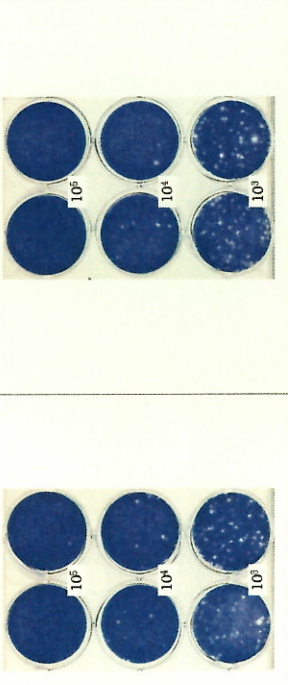
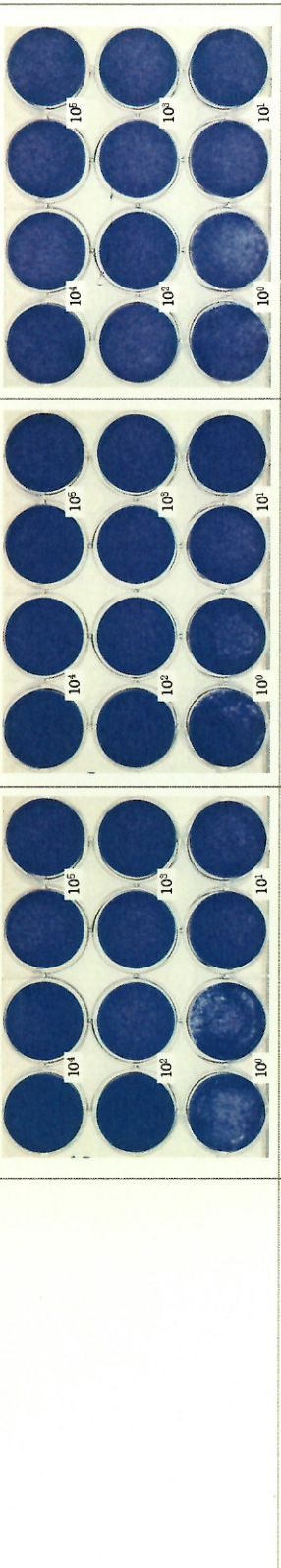
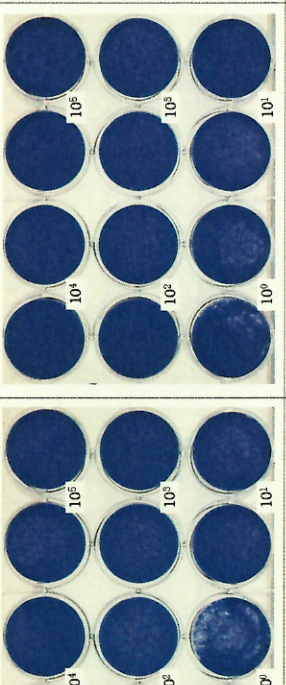
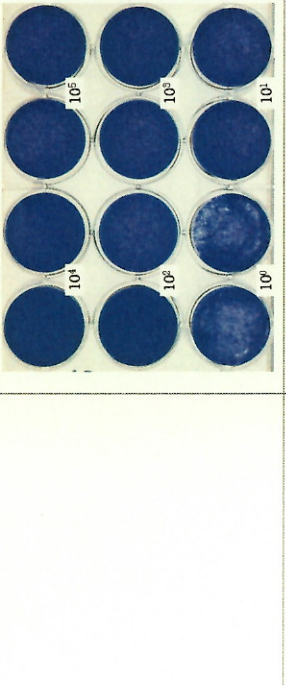
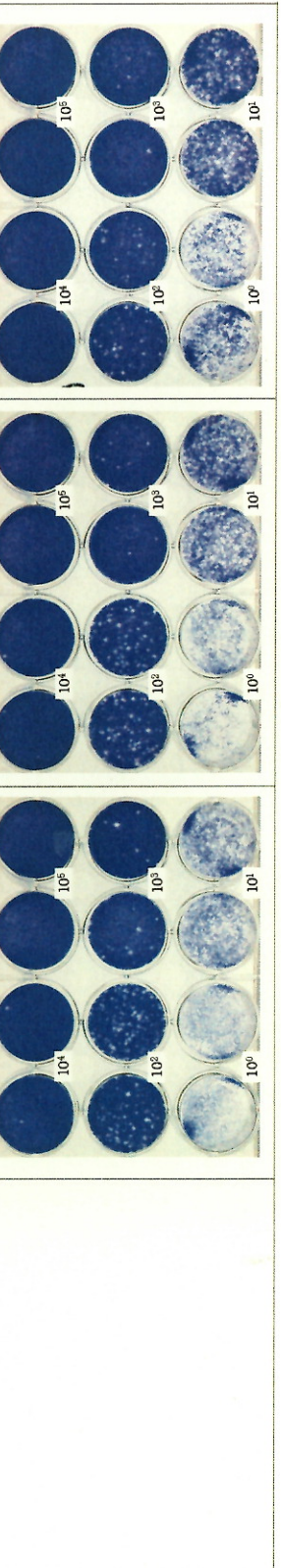
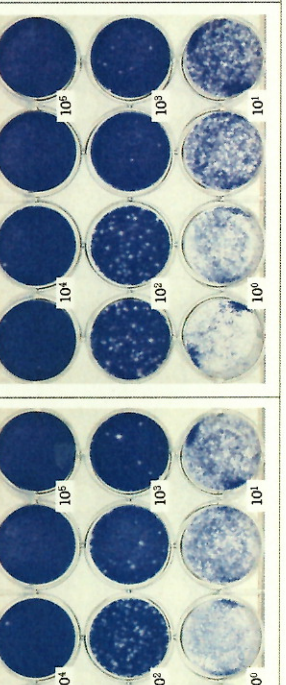
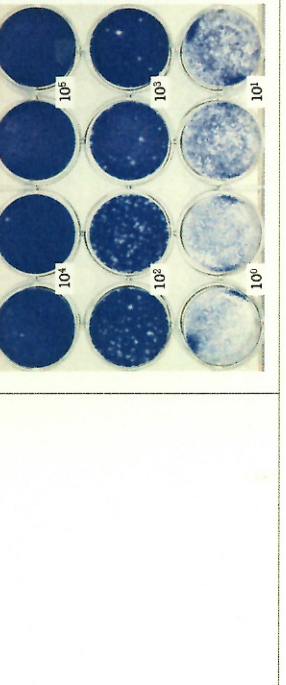
作用時間	作用時間		
	0 (初期)	15 秒間	1 分間
対照 (PBS)			
アルタント			
IPA (対照品)			

写真-1 試験品のネコカリシウイルスに対する不活化効果

試験品