

試験依頼社名

## 試験報告書

「高濃度弱酸性水 被検液」による

ウシ下痢症ウイルス（C型肝炎ウイルス代替）の不活化試験

北環発 24\_0025 号

平成 24 年 8 月 17 日

神奈川県相模原市南区北環 4 丁目 15 番 1 号

財団法人 北環環境科学センター

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承認が必要です。  
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. 試験目的

貴社提供、「高濃度弱酸性水 被検液」のウシ下痢症ウイルス（C型肝炎ウイルス代替）に対する不活化効果を評価した。

## 2. 依頼者

試験依頼社名

所在地：〒246-0022 神奈川県横浜市瀬谷区三ツ境 1-8-202

## 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 1-16-1

担当：ウイルス部ウイルス課

## 4. 実施日

平成 24 年 7 月 23 日 ～ 平成 24 年 8 月 8 日

## 5. 試験品

「高濃度弱酸性水 被検液」（有効塩素濃度 500 mg/L、pH 6.0±0.5）

（実測値：有効塩素濃度 414 mg/L、pH 6.0；測定方法および機器は、表-1 に示した。）

## 6. 試験条件

作用時間：0（初期）、30 秒

## 7. 供試ウイルス

*Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV：ウシ下痢症ウイルス、C型肝炎ウイルス代替)

## 8. 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い実施した。

### 1) 供試ウイルスの培養と調製方法

BVDV をウシ腎臓由来細胞株 (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 -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、3,500rpm 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。

### 2) ウイルス不活化効果試験

BVDV 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 0.9 mL の試験品と  $3.8 \times 10^6$  PFU/mL の供試ウイルス液 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。その後、0.1 mL サンプリングし、チオ硫酸ナトリウムを 0.5% 添加したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: Phosphate buffered saline) で 5 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た。この液をウイルス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 秒および陰性対照は試験品の代わりに PBS を用いて実験した。

### 3) ウイルス感染価の測定

MDBK 細胞をあらかじめ 12 ウェルプレートに播種して 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で 1 日間培養した。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希釈ウイルス液 0.1 mL を接種した。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、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、アガロースを添加した細胞維持培地を各ウェルに加え固化させた後、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で 4 日間培養した。培養後、12 ウェルプレートの各ウェルに、ホルマリンを 4% 添加した PBS を 2 mL 加え、室温で 2 時間静置後、アガロースを除去し、クリスタルバイオレットを 2%、ホルマリンを 4% 添加した PBS を各ウェルに 1 mL 加えて細胞を染色した。水道水で洗浄後、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。

### 4) 有効塩素濃度および pH の測定

試験直前に試験品の有効塩素濃度および pH を測定した。

測定方法および機器を表-1 に示した。

表-1 測定方法

測定項目	測定方法
有効塩素濃度	ヨウ素試薬による吸光光度法 測定機器：柴田科学、AQUAB AQ-102 (測定範囲 0 ~ 300 mg/L)
pH	ガラス電極法 測定機器：HORIBA pH-METER D-52)

## 9. 試験結果

試験結果を表-2 に示した。

初期ウイルス感染価は、 $5.8 \times 10^4$  PFU/mL であった。PBS に 30 秒間作用させた場合の感染価は、 $3.5 \times 10^4$  PFU/mL であり、初期値からほとんど変動しなかった。一方、「高濃度弱酸性水 被検液」をウイルスに 30 秒間作用させた場合、検出限界値 (5 PFU/mL) 以下となり、4.1 log<sub>10</sub> 以上の感染価対数減少値 (LRV : log reduction value) を示した。

## 10. コメント

本試験では、貴社ご提供「高濃度弱酸性水 被検液」による BVDV (C 型肝炎ウイルス代替) に対する不活化効果の検討を行った。

米国 EPA (環境保護庁) の報告では、消毒剤の効果判定基準として、試験系における感染価対数減少値を 4 桁 (LRV = 4)、またはウイルス感染価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 桁 (LRV = 3) を推奨している。本試験では、30 秒の作用で LRV = 4.1 以上の値を示しており、ウイルス不活化効果があると判断された。

一般に塩素系の消毒剤はウイルス不活化効果が認められるが、有機物含むウイルス液を用いたウイルス不活化試験においては、精製されたウイルス液を用いた場合の結果と比較して不活化効果が減少することが報告されている<sup>2)</sup>。このことは、タンパク質などの有機物が混在している環境中で使用した際には、有効塩素が有機物に消費され期待されたウイルス不活化効果が得られない可能性があることを示唆させる。従って、試験品を実際に使用する際には、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、適切な使い方をする必要がある。また今後、有機物を負荷させた場合でのウイルス不活化効果を調べることが検討されたい。

表-2 「高濃度弱酸性水 被検液」による BVDV 感染価の変化

試験品	作用時間 (秒)		感染価 対数減少値
	初期値 (0)	30	
陰性対照 (PBS)	$5.8 \times 10^4$	$3.5 \times 10^4$	0.2
高濃度弱酸性水 被検液		< 5	> 4.1

試験ウイルス：BVDV (C型肝炎ウイルス代替)

感染価単位：PFU/mL

検出限界値：5 PFU/mL

感染価対数減少値： $\log_{10}$  (初期値÷30 秒間作用後の感染価)

## 《参考データ》

試験品である「高濃度弱酸性水」被検液の有効塩素濃度と pH を表-3 に示した。

表-3 「高濃度弱酸性水」被検液の有効塩素濃度および pH 測定結果

試験品	有効塩素濃度 <sup>※1</sup> (実測値；mg/L)	pH <sup>※2</sup>
高濃度弱酸性水 被検液 (500 mg/L, pH6.0±0.5)	414	6.0

※1：測定機器：AQUAB AQ-102 (柴田科学)

試験品を蒸留水で 2 倍に希釈して測定

※2：測定機器：pH METER D-52 (HORIBA)