

2021年10月04日

新型コロナウイルス変異株（デルタ株）に対する効果確認試験報告 その（1）

亜塩素酸水の新型コロナウイルス変異株（デルタ株）[hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021株]に対する不活化効果を確認してみました、その結果を以下にご報告させていただきます。

試験条件： [*別紙1試験条件参照]

試験検体	亜塩素酸水 含量 亜塩素酸(HClO ₂ =68.46)として 8,000 ppm (0.8%)【ヨウ素還元滴定法】[製造時] 遊離塩素濃度(Cl=35.45として) 200 mg / L以上【DPD法】
ウイルス株	新型コロナウイルス変異株（デルタ株） (hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021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FBS濃度	0%※ (※ポリエチレングリコール(PEG)沈殿処理によってウイルス液の濃縮処理を行った)
ウイルス培養時の培地	ダルベッコ改変イーグル培地 (低グルコース) Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose (DMEM)
ウイルス力価検出方法	TCID ₅₀ 法
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5.8×10 ⁶ TCID ₅₀ / mL

試験方法：試験検体：ウイルスとの反応も 1.5mL チューブ内で行った。

なお、ウイルス液の調製は以下のように行った。VeroE6/TMPRSS2 細胞 (25 cm² フラスコ) に m.o.i. が 0.001 になるように 1.5 mL のウイルス液 (hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021 株) を細胞に 1 時間接種した後、2.5 mL の DMEM low glucose 培地 (2%FBS、1 mg/mL G-418 含有)を入れて 48 時間培養した。

その後、培養液を回収し、培養液 10 mL あたり 1 g のポリエチレングリコール 6,000 と 0.233 g の塩化ナトリウムの条件でポリエチレングリコール(PEG)沈殿処理を行った後、上澄み液(培地成分や FBS 等)を除去し、沈殿物(ペレット)をリン酸緩衝液 (PBS) で懸濁し、ウイルス濃縮液とした。

抗ウイルス試験の方法は以下のように行った。

ウイルス濃縮液と試薬を 60 μL : 540 μL (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、0.1 mol/L のチオ硫酸ナトリウム 30 μL を加え、中和した。

その後、DMEM low glucose 培地 (2%FBS、1 mg/mL G-418 含有)を用いて 10⁻⁶まで 10 倍段階希釈をおこなった。

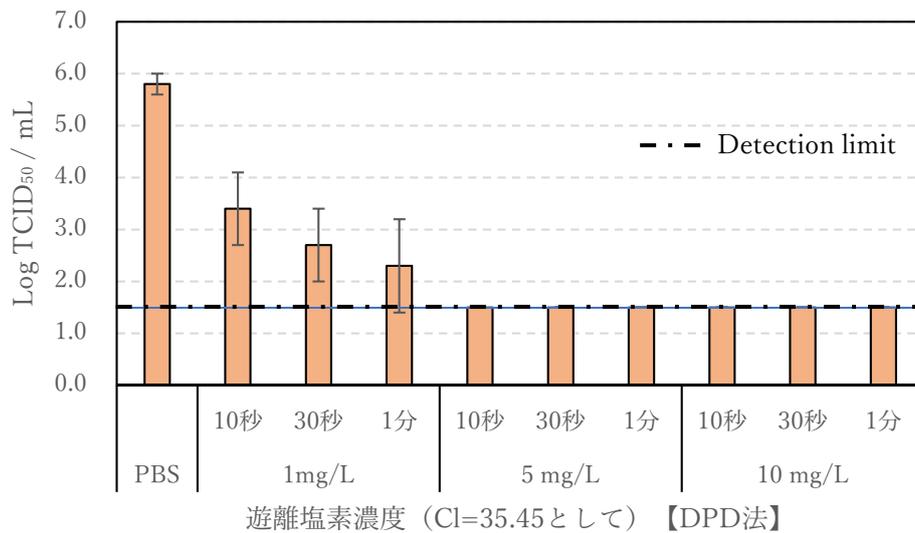
VeroE6/ TMPRSS2 細胞 (96 ウェルプレート) に各希釈のウイルス液を 100 μl/well で接種し、一時間後に吸引除去して 100 μl/well の DMEM low glucose 培地 (2%FBS、1 mg/mL G-418 含有)に置換して培養した。

また、2 日後に各ウェルの感染の有無を判定して、Behrens-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。[*別紙2 アウトライン参照]

結果：

[有機物非存在条件下における反応時間別の新型コロナウイルス変異株(デルタ株)不活化効果確認試験]



供試薬剤	遊離塩素濃度(Cl=35.45として) 【DPD法】 [含量 亜塩素酸(HClO ₂ =68.46)として] 【ヨウ素還元滴定法】(推定値)]	反応時間	感染価 Log(TCID ₅₀ /mL)	Δlog	減少率 (%)
リン酸緩衝液(PBS)	0mg/L	-	5.8±0.2	-	-
亜塩素酸水	1 mg/L [約 40 ppm]	10 秒	3.4±0.7	2.4	99.602
		30 秒	2.7±0.9	2.3	99.921
		1 分	2.3±0.7	3.5	99.968
	5 mg/L [約 200 ppm]	10 秒	≤1.5	≥4.3	≥99.995
		30 秒	≤1.5	≥4.3	≥99.995
		1 分	≤1.5	≥4.3	≥99.995
	10 mg/L [約 400 ppm]	10 秒	≤1.5	≥4.3	≥99.995
		30 秒	≤1.5	≥4.3	≥99.995
		1 分	≤1.5	≥4.3	≥99.995

亜塩素酸水は遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 5 mg/L 【DPD 法】 [含量 亜塩素酸 (HClO₂=68.46)として約 200 ppm 【ヨウ素還元滴定法】]の濃度を、10 秒間処理することで 5.8 log TCID₅₀/mL の新型コロナウイルス変異株(デルタ株)の感染価を検出下限以下(1.5 log TCID₅₀/mL)にまで低下(≧99.995%減少)させることができた。

また、遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 1 mg/L 【DPD 法】 [含量 亜塩素酸 (HClO₂=68.46)として約 40 ppm 【ヨウ素還元滴定法】]であっても 10 秒間処理することで 2 log TCID₅₀/mL の新型コロナウイルス変異株(デルタ株)の感染価を低下(99%減少)させることができ、又更に 1 分間まで処理時間を延長すると、3 log TCID₅₀/mL の新型コロナウイルス変異株(デルタ株)の感染価を低下(99.9%減少)させることができ

た。

以上の結果は、大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科 山崎 伸二教授が実施された試験結果（未公表）に基づき、三慶グループが作成したものである。