

2021年03月01日

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）不活化（除去）効果試験報告書（5）

亜塩素酸水製剤の SARS-CoV-2 に対する不活化（除去）効果を、一般的に使用されている塩素系消毒剤である次亜塩素酸ナトリウムと比較してみました、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]

ウイルス不活化(除去)効果確認試験条件(5) <有機物非存在下>

試験検体	亜塩素酸水製剤 含量 亜塩素酸(HClO ₂ =68.46)として 8,000 ppm (0.8%) [製造時] 遊離塩素濃度(Cl=35.45として) 200 mg / L以上 次亜塩素酸ナトリウム液 有効塩素濃度 50,000 ppm (5.0%) 遊離塩素濃度(Cl=35.45)として約50,000 mg/L
ウイルス株	SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 JPN/TY/WK-521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	ダルベッコ改良イーグル培地 (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	1:9
反応液比率	
初発ウイルス濃度	約1.6×10 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。

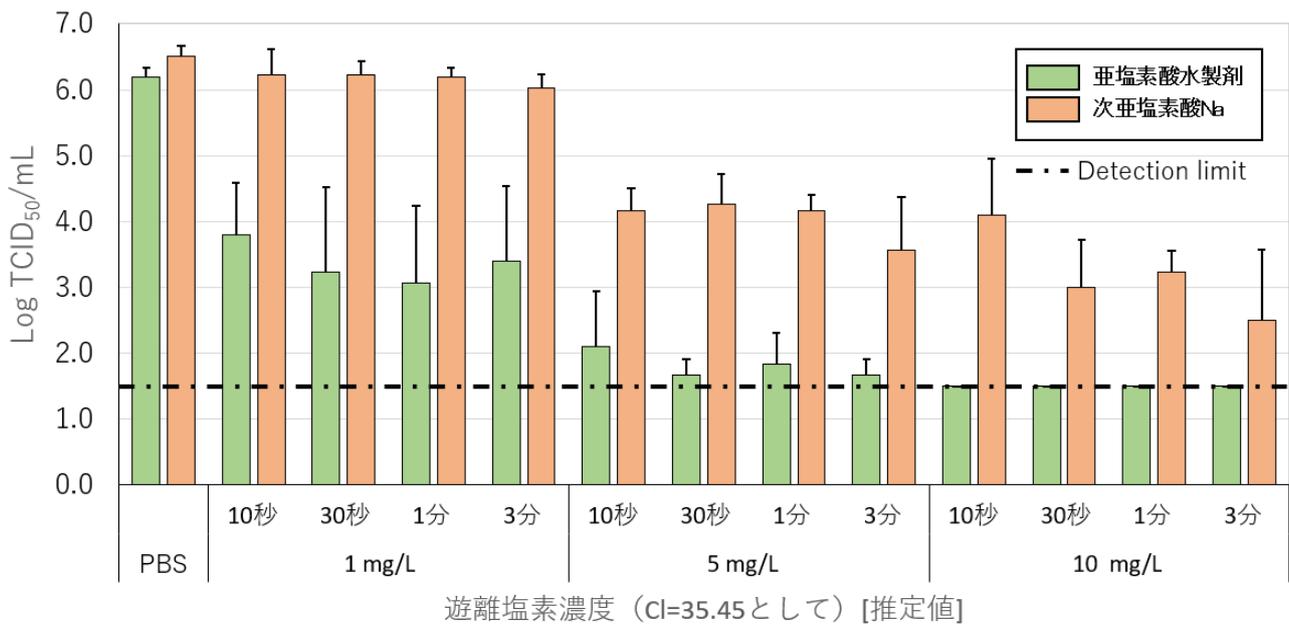
なお、ウイルス液の調製は以下のように行った。VeroE6/TMPRSS2 細胞 (25 cm² フラスコ) に m.o.i. が 0.001 になるように 1.5 mL のウイルス液 (SARS-CoV-2JPN/TY/WK 株) を細胞に 1 時間接種した後、2.5 mL の DMEM low glucose 培地 (2%FBS、1 mg/mL G-418 含有) を入れて 48 時間培養した。その後、培養液を回収し、培養液 10 mL あたり 1 g のポリエチレングリコール 6,000 と 0.233 g の塩化ナトリウムの条件でポリエチレングリコール (PEG) 沈殿処理を行った後、上澄み液(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 SARS-CoV-2 不活化（除去）効果確認試験]

供試薬剤	遊離塩濃度(CI=35.45として) (mg / L) [推定値]	反応時間	感染価 Log(TCID ₅₀ /mL)	Δlog	減少率 (%)		
亜塩素酸水製剤	0mg/L [リン酸緩衝液]	—	6.2±0.1	—	—		
		1 mg/L [含量 亜塩素酸(HClO ₂ =68.46)として約 40 ppm]	10 秒	3.8±0.8	2.4	99.602	
			30 秒	3.2±1.3	3.0	99.900	
			1 分	3.1±1.2	3.1	99.921	
			3 分	3.4±1.1	2.8	99.842	
	5 mg/L [含量 亜塩素酸(HClO ₂ =68.46)として約 200 ppm]	10 秒	2.1±0.8	4.1	99.992		
		30 秒	1.7±0.2	4.5	99.997		
		1 分	1.8±0.5	4.5	99.996		
		3 分	1.7±0.2	4.5	99.997		
	10 mg/L [含量 亜塩素酸(HClO ₂ =68.46)として約 400 ppm]	10 秒	≧1.5	≧4.8	≧99.998		
		30 秒	≧1.5	≧4.8	≧99.998		
		1 分	≧1.5	≧4.8	≧99.998		
		3 分	≧1.5	≧4.8	≧99.998		
	次亜塩素酸ナトリウム液	0mg/L [リン酸緩衝液]	—	6.5±0.2	—	—	
			1 mg/L [有効塩素濃度 1 ppm]	10 秒	6.2±0.4	0.3	49.881
				30 秒	6.2±0.2	0.3	49.881
1 分				6.2±0.1	0.3	49.881	
3 分				6.0±0.2	0.5	68.377	
5 mg/L [有効塩素濃度 5 ppm]		10 秒	4.2±0.3	2.3	99.499		
		30 秒	4.3±0.4	2.2	99.369		
		1 分	4.2±0.2	2.3	99.499		
		3 分	3.6±0.8	2.9	99.874		
10 mg/L [有効塩素濃度 10 ppm]		10 秒	4.1±0.8	2.4	99.602		
		30 秒	3.0±0.7	3.5	99.968		
		1 分	3.2±0.3	3.3	99.950		
		3 分	2.5±1.1	4.0	99.990		



亜塩素酸水製剤は遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 10 mg/L (DPD 法) 【推定値】 [含量 亜塩素酸(HClO₂=68.46)として約 400 ppm (ヨウ素還元滴定法)] の濃度で 6.2 log TCID₅₀/mL の SARS-CoV-2 の感染価を検出下限以下 (1.5 log TCID₅₀/mL) まで低下 (≧ 99.998%減少) させることができていた。

一方、次亜塩素酸ナトリウム溶液では同じ遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 10 mg/L (DPD 法) 【推定値】 [含量 亜塩素酸(HClO₂=68.46)として約 10 ppm (ヨウ素還元滴定法)] で 10 秒間処理しても 6.5 log TCID₅₀/mL の SARS-CoV-2 の感染価を 4.1 log TCID₅₀/mL までしか低下 (99.874%減少) させることはできず、処理時間を 3 分間にまで延長したとしても 2.5 log TCID₅₀/mL までしか、SARS-CoV-2 の感染価を低下 (99.990%減少) させることはできていなかった。

また、亜塩素酸水製剤の場合、遊離塩素濃度 (Cl=35.45 として) 1 mg/L (DPD 法) 【推定値】 [含量 亜塩素酸(HClO₂=68.46)として約 40 ppm (ヨウ素還元滴定法)] と前述の 10 分の 1 の濃度でも、30 秒間処理することで 3 log TCID₅₀/mL の SARS-CoV-2 の感染価を低下 (99.900%減少) させることができていた。

以上の結果により、ウイルス液の夾雑物を限りなく除去した (取り除いた) 有機物非存在条件下における、SARS-CoV-2 に対する消毒薬としては、広く一般的に利用されている次亜塩素酸ナトリウムよりも明らかにこの亜塩素酸水製剤の方が、低濃度でかつ短時間でウイルス (SARS-CoV-2) を不活化 (除去) することができる薬剤であるということがこの試験で明らかとなった。

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。

ウイルス不活化(除去)効果確認試験条件(5) <有機物非存在下>

試験検体	亜塩素酸水製剤 含量 亜塩素酸(HClO ₂ =68.46)として 8,000 ppm (0.8%) [製造時] 遊離塩素濃度(Cl=35.45として) 200 mg / L以上
	次亜塩素酸ナトリウム液 有効塩素濃度 50,000 ppm (5.0%) 遊離塩素濃度(Cl=35.45として) 約50,000 mg/L
ウイルス株	SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 JPN/TY/WK-521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 1.6×10^6 TCID ₅₀ / mL

ウイルス不活化（除去）効果確認試験アウトライン(5) <有機物非存在下>

・ 宿主細胞培養およびウイルス培養

- ・ ウイルス培養時のFBS濃度：2%※

※増殖後のウイルス液は濃縮処理を行い、FBS等の夾雑物を除去したウイルス濃縮液を調製した。

・ 供試サンプルの調製

- ・ 亜塩素酸水製剤並びに次亜塩素酸ナトリウム液の遊離塩素濃度(CI=35.45として)を蒸留水で数段階に設定

・ 抗ウイルス反応

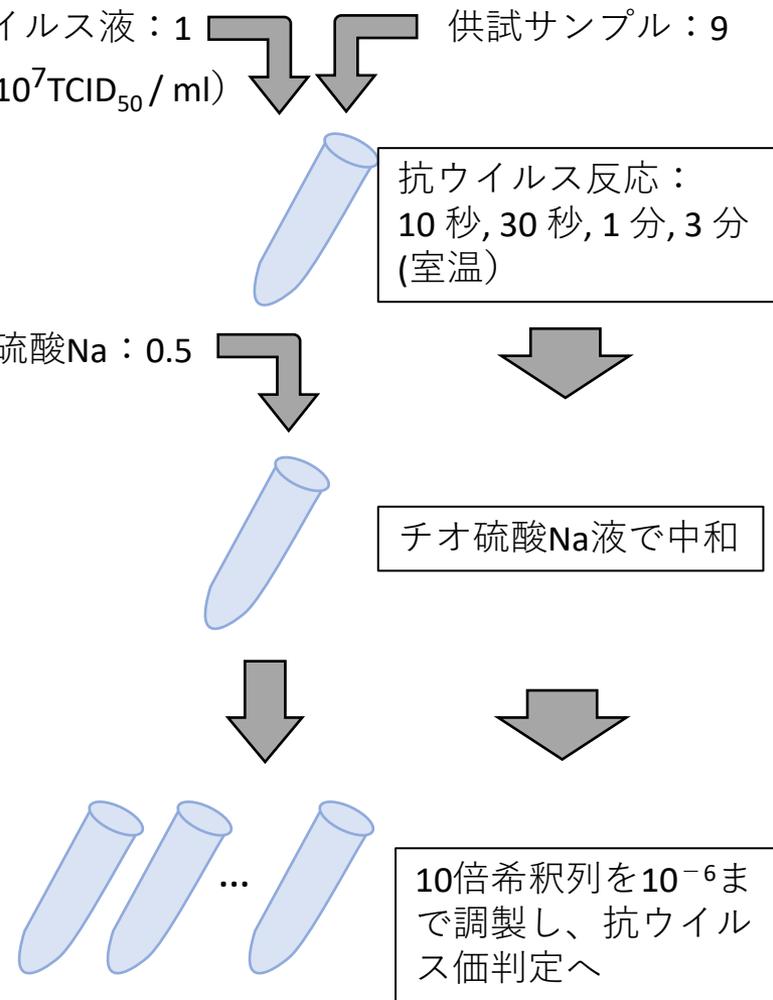
- ・ 供試サンプル：ウイルス液 = 9 : 1 (540 μ L : 60 μ L)
- ・ 室温10秒、30秒、1分、3分

・ 供試サンプルの除去・中和処理

- ・ 0.1mol/Lチオ硫酸ナトリウム液を0.5の比率 (30 μ L) で中和後、2%FBS含有DMEMになるように10倍濃縮DMEM 60 μ L, FBS 12 μ Lを添加後、2% FBS含有DMEMを用いて、10倍希釈列を 10^{-6} まで希釈調製した。

ウイルス液：1 (約 10^7 TCID₅₀/ml) 供試サンプル：9

チオ硫酸Na：0.5



抗ウイルス反応：
10秒, 30秒, 1分, 3分
(室温)

チオ硫酸Na液で中和

10倍希釈列を 10^{-6} まで調製し、抗ウイルス価判定へ

