

試験成績書
ACT消石灰鳥インフルエンザウイルス不活化効果試験

依頼者 有限会社クリーンケア
試験受託 北海道大学獣医学研究院

本試験は有限会社クリーンケアが試験計画を作成し、北海道大学に依頼を行い実施した。本成績書は、北海道大学獣医学研究院微生物教室迫田義博教授が実施した試験結果を受領し、その内容を有限会社クリーンケアで整理したものである。なお、受領した試験結果を本成績書末尾に参考資料としてそのまま転載する。（文責：大久保）

INDEX

I. 目的	3
II. 経緯	3
III. 試験法	3
III.1.使用材料	3
III.2.試験サンプル	3
III.3.試験	3
IV. 試験結果	5
V. 評価	5
VI. 参考資料	6
VI.1.試験サンプルのpH	6
VI.1.実試験環境の降雨量と回収時pH	6
VI.1.試験結果	7

I. 目的

ACT消石灰の鳥インフルエンザウイルス不活化効果の評価

II. 経緯

本試験は令和6年4月15日に、獣医学研究において、新規殺菌剤の鳥インフルエンザウイルスに対する有効性評価を目的として、有限会社クリーンケアが北海道大学獣医学研究院微生物学教室迫田義博教授に試験を依頼したことによる。

III. 試験法

ウイルス感染価測定法：50%組織培養感染量（TCID₅₀）測定法

III.1. 使用材料

試験ウイルス

高病原性鳥インフルエンザウイルスA/white-tailed eagle/Hokkaido/22-RU-WTE-2/2022(H5N1)（北海道大学で分離し、保管しているもの）

宿主細胞

Madin-Darby canine kidney(MDCK)細胞

ネガティブコントロール

PBS

III.2. 試験サンプル

1.1. ACT消石灰の調製

クリーンケアで製造したACTと消石灰（カナダ工業株式会社 食品添加物）をACT 3に対して消石灰 97で混合した。消石灰（同社）はACTを混合せずそのまま試験に用いた。

1.2. ACT消石灰乳の調製

調製したACT消石灰 1に対して水 4を混合し乳液状にした。乳液状にしたACT消石灰乳をPP製トレイ（底面積32×22cm）に1kg/m²の散布量で注ぎ、乾燥させた

1.3. 消石灰乳の調製

消石灰 1に対して水 4を混合し乳液状にした。PP製トレイ（底面積32×22cm）に1kg/m²の散布量で注ぎ、乾燥させた。

1.4. ACT消石灰粉末の調製

ACT消石灰を（底面積32×22cm）に1kg/m²の散布量で散布した。

1.5. 消石灰粉末の調製

消石灰を（底面積32×22cm）に1kg/m²の散布量で散布した。

1.6. 設置条件

表1 設置条件表および表2 実地試験設置表に従って、1.2.～1.5.の試験サンプルを設置し、所定の設置期間が経過したサンプルは、トレイ内の全量を回収した上ですり鉢で粉砕し微粉末状にした後、試験に必要な量を北海道大学にクール宅急便で送付した。

III.3. 試験

1) ウイルス懸濁液の調製

鶏発育鶏卵にウイルスを感染させ、35度で48時間培養後の尿膜腔内液を回収した。これをPBSで5倍に希釈し、試験に用いる試験ウイルス懸濁液とした。

2) 高病原性鳥インフルエンザウイルスの不活化試験

各設置条件（表1・表2）で調製した試験サンプル0.3gを蒸留水1.0mlと混和し、30分静置

1で調製したウイルス液を0.5ml加えて、混和

作用温度 25℃

作用時間 10分

作用後に、上記反応溶液0.04mlをウマ血清（Thermo Fisher Scientific Inc.）1.96mlと混和し反応を停止。

上清を回収し、ウイルス感染価を測定した。

3) ウイルス感染価測定法：50%組織培養感染量（TCID₅₀）測定法

2の最終反応溶液を、Eagle's minimal essential medium（EMEM 島津ダイアグノスティクス）で10倍希釈系列を作成し、MDCK細胞を事前に培養した96穴マイクロプレートに0.1mlずつ、4穴に添加した。1時間後に細胞に添加した溶液を除去し、新しいEMEMを各穴に0.1mlずつ添加した。これらのMDCK細胞は35℃で48時間培養した。

4) ウイルス増殖に伴う細胞変性効果を顕微鏡で観察し、ウイルス増殖の有無を判定した。各サンプル中に存在する感染性ウイルス量は、Reed and Muenchの方法により試験液1mlあたりのTCID₅₀の価として求めた。

表1 設置条件表

クリーンケア社内	設置条件		設置期間										
	日光	雨	1w	10d	2w	3w	4w	5w	6w	7w	8w	-	
対照													21
ACT消石灰粉末	○	×					1	2	3	4	5		
ACT消石灰乳液							6	7	8	9	10		
消石灰粉末			11	12	13	14	15	22	23	24	25		
消石灰乳液			16	17	18	19	29	26	27	28	29		
ACT消石灰粉末	○	○*1			34								
ACT消石灰乳液					35	36	37						
消石灰粉末				30	31								
消石灰乳液				32	33								

*1：3日1度の頻度で降雨強度1mm相当の雨水を噴霧した。頻度は日本の年間降雨日数から算出し、降雨強度は降雨強度の年間分布からもっとも頻度の高い降雨強度より選択した。

表2 実地試験設置表

南部ファーム	設置条件		設置期間			
	日光	雨	25d	39d	52d	-
ACT消石灰乳液	○	○	-	39	40	
消石灰乳液			38	-	-	
ACT消石灰粉末	○	○	風で飛散し試験に必要なサンプルの回収が不能のため未実施			
消石灰粉末						
対照	-	-				41

IV. 試験結果

サンプル番号	ウイルス価	サンプル番号	ウイルス価
1	≦0.5 (検出限界以下)	30	3.5
2	≦0.5 (検出限界以下)	31	3.5
3	≦0.5 (検出限界以下)	32	3.5
4	≦0.5 (検出限界以下)	33	3.5
5	≦0.5 (検出限界以下)	34	≦0.5 (検出限界以下)
6	≦0.5 (検出限界以下)	35	≦0.5 (検出限界以下)
7	≦0.5 (検出限界以下)	36	3.3
8	≦0.5 (検出限界以下)	37	3.5
9	≦0.5 (検出限界以下)	38	3.5
10	≦0.5 (検出限界以下)	39	3.5
21	7	40	3.5
22	≦0.5 (検出限界以下)	41	7
23	≦0.5 (検出限界以下)		
24	≦0.5 (検出限界以下)		
25	≦0.5 (検出限界以下)		
26	≦0.5 (検出限界以下)		
27	≦0.5 (検出限界以下)		
28	≦0.5 (検出限界以下)		
29	≦0.5 (検出限界以下)		

V. 評価

ACT消石灰は、日光・雨・実地環境のいずれの設置条件下でも99.9%以上の鳥インフルエンザ不活化効果が認められた。

VI. 参考資料

VI.1. 試験サンプルのpH

サンプル番号	pH	サンプル番号	pH
1	12.5	22	12.5
2	12.5	23	12.5
3	12.5	24	12.5
4	12.5	25	12.5
5	12.5	26	12.5
6	12.5	27	12.5
7	12.5	28	12.5
8	12.5	29	12.5
9	12.5		
10	12.5		

試験：財団法人日本食品分析センター

pH					
サンプル番号	噴霧0回	噴霧2回	噴霧3回	噴霧4回	噴霧5回
33	12.41	11.3	10.2	10.0	9.9
35	12.41	12.0	10.8	10.2	10.1

試験：社内実施（堀場製作所AQUA）

VI.1. 実試験環境の降雨量と回収時pH

サンプル番号	経過日数	期間総降雨量	pH
未実施	10日	0mm	11.81
38	25日	115mm	10.82
39	39日	182mm	9.44
40	52日	208mm	9.40

試験：社内実施（堀場製作所AQUA）

VI.1.試験結果

クリーンケアACT消石灰の鳥インフルエンザウイルス不活化試験

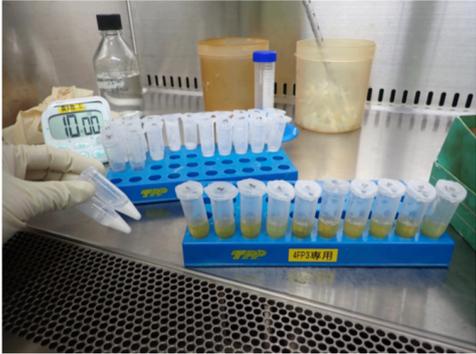
中間報告：6月22日分到着サンプルを用いた評価試験

その1：非検粉末0.3g + DW 0.5 ml + ウイルス液0.5mlの試験

その2：非検粉末0.3g + DW 8.5 ml + ウイルス液0.5mlの試験

最終報告：8月17日分到着サンプルを用いた評価試験

その3：非検粉末0.3g + DW 1.0 ml + ウイルス液0.5mlの試験



8月20日2024年

北海道大学
大学院獣医学研究院
微生物学教室 迫田義博

写真：試験その1の様子

その1：非検粉末0.3g + DW 0.5 ml + ウイルス液0.5mlの試験

背景
赤塗りのところが重要で最初に試験をお願いしたい箇所になります。
オレンジ色のところが赤背景の結果が期待通りにならなかった時に重要な箇所になります。
青背景のところは、赤背景の結果が期待通りだった時に可能であれば試験したいところになります。

サンプル符号	I	H	G	F	E	D	C	B	A
経過日数	1週間	10日	2週間	3週間	4週間	5週間	6週間	7週間	8週間
ACT消石灰粉末					①	②	③	④	⑤
ACT消石灰乳液					⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
消石灰粉末	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑲	⑳	㉑	㉒
消石灰乳液	⑰	⑱	㉒	㉓	㉔	㉕	㉖	㉗	㉘

㉑：消毒薬がない対照、PBSを0.3ml

【事前準備】①～㉑までについて：

- 0.3gを秤取りウイルスと反応させる、5mlエッペン 21本
- DW 0.5mlと事前混和、30分
- ウイルス液を0.5ml
- 反応時間 10分
- 1960 ulのウマ血清を準備しておき、そこに反応液40 ulを加える、5mlエッペン 21本
- 上記を遠心し、石灰を沈めた後に、2本に分注保存、1.5mlエッペン 2×21本
- 感染価測定のための 10⁻¹ ~ 10⁻⁷の希釈列、1.5mlエッペン 7×21本

その1：非検粉末0.3g + DW 0.5 ml + ウイルス液0.5mlの試験

ウイルス価		ウイルス価		ウイルス価	
# 1	≒0.5(検出限界以下)	# 11	≒0.5(検出限界以下)	# 21	7.0
# 2	≒0.5(検出限界以下)	# 12	≒0.5(検出限界以下)	# 22	≒0.5(検出限界以下)
# 3	≒0.5(検出限界以下)	# 13	≒0.5(検出限界以下)	# 23	≒0.5(検出限界以下)
# 4	≒0.5(検出限界以下)	# 14	≒0.5(検出限界以下)	# 24	≒0.5(検出限界以下)
# 5	≒0.5(検出限界以下)	# 15	≒0.5(検出限界以下)	# 25	≒0.5(検出限界以下)
# 6	≒0.5(検出限界以下)	# 16	≒0.5(検出限界以下)	# 26	≒0.5(検出限界以下)
# 7	≒0.5(検出限界以下)	# 17	≒0.5(検出限界以下)	# 27	≒0.5(検出限界以下)
# 8	≒0.5(検出限界以下)	# 18	≒0.5(検出限界以下)	# 28	≒0.5(検出限界以下)
# 9	≒0.5(検出限界以下)	# 19	≒0.5(検出限界以下)	# 29	≒0.5(検出限界以下)
# 10	≒0.5(検出限界以下)	# 20	≒0.5(検出限界以下)		

*表の数字の単位は \log_{10} TCID50/ ml

その2：非検粉末0.3g + DW 8.5 ml + ウイルス液0.5mlの試験

背景

赤塗りのところが重要で最初に試験をお願いしたい箇所になります。

オレンジ色のところが赤背景の結果が期待通りにならなかった時に重要な箇所になります。

青背景のところは、赤背景の結果が期待通りだった時に可能であれば試験したいところになります。

サンプル符号	I	H	G	F	E	D	C	B	A
経過日数	1週間	10日	2週間	3週間	4週間	5週間	6週間	7週間	8週間
ACT消石灰粉末					①	②	③	④	⑤
ACT消石灰乳液					⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
消石灰粉末	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑲	⑳	㉑	㉒
消石灰乳液	⑰	⑱	㉓	㉔	㉕	㉖	㉗	㉘	㉙

⑲：消毒薬がない対照、PBSを0.3ml

【事前準備】①～⑲までについて：

- 0.3gを秤取りウイルスと反応させる、15ml ファルコンチューブ 29本
- DW 8.5mlと事前混和、30分
- ウイルス液を0.5ml
- 反応時間 10分
- 900 ulのウマ血清を準備しておき、そこに反応液100 ulを加える、1.5mlエッペン 29本
- 上記を遠心し、石灰を沈めた後に、2本に分注保存、1.5mlエッペン 2x29本
- 感染価測定のための $10^{-1} \sim 10^{-7}$ の希釈列、1.5mlエッペン 7x29本

その2：非検粉末0.3g + DW 8.5 ml + ウイルス液0.5mlの試験

ウイルス価		ウイルス価		ウイルス価	
# 1		# 11	≦0.5(検出限界以下)	# 21	6.3
# 2		# 12		# 22	
# 3		# 13		# 23	
# 4		# 14		# 24	
# 5		# 15	≦0.5(検出限界以下)	# 25	≦0.5(検出限界以下)
# 6	≦0.5(検出限界以下)	# 16		# 26	
# 7		# 17		# 27	
# 8		# 18		# 28	
# 9		# 19	≦0.5(検出限界以下)	# 29	≦0.5(検出限界以下)
# 10	≦0.5(検出限界以下)	# 20	3.5		

*表の数字の単位は \log_{10} TCID₅₀/ ml

#21の対照サンプルが 試験その1 より低い理由は、加えたDWが8mlことが影響と考察される

その3：非検粉末0.3g + DW 1.0 ml + ウイルス液0.5mlの試験

ウイルス試験サンプル表

検体材料	水散布回数/散布方法A			
	3回	4回	6回	8回
消石灰粉末	①	○②		
消石灰乳	○③	○④		
ACT消石灰粉末		○⑤		
ACT消石灰乳		○⑥	○⑦	○⑧

検体材料	南部ファーム設置サンプル		
	25日経過	39日経過	52日経過
消石灰粉末	△⑨		
ACT消石灰乳		○⑩	○⑪

△：悪い場合はなしで大丈夫です。

⑫：消毒薬がない対照、PBSを0.3ml

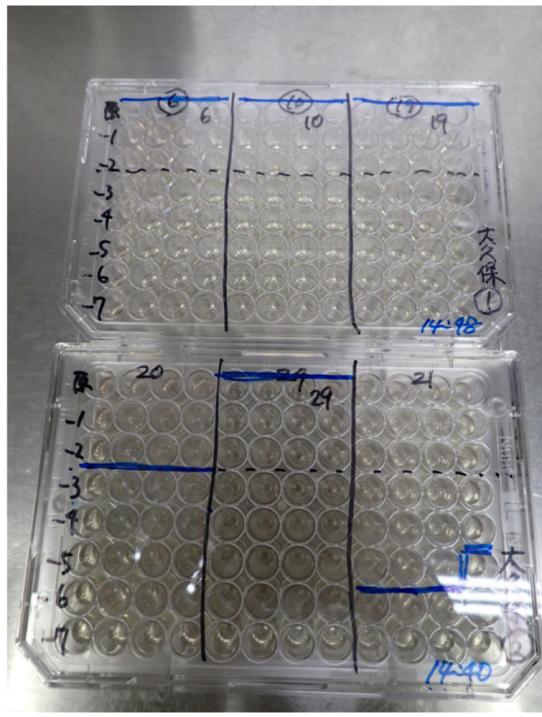
【事前準備】①～⑫までについて：

- 0.3gを秤取りウイルスと反応させる、5mlエッペン 12本
- DW 1.0 mlと事前混和、30分（サンプル⑨以降での膨張が著しかったので、1.0 mlの追加で実施）
- ウイルス液を0.5ml
- 反応時間 10分
- 1960 ulのウマ血清を準備しておき、そこに反応液40 ulを加える、5mlエッペン 12本
- 上記を遠心し、石灰を沈めた後に、2本に分注保存、1.5mlエッペン 2x12本
- 感染価測定のための 10⁻¹～10⁻⁷の希釈列、1.5mlエッペン 7x12本

その3：非検粉末0.3g + DW 1.0 ml + ウイルス液0.5mlの試験

ウイルス価		ウイルス価	
# 1	3.5	# 11	3.5
# 2	3.5	# 12	7.0
# 3	3.5		
# 4	3.5		
# 5	≦0.5(検出限界以下)		
# 6	≦0.5(検出限界以下)		
# 7	3.3		
# 8	3.5		
# 9	3.5		
# 10	3.5		

*表の数字の単位は \log_{10} TCID₅₀/ ml



実際の作業プレートの様子 (例)

サンプルは0.1ml接種なので
最終成績では10倍して数値を
出します。