



# 試験報告書

依頼者 有限会社 クリーンケア

一般財団法人  
日本食品分析センター  
東京都渋谷区元代々木町52番1号



検 体 嘔吐物処理剤(新ゲロブロック)含有ClO<sub>2</sub>発生剤

表 題 ウイルス不活化試験

2013年(平成25年)06月10日当センターに提出された上記検体について試験した結果をご報告いたします。

## ウイルス不活化試験

- 1 依頼者 株式会社 クリーンケア

2 検 体

嘔吐物処理剤（新グロブロック）含有ClO<sub>2</sub>発生剤

なお、依頼者から二酸化塩素濃度測定機器の提供を受けた。

3 試験目的

検体のネコカリシウイルスに対する不活化試験を行う。

4 試験概要

検体溶液にネコカリシウイルスのウイルス浮遊液を添加，混合し，作用液とした。室温で作用させ，3及び30分後に作用液のウイルス感染価を測定した。また，検体溶液を精製水で100倍に希釈したものについて二酸化塩素濃度を測定した。なお，あらかじめ予備試験を行い，ウイルス感染価の測定方法について検討した。

ネコカリシウイルスは，細胞培養が不可能なノロウイルスの代替ウイルスとして広く使用されている。

5 試験結果

1) 二酸化塩素濃度の測定

結果を表-1に示した。

表-1 検体\*の二酸化塩素濃度測定結果

二酸化塩素濃度

2.2 mg/L

試験方法:依頼者提供の二酸化塩素濃度測定機器を用いて測定した。

\* 精製水1 Lに検体1包を添加して調製した検体溶液を精製水で100倍に希釈したもの

2) 予備試験

細胞維持培地で作用液を100倍に希釈することにより、検体の影響を受けずにウイルス感染価が測定できることを確認した。

3) ウイルス感染価の測定

結果を表-2に示した。

表-2 作用液\*1のウイルス感染価測定結果

試験ウイルス	対象	log TCID <sub>50</sub> /mL*2		
		開始時	3分後	30分後
ネコカリシウイルス*3	検体*4	6.0	5.0	3.7
	対照	6.0	5.8	5.5

TCID<sub>50</sub>: median tissue culture infectious dose, 50 %組織培養感染量

開始時: 作用開始直後の対照のTCID<sub>50</sub>を測定し、開始時とした。

ウイルス浮遊液: 30 %牛血清アルブミン溶液で10倍に希釈したもの

対照: 精製水

作用温度: 室温

\*1 牛血清アルブミン5 %含有

\*2 作用液1 mL当たりのTCID<sub>50</sub>の対数値

\*3 ノロウイルスの代替ウイルス

\*4 精製水1 Lに検体1包を添加したもの

表2の例で検体開始時6.0とは、  
10の6乗=1000000を意味しています。  
検体3分後の値は10の5乗に、  
30分後、検体は10の3.7乗=5011を意味します。  
従って、ウイルスの不活化率は、  
(1000000-5011)/1000000=99.49%  
となります。  
この値は、同条件で試験した次亜塩素酸Na溶液  
1000ppmよりも高い不活化率です。

6 試験方法

1) 試験ウイルス

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

2) 使用細胞

CRFK細胞[大日本製薬株式会社]

3) 使用培地

① 細胞増殖培地

イーグルMEM培地「ニッスイ」①[日本製薬株式会社]に牛胎仔血清を10 %加えたものを使用した。

② 細胞維持培地

イーグルMEM培地「ニッスイ」①に牛胎仔血清を2 %加えたものを使用した。

#### 4) ウイルス浮遊液の調製

##### ① 細胞の培養

細胞増殖培地を用い、使用細胞を組織培養用フラスコ内に単層培養した。

##### ② ウイルスの接種

単層培養後にフラスコ内から細胞増殖培地を除き、試験ウイルスを接種した。次に、細胞維持培地を加えて37℃±1℃の炭酸ガスインキュベーター(CO<sub>2</sub>濃度:5%)内で1~5日間培養した。

##### ③ ウイルス浮遊液の調製

培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞の形態を観察し、細胞に形態変化(細胞変性効果)が起こっていることを確認した。次に、培養液を遠心分離(3000 r/min, 10分間)し、得られた上澄み液を30%牛血清アルブミン溶液で10倍に希釈し、ウイルス浮遊液とした。

#### 5) 試験操作

精製水1Lに検体1包を添加し、検体溶液を調製した。検体溶液4.9 mLに牛血清アルブミンの最終濃度が5%となるよう、ウイルス浮遊液1.1 mLを添加、混合し、作用液とした。室温で作用させ、3及び30分後に細胞維持培地を用いて100倍に希釈し、ウイルス感染価を測定した。

なお、精製水を対照として同様に試験し、開始時についても測定を行った。

\* 依頼者の指示により、平成20年度及び21年度ノロウイルスの不活化条件に関する調査報告書(国立医薬品食品衛生研究所)に記載された牛血清アルブミン濃度を選択した。

#### 6) ウイルス感染価の測定

細胞増殖培地を用い、使用細胞を組織培養用マイクロプレート(96穴)内で単層培養した後、細胞増殖培地を除き細胞維持培地を0.1 mLずつ加えた。次に、100倍希釈後の作用液及び対照を、細胞維持培地を用いて10倍段階希釈した。その希釈液0.1 mLを4穴ずつに接種し、37℃±1℃の炭酸ガスインキュベーター(CO<sub>2</sub>濃度:5%)内で4~7日間培養した。培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞の形態変化(細胞変性効果)の有無を観察し、Reed-Muench法により50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)を算出して作用液1 mL当たりのウイルス感染価に換算した。

以上