

株式会社 E プラン 殿

試験報告書

「スーパーアルカリイオン水 pH12.5」による
イヌパルボウイルス不活化試験

北環発 25_1036 号
平成 25 年 11 月 25 日

神奈川県相模原市南区北里 1 丁目 15 番 1 号
一般財団法人 北里環境科学センター
理事長 伊藤 俊洋



試験内容を公表する際は、結果の表記等について専門的な
立場から確認させていただいております。なお、確認目的
と申込様式は、ホームページに掲載しております。

(http://www.kitasato-e.or.jp/?page_id=87)

1. 目的

貴社ご提供試験品「スーパーアルカリイオン水 pH12.5」によるイヌパルボウイルスに対する不活化効果を調べた。

2. 依頼者

名称：株式会社 E プラン

所在地：〒273-0864 千葉県船橋市北本町 1-17-25 ベンチャープラザ船橋 108

3. 試験機関

名称：一般財団法人 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 1-15-1

担当：ウイルス部ウイルス課

4. 実施期間

平成 25 年 10 月 30 日～平成 25 年 11 月 8 日

5. 試験品および試験条件

1) 試験品

「スーパーアルカリイオン水 pH 12.5」

2) 作用時間

0 (初期)、0.5 分間、3 分間

6. 供試ウイルスとウイルス液の調製方法

イヌパルボウイルス (Canine parvovirus)

ウイルスをネコ腎臓細胞 (CRFK: Crandell-Reese feline 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 -30℃ の冷凍庫に凍結保存した。その後、凍結融解操作を行い、3,500 rpm 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を供試ウイルス液とした。

7. 試験方法

試験は、貴社担当者との打合せにより作成した仕様書に従って実施した。

1) ウイルス不活化試験

試験品 0.9 mL にウイルス液 0.1 mL を接種し、試験管ミキサーで穏やかに攪拌し

た後、室温で 0.5 分間、3 分間作用させた。所定時間作用後、0.1 mL 採取し、0.2M リン酸緩衝液 (pH7.0) で 10 倍に希釈して試験品の pH を中性に調整してウイルスに対する作用を停止させ、ウイルス感染価測定用の試料原液として用いた。なお、初期ウイルス感染価は、滅菌蒸留水にウイルス液を接種した後、直ちに採取したものを
用いた。

2) ウイルス感染価測定法

ウイルス感染価測定用試料原液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: phosphate buffered saline) で 10 倍段階希釈した後、感染価測定用試料原液または希釈ウイルス液 50 μ L と 5% FBS 添加 DMEM に懸濁した CRFK 細胞 50 μ L を、96 穴マイクロプレートに植え込んだ。その後、37℃の炭酸ガスふ卵器内で 7 日間培養を行った。イヌパルボウイルスの増殖は細胞変性効果による確認が困難なため、ブタ赤血球を用いた血球凝集法によりウイルスの増殖を確認した。以下に手順を示した。

ブタ保存血液 5 mL に生理食塩水 10 mL を加え、2,000 rpm、4℃、10 分間遠心し、赤血球を洗浄した。上清を除去し、生理食塩水 10 mL を加えて穏やかに攪拌し、2,000 rpm、4℃、10 分間遠心した。この操作を 2 回繰り返して洗浄ブタ血球を調製した。ブタ洗浄血球をペロナール緩衝生理食塩水に 0.8% になるよう加え、血球浮遊液を調製した。

丸底 96 ウェルプレートに、培養プレートと同じ配置で培養上清 50 μ L を移し、さらに、各ウェルにペロナール緩衝生理食塩水 50 μ L と 0.8% 血球浮遊液 50 μ L 加え、プレートミキサーで攪拌した後、4℃で 1 時間静置した。1 時間後、血球の凝集像を観察し、Reed-Muench 法で TCID₅₀/mL を求めた。

8. 試験結果

1) ウイルス不活化試験

試験結果を表-1 に示した。

感染価 2,900,000 TCID₅₀/mL のウイルス液を「対照 (蒸留水)」に接種後直ちに採取した場合の初期ウイルス感染価は、63,000 TCID₅₀/mL、3 分間作用後の感染価は 62,000 TCID₅₀/mL となり、感染価の変動はほとんど認められなかった。一方、「スーパーアルカリイオン水 pH12.5」をウイルスに 0.5 分間作用させた感染価は 72 TCID₅₀/mL、3 分間作用させた感染価は検出限界値 (63 TCID₅₀/mL) 以下となり、ウイルス感染価対数減少値は 3.0 log₁₀ 以上 (減少率 99.9% 以上) となった。

9. コメント

本試験では、貴社ご提供「スーパーアルカリイオン水 pH12.5」によるイヌパルボウイルス不活化効果を検討した。

抗菌試験においては、素材の抗菌効果の判定基準として抗菌活性値が 2.0 以上、消毒剤などの消毒効果の判定基準としては 4.0 以上を“効果あり”と規定している。

ウイルス試験では、所定作用時間経過後の対照との感染価対数減少値（LRV : log reduction value）の差を求めて不活化効果を判定している。ウイルス試験においては素材によるウイルス不活化効果の判定基準は定められていないが、抗菌試験の基準を適用した場合、作用 3 分後に 3.0 log₁₀ 以上の感染価減少値が認められ、ウイルス不活化効果“あり”と判定された。

以上

表-1 「スーパーアルカリイオン水 pH12.5」のウイルス不活化効果

試験品	作用時間			感染価の減少値		
	0 (初期)	0.5 分	3 分	初期値からの減少値 ^{※1}		3 分間作用後の 対照との差 ^{※2}
				0.5 分後	3 分後	
スーパーアルカリイオン水 pH 12.5		72	< 63	2.9 (99.87)	> 3.0 (> 99.9)	> 3.0 (> 99.9)
対照 (蒸留水)	63,000		62,000		0.0 (0.0)	

ウイルス感染価単位：TCID₅₀/mL

供試ウイルス感染価：2,900,000 TCID₅₀/mL

検出限界値：63 TCID₅₀/mL

感染価の減少値：

※1；初期値からの減少値

上段、LRV = \log_{10} (初期感染価 / 各作用時間後の感染価)

下段、減少率 = $(1 - 1/10^{\text{対数減少値}}) \times 100$ (%)

※2；3 分間作用後の対照との差

上段、LRV = \log_{10} (対照作用後の感染価 / 試験品作用後の感染価)

下段、減少率 = $(1 - 1/10^{\text{対数減少値}}) \times 100$ (%)

10. 作用停止液の有効性確認試験

1) 目的

試験品による供試ウイルスへの不活化作用を停止させる目的で使用する作用停止液の有効性を確認した。

2) 方法

作用停止液として 0.2M リン酸緩衝液 (pH7.0) を用いて、試験品を 10 倍希釈して、試験品の pH を中性に調整する方法を採用した。試験品 0.9 mL にウイルス液の代わりに、滅菌蒸留水 0.1 mL を添加した後、作用停止液で 10 倍に希釈した液を試験溶液とした。試験溶液 10 mL にウイルス液 0.1 mL を添加し、室温で 10 分間作用させた。この溶液をウイルス感染価測定用試料の原液としてウイルス感染価を測定した。作用停止液の有効性は、対照 (滅菌蒸留水) と比較して、感染価が $0.5 \log_{10}$ 以上減少しない場合を有効と判定した。

3) 結果

結果を表-2 に示した。

対照 (滅菌蒸留水) にウイルスを 10 分間作用させた場合、感染価は、63,000 TCID₅₀/mL であった。また、作用停止液で希釈した試験品にウイルスを作用させた場合の感染価は、1,100,000 TCID₅₀/mL となった。対照 (滅菌蒸留水) との感染価対数値の差は、 $0.0 \log_{10}$ となった。以上の結果から、作用停止液は試験に対して有効であると判定した。

表-2 作用停止液の確認

試験品	10 分作用後の感染価	感染価対数値の差	判定
スーパーアルカリオン水 pH12.5	1,100,000	-0.2	有効
対照 (滅菌蒸留水)	630,000		

ウイルス感染価単位：TCID₅₀/mL

参考データ

貴社ご提供「スーパーアルカリイオン水 pH12.5」の pH をガラス電極法 (pH メータ、HORIBA D-52) で測定した結果を以下に示した。

表-3 試験品の pH

試験品	pH	測定温度
スーパーアルカリイオン水 pH12.5	12.9	24.5℃