

令和3年4月19日

株式会社アクト

内海 洋様

次亜塩素酸水の新型コロナウイルス変異株に対する  
抗ウイルス効果の検証結果報告書

供試サンプル

- ・クリーン・リフレ (pH 約 5.9)
- ・クリーン・リフレ (pH 約 2.5)

国立大学法人帯広畜産大学

畜産学部 獣医学研究部門 小川 晴子

グローバルアグロメディシン研究センター 武田 洋平

## 材料

### ・ウイルス液

国立感染症研究所より供与を受けた新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の英国変異株 (hCoV-19/Japan/QHN001/2020 株)、ブラジル変異株 (hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 株)、南アフリカ変異株 (hCoV-19/Japan/TY8-612/2021 株) を用いた。なお実験には、SARS-CoV-2 を含むウイルス増殖培地 (VGM; 組成は下記参照、ただしチオ硫酸ナトリウムは不含) をウイルス液 (ウイルス力価: 約  $7.5 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml) として使用した。

### ・使用細胞、培地

国立感染症研究所にて樹立された VeroE6/TEMPRSS2 細胞を JCRB 細胞バンクを通じて入手し、実験に用いた(細胞番号: JCRB1819)。細胞増殖培地としては、10%牛胎仔血清、2 mM L-グルタミン、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  カナマイシン、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アムホテリシン B、および 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いた。VGM としては、1%牛胎仔血清、2 mM L-グルタミン、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  カナマイシン、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アムホテリシン B および 0.01 M チオ硫酸ナトリウム (遊離塩素の中和液) を添加した DMEM を用いた。

## 評価方法

評価試験直前に pH 約 5.9 のクリーン・リフレ および pH 約 2.5 のクリーン・リフレ原液の残留塩素濃度をハンディ水質計アクアブ AQ202 (SIBATA) により測定した。その後、両クリーン・リフレの残留塩素濃度が 45 ppm となる様に滅菌超純水 (UPW) を用いて希釈した。コントロールである UPW、および上記の様に作製した pH 約 5.9 のクリーン・リフレ (45 ppm) および pH 約 2.5 のクリーン・リフレ (45 ppm) の 3 種類の試験液を以下の SARS-CoV-2 不活化活性評価試験に供した。

各試験液と各変異株のウイルス液をスクリーキャップチューブ内で 19:1 または 49:1 の液量比で混合し、10 回以上ピペッティングを行った。それら混合液を 22°C で 20 秒間反応させた後、それら液のうちの 20  $\mu\text{L}$  をあらかじめ VeroE6/TMPRSS2 細胞を接種しておいた 96 well plate (VGM を 180  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加済みのもの) に添加した (各チューブから 2 well ずつへ)。その後 96 well plate 上で 10 倍階段希釈を行い、3 日間 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で細胞培養を行った。その後、顕微鏡でウイルス感染・増殖に起因する細胞変性効果を観察し、それをもとにベレンスケルバー法を用いてウイルス力価 (TCID<sub>50</sub>/mL) を算出した。UPW 群と各クリーン・リフレ群でウイルス力価を比較し、各試験液のウイルス不活化活性を評価した。なお本試験においては、再現性確認のため 1 群 4 本のチューブを用い実施した実験を 2 回繰り返した。なお、下記の結果の項には、2 回の実験を合わせた合計 8 本のチューブの結果を総合したデータを示した (n=8)。

## 結果

試験液:ウイルス液=19:1, 反応時間 20 秒

変異株→		英国変異株			ブラジル変異株			南アフリカ変異株		
試験液→		UPW	クリーン ・リフレ (pH 5.9)	クリーン ・リフレ (pH 2.5)	UPW	クリーン ・リフレ (pH 5.9)	クリーン ・リフレ (pH 2.5)	UPW	クリーン ・リフレ (pH 5.9)	クリーン ・リフレ (pH 2.5)
ウイルス力価 ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /mL)	平均値 ± 標準偏差	5.75 ± 0.38	≦1.50 ±0.38	≦1.25 ±0.00	6.00 ±0.54	≦1.81 ± 0.78	≦1.25 ±0.00	5.56 ±0.37	≦1.38 ±0.35	≦1.25 ±0.00
	UPW 群 との 平均値の差	-	≧4.25	≧4.50	-	≧4.19	≧4.75	-	≧4.19	≧4.31
ウイルス不活化率 (%)		-	≧99.994	≧99.997	-	≧99.994	≧99.998	-	≧99.994	≧99.995

試験液:ウイルス液=49:1, 反応時間 20 秒

変異株→		英国変異株			ブラジル変異株			南アフリカ変異株		
試験液→		UPW	クリーン ・リフレ (pH 5.9)	クリーン ・リフレ (pH 2.5)	UPW	クリーン ・リフレ (pH 5.9)	クリーン ・リフレ (pH 2.5)	UPW	クリーン ・リフレ (pH 5.9)	クリーン ・リフレ (pH 2.5)
ウイルス力価 ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /mL)	平均値 ± 標準偏差	5.43 ± 0.37	≦1.25 ±0.00	≦1.25 ±0.00	5.63 ±0.35	≦1.25 ± 0.00	≦1.25 ±0.00	5.25 ±0.38	≦1.25 ±0.00	≦1.25 ±0.00
	UPW 群 との 平均値の差	-	≧4.19	≧4.19	-	≧4.38	≧4.38	-	≧4.00	≧4.00
ウイルス不活化率 (%)		-	≧99.994	≧99.994	-	≧99.996	≧99.996	-	≧99.990	≧99.990

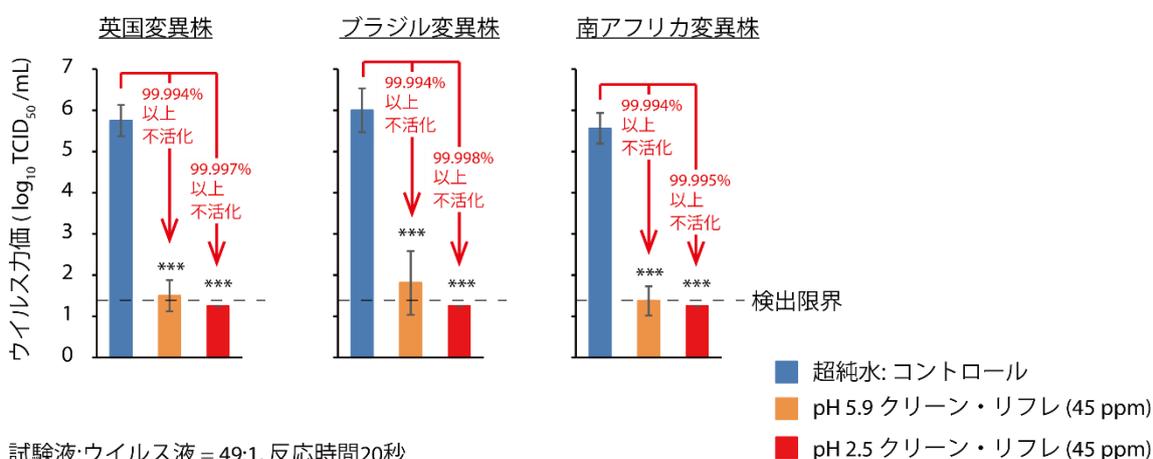
≦1.25 →検出限界以下

赤色ハイライト: 統計学的有意差が認められた群 [Student's *t* test (vs. UPW 群)]

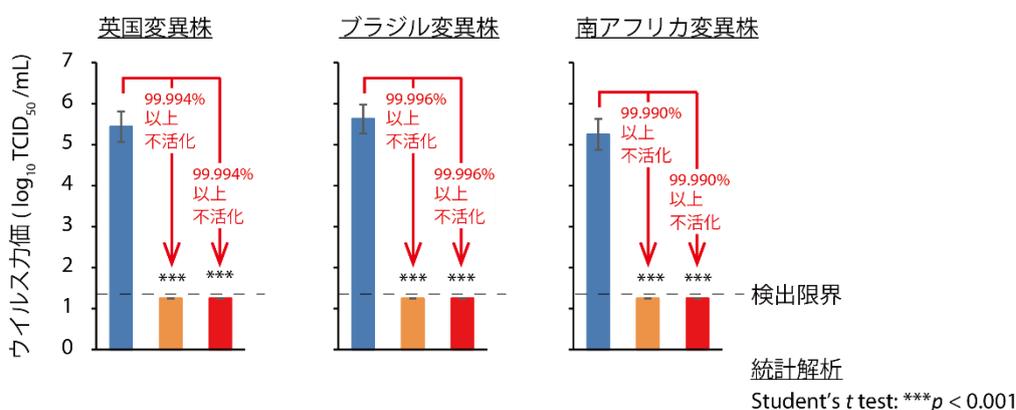
注)上記は1回目および2回目の実験を総合した結果。なお、1回目と2回目では同様の傾向の結果が得られており、再現性の確認が出来ている。

## 平均値のグラフ

試験液:ウイルス液 = 19:1, 反応時間20秒



試験液:ウイルス液 = 49:1, 反応時間20秒



## 結果まとめ

・各試験液とウイルス液を 19:1 で混合し 20 秒反応させた場合、pH 5.9 および 2.5 のクリーン・リフレ（残留塩素濃度 45 ppm）は 3 種の変異株全てを 99.99%以上不活化した。特に pH 2.5 のクリーン・リフレの活性は pH 5.9 のクリーン・リフレの活性より強く、pH 2.5 のクリーン・リフレ群におけるウイルス力価は完全に検出限界以下となっていた。

・各試験液とウイルス液を 49:1 で混合し 20 秒反応させた場合、pH 5.9 および 2.5 のクリーン・リフレ（残留塩素濃度 45 ppm）は 3 種の変異株全てを 99.99%以上不活化した。その際、pH 5.9 および 2.5 のクリーン・リフレ群ともにウイルス力価は完全に検出限界以下となっていた。