

ウイルス不活化試験

1. 検 体

空間衛生除菌水クリンメソッド(液体)

2. 試験目的

検体のウイルスに対する不活化試験を行う。

3. 試験概要

検体原液にインフルエンザウイルス又は単純ヘルペスウイルス浮遊液を添加、混合し、作用液とし、室温で作用させ、1 及び 5 分後に作用液のウイルス感染価を測定した。

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。

4. 試験結果

結果を表 - 1 に示した。

なお、細胞維持培地で作用液を 10 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予備試験により確認した。

表 - 1 ウイルス感染価測定結果

試験ウイルス	測定	対象	log TCID ₅₀ /ml *
インフルエンザ ウイルス	開始時	対照	6.5
	1 分後	検体	<1.5
	5 分後	検体 対照	<1.5 7.0
単純ヘルペス ウイルス	開始時	対照	5.0
	1 分後	検体	<1.5
	5 分後	検体 対照	<1.5 5.0

TCID₅₀ : median tissue culture infectious dose, 50%組織培養感染量

* 作用液 1 ml 当たりの TCID₅₀ の対数値

対照 : 精製水 、 保存温度 : 室温

5 試験方法

1) 試験ウイルス

インフルエンザウイルス A 型(H1N1)

Herpes simplex virus 1 ATCC VR-1493(単純ヘルペスウイルス)

2) 使用細胞

インフルエンザウイルス:

MDCK(NBL-2)細胞 ATCC CCL-34 株 [大日本製薬株式会社]

単純ヘルペスウイルス:

Hep-2 細胞 ATCC CCL-23 株 [大日本製薬株式会社]

3) 使用培地

① 細胞増殖培地

Eagle MEM(0.06 mg/ml カナマイシン含有)に新生コウシ血清を 10%加えたものを使用した。

② 細胞維持培地

MDCK 細胞 :	Eagle MEM	1,000 ml
	10% NaHCO ₃	12~22 ml
	L-グルタミン(30g/1)	9.8 ml
	100×MEM ビタミン液	30 ml
	10%アルブミン	20 ml
	0.25%トリプシン	20 ml

Hep-2 細胞 : 新生コウシ血清 2%添加 Eagle MEM

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、MDCK 又は Hep-2 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°C±1°Cの炭酸ガスインキュベータ(CO₂ 濃度: 5%)内で 2~7 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)が起っていることを確認した。次に、培養液を遠心分離(3,000r/min、10 分間)し、得られた上澄み液をウイルス浮遊液とした。

5) 試験操作

検体原液 0.9ml にウイルス浮遊液 0.1ml を添加し、作用液とした。室温で作用させ、1 及び 5 分後に細胞維持培地を用いて 10 倍に希釈した。

また、精製水を対照とし、開始時及び 5 分後について、同様に試験した。

6) ウイルス感染価の測定

細胞増殖培地を用い、MDCK 又は Hep-2 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 0.1ml ずつ加えた。次に、作用液の希釈液 0.1ml を 4 穴ずつに接種し、37°C±1°Cの炭酸ガスインキュベータ(CO₂ 濃度: 5%)内で 7~14 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(TCID₅₀) を算出して作用液 1ml 当たりのウイルス感染価に換算した。

以上

以上の分析データは(財)日本食品分析センターの試験報告書

〔第 205011994-001 号 2005 年(平成 17 年)04 月 18 日〕をもとに弊社で作成したものです。

平成 20 年 6 月 1 日

株式会社エム・アイ・シー
 東京都中央区日本橋人形町 2-2-6
 堀口第 2 ビル 7F
 TEL03-5623-2511 FAX03-5623-3077

殺菌効果試験

1. 検 体

- 1) 次亜塩素酸ソーダ(12%)
- 2) 空間衛生除菌水クリンメソッド 200ppm

2. 試験目的

検体の殺菌効果試験を行う。

3. 試験概要

精製水を用いて検体 1) の 0.17w/v%溶液及び検体 2) の 40w/v%溶液を調製し、試験液とした。試験液に枯草菌(芽胞)、大腸菌(O157:H7)、緑膿菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌及びメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(以下、「MRSA」という。)の菌液をそれぞれ添加、混合後、20°Cで作用させ、1、3及び5分間作用後に試験液の生菌数を測定した。

なお、あらかじめ予備試験を行い、生菌数の測定方法について検討した。

4. 試験結果

結果を表-1に示した。なお、試験液をSCDLP培地で10倍に希釈することにより、検体の影響を受けずに生菌数が測定できることを予備試験により確認した。

表-1 試験液の生菌数測定結果

試験菌	試験液	生菌数(/ml)			
		開始時*	1分後	3分後	5分後
枯草菌 (芽胞)	検体 1) 0.17w/v%溶液	2.8×10^6	2.6×10^6	2.5×10^6	2.3×10^6
	検体 2) 40w/v%溶液	2.8×10^6	2.4×10^6	2.4×10^5	8.7×10^2
	対照(精製水)	2.8×10^6	***	***	2.6×10^6
大腸菌 (O157:H7)	検体 1) 0.17w/v%溶液	1.8×10^6	<10	<10	<10
	検体 2) 40w/v%溶液	1.8×10^6	<10	<10	<10
	対照(精製水)	1.8×10^6	***	***	1.6×10^6
緑膿菌	検体 1) 0.17w/v%溶液	4.4×10^6	<10	<10	<10
	検体 2) 40w/v%溶液	4.4×10^6	<10	<10	<10
	対照(精製水)	4.4×10^6	***	***	2.9×10^6
サルモネラ	検体 1) 0.17w/v%溶液	2.9×10^6	<10	<10	<10
	検体 2) 40w/v%溶液	2.9×10^6	<10	<10	<10
	対照(精製水)	2.9×10^6	***	***	2.5×10^6
黄色ブドウ球菌	検体 1) 0.17w/v%溶液	3.9×10^6	<10	<10	<10
	検体 2) 40w/v%溶液	3.9×10^6	<10	<10	<10
	対照(精製水)	3.9×10^6	***	***	5.1×10^6
MRSA	検体 1) 0.17w/v%溶液	5.2×10^6	<10	<10	<10
	検体 2) 40w/v%溶液	5.2×10^6	<10	<10	<10
	対照(精製水)	5.2×10^6	***	***	5.4×10^6

作用温度：20°C

対照：精製水

<10：検出せず

***：実施せず、 * 菌液添加直後の対照の生菌数を測定し、開始時とした。

5. 試験方法

1) 試験菌

- ①Bacillus subtilis subsp. Subtilis NBRC 3134(枯葉菌)
- ②Escherichia coli ATCC 43895(大腸菌、血清型 O157:H7, ペロ毒素 I 及び II 型産生株)
- ③Pseudomonas aeruginosa NBRC 13275(緑膿菌)
- ④Salmonella enteritidis NBRC 3313(サルモネラ)
- ⑤Staphylococcus aureus subsp. Aureus IF0 12732(黄色ブドウ球菌)
- ⑥Staphylococcus aureus IID 1677(MRSA)

2) 試験用培地

- NA 培地：普通寒天培地 [栄研化学株式会社]
SCDLP 培地：SCDLP 培地 [日本製薬株式会社]
SCDLP A 培地：SCDLP 寒天培地 [日本製薬株式会社]

3) 菌液の調製

a) 試験菌①

NA 培地で $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、7 日間培養した試験菌の菌体を精製水に懸濁させ、 $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、20 分間加熱し、栄養細胞を死滅させた。懸濁液を遠心分離して上澄み液を除いた後、菌体を再度精製水に懸濁させ、1ml 当たりの菌数が約 108 となるように調製し、菌液(芽胞液)とした。

b) 試験菌②～⑥

試験菌を NA 培地で $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、16～20 時間培養後、得られた菌体を精製水に懸濁させ、1ml 当たりの菌数が約 108 となるように調製し、菌液とした。

4) 試験操作

精製水を用いて検体 1) の 0.17w/v%溶液及び検体 2) の 40w/v%溶液を調製し、試験液とした。試験液 10ml に菌液 0.1ml を添加、混合後、 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ で作用させ、1, 3 及び 5 分間作用後に SCDLP 培地を用いて直ちに 10 倍に希釈した。この希釈液の生菌数を、SCDLP A 培地を用いた混積平板培養法($35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、2 日間培養)により測定し、試験液 1ml 当たりに換算した。また、精製水を対照の試験液とし、菌液添加直後及び 5 分後に生菌数を測定した。

以上

以上の分析データは(財)日本食品分析センターの試験報告書

[第 104091757-001 号 2004 年(平成 16 年)09 月 28 日] をもとに弊社で作成したものです。

平成 20 年 6 月 1 日

株式会社エム・アイ・シー
東京都中央区日本橋人形町 2-2-6
堀口第 2 ビル 7F
TEL03-5623-2511 FAX03-5623-3077