

日本ビテイリース 株式会社 殿

## 試験報告書

オゾンナノバブル水によるウイルス不活化試験

(アデノウイルス)

北環発 2020\_0135 号

2020年6月30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 山田 陽城

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

1. 表題

オゾンナノバブル水によるウイルス不活化試験 (アデノウイルス)

2. 試験番号

依頼書番号 : 20207028 号

報告書番号 : 北環発 2020\_0135 号

3. 目的

貴社ご提供、オゾンナノバブル水によるアデノウイルスに対する不活化効果を評価した。

4. 依頼者

名 称 : 日本ビテイリース株式会社

所在地 : 〒418-0111 静岡県富士宮市山宮 860-9

5. 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

6. 試験期間

2020年4月7日～2020年4月15日

7. 試験品

NANO OZONE ナノオゾン 0.9 20190320 常温 (以下、NANO OZONE と記載した)

8. 試験条件

作用時間 : 対照 ; 0 秒間 (初期)、60 秒間

NANO OZONE ; 15 秒間、60 秒間

9. 供試ウイルス

アデノウイルス (Human adenovirus 3, GB, ATCC VR-3)

10. 感染価測定用細胞

ヒト肺がん由来細胞 (A549)

## 11. 主な試薬および使用培地

### 1) 培地

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM、シグマアルドリッチ)

### 2) 試薬

- ① Dulbecco's PBS (-) "Nissui" (PBS : Phosphate buffered saline、日水製薬)
- ② チオ硫酸ナトリウム (富士フイルム和光純薬)

### 3) 主な使用機材

- ① マイクロピペット 200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L (ギルソン)
- ② 電動 8 連マルチチャンネルピペット (10 ~ 300  $\mu$ L、ザルトリウス)
- ③ 電動 8 連マルチチャンネルピペット (50 ~ 1200  $\mu$ L、ザルトリウス)
- ④ 安全キャビネット (BHC-1902 IIB、エアータック)
- ⑤ CO<sub>2</sub> インキュベータ (MCO-20AIC、三洋)

## 12. 試験方法

### 1) ウイルス液の調製方法

ウイルスを A549 細胞に感染させ、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、細胞と培養液を回収し、-30℃ に凍結保存した。その後、凍結融解操作を行い、3,000 × *g* で 10 分間遠心した上清を限外ろ過膜および超遠心分離法にてウイルスを濃縮調製し、これを保存ウイルス液として -80℃ に保存した。試験には、保存ウイルス液を PBS で 10 倍に希釈したウイルス液を用いた。

### 2) ウイルス不活化試験

ウイルスの不活化効果試験は以下の手順により行った。

試験管内に試験品 9.9 mL を入れ、試験ウイルス液 0.1 mL を加えた後、試験管ミキサーでゆるやかに混合して、室温で所定の時間作用させた。所定時間作用後、作用液から 1 mL 採取し、1/10 容量の 0.5% チオ硫酸ナトリウム加 PBS を入れた試験管に加え、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試料とした。なお、作用時間 0 (初期) には PBS を用いた。なお、作用停止の有効性は別途試験で確認した。手順と結果を 15 項に示した。

### 3) ウイルス感染価の測定

ウイルス感染価測定用試料の原液を PBS で 10 倍段階希釈した後、感染価測定用試料の原液あるいは希釈した液 50  $\mu$ L と 5 % FBS 加 DMEM に  $8 \times 10^4$  cells/mL の細胞濃度に調製した A549 細胞の懸濁液 50  $\mu$ L を 96 ウエルプレー

トに植え込み、37°Cの CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 3 日間培養した。3 日間培養後、培養上清を除き、新しい 0.2 % FBS 加 DMEM を 0.1 mL 加えさらに 3 日間培養した。培養後、倒立顕微鏡下でウイルスの増殖により形成された CPE を観察し Reed-Muench 法を用いてウイルス感染価を算出した。

試験品の作用停止後の溶液が感染価測定用細胞に対し毒性を示す場合、感染価の測定が困難になるため、毒性確認を行った。試験品の作用停止後の細胞毒性確認試験手順と結果を 16 項に示した。

#### 4) ウイルス感染価対数減少値の算出

対照の初期感染価と試験品作用後の感染価から、下記式を用いて感染価対数減少値 (=LRV ; log reduction value) を算出した。なお、LRV は小数点以下 1 桁 (切り捨て) で表記した。不活化試験の結果、LRV が 4.0 以上のとき、ウイルス不活化効果ありと判定した。

計算式

$$\text{LRV} = \log_{10} (\text{対照の初期感染価} \div \text{試験品作用後の感染価})$$

### 13. 試験結果

試験の結果を表-1 に示した。ウイルス不活化試験の試験結果は、ウイルス感染価測定用試料 1 mL あたりのウイルス感染価および、初期感染価と試験品作用後の感染価対数値の差から求めた LRV を記載した。

初期および 60 秒間作用後のウイルスの感染価は順に、 $1.4 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL および  $8.4 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL であり感染価の大きな変動は認められなかった。一方、「NANO OZONE」にウイルスを 15 秒間および 60 秒間作用させたところ、ウイルス感染価は、それぞれ、 $4.7 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL および  $6.3 \times 10^1$  TCID<sub>50</sub>/mL となった。作用後の LRV を求めるとそれぞれ、4.4 および 5.3 となり、不活化効果ありと判定された。

### 14. コメント

本試験では貴社ご提供の「NANO OZONE」によるアデノウイルスに対する不活化効果を検討した。消毒薬などの欧州標準試験法である EN 14476:2013+A1:2015 (Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area. Test method and requirements (Phase 2/Step 1)) による消毒効果の判定基準は、初期感染価から 4.0 以上の LRV をもって不活化効果ありと判定している。本試験においては、LRV が 4 以上となりウイルス不活化効果ありと判定された。一般的に消毒効果は環境中に存在する有機物により影響を受けることが報告されており<sup>1,2)</sup>、不活化効果の認められた試験品を用いる際

にも用法や用量などを考慮することが重要であることが考えられる。

参考文献

- 1) E.Duizer *et al.*, Inactivation of caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol* 4538-4543: 2004.
- 2) 尾家重治 監修, 第五版 消毒剤マニュアルー消毒剤の特徴・使用法・使用上の留意点一、健栄製薬株式会社、2012

以上

表-1 試験品によるアデノウイルスに対する不活化効果

試験品	作用時間			感染価対数減少値 <sup>a)</sup>	
	0 (初期)	15秒間	60秒間	15秒後	60秒後
対照 (PBS)	$1.4 \times 10^7$	—	$8.4 \times 10^6$	—	0.2
NANO OZONE ナノオゾン 0.9 20190320 常温	—	$4.7 \times 10^2$	$6.3 \times 10^1$	4.4	5.3

感染価単位：TCID<sub>50</sub>/mL

検出限界値：6.3 TCID<sub>50</sub>/mL

a) 感染価対数減少値：log<sub>10</sub> (初期感染価 / 所定時間作用後の感染価)

## 15. 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の不活化効果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

試験品のウイルスに対する作用停止として 0.5 % チオ硫酸ナトリウム加 PBS を作用液の 1/10 量添加する方法を採用した。試験品 9.9 mL にウイルス液の代わりに、PBS 0.1 mL を加えたのち、作用停止液を 1/10 量加えた液を「試験試料」とした。試験試料 0.9 mL にウイルス液 0.1 mL を接種し室温で 20 分間作用させた。この溶液を原液とし、ウイルス感染価を測定した。作用停止液の有効性は、対照 (PBS) 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。「作用停止有効性の試験試料」にウイルスを作用させた時の感染価を、「対照 (PBS)」と比較した場合、判定基準内であった。以上の結果から、作用停止液は試験品に対して有効であると判定した。

表-2 作用停止液の有効性確認

試験試料 <sup>a)</sup>	感染価	感染価の差 <sup>b)</sup>	作用停止の有効性 <sup>c)</sup>
対照 (PBS)	$2.9 \times 10^4$	—	—
NANO OZONE ナノオゾン 0.9 20190320 常温	$4.7 \times 10^4$	-0.2	有効

感染価単位 : TCID<sub>50</sub>/mL

a) 試験品 9.9 mL に PBS 0.1 mL を加えたのち、作用停止液を 1/10 量加えた液

b)  $\log_{10}$  (対照の感染価 / 試験試料の感染価)

c) 対照に対し、 $0.5 \log_{10}$  以上減少していない場合を有効と判定した

## 16. 細胞毒性確認試験

## 1) 目的

試験品が供試ウイルスを培養する細胞に対して細胞毒性を示す場合、ウイルス感染価の測定が困難になるため、作用停止後の試験品を用いて A549 細胞に対する毒性を確認し、本試験における検出限界値を調べた。

## 2) 方法

試験品 9.9 mL に、PBS 0.1 mL を加えたのち、作用停止液を 1/10 量加えた液を「細胞毒性確認用試料の原液」とした。この液を、A549 細胞懸濁液とともにマイクロウェルプレートに播種し培養した。培養後、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、各ウェルの染色の度合いにより細胞毒性を確認した。細胞毒性は、PBS を加えて培養したものを生細胞率 100 % とし、細胞毒性確認用試料を添加した細胞の生細胞率を求め、生細胞率が 50 % 未満となった場合、細胞毒性“あり”と判定した。

## 3) 結果

試験結果を表-3 に示した。今回の試験では、細胞毒性確認用試料の原液で細胞毒性が認められなかった。従って、本試験における検出限界値は  $1.3 \times 10^1$  TCID<sub>50</sub>/mL となった。

表-3 試験品の A549 細胞に対する毒性

細胞毒性確認用試料 <sup>a)</sup>	生細胞率 (平均値 ± 標準偏差) <sup>b)</sup>		細胞毒性 の判定 <sup>c)</sup>
	原液	10 倍希釈液	
NANO OZONE ナノオゾン 0.9 20190320 常温	80 ± 5	83 ± 3	毒性なし

a) 試験品 9.9 mL に、PBS 0.1 mL を加えたのち、作用停止液を 1/10 量加えた液

b) 4 ウェルの平均値と標準偏差を示した

c) 生細胞率が 50% 未満を細胞毒性“あり”と判定した