

微酸性次亜塩素酸水及び強酸性次亜塩素酸水の PED ウイルスに対する不活化効果試験

目的

微酸性次亜塩素酸水及び強酸性次亜塩素酸水と PED (Porcine Epidemic Diarrhea; 豚流行性下痢症) ウイルスを反応させたときのウイルス不活化効果を確認するために実施した。

試験機関、試験番号及び試験期間

株式会社食環境衛生研究所 (試験機関)、14060500 (試験番号)、2014 年 6 月 12 日～7 月 17 日 (試験期間)

材料と方法

1. 次亜塩素酸水

- 1) 生成装置：森永エンジニアリング社製 Mp-240 (微酸性次亜塩素酸水)、アマノ社製 α -Light (強酸性次亜塩素酸水)
- 2) pH：pH6.1 (微酸性次亜塩素酸水)、pH2.6 (強酸性次亜塩素酸水)
- 3) 有効塩素濃度：10 および 30ppm (微酸性次亜塩素酸水)、20 および 40ppm (強酸性次亜塩素酸水) に調整。

2. 供試微生物

- 1) PED ウイルス：Porcine Epidemic Diarrhea virus
- 2) 培養細胞：Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来株化細胞)

3. 試験方法

「ウイルス実験学 総論 改訂二版 (丸善株式会社)」のウイルス中和試験法を参考として実施した。

1) 区の設定

試験区：試験資材各 1mL にウイルス液 0.1mL 添加。感作時間は試験開始後 0 分、5 分とした。

対照区：リン酸緩衝液各 1mL にウイルス液 0.1mL 添加。感作時間は試験開始後 0 分、5 分とした。

2) 試験手順

① 予備試験

試験に先立って、試験資材が培養細胞に与える影響 (細胞毒性) を調査した。

試験資材 (微酸性次亜塩素酸水 30ppm 及び強酸性次亜塩素酸水 40ppm) をリン酸緩衝液で 10 倍段階希釈した後、培養細胞に接種し、培養後の細胞の正常な状態を示す最高濃度を確認し、試験に使用するウイルス濃度を決定した。

その結果、細胞毒性について、Vero 細胞において、希釈なしの原液を用いても細胞の発育不良は認められなかった。このため、試験に際しては、原液からの試験実施が可能と判断され、ウイルス添加濃度は 10^5 TCID₅₀/mL 以上とした。

② 本試験・試験液混合

試験区分に従い、試験資材及びリン酸緩衝液の各 1mL をそれぞれ分取し、予備試験で決定した濃度にウイルス液を添加した。

ウイルス液添加後、混合液として室温 (25℃) にて所定の時間静置した。

③ 本試験・細胞接種及び菌数測定

試験区分ごとに感作が終了した混合液をそれぞれ 10 倍段階希釈し、96 well プレートに培養した細胞に 100 μ L ずつ接種した。

判定は、37℃、炭酸ガス培養 (5%) で 5 日間培養した後、培養細胞を顕微鏡観察し、培養細胞に現れる CPE (細胞変性) をもってウイルス増殖の有無を確認し、その濃度を算出した。

結果

PED ウイルスに対する試験結果を表 1 及び図 1 に示した。試験に使用したウイルス濃度は $10^{6.3}$ TCID₅₀/mL であった。対照区では試験開始後から、試験開始後 5 分までの間にウイルス量の変化は見られなかった ($10^{6.3}$ TCID₅₀/mL) が、試験区ではいずれの次亜塩素酸水の試験濃度でも開始後 5 分で $10^{1.5}$ 未満 TCID₅₀/mL (99.9%以上減少) となった。

表 1. PED ウイルス試験結果 (TCID₅₀/mL)

区	試験開始時	開始後 5 分
対照区 PBS		$10^{5.3}$ (199526)
試験区① 微酸性次亜塩素酸水 有効塩素 10ppm		不検出 ($< 10^{1.5}$) (検出限界(31)未満)
試験区② 微酸性次亜塩素酸水 有効塩素 30ppm	$10^{5.3}$ (199526)	不検出 ($< 10^{1.5}$) (検出限界(31)未満)
試験区③ 強酸性次亜塩素酸水 有効塩素 20ppm		不検出 ($< 10^{1.5}$) (検出限界(31)未満)
試験区④ 強酸性次亜塩素酸水 有効塩素 40ppm		不検出 ($< 10^{1.5}$) (検出限界(31)未満)

試験使用ウイルス濃度: $10^{6.3}$ TCID₅₀/mL

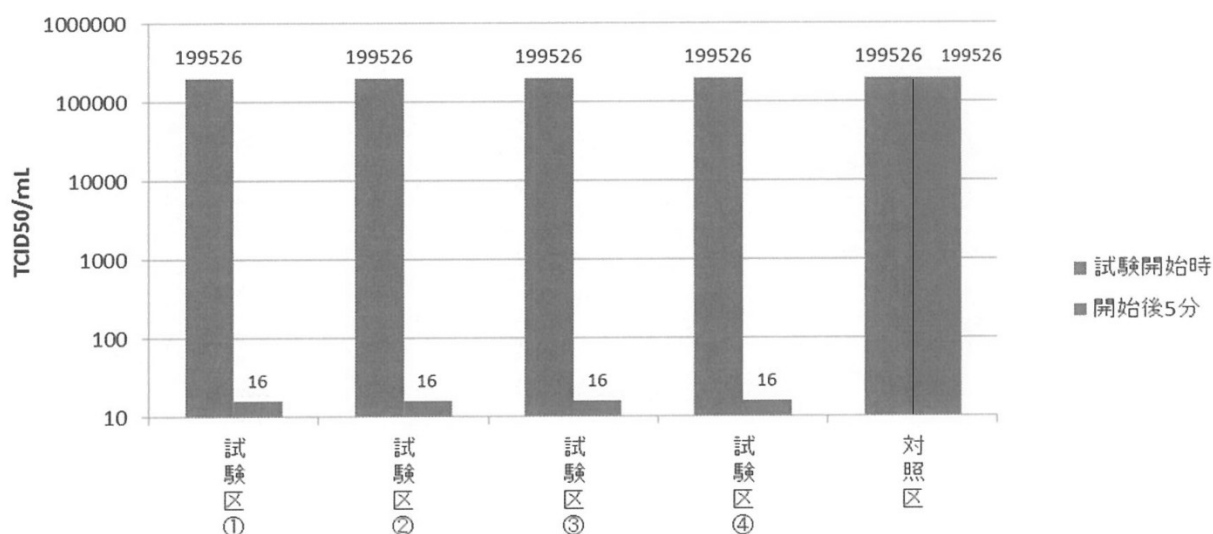


図 1. PED ウイルス試験結果

*検出限界未満は「16」と表示した。

考察

微酸性次亜塩素酸水 (10ppm、30ppm) 及び強酸性次亜塩素酸水 (20ppm、40ppm) について、PED ウイルスに対する不活化効果確認試験を実施した。

その結果、PED ウイルスに対して 5 分以上反応させることで微酸性次亜塩素酸水の (10ppm、30ppm) 及び強酸性次亜塩素酸水 (20ppm、40ppm) のいずれもウイルスが検出されなくなり、99.9%以上の不活化効果があることが判明した。

以上の結果から、微酸性次亜塩素酸水 (10ppm、30ppm) 及び強酸性次亜塩素酸水 (20ppm、40ppm) は PED ウイルスに顕著な不活化効果が確認された。

Examination of slightly acidic and strongly acidic hypochlorous acid waters for their inactivating effect on PED (porcine epidemic diarrhea) virus

Functional Water Foundation

Both slightly acidic and strongly acidic hypochlorous acid waters with available chlorine levels ranging 10 to 40 ppm were demonstrated that they showed high inactivating activities *in vitro* against PED virus.

(文責 堀田国元)