エタン酸配合安定化二酸化塩素（液体）を用いた、PED ウイルス（豚感染コロナウイルス）不活化試験

—試験報告書—

試験番号：207197N

株式会社　食環境衛生研究所

〒379-2107

群馬県前橋市荒口町 561-21

Tel027-230-3411

Fax027-230-3412

1. 表題

エタン酸配合安定化二酸化塩素（液体）を用いた、PED ウイルス（豚感染コロナウイルス）不活化試験

2. 試験番号

No.207197N

3. 目的

資材と豚コロナウイルス（PEDV）を反応させた時のウイルス不活化効果を確認するために実施した。

4. 試験管理組織

試験依頼者の名称、所在地及び担当者氏名

名称　　株式会社クボ

所在地　〒320-0861　栃木県宇都宮市西 1-1-2

担当者　安木　亮善

　　仲田　真梨子

実施機関の名称、所在地及びその長の氏名

名称　　株式会社　食環境衛生研究所

所在地　群馬県前橋市荒口町 561-21

氏名　　代表取締役　久保　一弘

試験実施責任者の氏名

松本　彰平

試験担当者の氏名

近藤　実紀

5. 試験スケジュール

試験受託日　2020 年 6 月 11 日

試験開始日　2020 年 8 月 10 日

試験終了日　2020 年 9 月 16 日

6. 試験資材

エタン酸配合安定化二酸化塩素（液体）　5000ppm

※試験資材は原液で使用した。また、対照資材として滅菌リン酸緩衝液を使用した。

7. 供試微生物

PED ウイルス：Porcine epidemic diarrhea virus　P-5V 株

※豚感染性のコロナウイルス

培養細胞：vero 細胞（アフリカミドリザルの腎臓上皮由来株化細胞）

8. 区の設定

区	処置	感作時間
試験区	試験資材 1mL にウイルス液 0.1mL 添加	試験開始後 45 秒、10 分
対照区	リン酸緩衝液 1mL にウイルス液 0.1mL 添加	試験開始後 0 分、45 秒、10 分

9. 試験方法

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

10. 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、試験資材 100 倍液において細胞の発育不良が確認された。このため、試験に際しては、試験資材とウイルス液の混合液を 100 倍以上希釈した後細胞に接種する必要があると判明した。また、ウイルス添加濃度は 10^6 $TCID_{50}$/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、96well プレー

トに培養した細胞に 100μL 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、ウイルス感染価（TCID50/mL）を算出した。

11. 結果

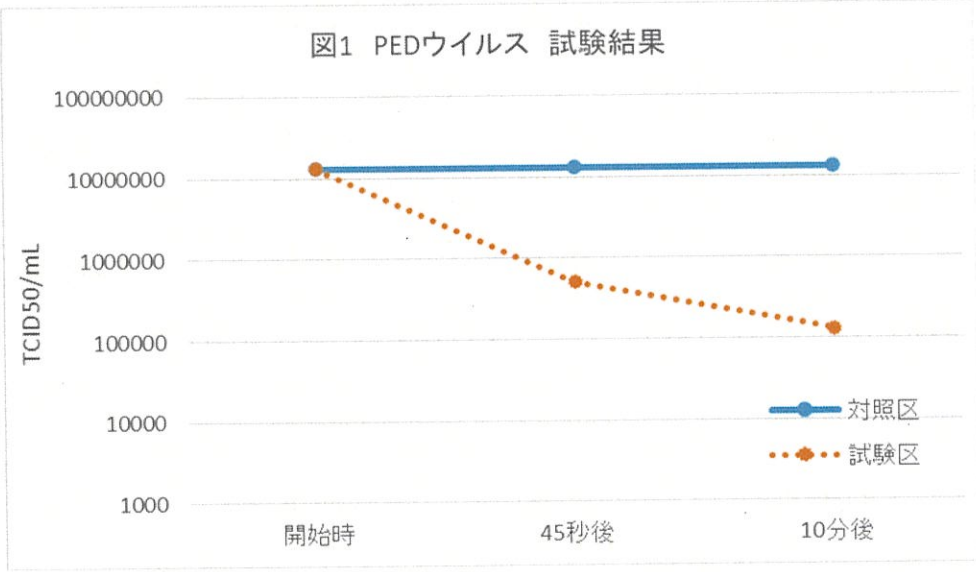
ウイルスに対する試験結果を表 1 及び図 1 に示した。

対照区では試験開始後から、試験開始後 10 分までの間にウイルス感染価の変化は見られなかった($10^{7.1}$TCID$_{50}$/mL)。

試験区では開始後 45 秒で $10^{5.7}$ TCID$_{50}$/mL(96.15%減少)、10 分で $10^{5.1}$ TCID$_{50}$/mL (99.00%減少) となった。

表 2　PED ウイルス試験結果(TCID$_{50}$/mL)

区	試験開始時	開始後 45 秒	開始後 10 分
対照区	$10^{7.1}$	$10^{7.1}$ (13000000)	$10^{7.1}$ (13000000)
試験区		$10^{5.7}$ (500000)	$10^{5.1}$ (130000)



12. 考察

今回、試験資材のPEDウイルス（豚感染コロナウイルス）に対する不活化効果試験を実施した。

その結果、試験資材とウイルスを45秒間接触することで96.15%、10分接触することで99.00%のウイルス感染価の減少が確認された。

以上の結果から、試験資材のPEDウイルスに対する不活化効果が確認された。