

試験報告書

MC ウォーターの不活化効果試験

(試験番号：16-104)

一般財団法人生物科学安全研究所

試験の表題

MC ウォーターの不活化効果試験
(試験番号：16-104)

試験委託者

名 称：株式会社 Santa Mineral
所 在 地：〒105-0013 東京都港区浜松町 2-6-4-1401
委託責任者：代表取締役 太西 るみ子
委託担当者：阿部 麻美衣

試験実施施設

名 称：一般財団法人生物科学安全研究所
所 在 地：〒252-0132 神奈川県相模原市緑区橋本台 3-7-11
代 表 者：理事長 濱岡 隆文
試験責任者：事業部 中島 隆二

試験実施期間

2016 年 12 月 6 日～2017 年 1 月 30 日

試験責任者の署名

一般財団法人生物科学安全研究所

中島 隆二  2017 年 1 月 30 日

1. 試験の目的

MC ウォーターのインフルエンザウイルス、大腸菌及び黄色ブドウ球菌に対する不活化効果を調べる目的で実施した。

2. 試験材料

1) 試験品

名 称：MC ウォーター (pH12 以上)

調製年月日：2016 年 12 月 15 日

2) 参照品

名 称：ウエルパス手指消毒液 0.2% (丸石製薬株式会社)

組 成：ベンザルコニウム塩化物 0.2 w/v%

ロ ッ ト：6X041

使用期限：2019.10

3) 供試ウイルス

・インフルエンザウイルス (IFV) A/Aichi/2/68 株 (亜型：H3N2)

由 来：北海道大学 大学院獣医学研究科・獣医学部 微生物学教室から分与を受け、当研究所にて SPF 発育鶏卵及び犬腎継代細胞 (MDCK 細胞) を用いて継代・増殖させたもの。

ウイルス含有量： $10^{8.50}$ TCID₅₀/mL

保存条件：-70℃以下

4) 供試菌

・大腸菌 *Escherichia coli* (ATCC25922)

由 来：ATCC より購入。

保存条件：-70℃以下

・黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC6538P)

由 来：ATCC より購入。

保存条件：-70℃以下

5) 供試細胞

犬腎継代細胞 (MDCK 細胞)

由 来：農林水産省動物医薬品検査所から分与を受け、試験実施施設にて継代培養しているもの。IFV のウイルス含有量測定に使用した。

3. 試験方法

1) 試験品及び参照品の調製

試験委託者が弊所施設に MC ウォーター製造装置を持ち込み、試験品を調製

した。具体的には市販のミネラルウォーターを本製造装置に通したものを試験品とした。また、使用直前に pH メーターを用いて、pH が 12 以上になっていることを確認し、調製後 30 分以内に試験に使用した。

参照品は原液を試験に使用した。

2) インフルエンザウイルス (IFV) 不活化試験

(1) MDCK 細胞の調製

細胞培養フラスコに単層を形成した MDCK 細胞をトリプシン処理し、細胞増殖用培養液 [付記 1] に 5 倍希釈で浮遊させた。これを 24 ウェルプレート of 各ウェルに 0.5 mL ずつ播きこみ、37℃, 5%炭酸ガス孵卵器で 2 日間培養し、単層形成した MDCK 細胞を試験に使用した。

(2) 供試 IFV 液の調製

IFV を希釈液 [付記 2] で 10 倍希釈したものを供試 IFV 液とした。

(3) IFV の感作

試験品又は参照品 9.9 mL に供試 IFV 液を 0.1 mL 加え、室温で 15 秒間、30 秒間、1 分間、5 分間、15 分間、30 分間及び 60 分間感作させたものを試験試料又は参照試料とした。試験品又は参照品の代わりに滅菌 MilliQ 水に供試 IFV 液を加えたものを対照試料とした。

(4) ウイルス含有量の測定

感作終了後、直ちに試験試料、参照試料及び対照試料を希釈液で 10 倍階段希釈した。24 ウェルプレートに単層形成した MDCK 細胞の表面をウイルス増殖用培養液 [付記 3] で 1 回洗浄し、ウイルス増殖用培養液を 0.5 mL 入れた後、各希釈段階の試料を 1 ウェル当たり 0.1 mL、1 希釈当たり 4 ウェルに接種し、37℃, 5%炭酸ガス孵卵器で 7 日間培養した。培養最終日に各ウェルから培養上清を 0.05 mL 採取し、96 ウェル U 底プレートに移した。これに 0.5% モルモット赤血球浮遊液 [付記 8] を 0.05 mL 加え、室温で 2 時間静置し、赤血球凝集 (HA) の有無を観察した。HA が認められた培養液をウイルス陽性とみなし、ベーレンス・ケルバー法にてウイルス含有量を算出した。

(5) Log Reduction Value の算出

各感作時間における試験試料又は参照試料及び対照試料のウイルス含有量から、次式により LRV (Log Reduction Value) を算出した。

$$LRV = \log_{10} A - \log_{10} B$$

A : 対照試料のウイルス含有量

B : 試験試料又は参照試料のウイルス含有量

(6) 効果の判定

試験品における LRV が 2 以上、すなわち、スパイクしたウイルスの 99% 以上が不活化された場合、試験品はインフルエンザウイルスに対し、不活化効果を有すると判断した。

(7) 試験の繰り返し

試験は繰り返し 3 回実施した。

3) 大腸菌不活化試験

(1) 供試菌液の調製

ミュラーヒントン寒天培地（以下、平板培地とする）に純培養した大腸菌の単一コロニーから釣菌し、ミュラーヒントン液体培地（以下、液体培地とする）で 37℃、18～24 時間好気培養した後、9,800×g で 20 分間遠心分離した。沈渣（菌体）を滅菌生理食塩液で洗浄して再度遠心分離を行い、滅菌生理食塩液に浮遊させた。試験菌液は $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL 程度の菌数になるよう調製した。

(2) 大腸菌の感作

試験品又は参照品 99 mL に供試菌液を 1 mL 加え、室温で 15 秒間、30 秒間、1 分間、5 分間、15 分間、30 分間及び 60 分間反応させた後、平板培地に溶液の一部を接種した。平板培地は 37℃ で 48 時間好気培養した。

(3) 判定

平板培地に菌の発育を認めない場合、殺菌効果があったと判定した。

(4) 試験の繰り返し

試験は繰り返し 2 回実施した。

4) 黄色ブドウ球菌不活化試験

(1) 供試菌液の調製

平板培地上に純培養した黄色ブドウ球菌の単一コロニーから釣菌し、液体培地で 37℃、18～24 時間好気培養した後、9,800×g で 20 分間遠心分離した。沈渣（菌体）を滅菌生理食塩液で洗浄して再度遠心分離を行い、滅菌生理食塩液に浮遊させた。試験菌液は $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL 程度の菌数になるよう調製した。

(2) 黄色ブドウ球菌の感作

試験品又は参照品 99 mL に供試菌液を 1 mL 加え、室温で 15 秒間、30 秒間、1 分間、5 分間、15 分間、30 分間及び 60 分間反応させた後、平板培地に溶液の一部を接種した。平板培地は 37℃ で 48 時間好気培養した。

(3) 判定

平板培地に菌の発育を認めない場合、殺菌効果があったと判定した。

(4) 試験の繰り返し

試験は繰り返し 2 回実施した。

4. 試験成績

1) 試験品の調製

使用直前の試験品の pH は 12.7 であった。

2) インフルエンザウイルス（IFV）不活化試験

ウイルス含有量の測定結果を表 1 に示す。

対照試料のウイルス含有量の平均値は $10^{5.25}$ TCID₅₀/mL であった。

15 秒間及び 30 秒間感作後の試験試料のウイルス含有量の平均値はそれぞれ $\leq 10^{2.42}$ 及び $\leq 10^{2.00}$ TCID₅₀/mL であり、1 分間、5 分間、15 分間、30 分間及び 60 分間感作後の試験試料のウイルス含有量は全て検出限界である $\leq 10^{1.50}$ TCID₅₀/mL であった。また、15 秒間、30 秒間、1 分間、5 分間、15 分間、30 分間及び 60 分間感作した時の LRV はそれぞれ ≥ 2.8 、 ≥ 3.2 、 ≥ 3.7 、 ≥ 3.7 、 ≥ 3.7 、 ≥ 3.7 及び ≥ 3.7 となり、全ての試験条件において LRV は 2 以上であった。一方、参照試料のウイルス含有量の平均値は全ての感作時間において検出限界以下になったが、参照品による細胞毒性が出現したため、検出限界値は $10^{3.50}$ TCID₅₀/mL となった。このことにより、参照品の試験における LRV は全ての試験条件で ≥ 1.7 となった。

3) 大腸菌不活化試験

大腸菌の不活化試験の結果を表 2 に示す。

大腸菌濃度 7.4×10^5 CFU/mL の供試菌液を試験に使用した。その結果、15 秒間、30 秒間及び 1 分間感作後の試験試料を接種した平板培地には菌の発育が認められ、5 分間、15 分間、30 分間及び 60 分間感作後の試験試料を接種した平板培地には菌の発育が認められなかった。一方、参照試料を接種した平板培地については全ての感作時間において菌の発育が認められなかった。

4) 黄色ブドウ球菌不活化試験

黄色ブドウ球菌の不活化試験の結果を表 3 に示す。

黄色ブドウ球菌濃度 3.4×10^5 CFU/mL の供試菌液を試験に使用した。その結果、15 秒間、30 秒間、1 分間及び 5 分間感作後の試験試料を接種した平板培地には菌の発育が認められ、15 分間、30 分間及び 60 分間感作後の試験試料を接種した平板培地には菌の発育が認められなかった。一方、参照試料を接種した平板培地については全ての感作時間において菌の発育が認められなかった。

5. 考察及び結論

使用直前の試験品の pH は規格値である 12 以上の 12.7 であり、試験品の調製に問題は認められなかった。

インフルエンザウイルス不活化試験における試験品の試験では全ての試験条件において LRV は 2 以上であり、短い時間の感作においてもインフルエンザウイルスに対する不活化効果が確認された。一方、参照品の試験では細胞毒性が出現したため、全ての試験条件で LRV は ≥ 1.7 となり、不活化効果に関しての明確な判定が実施出来なかった。

大腸菌不活化試験では大腸菌濃度 7.4×10^5 CFU/mL の供試菌液と試験品を 1:99 で混合した場合、5 分間以上の感作で不活化されることがわかった。一方、参照試料では 15 秒間以上の感作で不活化されることがわかった。

黄色ブドウ球菌不活化試験では黄色ブドウ球菌濃度 3.4×10^5 CFU/mL の供試菌液と試験品を 1:99 で混合した場合、15 分間以上の感作で不活化されることが

わかった。一方、参照試料では 15 秒間以上の感作で不活化されることがわかった。

以上から、本試験系において、ウエルパス手指消毒液 0.2% に大腸菌及び黄色ブドウ球菌を感作させた場合、それぞれ 15 秒間以上感作することで不活化効果があることが確認されたが、インフルエンザウイルスに対してはウイルス含有量測定に使用する細胞に毒性が出現し、不活化効果の確認ができなかった。一方、MC ウォーターにインフルエンザウイルス、大腸菌及び黄色ブドウ球菌を感作させた場合、それぞれ 15 秒間、5 分間、15 分間以上感作することで不活化効果があることが確認された。

[付記 1] 細胞増殖用培養液

イーグル MEM (TPB 含有) [付記 4]	950 mL
牛胎子血清	30 mL
7%炭酸水素ナトリウム液	20 mL

[付記 2] 希釈液

イーグル MEM (TPB 不含) [付記 5]	980 mL
7%炭酸水素ナトリウム液	20 mL

[付記 3] ウイルス増殖用培養液

イーグル MEM (TPB 不含)	929.5 mL
7%炭酸水素ナトリウム液	60 mL
10%グルコース	10 mL
結晶トリプシン (5 mg/mL)	0.5 mL

[付記 4] イーグル MEM (TPB 含有)

イーグル MEM「ニッスイ」①	9.4 g
(カナマイシン含有, 日水製薬株式会社)	
トリプトースホスフェイトブロス	3.0 g
MilliQ 水	1 L

溶解後、121℃, 15 分間高圧蒸気滅菌し、室温まで冷ました後、以下の試薬を加える。

L-グルタミン液 [付記 6]	10 mL
ペニシリン・ストレプトマイシン液 [付記 7]	10 mL

[付記 5] イーグル MEM (TPB 不含)

イーグル MEM「ニッスイ」①	9.4 g
(カナマイシン含有, 日水製薬株式会社)	
MilliQ 水	1 L

溶解後、121℃, 15 分間高圧蒸気滅菌し、室温まで冷ました後、以下の試薬を加える。

L-グルタミン液	15 mL
ペニシリン・ストレプトマイシン液	10 mL

[付記 6] L-グルタミン液

L-グルタミンを 200 mM 含む液体

[付記 7] ペニシリン・ストレプトマイシン液

1 mL 中に、ペニシリン 10,000 IU、ストレプトマイシン 10,000 µg 力価を含む液体

[付記 8] 0.5%モルモット赤血球浮遊液

凝固阻止処理をしたモルモット赤血球を PBS (-) [付記 9] で 3 回洗浄し、PBS (-) で 0.5%に調製したもの。

[付記 9] PBS (-)

PBS (-) 粉末「ニッスイ」(日水製薬株式会社) 9.6 g を 1 L の MilliQ 水に溶解し、121℃で 15 分間、高圧蒸気滅菌したもの。

表1 インフルエンザウイルス不活化試験成績

試料の区分	試験の 繰り返し	感作時間とウイルス含有量							
		—	15秒	30秒	1分	5分	15分	30分	60分
対照試料	1	5.50	—	—	—	—	—	—	—
	2	5.00	—	—	—	—	—	—	—
	3	5.25	—	—	—	—	—	—	—
	平均	5.25	—	—	—	—	—	—	—
試験試料 (MCウォーター)	1	2.75	≤ 2.00	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50
	2	≤ 2.00	≤ 2.00	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50
	3	2.50	≤ 2.00	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50
	平均	≤ 2.42	≤ 2.00	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50	≤ 1.50
	※ ¹ LRV	≥ 2.8	≥ 3.2	≥ 3.7	≥ 3.7	≥ 3.7	≥ 3.7	≥ 3.7	≥ 3.7
参照試料 (ウエルパス 手指消毒液0.2%)	1	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50
	2	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50
	3	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50
	平均	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50
	※ ² LRV	≥ 1.7	≥ 1.7	≥ 1.7	≥ 1.7	≥ 1.7	≥ 1.7	≥ 1.7	≥ 1.7

ウイルス含有量は試料 1 mL中の値（単位：TCID₅₀）を常用対数変換して表示した。

本試験系における検出限界値：（試験試料：1.50）（参照試料：3.50）

※1：LRV=log₁₀（対照試料のウイルス含有量）－log₁₀（試験試料のウイルス含有量）

※2：LRV=log₁₀（対照試料のウイルス含有量）－log₁₀（参照試料のウイルス含有量）

表2 大腸菌不活化試験成績

試料の区分	試験の 繰り返し	感作時間						
		15秒	30秒	1分	5分	15分	30分	60分
試験試料	1	+	+	+	—	—	—	—
MCウォーター	2	+	+	+	—	—	—	—
参照試料	1	—	—	—	—	—	—	—
ウエルパス手指消毒薬0.2%	2	—	—	—	—	—	—	—

—: 菌の発育を認めない +: 菌の発育を認める

表3 黄色ブドウ球菌不活化試験成績

試料の区分	試験の 繰り返し	感作時間						
		15秒	30秒	1分	5分	15分	30分	60分
試験試料	1	+	+	+	+	—	—	—
MCウォーター	2	+	+	+	+	—	—	—
参照試料	1	—	—	—	—	—	—	—
ウエルパス手指消毒薬0.2%	2	—	—	—	—	—	—	—

—: 菌の発育を認めない +: 菌の発育を認める