

# 不活化能の評価

本製品は体外診断用医薬品ではありません。

本品の、各種病原体（感冒コロナウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルス（A型・B型）、単純ヘルペスウイルス、エムポックスウイルス、ワクシニアウイルス、インフルエンザ菌、肺炎レンサ球菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌、赤痢菌、及びカンジダ属）に対する不活化能を評価した。

## 1. 殺菌効果試験

### ・1 - (1)

- [対象病原体] インフルエンザ菌、肺炎レンサ球菌、赤痢菌  
 [試薬] DetectAmp™ マルチ不活化液（シスメックス株式会社）  
 [材料] ・Haemophilus influenzae IID 1639（インフルエンザ菌）  
 ・Streptococcus pneumoniae NBRC 102642（肺炎レンサ球菌）  
 ・Shigella sonnei IID 969（ソネ赤痢菌）  
 ・人工唾液（D-PBS(-)<sup>\*1</sup> + ムチン混合液）  
 ・培地

### [試験法]

DetectAmp™ マルチ不活化液（本品）または対照として生理食塩水（インフルエンザ菌、肺炎レンサ球菌）、精製水（赤痢菌）と人工唾液を2:1で混合した検体液を、各測定用に10mLずつ採取した。検体液10mLに菌液<sup>\*2</sup> 0.1mLを接種して試験液とし、室温にて10分静置した後、培地と混合して10倍希釈を行った。さらに同培地を用いて10倍段階希釈系列を作成し、事前に準備した異なる培地と混合し混釈培養を行った。数日培養後、形成されたコロニー数を目視で計測した。（N=2）

\*1 D-PBS(-)：カルシウム及びマグネシウムフリーのダルベッコリン酸緩衝液

\*2 インフルエンザ菌： $2.7 \times 10^6$  cfu/mL、肺炎レンサ球菌： $8.4 \times 10^5$  cfu/mL、ソネ赤痢菌： $7.0 \times 10^5$  cfu/mL

### [結果]

各試験液中の生菌数は以下の通りとなった。

室温で10分静置した各試験液において、対照では生菌数が維持されていたのに対し、本品では検出されず、殺菌効果が確認された。

菌	対象	生菌数 (CFU/mL)	
		開始時	10分後
インフルエンザ菌	本品	$2.7 \times 10^6$	<100
	対照	$2.7 \times 10^6$	$3.7 \times 10^6$
ソネ赤痢菌	本品	$7.0 \times 10^5$	<100
	対照	$7.0 \times 10^5$	$7.8 \times 10^5$
肺炎レンサ球菌	本品	$8.4 \times 10^5$	<100
	対照	$8.4 \times 10^5$	$6.3 \times 10^5$

※<100：検出限界

※生菌数は2回測定の平均値で算出

・1 - (2)

- [対象病原体] 黄色ブドウ球菌、大腸菌、緑膿菌、カンジダ菌  
 [試薬] DetectAmp™ マルチ不活化液 (シスメックス株式会社)  
 [材料] ・Pseudomonas aeruginosa NBRC3080 (緑膿菌)  
 ・Staphylococcus aureus FDA209株 NBRC13276 (黄色ブドウ球菌)  
 ・Escherichia coli K12株 NBRC3301 (大腸菌)  
 ・Candida albicans 3147 NBRC1594 (カンジダ属)  
 ・人工唾液 (D-PBS(-) + ムチン混合液)  
 ・培地

[試験法]

DetectAmp™ マルチ不活化液 (本品) またはD-PBS(-) (対照) を0.6mLずつ分注し、そこに人工唾液により所定濃度に希釈した菌液<sup>\*3</sup> 0.3mLを混合し、試験液とした。試験液は室温にて10分静置し、培地と混合して10倍希釈を行った。さらに同培地を用いて10倍段階希釈系列を作成し、事前に準備した異なる培地と混合し混釈培養を行った。1-2日培養後、形成されたコロニー数を目視で計測した。(N=2)

\*3 緑膿菌 :  $1.8 \times 10^6$  cfu/mL、黄色ブドウ球菌 :  $4.6 \times 10^6$  cfu/mL、大腸菌 :  $5.4 \times 10^6$  cfu/mL、  
 カンジダ属 :  $3.3 \times 10^6$  cfu/mL

[結果]

各試験液中の生菌数は以下の通りとなった。

室温で10分静置した各試験液において、対照では生菌数が維持されていたのに対し、本品では検出されず、殺菌効果が確認された。

菌	対象	生菌数 (CFU/mL)	
		開始時	10分後
緑膿菌	本品	$1.8 \times 10^6$	<100
	対照	$1.8 \times 10^6$	$2.8 \times 10^6$
黄色ブドウ球菌	本品	$4.6 \times 10^6$	<100
	対照	$4.6 \times 10^6$	$6.7 \times 10^6$
大腸菌	本品	$5.4 \times 10^6$	<100
	対照	$5.4 \times 10^6$	$5.7 \times 10^6$
カンジダ属	本品	$3.3 \times 10^6$	<100
	対照	$3.3 \times 10^6$	$2.7 \times 10^6$

※<100 : 検出限界

※生菌数は2回測定の平均値で算出

2. ウイルス不活化試験 (プラーク法)

・2 - (1)

- [対象病原体] インフルエンザウイルスA型、インフルエンザウイルスB型、単純ヘルペスウイルス  
 [試薬] DetectAmp™ マルチ不活化液 (シスメックス株式会社)  
 [材料] ・Influenzavirus H1N1 A/PR/8/34 (インフルエンザウイルスA型)  
 ・Influenzavirus B (インフルエンザウイルスB型)  
 ・Herpes simplex virus1 HF strain (単純ヘルペスウイルス)  
 ・人工唾液 (D-PBS(-) + ムチン混合液)  
 ・宿主細胞株、細胞増殖・維持培地

[試験法]

DetectAmp™ マルチ不活化液 (本品) またはD-PBS(-) (対照) を0.6mLずつ分注し、人工唾液により希釈調製したウイルス液<sup>\*4</sup>を混合し、反応液とした。反応液は室温にて10分静置し、培地と混合して10倍希釈を行った。さらに同培地を用いて10倍段階希釈系列を作成し、事前に準備した宿主細胞に1mLずつ滴下し感染処理を行った。ウイルス感染後、細胞上清を寒天溶液に置換し1-2日培養した。形成されたプラーク数の測定データを元にウイルス感染力価 (PFU<sup>\*5</sup>/mL) を測定した。(N=2)

- \*4 インフルエンザウイルスA型： $2.0 \times 10^7$  PFU/mL、インフルエンザウイルスB型： $4.2 \times 10^7$  PFU/mL、  
単純ヘルペスウイルス： $9.0 \times 10^5$  PFU/mL
- \*5 PFU (Plaque Forming Unit)：細胞にウイルスを接種することによって、プラーク（溶菌斑；ウイルス感染によって細胞が変性や死滅した箇所が培地上に斑状に出現する）が観察されるウイルス量

[結果]

各反応液中のウイルス感染力価は以下の通りとなった。

室温で10分静置した各反応液において、対照ではウイルス感染力価が維持されていたのに対し、本品では検出されず、ウイルスが不活化されていることを確認した。

ウイルス	対象	感染力価 (PFU/mL)	
		開始時	10分後
インフルエンザ ウイルスA型	本品	$2.0 \times 10^7$	<1,000
	対照	$2.0 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$
インフルエンザ ウイルスB型	本品	$4.2 \times 10^5$	<1,000
	対照	$4.2 \times 10^5$	$4.2 \times 10^5$
単純ヘルペスウイルス	本品	$9.0 \times 10^5$	<1,000
	対照	$9.0 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$

※<1,000：検出限界

※感染力価は2回測定（インフルエンザウイルスA型、単純ヘルペスウイルス）、及び3回測定（インフルエンザウイルスB型）の平均値で算出

・2 - (2)

- [対象病原体] エムボックスウイルス、ワクシニアウイルス
- [試薬] DetectAmp™ マルチ不活化液（シスメックス株式会社）
- [材料]
- ・エムボックスウイルス（猿痘ウイルス）臨床分離株
  - ・Modified vaccinia virus Ankara (MVA)株（ワクシニアウイルス）
  - ・唾液サンプル
  - ・宿主細胞株、細胞増殖・維持培地

[試験法]

DetectAmp™ マルチ不活化液（本品）またはPBS（対照）を136 μLずつ分注し、そこへ唾液サンプル80 μL、ウイルス液24μLを混合し反応液とした。反応液は室温にて10分静置し、培地を用いて10倍段階希釈系列を作成した。

事前に準備した宿主細胞に滴下し感染処理を行った。ウイルス感染後、細胞上清を寒天溶液に置換し培養した。

形成されたプラーク数の測定データを元にウイルス感染力価（PFU/mL）を測定した。（N=3）

[結果]

各反応液中のウイルス感染力価は以下の通りとなった。

室温で10分静置した各反応液において、本品ではウイルス感染力価が検出限界以下となり、ウイルスが不活化されていることを確認した。

ウイルス	対象	感染力価 (PFU/mL)
		10分後
エムボックスウイルス	本品	<1,000
	対照	$2.2 \times 10^6$
ワクシニアウイルス	本品	<1,000
	対照	$3.2 \times 10^5$

※<1,000：検出限界

※感染力価は3回測定の平均値で算出

※開始時の感染力価については測定無し

### 3. ウイルス不活化試験 (TCID<sub>50</sub>法<sup>\*6</sup>)

- [対象病原体] 感冒コロナウイルス、アデノウイルス  
 [試薬] DetectAmp™ マルチ不活化液 (シスメックス株式会社)  
 [材料] ・Human coronavirus 229E (感冒コロナウイルス)  
 ・Human adenovirus 5 adenoid 75 (アデノウイルス)  
 ・人工唾液 (D-PBS(-)+ムチン混合液)  
 ・宿主細胞株、細胞増殖・維持培地

#### [感染価の測定 (試験法)]

DetectAmp™ マルチ不活化液 (本品) または精製水 (対照) と人工唾液を2:1の割合で混合して検体液を調製した。それぞれの検体液1mLにウイルス液<sup>\*7</sup> 0.1mLを添加、混合して反応液とした。室温にて10分静置後、反応液を10<sup>3</sup>倍から10<sup>8</sup>倍まで段階希釈したものを、細胞を分注したウェルにそれぞれ4ウェルずつ接種して培養し、細胞変性が認められたウェル数からウイルス感染価 (TCID<sub>50</sub>/mL) を測定した。(N=2)

\*6 TCID<sub>50</sub> (median tissue culture infection dose) : 細胞にウイルスを接種することによって、その50%でCPE (細胞変性効果; ウイルス感染によって形状が変化した細胞) が観察されるウイルス量

\*7 感冒コロナウイルス : 10<sup>5.7</sup> TCID<sub>50</sub>/mL、アデノウイルス : 10<sup>7.5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL

#### [結果]

10<sup>3</sup>倍から10<sup>8</sup>倍希釈した反応液を接種したウェルの内、細胞変性が認められた数は下表の通りであった。

この結果をもとにウイルス感染価を求めたところ、以下の通りとなった。室温で10分静置した各反応液において、対照では感染価が維持されていたのに対し、本品では検出されず、ウイルスが不活化されていることを確認した。

細胞変性が認められたウェル数

希釈倍率	感冒コロナウイルス				アデノウイルス			
	1		2		1		2	
	本品	対照	本品	対照	本品	対照	本品	対照
10 <sup>3</sup>	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4
10 <sup>4</sup>	0/4	4/4	0/4	3/4	0/4	4/4	0/4	4/4
10 <sup>5</sup>	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	4/4
10 <sup>6</sup>	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	0/4	4/4
10 <sup>7</sup>	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	0/4
10 <sup>8</sup>	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

ウイルス	対象	ウイルス感染価 (TCID <sub>50</sub> /mL)	
		開始時	10分後
感冒コロナウイルス	本品	1.0×10 <sup>5.7</sup>	<1.0×10 <sup>3.5</sup>
	対照	1.0×10 <sup>5.7</sup>	1.0×10 <sup>5.5</sup>
アデノウイルス	本品	1.0×10 <sup>7.5</sup>	<1.0×10 <sup>3.5</sup>
	対照	1.0×10 <sup>7.5</sup>	1.0×10 <sup>7.4</sup>

※<1.0×10<sup>3.5</sup> : 検出限界

※ウイルス感染価は2回測定の平均値で算出