

試験計画・報告書

開発コード：V2 課運営 テーマ：消毒薬の抗ウイルス作用の検討	2020年12月8日 試験計画・報告者 桑原 千恵子 (印)	2020年12月15日 生データ確認者 上野 千尋 (印)	2020年12月15日 試験実施承認・終了確認 首藤 洋三 (印)
------------------------------------	--------------------------------------	-------------------------------------	---

【試験タイトル】 [計画書・報告書]

消毒薬のネココロナウイルス及びネコカリシウイルスに対する抗ウイルス作用に関する検討

【目的】

5種の消毒薬のネココロナウイルス (FIPV:猫伝染性腹膜炎ウイルス) 及びネコカリシウイルス (FCV) に対する抗ウイルス作用を検討し、消毒薬の有効性を明らかにする。

【結果・考察の要旨】

FCV に対してはテラ・プロテクトとウイルスバスターウォーターが有効であったがテラ・プロテクトの方が高い有効性を有していた。FIPV に対してはVブロックスプレーを除くいずれの消毒薬も有効であったが、テラ・プロテクトの効果が最も高かった。以上の結果より、ウイルスのエンベロップの有無にかかわらずテラ・プロテクトが最も有用である。

【材料及び方法】

1. 供試ウイルス

- 1) 株名 FIPV KUK-H/L 株 ($10^{5.5}$ TCID₅₀/mL) VT:2020-90
FCV 91-19 株 ($10^{7.0}$ TCID₅₀/mL) (10^9 .0TCID₅₀/mL) VT:2020-84
- 2) 供試細胞 CRFK 細胞、fcwf-4 細胞
- 3) 供試消毒薬 以下の5種

メーカー	製品	依頼された効力試験対象*
Zoono	マイクロブシールド	ネココロナウイルス (FIPV)
スーリヤ	ウイルスバスターウォーター	ネココロナウイルス (FIPV)
ジールコスメティクス	Vブロックスプレー	ネココロナウイルス (FIPV)
サンタミネラル	テラ・プロテクト	ネココロナウイルス (FIPV)
Ableman	シートクリーナーリキッド	ネコカリシウイルス (FCV)

*全種類ネココロナウイルス (FIPV) とネコカリシウイルス (FCV) の両方に対する効果を検討した。

4) ウイルス感染価の測定

被検液を培養液で10倍階段希釈し、それぞれ96穴プレートに単層培養したfcwf-4またはCRFK細胞に各希釈列につき8穴ずつに100uLずつ接種した。37℃、5%CO₂下で3~5日間培養し、CPEの認められた穴を感染陽性とし、ベレンスケルバー法によりウイルス感染価を算出した。

2. 細胞毒性限度に関する検討

①各消毒薬を培養液で10倍から2倍階段希釈し、96穴プレートに単層培養したfcwf-4に添加して37℃、5%CO₂下で3~5日間培養した後、検鏡し細胞毒性が認められない最小希釈倍数を求めた。

3. 消毒薬の抗ウイルス作用に関する検討

① FCV：消毒薬とウイルス液を表に示した割合で混合し、混合後速やかにウイルス感染価を測定した。水または PBS と混合した対照と比較してウイルス感染価の低下が認められるか否かについて検討した。

② FIPV：消毒薬とウイルス液を表に示した割合で混合し、混合後速やかにウイルス感染価を測定した。マイクロブシールドとシートクリーナーリキッドのみ限外ろ過膜を用いた消毒薬除去を試みた。水または PBS と混合した対照と比較してウイルス感染価の低下が認められるか否かについて検討した。

③ シートクリーナーリキッド/FCVのみ：24穴プレートの8穴に $10^{7.0}$ TCID₅₀/10uLのFCVを塗り広げて風乾する。4穴にシートクリーナーリキッドを、他の4穴には水を500uL添加し、すぐに吸引除去して風乾する。各穴に 2×10^5 個/mLに調整したfcwf-4細胞液を1.1mL加えて10倍階段希釈した後培養し、プレート穴内の残存ウイルス濃度を求めた。

【結果】

2-① 各消毒薬について細胞毒性の認められない希釈倍数を表1に示した。マイクロブシールドで強い細胞毒性を認めた。Vブロックスプレー及びシートクリーナーリキッドはそれぞれ40倍、80倍であった。ウイルスバスターウォーター及びテラ・プロテクトについては、細胞毒性を認めなかった。

3-① 各消毒薬と混合したウイルス感染価を表2-1～表2-5に示した。FCVに対してはテラ・プロテクトのみで強い抗ウイルス効果が認められた。ウイルスバスターウォーターは9：1混合でウイルス感染価を95%程度低下させた。

3-② 各消毒薬と混合したウイルス感染価を表2-1～表2-5に示した。FIPVに対してもテラ・プロテクトで強い殺ウイルス作用が認められた。ウイルスバスターウォーターで90%程度低下させる作用があった。シートクリーナーリキッドは99.9%以上低下させた。マイクロブシールドは強い細胞毒性のため低希釈列での判定が困難であったが、10倍希釈してもFIPVの感染価を少なくとも99%低下させる効果があった。64倍希釈した場合には等量混合で有効性を示さなかった。Vブロックスプレーには有効性を認めなかった。

3-③ 消毒薬暴露後のFCV感染価を表3に示した。シートクリーナーリキッドに暴露した方がウイルス感染価は高かった。

【考察】

FCVに対してはテラ・プロテクトとウイルスバスターウォーターで感染価を低下させる効果があった。テラ・プロテクトが $10^{8.0}$ TCID₅₀/mLのウイルス感染価を検出限界以下に低下させるのに対し、ウイルスバスターウォーターでは90～95%の低下率であった。FIPVに対してはVブロックスプレーを除くいずれの消毒薬も感染価を低下させる効果があったが、テラ・プロテクトが細胞毒性を示さず、効果も非常に高かった。マイクロブシールドも高い有効性を有する可能性があるが、強い細胞毒性のために測定に限界があった。同種のコロナウイルスでもより高いウイルス感染価が得られるウイルス株を用いることで更なる有効性の検討が可能と考えられる。

以上の結果より、エンベロープの有無にかかわらずテラ・プロテクトが高い有効性を有することが示され、最も有用であると考えられた(表4)。

FCVの消毒薬暴露後感染価の検討試験においては水よりもシートクリーナーリキッドに暴露した方がFCVの感染価が高かった。この原因として風乾したウイルス液がシートクリーナーリキッドの添加によりプレートに固定されてしまうことが考えられる。一方、水の添加により風乾したウイルス液は速やかに溶解し水とともに除去されていると推測される。検鏡下においてもシートクリーナーリキッドを添加したウェルに多くの残存物がみられた。その後、消毒薬または水の風乾後に細胞懸濁液を添加することで固着したウイルス液が溶けだすため、残存ウイルス量が多いシートクリーナーリキッドでウイルス感染価が高くなったと考えられた。

表 1 細胞毒性の認められない希釈倍数

消毒薬	マイクロブシールド	ウイルスバスターウォーター	Vブロックスプレー	テラ・プロテクト	シートクリナーリキッド	対照 (PBS)
細胞毒性の認められない最高濃度	640~1280	<10	40	<10	80	<10

表 2-1 マイクロブシールドと混合後の FIPV・FCV 感染価 (Log₁₀TCID₅₀/mL)

混合比 消毒薬：ウイルス液	FIPV			FCV
	9：1 混合	9：1 (10 倍希釈)	1：1 混合 (64 倍希釈)	9：1
混合後ウイルス価	≤3.500	≤2.500	≥5.375	8.375
対照ウイルス価	4.625	4.250	5.125	8.000

赤字：細胞毒性のため記載の数値以下の判定不可

表 2-2 ウイルスバスターウォーターと混合後の FIPV・FCV 感染価 (Log₁₀TCID₅₀/mL)

混合比 消毒薬：ウイルス液	FIPV		FCV
	9：1 混合	1：1 混合	9：1
混合後ウイルス価	3.500	≥5.000	6.625
対照ウイルス価	4.625	5.125	8.000

表 2-3 V ブロックスプレーと混合後の FIPV・FCV 感染価 (Log₁₀TCID₅₀/mL)

混合比 消毒薬：ウイルス液	FIPV		FCV
	9：1 混合	1：1 混合 (4 倍希釈)	9：1
混合後ウイルス価	4.750	4.875	8.125
対照ウイルス価	4.625	5.125	8.000

表 2-4 テラ・プロテクトと混合後の FIPV・FCV 感染価 (Log₁₀TCID₅₀/mL)

混合比 消毒薬：ウイルス液	FIPV			FCV	
	9：1 混合	9：1 (10 倍希釈)	1：1 混合	9：1	1：1
混合後ウイルス価	≤1.500 検出限界以下	4.250	≤1.500 検出限界以下	≤1.500 検出限界以下	2.0
対照ウイルス価	4.625	4.250	5.125	8.000	9.0

表 2-5 シートクリナーリキッドと混合後の FIPV・FCV 感染価 (Log₁₀TCID₅₀/mL)

混合比 消毒薬：ウイルス液	FIPV		FCV
	9：1 混合	1：1 混合 (4 倍希釈)	9：1
混合後ウイルス価	≤1.500	4.875	8.250
対照ウイルス価	4.625	5.125	8.000

試験番号：V2-20-04

表3 消毒薬暴露後のFCV感染価 (Log₁₀TCID₅₀/mL)

消毒薬	シートクリナー リキッド	対照 (水)
ウイルス感染価	3.250	1.750

表4 消毒薬の効果まとめ

製品	細胞毒性	消毒効果	
		ネココロナ (FIPV)	ネコカリシ (FCV)
マイクロブシールド	×	○ (99%低下)	×
ウィルスバスターウォーター	◎	○ (90%低下)	○ (95%低下)
Vブロックスプレー	△	×	×
テラ・プロテクト	◎	◎	◎
シートクリナーリキッド	△	○ (99.9%低下)	×

細胞毒性：◎毒性なし、△毒性あり、×強い毒性あり

消毒効果：◎非常に有効、○90%以上失活、×ほぼ失活しない