

ユタカ安定型複合塩素製剤のネコカリシウイルスに対する
ウイルス不活化試験
最終報告書

(試験番号：47-YK10754)

2019年12月28日
株式会社ファルカルバオシステムズ


目次

1. 概要	3
1.1 試験名	3
1.2 試験番号	3
1.3 試験目的	3
1.4 試験委託者の名称及び所在地	3
1.5 試験実施施設の名称及び所在地	3
1.6 試験責任者	3
1.7 試験開始日及び終了日	3
2. 試験内容	4
2.1 被験物質	4
2.2 使用株と培地など	5
2.2.1 供試ウイルス	5
2.2.2 供試細胞	5
2.2.3 使用培地及び試薬	5
2.2.4 使用器具	5
2.2.5 使用機器	5
2.3 試験手順	6
2.3.1 使用培地及び試薬の調製	6
2.3.2 ウィルス溶液の調製	6
2.3.3 細胞の調製	6
2.3.4 予備試験	6
2.3.5 ウィルス不活化試験	7
3. 試験結果	9
4. 特記事項	11
4.1 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態	11
4.2 試験計画書に従わなかった事項	11
5. 資料	12
5.1 提出資料	12
5.2 保存資料	12

1. 概要

1.1 試験名

ユタカ安定型複合塩素製剤のネコカリシウイルスに対するウイルス不活化試験

1.2 試験番号

47-YK10754

1.3 試験目的

被験物質について、ネコカリシウイルスに対する不活化効果を確認する。

1.4 試験委託者の名称及び所在地

名 称 : ユタカ株式会社

所 在 地 : 京都府京都市中京区西ノ京中保町 10-1

1.5 試験実施施設の名称及び所在地

名 称 : 株式会社ファルコバイオシステムズ

所 在 地 : 京都府久世郡久御山町田井西荒見 17 番地 1

1.6 試験責任者

株式会社ファルコバイオシステムズ 本庄 弘一

1.7 試験開始日及び終了日

試験開始日 : 2019 年 10 月 28 日

試験終了日 : 2019 年 12 月 28 日

2. 試験内容

2.1 被験物質

(1) 被験物質

名 称 : ユタカ安定型複合塩素製剤

提 出 量 : 500mL

保管条件 : 室温

提 供 者 : 試験委託者

返 却 : 試験終了後、残余は試験実施施設にて廃棄した。

(2) 対照物質

名 称 : D-PBS (-)

製 造 元 : 富士フィルム和光純薬

2.2 使用株と培地など

2.2.1 供試ウイルス

略称	ウイルス株名	ウイルス株No.
FCV	Feline calicivirus (strain F-9) (ネコカリシウイルス)	ATCC VR-782

2.2.2 供試細胞

略称	細胞株名	細胞株No.
CRFK 細胞	Crandell Rees feline kidney cell	JCRB9035

2.2.3 使用培地及び試薬

略称	培地・試薬名称	メーカー名
D-MEM	D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red	富士フィルム和光純薬
Kanamycin	Kanamycin Sulfate Solution (50mg/mL)	富士フィルム和光純薬
PBS(-)	D-PBS(-)	富士フィルム和光純薬
Trypsin-EDTA	0.05w/v% Trypsin-0.53mmol/L EDTA・4Na Solution with Phenol Red	富士フィルム和光純薬
FBS	HyClone FETAL BOVINE SERUM	GEヘルスケア
	日本薬局方 精製水	山善製薬

2.2.4 使用器具

器具名称	メーカー名
培養フラスコ	IWAKI
96ウェルマイクロプレート	IWAKI
ディスポーザブル血球計算盤	エア・ブラウン
15mL遠心管	コーニングジャパン
チップ	ビーエム機器
個別包装ストリペット	コースター
マイクロピペット	エッペンドルフ
電動ピッパー	バイオヒット

2.2.5 使用機器

機器名称	メーカー名
CO ₂ インキュベータ	三洋電機
安全キャビネット	日本エーテック
培養倒立顕微鏡	ニコン
ディープフリーザー	カノウ冷機
恒温槽	アズワン
卓上遠心機	久保田製作所
ボルテックスミキサー	サイエンティフィックインダストリーズ

2.3 試験手順

2.3.1 使用培地及び試薬の調製

(1) 細胞増殖用培地

100mL の D-MEM に対して FBS 10mL、Kanamycin 0.1mL を加えたもの。

(2) 細胞維持用培地

100mL の D-MEM に対して FBS 1mL、Kanamycin 0.1mL を加えたもの。

2.3.2 ウイルス溶液の調製

- 1) CRFK細胞を、細胞増殖用培地にて約36°C、5% CO₂の条件下で3～4日間培養した。
- 2) 培養上清を除去した。
- 3) CRFK細胞にFCVを接種した細胞維持培地で3～4日間ウイルス感染させ、80%以上の細胞が細胞変性効果 (CPE) を示したことを確認した。
- 4) CPEが確認された細胞を-80°Cのディープフリーザーで凍結した。
- 5) 凍結させた細胞を約37°Cに保った恒温槽にて融解後、再度-80°Cのディープフリーザーで凍結した。
- 6) 凍結させた細胞を約37°Cに保った恒温槽にて融解後、3000 rpmで10分間遠心して上清を回収し、ウイルス溶液とした。
- 7) 回収したウイルス溶液は試験まで約-80°C以下のディープフリーザーで保存した。これをウイルス溶液とした。

2.3.3 細胞の調製

- 1) CRFK細胞を、細胞増殖用培地にて約36°C、5% CO₂の条件下で3～4日間培養した。
- 2) 培養フラスコに単層シート状に培養したCRFK細胞をTrypsin-EDTAで剥離し、細胞を回収した。
- 3) 回収された各細胞を血球計算盤にて計測し、細胞維持培地で細胞数を調製し細胞浮遊液を作製した。
- 4) 各細胞浮遊液を96ウェルマイクロプレートの各ウェルに0.1mLずつ加え、約36°C、5% CO₂の条件下で1日間培養した。
- 5) 96ウェルマイクロプレート各ウェルのCRFK細胞がそれぞれ単層シート状になっていることを培養倒立顕微鏡にて確認し、培養上清を除いたものを試験用の細胞プレートとした。

2.3.4 予備試験

2.3.4.1 細胞毒性の確認試験

- 1) 被験物質 0.9mLに細胞維持培地 0.1mLを加えて混和した。(試料液)
- 2) 試料液を細胞維持培地で10倍希釈した。(10倍希釈液)
- 3) 10倍希釈液を細胞維持培地で10倍希釈した。(100倍希釈液)

- 4) 10倍希釈液、100倍希釈液を0.1mLずつ「2.3.3 細胞の調製」で準備した細胞プレートに接種した。
- 5) 約36°C、5% CO₂の条件下で4～7日間培養した。
- 6) 細胞プレートの各ウェルを培養倒立顕微鏡下で観察し、細胞の形態変化の有無を確認した。

表1 判定（細胞毒性の確認試験）

形態変化の有無	判定
無し	適合
有り	不適合

2.3.4.2 中和条件の確認試験

- 1) 被験物質 0.9mLに細胞維持培地 0.1mLを加えて混和した。（試料液）
- 2) 試料液を細胞維持培地で10倍希釈した。（10倍希釈中和液）
- 3) 10倍希釈液を細胞維持培地で10倍希釈した。（100倍希釈中和液）
- 4) 対照物質 0.9mLに細胞維持培地 0.1mLを加えて混和した。（対照試料液）
- 5) 対照試料液を細胞維持培地で10倍希釈した。（10倍希釈対照中和液）
- 6) 10倍希釈対照液を細胞維持培地で10倍希釈した。（100倍希釈対照中和液）
- 7) 10倍希釈中和液、100倍希釈中和液、10倍希釈対照中和液、100倍希釈対照中和液にそれぞれウイルス溶液を0.01mL加え混和し、室温で15分間静置した。（ウイルス接種中和液）
- 8) 「2.3.5.2 ウィルス感染価の測定」に従い、ウイルス感染価を測定した。
- 9) 被験物質及び対照物質のウイルス接種中和液のウイルス感染価を比較して中和条件を判定した。

表2 判定（中和条件の確認試験）

ウイルス感染価	判定
被験物質と対照物質のウイルス感染価の差が±0.5 log ₁₀ 以内	適合
上記以外	不適合

2.3.5 ウィルス不活化試験

2.3.5.1 被験物質とウイルスの作用

- 1) 被験物質 0.9mLにウイルス溶液 0.1mLを加えて混和し、「表3 作用時間」に従い室温にて作用させた。
- 2) 対照物質 0.9mLにウイルス溶液 0.1mLを加えて混和し、「表3 作用時間」に従い室温にて作用させた。
- 3) 作用時間後、「2.3.4 予備試験」の結果より決定した中和条件まで細胞維持培地で速やかに希釈し、作用を停止させたものを作用液及び対照作用液とした。
- 4) 「2.3.5.2 ウィルス感染価の測定」に従い、ウイルス感染価を測定した。

表3 作用時間

測定対象	試験ウイルス株	作用時間		
		0分	1分	3分
被験物質	FCV		●	●
対照物質		●	●	●

2.3.5.2 ウィルス感染価の測定

- 1) ウィルス接種中和液、作用液及び対照作用液を細胞維持培地で10倍段階希釈した。
- 2) 10倍段階希釈液 0.1mLを「2.3.3 細胞の調製」で準備した細胞プレートに接種した。
- 3) 約36℃、5% CO₂の条件下で4～7日間培養した。
- 4) 培養後、培養倒立顕微鏡下でCPEの有無を確認し、Reed-Muench法によりウィルス感染価を算出した。（単位：TCID₅₀ / mL）

3. 試験結果

表4 細胞毒性の確認試験の結果

測定対象		形態変化の有無	判定	細胞毒性
被験物質	10倍希釀液	無し	適合	10倍希釀液及び100倍希釀液において細胞毒性は確認されなかった。
	100倍希釀液	無し	適合	

表5 中和条件の確認試験の結果

測定対象		ウイルス感染価 (TCID ₅₀ /mL)	ウイルス感染価の差 ^(注1)	判定
被験物質	10 倍希釀中和液	3.2×10^6	0.1	適合
対照物質	10 倍希釀対照中和液	4.0×10^6		
被験物質	100 倍希釀中和液	3.2×10^6	0.0	適合
対照物質	100 倍希釀対照中和液	3.2×10^6		

(注 1) \log_{10} (対照物質の感染価/被験物質の感染価)

表6 ウィルス不活化試験の結果

測定対象	ウィルス感染価 (TCID ₅₀ /mL)			ウィルス感染価の差 ^(注2)	
	0分	1分	3分	1分	3分
被験物質		<3.2×10 ¹	<3.2×10 ¹	>5.9	>6.0
対照物質	4.4×10 ⁷	2.3×10 ⁷	3.2×10 ⁷		

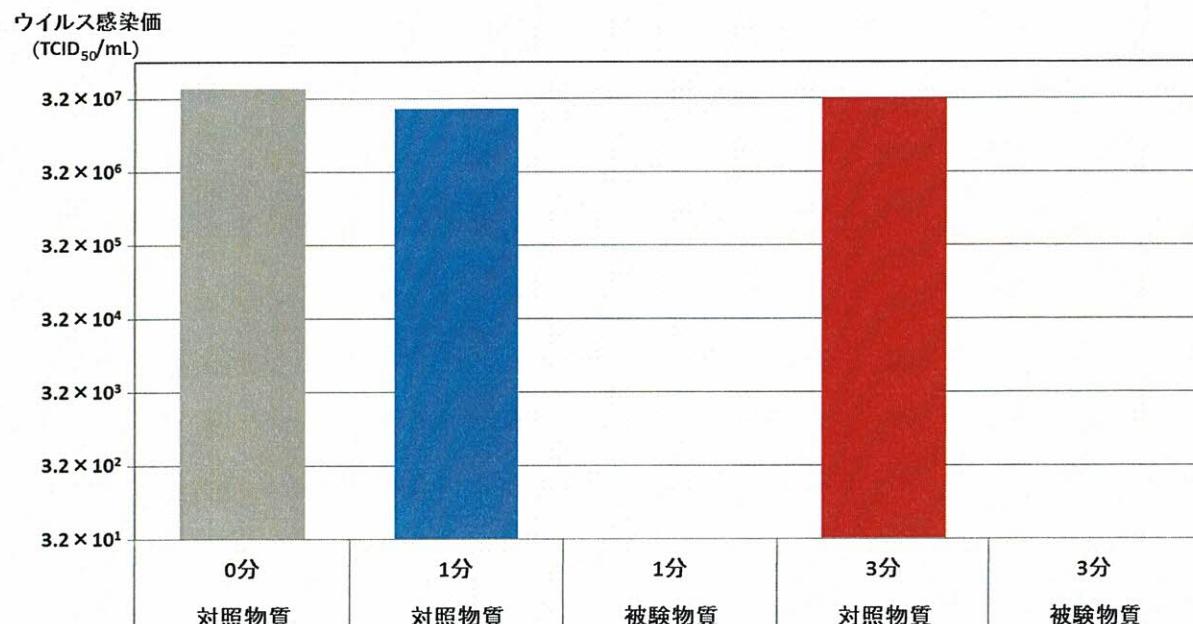
(注 2) log₁₀ (作用後の対照物質の感染価/作用後の被験物質の感染価)

図 1 ウィルス不活化試験の結果

4. 特記事項

4.1 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態
なし。

4.2 試験計画書に従わなかつた事項
なし。

5. 資料

5.1 提出資料

この試験において下記に示す資料は原本を試験委託者へ提出する。

- 試験計画書
- 最終報告書

5.2 保存資料

この試験において下記に示す資料は複写を試験実施施設の資料書庫に保存する。

(保存期間は試験実施施設の基準に準じ、5年間とする。)

- 試験計画書
- 最終報告書

以上