

様式第4号

受託研究結果報告書

令和 3年 3月 31日

株式会社リバティソリューション
代表取締役 古田みゆき 殿

学校法人 加計学園
理事長 加計 晃太郎



貴 株式会社リバティソリューション との受託研究が終了しましたので、下記のとおりその結果の報告をいたします。

記

- 1 研究担当者 岡山理科大学 獣医学部 獣医学科 教授 森川 茂
- 2 研究題目 リバティシュシュ（次亜塩素酸水）による SARS-CoV-2 への感染性の不活化及び遺伝子破壊試験
- 3 研究期間 令和 2年 6月12日 より 令和 3年 3月31日まで
- 4 研究結果 (別紙のとおり)
- 5 備 考

リバティースソリューション社の次亜塩素酸水の新型コロナウイルスの不活化効果 (1)

令和2年6月30日

岡山理科大学・獣医学部・微生物学教授 森川 茂

材料：

ウイルス:新型コロナウイルス SARS-CoV-2 (2019-nCoV/Japan/AI/I-004/2020 株)

細胞：VeroE6/TMPRSS2 細胞

培地：DMEM

ウイルスカ価（感染価）検出法：TCID50 法

ウイルス液中 FBS（ウシ胎仔血清）濃度：1%

ウイルス液：次亜塩素酸水比率 = 1：19

初発ウイルス濃度： 1.0×10^8 TCID50/mL (30 μ L 使用)

方法：

1. ウイルス液 30 μ L + 各濃度（212, 100, 48, 22ppm）の次亜塩素酸水 570 μ L を混和して 60 秒（1 分間）処理後にチオ硫酸 Na 液で中和
2. 中和に要するチオ硫酸 Na 量は、大東化学株式会社の HP から算出

https://www.dcg.co.jp/products/chemicals/case/case_02.html

212ppm : 0.1M チオ硫酸 Na 液 51 μ L

100ppm : 0.1M チオ硫酸 Na 液 24 μ L + MilliQ (超純水) 27 μ L

48ppm : 0.1M チオ硫酸 Na 液 12 μ L + MilliQ (超純水) 39 μ L

22ppm : 0.1M チオ硫酸 Na 液 6 μ L + MilliQ (超純水) 45 μ L

対照 : 0 ppm : MilliQ (超純水) 51 μ L

3. ウイルスカ価測定 : TCID₅₀ 法による (略)

結果 :

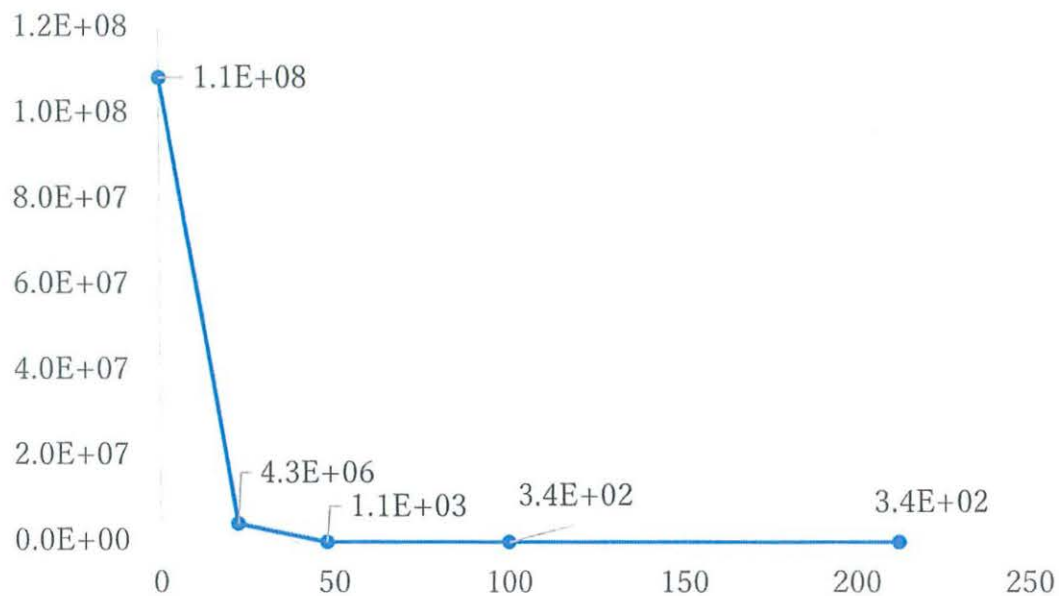
1) 細胞毒性 : ウイルスを入れずに各次亜塩素酸水を同様に処理して細胞毒性をみた。接種量は 96 穴マイクロプレートの各穴に培地 150 μ L, 処理済み次亜塩素酸水 40 μ L を接種した (浸透圧による毒性を回避するためこれ以上は接種できない) 結果、いずれの濃度の次亜塩素酸水処理液を接種した細胞に毒性は認められなかった (今後、ミトコンドリア酵素活性で定量的に細胞毒性を測定予定)。

2) ウイルスカ価 :

ppm	titer (TCID ₅₀ /mL)	% of original
212	$<3.4 \times 10^2$	0.00032%
100	$<3.4 \times 10^2$	0.00032%
48	1.1×10^3	0.001%
22	4.3×10^6	3.98%
0	1.1×10^8	100%

*212, 100ppm では感染性ウイルスは検出されなかったが、処理過程でウイルス液が希釈されているので、検出限界が本試験では 3.4×10^2

SARS-CoV-2の次亜塩素酸水による不活化
(TCID50/mL)



まとめ：

今回の試験では、各濃度の次亜塩素酸水 19 量と新型コロナウイルス液 1 量の割合で混合して、1 分間処理した。処理後に次亜塩素酸水をチオ硫酸ナトリウム液で中和して、直ちにウイルス力価（感染価）を TCID50 法で測定した。その結果、212 と 100ppm 処理では感染性ウイルスは検出限界未満で不活化度は > 99.999684%であった。48ppm 処理では 99.999%不活化され、22ppm 処理では 96.02%不活化された。

また、いずれの ppm の処理液でも顕微鏡下の観察では、細胞毒性は認められなかった。細胞毒性はミトコンドリアの酵素活性を測定することにより定量できるので、今後検討予定である。

また、100ppm 処理の反応時間による不活化については今後検討予定である。

リバティーツリューション社の次亜塩素酸水の新型コロナウイルスの不活化効果 (2)

令和2年10月14日

岡山理科大学・獣医学部・微生物学教授 森川 茂

材料：

ウイルス:新型コロナウイルス SARS-CoV-2 (2019-nCoV/Japan/AI/I-004/2020 株)

細胞: VeroE6/TMPRSS2 細胞

培地: DMEM

ウイルスカ価 (感染価) 検出法: TCID50 法

ウイルス液中 FBS (ウシ胎仔血清) 濃度: 1%

ウイルス液: 次亜塩素酸水比率 = 1 : 19

初発ウイルス濃度: 1.0×10^8 TCID50/mL

方法：

1. ウイルス液 1 volume + 各濃度 (212, 100, 48, 22ppm) の次亜塩素酸水 19 volume を混和して 60 秒 (1 分間) 処理後にチオ硫酸 Na 液で中和
2. 中和に要するチオ硫酸 Na 量は、大東化学株式会社の HP から算出

https://www.dcg.co.jp/products/chemicals/case/case_02.html

600 μ L ウイルス処理液あたり

212ppm : 0.1M チオ硫酸 Na 液 51 μ L

100ppm : 0.1M チオ硫酸 Na 液 24 μ L + MilliQ (超純水) 27 μ L

48ppm : 0.1M チオ硫酸 Na 液 12 μ L + MilliQ (超純水) 39 μ L

22ppm : 0.1M チオ硫酸 Na 液 6 μ L + MilliQ (超純水) 45 μ L

対照 : 0 ppm : MilliQ (超純水) 51 μ L

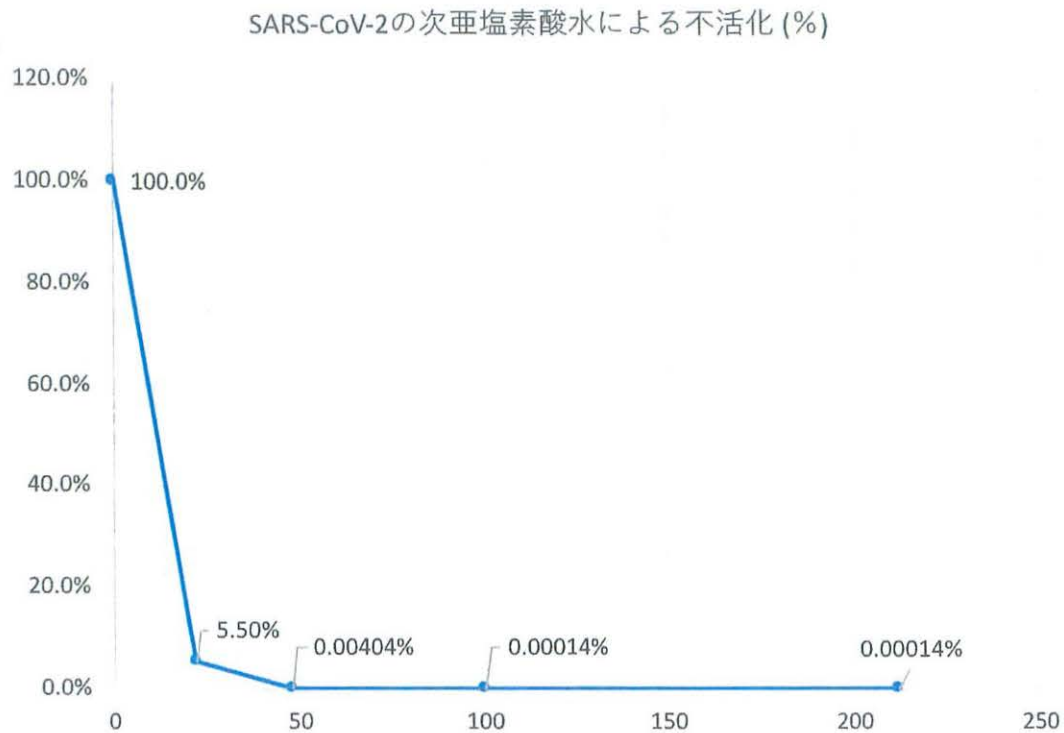
3. ウイルスカ価測定 : TCID50 法による (略)

結果 :

1) ウイルスカ価 (3回の試験の平均値) :

ppm	titer (TCID50/mL)	% of original
212	$<2.3 \times 10^2$	$<0.00014\%$
100	$<2.3 \times 10^2$	$<0.00014\%$
48	1.1×10^4	0.004%
22	1.3×10^7	5.50%
0	2.9×10^8	100%

*212, 100ppm では感染性ウイルスは検出されなかったが、処理過程でウイルス液が希釈されているので、検出限界未満で表記した。



まとめ：

今回の試験では、各濃度の次亜塩素酸水 19 量と新型コロナウイルス液 1 量の割合で混合して、1 分間処理した。処理後に次亜塩素酸水をチオ硫酸ナトリウム液で中和して、直ちにウイルスカ価（感染価）を TCID₅₀ 法で測定した。その結果、212 と 100ppm 処理では感染性ウイルスは検出限界未満であった。48ppm 処理では 99.996%不活化され、22ppm 処理では 94.50%不活化された。

また、いずれの ppm の処理液でも顕微鏡下の観察では、細胞毒性は認められなかった。

リバティースソリューション社の次亜塩素酸水の新型コロナウイルスの不活化効果 (3)

令和2年10月31日

岡山理科大学・獣医学部・微生物学教授 森川 茂

材料：

ウイルス：新型コロナウイルス SARS-CoV-2 (2019-nCoV/Japan/AI/I-004/2020 株)

細胞：VeroE6/TMPRSS2 細胞

培地：DMEM

ウイルスカ価（感染価）検出法：TCID₅₀ 法

ウイルス液中 FBS（ウシ胎仔血清）濃度：1%

ウイルス液：次亜塩素酸水比率 = 1：19

使用したウイルス濃度： 6.3×10^7 TCID₅₀/mL

方法：

1. ウイルス液 30 μ L + 各濃度（212, 102, 52, 21ppm）の次亜塩素酸水 570 μ L を混和して 60 秒（1 分間）処理後にチオ硫酸 Na 液で中和し、20 倍 PBS で浸透圧を調整した。各希釈 3 試験行った。また、21 ppm で 10, 20, 30 分間処理した（各時間 1 試験）。

2. 中和に要するチオ硫酸 Na 量は、大東化学株式会社の HP から算出

https://www.dcg.co.jp/products/chemicals/case/case_02.html

3. ウイルスカ価測定：TCID50 法による（略）

結果：

1) 細胞毒性：ウイルスを入れずに各次亜塩素酸水を同様に処理して細胞毒性をみた。接種量は 96 穴マイクロプレートの各穴に培地 150 μ L, 処理済み次亜塩素酸水 40 μ L を接種した。その結果、いずれの濃度の次亜塩素酸水処理液を接種した細胞に顕微鏡下では毒性は認められなかった。ミトコンドリア酵素活性を WST-1 法で定量的に測定したが、細胞毒性は認められなかった。よって、いずれの濃度の処理液の結果は採用できる。

2) ウイルスカ価（3 試験の平均）：

ppm	titer (TCID50/mL)	% of original
212	$<1.8 \times 10^2$	$<0.00024\%$
102	$<1.8 \times 10^2$	$<0.00024\%$
52	$<1.8 \times 10^2$	$<0.00024\%$
21	7.2×10^6	9.56%
0	7.5×10^7	100%

*212, 102, 52ppm では感染性ウイルスは検出されなかったが、処理過程でウ

ウイルス液が希釈されているので、検出限界が本試験では 1.8×10^2 TCID50/mL である。

21ppm	titer (TCID50/mL)	% of 1分間
1分間	7.2×10^6	100%
10分間	1.8×10^6	25.1%
20分間	1.8×10^6	25.1%
30分間	1.3×10^6	18.3%

まとめ：

今回の試験では、各濃度の次亜塩素酸水 19 量と新型コロナウイルス液 1 量の割合で混合して、1 分間処理した。処理後に次亜塩素酸水をチオ硫酸ナトリウム液で中和して、直ちにウイルスカ価（感染価）を TCID50 法で測定した。その結果、212, 102, 52ppm 処理では感染性ウイルスは検出限界未満で不活化度は > 99.99976%であった。21ppm 処理では 90.45%不活化された。

また、いずれの ppm の処理液でも顕微鏡下の観察では、細胞毒性は認められず、WST-1 によるミトコンドリア酵素活性でも細胞毒性が認められなかった。

また、21ppm 処理の反応時間による不活化では、時間が経つと若干カ価が低下したが顕著なカ価低下は認められず、次亜塩素酸水による新型コロナウイルス

スの不活化は1分間以内で起きていると考えられた。

捕捉：同様の試験をネココロナウイルス2型で行った結果、21ppmで98.6%、52,102,212ppmで>99.992%(検出限界以下)の不活化効果が認められ、新型コロナウイルスとほぼ同等の不活化効果であった。

リバティーツリューション社の次亜塩素酸水の新型コロナウイルスの不活化効果 (4)

令和3年1月13日

岡山理科大学・獣医学部・微生物学教授 森川 茂

材料：

ウイルス:新型コロナウイルス SARS-CoV-2 (2019-nCoV/Japan/AI/I-004/2020 株)

細胞：VeroE6/TMPRSS2 細胞

培地：DMEM

ウイルスカ価（感染価）検出法：TCID50 法

ウイルス液中 FBS（ウシ胎仔血清）濃度：1%

ウイルス液：次亜塩素酸水比率 = 1：19

使用したウイルス濃度： 6.3×10^7 TCID50/mL

方法：

1. ウイルスの生理食塩水置換

ウイルスは細胞培養用の DMEM 培地中に含まれているが、培地には大量のアミノ酸が含まれるため次亜塩素酸水中の有効塩素がアミノ酸の酸化に消費されると考えられる。そこで、Sephadex G25 カラムを用いて培地成分を生

理食塩水に置換したウイルスを調整した。対照として、生理食塩水に置換していないウイルス液を用いた。

2. ウイルス液 20 μ L + 各濃度（提供されたロット 3 の 200, 102, 49, 21ppm の液及び提供された 200ppm 液を滅菌超純水で希釈して 10, 5ppm に調整した液）の次亜塩素酸水 380 μ L を混和して 60 秒（1 分間）処理後にチオ硫酸 Na 液で中和し、20 倍 PBS で浸透圧を調整した。各希釈 2 試験行った。
3. 中和に要するチオ硫酸 Na 量は、大東化学株式会社の HP から算出
https://www.dcg.co.jp/products/chemicals/case/case_02.html
4. ウイルス力価測定：TCID50 法による（略）

結果：

1) ウイルス不活化試験

DMEM 培地中のウイルス及び生理食塩水に置換したウイルス液をそれぞれ用いて、次亜塩素酸水によるウイルスの不活化を検討した結果、以下の成績を得た。

2) ウイルス力価（2 試験の平均）：

表 1. 通常のウイルス液を用いた不活化試験の成績

ppm	titer (TCID50/mL)	% of original
200	$<0.8 \times 10^1$	$<0.00045\%$
102	$<0.8 \times 10^1$	$<0.00045\%$

49	$<0.8 \times 10^1$	$<0.00045\%$
21	4.5×10^4	2.55%
10	6.8×10^5	39.1%
5	2.0×10^6	111.8%
0	1.8×10^6	100%

*200, 102, 49ppm では感染性ウイルスは検出されなかったが、処理過程でウイルス液が希釈されているので、検出限界が本試験では 0.8×10^1 TCID50/mL である。

表 2. 生理食塩水に置換したウイルス液を用いた不活化試験の成績

ppm	titer (TCID50/mL)	% of original
200	$<0.8 \times 10^1$	$<0.00045\%$
102	$<0.8 \times 10^1$	$<0.00045\%$
49	$<0.8 \times 10^1$	$<0.00045\%$
21	$<0.8 \times 10^1$	$<0.00045\%$
10	$<0.8 \times 10^1$	$<0.00045\%$
5	$<0.8 \times 10^1$	$<0.00045\%$
0	1.8×10^6	100%

まとめ：

本試験では、各濃度の次亜塩素酸水 19 量と新型コロナウイルス液 1 量の割合で混合して、1 分間処理した。処理後に次亜塩素酸水をチオ硫酸ナトリウム液で中和して、直ちにウイルス力価（感染価）を TCID₅₀ 法で測定した。その結果、通常のウイルス液を用いた場合には、200 10², 49ppm 処理では感染性ウイルスは検出限界未満で不活化度は > 99.99955%であった。21ppm 及び 10ppm 処理ではそれぞれ 97.45%、60.9%不活化された。5ppm では不活化されなかった。この結果は、これまでの試験結果と一致し、NITE で報告された結果とも良く一致する。

一方、ウイルス液中の培地成分を生理食塩水に置換したウイルス液を用いて同様の試験をすると、5ppm 処理でも感染性ウイルスは検出限界未満で不活化度は >99.99955%であった。この結果から、培地中に含まれるアミノ酸が有効塩素を消費するため、比較的高濃度の 50ppm 以上の次亜塩素酸水でウイルスが不活化されるが、アミノ酸を除去した場合には、5ppm でも検出限界未満まで不活化できると考えられた。

感染者の唾液などには、細胞培養液のような高濃度のアミノ酸は含まれていないため、50ppm よりも低濃度の次亜塩素酸水でも SARS-CoV-2 は 1 分間で不活化できると考えられた。