

二酸化塩素ガス製品－浮遊ウイルス低減性試験法・ 浮遊ウイルス低減効果－大形試験チャンバー法(仮)

Chlorine dioxide products – Determination of reduction activity of airborne virus and reduction efficacy of airborne virus -Large chamber method

8 序文

本 JSA 規格では、「二酸化塩素ガスを空間中に放出し空間中の浮遊ウイルスに作用させることにより、浮遊ウイルスを低減させる製品」の浮遊ウイルスに対する低減性試験法について規定する。

これらの製品の浮遊ウイルス低減性能は、従来、各製造メーカーが各自で設定した試験法により評価されており、統一された方法が存在していなかった。そのため、消費者に対する情報提供においても一貫性を欠くという課題があった。今回、統一された試験法を規定することにより、統一された尺度での性能比較が可能となり、消費者の理解の促進、ひいては業界全体における品質向上に寄与することが期待される。

本 JSA 規格においては、ウイルスを空間中に噴霧し二酸化塩素と作用させた後、ウイルスを回収して、ウイルス感染価を測定することで低減性能を測定している。その際、ウイルス感染価を定量化する方法としては、プラーク測定法及び TCID₅₀ 測定法を採用している。いずれの方法を使用するかはそれぞれの試験機関の経験及び利便性により選択可能である。

20 1 適用範囲

この JSA 規格は、一般消費者が、換気の少ない半密閉空間内に一定期間にわたり設置して使用する二酸化塩素ガス製品の浮遊ウイルス低減性試験方法と浮遊ウイルス低減効果について規定する。

なお、この JSA 規格は、設置時に人が活動しても支障が少ない二酸化塩素濃度(0.1 ppm 以下)に設置空間を保つ製品を対象としており、燻蒸のように設置空間が無人であることを前提とし、高濃度の二酸化塩素ガスを作用させる製品については、対象としていない。

26 2 引用規格

次に掲げる引用規格は、この規格に引用されることによって、その一部がこの規格の要求事項を構成している。これらの引用規格は、その最新版（追補を含む。）を適用する。

JIS K 0050 化学分析方法通則

JIS K 3600 バイオテクノロジー用語

JIS K 3800 バイオハザード対策用クラス II キャビネット

32 **JIS K 8008** 生化学試薬通則

33 **JIS K 8638** チオ硫酸ナトリウム（試薬）

34 **JIS L 1922** 繊維製品の抗ウイルス性試験方法

35 **JIS S 3302** 二酸化塩素を用いた除菌製品の二酸化塩素ガス発生量の測定方法—小形チャンバー法

36 **ASTM E 3273-21** Standard Practice to Assess Microbial Decontamination of Indoor Air using an Aerobiology
37 Chamber

38 **3 用語及び定義**

39 この規格で用いる主な用語及び定義は、次によるほか、**JIS K 3600**、**JIS K 3800**、**JIS K 8008**、**JIS L 1922**、
40 **JIS S 3302**、及び **ASTM E 3273-21** による。

41

42 **3.1**

43 **二酸化塩素ガス製品**

44 空間に二酸化塩素ガスを放出する製品

45 **3.2**

46 **ウイルス**

47 細胞をもたずたんぱく質及び遺伝子物質からなり、特定の宿主細胞内で自己増殖が可能であるもの。

48 **3.3**

49 **浮遊ウイルス低減効果**

50 空間に浮遊しているウイルス感染価を減少させること。

51 **3.4**

52 **ウイルス感染価 (infectivity titre of virus)**

53 単位体積当たりの感染性のあるウイルスの数。

54 **3.5**

55 **プラーク (plaque)**

56 一つの感染性ウイルス粒子が細胞に感染・増殖することによって、半固体培地下の単層細胞中で形成さ
57 れる細胞溶解部分。

58 **注記** 溶解部分は染色されないため透明な斑点として観察できる。

59 **3.6**

60 **プラーク形成単位, PFU (plaque forming units)**

61 単位体積当たりのプラーク数。

62 **3.7**

63 **プラーク測定法 (plaque assay)**

64 ある希釈濃度でのプラーク数から求められるウイルス感染価測定方法。

65 3.8

66 **TCID₅₀ 測定法 (TCID₅₀ method)**

67 培養細胞の 50 %に細胞変性効果が認められる希釈倍率から求められるウイルス感染価測定方法。

68 **注記** TCID₅₀ は、“Median tissue culture infectious dose” の略称である。

69

70 **4 原理**

71 あらかじめ、試験空間内に二酸化塩素ガス製品を設置し、試験空間内の二酸化塩素ガス濃度が一定レベ
72 ルに達したことを確認後、取り出す。その後、試験空間内にウイルス液を噴霧し、二酸化塩素と作用させ
73 る。一定時間経過後に試験空間内から浮遊ウイルスを回収し、それらのウイルス感染価の常用対数値を二
74 酸化塩素ガス製品を設置しない対照試験の結果と比較することで、浮遊ウイルスに対する低減効果を評価
75 する。

76 **5 対象ウイルス及び宿主細胞**

77 対象ウイルスは、**附属書 A** に規定するインフルエンザウイルスとする。また、**附属書 A** には、ウイルス
78 に対応して使用する宿主細胞、培地を規定する。

79 **6 安全上の警告**

80 この JSA 規格では、取扱いの仕方によっては健康及び環境に害を及ぼす感染性ウイルス及び薬品を使用
81 する。この JSA 規格は、単に技術的に適切な方法を規定しているものであり、この JSA 規格の使用者は、
82 この規定に従っていても、測定のどの段階においても健康及び環境に関する法的義務を免除されるもので
83 はない。

84 また、重要な安全上の注意事項として、この試験ではウイルス液を噴霧するため、それらに由来するエ
85 アロゾルの試験者への暴露及び試験系外の環境への漏出が起らないように、世界保健機関 (WHO) の実
86 験室バイオセーフティマニュアルを基に対策を講じなければならない。

87 なお、試験の担当者は、微生物取扱い技術の訓練を受け、十分な知識及び経験をもって実施する必要が
88 あることを警告する。

89 **7 装置及び器具**

90 試験に用いる装置は、次による。

91 **7.1 試験装置及び器具**

92 **7.1.1 高圧蒸気滅菌器 (オートクレーブ)** 温度 121 °C ± 2 °C, 圧力 103 kPa ± 5 kPa での使用が可能な
93 もの。

94 **7.1.2 乾熱滅菌器** 温度 180 °C ± 2 °C 及び 160 °C ± 2 °C での使用が可能なもの。

- 95 **7.1.3 メスフラスコ** 容量が1 Lのもの。
- 96 **7.1.4 天びん(秤)** 計測値の許容範囲が ± 0.01 gの精度をもつもの。
- 97 **7.1.5 プラスチックピペット** 50 mL ± 0.5 mL, 25 mL ± 0.25 mL, 10 mL ± 0.1 mL 及び5 mL ± 0.05 mLの
98 容量のもの。
- 99 **7.1.6 ピペッター** プラスチック製のピペットを装着可能なもの。
- 100 **7.1.7 マイクロピペット** ガラス製又はプラスチック製のチップが装着可能で、この試験に最も適した容
101 積をもち、許容誤差が0.5%以下のもの。
- 102 **7.1.8 ウォーターバス** 37 °C ± 1 °C, 50 °C ± 1 °C及び56 °C ± 1 °Cの温度を保つことができるもの。
- 103 **7.1.9 ボルテックスミキサー** 微生物試験用のもの。
- 104 **7.1.10 冷凍庫** -80 °C ± 2 °C及び-20 °C ± 2 °Cの温度を保つことができるもの。
- 105 **7.1.11 液体窒素槽** -196 °Cに保つことができるもの。
- 106 **7.1.12 メンブランフィルタ** 孔径0.22 μm のもの。
- 107 **7.1.13 保冷库** 2 °C \sim 8 °Cの温度を保つことができるもの。
- 108 **7.1.14 pHメータ** 20 °C ± 1 °Cで、 ± 0.1 pHに校正できるもの。
- 109 **7.1.15 倒立顕微鏡** 培養細胞観察用のもの。
- 110 **7.1.16 ピンセット** 滅菌処理が可能なもの。
- 111 **7.1.17 遠心分離機** 温度4 °C ± 2 °Cに設定可能で、約9800 m/s² (1000 g) で使用可能なもの。
- 112 **7.1.18 安全キャビネット** JIS K 3800 に適合するものか又はこれと同等の性能をもつ微生物試験対応の
113 もので、クラスIIのもの。
- 114 **7.1.19 96穴マイクロプレート** TCID₅₀ 測定用で、 γ 線滅菌済みのもの又はエチレンオキサイド滅菌法に
115 よるもの及び無菌生産のもの。
- 116 **7.1.20 6穴プラスチックプレート** プラーク感染価測定用で、 γ 線滅菌済みのもの。
- 117 **7.1.21 フラスコ** ベントキャップ付きで、底面積75 cm²の付着性細胞培養用のもの。ベントキャップは、
118 0.2 μm のメンブランフィルタ付きで、無菌でガス交換ができ、 γ 線滅菌済みのもの。
- 119 **7.1.22 CO₂ インキュベーター** 34 °C ± 1 °C及び37 °C ± 1 °Cの温度で、炭酸ガス濃度5%の環境を保て
120 るもの。
- 121 **7.1.23 遠沈管** 遠心分離を行うときに使用するガラス又はプラスチック製の容器。
- 122 **7.1.24 培地瓶**
- 123 **7.1.25 試験管**
- 124 **7.1.26 ビーカー**

125 **7.1.27 PFA チューブ** テトラフルオロエチレン - パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体 (PFA)
126 チューブで外径 $\phi 6\text{mm}$ 内径 $\phi 4\text{mm}$ のもの

127 **7.2 試験チャンバー**

128 試験チャンバーは以下の仕様を備えたものとする。

129 **7.2.1 容積**

130 試験チャンバーの容積は、 $20\text{ m}^3\sim 32\text{ m}^3$ の範囲とする。

131 **7.2.2 付帯設備**

132 試験チャンバーには、次の設備を備えていなければならない。

133 a) **温度・湿度調節設備** 7.2.3 に規定する温度・湿度が設定可能なもの。

134 b) **浮遊ウイルス捕集口** 浮遊ウイルス捕集器具 [7.2.5 b)] を接続可能なもの。

135 c) **二酸化塩素ガス捕集口** 試験チャンバー (7.2) 内に 1 か所以上設ける二酸化塩素ガスの濃度測定点か
136 ら二酸化塩素濃度測定器具 [7.2.5 a)] 及び装置に二酸化塩素ガスを導くために用いる PFA チューブ
137 (7.1.27) を通すための壁面の開口部

138 d) **空気及び二酸化塩素ガスのリターン開口部** 浮遊ウイルス捕集口 [7.2.2 b)] 及び二酸化塩素ガス捕集
139 口 [7.2.2 c)] を通じて捕集した空気を試験チャンバー (7.2) 内に戻すための PFA チューブ (7.1.27)
140 を接続するための壁面の開口部

141 **7.2.3 温度・湿度の設定**

142 試験チャンバー (7.2) 内の温度・湿度は、初期温度は $23\text{ }^\circ\text{C}\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 、初期湿度は $50\%\pm 10\%\text{ RH}$ 以下に
143 設定する。なお、温度・湿度は、受渡当事者間の合意によって変更してもよい。変更した温度・湿度で実
144 験を実施した場合は、対照試験も同条件に合わせ、試験を実施する。

145 温度・湿度は、温度計・湿度計を用いて経時的に測定し、記録する。

146 **7.2.4 内部に設置する器具**

147 試験チャンバー (7.2) 内には、次の器具又は試験品を設置する。

148 a) **試験品**

149 b) **攪拌ファン** ASTM E3273-21 で規定する 30 CFM の風量を確保できるもの。単体で仕様を満たす製品
150 となったものが入手できない場合には、ファンに電源、脚などの付属品を組み合わせることで製作したもの
151 を使用することが可能である。

152 c) **噴霧器具** 粒径 $0.5\sim 5\text{ }\mu\text{m}$ の噴霧ができるコンプレッサー式ネブライザー

153 d) **温湿度計**

154 e) **ウイルスの捕集チューブ** 噴霧されたウイルスを回収するためのチューブで浮遊ウイルス捕集口
155 [7.2.2 b)] に接続する。ウイルスの捕集位置は、試験チャンバー (7.2) 内の床上 120 cm の位置に設
156 定する。

157 f) **HEPA フィルター付き排気口** 試験後に HEPA フィルターを介して、試験チャンバー内の空気を清浄
158 化する。

159 g) **その他** 試験品又は温湿度計を設置したり、二酸化塩素ガスの濃度測定に用いる PFA チューブ (7.1.27)

160 又は捕集器具を固定するための金属製のスタンドを設置することができる。

161 7.2.5 外部に設置する器具

162 試験チャンバーの外部には、次の器具を準備する。

163 a) **二酸化塩素ガス濃度の測定器具又は装置** ガス検知管及び二酸化塩素ガス検知器（例：GD-70D，理研
164 計器）を用いることができる。

165 b) **浮遊ウイルス捕集器具** インピンジャー等の、液体を介して気体を回収できるガラス製器具

166 c) **吸引ポンプ**

167 d) **HEPA フィルター** 浮遊ウイルス捕集器具と吸引ポンプの間に設置する。

168 e) **ガス乾燥管** 浮遊ウイルス捕集器具と吸引ポンプの間に設置する。

169

170 8 使用器具の滅菌

171 ガラス容器，プラスチック製器具など細胞組織，使用薬剤，試験試料などに接触するものは全て滅菌す
172 る。滅菌方法は，次の高圧蒸気又は乾熱のいずれかの方法による。なお，プラスチック製器具は，耐熱性
173 のあるものを使用するか，又は無菌生産製品を使用してもよい。

174 ー 高圧蒸気滅菌法：オートクレーブ（7.1.1）によって設定温度 121 °C 及び設定圧力 103 kPa で 15 分間加
175 熱し，滅菌する。

176 ー 乾熱滅菌法：乾熱滅菌器（7.1.2）によって設定温度 180 °C で 30 分間，又は設定温度 160 °C で 2 時間
177 加熱し，滅菌する。

178

179 9 試薬及び培地

180 試薬は，分析用品質又は微生物試験に用いる品質のものとする。培養培地などの薬剤は，市場で購入可
181 能なものもあり，可能な限りそれら市販品の使用を推奨する。

182 9.1 **水** JISK0050 附属書 D に規定する A3 のもの又は微生物学用培地の作製に使用できる分析用品質
183 のもので，イオン交換，蒸留，逆浸透，限外ろ過などを単独又はその組合せによって精製したもの。

184 9.2 7.5 %炭酸水素ナトリウム溶液

185 7.5 %炭酸水素ナトリウム溶液は次のいずれかの処方によって準備し，使用直前に十分に混合する。

186 9.2.1 調製方法 1

187 9.2.1.1 炭酸水素ナトリウム 75 g を培地瓶（7.1.24）に入れ，培地瓶の蓋を閉めて高圧蒸気滅菌する。

188 9.2.1.2 水（9.1）1000 mL を高圧蒸気滅菌する。

189 9.2.1.3 炭酸水素ナトリウム（9.2）と水（9.1）1000 mL を混合し，溶解する。

190 9.2.2 調製方法 2

- 191 **9.2.2.1** 1000 mL の水 (9.1) に 75g の炭酸水素ナトリウム (9.2) を溶解した 7.5%炭酸水素ナトリウム溶液
192 を調製する。
- 193 **9.2.2.2** メンブランフィルタ (7.1.12) によって、ろ過滅菌する。
- 194 **9.3 細胞固定用ホルマリン溶液**
- 195 a) 37%ホルムアルデヒド溶液 100 mL を準備する。
- 196 b) a)の溶液に、水 (9.1) 900 mL を加える。なお、細胞固定のための適切な検証を行った上で、他の細
197 胞固定液を使用してもよい。
- 198 **9.4 細胞染色用メチレンブルー溶液**
- 199 a) 1 L のメスフラスコ (7.1.3) を準備し、次の成分を入れる。
200 -水 (9.1) 800 mL
201 -メチレンブルー 0.375 g
202 -1 mol/L の水酸化ナトリウム溶液 62.5 μL
- 203 b) a)の成分を溶解、混合し、水 (9.1) を加えて全量を 1000 mL とする。
- 204 **9.5 非働化済ウシ胎児血清**
- 205 a) 凍結保存されたウシ胎児血清を 37 °Cの温度に設定されたウォーターバス (7.1.8) によって解凍する。
206 b) ウォーターバスによって 56 °Cで、30 分間加温し、非働化する。
207 c) 適量ずつ試験管 (7.1.25) に分注し、-20 °C以下の温度に設定された冷凍庫 (7.1.10) に入れ、保管す
208 る。
209 d) 使用直前に、37 °Cの温度に設定されたウォーターバス (7.1.8) によって解凍する。
- 210 **9.6 トリプトン** 微生物試験用のもの。
- 211 **9.7 ウシ血清アルブミン (Fraction V)** 微生物試験用のもの。
- 212 **9.8 ムチン (ウシ顎下腺由来)** 微生物試験用のもの。
- 213 **9.9 テオ硫酸ナトリウム** JIS K 8638 に規定する特級のもの。
- 214 **9.10 イーグル培地 (EMEM)** 組成が**附属書 B**によるもの。市販品が入手可能である。市販品を使用
215 する場合、**附属書 B**の組成で含まれていない成分がある場合は追加する。
- 216 **9.11 細胞培養に使用する増殖培地**
- 217 a) 1 L のメスフラスコ (7.1.3) を準備し、次の成分を入れる。
218 -水 (9.1) 800 mL
219 -カナマイシン硫酸塩 60 mg
220 -イーグル培地 (EMEM) 9.53 g
- 221 b) a)の成分を溶解、混合し、水 (9.1) を加えて全量を 1000 mL とする。
222 c) b)の混合溶液を、メンブランフィルタ (7.1.12) によって、ろ過滅菌する。
223 d) 次いで、c)の混合溶液に 7.5%炭酸水素ナトリウム溶液 (9.2) 15 mL 及び非働化済ウシ胎児血清 (9.5)

J JSA-S1021 :

224 100 mL を加える。市販品の EMEM に L-グルタミンが含まれていない場合は、**附属書 B** に規定する組
225 成によって混合し、使用するのがよい。

226 9.12 細胞培養に使用する維持培地

227 a) 1 L のメスフラスコ (7.1.3) を準備し、次の成分を入れる。

228 -水 (9.1) 800 mL

229 -カナマイシン硫酸塩 60 mg

230 -EMEM 9.53 g

231 b) a)の成分を溶解、混合し、水 (9.1) を加えて全量を 1000 mL とする。

232 c) b)の混合溶液を、メンブランフィルタ (7.1.12) によって、ろ過滅菌する。

233 d) c)の混合溶液に、7.5 %炭酸水素ナトリウム溶液 (9.2) 15 mL を加える。市販品の EMEM に L-グルタ
234 ミンが含まれていない場合は、**附属書 B** に規定する組成によって混合し、使用するのがよい。

235 9.13 2 倍濃縮維持培地

236 a) 1 L のメスフラスコ (7.1.3) を準備し、次の成分を入れる。

237 -水 (9.1) 800 mL

238 -カナマイシン硫酸塩 120 mg

239 -EMEM 19.06 g

240 b) b)の成分を溶解、混合し、水 (9.1) を加えて全量を 1000 mL とする。

241 c) c)の混合溶液を、メンブランフィルタ (7.1.12) によって、ろ過滅菌する。

242 9.14 0.01 mol/L のりん酸緩衝生理食塩水 [PBS(-)]

243 a) 1 L のメスフラスコ (7.1.3) を準備し、次の成分を入れる。

244 -水 (9.1) 800 mL

245 -塩化ナトリウム 8 g

246 -塩化カリウム 0.2 g

247 -りん酸水素二ナトリウム 12 水和物 2.9 g

248 -りん酸二水素カリウム 0.2 g

249 b) a)の成分を溶解、混合し、水 (9.1) を加えて全量を 1000 mL とする。

250 c) b)の混合溶液を培地瓶 (7.1.24) に移し、オートクレーブ (7.1.1) によって 121 °C, 15 分間の条件で
251 高压蒸気滅菌を行う。

252 9.15 ウシすい(臍) 臓由来トリプシン及び PBS (-) 混合液

253 a) ビーカー (7.1.26) を準備し、次の成分を入れる。

254 -0.01 mol/L のりん酸緩衝生理食塩水 [PBS(-)] (9.14) 100 mL

255 -ウシすい(臍) 臓由来トリプシン 1.0 g

256 b) a)の成分を 2 時間溶解し、混合する。

257 c) b)の混合溶液を、メンブランフィルタ (7.1.12) によって、ろ過滅菌する。適量ずつ分注し、すぐ使用
258 しないものは-80 °C以下の温度に設定された冷凍庫 (7.1.10) に入れ、保存する。

- 259 d) 試験管 (7.1.25) を準備し、次の成分を入れる。
 260 -0.01 mol/L のりん酸緩衝生理食塩水 [PBS(-)] (9.14) 9 mL
 261 -c) のウシすい (臍) 臓由来トリプシン及び PBS(-) 混合液 1 mL
 262 e) d)の成分を十分に溶解し、混合する。
 263 f) 混合溶液を適量ずつ分注し、-20 °C以下の温度に設定された冷凍庫 (7.1.10) に入れ、保存する。
 264 g) 使用直前に 37 °Cの温度に設定されたウォーターバス (7.1.8) によって解凍する。

265 9.16 結晶トリプシン及びエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液

- 266 a) 1 L のメスフラスコ (7.1.3) を準備し、次の成分を入れる。
 267 -0.01 mol/L のりん酸緩衝生理食塩水 [PBS(-)] (9.14) 800 mL
 268 -結晶トリプシン 2.5 g
 269 -カナマイシン硫酸塩 0.1 g
 270 -ストレプトマイシン硫酸塩 0.1 g
 271 -アムホテリシン B 2 mg
 272 -EDTA 0.014 mol
 273 b) a)の成分を溶解、混合し、0.01 mol/L のりん酸緩衝生理食塩水 [PBS(-)] (9.14) を加えて全量を 1000
 274 mL とする。
 275 c) b)の混合溶液を、メンブランフィルタ (7.1.12) によって、ろ過滅菌する。
 276 d) 混合溶液を適量ずつ分注し、-20 °C以下の温度に設定された冷凍庫 (7.1.10) に入れ、保存する。
 277 e) 使用直前に、37 °Cの温度に設定されたウォーターバス (7.1.8) によって解凍する。
 278 **注記** 結晶トリプシン及び EDTA 溶液は市場で購入可能である。なお、購入したものが 9.16 a)と成
 279 分が異なる場合でも適切な検証後に使用可能である。

280 9.17 ジエチルアミノエチルデキストラン (DEAE-Dextran) 溶液

- 281 a) 1 L のメスフラスコ (7.1.3) を準備し、次の成分を入れる。
 282 -水 (9.1) 800 mL
 283 -DEAE-Dextran 20 g
 284 b) a)の成分を溶解、混合し、水 (9.1) を加えて全量を 1000 mL とする。
 285 c) b)の混合溶液を、メンブランフィルタ (7.1.12) によって、ろ過滅菌する。

286 9.18 寒天培地

287 寒天培地は、プラーク測定法に使用するものであり、A 液及び B 液を次の処方によって準備し、使用直
 288 前に十分に混合する。

- 289 a) A 液
 290 1) 1 L の滅菌済み培地瓶 (7.1.24) を準備し、次の成分を入れて十分混合する。
 291 -2 倍濃縮維持培地 (9.2.4) 1000 mL
 292 -DEAE-Dextran 溶液 (9.17) 10 mL
 293 -7.5 % 炭酸水素ナトリウム溶液 (9.2) 40 mL
 294 2) インフルエンザウイルスのプラーク測定法の場合だけ、ウシすい (臍) 臓由来トリプシン (9.15) を
 295 3.0 mL 加える。

J JSA-S1021 :

296 3) 1)及び 2)の混合溶液を 37 °Cの温度に設定されたウォーターバス (7.1.8) に入れ, 使用直前まで保
297 温する。

298 b) B液

299 1) 2 Lの培地瓶 (7.1.24) を準備し, 次の成分を入れて十分混合する。

300 -水 (9.1) 1000 mL

301 -細胞培養用寒天 15 g

302 2) 1)の混合溶液をオートクレーブ (7.1.1) によって 121 °C, 103 kPa の条件で, 15 分間高圧蒸気滅菌
303 する。

304 3) 2)の混合溶液を 50 °Cの温度に設定されたウォーターバス (7.1.8) に入れ, 使用直前まで保温する。

305 9.19 トリプシン添加維持培地 1 Lの培地瓶 (7.1.24) を準備し, 次の成分を入れて溶解し, 十分混合す
306 る。

307 -維持培地 (9.12) 1000 mL

308 -ウシすい (臍) 臓由来トリプシン (9.15) 3.0 mL

309 9.20 ウイルス噴霧用培地

310 ウイルス噴霧用培地は, ウイルスを試験チャンバー内に噴霧するために使用するものであり, A 液 1.05
311 mL, B 液 0.75 mL, C 液 3mL を 10.14 mL のりん酸緩衝生理食塩水 (9.14) に加える。混合溶液を適量ずつ
312 分注し, 使用するまで-20 °C以下の温度に設定された冷凍庫 (7.1.10) に入れ, 保存する。

313 a) A液 トリプトン溶液

314 1) トリプトン (9.6) 0.5 g をりん酸緩衝生理食塩水(PBS) (9.14) 10 mL に溶解させる。

315 2) 1)をメンブランフィルタ (7.1.12) に通して滅菌し, 分注して 5 °C± 3 °C又は-20 °C±2 °Cの環境で
316 保存する。

317 b) B液 ウシ血清アルブミン溶液

318 1) ウシ血清アルブミン (9.7) 0.5 g をりん酸緩衝生理食塩水(PBS) (9.14) 10 mL に溶解させる。

319 2) 1)をメンブランフィルタ (7.1.12) に通して滅菌し, 分注して 5 °C± 3 °C又は-20 °C±2 °Cの環境で
320 保存する。

321 c) C液 ムチン溶液

322 1) ムチン (9.8) 0.04 g をりん酸緩衝生理食塩水(PBS) (9.14) 10 mL に溶解させる。

323 2) 1)をメンブランフィルタ (7.1.12) に通して滅菌し, 分注して 5 °C±3 °C又は-20 °C±2 °Cの環境で
324 保存する。

325 9.21 ウイルス捕集液 1 Lの培地瓶 (7.1.24) を準備し, 次の成分を入れて溶解し, 十分混合する。

326 -チオ硫酸ナトリウム (9.9) 0.015 g

327 -りん酸緩衝生理食塩水 (9.14) 100 mL

328 10 試験準備

329 10.1 浮遊ウイルス除去試験の準備

330 10.1.1 凍結保存された宿主細胞の復元

331 凍結保存された宿主細胞は、解凍し、培養を行う。その手順は、次による。

- 332 a) 凍結保存された宿主細胞懸濁液を 37 °Cの温度に設定されたウォーターバス (7.1.8) によって、急速
333 に融解する。
- 334 b) フラスコ (7.1.21) に増殖培地 (9.11) 20 mL を加える。
- 335 c) b)のフラスコに a) によって融解した細胞の 1 アンプル分全量を入れる。
- 336 d) c)のフラスコを、37 °Cの温度に設定された CO₂ インキュベーター (7.1.22) に入れ、24 時間±2 時間
337 培養する。
- 338 e) 倒立顕微鏡 (7.1.15) によってフラスコ (7.1.21) 底部に細胞が吸着していることを確認する。確認で
339 きれば次の手順を行う。確認できない場合は、更に培養を継続する。
- 340 f) e)のフラスコ内の増殖培地を全量除去する。
- 341 g) f)のフラスコ内に新たに増殖培地 (9.11) 20 mL を加える。
- 342 h) g)のフラスコを、37 °Cの温度に設定された CO₂ インキュベーター (7.1.22) に入れ、48 時間±2 時間
343 培養する。
- 344 i) 培養後、細胞が h)のフラスコの底面に均一に分布していることを倒立顕微鏡 (7.1.15) によって確認す
345 る。細胞の増殖が不十分な場合は、十分に増殖したことが確認できるまで継続する。
- 346 j) 次に、10.1.2 の手順によって、継代培養を行う。

347 10.1.2 宿主細胞の継代培養

348 宿主細胞は、継代培養する。継代培養の手順は、次による。

- 349 a) 10.1.1 i)で単層培養した細胞が、フラスコの底面に均一に分布していることを倒立顕微鏡 (7.1.15) に
350 よって確認する。確認後、増殖培地を除去する。
- 351 b) 次に、0.01 mol/L のりん酸緩衝生理食塩水 [PBS(-)] (9.14) 5 mL を加え、この溶液によってフラスコ
352 底部上に増殖した細胞の表面を洗浄後、加えた PBS(-)を除去する。この操作を 3 回繰り返す。
- 353 c) b)のフラスコに結晶トリプシン及び EDTA 溶液 (9.16) 1 mL を加え、細胞表面全体に行き渡らせた後、
354 余分な結晶トリプシン及び EDTA 溶液を除去する。
- 355 d) c)のフラスコを 37 °Cの温度に設定された CO₂ インキュベーター (7.1.22) に入れ、10 分間±1 分間保
356 温する。
- 357 e) d)のフラスコ内の細胞が剥がれ始めたことを目で確認し、フラスコ側面を軽くたたき、細胞を分散さ
358 せる。
- 359 f) e)のフラスコに増殖培地 (9.11) 5 mL を加える。組織を傷付けないようにピペットによってピペッテ
360 イングし、細胞を分散させる。
- 361 g) 新たな細胞培養用フラスコ (7.1.21) に増殖培地 (9.11) 20 mL を加えたものを準備する。
- 362 h) g)のフラスコ内にピペットによって、f)の細胞懸濁液を 1 mL 加える。
- 363 j) 蓋を締めたフラスコを 37 °Cの温度に設定された CO₂ インキュベーター (7.1.22) に入れ、5 日間培養
364 する。

365 継代培養を繰り返し行う場合は、10.1.2 a)~10.1.2 j)の工程を繰り返す。

366 培養期間は、必要に応じて変更してもよい。

367

368 **10.1.3 ウイルス感染価測定用細胞培養**

369 プラーク測定法又は TCID₅₀ 測定法のために、6 穴プラスチックプレート又は 96 穴マイクロプレートに
370 よって、細胞培養する。

- 371 **a)** 培地瓶 (7.1.24) に増殖培地 (9.11) を 20 mL 入れ、ピペットによって 10.1.2 f) の細胞懸濁液を 1 mL 加
372 える。
- 373 **b)** プラーク測定法用の 6 穴プラスチックプレート (7.1.20) には、**a)** の細胞懸濁液を 1 穴当たり、3 mL 加
374 える。
- 375 **c)** TCID₅₀ 測定法用の 96 穴マイクロプレート (7.1.19) には、**a)** の細胞懸濁液を 1 穴当たり、0.1 mL 加え
376 る。
- 377 **d)** **b)** の 6 穴プラスチックプレート又は **c)** の 96 穴マイクロプレートを、37 °C の温度に設定された CO₂ イ
378 ンキュベーター (7.1.22) に入れて、5 日間培養する。培養期間は、必要に応じて変更してもよい。
- 379 **e)** 感染価の測定に使用する前に、倒立顕微鏡 (7.1.15) によって、細胞が均一に分布していることを確認
380 する。

381

382 **10.1.4 試験ウイルス懸濁液の調製**

383 インフルエンザウイルスは凍結保存されているので、その融解及び培養を行う。

- 384 **a)** 凍結保存されたウイルス懸濁液を 37 °C の温度に設定されたウォーターバス (7.1.8) によって、急速
385 に融解する。
- 386 **b)** 細胞が単層培養された 10.1.2 j) のフラスコから増殖培地を除去する。
- 387 **c)** **b)** のフラスコ内に 5 mL の維持培地 (9.12) を加えて細胞の表面を洗浄後、維持培地を除去する。この
388 洗浄操作を 2 回繰り返す。
- 389 **d)** 新しい試験管 (7.1.25) を準備する。
- 390 **e)** **d)** の試験管に 10.1.4 a) の融解したインフルエンザウイルス懸濁液を入れ、維持培地 (9.12) によって希
391 釈し、10³ PFU (プラーク形成単位であり、以下、PFU という。) /mL ~ 10⁴ PFU/mL 又は TCID₅₀/mL に
392 調製する。
- 393 **f)** **c)** のフラスコ内の細胞の表面上に **e)** で調製されたインフルエンザウイルス懸濁液 1 mL を接種し、細
394 胞表面全体に広げる。
- 395 **g)** **f)** のフラスコを 34 °C の温度に設定された CO₂ インキュベーター (7.1.22) に入れ、1 時間保温し、細
396 胞にウイルスを吸収させる。
- 397 **h)** **g)** のフラスコ内に維持培地 (9.12) 20 mL を入れ、更にウシすい (臍) 臓由来トリプシン及び PBS(-) 混
398 合液 (9.15) 30 µL を加える。
- 399 **i)** **h)** のフラスコを 34 °C の温度に設定された CO₂ インキュベーター (7.1.22) に入れ、フラスコ内のイン
400 フルエンザウイルスを 1 日 ~ 3 日間増殖させる。
- 401 **j)** 倒立顕微鏡 (7.1.15) によって細胞変性効果を観察し、インフルエンザウイルスの増殖を確認する。イン
402 フルエンザウイルスの増殖を確認し、次のステップへ進む。
- 403 **k)** 遠沈管 (7.1.23) に、培養されたウイルス懸濁液を入れる。
- 404 **l)** 遠心分離機 (7.1.17) によって、**k)** のウイルス懸濁液を 4 °C の温度で 15 分間、約 9 800 m/s² (1000 g)

405 の条件下で遠心分離する。

406 **m)** 遠心分離後、遠沈管から上澄みを分取し、インフルエンザウイルスの懸濁液とする。試験管 (7.1.25)
407 に適量を分注し、 -80°C の温度に設定された冷凍庫 (7.1.10) に入れ、凍結保存する。

408 **n)** プラーク測定法又はTCID₅₀測定法によって、ウイルス懸濁液の濃度が 10^8 PFU/mL以上又はTCID₅₀/mL
409 以上かどうかを確認する。ウイルス懸濁液の濃度が 10^8 PFU/mL未満又はTCID₅₀/mL未満の場合は、
410 再度調製する。

411 **o)** **n)**で凍結保存したウイルス懸濁液を使用直前に、 37°C の温度に設定されたウォーターバス (7.1.8) に
412 よって、急速に融解する。

413 **p)** これを試験ウイルス懸濁液とする。直ちに使用しない場合は、 4°C の温度に設定された保冷库(7.1.14)
414 に入れ、保存する。

415

416 10.1.5 試験ウイルス懸濁液の感染価

417 試験ウイルス懸濁液に含まれるウイルスの感染価の測定は、次の手順による。

418 **a)** ウイルス懸濁液のための希釈系列の準備

419 1) 新しい試験管 (7.1.25) に 4°C で保冷した維持培地 (9.12) 1.8 mLを入れる。

420 2) 1)の試験管内に、10.1.4 p)のウイルス懸濁液 0.2 mLを加え、ボルテックスミキサー (7.1.9) によっ
421 て試験管を十分にかくはんする。

422 **注記 1** この操作によって、ウイルス懸濁液は10倍希釈される。

423 3) 新しい試験管 (7.1.25) に 4°C で保冷した維持培地 (9.12) 1.8 mLを入れる。

424 4) 3)の試験管に2)の溶液 0.2 mLを追加し、それらをよく振とうする。

425 **注記 2** この操作によって、ウイルス懸濁液は100倍希釈される。

426 5) この手順を繰り返し、ウイルス懸濁液の希釈系列を準備する。TCID₅₀測定法の場合は、8穴(ウェル)
427 全てが感染する希釈点及び8穴(ウェル)全てが感染しない希釈点を準備する必要がある。ま
428 た、ウイルス感染価が 10^8 TCID₅₀/mLの場合は、TCID₅₀測定法に供するウイルス懸濁液の希釈系列は
429 10^{-8} までが必要となる。

430 **b)** ウイルス感染価の測定

431 1) **プラーク測定法** プラーク測定法によるウイルス感染価の測定は、**附属書 C**による。

432 2) **TCID₅₀測定法** TCID₅₀測定法によるウイルス感染価の測定は、**附属書 D**による。

433 11 試験方法

434 11.1 試験チャンバーの準備

435 **a)** 試験チャンバー (7.2) 内部に攪拌ファン [7.2.4 b)] を噴霧器具 [7.2.4 c)] の真下に上向きに設置する。
436 また必要に応じて温湿度計 [7.2.4 d)]、金属製スタンド [7.2.4 g)] を設置する。

437 **b)** 試験チャンバー (7.2) 外部に二酸化塩素ガス濃度の測定器具又は装置 [7.2.5 a)] 及び吸引ポンプ [7.2.5
438 c)]、HEPA フィルター [7.2.5 d)]、ガス乾燥管 [7.2.5 e)] に接続した浮遊ウイルス捕集器具 [7.2.5 b)]
439 を設置する。ウイルスの捕集器具は環境からの微生物の混入を避けるため使用時まで吸い込み部分を
440 閉塞しておく。

441 **c)** **b)**で設置した二酸化塩素ガス濃度の測定器具又は装置 [7.2.5 a)] に PFA チューブ (7.2.27) を接続し、

442 二酸化塩素ガス捕集口 [7.2.2 c)] を介して、試験チャンバー内部の二酸化塩素ガス測定点と接続する。
443 二酸化塩素ガス濃度の測定器具の排気は、二酸化塩素ガスのリターン開口部 [7.2.2 d)] を介して、試
444 験チャンバー (7.2) 内部に戻す。ウイルス捕集器具を通過した排気は、空気のリターン開口部 [7.2.2
445 d)] を介して、試験チャンバー (7.2) 内部に戻す。

446 d) 試験チャンバー (7.2) 内部に設置した攪拌ファン [7.2.4 b)] を起動し、温度・湿度を目標値に調整す
447 る。

448 11.2 試験品の準備

449 二酸化塩素ガス発生に用いる試験品は、その製品が指定する使用方法によって調製する。調製時には、
450 製品を構成するもの以外の添加、製品の想定使用の温度範囲を超えた加熱・冷却等の処理をしてはなら
451 ない。

452

453 11.3. 試験品の試験チャンバーへの設置及び取り出し

454 調製した試験品は、ウイルス液を噴霧する前に試験チャンバー (7.2) 内に設置する。

455 a) **設置時間** 試験品の試験チャンバー (7.2) 内への設置時間は、測定依頼者が測定受託者に指定する。
456 設置時間については、試験チャンバー (7.2) 内の濃度が 0.1 ppm を越えないことを条件に、最大 16 時
457 間までの範囲で任意の時間を指定できるものとする。

458 b) **設置場所** 試験チャンバー (7.2) 内の試験品の設置場所は、試験品が実際に使用される状況を参考に、
459 試験依頼者が試験受託者に指定する。

460 c) **二酸化塩素ガス濃度測定** 試験チャンバー (7.2) 内部の二酸化塩素ガス濃度が 0.1 ppm を越えないこ
461 とを確認するために、経時的に濃度を測定する。

462 d) **試験品の取り出し** あらかじめ指定した設置時間の経過後に試験品を試験チャンバー (7.2) から取り
463 出す。

464

465 11.4 噴霧ウイルス液の準備

466 a) 10.1.4 n) で凍結保存したウイルス懸濁液を使用直前に、37 °C の温度に設定されたウォーターバス
467 (7.1.8) によって、急速に融解する。

468 b) 超遠心後 (100,000 g × 1 時間) 後、上清を除去し、ウイルス噴霧用培地 (9.20) に置換後、十分に再分
469 散させたものを噴霧ウイルス液とする。

470 **注記** 噴霧ウイルス懸濁液濃度 : $1-5 \times 10^9$ PFU/mL

471

472

473 11.5 対照試験

474 試験品に起因する浮遊ウイルス低減効果を評価するために、試験チャンバー内の浮遊ウイルスの自然減
475 衰を測定する試験を対照試験として実施する。対照試験では、試験チャンバー内に試験品を設置しないこ
476 と以外は試験品を設置した試験と同様の試験条件にて試験を実施する。

477

478 11.6 浮遊ウイルス低減度測定

479 11.6.1 噴霧ウイルス液の噴霧

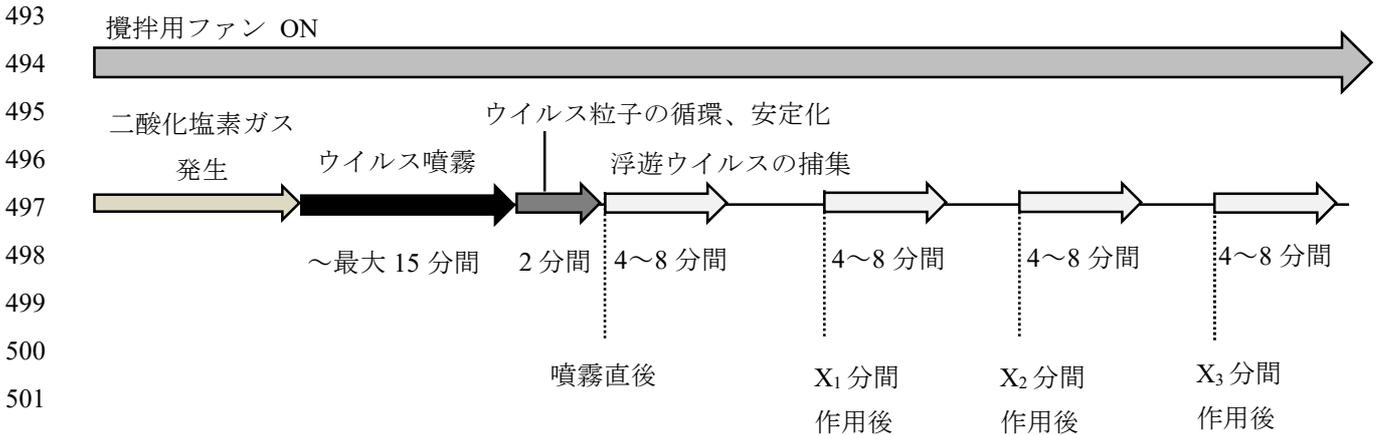
- 480 a) 11.4 で調製した噴霧ウイルス液を噴霧器具 [7.2.4 c)] に必要量加える。
- 481 b) a)の噴霧器具を試験チャンバー (7.2) 内、床面中央、高さ 70cm の位置に設置する。
- 482 c) 噴霧器具を起動し、攪拌ファン [7.2.4 b)] を作動させながら、15 分以内に 2mL の噴霧ウイルス液を
- 483 噴霧する。

484

485 11.6.2 浮遊ウイルスの捕集

- 486 a) 11.6.1 c)の手順が完了後、試験チャンバー内の浮遊ウイルスを均一に分散させるために、攪拌ファンを
- 487 作動させながら、試験チャンバー (7.2) 内の空気を 2 分間攪拌する。
- 488 b)その後、捕集液 (9.21) を 20 mL 入れた浮遊ウイルス捕集器具 [7.2.5 b)] を用いて、4~8 分間、試験
- 489 チャンバー内の空気を吸引し、浮遊ウイルスを捕集する。これを噴霧直後の試験液とする。
- 490 c) その後、所定時間作用後に b)の手順と同様に試験チャンバー内の空気を吸引し、浮遊ウイルスを捕集
- 491 する。作用時間は最大 90 分、捕集間隔は任意、捕集回数は噴霧直後を含め、2 回以上とする。

492



493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

図 1ー浮遊ウイルス低減性試験の工程の例

505

506 12 ウイルス感染価の測定

507 プラーク測定法又は TCID₅₀ 測定法によって、感染価を求める。

- 507 a) **プラーク測定法** プラーク測定法による感染価の測定は、**附属書 C** による。
- 508 b) **TCID₅₀ 測定法** TCID₅₀ 測定法による感染価の測定は、**附属書 D** による。

509

510 13 ウイルス感染価の計算

511 13.1 プラーク測定法

512 プラーク測定法による感染価の計算は、次の式(1)及び式(2)による。

513
$$P = Z \times R \dots\dots\dots (1)$$

J JSA-S1021 :

ここで、 P : 感染価 (PFU/0.1 mL)
 Z : 2 穴のプラーク数の平均値 (個)
 R : 希釈倍率

$$514 \quad W = P \times 10 \dots\dots\dots (2)$$

ここで、 W : 感染価 (PFU/mL)

515 さらに、1 m³ 空気中の感染価 (PFU/m³) は、次の式による。

$$516 \quad V_p = W \times C \times 1000 / A$$

ここで、 V_p : 感染価 (PFU/m³)
 C : 捕集液量 (mL)
 A : 空気の吸引量 (L)

517

518 13.2 ベーレンス・ケルバー (Behrens and Kärber) 法

519 ベーレンス・ケルバー法による感染価の計算は、次の式(3)による。

$$520 \quad Y = X \times 10^a \dots\dots\dots (3)$$

$$a = \sum p - 0.5$$

ここで、 Y : 感染価 (TCID₅₀/0.1 mL)
 X : 捕集液原液の希釈倍率
 p : 各希釈系列において細胞変性効果が認められる割合 (細胞変性効果ありの穴数 / 総穴数)
 $\sum p$: 原液を含む各希釈系列の p 値の総和

521 すなわち、感染価 T は、次の式による。

$$522 \quad T = Y \times 10$$

ここで、 T : 感染価 (TCID₅₀/mL)

523 さらに、1 m³ 空気中の感染価 (TCID₅₀/m³) は、次の式による。

$$524 \quad V_i = T \times C \times 1000 / A$$

ここで、 V_i : 感染価 (TCID₅₀/m³)
 C : 捕集液量 (mL)
 A : 空気の吸引量 (L)

525

526 13.3 試験結果

527 13.3.1 試験成立の判定

528 次のいずれにも該当する場合に、試験が成立していると判定する。

529 a) 試験ウイルス懸濁液の感染価

530 - インフルエンザウイルス懸濁液濃度 > 1.5 × 10⁹ PFU/mL 又は TCID₅₀/mL

531 b) 対照試験 (11.5) における最大捕集時間におけるウイルス感染価の値の常用対数値が測定限界値の常用対数値よりも 2 桁以上、上回っていること。

532

534 13.3.2 浮遊ウイルス低減値の計算

535 浮遊ウイルス低減値 $R_p = Ct - D_t$

536 C_t : 検体なし（対照試験）の各所定時間放置後の試験液のウイルス感染価（PFU/m³）の常用対数値
537 D_t : 検体ありの各所定時間放置後の試験液のウイルス感染価（PFU/m³）の常用対数値

538 14 評価基準

539 この規格の試験方法によって得られる浮遊ウイルス低減値が 2.0 以上であるとき、試験に用いた二酸化
540 塩素ガス製品は、浮遊ウイルス低減化効果があると判断する。

541

542 15 試験報告書

543 試験報告書には、次の事項を含めること。

- 544 a) 規格番号又は名称
- 545 b) 試験実施年月日
- 546 c) 試験品情報（製品の名称、製造業者、ロット番号、使用面積又は使用容積）
- 547 d) ウイルス及び宿主細胞に関する情報、ウイルス種又は株情報
- 548 e) 試験チャンバーに関する情報（幅、奥行き、高さ、各機器の設置場所など）
- 549 f) 試験品の設置に関する情報（試験チャンバー内の設置場所、設置時間、ウイルス噴霧前の二酸化塩素
550 濃度）
- 551 g) 試験結果
- 552 h) 連続測定した温度及び湿度
- 553 i) 規定から逸脱した内容などのその他特記事項
554
555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

附属書 A

(規定)

試験対象ウイルス株及び宿主細胞

試験対象ウイルス株及び宿主細胞

この規格で使用するウイルス株及び宿主細胞を、表 A.1 に示す。

表 A.1—試験に用いるウイルス株、宿主細胞及び増殖培地

ウイルス株	宿主細胞	増殖培地
Influenza A virus(H3N2): A/Hong Kong/8/68: TC adapted ATCC VR-1679	MDCK 細胞 (イヌ腎臓由来細胞)	イーグル培地 (EMEM) (9.10)
Influenza A virus (H1N1): A/PR/8/34: TC adapted ATCC VR-1469	ATCC CCL-34	

566

567

568

569

上記の他、13.3.1 試験成立の判定条件を満たす場合は、他の種類のウイルス及び宿主細胞を使用することができる。

附属書 B
(規定)
培地の組成

570
571
572
573

574 **B.1 概要**

575 培地は市場で入手可能であり、細胞培養に使用する。期待する細胞増殖が観察される場合は、他の培地
576 も使用してよい。
577

578 **B.2 EMEM 培地の組成**

579 EMEM 培地の組成を、表 B.1 に示す。EMEM 培地は、市販品を利用することができる。不足する成分が
580 ある場合は、表 B.1 によって追加する。
581
582

表 B.1—EMEM 培地の組成

水 1000 mL 中の組成		CAS No.	mg
アミノ酸	L-アルギニン塩酸塩 (L-Arginine · HCl)	1119-34-2	126.40
	L-シスチン二塩酸塩 (L-Cystine · 2HCl)	30925-07-6	31.20
	L-グルタミン (L-Glutamine)	56-85-9	292.00
	L-ヒスチジン塩酸塩一水和物 (L-Histidine · HCl · H ₂ O)	7048-02-4	41.90
	L-イソロイシン (L-Isoleucine)	73-32-5	52.50
	L-ロイシン (L-Leucine)	61-90-5	52.50
	L-リジン塩酸塩 (L-Lysine · HCl)	657-27-2	72.50
	L-メチオニン (L-Methionine)	59-51-8	15.00
	L-フェニルアラニン (L-Phenylalanine)	63-91-2	32.50
	L-トレオニン (L-Threonine)	72-19-5	47.60
	L-トリプトファン (L-Tryptophan)	73-22-3	10.00
	L-チロシン二ナトリウム二水和物 (L-Tyrosine 2Na · 2H ₂ O)	122666-87-9	51.90
L-バリン (L-Valine)	72-18-4	46.80	
ビタミン	コリンクロリド (Choline Chloride)	67-48-1	1.00
	パントテン酸カルシウム (D-Calcium Pantothenate)	137-08-6	1.00
	葉酸水和物 (Folic Acid)	59-30-3	1.00
	イノシット (Myo Inositol)	87-89-8	2.00
	ニコチン酸アミド (Nicotinamide)	98-92-0	1.00
	ピリドキシン塩酸塩 (Pyridoxine · HCl)	58-56-0	1.00
	リボフラビン (Riboflavin)	83-88-5	0.10
無機塩	塩酸チアミン (Thiamine HCl)	67-03-8	1.00
	塩化カルシウム (Calcium Chloride [CaCl ₂])	10043-52-4	200.00
	硫酸マグネシウム (Magnesium Sulfate [MgSO ₄])	7487-88-9	97.70
	塩化カリウム (Potassium Chloride [KCl])	7447-40-7	400.00
	塩化ナトリウム (Sodium Chloride [NaCl])	7647-14-5	6 800.00
その他	りん酸二水素ナトリウム一水和物 (Sodium Phosphate Monobasic [NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O] Monohydrate)	10049-21-5	140.00
	D-グルコース (D-Glucose)	50-99-7	1000.00
	フェノールレッドナトリウム (Phenol Red Sodium Salt)	34487-61-1	10.00

583
584
585
586

附属書 C (規定) プラーク測定法

587 **C.1 試験手順**

588 **C.1.1** 6 穴プラスチックプレート (7.1.20) に、単層培養した細胞が均一に分布していることを倒立顕微鏡
589 (7.1.15) で確認した後、増殖培地を除去する。

590 **C.1.2** 維持培地 (9.12) 3 mL を加え、細胞表面を洗浄した後、余分な維持培地を除去する。この操作を 2 回
591 繰り返し、細胞表面を洗浄する。

592 **C.1.3** 試験液の各希釈系列 0.1 mL を 1 希釈系列当たり 2 穴ずつ、細胞表面に接種する。すなわち、最初の
593 2 穴には試験液原液を接種し、次の 2 穴には 1/10 希釈ウイルス懸濁液を接種する。最後の列には、細胞を
594 検証するため、維持培地 (9.12) 0.1 mL を接種する。

595 **C.1.4** C.1.3 のプレートを表 C.1 の温度に設定された CO₂ インキュベーター (7.1.22) に入れ、15 分ごとに
596 プレートを揺すりながら、1 時間保温し、ウイルスを細胞全体に吸着させる。

597 **C.1.5** C.1.4 のプレートを維持培地 (9.12) 3 mL を加え、表面を洗浄した後、余分な維持培地を除去する。

598 **C.1.6** 各穴にプラーク測定法用の寒天培地 (9.18) 3 mL を加え、蓋をして室温で約 10 分間静置する。

599 **C.1.7** 寒天培地が凝固したことを確認後、プレートを倒置し、表 B.1 の温度に設定された CO₂ インキュベ
600 ーター (7.2.22) によって、2 日～3 日間培養する。培養後、CO₂ インキュベーター (7.2.22) からプレー
601 トを取り出し、元の向きに戻し、各穴に寒天上から、細胞固定用ホルマリン溶液 (9.3) 3 mL を加え、室温
602 で 1 時間以上静置し、細胞を固定する。

603 注記 細胞固定に関する適切な検証後、他の細胞固定液を使用することができる。

604 **C.1.8** 細胞固定後、C.1.7 から寒天培地を除去し、各穴に細胞染色用メチレンブルー溶液 (9.4) 3 mL を加
605 え、室温で 15 分間以上静置し、細胞を染色する。

606 **C.1.9** 染色後の余分なメチレンブルー溶液を流水で洗い流し、細胞の染色を確認する。

607 **C.1.10** プラーク (白い斑点) 数を測定する。

608 **C.1.11** 2 穴のプラーク数の平均値を算出する。

609

表 C.1—CO₂ インキュベーターの設定条件

試験対象ウイルス	インフルエンザウイルス
規定箇条番号	11.6.3
吸着温度設定 (°C)	34
培養温度設定 (°C)	34

610

611 **C.2 プラーク数 (PFU) の測定**

612 **C.2.1 概要** プラーク (白い斑点) は、60 個程度まで数えることができる。60 個以上になるとプラーク (白
613 い斑点) の分離が不明確になる。また、別のケースとして、プラークが確認されない場合がある。その場
614 合は、2 穴の平均が 1 以下になることがある。そのため、プラーク数 (PFU) の決定は、C.2.2 による。

615 **C.2.2 プラーク数 (PFU) の決定** この規格に規定しているように、プラークは希釈系列の染色された細胞
616 上の斑点として数えられる。プラーク数は、表 C.2 の規定によってそれぞれの希釈倍率での二つのデータ
617 の平均として得られる。

618

表 C.2—データの解釈

希釈系列	試験液原液	第 1 希釈	第 2 希釈	第 3 希釈	第 N 希釈
希釈倍率	1	10 倍	100 倍	1000 倍	10 ^N 倍
平均プラーク数	C1	C2	C3	C4	CN

619

620 プラーク数は、次のように決定する。

621 - C1 から CN の一つの系列で、6~60 のプラーク数が得られた場合は、その値をその試験のプラーク数
622 (PFU) とする。

623 - C1 が 6 以下の場合は、C1 をその試験のプラーク数 (PFU) とする。

624 - C1 が 0 を含めて 1 以下の場合は、プラーク数 (PFU) を 1 として計算する。

625

626 適切な検証後に、試験液原液 0.1 mL/well を 10 well に接種し、試験液 1.0 mL 当たりのウイルス感染価を
627 測定し、1 m³ 当たりの浮遊ウイルス感染価を算出することで、測定限界値を下げる事が可能である。

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

附属書 D
(規定)
TCID₅₀ 測定法

638

639

640

641 **D.1 試験手順**

642 **D.1.1** 96 穴マイクロプレート (7.1.19) に、単層培養した細胞が均一に分布していることを倒立顕微鏡 (7.1.15)
643 で確認した後、増殖培地を除去する。

644 **D.1.2** 維持培地 (9.12) 0.1 mL を加え、細胞表面を洗浄した後、余分な維持培地を除去する。この操作を 2
645 回繰り返し、細胞表面を洗浄する。

646 **D.1.3** 試験液の各希釈系列 0.1 mL を 1 希釈系列当たり 8 穴ずつ、細胞表面に接種する。すなわち、最初の
647 列の 8 穴に試験液原液を接種し、第 2 の列には 1/10 希釈のウイルス懸濁液を接種する。最後の列には、細
648 胞の検証のため維持培地 (9.12) 0.1 mL を接種する。

649 **D.1.4 D.1.3** の 96 穴マイクロプレートを表 D.1 の温度に設定された CO₂ インキュベーター (7.1.22) に入れ、
650 1 時間保温し、ウイルスを細胞に吸着させる。

651 **D.1.5** プレートから上澄みを除去する。

652 **D.1.6** 維持培地 (9.12) 0.1 mL を加えて表面を洗浄後、余分な維持培地を除去する。

653 **D.1.7** 維持培地 (9.12) 0.2 mL を加える。その後、96 穴マイクロプレートを表 D.1 の温度に設定した CO₂
654 インキュベーター (7.1.22) に入れ、7 日間培養する。

655

表 D.1-CO₂ インキュベーターの設定条件

試験対象ウイルス	インフルエンザウイルス
規定箇条番号	11.6.3
吸着温度設定 (°C)	34
培養温度設定 (°C)	34

656

657 **D.1.8** 倒立顕微鏡 (7.1.15) によってそれぞれの穴の細胞変性効果を確認する。

658 **D.1.9** 細胞変性効果を確認後、ベーレンス・ケルバー (Behrens and Kärber) 法 (13.2) によってウイルスの
659 感染価を算出する。

660