

시 험 보 고 서

안정형 복합염소 제균/소취제의 바이러스에 대한 불활성화 효과시험

(시험번호 : 08-154-1)

재단법인 축산생물과학 안전연구소

시험제목

안정형 복합염소 제균/소취제의 바이러스에 대한 불활성화 효과시험
(시험번호 : 08-154-1)

시험위탁자

명 칭 : 주식회사 광학연구소
소 재 지 : 일본국 교토부 교토시 미나미구
위탁책임자 : 대표이사 우에다 켄이치

시험실시시설

명 칭 : 재단법인 축산생물과학 안전연구소
소 재 지 : 일본국 가나가와현 스모하라시 하시모토다이 소재
대 표 자 : 이사장 마츠하라 요우이치
시험책임자 : 생물공학연구부 주임연구원 니시하라
시험담당자 : 생물공학연구부 나카지마, 토우다

시험경과

시험품 수령 : 2009.02.02

1. 인플레인자 바이러스에 대한 시험
MDCK세포 계대배양 : 2009.03.13
시험품조제 : 2009.03.17
감작 및 접종 : 2009.03.17
판정 : 2009.03.20
2. 돼지전염성 위장염바이러스에 대한 시험
CPK세포의 계대배양 : 2009.03.02
시험품조제 : 2009.03.05
감작 및 접종 : 2009.03.05
판정 : 2009.03.12
3. 개의 파르보바이러스에 대한 시험
CRFK세포의 계대배양 : 2009.02.26
시험품조제 : 2009.02.26
감작 및 접종 : 2009.02.26
판정 : 2009.03.06

보고서안 작성 : 2009.03.25

보고서 제출 : 2009.04.01

시험의 목적

안정형복합염소 제균/소취제에 대한, 인플레인지바이러스, 파르보바이러스, 코로나바이러스에 대한 불활성화 효과를 조사하기 위한 시험임.

시험재료

1. 시험품

명 칭 : 안정형복합염소 제균/소취제
성 상 : 유효염소농도 1,250mg/L
입수년월일 : 2009년 2월 2일
입 수 량 : 갈색플라스틱병 1개
공급담당자 : 주식회사 광학연구소 대표이사

2. 시험용 바이러스

시험시설에서 계대배양한 이하의 바이러스균을 시험함.

1) 개의 파르보바이러스(CPV) Cp49주

분 류 : 파르보바이러스과(DNA바이러스)
유 래 : 동경대학대학원 생명과학연구과/농학부 수의미생물학 교실에서 제공
받은 것을 시험시설설비에서 CRFK세포로 2대 계대한 것임.
바이러스함유량 : $10^{7.75}$ TCID₅₀/ml(시험품 조제시에 판정한 역가)
소태반혈청(FBS) 함유량 : 2%
보 존 조 건 : -80°C 이하
보 관 장 소 : 재단법인 축산생물과학 안전연구소

2) 돼지전염성 위장염바이러스(TGEV) 浮羽株(부익주)

분 류 : 코로나바이러스과(RNA바이러스)
유 래 : 사단법인 일본동물용 의약품협회가 배포한 가축위생 균주로, 시험실시
시설에서 CPK세포로 4대 계대한 것임.
바이러스함유량 : $10^{6.75}$ TCID₅₀/mL(시험품 조제시에 판정한 역가)
보 존 조 건 : -80°C 이하
보 관 장 소 : 재단법인 축산생물과학 안전연구소

3) 인플레인지 바이러스(IFV) A/Aichi/2/68주(아형 : H3N2)

분 류 : 율소믹소바이러스과(RNA바이러스)
유 래 : 홋카이도대학대학원 수의학 연구과/수의학부 미생물학교실로부터 제공
받은 바이러스주로, 당 연구소에서 SPF발육계란을 이용하여 1대 계대/
증식한 것을 MDCK세포로 다시 1대 계대배양 시킨 것임.
바이러스함유량 : 5.0×10^8 PFU/mL(시험품 조제시에 판정한 역가)

FBS농도 : 보관 바이러스액은 FBS를 함유하고 있지 않음. 단, 소혈청 알부민을 0.4w/v% 함유하고 있음.

보 존 조 건 : -80°C 이하

보 관 장 소 : 재단법인 축산생물과학 안전연구소

3. 시험세포

공급 받은 바이러스 정량에 이하의 세포를 사용하였다.

1) 고양이신장 계대세포(CRFK세포) (Y계)

대 상 : CPV 정량 사용.

유 래 : 농림수산성 동물의약품검사소로부터 제공받아, 시험실시시설에서 보관 하던 것.

2) 돼지신장 계대세포(CPK세포)

대 상 : TGEV 정량 사용.

유 래 : 농림수산성 동물의약품검사소로부터 제공받아, 시험실시시설에서 보관 하던 것.

3) 개신장 계대세포(MDCK세포)

대 상 : TGEV 정량 사용.

유 래 : 농림수산성 동물의약품검사소로부터 제공받아, 시험실시시설에서 보관 하던 것.

시험방법

1. 시험액 조제

시험품을 멸균 MilliQ水를 사용하여 10배와 15배 희석했다. (각각, "10배 희석시험액", "15배 희석시험액"으로 했다)

2. 시험 바이러스액의 조제

CPV 및 TGEV에 대해, 보관 바이러스액에 FBS를 첨가하여, 바이러스액 중의 FBS함유량을 10%로 조제했다. IFV에 대해서는 보관 바이러스액을 바이러스 증식용 배양액 [부기2]에서 10배 희석한 것을 사용했다.

3. 감작

시험용 바이러스액을 1:99의 비율로 혼합(이하, "시험샘플액"이라고 한다.)한 후(이것을 0분이라고 했다.), 실온에서 1분에서 3분간 정치하여 감작했다.

대조로서, 시험용 바이러스액과 멸균정제수를 1:99의 비율로 혼합한 것을 같은 방법으로 처리했다(이하, "대조샘플액"이라고 함.).

4. 바이러스 함유량 측정

감작 종료 후 시험용 샘플액 및 대조샘플액에 대해서는 [별지]기재에 따라 바이러스 함유량을 측정하였다.

5. 평가

이하, 방법으로 Log Reduction Value(LRV)를 산출하였다.

$$LRV = \log_{10}A - \log_{10}B$$

A : 대조샘플액의 바이러스 함유량(TCID₅₀/mL 또는 PFU/mL)

B : 시험샘플액의 바이러스 함유량(TCID₅₀/mL 또는 PFU/mL)

LRV가 2 이상일 때, 유효하다고 판정했다. 또한, LRV가 1 이하일 경우, 시험품은 바이러스에 대해 불활성화 효과가 없는 것으로 판단했다.

6. 시험회수

시험회수는 3회(n=3)로 했다.

시험성적 및 고찰

1. CPV를 사용한 시험

시험성적을 표1과 같음.

혼합직후(감작시간 0분) 시험샘플액의 바이러스 함유량의 평균치가, 10배 희석시험액에서는 10^{3.1}TCID₅₀/mL, 15배 희석시험액에서는 10^{3.4}TCID₅₀/mL의 결과가 있었다. 이때 LRV는, 10배 희석시험액에서는 2.6, 15배 희석시험액에서는 2.3이었다.

감작시간을 1분으로 한 경우에는, 10배 희석시험액에서는 3회 시험결과 중 2회가, 15회 희석시험액에서는 3회 반복시험 모두에서 시험샘플액의 바이러스 함유량은 검출한계(10^{1.5}TCID₅₀/mL) 이하까지 감소했다. 이때 LRV는, 10배 희석시험액에서는 4.2(이상), 15배 희석시험액에서는 4.3(이상)이었다.

감작시간을 3분까지 늘였더니, 10배 및 15배 희석시험액 모든 시험에서, 시험샘플액의 바이러스함유량은 검출한계 이하까지 감소했다. 이때 LRV는, 10배 및 15배 희석시험액 모두 4.2(이상)이었다.

2. TGEV를 사용한 시험

시험성적은 표2와 같음.

TGEV를 사용한 시험에서는, 10배 및 15배 희석시험액은 혼합직후 즉시, 시험샘플액 바이러스함유량이 검출한계(10^{1.5}TCID₅₀/mL) 이하까지 감소했다. 이때 LRV는, 10배 및 15배 희석시험액 모두 3.9(이상)이었다.

3. IFV를 사용한 시험

시험성적은 표3과 같음.

IFV를 사용한 시험에서는, 10배 및 15배 희석시험액은 혼합직후 즉시, 시험시료의 바이러스함유량은 검출한계($10^{2.0}$ PFU/mL) 미만으로 감소했다. 이때 LRV는, 10배 및 15배 희석시험액 모두 2.8(보다 큼)로 산출 되었다.

이상의 시험성적으로 보면, 이번 시험에 사용한 안정형복합염소 제균/소취제는 엔벨롭을 지닌 바이러스(인플레인지바이러스 및 돼지전염성 위장염바이러스)에 대해서, 혼합직후 바로 높은 불활성화 효과를 나타내는 것이 명확해졌다. 또한, 개의 파르보바이러스에 대해서도, 혼합직후부터 LRV가 2이상의 불활성화 작용을 하는 것이 나타났다. 그러나, 혼합직후에는 CPV가 잔존함으로, 작용 시간을 충분히 가질 필요가 있을 것으로 판단됨.

[별지] 바이러스함유량의 측정방법

1. 개의 파르보바이러스(CPV) 함유량 측정

1) CRFK세포의 계대배양

세포배양 플라스크에 단층을 형성하고 있는 CRFK세포를 트립신으로 처리하여, 세포 증식용 배양액 [부기1]에 세포농도를 약 2×10^5 개/mL로 조제한다. 이 세포부유액을 24Multi-Well Plate의 각 웰에 0.5mL씩 넣어, 시료접종까지의 사이를 37°C, 5% 탄산가스 부란기 안에 정치한다.

2) 바이러스함유량 측정

감작 종료 후 시험시료 및 대조시료를 세포증식용 배양액으로 10배 단계로 희석하여, 이하의 방법으로 바이러스함유량을 측정한다.

24Multi-Well Plate에 나눈 CRFK세포에 각 희석시료액을 1웰당 0.1mL, 1회 희석당 4웰에 접종한다. 37°C, 5%의 탄산가스 부란기에서 20+/- 4시간 배양한 후 배양액을 흡인 제거하고, 0.5mL의 바이러스 증식용 배양액 [부기2]을 추가해 37°C, 5% 탄산가스 부란기에서 6일간 배양한다. 배양 최종일에 각 웰에서 배양상청을 0.025mL씩 채취하여, 96웰 V저프레이트로 옮긴다. 여기에 같은 양의 소혈청 알부민카보산 완충식염액 [부기5]을 추가하고, 이 혼합액에 VAD6.0액[부기6]에서 조제한 0.5%돼지적혈구 부유액[부기7]을 0.05mL넣어, 4도에서 하루 밤 정치하여 적혈구응집(HA) 유무를 관찰한다. HA가 인정된 배양액을 바이러스 양성으로 보고, 베렌스 켈바법으로 바이러스 함유량을 산출함.

2. 돼지전염성 위장염바이러스(TGEV) 함유량의 측정

1) CPK세포의 계대배양

세포배양 플라스크에 단층을 형성한 CPK세포를 트립신처리하여, 세포증식용 배양액 [부기1]에서 세포농도를 약 2×10^5 개/mL로 조제한다. 이 세포부유액을 24Multi-Well Plate의 각 웰에 0.5mL씩 넣어, 37°C, 5%의 탄산가스부란기에서 2~3일간 배양한다.

2) 바이러스함유량 측정

감작 종료후 시험시료 및 대조시료를 바이러스 증식용 배양액[부기2]으로 10배로 단계 희석하여 이하의 방법으로 바이러스 함유량을 측정한다.

24Multi-Well Plate에 단층을 형성하고 있는 CPK세포에서 배양액을 제거하여, 세포표면을 PBS(-)[부기4]로 1회 세정한다. PBS(-)를 제거하여, 각 희석단계 시료를 1웰당 0.1mL, 1회 희석당 4웰에 접종하여 37°C, 5%의 탄산가스 부란기 안에서 1시간 흡착시킨다. 흡착종료 후, 접종시료를 제거한 후 바이러스 증식용 배양액을 0.5mL씩 주입하여 37°C, 5%의 탄산가스 부란기에서 7일간 배양한다.

세포에 세포변성효과(CPE)가 인정된 웰을 바이러스양성으로 보고, 베렌스 켈바법으로 함유량을 산출한다.

3. 인플레인자 바이러스(IFV) 함유량 측정

1) MDCK세포 계대배양

세포배양 플라스크에 단층을 형성하고 있는 MDCK세포를 트립신으로 처리하여, 세포 증식용 배양액[부기1]에 부유시켜, 이것을 6Well Plate의 각 웰에 2~4ml넣고, 36~37°C, 5%의 탄산가스 부란기로 2~4일간 배양한다.

2) 바이러스 함유량 측정

감작 종료후 시험시료 및 대조시료를 바이러스증식용 배양액[부기2]으로 10배로 단계 희석하여 이하의 방법으로 바이러스 함유량을 측정한다.

6Well Plate 단층을 형성하고 있는 MDCK세포에서 배양액을 제거하여, 세포표면을 PBS(-)로 1회 세정한다. PBS(-)를 제거하고, 각 희석단계의 시료를 1웰당 0.1ml, 1회 희석당 2웰에 접종시켜 실온에서 60분간 흡착시킨다. 흡착종료 후, 접종액을 제거하고, 1차 중층한천배지[부기8]를 2~3ml주입한다.

한천이 굳어지면 플레이트를 뒤집어, 34~36도, 5%의 탄산가스 부란기에서 2일간 배양한다. 거기에 2차 중층한천배지[부기9]를 1~2ml 주입하여, 한천이 굳어지면 플레이트를 뒤집어, 34~36°C, 5%의 탄산가스 부란기에서 하루밤 배양한다.

각 희석단계 플락수를 계측하여, 바이러스 함유량을 산출한다.

[부기1] 세포증식용 배양액

- A. 개의 파르보바이러스(CPV) 함유량 측정
1,000ml 중
이글 MEM(TPB함유) [부기3] 880ml
소태반혈청 100ml
7%탄산가스 나트륨액 20ml
- B. 돼지전염성 위장염바이러스(TGEV) 함유량 측정
1,000ml 중
이글 MEM(TPB함유) [부기3] 880~930ml
소태반혈청 50~100ml
7%탄산가스 나트륨액 20ml
- C. 인플레인자 바이러스(IFV) 함유량 측정
1,000ml 중
이글 MEM(TPB함유) [부기3] 880~950ml
소태반혈청 30~100ml
7%탄산가스 나트륨액 20ml

[부기2] 바이러스증식용 배양액

- A. 개의 파르보바이러스(CPV) 함유량 측정
1,000ml 중
이글 MEM(TPB함유) [부기3] 950~960ml
소태반혈청 20~30ml
7%탄산가스 나트륨액 20ml
- B. 돼지전염성 위장염바이러스(TGEV) 함유량 측정
1,000ml 중
이글 MEM(TPB함유) [부기3] 950~960ml
소태반혈청 20~30ml
7%탄산가스 나트륨액 20ml
- C. 인플레인자 바이러스(IFV) 함유량 측정
2 X 바이러스증식용 배양액
500ml 중
X 10MEM 100ml
멸균 MilliQ水 336.2ml

7%탄산가스 나트륨액	32.1ml
L-글루타민(200mm)	15ml
30%알부민	6.7ml
100 X PS	10ml

바이러스증식용 배양액

2 X 바이러스증식용 배양액을 멸균 MilliQ水로 2배 희석하여 사용한다.

[부기3] 이글 MEM(TPB함유)

이글 MEM『Nissui』④(카나마이신함유, Nissui제약주식회사 제조) 9.4g 및 트립트스호스페이 트브로스(Difco) 3.0g을 1L의 MilliQ水에 용해 후, 121°C, 15분간 고압 증기 멸균하여 실온까지 냉각시킨 후, L-글루타민액(200mM) 10ml 및 페니실린스트렙트마이신액(페니실린 10,000IU/ml, 스트렙트마이신 10,000μg역가/ml) 10ml를 첨가한 것임.

[부기4] PBS(-)

PBS(-)분말 『Nissui』(Nissui제약주식회사 제조) 9.6g을 1L의 MilliQ水에 용해하여, 121°C에서 15분간 고압 증기 멸균한 것임. 9.6g(1L분) 중의 성분구성은 아래와 같다.

염화나트륨	8,000mg
염화칼륨	200mg
인산일차수소나트륨(無水)	1,150mg
인산이차수소칼륨(無水)	200mg

[부기5] 소혈청 알부민 가봉산 완충식염액

1,000ml 중	
염화나트륨	7.01g
붕산	3.05g
수산화나트륨	0.96g
물	잔량

소혈청 알부민을 0.2w/v%가 되도록 첨가한 후, 수산화나트륨으로 pH를 9.0으로 조정한다.

[부기6] VAD6.0액

1,000ml 중	
염화나트륨	8.77g
無水인산수소2나트륨	5.68g
인산2수소나트륨2수화물	40.56g
물	잔량

소혈청 알부민 가봉산 완충식염액과 같은 양으로 혼합했을 때, pH9.0가 되도록 조제한다.

[부기7] 0.5vol% 돼지혈청구 부유액

건강한 돼지로부터 알스바액 중 채혈하여 얻은 혈액을, VAD6.0액[부기6]으로 3회 세정한 후, VAD6.0액으로 0.5vol%가 되도록 조제한 것임.

[부기8] 1차 중층한천배지

조성	
멸균 MilliQ수	7.8ml
2 X 바이러스증식용 배양액	50ml
10%글루코스	1ml
결정트립신(5mg/ml)	0.05ml
2%아가로스 또는 고순도한천	40ml

[부기9] 2차 중층한천배지

조성	
2 X 바이러스증식용 배양액	49ml
2%아가로스 또는 고순도한천	50ml
1%뉴트럴레드	1ml

수 신 : 주식회사 광학연구소
대표이사 우에다 켄이치 귀하

재단법인 축산생물과학안전연구소
이 사 장 마츠하라 요오이치

시험보고서 제출에 대해서

귀사의 무궁한 발전을 기원합니다.

2009년 2월 10일자로 수탁계약에 따라 아래 시험에 대하여 계약서 제5조 규정에 따라 별첨과
같이 시험성적 결과보고를 드립니다.

아 래

시험명

안정형복합염소 제균/소취제의 바이러스에 대한 불활성화 효과시험

[시험번호 08-154]

표1 안정형복합염소 제균/소취제의 개의 파르보바이러스에 대한 불활성화 효과시험

시험군	시험회수	감작시간과 바이러스 함유량의 차이		
		0	1	3(분)
대조군	1	5.50	6.25	5.75
	2	5.50	5.25	5.50
	3	6.00	6.00	5.75
	평균치	5.7	5.8	5.7
10배 희석시험액	1	2.75	≤1.50	≤1.50
	2	3.50	≤1.50	≤1.50
	3	3.00	≤1.75	≤1.50
	평균치	3.1	≤1.6	≤1.5
	LRV	2.6	≥4.2	≥4.2
15배 희석시험액	1	3.00	≤1.50	≤1.50
	2	3.75	≤1.50	≤1.50
	3	3.50	≤1.50	≤1.50
	평균치	3.4	≤1.5	≤1.5
	LRV	2.3	≥4.3	≥4.2

바이러스함유량은 시료 1ml당 값을 대수 변환하여 기재했다.

표2 안정형복합염소 제균/소취제의 돼지전염성위장염바이러스에 대한 불활성화 효과시험

시험군	시험회수	감작시간과 바이러스 함유량의 차이		
		0	1	3(분)
대조군	1	5.50	5.00	5.25
	2	5.50	5.50	5.50
	3	5.25	5.25	5.75
	평균치	5.4	5.3	5.5
10배 희석시험액	1	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	2	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	3	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	평균치	≤1.5	≤1.5	≤1.5
	LRV	≥3.9	≥3.8	≥4.0
15배 희석시험액	1	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	2	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	3	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	평균치	≤1.5	≤1.5	≤1.5
	LRV	≥3.9	≥3.8	≥4.0

바이러스함유량은 시료 1ml당 값을 대수 변환하여 기재했다.

표3 안정형복합염소 제균/소취제의 인플레인자 바이러스에 대한 불활성화 효과시험

시험군	시험회수	감작시간과 바이러스 함유량의 차이		
		0	1	3(분)
대조군	1	3.5×10^4	1.4×10^5	1.0×10^5
	2	6.0×10^4	9.0×10^4	6.0×10^4
	3	8.0×10^4	8.5×10^4	1.1×10^5
	평균치	5.83×10^4	1.05×10^5	9.00×10^4
	대수교환값	4.77	5.02	4.95
10배 희석시험액	1	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	2	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	평균치	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	대수교환값	<2.00	<2.00	<2.00
	LRV	>2.8	>3.0	>3.0
15배 희석시험액	1	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	2	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	평균치	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	대수교환값	<2.00	<2.00	<2.00
	LRV	>2.8	>3.0	>3.0

바이러스함유량은 시료 1ml당 값을 기재했다.