

空気清浄機の浮遊ウイルスに対する 除去性能評価試験方法

2011年（平成23年）7月4日制定



一般社団法人日本電機工業会

空気清浄機の浮遊ウイルスに対する 除去性能評価試験方法

1. 目的

空気清浄機を運転することによる浮遊ウイルス除去の評価方法を定める。

2. 対象品目

空気清浄機を対象とする。但し、その他の品目にも準用することを妨げない。

3. 試験機関

試験は公的機関に依頼する。

- 公的機関の例
1. (財) 北里環境科学センター
 2. (財) 日本食品分析センター

4. 試験微生物

試験に用いる微生物は下記から選択する。下記では例として大腸菌ファージおよびインフルエンザウイルスを用いる例を挙げる。これ以外に適切なものがあれば追加する。

なお、WHO ガイドライン及び「国立感染症研究所病原体等安全管理規程」においてBSL 2（バイオセフティーレベル2；Biosafety Level 2）以上に区分されている微生物（インフルエンザウイルス等）の使用にあたっては、病原体等の管理と使用に関する現行の法律および指針の順守が必要である。

1) 大腸菌ファージと宿主菌：（下記のいずれかを選択）

- ① 大腸菌ファージ *Escherichia coli* phage Phi-X174 (ATCC 13706-B1、NBRC 103405 等)、宿主菌 *Escherichia coli* (ATCC 13706、NBRC 13898 等)
- ② 大腸菌ファージ *Escherichia coli* phage MS2 (NBRC 102619 等)、宿主菌 *Escherichia coli* (NBRC 3012、同 13965、同 106373 等)

2) インフルエンザウイルス A 型と宿主細胞：（下記は代表例）

- ① *Influenza A virus* H1N1(A/PR/8/34) ATCC VR-95 等
- ② *Influenza A virus* H3N2 (A/Aichi/2/68) ATCC VR-547 等

宿主細胞は、発育鶏卵または使用するウイルス株に感受性がある培養細胞（Madin-Darby canine kidney；MDCK 細胞等）とする。

ファージの種類選択にあたっては、評価目的としたヒトウイルスと代替使用するファージが各メーカーの機器に対して示す感受性をあらかじめ調べておく。その結果、ファージの感受性がヒトウイルスと同等ないし低いファージ種を用いることとする。

5. 試験方法

20m³～32 m³の試験チャンバー内に試験品を設置し、チャンバー内にファージもしくはインフルエンザウイルス懸濁液を噴霧、浮遊させる。初発（0 時間）の浮遊ファージもしくは

はインフルエンザウイルスをインピンジャーもしくはゼラチンフィルターで捕集後、試験品の運転を開始する。その後、経時的にチャンバー内の浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルスを捕集し、ファージ数もしくはインフルエンザウイルス感染価を測定する。試験品の設置位置は、取扱説明書で指定する位置による。取扱説明書に記載がない場合は、卓上形及び卓上壁掛け兼用形は壁よりの約 70 cm の台の上、かつ、設置する壁の中央に置く。床置き専用形は、壁よりの床上とする。壁掛け専用形は、下面が床上 180 cm になるようにする。いずれの場合も、設置する壁の中央に置く。

詳細を以下に示す。

1) 試験系

試験系を図 2、3 に示す。20m³~32 m³の試験チャンバー内に試験品と攪拌ファン（例：Yamazen、YBR-C-25、BS-B-25。ルーバー on にて運転）、ファージ液もしくはインフルエンザウイルス液噴霧器具をそれぞれ設置する。チャンバーの一側面には浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルス捕集口を室内の中央部床上 120 cm の 1 点に設け、浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルス捕集器具を接続する。ファージもしくはインフルエンザウイルス液噴霧器具として、ファージ液もしくはインフルエンザウイルス液を入れたジェット式ネブライザー（オムロン NE-C16 相当品、ガラス製ネブライザーも可）を使用する。浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルス捕集器具として、捕集液を入れたガラス製ミゼットインピンジャーもしくはゼラチンフィルターを使用する。

チャンバー内の温湿度条件は、ファージを使用した場合は、初期温度は 23±5°C、初期湿度は (50±10) %RH とする。インフルエンザウイルスを使用した場合は、初期温度は 20±5°C、初期湿度は 40%RH 以下とする。なお、試験中の温湿度がこの範囲を越える場合は、コントロールも同条件に合わせる。

ファージ液またはインフルエンザウイルス液の調製

①ファージ液の調製（例）

ホストを普通寒天培地（例：日水製薬社製 Code.05514）、または NA 培地（例：Difco）+0.5%NaCl で前培養した 1 コロニーを釣菌し、大腸菌用液体培地（例：NB 培地-Becton Dickinson 社製 #233000+0.5%NaCl)に植菌して、35±1°Cで、18±2 時間静置培養する。または、35±1°Cで 100rpm で 5±1 時間振とう培養する。

角型シャーレ下層培地（例：普通寒天培地、または NA 培地+0.5%NaCl を約 60mL）を作成し、培養した大腸菌液体培地 5mL（約 10^{8~9}CFU/mL）（CFU：Colony forming unit）とファージ 5mL（約 10^{5~6}PFU/mL）（PFU：Plaque forming unit）を、大腸菌とファージの比率がおおよそ 1000：1 となるよう加えて混合し、35±1°C10~20 分間静置する。この液に、硬化しない程度に暖めた（例：45~50°C）軟 NB 寒天培地（NB 培地+0.5%NaCl+0.5%寒天）10mL を添加混合し、角型シャーレ下層培地へ重層し、固定化させて倒置せずに 35±1°Cで 18±2 時間程度培養する。培養後、角型シャーレ上層をコンラージ棒を用いて、ストマッカー用袋（例：seward 社製 #BA6141 standard bags）に回収し、260RPM で 2 分間ストマッキング後、35±1°Cで 1 時間静置する。この液を別の 50mL 遠沈管に移し、3500rpm で 10 分間遠心し、上澄みをさらに別の 50mL 遠沈管に移す。

この遠心操作をさらに 2 回繰り返した後、上澄みを孔径 0.22 μm のメンブレンフィルター（例：Stericup-MILLIPORE 社製 #SCGPU02RE)でろ過し、試験ファージ原液を得る。フ

ファージ原液濃度は Phi-X174 の場合、 $10^9 \sim 10^{10}$ PFU/mL、MS2 の場合 $10^{11} \sim 10^{12}$ PFU/mL 程度とし、作成したファージ原液は、試験に供すまで凍結保存する。噴霧試験直前に、解凍し、滅菌イオン交換水で希釈し、液の表面張力を $65 \sim 69$ ($\times 10^{-3}$ N/m) に調節し、ファージ液の濃度を Phi-X174 の場合 $10^8 \sim 10^9$ PFU/mL、MS2 の場合 $10^{10} \sim 10^{11}$ PFU/mL に調製し、試験に供する。具体的には、ファージ原液を滅菌イオン交換水にて、10 倍希釈、または 100 倍希釈する。

なお、上記方法にて作成したファージ原液の使用期限は、凍結乾燥保存で、ΦX174 は 3 ヶ月、MS2 は 6 ヶ月とし、噴霧ファージ液は、その日のうちに使い切る。

なお、試験で使用するファージは、凍結・解凍標品、または乾燥標品のアンプル (0 代) を上記方法で培養した液 (1 代とする) を用い、作成すること (2 代とする)。1 代および 2 代を購入または輸送する場合は、冷凍輸送とし、輸送時に解凍されていないことを確認したもののみ使用可能とする。

② インフルエンザウイルス液の調製 (例)

発育鶏卵の漿尿膜腔に、試験インフルエンザウイルスを接種する。ふ卵器で培養後、漿尿液を採取し、 γ 糖密度勾配遠心法により精製したインフルエンザウイルス液をインフルエンザウイルス原液とする。作成したインフルエンザウイルス原液を滅菌イオン交換水もしくはリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS) にて希釈し、インフルエンザウイルス濃度を $10^6 \sim 10^7$ PFU/mL (PFU : Plaque forming unit) もしくは $10^6 \sim 10^7$ TCID₅₀/mL (TCID₅₀ : 50% tissue culture infectious dose) に調製し、試験に供する。

3) ファージ液もしくはインフルエンザウイルス液の噴霧

ファージ液もしくはインフルエンザウイルス液を入れたネブライザーに、コンプレッサーから圧縮空気を送り出し、ファージ液もしくはインフルエンザウイルス液 2mL 以上を 30 分以内で噴霧してチャンバー内に浮遊させる。

4) 浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルスの捕集

① ミゼットインピンジャーを使用した場合

捕集液として 0.015% チオ硫酸ナトリウム溶液 20mL を入れたガラス製ミゼットインピンジャーを用いる。1 回の捕集につき、毎分 5L で 2 分間 (=10L) のチャンバー内の空気を吸引し、浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルスを捕集する。なお、空気中に活性種が含まれる可能性がない場合は、上記捕集液として純水或いは緩衝液を用いても良い。

また、回収率を高めるために、インピンジャーを複数用い、前段での回収よりも後段での回収量が少なくなる条件 (例 : 直列に 4 本連結) で浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルスを捕集してもよい。インピンジャーは、一試験すべてにおいて、同一の本数で行う。

本試験において使用するミゼットインピンジャーは、JIS K3800 に準じたものとする。

② ゼラチンフィルタを使用した場合

ゼラチンフィルタにチャンバー内の空気を吸引し、ゼラチンフィルタ上にファージもしくはインフルエンザウイルスを捕集する。1 回の捕集につき、毎分 40L で 2 分間 (=80L) のチャンバー内の空気を吸引し、浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルスを捕集する。

5) 操作

表 1 の工程 (例) に従い試験を実施する。チャンバー内の攪拌ファンを作動させながら

ファージ液もしくはインフルエンザウイルス液を噴霧終了後、2分攪拌した後にチャンバー内空気から初発(0時間)の浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルスを捕集する。その後、自然減衰と試験品を運転したときのそれぞれの浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルスを捕集する。捕集する時間は最大90分、サンプリング間隔は任意、サンプリング回数は初発を含め4回以上とする。

また、製品搭載の放出系デバイスの評価を行う場合は、フィルタ有りでのデバイス評価(フィルタ、デバイス+フィルタ)の試験を追加して実施する。

6) ファージ数もしくはインフルエンザウイルス感染価の測定

①ファージ数の測定(例)

浮遊ファージ捕集後のミゼットインピンジャー内の捕集液もしくはゼラチンフィルタを滅菌イオン交換水もしくはMEM(Minimum Essential Medium)かPBS(Phosphate buffered saline)で溶かした液を試料原液とし、滅菌イオン交換水もしくはMEM、PBSで10倍段階希釈列を作製する。その試料原液または希釈液とファージ液調製時と同様の方法で大腸菌を培養した大腸菌液体培地を混合し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 10~20分間静置する。この液に、 45°C の軟NB寒天培地を添加混合し、角型シャーレ下層培地へ重層し、固定化させて上下逆さにし $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で24時間程度培養する。培養後、培地上に発生したプラークを数え、空気10Lあたりの浮遊ファージ数を求める。

②インフルエンザウイルス感染価の測定(例)

a)プラーク形成法を用いた場合

浮遊インフルエンザウイルス捕集後のミゼットインピンジャー内の捕集液もしくはゼラチンフィルタを滅菌イオン交換水もしくはMEM(Minimum Essential Medium)かPBS(Phosphate buffered saline)で溶かした液を試料原液とし、滅菌イオン交換水もしくはMEM、PBSで10倍段階希釈列を作製する。その試料原液または希釈液をMDCK(Madin-Darby canine kidney)細胞に接種する。接種したMDCK細胞は、細胞培養液とAgaroseを等量混合したものを載せ、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下で培養を行う。培養後固定染色を行い、発生したプラークを数え、空気10Lあたりの浮遊インフルエンザウイルス数を求める。

b)TCID₅₀(50% tissue culture infectious dose)法を用いた場合

浮遊インフルエンザウイルス捕集後のミゼットインピンジャー内の捕集液もしくはゼラチンフィルタを滅菌イオン交換水もしくはMEM(Minimum Essential Medium)かPBS(Phosphate buffered saline)で溶かした液を試料原液とし、滅菌イオン交換水もしくはMEM、PBSで10倍段階希釈列を作製する。その試料原液または希釈液50 μL と5%ウシ胎児血清(FBS:fetal bovine serum)を含むDMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium)に懸濁したMDCK細胞50 μL を96ウエルプレートに植え込む。その後、炭酸ガスふ卵器で培養後、顕微鏡下で細胞変性効果(CPE:cytopathogenic effect)を確認し、Reed-Muench法を用いて、空気10Lあたりの浮遊インフルエンザウイルス数を求める。

6. 結果

下記の内容を示す。

・噴霧した試験ファージ液もしくはインフルエンザウイルス液のファージ数もしくはイン

フルエンザウイルス数 [単位：PFU/mL] を示す。

- ・ 図 1 の様に浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルスに対する試験結果を示す。
- ・ 参考データとして試験時におけるチャンバー内の浮遊粒子数および温湿度を示す。
- ・ 浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルス数について、図 1 に近似式の傾き (=1 分間当たりに変化する浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルス数 (対数値) の変化) を示す。

対数値は浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルス数の桁数の変動と読みかえることができる。よって初期から t 分間で減少した浮遊ファージもしくはインフルエンザウイルス数から、①コントロール、②試験品運転で何桁 (何%) 違うかを求める。

近似式を コントロール : $y = -a_1x + b_1$ 、試験品運転 : $y = -a_2x + b_2$

y: Log(浮遊菌数 (PFU/10L-air))

x: 試験品の運転時間(分)

t 分後のコントロールと試験品運転でのウイルスの減少桁数の違い Δy は、

$$\Delta y = t(a_2 - a_1)$$

注 : 1 桁減少は 90%減少、2 桁減少は 99%減少である。計算式は以下のようになる。

$$\left[1 - \frac{1}{10^{(\text{減少桁数})}} \right] \times 100(\%)$$

何桁 (何%) 違うか求める場合は測定した時間内で行うものとし、近似式の外挿によって求めた数値での判断は行わないこと。

7. 除去効果

本試験方法によって得られる対数減少値が 2.0 以上のとき、空気清浄機の浮遊ウイルスに対する除去効果があるものと判断する。

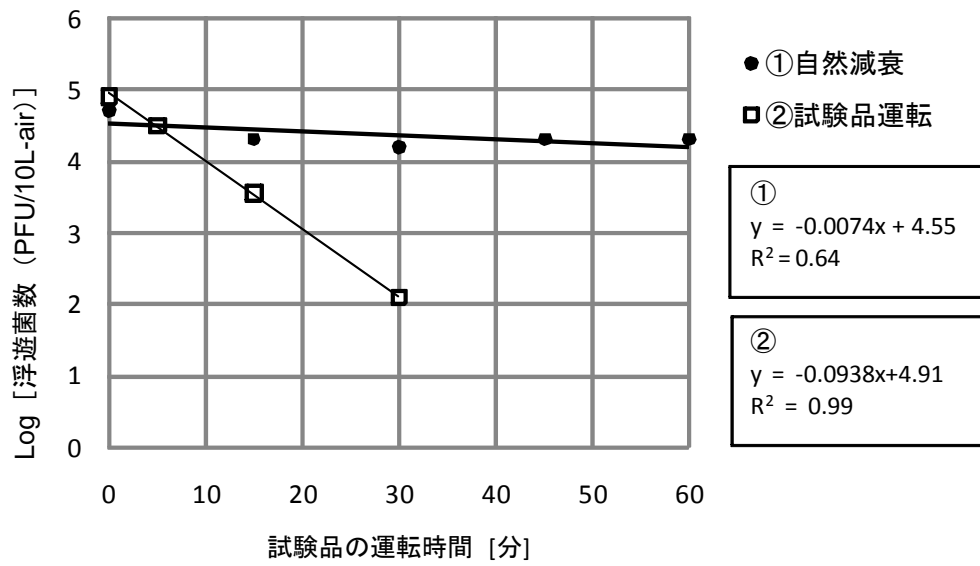


図 1. 浮遊ウイルスに対する除去性能評価試験結果

表 1. 試験工程表 (例)

試験操作	使用機器	試験品の運転時間(分)				
		0	※	※	※	90
試験チャンバー内 空気の均質化	攪拌ファン	→				
試験ウイルスの噴霧	ネブライザー	30分以内 →	2分攪拌 ↕			
試験品の運転	試験品	-----→				
浮遊ウイルスの捕集	ミゼット インピンジャー	2分 ↕ 10L	2分 ↕ 10L	2分 ↕ 10L	2分 ↕ 10L	2分 ↕ 10L

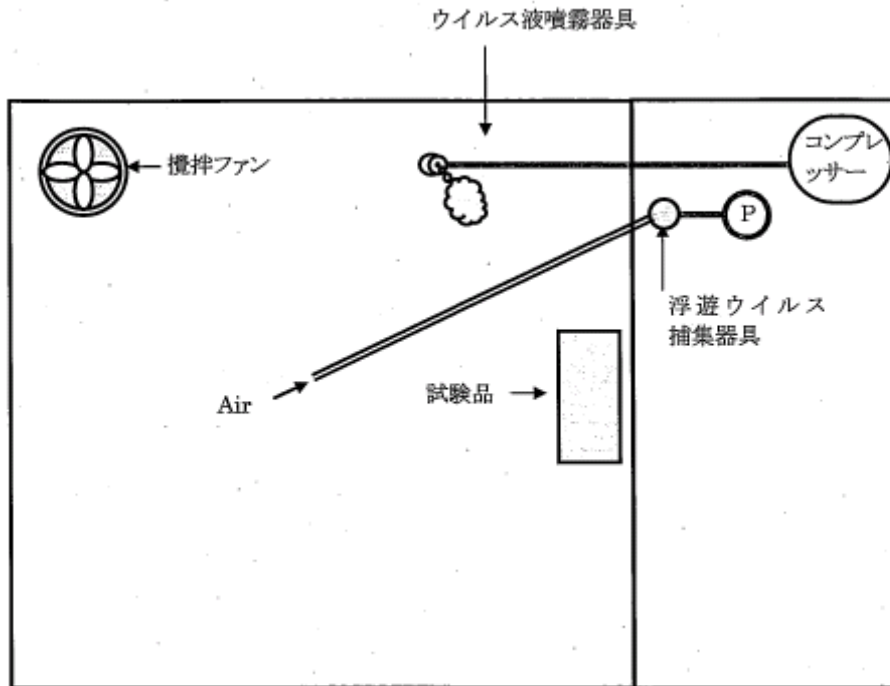


図 2. 20m³~32 m³試験チャンバーの外観（平面図）

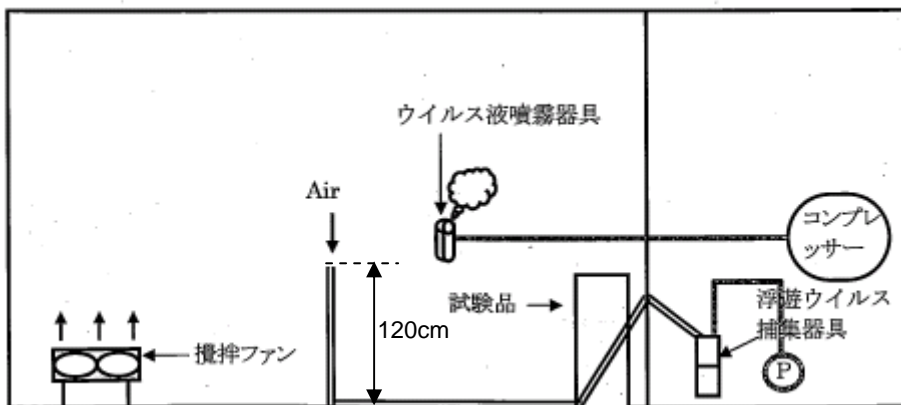


図 3. 20m³~32 m³試験チャンバーの外観（側面図）

空気清浄機の浮遊ウイルスに対する 除去性能評価試験方法 解 説

1. 目的

制定の趣旨

『空気清浄機の浮遊ウイルスに対する除去性能評価』については、国際規格、JIS 等の規格も無い状況から、各社にて、第三者試験機関の協力も交えつつ独自の試験方法により、その評価を行って来た。しかし、その試験方法等が各社で統一されていないためその効果が比較しにくく、またインフルエンザの流行により、空気清浄機のウイルスに対する除去または抑制性能が社会的に注目される様になった。そのため、その評価を業界で統一して行える様に、本除去性能評価試験方法を定め、日本電機工業会 会員各社の評価／訴求の適正化を図る。

2. 対象品目

本除去性能評価試験方法を空気清浄機以外のその他の品目にも準用する事は妨げないが、対象とする品目の特性を考慮して、試験チャンバーの大きさ及び測定時間については、品目毎に設定する。

3. 試験機関

本除去性能評価試験方法はウイルスの除去や抑制を評価することから、『家庭電気製品製造業における表示に関する公正競争規約』に準拠し、公的機関とする。

4. 試験微生物

これまでウイルスに対する性能検証は、インフルエンザウイルスを指標ウイルスとして容積 1m³ 等の密閉空間を用いて実施されてきたが、微生物的リスクの観点から、インフルエンザウイルスを広い空間に噴霧する性能検証方法は国内の評価機関で実施困難な状況である。社会的な関心の高まりもあることから、本来は対象とするウイルスを用いて性能評価を行なうべきではあるが、上記のような背景により、第三者機関での性能評価が実施困難であるため、本規定ではファージ MS2 と Phi-X174 をインフルエンザウイルスの代替ウイルスと位置づけ、試験微生物に加えている。

ファージは細菌に感染するウイルスの総称であり、人に対して感染せず、病原性を有しないウイルスである。ファージのなかには様々なタイプが存在するが、大腸菌に感染する MS2 と Phi-X174 は環境中において比較的安定であり、すでに JIS として制定されている試験法においても指標ウイルスとして用いられている。

これらのファージの大きさは直径 20~40nm 程度（正 20 面体構造）であり、インフルエンザウイルスの 100nm と比べて小さいため、ウイルスを微粒子としてみた場合でも、フィルタへの捕集効果において過大評価されることがない。

ファージとインフルエンザウイルスの感受性について比較検証した結果、ファージの感受性は、インフルエンザウイルスの感受性に比べて同等以下であることが確認されている

場合において、殺滅効果においても過大評価されることはないと考えられる。

5. 試験方法

1) 試験系

試験空間および試験品設置は JEM1467(家庭用空気清浄機)の試験空間および試験品設置に合わせることをとする。設定するチャンバー内の温湿度条件は、使用するウイルスがその条件によって死滅するなどの影響を与えない条件とする。

コントロール環境（自然減衰等）での評価を行い、ウイルスの死滅がないことを確認すること。

2) 操作

空気清浄機の適用床面積は、自然換気回数 1(1 回/h)の条件において、粉じん濃度が 1.25mg/m³の空気の汚れを 30 分間で、ビル衛生管理法に定める 0.15 mg/m³（初期濃度の 12%）まで清浄出来る室の大きさを算出しているが、ウイルスを扱う場合、初期濃度の 1%（除去率 99%）のため、捕集する時間は 30 分より延長し、最大 90 分と規定した。

3) 参考文献

ファージがインフルエンザウイルスの代替となる根拠の資料

- ・ APIC guideline for selection and use disinfectant

以 上