

# 空気清浄機の室内付着ウイルスに対する 抑制性能評価試験方法

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

# 空気清浄機の室内付着ウイルスに対する 抑制性能評価試験方法

## 1. 目的

空気清浄機を運転することによる室内付着ウイルス抑制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. 試験微生物等

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

20～32m<sup>3</sup>の試験チャンバー内に試験品および、チャンバー内にファージ液またはインフル

エンザウイルス液を付着させた滅菌ガーゼ（以下、ウイルス付着ガーゼとする）もしくはプラスチックシャーレ（以下ウイルス付着シャーレ）を設置する。初期（0時間）ウイルス付着ガーゼもしくはウイルス付着シャーレを回収後、試験品の運転を開始する。その後、経時的にウイルス付着ガーゼもしくはウイルス付着シャーレを回収し、ファージ数また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

試験系の概要を図-1～4 に示す。

### ①ウイルス付着ガーゼの場合

20～32m<sup>3</sup>の試験チャンバー内に試験品および、滅菌ガーゼを設置する。滅菌ガーゼ（例：白十字、白十字折りガーゼ滅菌済 5×5cm）はクランプ等を使用して固定する。滅菌ガーゼの設置場所は、試験品から 1.5m 以上の垂直線上の面で、床上 1.2m の位置とする。なお、試験品の風向が正面吹出しの場合で、前記滅菌ガーゼの設置場所から直径 80cm 以内に、試験品から 1.5m 以上の垂直線上の面で、風速の一番大きい点が存在する場合は、前記風速の一番大きい点を中心とした直径 80cm 内を避けた位置に移動させる。

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℃、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℃、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。

### ②ウイルス付着シャーレの場合

20～32m<sup>3</sup>の試験チャンバー内に試験品および、プラスチックシャーレを設置する。プラスチックシャーレ（例：イワキガラス製、素材：ポリエチレン、φ60mm）はアングル台等の上に置く。プラスチックシャーレの設置場所は、試験品から 1.5m 以上の垂直線上の面で、床上 1.2m の位置とする。なお、試験品の風向が正面吹出しの場合で、前記プラスチックシャーレの設置場所から直径 80cm 以内に、試験品から 1.5m 以上の垂直線上の面で、風速の一番大きい点が存在する場合は、前記風速の一番大きい点を中心とした直径 80cm 内を避けた位置に移動させる。

なお、プラスチックシャーレではなく、プラスチック片を使用しても良い。

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℃、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℃、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。

## 2) 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（一例）

ホストを普通寒天培地（例：日水製薬社製 Code. 05514、または Nutrient Agar (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+0.5%NaCl）に植菌して、35±1℃で、18±2 時間静置培養する。または、35±1℃

で 100rpm で  $5 \pm 1$  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  $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL）（CFU：Colony forming unit）とファージ 5mL（約  $10^5 \sim 10^6$ PFU/mL）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、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$  10～20 分間静置する。この液に、硬化しない程度に暖めた（例： $45 \sim 50^\circ\text{C}$ ）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  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  で  $18 \pm 2$  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、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$  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  $0.22 \mu\text{m}$  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。または、JIS T 8061 等によりファージ液を調製する。

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、または、冷蔵保存する。噴霧試験直前に、解凍し、滅菌イオン交換水で希釈し、ファージ液の濃度を  $10^6 \sim 10^7$ PFU/mL に調製し、試験に供する。

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、Phi-X174 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（一例）

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、漿尿液を採取しシヨ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  $10^6 \sim 10^7$ TCID<sub>50</sub>/mL（TCID<sub>50</sub>：50% tissue culture infectious dose）に調製し、試験に供する。

## 3) ファージ液またはインフルエンザウイルス液の試験片への接種

### ① ウイルス付着ガーゼの場合

ファージ液またはインフルエンザウイルス液 1～3mL を滅菌ガーゼに滴下しウイルス付着ガーゼを作成する。この時、試験片を持ち上げ、ウイルス液が自重で落ちないこととする。

### ② ウイルス付着シャーレの場合

ファージ液またはインフルエンザウイルス液 0.1mL をプラスチックシャーレに滴下し、マイクロチップの先端で塗り拡げ、安全キャビネット内で 20 分間乾燥させ、ウイルス付着シャーレを作成する。

#### 4) 操作

初期（0 時間）のウイルス付着ガーゼ（もしくはウイルス付着シャーレ）を回収する。その後、コントロール群と試験品運転群の各ウイルス付着ガーゼ（もしくはウイルス付着シャーレ）を回収する。試験品の運転時間は最大 24 時間、サンプリング間隔は任意、サンプリング回数は初期を含め 3 回以上とする。

また、空気清浄機に搭載した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。

#### 5) ファージ液またはインフルエンザウイルス液の回収

##### ①ウイルス付着ガーゼの場合

ウイルス付着ガーゼを滅菌ストマッカー用袋に回収し、PBS または 0.015%チオ硫酸ナトリウム等を 10mL 加えて 2-3 分間ストマッキングすることで付着ウイルスを誘出する。なお、ウイルス付着ガーゼを 50mL 遠沈管に回収し、PBS を 20mL を加えて手振り（振幅 30cm、30 回振とう）又は試験管用攪拌器（5 秒間、5 回）などで付着ウイルスを誘出してもよい。この洗い出した液を用いて、下記に示す方法でファージ数またはインフルエンザウイルス感染価を測定する。

##### ②ウイルス付着シャーレの場合

ウイルス付着シャーレに PBS 1mL を滴下し、3 分間 100 strokes/min で振とうし付着ウイルスを誘出する。この洗い出した液を用いて、下記に示す方法でファージ数またはインフルエンザウイルス感染価を測定する。

#### 6) ファージ数また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）

洗い出したファージ液を試料原液として、滅菌イオン交換水もしくは MEM、PBS で 10 倍段階希釈液を作製する。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、 $45\sim 50^{\circ}\text{C}$  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 16～24 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、ガーゼ 1 枚またはシャーレ 1 個あたりの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

洗い出したインフルエンザウイルス液を試料原液として、イオン交換水もしくは MEM (Minimum Essential Medium)、PBS で 10 倍段階希釈液を作製する。その試料原液または希釈液を MDCK 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、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  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、ガーゼ 1 枚またはシャーレ 1 個あたりのインフルエンザウイルス感染価を求める。

###### b) TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infectious dose) 法を用いた場合

洗い出したインフルエンザウイルス液を試料原液として、イオン交換水もしくは MEM、PBS で 10 倍段階希釈液を作製する。その試料原液または希釈液 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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、

ガーゼ 1 枚またはシャーレ 1 個あたりのインフルエンザウイルス感染価を求める。

## 6. 試験結果

下記の内容を示す。

- ・試験結果を表-1 の通りに示す。
- ・副生成物としてオゾンが発生するものについてはオゾン濃度を同時に測定し、50 ppb 以下であること。測定位置はウイルス付着ガーゼもしくはウイルス付着シャーレ設置場所とする。
- ・参考データとして試験時におけるチャンバー内の温湿度を示す。
- ・ウイルスの数値を下記の通り文章にて示す。

### ①試験品作動前（初期）

[単位：PFU/ガーゼ 1 枚またはシャーレ 1 個もしくは TCID<sub>50</sub>/ガーゼ 1 枚またはシャーレ 1 個]。

### ②試験品を作動させなかった場合（コントロール）

[単位：PFU/ガーゼ 1 枚またはシャーレ 1 個もしくは TCID<sub>50</sub>/ガーゼ 1 枚またはシャーレ 1 個]。

### ③試験品を作動させた場合

[単位：PFU/ガーゼ 1 枚またはシャーレ 1 個もしくは TCID<sub>50</sub>/ガーゼ 1 枚またはシャーレ 1 個]。

### ④初期ファージ数またはインフルエンザウイルス感染価からのファージ数またはインフルエンザウイルス感染価の対数減少値。

対数値はウイルス数の桁数の変動と読みかえることができる。

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

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

## 7. 抑制効果

本試験方法によってサンプリングポイントで得られる対数減少値が 2.0 以上のとき、空気清浄機の室内付着ウイルスに対する抑制効果があるものと判断する。

表 1. 空気清浄機による付着ウイルスに対する影響

[単位：PFU/ガーゼ 1 枚もしくは TCID<sub>50</sub>/ガーゼ 1 枚]

試験ウイルス	動作	空気清浄機の運転時間			対数減少値	
		0 時間	x 時間	y 時間	x 時間	y 時間
	ON	①	③	③	④	④
	OFF	①	②	②	④	④

試験品：

試験ウイルス：

風 量：

試験空間：

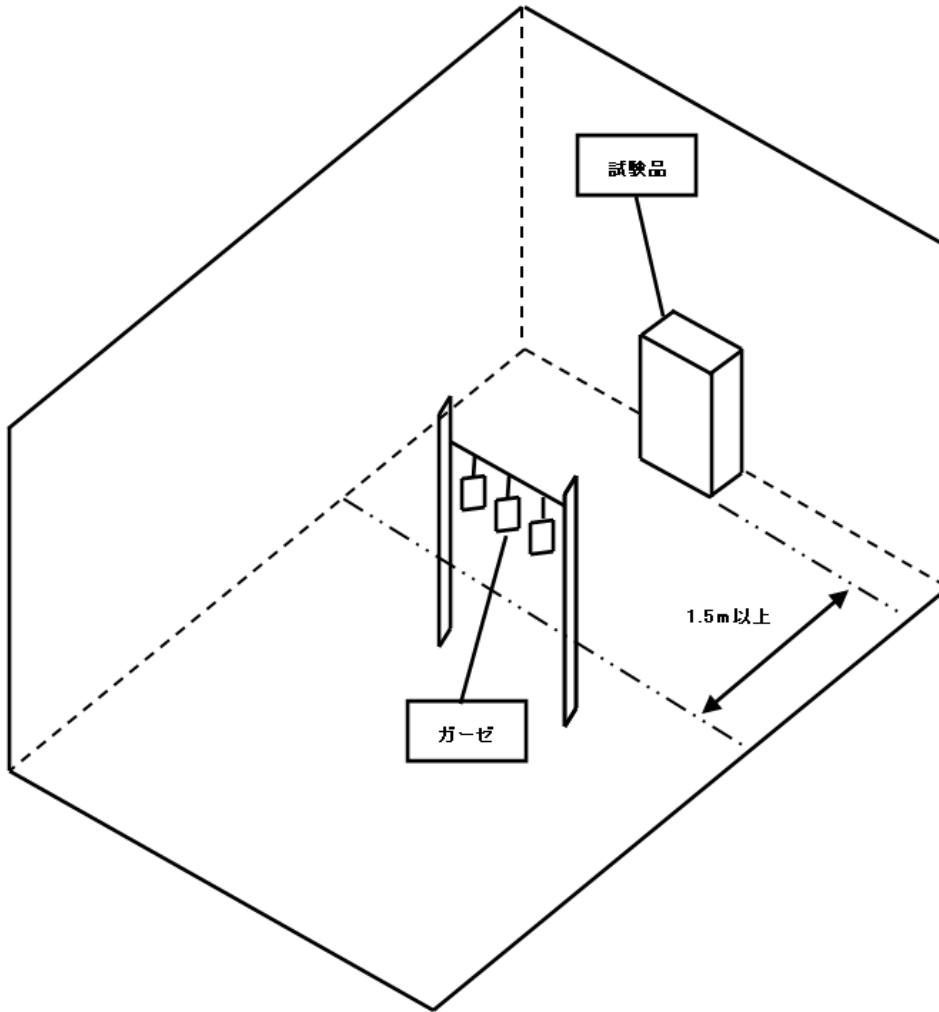


図1. ウイルス付着ガーゼの試験系概要図

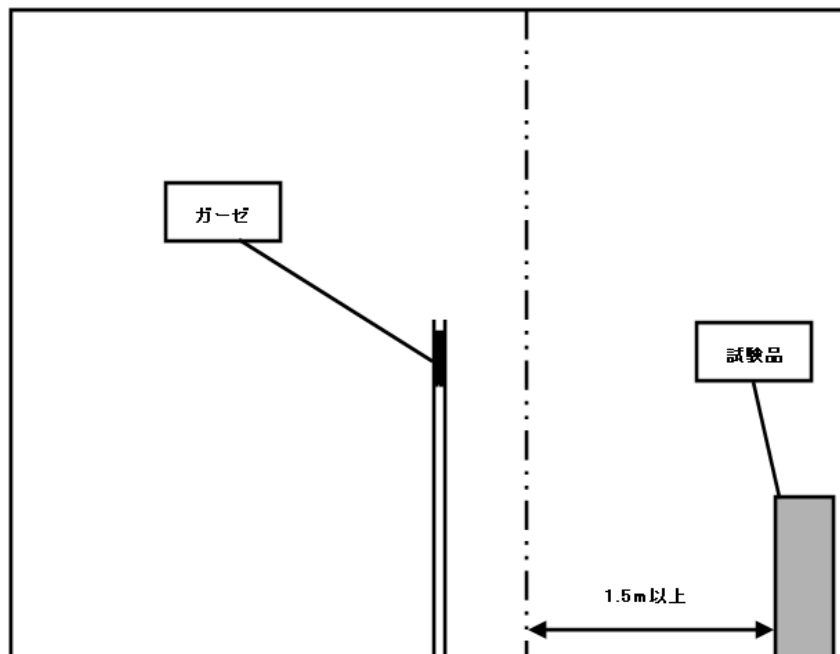


図2. ウイルス付着ガーゼの試験系側面図

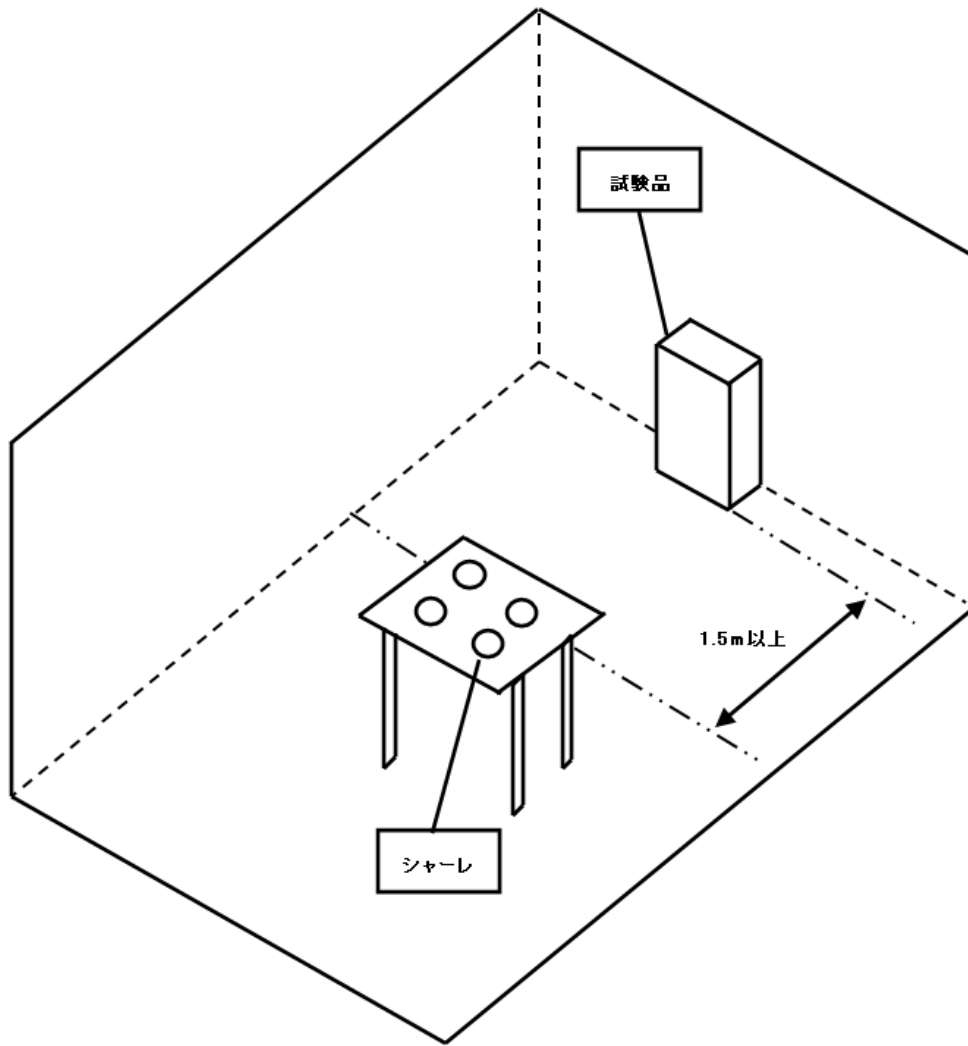


図3. ウイルス付着シャーレの試験系概要図

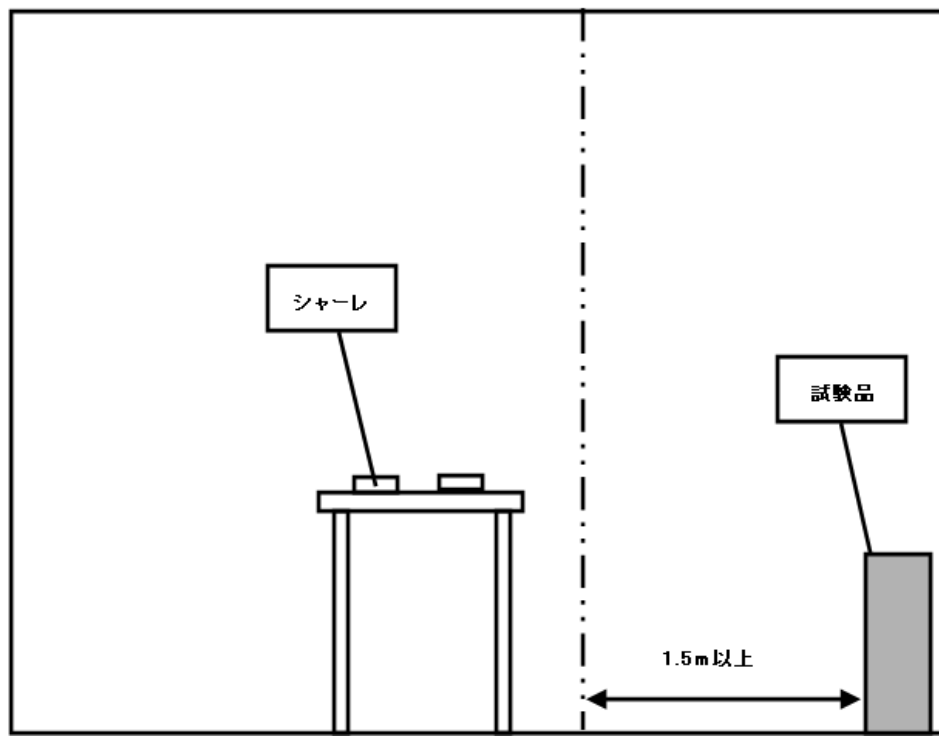


図4. ウイルス付着シャーレの試験系側面図



# 空気清浄機の室内付着ウイルスに対する 抑制性能評価試験方法

## 解 説

### 1. 目的

#### 制定の趣旨

『空気清浄機の室内付着ウイルスに対する抑制性能評価』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、本抑制性能評価試験方法基準を定め、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

本基準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

本基準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1m<sup>3</sup>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。

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にする。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

試験品の運転時間について、付着ウイルスの生存時間としては、24～48 時間、湿潤環境では 72 時間以上とされ、JIS L1902 においても 18～48 時間の試験方法があることから、最大 24 時間と規定した。

## 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