

抗ウイルス試験：新型コロナウイルス

- 試料：2020.11月4日提出 / 回答日 2020.12月28日
- 依頼者：有限会社プレゼンス
- 試験項目：抗ウイルス性試験
- 試験方法：ISO21702 / Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces
- 試験機関：一般財団法人 日本繊維製品品質技術センター 神戸試験センター 微生物試験室

【試験概要】

- 試験ウイルス：Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) / NIID 分離株：JPN/TY!WK-521 国立感染症研究所より分与
- ・ 宿主細胞：VeroE6/TMPRSS2 JCRB1819
- ・ 細胞培養液：Dulbecco's modified Eagle's medium (low-glucose) ; DMEM (SIGMA, Cat#D6046) Minimum Essential Medium Eagle ; EMEM (SIGMA, Cat#-M4655)
- ・ ウシ胎児血清：Fetal Bovine Serum (FBS) (SIGMA, Cat#I 73012)
- ・ 密着フィルム：ポリエチレンフィルム
- ・ 対照サンプル：GlossWell #360 Type Anti-Viral 味加工品
- ・ 試験サンプル：GlossWell #360 Type Anti-Viral (加工品)
- ・ 試験片の消浄化：実施なし
- ・ 試験ウイルス懸濁液接種量：0.4ml
- ・ 試験条件：作用温度 25℃
- ・ 試験条件：作用時間 24時間 (対照サンプルは接種直後もウイルス感染価を測定)
- ・ 洗い出し液：SCDLP を 2%FBS 含 DMEM で 10 倍希釈した溶液
- ・ 感染価測定法：プラーク測定法

【試験操作】

1) 本試験：

1. 宿主細胞にウイルスを感染させ EMEM を加え 37℃ で所定時間培養後、4℃ / 1,000xg で 15 分間遠心分離した上清を試験ウイルス懸濁液とする。
2. 1. で得られたウイルス懸濁液を滅菌蒸留水を用いて 10 倍希釈し、1~ 10^1 PFU/mL に調整したものを試験ウイルス懸濁液とする。
3. 滅菌シャーレの底に加工面を上にして各検体 (50mm×50mm) を置き、試験ウイルス懸濁液を 0.4ml 接種する。
4. 密着フィルム (40mm×40mm) をかぶせ、試験ウイルス懸濁液がフィルム全体に行きわたるように軽く押さえつける。
5. シャーレの蓋をかぶせる。
6. 25℃ で 24 時間、90%RH 以上の条件下で放散後、各試験検体に洗い出し液 10mL を加える。
7. 各試験検体および密着フィルムの表面を擦り、ウイルスを洗い出す。
8. 2%FBS 含 DMEM を用いて、洗い出し液を 10 倍希釈する。
9. プラーク測定法にてウイルス感染価を測定する。

2) 宿主細胞検証試験：

2)-1 細胞毒性確認試験

1. 各試験検体に洗い出し液 10mL を加え、本試験と同様に洗い出し操作を行なう。
2. 2%FBS 含 DMEM を用いて、洗い出し液を 10 倍希釈する。
3. プラーク測定法と同様に細胞を染色し、細胞毒性の有無を確認する。

2)-2 ウイルスへの細胞の感受性確認試験

1. 各試験検体に洗い出し液 10mL を加え、本試験と同様に洗い出し操作を行なう。
2. 2%FBS 含 DMEM を用いて、洗い出し液を 10 倍希釈する。
3. 上記 2. の溶液 5mL を滅菌済試験管に採る。
4. EMEM を用いて試験ウイルス懸濁液を $4\sim 6 \times 10^4$ PFU/ml に調整し、その懸濁液 0.05ml を 2. の洗い出し液に加える。
5. 25℃ で 30 分間静置する。
6. プラーク測定法にてウイルス感染価を測定し、洗い出し液 1ml 当たりのウイルス感染価を測定し、ウイルスへの細胞の感受性を確認する。

【試験結果】
1) 本試験

- ・試験ウイルス：SARS-CoV-2 NIID 分離株；JPN/TY!WK-521（国立感染症研究所より分与）
- ・試験ウイルス懸濁液濃度：1.2 x 10⁷ PFU/ml

| 検体 | | ウイルス感染価 (PFU/cm ²) (注 2) | | | 抗ウイルス活性値 【R】(注 2) |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|-------|----------|----------------------|
| | | 常用対数値 | | 常用対数値平均値 | |
| GlossWell #360 Type Anti-Viral (未加工品)(注 1) | 接種直後 【U ₀ 】 | n1 | 5.52 | 5.53 | |
| | | n2 | 5.52 | | |
| | | n3 | 5.55 | | |
| | 24 時間放置後 【U _t 】 | n1 | 5.04 | 5.04 | |
| | | n2 | 5.03 | | |
| | | n3 | 5.06 | | |
| GlossWell #360 Type Anti-Viral (加工品) | 24 時間放置後 【A _t 】 | n1 | <1.80 | <1.80 | ≥3.2 [数値解説] |
| | | n2 | <1.80 | | |
| | | n3 | <1.80 | | |

[数値解説] 抗ウイルス活性値 ≥3.2 とは：24 時間後の抗ウイルス活性値が 99.9% 又は 1/1000 以上である事を示します。

※ ISO 21072 にて合格とされる抗ウイルス活性値は ≥2.0 となりますので、今回の試験結果ではその合格値を大きく越える結果となります。

(注 1) 対照試料として、GlossWell #360 Type Anti-Viral (未加工品) (依頼者提供) を用いた。

(注 2) PFU : plaque forming units、

(注 3) 抗ウイルス活性値 R = U_t - A_t

2) 宿主細胞検証試験

- ・試験ウイルス：SARS-CoV-2 NIID 分離株；JPN/TY/WK-521（国立感染症研究所より分与）
- ・試験ウイルス懸濁液濃度：4.9 x 10⁴ PFU/ml

| 検体 | 2)-1 細胞毒性の有無 | 2)-2 ウイルスへの細胞の感受性確認 | | 試験成立の判定 |
|---|-----------------|-----------------------------------|------|---------|
| | | ウイルス感染価 (PFU/ml) (注 2) 常用対数平均値 | | |
| GlossWell #360 Type Anti-Viral (未加工品)(注 1) | 無 | 【Su】 | 2.68 | 成立 |
| GlossWell #360 Type Anti-Viral (加工品) | 無 | 【Su】 | 2.69 | 成立 |
| 陰性対照 (注 4) | 無 | 【Sn】 | 2.67 | |

(注 4) 陰性対照として SCDLP を 2%FBS 含 DMEM で 10 倍希釈した溶液を用いた。

【試験成立条件】

2-1) 細胞毒性：無し

2-2) ウイルスへの細胞の感受性確認：| S_n - S_u | ≤ 0.5 および | S_n - S₁ | ≤ 0.5

【参考情報】

○ 本試験に供したウイルス懸濁液のリアルタイム RT-PCR 測定

- ・試験ウイルス：SARS-CoV-2NIID 分離株；JPN/TY/WK.-521（国立感染症研究所より分与）
- ・ウイルス懸濁液濃度：>IOSPFU/ml
- ・リアルタイム PCR 装置：Thermal Cycler Dice Real Time System 3 (TaKaRa)
- ・検出キット：SARS-CoV-2Detection Kit -NI set-(Code NCV-301; Lot# 038200)
(TOYOBO CO.,LTD. Biotech support Department)

○ 測定結果

リアルタイム RT-PCR 測定結果 (Fig.I.) より、ウイルス RNA の増幅が確認された。

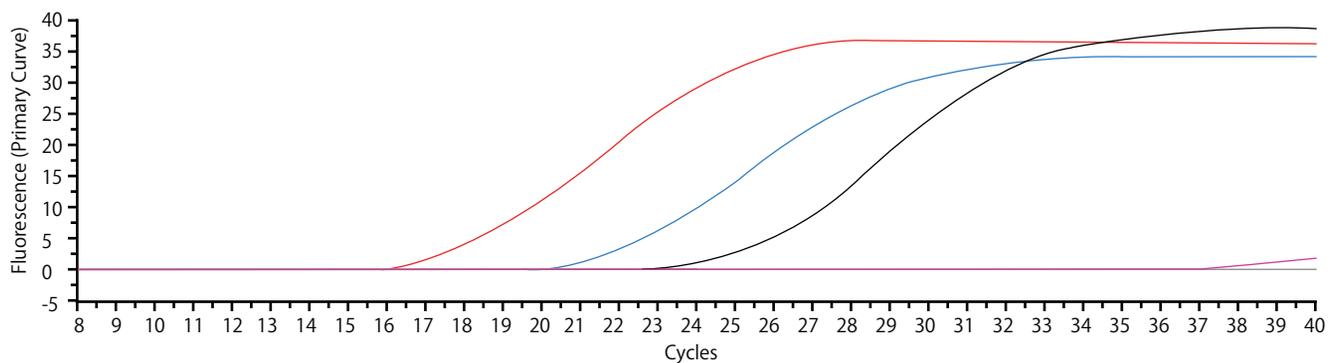


Fig.I. ウイルス懸濁液のリアルタイム RT-PCR 測定結果

- グラフ：赤線（ウイルス懸濁液濃度を PBS にて 102 倍希釈）
- グラフ：青線（ウイルス懸濁液濃度を PBS にて 103 倍希釈）
- グラフ：黒線（ウイルス懸濁液濃度を PBS にて 104 倍希釈）
- グラフ：ピンク線（Negative control ; EMEM）

○ 試験機関

一般財団法人 日本繊維製品品質技術センター 神戸試験センター 微生物試験室