

試験結果報告書

依頼者名 株式会社アルティメットスペース 殿
品名 フィルム 1点
試験項目 抗ウイルス性試験

2021年2月19日提出の試料に対する試験結果は下記の通りです。

2021年7月5日

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 射本



記

○試験概要

参考試験規格：

JIS R1756 「ファインセラミックス—可視光応答形光触媒材料の抗ウイルス性試験方法—
バクテリオファージ QB を用いる方法」

ISO 21702 「Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces」

- ・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) (NICHIREI BIOSCIENCES INC., Cat#174012)
- ・密着フィルム： ポリプロピレンフィルム (KOKUYO, Cat# VF-10)
- ・保湿用ガラス板： ほうけい酸ガラス (100mm×100mm)
- ・対照サンプル： 未加工フィルム (依頼者提出品)
- ・試験サンプル： フィルム (加工品)
- ・有機物の除去方法： 紫外線放射照度 1.0mW/cm²で 24 時間予備照射
- ・光照射条件： 1,000 Lx (白色蛍光灯 (FI20SW,ホタルクス)
*UV シャープカットフィルタ (Type B) 使用
- ・試験条件： 作用温度 23°C (BSL3 実験室内温度)、作用時間 4 時間
- ・試験ウイルス懸濁液接種量： 0.15 mL
- ・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

* この報告書は、提出の試料に対する試験結果であり、ロット全体の品質を保証するものではありません。
* 本報告書の全部又は一部の無断転用を固くお断りします。

○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°C で所定時間培養後、4°C、1,000×g で 15 分間遠心分離した上清をウイルス懸濁液とする。
2. ウイルス懸濁液を滅菌超純水を用いて 10 倍希釈し、 6.7×10^6 PFU/mL ~ 2.6×10^7 PFU/mL に調整したものを試験ウイルス懸濁液とする。
3. 滅菌済シャーレの底に滅菌済調湿用ろ紙を置き、滅菌イオン交換水を 4.5 mL 入れ、試験片と調湿用ろ紙とが触れないよう U 字ガラス管を置く。
その上に、加工面を上にして検体 (50mm×50mm) を載せる。
4. 試験ウイルス懸濁液を 0.15 mL 接種する。
5. 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。
6. 10×10 cm の保湿用ガラスをシャーレの上にかぶせる。
7. 光照射下 (1,000 Lx) または暗所で 4 時間放置後、洗い出し液 10 mL を加え試験試料からウイルスを洗い出す。
8. 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 10 mL を加え、本試験と同様に洗い出し操作を行なう。
2. 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 10 mL を加え、本試験と同様に洗い出し操作を行なう。
2. 上記の洗い出し液 5 mL を滅菌済試験管に採る。
3. EMEM を用いて試験ウイルス懸濁液を $4 \sim 6 \times 10^4$ PFU/mL に調製し、その懸濁液 0.05 mL を 2. の洗い出し液に加える。
4. 25°C で 30 分間静置する。
5. 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。

* 宿主細胞検証試験は、以下の基準を満たすことを判定基準とする。

2) - 1 細胞毒性: 無し

2) - 2 ウイルスへの細胞の感受性確認:

$$\lg(\text{対照サンプルのウイルス感染価 (PFU/mL)}) - \lg(\text{試験サンプルのウイルス感染価 (PFU/mL)}) \leq 0.5$$

* この報告書は、提出の試料に対する試験結果であり、ロット全体の品質を保証するものではありません。
* 本報告書の全部又は一部の無断転用を固くお断りします。

○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： 2.5×10^7 PFU/ml

	ウイルス感染価 (PFU/sample)			
	接種直後			
	ウイルス感染価 (常用対数値)	平均値	平均値の常用対数値	
未加工フィルム	n1	3.7×10^6 (6.57)	3.7×10^6	6.57
	n2	3.8×10^6 (6.58)		
	n3	3.7×10^6 (6.57)		

【光照射条件：1,000 Lx】

	ウイルス感染価 (PFU/sample)							
	4時間 光照射後				4時間 暗所放置後			
	ウイルス感染価	平均値	常用対数値	ウイルス感染価	平均値	常用対数値		
未加工フィルム	n1	6.5×10^4	7.3×10^4	4.87	n1	3.0×10^5	2.4×10^5	5.38
	n2	8.0×10^4			n2	1.8×10^5		
	n3	7.5×10^4			n3	2.4×10^5		
フィルム (加工品)	n1	< 100	< 100	< 2.00	n1	< 100	< 100	< 2.00
	n2	< 100			n2	< 100		
	n3	< 100			n3	< 100		
抗ウイルス活性値	【 V_{B-1000} 】 ≥ 2.9				【 V_D 】 ≥ 3.4			
光照射による 抗ウイルス活性値	【 ΔV 】 -0.5							

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： 4.4×10^4 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
		ウイルス感染価 (PFU/mL) 常用対数平均値
未加工フィルム	無	2.63
フィルム (加工品)	無	2.61
陰性対照 (注1)	無	2.63

(注1) 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。

* 洗い出し原液にて、検体の影響を受けずにウイルス感染価測定ができることを確認した。

- * この報告書は、提出の試料に対する試験結果であり、ロット全体の品質を保証するものではありません。
- * 本報告書の全部又は一部の無断転用を固くお断りします。

<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-2 NIID 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： $>10^8$ PFU/ml
- ・リアルタイム PCR 装置：Thermal Cycler Dice® Real Time System III (TaKaRa)
- ・検出キット：SARS-CoV-2 Detection Kit -N1 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.1.) より、ウイルス RNA の増幅が確認された。

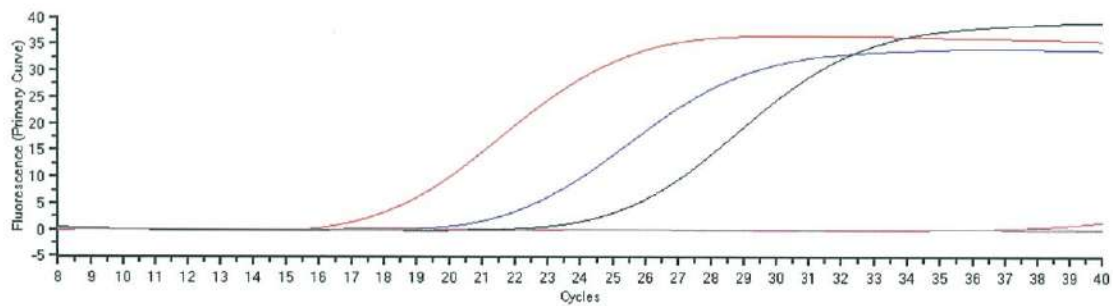


Fig.1. ウイルス懸濁液のリアルタイム RT-PCR 測定結果

- 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）

以上