

試験結果報告書

依頼者名 殿
品名 液剤 1点
試験項目 抗ウイルス性試験

2020年9月9日提出の試料に対する試験結果は下記の通りです。

2020年12月8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

- ・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#173012)
- ・対照サンプル (Negative control) : Phosphate buffered saline (PBS)
- ・試験サンプル：株式会社ワンテンスの高機能電解水(IELU)
- ・試験条件：
 - ウイルス懸濁液：試験サンプル= 1：19
 - 作用温度 25℃
 - 作用時間 1分
 - (対照サンプル；Negative controlのみ混合直後も測定)
- ・薬剤不活化剤：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

○試験方法

1) ウイルス懸濁液の調製:

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℃、1,000×g 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) 宿主細胞検証試験:

2) - 1 細胞毒性確認試験

1. 試験サンプル 1.9 mL に EMEM 0.1 mL を加え、十分に攪拌する。
これを試験液とする。
2. 薬剤不活化剤 0.9ml に試験液 0.1ml を添加し、十分に攪拌する。
3. 2%FBS 含 DMEM を用いて、10 倍希釈系列を作製する。
4. プラーク測定法にて各希釈系列の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. 試験サンプル 1.9 mL に EMEM 0.1 mL を加え、十分に攪拌する。
これを試験液とする。
2. 薬剤不活化剤 4.5ml に試験液 0.5ml を添加し、十分に攪拌する。
3. 2%FBS 含 DMEM を用いて、10 倍希釈系列を作製する。
4. EMEM を用いて $4\sim 6\times 10^4$ PFU/mL に調製したウイルス懸濁液を 3. の各希釈系列の 1/100 量添加する。
5. 室温で 10 分間静置する。
6. プラーク測定法にて各希釈系列 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:

$$\lg(\text{PBS のウイルス感染価 (PFU/mL)}) - \lg(\text{Sample のウイルス感染価 (PFU/mL)}) \leq 0.5$$

3) 本試験:

1. 試験サンプル 1.9 mL に試験ウイルス懸濁液 0.1 mL を加え、十分に攪拌する。
2. 25℃ で 1 分間静置する。これを試験液とする。
3. 宿主細胞検証試験で不活化が確認された条件で試験液を不活化する。
これを反応停止液とする。
4. 上記 3. の反応停止液を 10^0 として、2%FBS 含 DMEM で 10 倍希釈系列を作製し、反応停止液 0.1ml 当たりのウイルス感染価をプラーク測定法にて測定し、試験液 1ml 当たりのウイルス感染価を算出する。

* 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。

* 本証明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

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： 5.1×10^4 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
PBS (Negative control)	無	2.72
株式会社ワントンスの高機能電解水(IELU)	無	2.71

- * 試験液を薬剤不活化剤で 10 倍希釈することにより、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。

3) 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： 1.2×10^8 PFU/ml

検 体		試験液 1ml 当たりの ウイルス感染価 (PFU/mL) の常用対数値			Negative control との常用対数値差
		常用対数値		常用対数値平均値	
PBS (Negative control)	混合直後	n1	6.81	6.82	/
		n2	6.81		
		n3	6.85		
	1分作用後	n1	6.82	6.81	
		n2	6.80		
		n3	6.81		
株式会社ワントンス の高機能電解水 (IELU)	1分作用後	n1	< 2.00	< 2.00	≥ 4.8
		n2	< 2.00		
		n3	< 2.00		

- * 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。
- * 本証明書の一部又は全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。

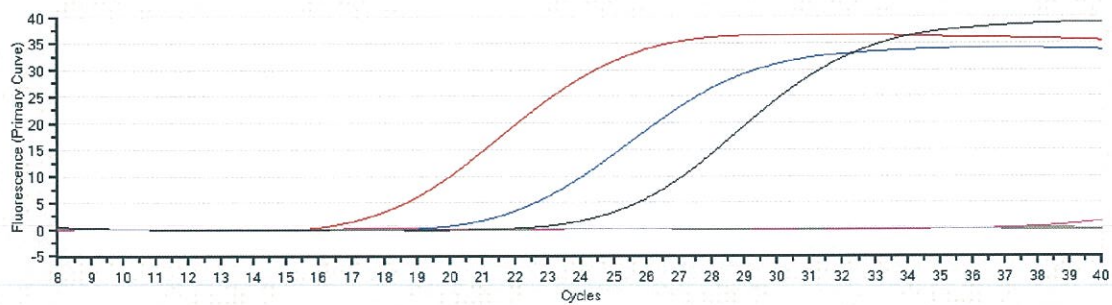


Fig.1. ウイルス懸濁液のリアルタイム RT-PCR 測定結果

- グラフ：赤線 (ウイルス懸濁液濃度を PBS にて 10^2 倍希釈)
- グラフ：青線 (ウイルス懸濁液濃度を PBS にて 10^3 倍希釈)
- グラフ：黒線 (ウイルス懸濁液濃度を PBS にて 10^4 倍希釈)
- グラフ：ピンク線 (Negative control ; EMEM)

以上

* 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。
* 本証明書の一部又は一部の無断転用を固くお断りします。