

研究開発受託報告書

南信産業株式会社 様

新型コロナウイルスを用いた抗ウイルス性能評価

神奈川県海老名市下今泉705番地の1
地方独立行政法人
神奈川県立産業技術総合研究所

理事長 鈴木 邦雄



① 仕様

- ・評価名： SARS-CoV-2を用いた抗ウイルス性能評価
- ・ウイルス接種日： 対照評価 令和3年7月7日、抗ウイルス評価 令和3年8月4日
- ・試験品の素材・種類： 繊維
- ・評価方法： JIS L 1922を準用 (②評価の方法参照)
- ・対照試料名： オーガニックコットン布
- ・抗ウイルス試料名： オーガニックコットン (1%柿渋銀イオン液処理)
- ・試験品の量： 1水準あたり0.40 g±0.05 g
- ・n数： n=3
- ・試験ウイルス： SARS-CoV-2/Hu/KngFJ/232RD5
宿主細胞：Vero細胞 (ATCC CCL-81)
- ・試験品の無菌化： オートクレーブ(121°C、20分) (ただし、抗ウイルス試料は、熱による失活が見られたため、無菌化処理は、無しとした)
- ・作用条件： 作用温度 25°C
作用時間 2時間
- ・ウイルス感染価の測定方法： プラーク法

② 評価の方法

2-1 培地

- ・細胞培養培地：イーグル培地 (EMEM) +10%非働化済み胎児ウシ血清+抗生物質
- ・ウイルス回収用培地：SCDLP培地
- ・維持培地：イーグル培地 (EMEM)
- ・寒天培地：維持培地+0.75% 細胞培養用寒天

2-2 ウイルスの培養と試験ウイルス液の調製

Vero細胞 (100%コンフルエント) を維持培地で洗浄後、SARS-CoV-2を接種する。15分毎に振盪し1時間後、維持培地を加え、37°C、5% CO₂環境下で5日間培養する。その後、凍結融解を2回行い、細胞を遠心分離で除去し、上清をウイルス原液とする。このウイルス原液を滅菌水で10倍に希釈したものを、試験ウイルス液 (約1~5×10⁶ pfu/ml) として用いる。

pfu : plaque-forming unit (プラーク法で用いられ、感染性を有するウイルス量を表す。)

2-3 対照評価

・細胞毒性の評価

バイアル瓶に対照試料および抗ウイルス試料 (0.4 g±0.05 g) を入れ、SCDLP培地10 mlを添加する。実際の回収作業と同様にボルテックスミキサーで攪拌する。この回収液を維持培地を用いて10倍及び100倍の希釈系列を作製し、それぞれ0.1 mlをVero細胞に添加し、プラーク法と同様の操作を行う。染色した細胞を目視で細胞毒性の有無を確認する。

・宿主細胞への感染に対する影響の評価

上記と同様に、回収操作を行う。この回収液を維持培地を用いて10倍及び100倍の希釈系列を作製し、それぞれに、SARS-CoV-2を加える (約4~6×10² pfu/ml)。これらの懸濁液を25°Cで30分間静置した後、プラーク法によって、ウイルスの感染価を測定し、宿主細胞への感染性の確認を行う。

2-4 抗ウイルス評価

バイアル瓶に無菌化処理をした対照試料および抗ウイルス試料 ($0.4 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$) を入れ、2-2で調整した試験ウイルス液を試験品全体に浸み込ませるように接種する（接種液量は、試験結果に記載）。フタをして、 25°C で作用させる（実際の作用条件は仕様に記載）。接種直後のものは、静置せずすぐに回収作業を行う。その後、SCDLP培地10 mlを加え、ボルテックスミキサーで試験品からウイルスを回収する。次に、この回収液を維持培地を用いて10倍の段階希釈系列を作製する。この回収原液と希釈液を用いてプラーク法によってそれぞれのウイルス感染価を測定する（図1参照）。

2-5 ウイルス感染価の測定

ウイルスの感染価の測定には、プラーク法を用いる。まず、感染させるためのVero細胞を6穴プレートに培養する（100%コンフルエント）。その後、培地を除去し、ウイルス回収原液及び段階希釈液0.1 mlを接種する。15分毎に振盪し1時間後、寒天培地3.0 mlを重層し、 37°C 、5% CO_2 環境下で5日間培養する。培養後、10%ホルマリン水溶液で固定し、寒天培地を除去する。最後に、メチレンブルー水溶液で染色し、ウイルスによって形成されたプラークの数を計測する。プラークの数、希釈倍率及びSCDLPの量より、各試料当たりのウイルスの感染価を算出する（図1参照）。

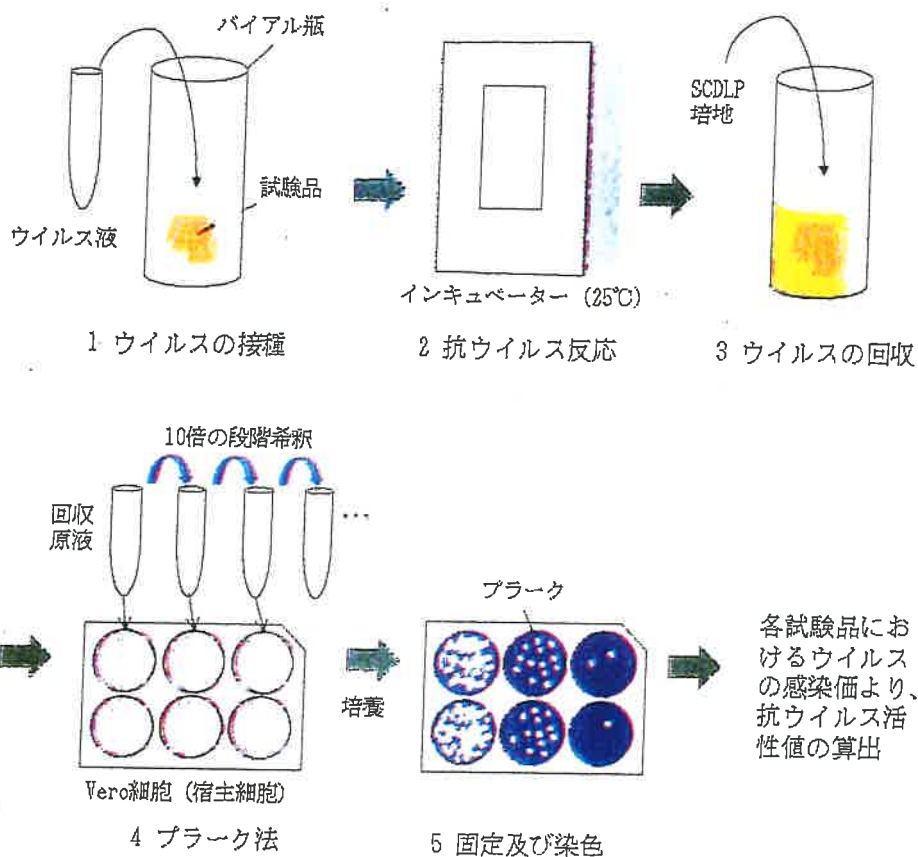


図1 抗ウイルス評価の流れ

③ 対照評価の結果

表1 対照評価の結果

対照評価 (SARS-CoV-2)	宿主細胞に 対する毒性	宿主細胞への感染 に対する影響	対照評価に基づくウイル スの検出限界濃度
オーガニックコットン布	無し	無し	10^2 pfu/sample
オーガニックコットン (1%柿渋銀イオン液処理)	無し	無し	10^2 pfu/sample

対照評価の結果、対照試料及び抗ウイルス試料からの抽出液には、細胞傷害性及びウイルス感染性に対する影響は見られなかった。SCDLP培地による中和効果も有効であった。そのため、ウイルスの検出限界値を、 1.0×10^2 pfu/sampleとした。

④ 抗ウイルス評価の結果

表2 抗ウイルス評価の結果

抗ウイルス評価 (SARS-CoV-2)	ウイルス感染価 (pfu/sample) ^{*1}		M _v : 抗ウイルス活性値 ^{*2}
	接種直後	25°C、2時間	25°C、2時間
オーガニックコットン布	2.7E+05	5.0E+04	—
	2.3E+05	5.0E+04	
	2.4E+05	4.3E+04	
オーガニックコットン (1%柿渋銀イオン液処理)	—	<10 ²	3.4
	<10 ²		
	<10 ²		

・接種ウイルス液の感染価: 1.8×10^6 pfu/ml

・接種量: 0.2 ml/sample

*1 "E+05" とは " $\times 10^5$ " を表す。

*2 抗ウイルス活性値 $M_v = \log(V_a) - \log(V_p)$

$\log(V_a)$: 対照試料における接種直後のウイルス感染価常用対数値の平均値

$\log(V_b)$: 対照試料における作用時間後のウイルス感染価常用対数値の平均値

$\log(V_p)$: 抗ウイルス試料における作用時間後のウイルス感染価常用対数値の平均値

注: $\log(V_a) - \log(V_b) < 1.0$ 、かつ $\log(V_a) > \log(V_p)$ のため、 $\log(V_b)$ の代わりに $\log(V_p)$ を用いて計算を行った。

抗ウイルス評価の結果、抗ウイルス試料であるオーガニックコットン(1%柿渋銀イオン液処理)は、SARS-CoV-2に対して、十分な抗ウイルス効果※を有していることが明らかとなった。抗ウイルス活性値は、「3.4 (ウイルスの減少率=99.96%)」であった。

※JIS L 1922における抗ウイルス効果の目安

抗ウイルス活性値 (M_v) 3.0 > M_v > 2.0: 効果あり

抗ウイルス活性値 (M_v) M_v ≥ 3.0 : 十分な効果あり

⑤ プラークの写真

試験品からSCDLPによる抽出を行い、その原液、10倍希釈、100倍希釈したものを、それぞれ0.1 mlずつ宿主細胞に接種した時のプラークの写真を示す。1つのプラークは、感染性のある1個のウイルスより形成されるため、プラークの数を数えることで、ウイルスの感染価を測定することができる。

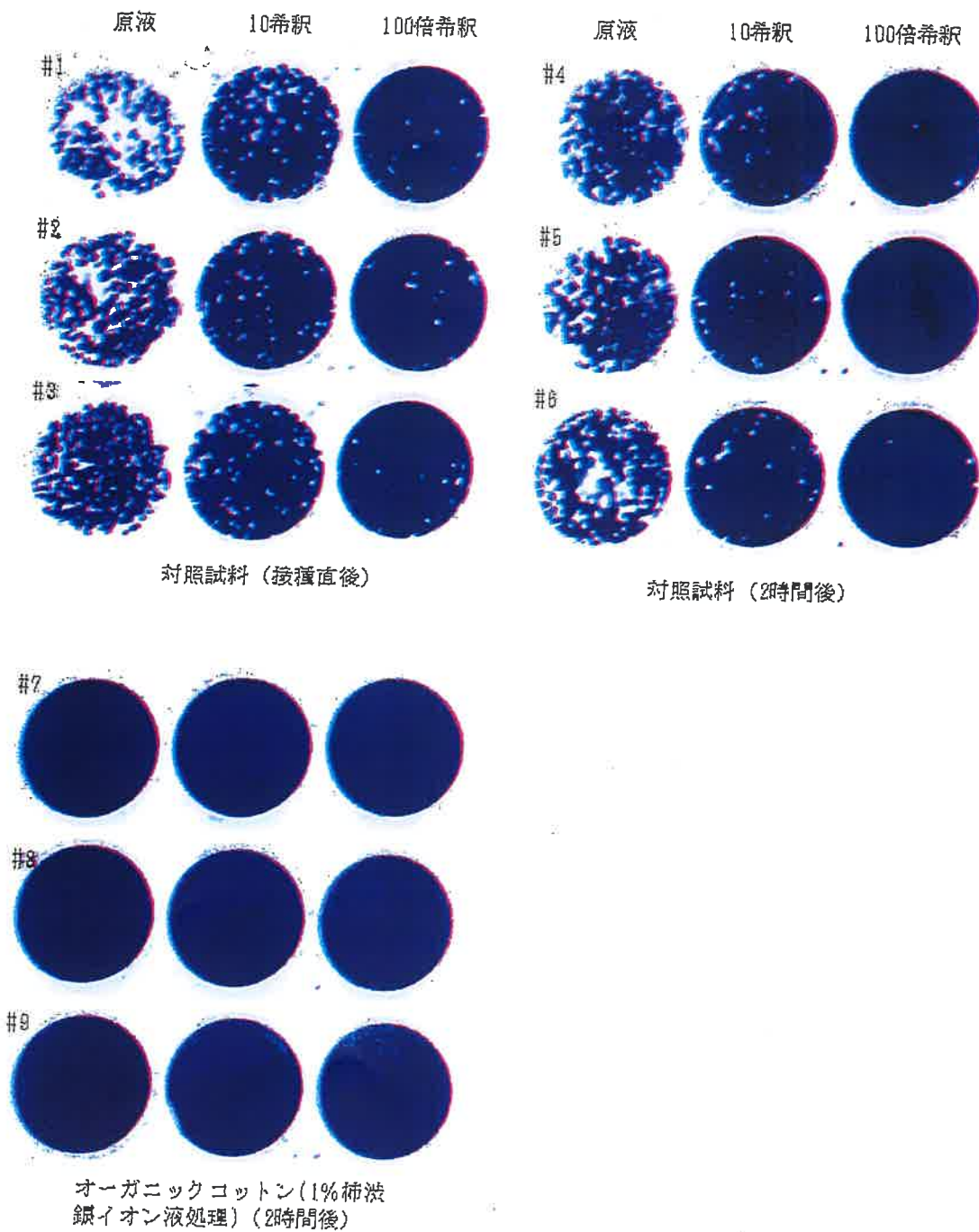


図2 SARS-CoV-2によって形成されたプラークの写真