

I

ISO18184 を用いた SARS-CoV-2 に対する Acrylic with Clean Max II の殺ウイルス活性のテスト

Virology Research Services Ltd が作成した報告書。

青島宏順貿易有限公司

2701 号室、NO. 青島市李滄区 28 号 2 号ビル 25 層 2701 室 青島市李滄区 28 号 2 棟 25 層 2701 室

中国

プロジェクト番号：CM01 文書番号：CM01

実験開始日：2021 年 3 月 9 日 報告書作成日：2021 年 3 月 17 日 実験開始日：2021 年 3 月 9 日 報告日：2021 年 3 月 17 日

概要

目的 1

この研究では、SARS-CoV-2 に対する、接触時間 2 時間の Acrylic with Clean Max II の抗ウイルス活性を、無処理の基準コントロールと比較して検証する。

方法

ISO18184 は、繊維素材の抗ウイルス性を定量化するための標準手順である。この手順では、あらかじめ決められた濃度のウイルスをテスト素材と検査対象布素材に分注し、室温で 2 時間培養した。

次に、サンプルを媒質で洗浄して回収し、各懸濁液中の感染性ウイルスの量を測定しました。

各懸濁液中の感染性ウイルスの量 TCID₅₀ 試験方法を用いて定量した。この培養が有効であるためには、被験物質がウイルスの定量に用いた細胞に対して細胞毒性を示さないこと、および細胞の感染感受性を阻害しないことが必要である。

結果

被験物質は、ウイルスの定量化に用いた細胞に対して細胞毒性活性を示さなかった。参照対照試料に対して、細胞毒性活性は検出されなかった。培地だけのサンプルには細胞毒性は認められなかった。

目的 2

ISO18184:2019 に準拠して、SARS- CoV-2 に対する Acrylic with Clean Max II の 2 時間の接触時間における殺菌活性を基準コントロールと比較して試験する。

メソッド

試験方法の有効性に関するコントロールテスト

試験方法が有効であるためには、被検物質が、ウイルスの定量に用いる細胞に対して細胞毒性を示さないこと、また、細胞の感染感受性を阻害しないことが必要である。これらの基準を満たす2つの試験を以下に示す。

細胞毒性のコントロール。被検物質は培養の宿主細胞に対して細胞毒性を示すか。

培養液を被検物質と比較対照物質に5分間添加した後、回収し、96ウェルプレートのウェルに播種した単層の細胞に添加する。その後、細胞を培養し、10日後に増殖培養（クリスタルバイオレット染色）により細胞の生存率を測定します。試験は、被検物質と未処理のリファレンスコントロール（検査対象布）の両方について、3連で実施する。

被検物質と対照物質のどちらとも接触していないメディアは、参照用として含まれる。試験が有効であるためには、培地と比較して細胞毒性効果が観察されないことが必要である。

感度管理。被検物質は培養細胞のウイルスに対する感受性に影響を与えるか？

培養液を試験材料とリファレンスコントロールに5分間添加した後、チューブに回収する。次に、培養媒体を材料にさらすことが細胞の感染感受性に影響を与えるかどうかを調べるために、 0.5×10^6 個の感染単位（IU）のウイルスを各チューブに添加する。室温で30分間孵化した後、各サンプルに含まれる感染性ウイルスの量を定量する（TCID₅₀ 培養）。50%組織培養感染量（TCID₅₀）は、感染した試験細胞の50%が死滅する終点のウイルス希釈率である。

試験は、被検物質および基準物質を用いて3重に実施する。どちらの材料にも接触していない培地もウイルスと一緒にインキュベート（孵化）する。

細胞毒性がなく、材料が宿主細胞の感染感受性を阻害しない場合、この試験法はISO18184の要件を満たしていると考えられ、試験材料の抗ウイルス活性を立証するために使用することができる。

抗ウイルス薬試験の手順

試験布と対照布をそれぞれチューブに入れ、3回に分けて試験を行った。200 μ l のウイルス（濃度 1×10^7 IU/ml）を各布地の上に加え、布地がウイルス溶液に完全に浸るようにした。各チューブに蓋をして、室温で指示された接触時間だけ培養した。培養終了後、サンプルを培地で数回洗浄し、ウイルスを回収した。各サンプルから回収した感染性ウイルスの量を、TCID₅₀ で定量した。

TCID₅₀ で定量した。

さらに、対照として、基準対照物質の3つのサンプルにウイルスを加え、直ちに洗浄して回収した（「ウイルス回収対照」と呼ぶ）。この回収したウイルスを用いて、開始時のウイルス量を定量した。接種直後のリファレンスから回収したウイルスと、接触時間後のウイルスとの差は、1 log 未満でなければならない（付録表 5 参照）。

TCID₅₀ 決定

ウイルスを含む洗浄液からの 7 点、10 倍の連続希釈液を、各サンプルについて、African Green Monkey Kidney Epithelial (Vero) で 4 重に試験した。3 日後、希釈系列全体の細胞生存率を決定するために、生存率クリスタルバイオレットアッセイを実施した。細胞の 50% が感染／死滅する希釈率（TCID₅₀）を Reed and Muench 法を用いて算出した。

抗ウイルス活性の定量化

試験が有効と判断された場合、抗ウイルス活性（M_v）を以下のように算出する。

$$M_v = \text{Log}(V_a) - \text{Log}(V_c)$$

ここで、Log(V_a)は、接種直後の基準検体から回収した感染ユニット数の共通対数の平均値。Log(V_c)は、培養時間終了時に抗ウイルス試験片から回収した感染ユニット数の共通対数の平均値である。

2.0 > M_v ≥ 1.0 の場合は、軽度の抗ウイルス効果を示す。3.0 > M_v ≥ 2.0 の場合は、良好な抗ウイルス効果を示す。M_v ≥ 3.0 は優れた抗ウイルス効果を示す。

主要な試験情報

このページでは、ISO18184:2019 の試験プロトコルの結果を報告する際に必要となる
主要な追加情報を提供します。

<試験片>

試験サンプル。CLEAN MAX II を使用したアクリル繊維

基準対照。 ポリエステル サイズ・形状・厚さ: 20 × 20mm 角、0.4g

ウイルス・細胞 ウイルスの種類 SARS-CoV-2

宿主細胞 アフリカミドリザル腎臓上皮細胞 (Vero)

試験用接種液 容量: 200 μ l ウイルス培養力: 1×10^7

接触時間 2 時間

標準手順からの逸脱 なし

試験機関 Virology Research Services Ltd, ロンドン

結果

コントロール実験

コントロール実験の概要を付録にまとめた。

被験物質は、この実験でウイルスを宿主とした細胞に対して細胞毒性を示さない。被験物質は、この実験でウイルスを宿主とするために用いられた細胞に干渉しない。

抗ウイルス剤のテスト

表 2. ウイルスとの接触時間が 2 時間の場合に、試験材料と基準対照材料から回収された 1ml あたりの平均感染単位。

Test Condition	Virus recovery control (TCID50/sample)	Antiviral test (TCID50/sample)
Test	NA	1.71E+03 ± 1.37E+03
Reference	2.78E+06 ± 8.90E+05	2.14E+03 ± 3.65E+02

表 2. ウイルスとの接触時間が 2 時間の場合に、試験材料と基準対照材料から回収された 1ml あたりの平均感染単位。

Test Condition	TCID50 (log10)	Mv Value	% reduction
Test Control	3.23 6.44	3.21	99.9%

1.00 E+ 07 1.00 E+ 06 1.00 E+ 05 1.00 E+ 04 1.00 E+ 03 1.00 E+ 02 1.00 E+ 01 1.00 E+ 00

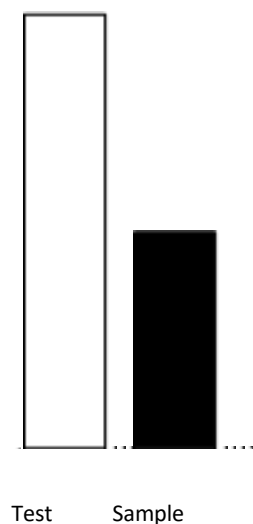


図 1. SARS-CoV-2 をテストサンプルに 2 時間接触させた後、コントロール材料をすぐに採取した場合の平均 TDIC50/サンプル値。エラーバーは平均値の標準誤差。

結 論

The results of control assays confirm that the tested material is not cytotoxic for the test cells.

コントロールアッセイの結果から、被験物質が試験細胞に対して細胞毒性を示さないことが確認された。