

# 試 験 成 績 書

No.20-124751  
2020年12月11日

ケミカルデザイン有限公司 御中

〒533-0014  
大阪市東淀川区豊新3-12-23  
株式会社 ユニオンバイテック  
TEL 06-6327-8451  
FAX 06-6327-5785

## ウイルス不活化試験結果

(細胞毒性および感染阻害作用の確認試験を含む)

### 1. 検 体

2020年10月16日受取 計1点  
高濃度銀イオン水 10<sup>6</sup> μg Ag<sup>+</sup>

### 2. 試験目的

検体の不活化ウイルスに対する不活化効果を確認する。

(補注) 不活化ウイルスは、細胞培養系が確立されていないウイルスの代替ウイルスとして広く用いられている。

### 3. 試験材料

#### (1) 試験ウイルス

*Feline calicivirus* F-9 ATCC VR-782 (不活化ウイルス)

#### (2) 使用細胞

CRFK 細胞 ATCC CCL-94

#### (3) 使用培地

細胞増殖培地：10%の胎仔血清 (10%FBS) 加イ-グル MEM 培地

細胞維持培地：2%の胎仔血清 (2%FBS) 加イ-グル MEM 培地

#### (4) 中和液

10%の胎仔血清 (10%FBS) 加イ-グル MEM 培地 (細胞増殖培地と同じ)

#### 4. ウィルス浮遊液の調製

##### (1) 細胞の培養

CRFK 細胞を、組織培養用75ml内に単層培養する。

##### (2) ウィルスの接種

単層培養した75ml内から細胞増殖培地を除き、試験ウィルスを接種する。接種後、細胞維持培地を加えて、37℃の炭酸ガスインキュベーター（CO<sub>2</sub>濃度 5%）で 1～2 日間培養する。

##### (3) ウィルス浮遊液の調製

培養後、ほぼ全ての細胞に変性が生じたことを倒立位相差顕微鏡で確認する。培養液および細胞を回収したのち、-80℃（超低温フリーザー）および 25℃（温浴）で凍結融解を 3 回繰り返す。この液を遠心分離（400×g、15 分間）し、得られた上清をウィルス浮遊液とする。

#### 5. 予備試験(1) 細胞毒性の確認試験

##### 5.1 試験方法

- ① 検体を、中和液で 10 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍に希釈する。
- ② CRFK 細胞を単層培養した 96 ウェルマイクロプレートから細胞増殖培地を除き、これに細胞維持培地 0.1mL を加える。
- ③ このマイクロプレートの 1 列（8 ウェル）に、①の各希釈液を 0.1mL ずつ加える。また対照として、中和液 0.1mL を 8 ウェルに加える。これを、37℃の炭酸ガスインキュベーターで 4～7 日間培養する。
- ④ 培養期間中、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞を観察し、細胞変性（形態変化や剥離）が認められたものを細胞毒性ありと判定する。

##### 5.2 試験結果

表 1. 細胞毒性の確認試験結果

検 体	検体の希釈倍率				細胞変性の無かった最低希釈倍率
	10 倍	100 倍	1000 倍	10000 倍	
高濃度銀イオン水 10 <sup>4</sup> ppm Ag <sup>+</sup>	----- ----- (0/8)	----- ----- (0/8)	----- ----- (0/8)	----- ----- (0/8)	10 倍
対 照 (中和液)	中和液による細胞変性はなかった (0/8)。				

＋：細胞変性あり   －：細胞変性なし   （）：細胞変性ウェル/8ウェル

##### 5.3 細胞毒性試験まとめ

検体は、中和液で 10 倍希釈すれば、細胞毒性は認められなかった。

## 6. 予備試験(2) ウィルス感染阻害作用の確認試験

### 6.1 試験方法

- ① 検体を、細胞毒性が認められなくなるレベルまで、中和液で希釈する（本試験の場合、表 1.の結果より、10 倍希釈とする）。
- ② この希釈液 10mL に、ウィルス浮遊液 0.1mL を接種して 10 分間静置する。また対照として、中和液 10mL にウィルス浮遊液 0.1mL を接種し、10 分間静置する（これらウィルス作用液とする）。静置後、ウィルス作用液を中和液で 10 倍段階希釈する。
- ③ CRFK 細胞を単層培養した 96 ウェルマイクロプレートから細胞増殖培地を除き、これに細胞維持培地 0.1mL を加える。
- ④ このマイクロプレートの 1 列（8 ウェル）に、②の各段階希釈液を 0.1mL ずつ加え、37°Cの炭酸ガスインキュベーターで 4~7 日間培養する。
- ⑤ 培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞変性の有無を観察する。その結果をもとに、Reed-Muench 法によりウィルス感染価（TCID<sub>50</sub>/mL）を算出する（表 2.参照）。
- ⑥ 対照とウィルス作用液の感染価に 0.5 log 以上の差がなければ、試験ウィルスの細胞への感染に阻害作用がないと判定する。

### 6.2 試験結果

表 2. ウィルス感染阻害作用の確認試験結果

検 体	希釈倍率	ウィルス作用液の希釈倍率 (10 <sup>-n</sup> )					感染価
		3	4	5	6	7	
対 照 (中和液)	/	++++	++++	++++	+--+	-----	7.2
		++++ (8/8)	++++ (8/8)	++++ (8/8)	+--+ (5/8)	----- (0/8)	
高濃度銀イオン水 ゲン Ag <sup>+</sup>	10	++++	++++	++++	+--+	-----	6.8
		++++ (8/8)	++++ (8/8)	++++ (8/8)	+--+ (3/8)	----- (0/8)	

+：細胞変性あり -：細胞変性なし ( )：細胞変性ウェル/8ウェル  
感染価：ウィルス作用液 1mL あたりの log TCID<sub>50</sub>

### 6.3 ウィルス感染阻害作用まとめ

検体の希釈液と対照とのウィルス作用液の感染価差は、0.5log 未満であった。これより、検体は細胞毒性のないレベルにまで希釈すれば、試験ウィルスの細胞への感染にも阻害作用は生じないことが確認された。

## 7. ウィルス不活化試験

### 7.1 試験方法

- ① 検体 9.9g に、ウィルス浮遊液 0.1mL を接種する。
- ② 接種して 1 分、5 分、15 分後に、その 0.2g を採取して中和液 1.8mL で希釈する。この希釈液を、さらに中和液で 10 倍段階希釈する。
- ③ 対照として、検体を滅菌精製水に代えて同様にウィルス浮遊液を接種し、接種直後および 15 分後に、中和液で 10 倍段階希釈する。
- ④ CRFK 細胞を単層培養した 96 ウェルマイクロプレートから細胞増殖培地を除き、これに細胞維持培地 0.1mL を加える。
- ⑤ このマイクロプレートの 1 列（8 ウェル）に、②、③の各段階希釈液を 0.1mL ずつ加え、37°C の炭酸ガスインキュベーターで 4～7 日間培養する。
- ⑥ 培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞変性の有無を観察し、その結果をもとにウィルス感染価を算出する。

### 7.2 試験結果

次ページ表 3. に記載。

### 7.3 まとめ

試験ウィルス	検 体	作用時間	抗ウィルス活性値
コロナウィルス	高濃度銀イオン水 10 <sup>7</sup> CFU Ag <sup>+</sup>	1 分	4.8
		5 分	>5.9
		15 分	>5.9

【参考】JIS L 1922:2016 繊維製品の抗ウィルス性試験方法の判定基準

抗ウィルス活性値	効果の説明
2.0 ~ 3	効果あり
≥ 3.0	十分な効果あり

表3. ウィルス不活化試験結果

検 体	作用 時間	検体の希釈倍率 (10 <sup>-n</sup> )								感染価	抗ウィルス 活性値*	
		1	2	3	4	5	6	7	8			
対 照 (滅菌精製水)	接種 直後	++++ ++++ (8/8)	++++ ++++ (8/8)	++++ ++++ (8/8)	++++ ++++ (8/8)	++++ ++++ (8/8)	++++ ++++ (8/8)	++-- ++++ (6/8)	--+-- ---- (1/8)	---- ---- (0/8)	7.4	-
	15分	++++ ++++ (8/8)	++++ ++++ (8/8)	++++ ++++ (8/8)	++++ ++++ (8/8)	++++ ++++ (8/8)	++++ ++++ (8/8)	+++-- +++-- (6/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	7.3	-
高濃度銀イオン水 10 <sup>7</sup> Ag <sup>+</sup>	1分	++++ ++++ (8/8)	---- ----+	---- ----	---- ----	---- ----	---- ----	---- ----	---- ----	---- ----	2.6	4.8
	5分	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	<1.5	>5.9
	15分	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	---- ---- (0/8)	<1.5	>5.9

+: 細胞変性あり - : 細胞変性なし ++: 細胞毒性による細胞変性あり ( ): 細胞変性ウイルス/8ウイルス 感染価: 検体 1g あたりの log TCID<sub>50</sub>

\*抗ウィルス活性値 = 対照の接種直後のウィルス感染価 - 検体のウィルス感染価

以 上