

株式会社 シマニシ科研 御中

# 新型コロナウイルス不活化試験 結果報告書

令和3年6月

株式会社グッドアイ

〒376-8515 群馬県桐生市天神町1丁目5番地1号

TEL : 0270-46-9277 FAX : 0277-46-9275

## ウイルス不活化評価結果報告書

2021年6月15日

責任者： 株式会社グッドアイ 板橋英之

依頼主：株式会社 シマニシ科研

被検体： シーマロックス 150 倍希釈液(TR-150)

被検体の製法：独自製法

コントロール：反応時間 0 分のウイルス溶液

リファレンス： 水道水

ウイルス：新型ヒトコロナウイルス (SARS-CoV-2 WK-521)

ウイルス力価 (原液) :  $3.6 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> / mL

細胞：Vero 細胞 (株番号：JCRB0111、培地組成：10%血清(FBS)DMEM)

### 試験概要：

検体に対してウイルス液を混合させ、反応時間後にウイルス液を採取し、細胞へ感染させ感染性ウイルス量を測定する。

### 試験方法：

#### 1. ウイルスの準備

Vero 細胞を  $3.0 \times 10^5$  cells/mL に調整後、10mL を 75 cm<sup>2</sup> のティッシュカルチャーに注ぎ、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% のインキュベーターで 1 日培養後、 $10^5 \sim 10^6$  TCID<sub>50</sub> /mL 程度の SARS-CoV-2 を 100 μL 播種した。その後、CO<sub>2</sub> 濃度 5% のインキュベーターで 3 日間培養後、TCID<sub>50</sub> 法に基づきウイルス力価を測定した。

#### 2. 細胞の準備

Vero 細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/mL に調整後、96well plate に 100 μL/well ずつ播種し、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% のインキュベーターで 1 日培養した。

#### 3. 被検体の準備

各被検体 975 μL を 24well plate に播種した。

#### 4. ウイルスと検体の反応

ウイルス液 25 μL を被検体に混合し反応させた。反応時間は 1 分で実施した。その後、反応を停止させるため、ウイルス混合液 100 μL を無血清の DMEM 培地 900 μL に添加した。

なお、ウイルスと検体の反応は、室温 23°C、湿度 44% のキャビネット内で行った。

## 5. Vero 細胞への添加と培養

3.で希釈した液を 1.で準備した細胞に 1 被検体・1 反応時間あたり 3well ずつ 100  $\mu$  L/well 播種した。37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%のインキュベーターで 1 日間培養した後、感染性ウイルス量を測定し、各被検体の抗ウイルス活性を評価した。

結果：

コントロールのウイルス感染価を 100 とした場合の各検体におけるウイルス感染価

反応時間 0 分におけるウイルス感染価に対して、1 分後に 0.6%まで、ウイルス減少が確認された。

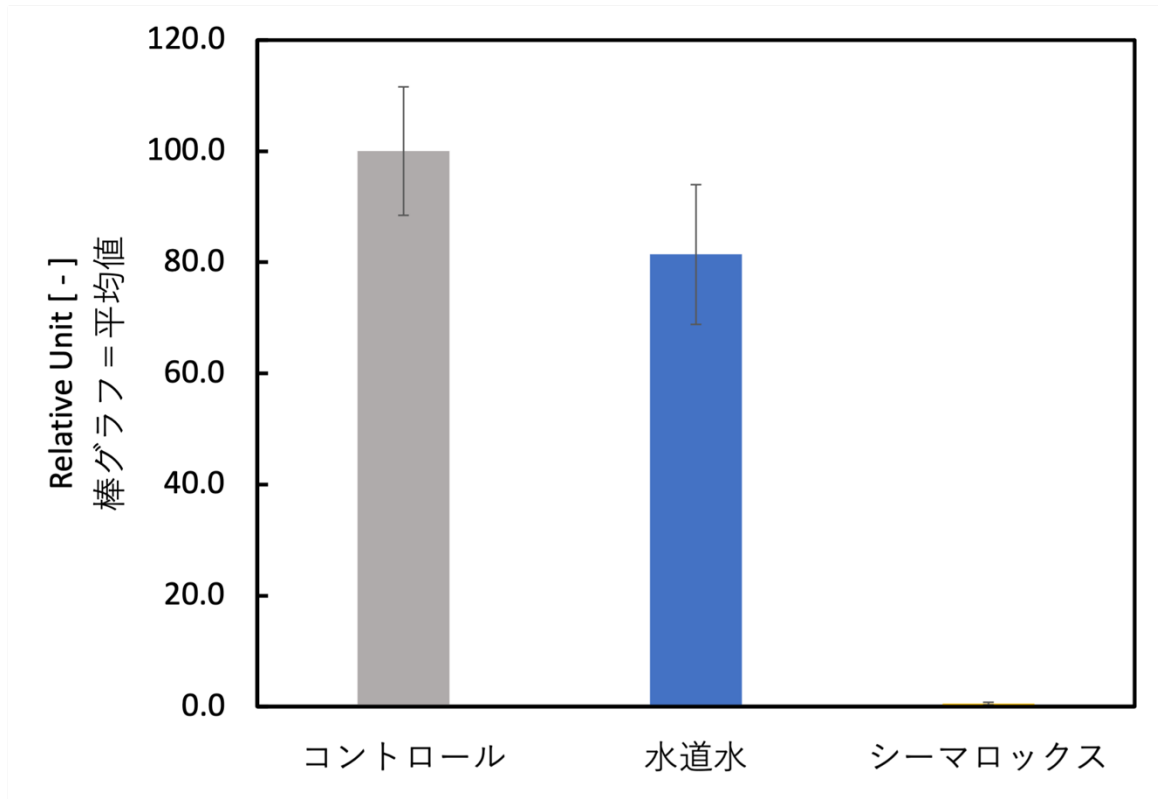


Fig1. コントロールのウイルス感染価を 100 とした場合の各検体におけるウイルス感染価

Table 1 コントロールのウイルス感染価を 100 とした場合の各検体におけるウイルス感染価

試料名	コントロール	水道水	シーマロックス 150 倍希釈液 (TR-150)
平均値	100.0	81.4	0.6
標準誤差 SE	11.5	12.6	0.3

コントロールに対する各検体でのウイルス減少率

反応時間0分におけるウイルス感染価に対して、1分後に99.4%の減少が確認された。

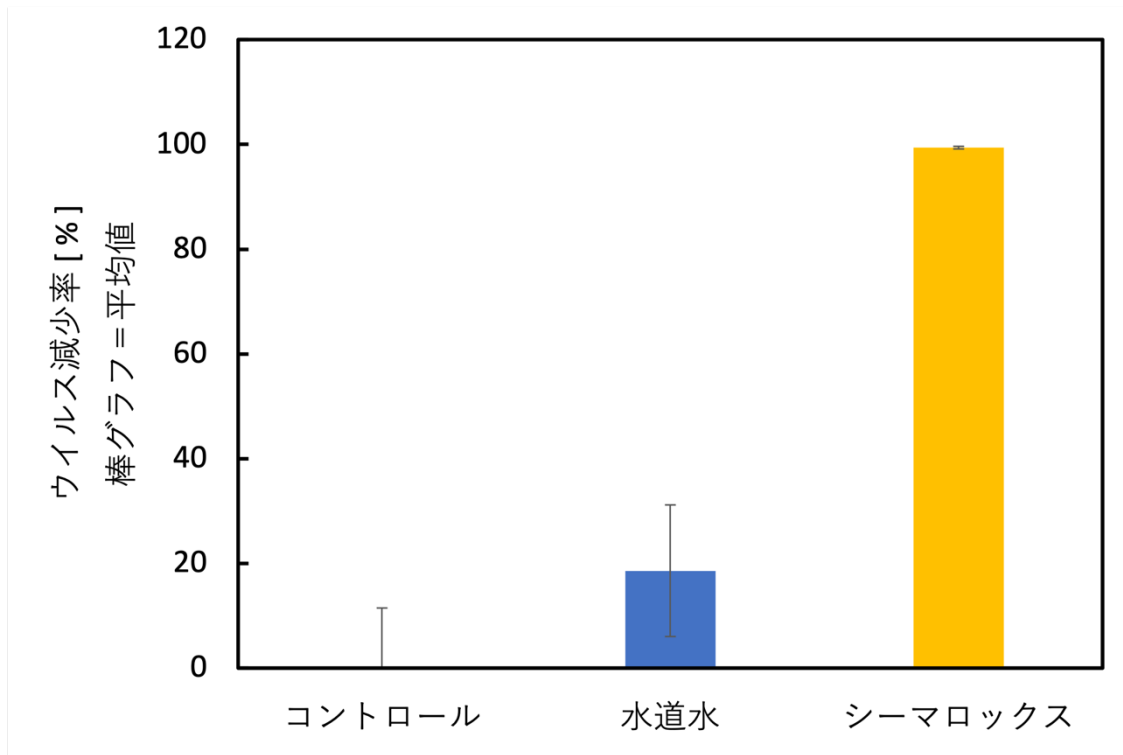


Fig.2 コントロールに対する各検体のウイルス減少率

Table 2 コントロールに対する各検体のウイルス減少率

試料名	コントロール	水道水	シーマロックス 150倍希釈液 (TR-150)
平均値	0	18.6	99.4
標準誤差 SE	11.5	12.6	0.3

### リファレンスに対する不活化率

1分後のウイルス減少率より、リファレンス（水道水）に対して、99.3%の不活化が確認された。

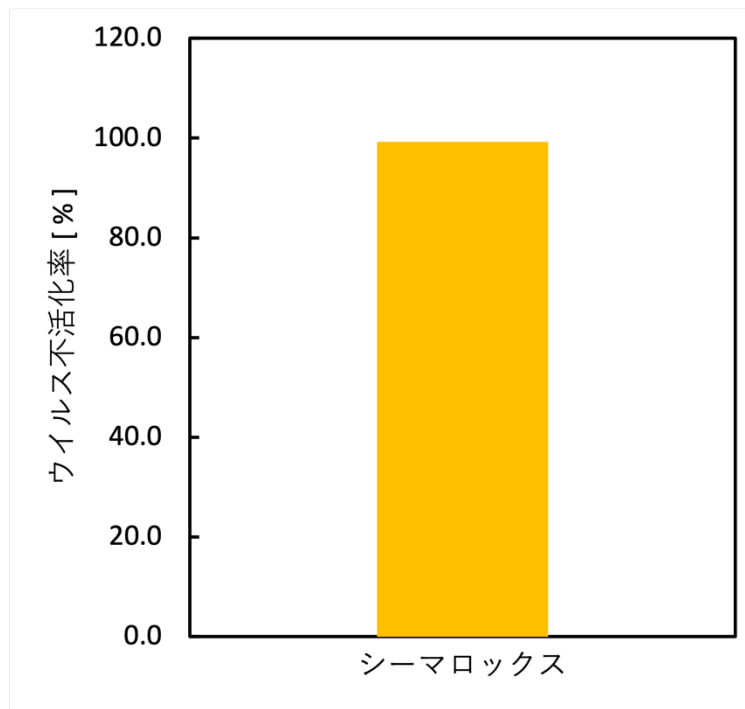


Fig.3 リファレンスに対するウイルス不活化率

Table 3 リファレンスに対するウイルス不活化率

試料名	シーマロックス 150倍希釈液 (TR-150)
平均値	99.3

#### 結論：

今回の結果から、シーマロックス 150 倍希釈液(TR-150)ではウイルス感染価は 1 分後に 300 分の 1 以下になることが確認された。なお、リファレンスでのウイルス減少も確認されたことから、シーマロックス 150 倍希釈液(TR-150)が有する不活化能力の評価指標としては、リファレンスに対するウイルス不活化率の値(Fig.3、Table3)を用いるのが妥当と判断する。つまり、シーマロックス 150 倍希釈液(TR-150)が有する不活化能力は、1 分で 99.3%となる。

#### 備考：

##### 細胞毒性試験について

試験を行うにあたり、本試験方法で被検体が細胞に毒性を示さないことを確認するために、以下のとおり細胞毒性評価 (MTT アッセイ) を行った。

##### 試験概要：

実験方法 4「ウイルスと検体の反応」の試験を、ウイルス液の代わりに無血清 DMEM25 $\mu$ L で行い、被検体に接触した溶液の希釈溶液を調製し、細胞毒性を評価した。

この試験では、細胞で起きる MTT の色素をホルマザン色素へ還元する酵素活性を光学的に測定する。これにより、細胞が死滅等により減少した場合は、発光量が小さくなる。

##### 1. 細胞の準備

Vero 細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/mL に調整後、96well plate に 100 $\mu$ L/well ずつ播種し、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%のインキュベーターで 1 日培養した。

##### 2. 被検体の準備

各被検体 975  $\mu$ L を 24well plate に播種した。

##### 3. 無血清 DMEM と検体の反応

無血清 DMEM 25 $\mu$ L を被検体に混合し反応させた。反応時間は 1 分で実施した。その後、反応を停止させるため、無血清 DMEM 混合液 100 $\mu$ L を無血清の DMEM 培地 900 $\mu$ L に添加した。

なお、無血清 DMEM と検体の反応は、室温 23°C、湿度 20%のキャビネット内で行った。

##### 4. Vero 細胞への添加と培養

3.で 10 倍希釈、100 倍希釈した溶液を、それぞれ、1.で準備した細胞に 1 被検体あたり 3well ずつ 100 $\mu$ L/well 播種した。その後、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%のインキュベーターで 1 日間培養した。

## 5. 細胞毒性試験

MTT 溶液を各 well に 10  $\mu$ L ずつ添加し、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% のインキュベーターで 2 時間呈色反応させた。その後、可溶化溶液を 100  $\mu$ L ずつ添加し、マイクロプレートリーダーを用いて、595nm の吸光度値を測定した。

## 6. 細胞毒性試験結果

被検体に接触させていない無血清 DMEM 培地を暴露した細胞の吸光度値に対して、シーマロックス 150 倍希釈液 (TR-150) の値に大きな減少が見られなかったことから、各被検体に接触した溶液の細胞に対する毒性はないことが確認された。

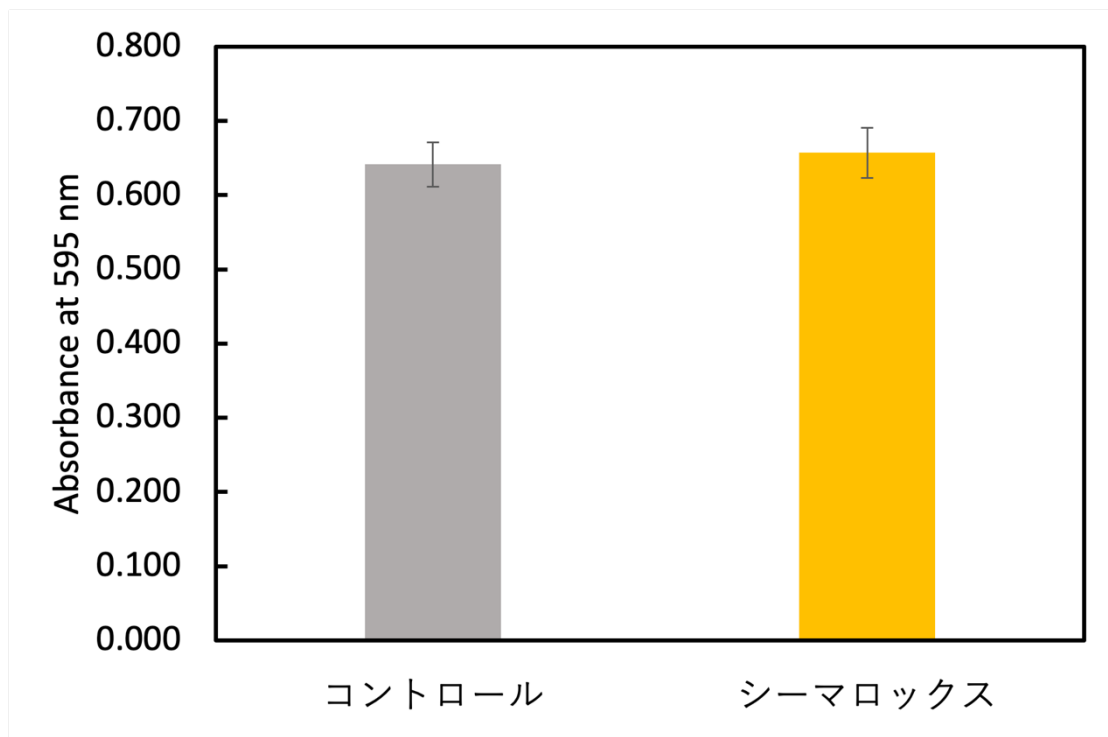


Fig. 4 各検体における発光量

Table 4 各検体における発光量

試料名	コントロール	シーマロックス 150 倍希釈液 (TR-150)
平均値	0.641	0.657
標準誤差 SE	0.03	0.034