

A.Cast.Partner's 株式会社 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10日

責任者： 株式会社グッドアイ 板橋英之

依頼主： A.Cast.Partner's 株式会社  
被検体： コロッシュコート C  
被検体の製法： 独自塗装  
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： 未処理ガラス  
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：

各検体に対して満遍なく広がるようにウイルス液を滴下し、反応時間毎に暴露した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 uL 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 100uL/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

被検体を各 1 枚ずつ 24well plate に配置した。

#### 4. ウイルスと検体の反応

ウイルス液 50uL を被検体に満遍なく滴下し反応させた。反応時間は 120 分で実施した。その後、反応を停止させるため、無血清の DMEM 培地を 450uL 添加した。

明所下条件として 550lx の光を照射して実験を行った。

なお、ウイルスと検体の反応は、室温 23°C、湿度 20% のキャビネット内で行った。

#### 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 100uL/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、120 分後に 0.3%までウイルス減少が確認された。

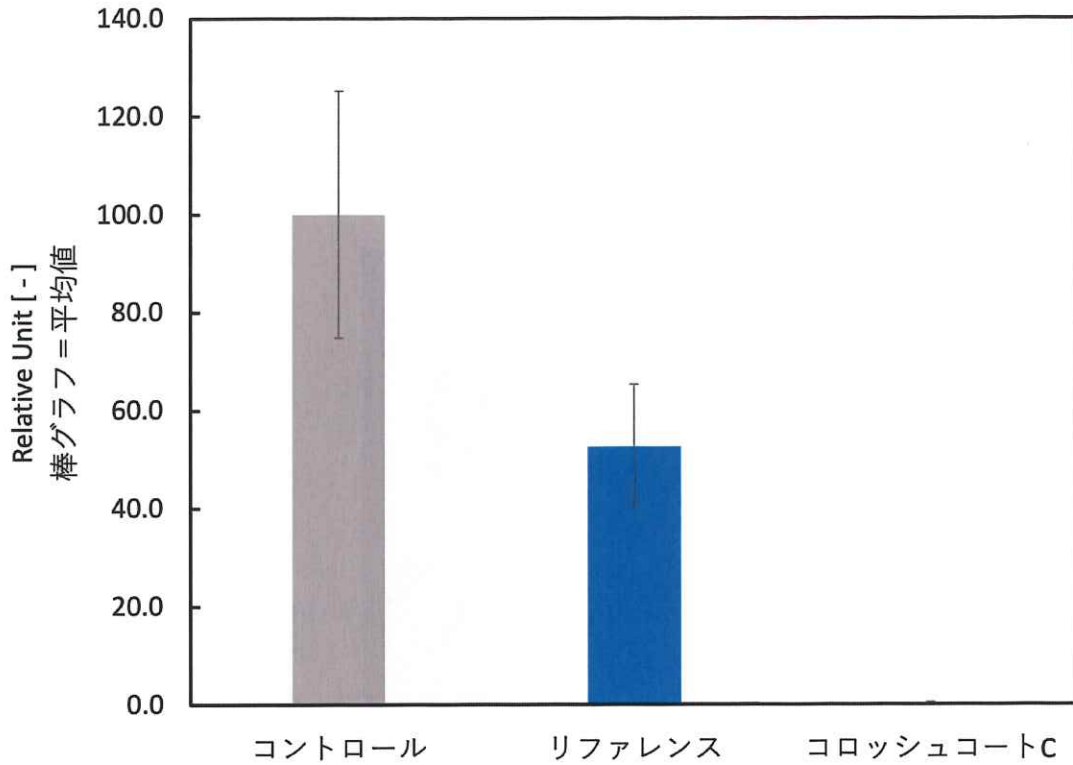


Fig1. コントロールのウイルス感染価を 100 とした場合の各検体におけるウイルス感染価

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	リファレンス	コロッシュコートC
平均値	100.0	52.7	0.3
標準誤差 SE	25.1	12.7	0.1

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（空白表示なし）

反応時間 0 分におけるウイルス感染価に対して、120 分後に 0.3%までウイルス減少が確認された。

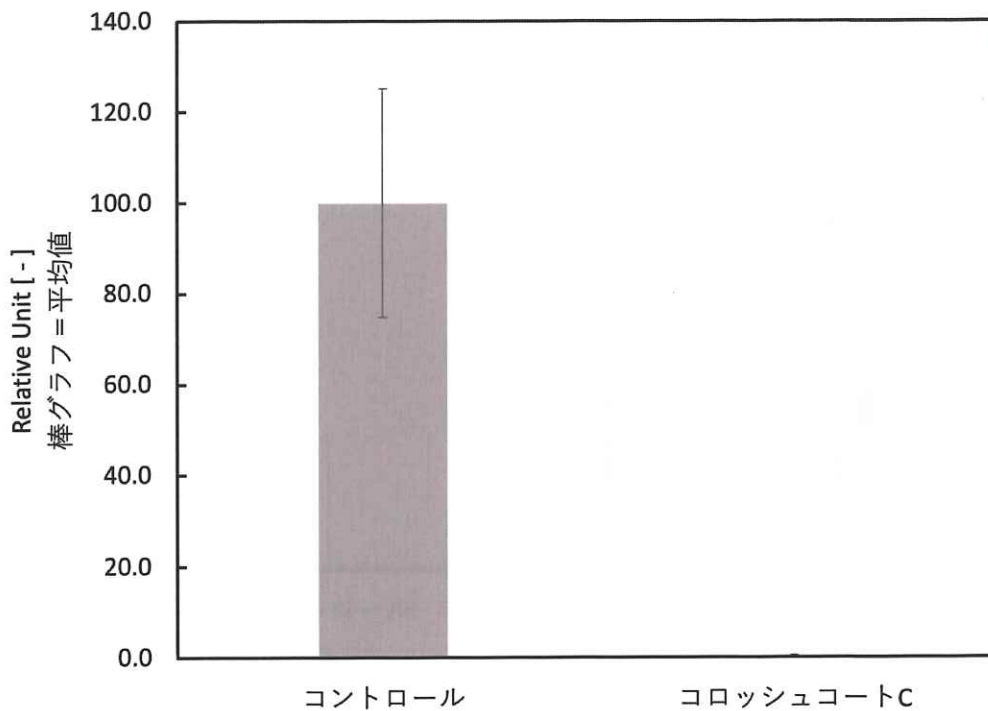


Fig2. コントロールのウイルス感染価を 100 とした場合の各検体におけるウイルス感染価

Table 2 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	コロッシュコートC
平均値	100.0	0.3
標準誤差 SE	25.1	0.1

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、120 分後に 99.7%のウイルス減少が確認された。

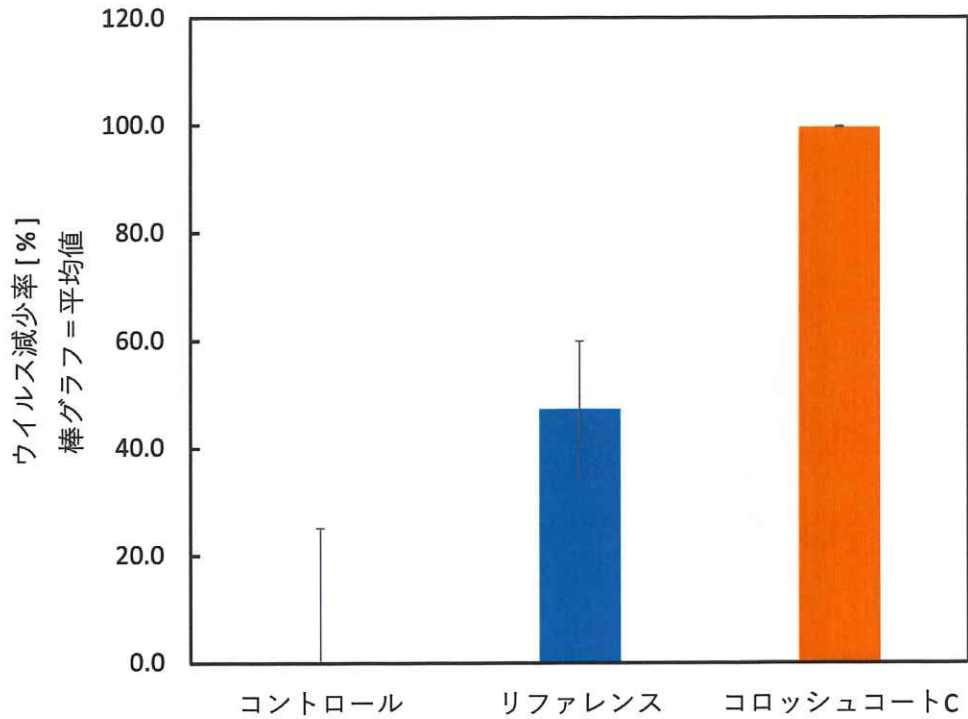


Fig.3 コントロールに対する各検体のウイルス減少率

Table 3 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	リファレンス	コロッシュコート C
平均値	0.0	47.3	99.7
標準誤差 SE	25.1	12.7	0.1

コントロールに対する各検体でのウイルス減少率（ブランク表示なし）

反応時間 0 分におけるウイルス感染価に対して、120 分後に 99.7%のウイルス減少が確認された。

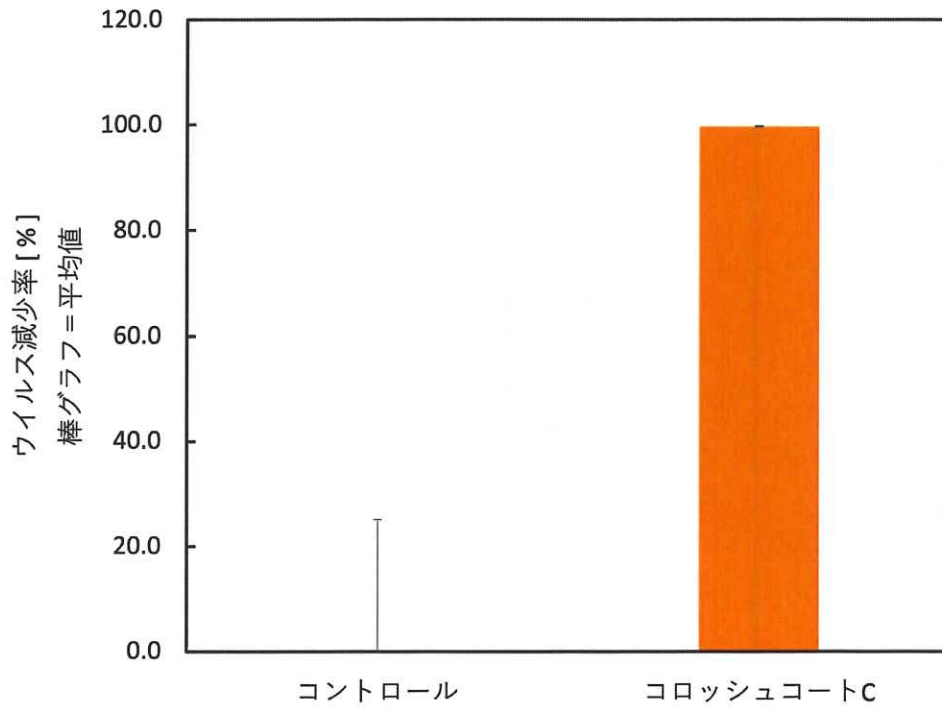


Fig.4 コントロールに対する各検体のウイルス減少率

Table 4 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	コロッシュコート C
平均値	0.0	99.7
標準誤差 SE	25.1	0.1

### リファレンスに対する不活化率

各反応時間分におけるリファレンスに対するウイルス不活化率を算出すると、120分後では約99.4%のウイルス減少が確認された。

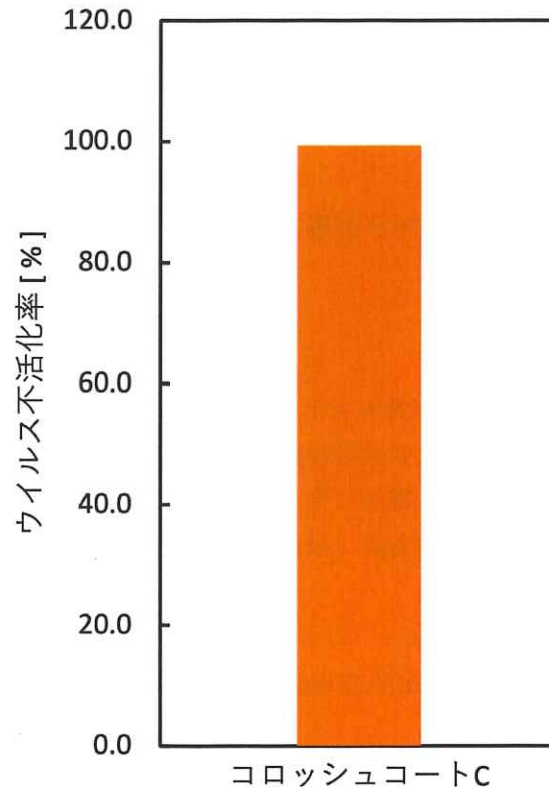


Fig.5 リファレンスに対するウイルス不活化率

Table 5 リファレンスに対するウイルス不活化率

試料名	コロッシュコートC
平均値	99.4



#### 結論：

今回の結果から、コロッシュコート C ではウイルス感染価は 120 分後に 200 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、コロッシュコート C 自体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.5 Table5) を用いるのが妥当と判断する。つまり、コロッシュコート C が有する不活化能力は、120 分で 99.4%となる。

#### 備考：

##### 被検体の細胞毒性評価について

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 DMEM50uL 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 100uL/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

被検体を各 1 枚ずつ 1cm×1cm の検体を 24well plate に配置した。

#### 3. ウイルスと検体の反応

無血清 DMEM 50uL を被検体に滴下した。120 分後、無血清の DMEM 培地を 450uL 添加し、10 倍希釈溶液とした。また、無血清 DMEM900uL に 10 倍希釈した溶液 100uL を播種し、100 倍希釈溶液を調整した。

なお、ウイルスと検体の反応は、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 100uL/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 10uL 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 100uL 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、コロッシュコート C の値に大きな減少が見られなかったことから、各被検体の細胞に対する毒性はないことが確認された。

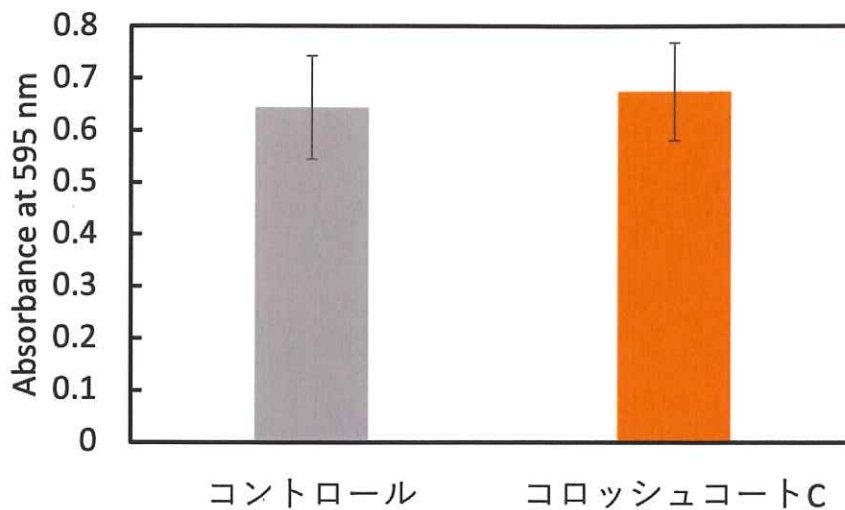


Fig.6 各希釈倍率における発光量

Table 6 各希釈倍率における発光量

試料名	コントロール	コロッシュコートC
平均値	0.644	0.675
標準誤差 SE	0.099	0.094