

試験結果報告書

依頼者名 株式会社パナセア 殿
品名 空間洗浄ミストパナセア 1点
試験項目 抗ウイルス性試験

2020年11月20日提出の試料に対する試験結果は下記の通りです。

2021年3月8日

一般財団法人 日本繊維製品品質技術センター

神戸試験センター 射本



記

○試験概要

- ・試験ウイルス：Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)
NIID 分離株；JPN/TY/WK-521 (国立感染症研究所より分与)
- ・宿主細胞：VeroE6/TMPRSS2 JCRB1819
- ・細胞培養液：Dulbecco's modified Eagle's medium (low-glucose) ; DMEM
(SIGMA, Cat#D6046)
Minimum Essential Medium Eagle ; EMEM (SIGMA, Cat#M4655)
- ・ウシ胎児血清：Fetal Bovine Serum (FBS) (SIGMA, Cat#173012)

- ・対照サンプル (Negative control) : Phosphate buffered saline (PBS)
- ・試験サンプル：①空間洗浄ミストパナセア

- ・試験条件：
 - ウイルス懸濁液：試験サンプル = 1 : 9
 - 作用温度 25℃
 - 作用時間 3分
 - (対照サンプル；Negative controlのみ混合直後も測定)

- ・薬剤不活化剤：SCDLP を 2% FBS 含 DMEM で 10 倍希釈した溶液
- ・感染価測定法：プラーク測定法

○試験方法

1) ウイルス懸濁液の調製:

宿主細胞にウイルスを感染させ、EMEM を加え 37℃で所定時間培養後、4℃、1,000×g で 15 分間遠心分離した上清を試験ウイルス懸濁液とする。

2) 宿主細胞検証試験:

2) - 1 細胞毒性確認試験

1. 試験サンプル 0.9 mL に EMEM 0.1 mL を加え、十分に攪拌する。
これを試験液とする。
2. 薬剤不活化剤 0.9ml に試験液 0.1ml を添加し、十分に攪拌する。
3. 2%FBS 含 DMEM を用いて、10 倍希釈系列を作製する。
4. プラーク測定法にて各希釈系列の細胞毒性の有無を確認する。

2) - 2 ウイルスへの細胞の感受性確認試験

1. 試験サンプル 0.9 mL に EMEM 0.1 mL を加え、十分に攪拌する。
これを試験液とする。
2. 薬剤不活化剤 4.5ml に試験液 0.5ml を添加し、十分に攪拌する。
3. 2%FBS 含 DMEM を用いて、10 倍希釈系列を作製する。
4. EMEM を用いて $4 \sim 6 \times 10^4$ PFU/mL に調製したウイルス懸濁液を 3. の各希釈系列の 1/100 量添加する。
5. 室温で 10 分間静置する。
6. プラーク測定法にて各希釈系列 1mL 当たりのウイルス感染価を測定し、ウイルスへの細胞の感受性を確認する。

* 宿主細胞検証試験は、以下の基準を満たすことを判定基準とする。

2) - 1 細胞毒性:無し

2) - 2 ウイルスへの細胞の感受性確認:

$$\lg(\text{PBS のウイルス感染価 (PFU/mL)}) - \lg(\text{Sample のウイルス感染価 (PFU/mL)}) \leq 0.5$$

3) 本試験:

1. 試験サンプル 0.9 mL に試験ウイルス懸濁液 0.1 mL を加え、十分に攪拌する。
2. 25℃で 3 分間、静置する。これを試験液とする。
3. 宿主細胞検証試験で不活化が確認された条件で試験液を不活化する。
これを反応停止液とする。
4. 上記 3. の反応停止液を 10^0 として、2%FBS 含 DMEM で 10 倍希釈系列を作製し、反応停止液 0.1ml 当たりのウイルス感染価をプラーク測定法にて測定し、試験液 1ml 当たりのウイルス感染価を算出する。

* この報告書は、提出の試料に対する試験結果であり、ロット全体の品質を保証するものではありません。
* 本報告書の全部又は一部の無断転用を固くお断りします。

○試験結果

2) 宿主細胞検証試験

- ・試験ウイルス：SARS-CoV-2 NIID 分離株；JPN/TY/WK-521（国立感染症研究所より分与）
- ・ウイルス懸濁液濃度： 4.1×10^4 PFU/ml

検体	2) - 1	2) - 2
	細胞毒性の有無	ウイルスへの細胞の感受性確認 ウイルス感染価 (PFU/mL) 常用対数平均値
PBS (Negative control)	無	2.61
①空間洗浄ミストバナセア	無	2.62

*試験サンプル①：

試験液を薬剤不活化剤で10倍希釈することにより、検体の影響を受けずにウイルス感染価測定ができることを確認した。

○試験結果

3) 本試験

- ・試験ウイルス：SARS-CoV-2 NIID 分離株；JPN/TY/WK-521（国立感染症研究所より分与）
- ・試験ウイルス懸濁液濃度： 1.7×10^8 PFU/ml

検体		試験液 1ml 当たりの ウイルス感染価 (PFU/mL) の常用対数値		Negative control との常用対数値差
		常用対数値	常用対数値平均値	
PBS (Negative control)	混合直後	n1	7.24	7.19
		n2	7.19	
		n3	7.13	
	3分作用後	n1	7.26	7.19
		n2	7.28	
		n3	7.04	
①空間洗浄 ミストバナセア	3分作用後	n1	< 2.00	< 2.00
		n2	< 2.00	
		n3	< 2.00	

* この報告書は、提出の試料に対する試験結果であり、ロット全体の品質を保証するものではありません。
* 本報告書の全部又は一部の無断転用を固くお断りします。

<参考情報>

○本試験に供したウイルス懸濁液のリアルタイム RT-PCR 測定

- ・試験ウイルス：SARS-CoV-2 NIID 分離株；JPN/TY/WK-521
(国立感染症研究所より分与)
- ・ウイルス懸濁液濃度： $>10^8$ PFU/ml
- ・リアルタイム PCR 装置：Thermal Cycler Dice® Real Time System III (TaKaRa)
- ・検出キット：SARS-CoV-2 Detection Kit -N1 set- (Code NCV-301; Lot# 038200)
(TOYOBO CO.,LTD. Biotech support Department)

○測定結果

リアルタイム RT-PCR 測定結果 (Fig.1.) より、ウイルス RNA の増幅が確認された。

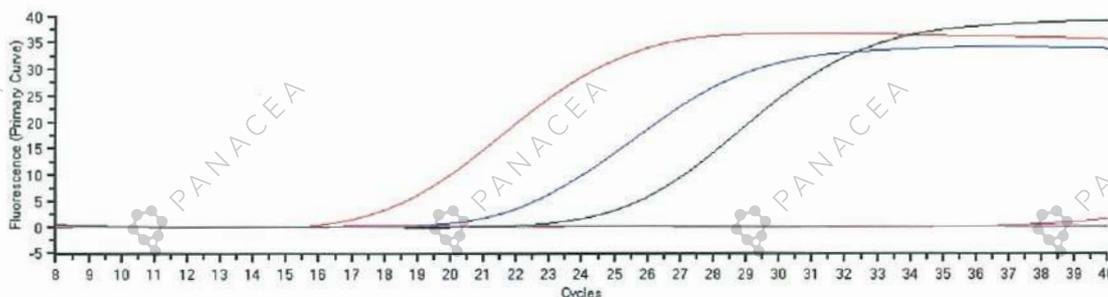


Fig.1. ウイルス懸濁液のリアルタイム RT-PCR 測定結果

- グラフ：赤線 (ウイルス懸濁液濃度を PBS にて 10^2 倍希釈)
- グラフ：青線 (ウイルス懸濁液濃度を PBS にて 10^3 倍希釈)
- グラフ：黒線 (ウイルス懸濁液濃度を PBS にて 10^4 倍希釈)
- グラフ：ピンク線 (Negative control ; EMEM)

以上

* この報告書は、提出の試料に対する試験結果であり、ロット全体の品質を保証するものではありません。
* 本報告書の全部又は一部の無断転用を固くお断りします。

試験結果報告書について

このたび株式会社パナセアでは「COVID-19」のエビデンスを取得することができました。
ウイルス名は「SARS-CoV-2」となっておりますが、COVID-19のエビデンスとなります。

病名はCOVID-19、ウイルス名はSARS-CoV-2

<https://medical.nikkeibp.co.jp/leaf/mem/pub/report/t344/202002/564301.html>

除菌率計算について

【計算に使用した条件】

- ・ウイルス感染価の常用対数

Negative control 7.19 (7.19 à 10^{7.19} PFU (ウイルス量) / ml = 15,488,166 個体)

Negative controlとの常用対数值差 5.2 (除去差は 10^{5.2}PFU / ml = 158,489 個体)

*3分後 < 2.00

(10^{5.2} / 10^{7.19}) を整数に直して計算しました。

乗数計算上微量の誤差がありますが、下記のようになります。

- ・除菌率式：「 $P = (1 - 10^L) \times 100$ 」

*P = %

*L = Log

$P = (1 - 10^{5.2} / 10^{7.19}) \times 100$

$10^{5.2} / 10^{7.19} = 10^{(5.2 - 7.19)} = 10^{-1.99} = 1 / 10^{1.99}$

$(1 - 10^{-2}) \times 100 = \text{約 } 99\% \text{ 不活化}$

結果

10^{7.19}乗個の新型コロナウイルスを、10^{5.2}乗個程不活化し、10^{1.9}個まで落とすことが出来ました。
即ち、約10² = 2 log = 99.0% 除去となり、200ppmの濃度で3分後に99.0%不活化出来ました。