

ウイルス不活化試験
最終報告書

（試験番号：48-YK10803）

2020年5月7日

株式会社ファルコムバイオシステムズ



目次

1. 概要	3
1.1 試験名	3
1.2 試験番号	3
1.3 試験目的	3
1.4 試験委託者の名称及び所在地	3
1.5 試験実施施設の名称及び所在地	3
1.6 試験責任者	3
1.7 試験開始日及び終了日	3
2. 試験内容	4
2.1 被験機器	4
2.2 使用株と培地など	4
2.2.1 供試ウイルス	4
2.2.2 供試細胞	4
2.2.3 使用培地及び試薬	4
2.2.4 使用器具	4
2.2.5 使用機器	5
2.3 試験手順	6
2.3.1 使用培地及び試薬の調製	6
2.3.2 ウイルス溶液（Flu A）の調製	6
2.3.3 細胞の調製	6
2.3.4 ウイルス不活化試験	6
3. 試験結果	8
4. 特記事項	9
4.1 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態	9
4.2 試験計画書に従わなかった事項	9
5. 資料	10
5.1 提出資料	10
5.2 保存資料	10

1. 概要

1.1 試験名

ウイルス不活化試験

1.2 試験番号

48-YK10803

1.3 試験目的

被験物質について、インフルエンザウイルスに対する不活化効果を確認する。

1.4 試験委託者の名称及び所在地

名 称： FKK 株式会社

所 在 地： 京都府京都市南区吉祥院堤外町 11 番地

1.5 試験実施施設の名称及び所在地

名 称： 株式会社ファルコバイオシステムズ

所 在 地： 京都府久世郡久御山町田井西荒見 17 番地 1

1.6 試験責任者

株式会社ファルコバイオシステムズ 本庄 弘一

1.7 試験開始日及び終了日

試験開始日： 2020 年 4 月 10 日

試験終了日： 2020 年 5 月 7 日

2. 試験内容

2.1 被験機器

(1) 被験機器

名 称：LED 除菌照明プロトタイプ 1
 提 供 者：試験委託者
 返 却：試験終了後、試験委託者に返却した。

2.2 使用株と培地など

2.2.1 供試ウイルス

略称	ウイルス株名	ウイルス株No.
Flu A	Influenza A virus (H1N1) A/PR/8/34 (A 型インフルエンザウイルス)	ATCC VR-1469

2.2.2 供試細胞

略称	細胞株名	細胞株No.
MDCK 細胞	Madin-Darby canine kidney cell	JCRB9029

2.2.3 使用培地及び試薬

略称	培地・試薬名称	メーカー名
D-MEM	D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red	富士フイルム和光純薬
Kanamycin	Kanamycin Sulfate Solution (50mg/mL)	富士フイルム和光純薬
PBS(-)	D-PBS(-)	富士フイルム和光純薬
Trypsin-EDTA	0.05w/v% Trypsin-0.53mmol/L EDTA・4Na Solution with Phenol Red	富士フイルム和光純薬
FBS	HyClone FETAL BOVINE SERUM	GEヘルスケア
	日本薬局方 精製水	山善製薬

2.2.4 使用器具

器具名称	メーカー名
培養フラスコ	IWAKI
96ウェルマイクロプレート	IWAKI
ディスポーザブル血球計算盤	エア・ブラウン
15mL遠心管	コーニングジャパン
マイクロピペット	エッペンドルフ
チップ	ビーエム機器
電動ピペッター	ドラモンド
個別包装ストリペット	コースター

2.2.5 使用機器

機器名称	メーカー名
CO ₂ インキュベータ	三洋電機
安全キャビネット	日本エアーテック
培養倒立顕微鏡	ニコン
ディープフリーザー	カノウ冷機
恒温槽	タイテック
卓上遠心機	久保田製作所
ボルテックスミキサー	アズワン

2.3 試験手順

2.3.1 使用培地及び試薬の調製

(1) 細胞増殖用培地

100mL の D-MEM に対して FBS 10mL、Kanamycin 0.1mL を加えたもの。

(2) 細胞維持用培地

100mL の D-MEM に対して FBS 1mL、Kanamycin 0.1mL を加えたもの。

2.3.2 ウイルス溶液 (Flu A) の調製

- 1) MDCK細胞を、細胞増殖用培地にて約36℃、5% CO₂の条件下で3~4日間培養した。
- 2) 培養上清を除去した。
- 3) MDCK細胞をFlu Aを接種した細胞維持培地で3~4日間ウイルス感染させ、80%以上の細胞が細胞変性効果 (CPE) を示したことを確認した。
- 4) CPEが確認された細胞を-80℃のディープフリーザーで凍結した。
- 5) 凍結させた細胞を約37℃に保った恒温槽にて融解後、再度-80℃のディープフリーザーで凍結した。
- 6) 凍結させた細胞を約37℃に保った恒温槽にて融解後、3000 rpmで10分間遠心して上清を回収した。
- 7) 回収したウイルス溶液は試験まで約-80℃以下のディープフリーザーで保存した。これをウイルス溶液 (Flu A) とした。

2.3.3 細胞の調製

- 1) MDCK細胞を、細胞増殖用培地にて約36℃、5% CO₂の条件下で3~4日間培養した。
- 2) 培養フラスコに単層シート状に培養したMDCK細胞をTrypsin-EDTAで剥離し、細胞を回収した。
- 3) 回収された各細胞を血球計算盤にて計測し、細胞維持培地で細胞数を調整して細胞浮遊液を作製した。
- 4) 細胞浮遊液を96ウェルマイクロプレートの各ウェルに0.1mLずつ加え、約36℃、5% CO₂の条件下で1日間培養した。
- 5) 96ウェルマイクロプレート各ウェルのMDCK細胞がそれぞれ単層シート状になっていることを培養倒立顕微鏡にて確認し、培養上清を除いたものを試験用の細胞プレートとした。

2.3.4 ウイルス不活化試験

2.3.4.1 被験機器とウイルスの作用

- 1) 96ウェルマイクロプレートの8ウェルにウイルス溶液 0.25mLを接種した。
- 2) 96ウェルマイクロプレートにフタを被せ、被験機器にてUV照射を行った。

- 3) 対照として、96ウェルマイクロプレートの9ウェルにウイルス溶液 0.25mLを接種し、フタを被せた。(対照はUV照射を行わなかった)
- 4) 室温にて表1の通りに所定時間静置したものを作用液とし、「2.3.4.2 ウイルス感染価の測定」に従い、ウイルス感染価を測定した。

表1 被験機器及び対照の作用時間

	作用時間									
	接種直後 (0時間)	1時間	2時間	3時間	4時間	5時間	6時間	24時間	25時間	
被験機器		●	●	●	●	●	●	●	●	●
対照	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

2.3.4.2 ウイルス感染価の測定

- 1) 作用液を細胞維持培地で10倍段階希釈した。
- 2) 10倍段階希釈液 0.1mLを「2.3.3 細胞の調製」で準備した細胞プレートに接種した。
- 3) 約36°C、5% CO₂の条件下で4~7日間培養した。
- 4) 培養後、培養倒立顕微鏡下でCPEの有無を確認し、Reed-Muench法によりウイルス感染価を算出した。(単位：TCID₅₀/mL)

3. 試験結果

表2 ウイルス不活化試験の結果

作用時間	被験機器 UV 照射あり	対照 UV 照射なし	ウイルス感染価の差 (注1)
	ウイルス感染価 (TCID ₅₀ /mL)		
接種直後 (0時間)		3.2×10 ⁶	
1 時間	1.0×10 ⁴	1.4×10 ⁶	2.1
2 時間	<3.2×10 ¹	1.8×10 ⁶	>4.8
3 時間	<3.2×10 ¹	1.8×10 ⁶	>4.8
4 時間	<3.2×10 ¹	3.2×10 ⁶	>5.0
5 時間	<3.2×10 ¹	1.8×10 ⁶	>4.8
6 時間	<3.2×10 ¹	2.3×10 ⁶	>4.9
24 時間	<3.2×10 ¹	4.0×10 ⁵	>4.1
25 時間	<3.2×10 ¹	3.2×10 ⁵	>4.0

(注1) log₁₀ (作用後の対照物質の感染価/作用後の被験物質の感染価)

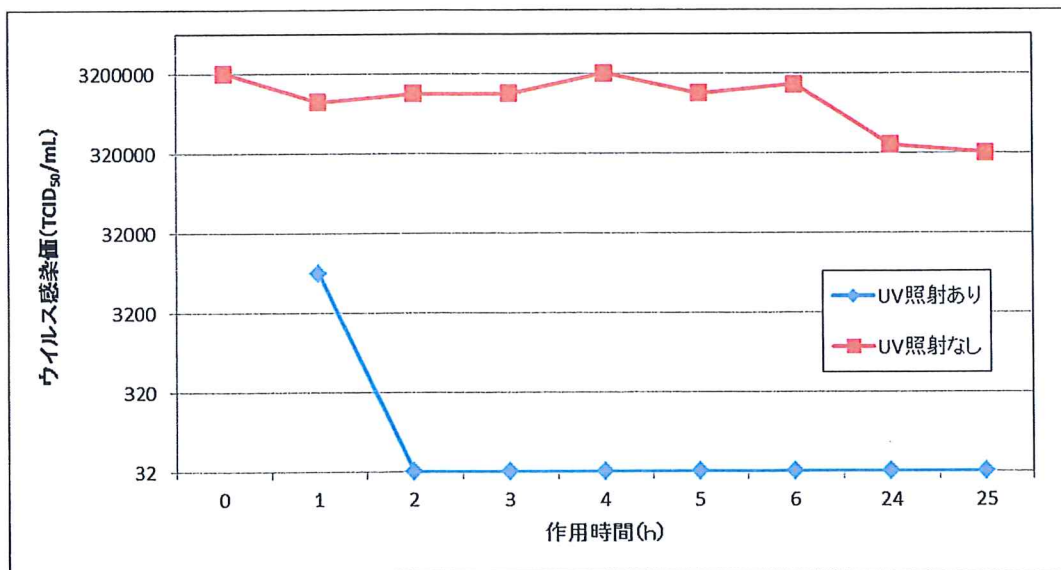


図 1 ウイルス不活化試験の結果

4. 特記事項

4.1 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態
なし。

4.2 試験計画書に従わなかった事項
なし。

5. 資料

5.1 提出資料

この試験において下記に示す資料は原本を試験委託者へ提出する。

- 試験計画書
- 最終報告書

5.2 保存資料

この試験において下記に示す資料は複写を試験実施施設の資料書庫に保存する。

（保存期間は試験実施施設の基準に準じ、5年間とする。）

- 試験計画書
- 最終報告書

以上