

---

フィルム剤の抗ウイルス試験

---

最終報告書

作成日 2021年3月26日

本報告書は最終報告書を複写したものに  
相違ありません。

2021年3月26日

試験責任者 佐久間 隆介

株式会社日本バイオリサーチセンター  
羽島研究所

## 1. 目次

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 表紙                                  | 1  |
| 1. 目次                               | 2  |
| 2. 最終報告書作成者署名                       | 3  |
| 3. 表題                               | 4  |
| 4. 試験番号                             | 4  |
| 5. 試験委託者                            | 4  |
| 6. 試験施設                             | 4  |
| 7. 試験目的                             | 4  |
| 8. 適用した信頼性基準                        | 4  |
| 9. 試験責任者                            | 4  |
| 10. 試験日程                            | 5  |
| 11. 試験関係資料の取り扱い                     | 5  |
| 12. 予見することができなかつた事態及び試験計画書に従わなかつたこと | 5  |
| 13. 試験従事者及び業務分担                     | 5  |
| 14. 要約                              | 6  |
| 15. 材料及び方法                          | 7  |
| 15.1. 被験物質及び対照物質                    | 7  |
| 15.1.1. 被験物質                        | 7  |
| 15.1.2. 対照物質                        | 7  |
| 15.1.3. 残余被験物質及び対照物質の取り扱い           | 7  |
| 15.2. 投与検体                          | 7  |
| 15.2.1. 被験物質及び対照物質                  | 7  |
| 15.3. 病原微生物                         | 7  |
| 15.3.1. 使用ウイルス株及び宿主細胞               | 7  |
| 15.3.2. 保存条件及び保存場所                  | 7  |
| 15.3.3. 接種ウイルス液の精製及び調製              | 8  |
| 15.4. 抗ウイルス試験                       | 11 |
| 15.4.1. 抗ウイルス試験                     | 11 |
| 15.5. 結果のまとめ                        | 11 |
| 15.6. 判定基準                          | 11 |
| 16. 試験成績及び結論                        | 12 |

Table 1. Antiviral activity

Appendix 1. Individual viral infectivity

2. 最終報告書作成者署名

試験番号：409281

表題：フィルム剤の抗ウイルス試験

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

試験責任者 佐久間 隆介

2021年3月26日

3. 表題

フィルム剤の抗ウイルス試験

4. 試験番号

409281

5. 試験委託者

株式会社気生堂印刷所

〒143-0015 東京都大田区大森西 4-6-13

TEL : 03-3766-1711 FAX : 03-3766-1976

6. 試験施設

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島 6-104

TEL : 058-392-6222 FAX : 058-392-1284

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所 木曾三川分室

〒503-0628 岐阜県海津市海津町福江字中無垢里 676-2

TEL : 0584-51-2737 FAX : 0584-51-0856

7. 試験目的

UV 抗ウイルスニス SCP シリーズのインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス作用を評価した。

8. 適用した信頼性基準

なし

9. 試験責任者

佐久間 隆介

## 10. 試験日程

|       |            |
|-------|------------|
| 試験開始日 | 2021年2月19日 |
| 実験開始日 | 2021年2月19日 |
| 実験終了日 | 2021年3月12日 |
| 試験終了日 | 2021年3月26日 |

## 11. 試験関係資料の取り扱い

この試験において試験施設で発生したすべての試験関係資料は、試験委託者に最終報告書提出後に移管する。

## 12. 予見することができなかった事態及び試験計画書に従わなかったこと

該当する事例は認められなかった。

## 13. 試験従事者及び業務分担

佐久間 隆介

(試験計画書の作成、試験操作の確認、接種ウイルス液の調製、抗ウイルス試験、最終報告書の作成)

藤原 隆

(抗ウイルス試験)

佐分利 利江子

(被験物質の管理)

#### 14. 要約

UV 抗ウイルスニス SCP シリーズのインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス作用を Antiviral activity から評価した。

プラスチックシャーレ上の2本のガラス棒の上に被験物質あるいは対照物質(未加工 OP ニス)を1枚載せた。そこにウイルス液 0.4 mL を接種し、被膜フィルムを被せ、炭酸ガス培養装置で約24時間培養した。培養後、SCDLP 培地 10 mL を入れたストマッカー袋に被験物質あるいは対照物質を入れ、手でよくもみ、ウイルス液を洗い出した。これを原液とし、ウイルスプラーク数を測定し、Antiviral activity を算出した。また、対照物質のみ接種直後に同様の方法でウイルス液を回収し、ウイルス感染価を算出した。

その結果、Antiviral activity はUV 抗ウイルスニス SCP シリーズは3.1を示したことから、判定基準の2を超えた。よって、抗ウイルス作用を有していると判断した。

## 15. 材料及び方法

### 15.1. 被験物質及び対照物質

#### 15.1.1. 被験物質

名 称：UV 抗ウイルスニス SCP シリーズ  
 ロット番号：TS-1  
 保管条件：室温（18.0～28.0℃）  
 保管場所：試験施設の被験物質保管室の保管庫  
 供給源：株式会社気生堂印刷所

#### 15.1.2. 対照物質

名 称：未加工 OP ニス  
 ロット番号：T-1  
 保管条件：室温（18.0～28.0℃）  
 保管場所：試験施設の被験物質保管室の保管庫  
 供給源：株式会社気生堂印刷所

#### 15.1.3. 残余被験物質及び対照物質の取り扱い

残余被験物質及び対照物質は試験委託者に返却した。

## 15.2. 投与検体

### 15.2.1. 被験物質及び対照物質

そのまま用いた。

## 15.3. 病原微生物

### 15.3.1. 使用ウイルス株及び宿主細胞

使用したウイルス株と宿主細胞は以下のものを用いた。

| ウイルス                                | 宿主細胞               |
|-------------------------------------|--------------------|
| インフルエンザウイルス A 型 H1N1 (ATCC VR-1469) | MDCK (ATCC CCL-34) |

### 15.3.2. 保存条件及び保存場所

試験施設（木曾三川分室）の超低温フリーザー（設定温度：-80℃、MDF-394AT、三洋電機株式会社）で使用時まで凍結保存した。

### 15.3.3. 接種ウイルス液の精製及び調製

#### 15.3.3.1. 接種ウイルス液の精製及び調製の使用試薬

- (1) Fetal Bovine Serum (以下 FBS、Cytiva)
- (2) Dulbecco's Modified Eagle Medium (以下 DMEM、SIGMA)
- (3) Minimum Essential Medium (autoclavable) (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)
- (4) DEAE デキストラン (DEAE-Dextran、pK chemicals A/S)
- (5) 炭酸水素ナトリウム (富士フィルム和光純薬株式会社)
- (6) L-グルタミン (東京化成工業株式会社)
- (7) D-グルコース (東京化成株式会社)
- (8) アルブミン (富士フィルム和光純薬株式会社)
- (9) トリプシン (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)
- (10) 抗菌薬 (Antibiotic-Antimycotic、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)
- (11) ニュートラルレッド (富士フィルム和光純薬株式会社)
- (12) アガロース (Agar Noble、Becton, Dickinson and Company)
- (13) PBS (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)

#### 15.3.3.2. 培地及び試薬の調製

- (1) 超純水  
水道水を純水製造装置 (Direct-Q UV3、メルク株式会社) で精製した。
- (2) 滅菌水  
超純水を高圧蒸気滅菌 (小型オートクレーブ、LSX-500、株式会社トミー精工、滅菌条件 : 121°C、15 分) した。
- (3) 10%FBS 添加 DMEM  
DMEM 45 mL に FBS 5 mL、抗菌薬 0.5 mL の割合で加えた。
- (4) トリプシン含有 DMEM  
DMEM 50 mL に 1 mg/mL トリプシン 0.05 mL の割合で加えた。
- (5) 10×MEM  
Minimum Essential Medium (autoclavable) 9.39 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、高圧蒸気滅菌 (滅菌条件 : 121°C、15 分) した。
- (6) 7.5% NaHCO<sub>3</sub>  
炭酸水素ナトリウム 7.5 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルター (0.22 µm、MILLEX® GS、メルク株式会社) で濾過した。
- (7) 200 mmol/L L-グルタミン  
L-グルタミン 1.46 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルターで濾過した。
- (8) 1%DEAE デキストラン



DEAE デキストラン 1 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルターで濾過した。

- (9) 15%グルコース  
D-グルコース 15 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルターで濾過した。
- (10) 10% BSA  
アルブミン 10 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルターで濾過した。
- (11) 1 mg/mL トリプシン  
トリプシン 100 mg に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルターで濾過した。
- (12) 2.5%トリプシン  
トリプシン 2.5 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルターで濾過した。
- (13) 1%ニュートラルレッド  
ニュートラルレッド 1 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルターで濾過した。

#### 15.3.3.2.1. 継代方法

- (1) 凍結保管中の宿主細胞を約 37°C に設定した恒温槽で融解後、15 mL 遠心管に 10%FBS 添加 DMEM 10 mL を入れ、融解した細胞液 1 mL を添加し懸濁した。
- (2) 5 分間遠心分離 (1000 rpm、190 × g、24°C) して上清を除去した。
- (3) 15 mL 遠心管に 10%FBS 添加 DMEM 1 mL を加えて再懸濁した。10%FBS 添加 DMEM 5 mL を加えた 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコに細胞懸濁液 0.5 mL を添加し、炭酸ガス培養装置 (設定温度 : 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 : 5%、型式 : MCO-170AICUV-PJ、パナソニックヘルスケア株式会社) で数日間培養した。
- (4) 細胞が 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコの底に単層シート状になっていることを確認した。培地を除去し、PBS で細胞を 2 回洗浄後に 0.05%トリプシン 1 mL を加えて細胞を剥離し、回収液を 15 mL 遠心管に移した。
- (5) 回収液と等量の 10%FBS 添加 DMEM を混合し、5 分間遠心分離 (1000 rpm、190 × g、24°C) して上清を除去した。
- (6) 15 mL 遠心管に 10%FBS 添加 DMEM 1 mL を加えて再懸濁した。10%FBS 添加 DMEM 5 mL を加えた 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコに懸濁液 0.1 mL を添加し、炭酸ガス培養装置で数日間培養した。
- (7) 単層シート状になったら(4)~(6)を繰り返し、細胞を継代した。

#### 15.3.3.2.2. 75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコ作製方法

- (1) 継代培養し、25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコの底で単層シート状になった宿主細胞の培地を除去し、PBS で細胞を 2 回洗浄後、0.05%トリプシンを 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコ 1 本に対して 1 mL を

加えて細胞を剥離し、回収液を 15 mL 遠心管に移した。

- (2) 回収液と等量の 10%FBS 添加 DMEM を混合し、5 分間遠心分離 (1000 rpm,  $190 \times g$ ,  $24^{\circ}\text{C}$ ) して上清を除去した。
- (3) 15 mL 遠心管に 10%FBS 添加 DMEM を 1 mL 加え再懸濁した。再懸濁した全量を滅菌済みメディウム瓶に入れ、さらに 10%FBS 添加 DMEM を加えて、 $75 \text{ cm}^2$  培養フラスコに 15 mL ずつを播種し、炭酸ガス培養装置で培養した。
- (4) 宿主細胞が  $75 \text{ cm}^2$  培養フラスコの底に単層シート状になっていることを確認し、接種ウイルス液の精製に用いた。

#### 15.3.3.2.3. 6 ウェルプレート作製方法

- (1) 継代培養し、 $25 \text{ cm}^2$  培養フラスコの底で単層シート状になった宿主細胞の培地を除去し、PBS で細胞を 2 回洗浄後、0.05%トリプシンを  $25 \text{ cm}^2$  培養フラスコ 1 本に対して 1 mL を加えて細胞を剥離し、回収液を 15 mL 遠心管に移した。
- (2) 回収液と等量の 10%FBS 添加 DMEM を混合し、5 分間遠心分離 (1000 rpm,  $190 \times g$ ,  $24^{\circ}\text{C}$ ) して上清を除去した。
- (3) 15 mL 遠心管に 10%FBS 添加 DMEM 1 mL を加えて再懸濁した。再懸濁した全量を滅菌済みメディウム瓶に入れ、10%FBS 添加 DMEM を加え、6 ウェルプレートの 1 ウェルに 2 mL ずつを播種し、炭酸ガス培養装置で培養した。
- (4) 宿主細胞が 6 ウェルプレートの底に単層シート状になっていることを確認し、接種ウイルス液の濃度測定及び抗ウイルス試験に用いた。

#### 15.3.3.3. 接種ウイルス液の精製方法

凍結保存のインフルエンザウイルスを解凍し、DMEM で  $10^4$  倍希釈し、MDCK 細胞を培養した  $75 \text{ cm}^2$  培養フラスコに添加し、炭酸ガス培養装置で、細胞にウイルスを 1 時間吸着させた。

その後、ウイルス液を除去し、トリプシン含有 DMEM を加え、炭酸ガス培養装置で培養した。培養は、細胞変性効果 (CPE) が出現するまで実施し、ウイルス液を含む上清を採取した。

採取後、遠心分離 (2000 rpm,  $780 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 分間) し、上清を接種ウイルス液とした。接種ウイルス液は 1 mL ずつセラムチューブに分注し、超低温フリーザーに使用時まで凍結 ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) 保存した。

#### 15.3.3.4. 接種ウイルス液の濃度測定

接種ウイルス液を DMEM で段階希釈液 ( $10 \sim 10^6$ ) を調製した。MDCK 細胞を培養した 6 ウェルプレートに各ウイルス希釈液を 1 ウェルに 0.1 mL ずつ添加し、15 分毎に 6 ウェルプレートを振盪し、細胞にウイルスを 1 時間吸着させた。

ウイルス液の除去後、Overlay medium\*を速やかに 2 mL ずつ吸着の終わったシャーレに加えた。アガロースが凝固するまで室温に放置し、炭酸ガス培養装置で 2 日間培養した。

Overlay medium 100 mL に対して 1%ニュートラルレッド 1 mL 加えた培地を 2 mL 重層し、一晚

炭酸ガス培養装置で培養後、プラーク数を算定した。各濃度の例数は3とした。

\* : Overlay medium は培地 A (組成 : 10×MEM 10 mL、7.5% NaHCO<sub>3</sub> 3 mL、200 mmol/L L-グルタミン 2 mL、1%DEAE デキストラン 1 mL、15%グルコース 1 mL、10% BSA 1 mL、2.5%トリプシン 40 μL、抗菌薬 1 mL、滅菌蒸留水 31 mL) と高圧蒸気滅菌した培地 B (組成 : アガロース 0.8 g、蒸留水 50 mL) を等量混ぜ合わせた。

#### 15.3.3.5. 接種ウイルス液の調製

凍結保存してある接種ウイルス液を用時に融解し、PBS で  $1 \times 10^7$  PFU/mL となるように調製した。

使用後の残余接種ウイルス液は、オートクレーブ (LSX-500、株式会社トミー精工) 処理 (121°C、15 分間) した後、廃棄した。

### 15.4. 抗ウイルス試験

#### 15.4.1. 抗ウイルス試験

被験物質は3枚、対照物質は6枚 (3枚 : ウイルス接種直後用、3枚 : 24 時間反作用) を使用した。

1つのプラスチックシャーレ上の2本のガラス棒の上に被験物質あるいは対照物質を1枚置いた。そこにウイルス液 0.4 mL を接種し、被膜フィルム (40 mm×40 mm) を被せ、25°C 設定の炭酸ガス培養装置で約 24 時間培養した。培養後、SCDLP 培地 10 mL を入れたストマッカー袋に入れ、手でよくもみ、ウイルス液を洗い出し、回収した。さらに、対照物質についてはウイルス接種直後にウイルス液を洗い出し、回収した。これを原液とし、 $10^{10}$  倍まで 10 倍段階希釈液を調製した。希釈液 0.1 mL を 3 ウェルずつ 6 ウェルプレートに接種した。炭酸ガス培養装置内で 1 時間培養後、希釈液を除去した。接種ウイルス液の濃度測定時の Overlay medium を 1 ウェルに 2 mL ずつ加えた。炭酸ガス培養装置で 2 日間培養した。

接種ウイルス液の濃度測定時の Overlay medium 100 mL に 1% ニュートラルレッド 1 mL の割合で加えた培地を 2 mL 重層した。

一晚炭酸ガス培養装置で培養後、プラーク数を計数した。

### 15.5. 結果のまとめ

プラーク数からウイルス感染価 (PFU/試験片 1 cm<sup>2</sup>) を算出し、その常用対数値を用いて Antiviral activity を算出した。

以下の式を用いて、Antiviral activity を算出した。

Antiviral activity = 対照物質の 24 時間反応後のウイルス感染価常用対数値の平均値 - 被験物質の 24 時間反応後のウイルス感染価常用対数値の平均値

### 15.6. 判定基準

Antiviral activity が 2 以上の場合、抗ウイルス作用を有していると判断した。

## 16. 試験成績及び結論

試験結果を Table 1 及び Appendix 1 に示した。

その結果、Antiviral activity は UV 抗ウイルスニス SCP シリーズは 3.1 を示したことから、判定基準の 2 を超えた。よって、抗ウイルス作用を有していると判断した。

Table 1. Antiviral activity

|                    | OP varnish in the raw<br>(Immediately after inoculation) | OP varnish in the raw<br>(24 hours after inoculation) | UV antiviral varnish SCP series<br>(24 hours after inoculation) |
|--------------------|--|---|---|
| Viral infectivity  | 5.5  | 4.4   | 1.3   |
| Antiviral activity | -  | -   | 3.1   |

## Appendix 1. Individual viral infectivity

| Test substances  | Viral infectivity      |  |
|--|------------------------|--|
|  | (PFU/cm <sup>2</sup> ) | (Log <sub>10</sub> PFU/cm <sup>2</sup> ) |
| OP varnish in the raw (Immediately after inoculation)        | 287500.0               | 5.5                                      |
| OP varnish in the raw (Immediately after inoculation)        | 331250.0               | 5.5                                      |
| OP varnish in the raw (Immediately after inoculation)        | 356250.0               | 5.6                                      |
| Mean   | 325000.0               | 5.5                                      |
| OP varnish in the raw (24 hours after inoculation)           | 21250.0                | 4.3                                      |
| OP varnish in the raw (24 hours after inoculation)           | 26250.0                | 4.4                                      |
| OP varnish in the raw (24 hours after inoculation)           | 26250.0                | 4.4                                      |
| Mean   | 24583.3                | 4.4                                      |
| UV antiviral varnish SCP series (24 hours after inoculation) | 18.8                   | 1.3                                      |
| UV antiviral varnish SCP series (24 hours after inoculation) | 18.8                   | 1.3                                      |
| UV antiviral varnish SCP series (24 hours after inoculation) | 25.0                   | 1.4                                      |
| Mean   | 20.9                   | 1.3                                      |