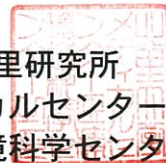


試験報告書（ウイルス試験）

Etak 塗布フィルタ（中性能フィルタ）のウイルス抑制評価試験

学校法人 北里研究所
北里大学メディカルセンター
研究部門 医療環境科学センター



表題： Etak 塗布フィルタ（中性能フィルタ）のウィルス抑制評価試験

試験番号： 01602

目的： Etak 塗布フィルタ（中性能フィルタ）の抗ウィルス活性を検討する

試験依頼者： 株式会社センチュリーアークス
名称： 株式会社センチュリーアークス
所在地： 広島県福山市神辺町旭丘 46-1
Tel：084-960-6371 Fax：048-593-1262

担当者： 藤野 英利

試験受託者：
名称： 学校法人 北里研究所
北里大学メディカルセンター
医療環境科学センター
所在地： 埼玉県北本市荒井 6 丁目 100 番地
Tel：048-593-1212 Fax：048-593-1262

センター長： 小林憲忠

試験実施施設：
名称： 学校法人 北里研究所
北里大学メディカルセンター
バイオメディカル棟 2F 感染実験室

試験実施期間： 契約締結日～平成 29 年 2 月 20 日

試験責任者： 小林 憲忠
実験担当者： 小林 憲忠
山村 瑠衣
報告書作成者： 山村 瑠衣
報告書承認者： 小林 憲忠

方法

1. 材料

1.1 被験機材

名称： 特殊線維（中性能フィルタ Etak 処理済み）

コード番号：

備考： センチュリーアークス株式会社で開発した特殊線維

1.2 1 対照機材

名称： 対照線維（中性能フィルタ Etak 未処理）

コード番号：

備考： センチュリーアークス株式会社で開発した特殊線維の基礎線維

1.3 使用ウイルス株

1.3.1 ネココロナウイルス

名称： Feline infectious peritonitis virus (FIPV;ネココロナウイルス)

株名： 79-1146

備考： SARS Coronavirus/MERS Coronavirus 代替

1.3.2 ネコカリシウイルス

名称： Feline calicivirus

株名： F9

備考： Norovirus 代替

1.3.3 インフルエンザウイルス A 型

名称： Influenza virus A (H1/N1) (IFVA;インフルエンザウイルス A 型)

株名： PR/8/34 株 (H1/N1)

1.4 使用細胞

1.4.1 名称： fcwf4 細胞

株名： fcwf4 p86

備考： ネコ腎臓由来上皮様細胞、FIPV 感染および FCV 感染に使用

1.4.2 名称： MDCK 細胞

株名： RCB0995

備考： イヌ（♀性 Cocker Spaniel）腎臓由来上皮様細胞、IFVA 感染に使用

1.5 培地

1.5.1 FIPV、FCV および IFVA ウィルス培養用細胞増殖培地

10%FBS 含有イーグル MEM (Gibco;Invitrogen Corp., CA, USA)

(NaHCO₃、Glutamine および Penicillin/Streptomycin 含有) および Nutrient Mixture (Ham's F-12) 含有)

1.5.2 FIPV および FCV ウィルス維持培地

1%BSA 含有イーグル MEM (Gibco)

(NaHCO₃、Glutamine、vitamin、biotin および Penicillin/Streptomycin 含有) および Nutrient Mixture (Ham's F-12) 含有)

1.5.3 ウィルス維持培地

1%BSA 含有イーグル MEM (Gibco)

(NaHCO₃、Glutamine、vitamin、葉酸、biotin、trypsin および Penicillin/Streptomycin 含有)

2. 試験方法

2.1 ウィルスの調製および感染力価の測定

2.1.1 細胞の調製

2.1.1.a

fcwf4 細胞の調製

液体窒素容器に凍結保存してある fcwf4 細胞 (House-keeping cell line) を非動化済み 5%FBS (GIBCO™)、0.2%NaHCO₃ (GIBCO™) 含有 Hanks' BSS (GIBCO™) 洗浄用培地にて 3 回遠心洗浄を行った。遠心洗浄後、10%FBS、0.1%NaHCO₃、50u/mL Penicillin G - 50mg/mL streptomycin (GIBCO™)、および 2mM L-glutamine (GIBCO™) 含有 D-MEM (GIBCO™) 細胞増殖 (継代) 培地 (10%MEM) を用いて 1x10⁵/mL 濃度に調製した。調製した細胞浮遊液 5mL を 25cm² 組織培養用フラスコ (FALCON® 3082; Becton Dickinson labware) に入れ、5%CO₂ 存在下 37°C の CO₂ インキュベーター (Model 3161; Forma Scientific) で 24 時間培養を行う。24 時間後、フラスコ中の 10%MEM を除去し、新しい 10%MEM を 5mL 添加し、48 時間培養を行う (1 継代目)。フラスコ底面に sheet 状になった fcwf4 細胞を 0.05%Trypsin-0.53mM EDTA 溶液 (GIBCO™) で酵素処理を施し、洗浄用培地にて 3 回遠心洗浄を行った。遠心洗浄後、10%MEM を用いて 1x10⁵/mL 濃度に調製した細胞浮遊液 5mL を新しい FALCON® 3082 に入れ、CO₂ インキュベーターで 72 時間培養を行った (2 継代目)。以後、72 時間毎に同様の操作を行い、5 継代終了した時点で 10%MEM を用いて 1x10⁵/mL 濃度に調製した細胞浮遊液 30mL を 75cm² 組織培養用フラスコ (CORNING 25115; Corning Glass Works) に入れ、CO₂ インキュベーターで 72 時間培養を行った。酵素処理および遠心洗浄を行った後、10%MEM を用いて 1x10⁵/mL 濃度に調製した細胞浮遊液 80mL を 75cm² 組織培養用フラスコ (FALCON® 5000) に入れ、CO₂ インキュベーターで 72 時間培養を行った。72 時間後、同様に酵素処理および遠心洗浄を行った fcwf4 細胞を 10%MEM に再懸濁し、96well 平底マイクロプレート (costar® 3595; Corning Incorporated) 2 枚に 1 well あたり 5x10⁴ 個で細胞を播き 72 時間培養を行った。72 時間後 fcwf4 細胞が full-sheet になった costar® 3595 をウィルス感染に使用した。

2.1.1.b

MDCK 細胞の調製

液体窒素容器に冷凍保存してあるイヌ腎細胞由来株 MDCK 細胞 (RCB0995 株) を非動化済み 5%FBS (GIBCO™)、0.2%NaHCO₃ (GIBCO™) 含有 Hanks' BSS (GIBCO™) 洗浄用培地にて 3 回遠心洗浄を行った。遠心洗浄後、10%FBS、0.1%NaHCO₃、50u/mL Penicillin G (GIBCO™)、50mg/mL streptomycin (GIBCO™)、および 2mM L-glutamine (GIBCO™) 含

有 D-MEM (GIBCO™) 細胞継代培地 (10%MEM) を用いて 1×10^5 /mL 濃度に調製した。調製した細胞浮遊液 5mL を 25cm² 組織培養用フラスコ (FALCON® 3082; Becton Dickinson labware) に入れ、5%CO₂ 存在下 37° C の CO₂ インキュベーター (Model 3161; Forma Scientific) で 24 時間培養を行った。24 時間後、フラスコ中の 10%MEM を除去し、新しい 10%MEM を 5mL 添加し、48 時間培養を行った (1 継代目)。フラスコ底面に sheet 状になった MDCK 細胞を 0.05%Trypsin-0.53mM EDTA 溶液 (GIBCO™) で酵素処理を施し、洗浄用培地にて 3 回遠心洗浄を行った。遠心洗浄後、10%MEM を用いて 1×10^5 /mL 濃度に調製した細胞浮遊液 5mL を新しい FALCON® 3082 に入れ、CO₂ インキュベーターで 72 時間培養を行った (2 継代目)。以後、72 時間毎に同様の操作を行い、5 継代終了した時点で 10%MEM を用いて 1×10^5 /mL 濃度に調製した細胞浮遊液 30mL を 75cm² 組織培養用フラスコ (CORNING 25115; Corning Glass Works) に入れ、CO₂ インキュベーターで 72 時間培養を行った。酵素処理および遠心洗浄を行った後、10%MEM を用いて 1×10^5 /mL 濃度に調製した細胞浮遊液 80mL を 150cm² 組織培養用フラスコ (FALCON® 5000) に入れ、CO₂ インキュベーターで 72 時間培養を行った。72 時間後、同様に酵素処理および遠心洗浄を行った MDCK 細胞を 10%MEM に再懸濁し、96 穴平底マイクロプレート (costar® 3595; Corning Incorporated) 2 枚に 1 well あたり 5×10^4 個で細胞を播き 72 時間培養を行った。72 時間後 MDCK 細胞が full-sheet になった costar® 3595 をウイルス感染試験に使用した。

2.1.2 ウィルス感染

2.1.2.a

Feline infectious peritonitis virus (FIPV) の調製

超低温冷凍庫 (荏原) に凍結乾燥保存してある Feline infectious peritonitis virus (FIPV; ネココロナウイルス: 79-1146 株) を細胞増殖用培地中 (10%FBS 含有イーグル MEM (Gibco) で fcwf4 細胞 (ネコ腎細胞; fcwf4p86 株) に M. O. I (Multiplicity of infection) 0.01 で感染させ、37°C5%CO₂ 存在下で 72 時間培養した (1 継代)。連続して 5 代継代したものを大量培養し、蔗糖密度勾配超高速遠心法によりウイルス液を分離・精製し、1mL ずつ分注後 -80° C 超低温冷凍庫にて実験使用時まで保存した。ウイルス液の一部は、10 倍階段希釈法にて細胞変性効果を確認し、ウイルス感染力価 (TCID₅₀) を測定した。

2.1.2.b

Feline calicivirus (FCV) の調製

超低温冷凍庫 (荏原) に凍結乾燥保存してある Feline calicivirus (FCV: ネコカリシウイルス (F9 株) を細胞増殖用培地中 (10%FBS 含有イーグル MEM (Gibco) で fcwf-4 細胞 (ネコ胎児由来細胞) に M. O. I (Multiplicity of infection) 0.01 で感染させ、37°C5%CO₂ 存在下で 72 時間培養した (1 継代)。連続して 5 代継代したものを大量培養し、蔗糖密度勾配超高速遠心法によりウイルス液を分離・精製し、1mL ずつ分注後 -80° C 超低温冷凍庫にて実験使用時まで保存した。ウイルス液の一部は、10 倍階段希釈法にて細胞変性効果を確認し、ウイルス感染力価 (TCID₅₀) を測定した。

2.1.2.c

Influenza virus A (IFVA) の調製

超低温冷凍庫（荏原）に凍結乾燥保存してある Influenza virus A (IFVA: インフルエンザウィルス A 型 (H1/N1; PR/8/34 株) を細胞増殖用培地中 (10%FBS 含有イーグル MEM (Gibco) で MDCK 細胞 (イヌ腎細胞; RCB0995 株) に M. O. I (Multiplicity of infection) 0.01 で感染させ、37°C5%CO₂ 存在下で 72 時間培養した (1 継代)。連続して 5 代継代したものを大量培養し、蔗糖密度勾配超高速遠心法によりウィルス液を分離・精製し、1mL ずつ分注後-80°C 超低温冷凍庫にて実験使用時まで保存した。ウィルス液の一部は、10 倍階段希釈法にて細胞変性効果を確認し、ウィルス感染力価 (TCID₅₀) を測定した。

2.2 実験方法

2.2.1 特殊線維のネココロナウィルスに対する性能試験

a 測定条件

接触時間: 1, 10, 30, 60 および 1080 分間

試験回数: 試験条件毎 3 回

回収容量: 1mL/線維 (40mm x 25mm)

b 測定方法

- ① あらかじめ約 10^{8.00}TCID₅₀/mL 濃度に Feline infectious peritonitis virus (FIPV; 79-1146 株) を調製した。なお、至適ウィルス濃度はウィルスを含まない陰性対照試験 (予備試験) での細胞変性効果を元に算定した。
- ② 組織培養用シャーレ (60mm φ) に滅菌済み試験片 (40mm x 25mm) を設置した。試験片に濃度調製済みウィルス液 100μL を滴下した。滴下後直ちに 37°C 5%CO₂ 存在下で所定の時間培養を行った。
- ③ 測定条件に記載した接触時間毎に試験片を回収し、ウィルス維持培地 1%BSA 含有イーグル MEM (Gibco) 1mL を加えて洗い出し操作を行い、ウィルス液を回収した。
- ④ 回収したウィルス液を 10 倍階段希釈し、96 穴マイクロプレート上 fcwf4 細胞に接種し、1 時間接触感染させた。ウィルス液除去後、ウィルス維持培地 1%BSA 含有イーグル MEM (Gibco) 0.2mL を加えて 37°C5%CO₂ 存在下で 96 時間培養し、24 時間毎に細胞変性効果 (CPE; Cytopathic effect) あるいは代謝阻害を観察し、ウィルス感染力価 (TCID₅₀) を測定した。対照には、特殊加工未処理の基礎線維を用い、同様の試験方法を行った。なお、回収したウィルス液の有効希釈系列は、ウィルスを含まない陰性対照試験 (予備試験) での細胞変性効果を元に算定した。

2.2.2 特殊線維のネコカリシウィルスに対する性能試験

a 測定条件

接触時間: 1, 10, 30, 60 および 1080 分間

試験回数: 試験条件毎 3 回

回収容量: 1mL/線維 (40mm x 25mm)

b 測定方法

- ① あらかじめ約 $10^{8.00}$ TCID₅₀/mL 濃度に Feline calicivirus (FCV: ネコカリシ ウィルス (F9 株) を調製した。なお、至適ウィルス濃度はウィルスを含ま ない陰性対照試験 (予備試験) での細胞変性効果を元に算定した。
- ② 組織培養用シャーレ (60mm φ) に滅菌済み試験片 (40mm x 25mm) を設置し た。試験片に濃度調製済みウィルス液 100μL を滴下した。滴下後直ちに 37°C 5%CO₂ 存在下で所定の時間培養を行った。
- ③ 測定条件に記載した接触時間毎に試験片を回収し、ウィルス維持培地 1%BSA 含有イーグル MEM (Gibco) 1mL を加えて洗い出し操作を行い、ウィル ス液を回収した。
- ⑤ 回収したウィルス液を 10 倍階段希釈し、96 穴マイクロプレート上 fcwf4 細胞に接種し、1 時間接触感染させた。ウィルス液除去後、ウィルス維持 培地 1%BSA 含有イーグル MEM (Gibco) 0.2mL を加えて 37°C 5%CO₂ 存在下で 96 時間培養し、24 時間毎に細胞変性効果 (CPE; Cytopathic effect) あるい は代謝阻害を観察し、ウィルス感染力価 (TCID₅₀) を測定した。対照には、 特殊加工未処理の基礎線維を用い、同様の試験方法を行った。なお、回収 したウィルス液の有効希釈系列は、ウィルスを含まない陰性対照試験 (予 備試験) での細胞変性効果を元に算定した。

2.2.3 特殊線維のインフルエンザウィルス A 型に対する性能試験

a 測定条件

接触時間: 1, 10, 30, 60 および 1080 分間

試験回数: 試験条件毎 3 回

回収容量: 1mL/線維 (40mm x 25mm)

b 測定方法

- ① あらかじめ約 $10^{8.00}$ TCID₅₀/mL 濃度に Influenza virus A (IFVA: インフルエ ンザウィルス A 型 (H1/N1; PR/8/34 株) を調製した。なお、至適ウィルス濃 度はウィルスを含まない陰性対照試験 (予備試験) での細胞変性効果を元 に算定した。
- ② 組織培養用シャーレ (60mm φ) に滅菌済み試験片 (40mm x 25mm) を設置し た。試験片に濃度調製済みウィルス液 100μL を滴下した。滴下後直ちに 37°C 5%CO₂ 存在下で所定の時間培養を行った。
- ③ 測定条件に記載した接触時間毎に試験片を回収し、ウィルス維持培地 1%BSA 含有イーグル MEM (Gibco) 1mL を加えて洗い出し操作を行い、ウィル ス液を回収した。
- ⑥ 回収したウィルス液を 10 倍階段希釈し、96 穴マイクロプレート上 fcwf4 細胞に接種し、1 時間接触感染させた。ウィルス液除去後、ウィルス維持 培地 1%BSA 含有イーグル MEM (Gibco) 0.2mL を加えて 37°C 5%CO₂ 存在下で 96 時間培養し、24 時間毎に細胞変性効果 (CPE; Cytopathic effect) あるい は代謝阻害を観察し、ウィルス感染力価 (TCID₅₀) を測定した。対照には、 特殊加工未処理の基礎線維を用い、同様の試験方法を行った。なお、回収 したウィルス液の有効希釈系列は、ウィルスを含まない陰性対照試験 (予 備試験) での細胞変性効果を元に算定した。

結果および考察

3.1 試験物質の細胞毒性（予備試験）

被験機材および対照機材（それぞれ1片が40mm x25mmとなるように調製）に細胞増殖用培地 0.1mL を加えたものを測定試料原液とし、10 倍階段希釈を施した後、96 穴マイクロプレート上 fcwf4 細胞に接種した。被験機材において、測定試料原液で 60%の細胞変性効果 (CPE) が認められた (表 1)。 10^{-1} 希釈液以降の希釈液では、被験機材および対照機材ともに CPE は観察されなかった (表 1)

以上の結果より、被験機材はウィルス力価測定に使用する fcwf4 細胞に影響を及ぼすことが示唆され、これ以降の試験に関しては、1/10 倍希釈が適当であると判断した。また、測定に使用する FIPV および FGV の感染力価は 7.0TCID₅₀/mL 以上相当のものを使用することとした。

また、IFVA 感染試験用の MDCK 細胞についても細胞毒性の検討を行った。被験機材および対照機材（それぞれ1片が40mm x25mmとなるように調製）に細胞増殖用培地 0.1mL を加えたものを測定試料原液とし、10 倍階段希釈を施した後、96 穴マイクロプレート上 MDCK 細胞に接種した。被験機材において、測定試料原液で 50%の細胞変性効果 (CPE) が認められた (表 2)。 10^{-1} 希釈液以降の希釈液では、被験機材および対照機材ともに CPE は観察されなかった (表 2)

以上の結果より、被験機材はウィルス力価測定に使用する MDCK 細胞に影響を及ぼすことが示唆され、これ以降の試験に関しては、1/10 倍希釈が適当であると判断した。また、測定に使用する IFVA の感染力価は 7.0TCID₅₀/mL 以上相当のものを使用することとした。

3.2 被験機材のネココロナウィルスに対する抗ウィルス効果

a 被験機材 (Etak 処理済み中性能フィルタ)

実際に本試験に使用した FIPV の感染力価は、9.0TCID₅₀/mL であった。fcwf4 播種時の 1/10 希釈時におけるウィルス感染力価は、8.0TCID₅₀/mL であった (表 3a)。

被験機材とウィルス液 (FIPV) とを所定の時間感作させた後のウィルス感染力価は、感作時間 1 分時で 5.0TCID₅₀/mL、感作時間 10 分時で 4.0TCID₅₀/mL であった (表 2)。感作時間 30 分時で 3.0TCID₅₀/mL、感作時間 60 分時以降で検出限界以下の <2.0TCID₅₀/mL となった (表 3a)。

fcwf4 播種時の 1/10 希釈時におけるウィルス感染力価を基準として、次式よりウィルス抑制率を求めたところ、

$$\text{ウィルス抑制率 (\%)} = \frac{(\text{基準ウィルス感染力価}) - (\text{感作時間毎のウィルス感染力価})}{(\text{基準ウィルス感染力価})} \times 100$$

ウィルス抑制率は、感作時間 10 分時で 99.99%、30 分時で 99.999% および感作時間 60 分時以降で 99.999% 以上となった (図 1 および表 3a)。

B 対照機材

対照機材とウィルス液 (FIPV) とを所定の時間感作させた後のウィルス感染力価は、感作時間 1 分時で 5.0TCID₅₀/mL、感作時間 10 分時でも 5.0TCID₅₀/mL であった (表 3a)。感作時間 30 分時で 4.0TCID₅₀/mL および感作時間 60 分時以降で検出限界以下の <2.0TCID₅₀/mL となった (表 3a)。

ウィルス抑制率に関しては、感作時間 30 分時で 99.99% および感作時間 60 分時以降で 99.99% 以上となった (図 1 および表 3a)。

3.3 被験機材のネコカリシウイルスに対する抗ウイルス効果

a 被験機材 (Etak 処理済み中性能フィルタ)

実際に本試験に使用した FCV の感染力価は、8.5TCID₅₀/mL であった。fcwf4 播種時の 1/10 希釈時におけるウイルス感染力価は、7.5TCID₅₀/mL であった (表 3b)。

被験機材とウイルス液 (FCV) とを所定の時間感作させた後のウイルス感染力価は、感作時間 1 分時で 5.0TCID₅₀/mL、感作時間 10 分時で 4.0TCID₅₀/mL であった (表 2)。感作時間 30 分時で 3.0TCID₅₀/mL、感作時間 60 分時以降で検出限界以下の <2.0TCID₅₀/mL となった (表 3b)。

fcwf4 播種時の 1/10 希釈時におけるウイルス感染力価を基準として、次式よりウイルス抑制率を求めたところ、

$$\text{ウイルス抑制率 (\%)} = \frac{(\text{基準ウイルス感染力価}) - (\text{感作時間毎のウイルス感染力価})}{(\text{基準ウイルス感染力価})} \times 100$$

ウイルス抑制率は、感作時間 10 分時で 99.97%、30 分時で 99.997% および感作時間 60 分時以降で 99.997% 以上となった (図 2 および表 3b)。

B 対照機材

対照機材とウイルス液 (FCV) とを所定の時間感作させた後のウイルス感染力価は、感作時間 1 分時で 5.0TCID₅₀/mL、感作時間 10 分時でも 5.0TCID₅₀/mL であった (表 3b)。感作時間 30 分時で 4.0TCID₅₀/mL および感作時間 60 分時以降で検出限界以下の <2.0TCID₅₀/mL となった (表 3b)。

ウイルス抑制率に関しては、感作時間 30 分時で 99.97% および感作時間 60 分時以降で 99.97% 以上となった (図 2 および表 3b)。

3.4 被験機材のインフルエンザウイルス A 型に対する抗ウイルス効果

a 被験機材 (Etak 処理済み中性能フィルタ)

実際に本試験に使用した IFVA の感染力価は、9.0TCID₅₀/mL であった。MDCK 播種時の 1/10 希釈時におけるウイルス感染力価は、8.0TCID₅₀/mL であった (表 3c)。

被験機材とウイルス液 (IFVA) とを所定の時間感作させた後のウイルス感染力価は、感作時間 1 分時で 5.0TCID₅₀/mL、感作時間 10 分時で 4.0TCID₅₀/mL であった (表 2)。感作時間 30 分時で 3.0TCID₅₀/mL、感作時間 60 分時以降で検出限界以下の <2.0TCID₅₀/mL となった (表 3c)。

MDCK 播種時の 1/10 希釈時におけるウイルス感染力価を基準として、次式よりウイルス抑制率を求めたところ、

$$\text{ウイルス抑制率 (\%)} = \frac{(\text{基準ウイルス感染力価}) - (\text{感作時間毎のウイルス感染力価})}{(\text{基準ウイルス感染力価})} \times 100$$

ウイルス抑制率は、感作時間 10 分時で 99.99%、30 分時で 99.999% および感作時間 60 分時以降で 99.999% 以上となった (図 3 および表 3c)。

B 対照機材

対照機材とウイルス液 (IFVA) とを所定の時間感作させた後のウイルス感染力価は、感作時間 1 分時で 5.0TCID₅₀/mL、感作時間 10 分時でも 5.0TCID₅₀/mL であった (表 3c)。感作時間 30 分時で 4.5TCID₅₀/mL および感作時間 60 分時以降で検出限界以下の <2.0TCID₅₀/mL となった (表 3c)。

ウイルス抑制率に関しては、感作時間 30 分時で 99.97% および感作時間 60 分時

以降で 99.97%以上となった（図 2 および表 3c）。

以上の結果より、本試験に使用した被験機材すなわち対照機材に Etak を塗布したものは、抗ウイルス活性があることが示唆された。加えて、それらの効果はウイルス種に依存しないことが示唆された。

まとめ

本試験に使用した被験機材（Etak 処理済み中性能フィルタ）は

1. ネココロナウイルス、ネコカリシウイルスおよびインフルエンザウイルス A 型に対して、一定時間（感作時間 10 分以上）作用させることで 99.99% 以上の抗ウイルス効果を示した。
2. 対照機材と比較した場合には 1/10 程度の抗ウイルス効果であった。

参考文献

- ウイルス実験学、総論、1973（国立予防衛生研究所学友会編）
ウイルス実験学、各論、1973（国立予防衛生研究所学友会編）
ウイルス実験プロトコール、1995（メディカルビュー社）