

中衛検 第 21-V I -006 号

2021年6月28日

# 試 験 報 告 書

厚生労働省登録検査機関  
登録番号静岡県第 446 号  
(株)中部衛生検査センター  
〒428-0007 静岡県島田市島田 660-1  
Tel. 0547-46-2348 Fax 0547-46-2545



依頼者名:田中石灰工業株式会社 様

試験実施日:2021年4月28日～2021年6月28日

検査担当者:長澤 峻、井上 大悟  
検査責任者:増田 高志

1. 試験目的 検体の新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に対するウイルス不活化試験
2. 検体  
タナクリーム 1 日仕上げ
3. 試験概要  
検体表面に対して新型コロナウイルスのウイルス浮遊液を接種し、規定時間経過後、洗い出しを行い作用液とした。冷却しながら作用させ、2 時間後に作用液のウイルス感染価を測定した。なお試験方法は ISO18184 (JIS L 1922)を基本とした。
4. 試験方法
  - 1) 試験ウイルス  
SARS-CoV-2 JPN/Kanagawa/KUH003(新型コロナウイルス)
  - 2) 使用細胞  
VeroE6/TMPRSS2 細胞(JCRB1819)
  - 3) 使用培地
    - ① 細胞増殖培地  
ダルベッコ変法イーグル培地(ナカライテスク株式会社)に牛胎児血清を 5%、ペニシリン(100U/mL)、ストレプトマイシン(100  $\mu$  g/mL)、ジェネティシン(G418) (1mg/mL) 加えたものを使用した。
    - ② 細胞維持培地  
ダルベッコ変法イーグル培地(ナカライテスク株式会社)に牛胎児血清を 2%、ペニシリン(100U/mL)、ストレプトマイシン(100  $\mu$  g/mL)、ジェネティシン(G418) (1mg/mL) 加えたものを使用した。
  - 4) ウイルス浮遊液の調製
    - ① 細胞の培養  
細胞増殖培地を用い、使用細胞を組織培養フラスコ内に単層培養した。
    - ② ウイルスの接種  
単層培養後にフラスコ内から細胞増殖培地を除き、試験ウイルスを接種した。次に、細胞維持培地を加えて 37°C  $\pm$  1°C の炭酸ガスインキュベーター(CO<sub>2</sub> 濃度: 5%) 内で 5 日間培養した。
    - ③ ウイルス浮遊液の調製  
培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞の形態を観察し、細胞に形態変化(細胞変性効果: CPE) が起きていることを確認した。次に、培養液を遠心分離(3500rpm/min、10min) し、得られた上清をウイルス浮遊液とした。

5) 試験操作

検体(タナクリーム 1 日仕上げ)を滅菌したガラスバイアルに入れ、検体表面にウイルス浮遊液 250  $\mu$ L を接種した。冷却ブロック(CoolBox XT 冷蔵コア:Biocision)を用いて約 4°C に保冷しながら作用させ、2 時間後に 10 倍量の細胞維持培地を添加し、激しく混和し、混和液を回収した。混和の際に検体表面の加工物が剥離し、測定結果へ影響を及ぼすこと予備検討で確認されたため、回収した混和液を遠心処理(8000rpm/5min)し、その上清のウイルス感染価を測定した。

なお対照(ビニールクロス)を同様に試験し、2 時間作用後について測定を行った。

6) ウイルス感染価の測定

細胞増殖培地を用い、使用細胞を組織培養用マイクロプレート(平底 96 穴)内で単層培養した後、細胞増殖培地を除き、細胞維持培地で洗浄し、細胞維持培地を取り除いた。

次に、混和液上清及び対照を、細胞維持培地を用いて3倍段階希釈した。その希釈液 100  $\mu$ L を 4 穴ずつに接種し、37°C  $\pm$  1°C の炭酸ガスインキュベーター(CO<sub>2</sub> 濃度:5%)内で 1 時間使用細胞へ感染させた。感染後、原液及び希釈液をすべて除去し、細胞維持培地を用いて 2 回洗浄し、新たな細胞維持培地を入れ 3 日間培養した。

培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞の形態変化(細胞変性効果:CPE)の有無を観察し、Behrens-Karber 法により 50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)を算出して作用液 1mL 当たりのウイルス感染価に換算した。

5. 試験結果

1) 予備試験

溶出毒性試験:検体及び対照へ細胞維持培地を添加し、2 時間後に洗い出しを行い回収した。回収液から宿主細胞への毒性を試験したところ細胞毒性は確認されなかった。

抗ウイルス活性不活化の確認:溶出毒性試験での回収液にウイルス浮遊液を添加し、感染価を測定した。検体及び対照での回収液では抗ウイルス活性が無いことが確認された。

ウイルス液接種初発試験:検体及び対照(ビニールクロス)へ接触 1 分後の感染価結果を表 1 に示した。

2) ウイルス感染価の測定

結果を表 2 に示した。

表 1 ウイルス液接種初発試験

試験ウイルス	対象	log TCID <sub>50</sub> /mL <sup>*</sup>	LRV	減少%
			対数減少値	
新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)	タナクリーム 1日仕上げ	3.54	3.22	99.93
	ビニールクロス	6.04	0.72	80.75
	対照(維持培地)	6.76	—	—

TCID<sub>50</sub>: median tissue culture infectious dose 50%組織培養感染量

LRV: Logarithmic Reduction Value (対数減少値)

対照: 細胞維持培地

作用温度: 室温

検出下限: 3.54log TCID<sub>50</sub>/mL

※作用液1mL 当たりの TCID<sub>50</sub> の対数值

表 2 ウイルス液接触 2 時間試験

試験ウイルス	対象	log TCID <sub>50</sub> /mL <sup>*</sup>	LRV	減少%
		2 時間後	対数減少値	
新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)	タナクリーム 1日仕上げ	2.54	3.81	99.98
	対照(クロス)	6.36	—	—

TCID<sub>50</sub>: median tissue culture infectious dose 50%組織培養感染量

LRV: Logarithmic Reduction Value (対数減少値)

対照: 細胞維持培地

作用温度: 約 4°C

検出下限: 2.54log TCID<sub>50</sub>/mL

※作用液1mL 当たりの TCID<sub>50</sub> の対数值

以上