

订单编号: 15-an-RK-1

发行日期: 2020 年 12 月 7 日

## 试验报告

Rilis 科学工业株式会社 公启

标题

SARS-CoV-2 (病毒) 灭活试验

PANCIL V-20 5%水溶液

株式会社 **Biostir** (印)

邮编 532-0003

日本大阪市淀川区宫原 2-9-1 Annex 新大阪 4A

TEL: 0081-6-6151-3950

FAX: 0081-6-6151-3940

E-mail: info@biostir.com

试验责任人章

研究部 严原 美穗

(印)

1. 委托方

Rilis 科学工业株式会社

2. 试验机构及地址

受托方 : 株式会社 Biostir

试验机构 : 株式会社 Biostir

试验场所 : 鸟取大学医学部

3. 实施日期

2020 年 11 月 25 日

4. 试验监理

吉山裕规 (岛根大学医学部微生物学 教授)

5. 试验材料及受试物

病毒

SARS-CoV-2/JP/Hiroshima-46059T/2020

使用事先用 DMEM 配制后冷冻保存的病毒溶液 (不含血清)

细胞

VeroE6/TMPRSS2

受试物

PANCIL V-20 5%水溶液

灭菌水 (对照)

6. 病毒及其反应条件

受试物:病毒=9:1 (体积比)

室温, 30 分钟

※不存在血清

## 7. 试验方法

将受试物和病毒的溶液混合，引发了指定的反应。

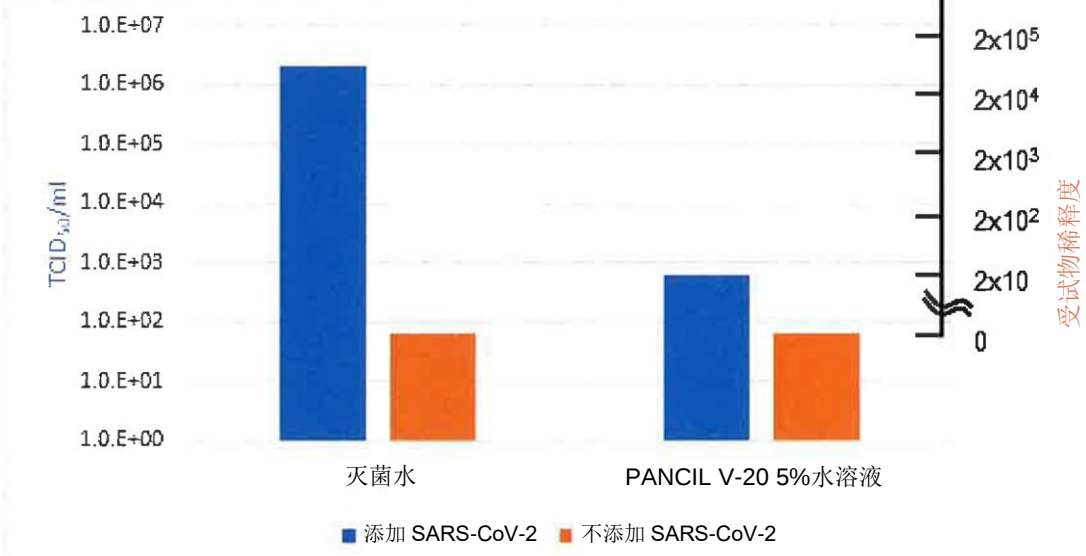
为了确认细胞毒性，将受试物和 EMEM 混合，引发了指定的反应。

将本反应液 50  $\mu$ l 和 EMEM 450  $\mu$ l 混合。重复用 EMEM 稀释 10 倍的操作，制作了逐级稀释 8 次的溶液。另外，为了确认细胞毒性，制作了逐级稀释 4 次的溶液。

向细胞加入各稀释液 100  $\mu$ l，在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下进行感染处理 1 小时。感染病毒后，加入含有 20%FCS 的 EMEM 50  $\mu$ l，在 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养了 2 天。通过显微镜经日性地确认到了致细胞病变效应（cytopathic effect, CPE）。

确认细胞从细胞井剥落后，加入异丙醇 100  $\mu$ l，再加入固定液（乙醇:乙酸=5:1）100  $\mu$ l 后，静置一晚。废弃固定液，向各细胞井分注染色液（乙醇中 0.5%氨基黑:乙酸:水=45:10:45）各 30  $\mu$ l，并让染色液流动过细胞井全体，然后在隔 1 分钟左右后用流水冲洗，目视判断了有无病毒感染。用 Behrens-Karber 法计算了 50%感染量（TCID<sub>50</sub>/ml）。

8. 结果



蓝色表示病毒毒力滴度，红色表示细胞毒性。与对照同样，未确认到受试物的细胞毒性。

病毒毒力滴度减少

| 受试物               | TCID <sub>50</sub> /ml | log | Δlog |
|-------------------|------------------------|-----|------|
| PANCIL V-20 5%水溶液 | 6.3.E+02               | 2.8 | -3.5 |
| 灭菌水               | 2.0.E+06               | 6.3 | 0.0  |

用常用对数计算时，PANCIL V-20 5%水溶液对 SARS-CoV-2 具有 3.5Log 的灭活效果。