

受注番号 : 15-an-RK-1

発行日 : 2020 年 12 月 7 日

## 試験報告書

リリース科学工業株式会社 御中

件名

SARS-CoV-2 (ウイルス) 不活化試験

パンシル V-20 5 %水溶液

株式会社 ビオスタ



〒532-0003

大阪市淀川区宮原 2-9-1 アネックス新大阪 4A

TEL: 06-6151-3950

FAX: 06-6151-3940

E-mail: [info@biostir.com](mailto:info@biostir.com)

試験責任者捺印

研究部 巖原 美穂



**1. 依頼者**

リリース科学工業株式会社

**2. 試験機関及び住所**

受託者 : 株式会社バイオスタ

試験機関 : 株式会社バイオスタ

試験場所 : 鳥取大学医学部

**3. 実施日**

2020 年 11 月 25 日

**4. 試験監修**

吉山裕規 (鳥根大学医学部微生物学 教授)

**5. 試験材料及び被験物質**

ウイルス

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

事前に DMEM で調製した冷凍保管ウイルス溶液 (血清含まず) を使用

細胞

VeroE6/TMPRSS2

被験物質

パンシル V-20 5 %水溶液

滅菌水 (対照)

**6. ウイルスとの反応条件**

被験物質 : ウイルス = 9 : 1 (容量比)

室温、30 分

※血清非存在下

## 7. 試験方法

被験物質とウイルス溶液を混合し、所定の反応を行った。

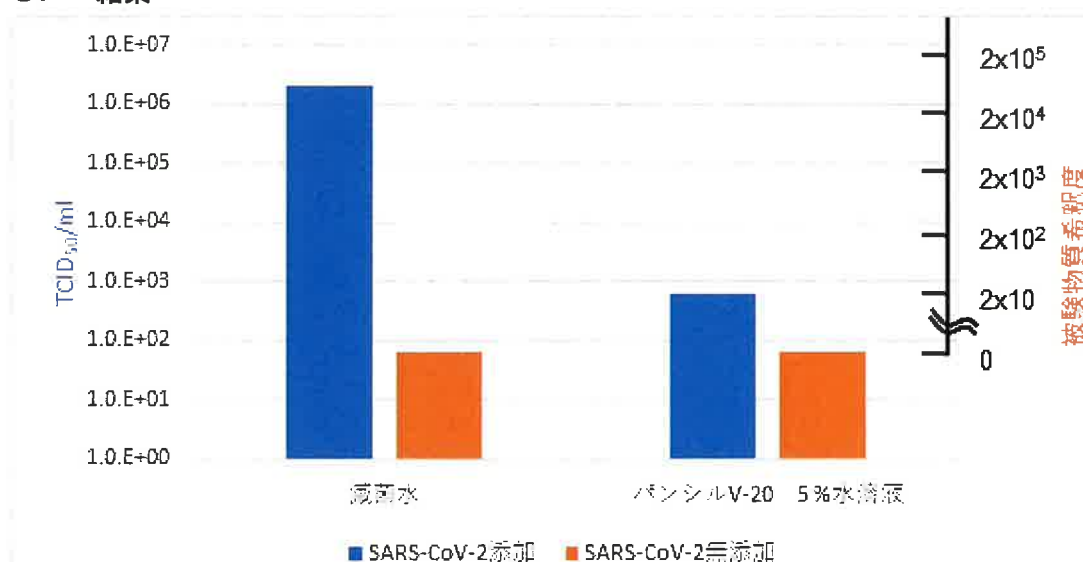
細胞毒性確認用に被験物質と EMEM を混合し、所定の反応を行った。

本反応液 50  $\mu$ l を 450  $\mu$ l の EMEM と混合した。EMEM で 10 倍希釈を繰り返し、8 段階希釈系を作成した。細胞毒性確認用として、4 段階希釈系を作成した。

細胞に各希釈液 100  $\mu$ l を加え、37  $^{\circ}$ C, 5 %  $\text{CO}_2$  下で 1 時間感染処理を行った。ウイルス感染後、20 % FCS 含有 EMEM を 50  $\mu$ l 加え、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 2 日間培養した。経目的に顕微鏡下で細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) を確認した。

細胞が well からはがれたことを確認後、100  $\mu$ l イソプロパノールを加え、100  $\mu$ l 固定液 (エタノール : 酢酸 = 5 : 1) を加え、一晩静置した。固定液を捨て、染色液 (0.5 % アミドブラック in エタノール : 酢酸 : 水 = 45 : 10 : 45) を各 well に 30  $\mu$ l 分注し、well 全体に行き渡らせ、1 分程度おいて流水で濯ぎ、ウイルス感染の有無を目視で判定した。50 % 感染量 ( $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ) は、Behrens-Karber 法で算出した。

## 8. 結果



青色はウイルス感染価、赤色は細胞毒性を示す。対照と同様に被験物質の細胞毒性は確認されなかった。

## 感染価の減少

| 被験物質           | TCID <sub>50</sub> /ml | log | Δlog |
|----------------|------------------------|-----|------|
| パンシルV-20 5%水溶液 | 6.3.E+02               | 2.8 | -3.5 |
| 滅菌水            | 2.0.E+06               | 6.3 | 0.0  |

パンシル V-20 5 %水溶液は、常用対数で 3.5 の SARS-CoV-2 不活化効果を有した。

以上