

1. 目的

貴社ご提供品「白金ナノ粒子液」によるネココロナウイルスの不活化効果を評価した。

2. 依頼者

名 称：株式会社 バイオフェイス

所在地：〒611-0026 京都府宇治市開町 39-2

3. 試験機関

名 称：財団法人 北里環境科学センター

所在地：〒252-0329 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1

担 当：ウイルス部ウイルス課

4. 実施日

平成 24 年 3 月 7 日～平成 24 年 3 月 15 日

5. 試験品

白金ナノ粒子液

貴社ご提供試験品を原液として、リン酸緩衝生理食塩水（PBS：phosphate buffered saline）で 2 倍に希釈したものをを用いた。

6. 作用時間

0 時間（初期）、10 時間

7. 供試ウイルス

ネココロナウイルス（*Feline enteric corona virus*）79-1683 株）

8. 試験方法

1) 供試ウイルスの培養方法

ネココロナウイルスをネコ胎児由来細胞株（Fcfw-4：Felis cautus, whole fetus）に感染させ、細胞培養面積の約 90% 以上が細胞変性効果（CPE：Cytopathic effect）を示したとき-80℃の冷凍庫に凍結保存した。その後、凍結融解操作を 2 回繰り返して、3,500rpm で 10 分間遠心した上澄みを採取し、限外ろ過膜で濃縮精製したウイルス液を供試ウイルスとした。

2) 試験手順

試験管内に 900 μL の試験品と試験ウイルス液 100 μL をそれぞれ加え、試験管ミキサーで穏やかに混合した後、室温で所定の時間作用させた。所定時間作用後、直ち

にこの混合液 100 μL を 0.2% のウシ胎児血清 (FBS : fetal bovine serum) を含む Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 9.9 mL に添加し、100 倍に希釈して試験品の作用を停止させた。この液をウイルス感染価測定用試料原液としてウイルス感染価を測定した。なお、作用時間 0 時間の試料は試験品液の代わりに PBS を用いて実施した。

3) ウイルス感染価の測定

ウイルス感染価測定用試料原液を PBS で 10 倍段階希釈した後、測定用試料原液または希釈ウイルス液 50 μL と 5% FBS を含む DMEM に懸濁した CRFK 細胞 50 μL を、96 穴マイクロプレートに植え込んだ。その後、37 $^{\circ}\text{C}$ の炭酸ガスふ卵器内で 4 日間培養を行った。培養後、倒立顕微鏡下でウイルスの増殖による CPE を観察して Reed-Muench 法を用いてウイルス感染価 ($\text{TCID}_{50}/\text{mL}$) を求めた。

9. 試験結果

貴社ご提供試験品、「白金ナノ粒子液 (2 倍希釈液)」のネココロナウイルスに対する不活化効果を調べた。試験結果を表-1、図-1 に示した。

初期感染価 $3.3 \times 10^5 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ のウイルスにコントロール (PBS) を 10 時間させた場合、感染価はほとんど変動しなかった。一方、2 倍希釈液を 10 時間作用させた場合、 $1.9 \times 10^1 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ となり、初期値からのウイルス感染価の対数減少値 (LRV : log reduction value) は、 $4.2 \log_{10}$ (対照と比較した場合、 $3.9 \log_{10}$) となった。

10. コメント

本試験では、貴社ご提供白金ナノ粒子液によるネココロナウイルスに対する不活化効果を検討した。

本試験で用いたネココロナウイルスは、SARS ウイルスの代替ウイルスとして認知されていない。本試験では、SRAS の原因となる病原体の SARS コロナウイルスと同じコロナウイルス科に属し、構造が似ているため試験に用いた。

本試験品の 2 倍希釈液をネココロナウイルスに対し 10 時間作用させた場合、ウイルス感染価を $4.2 \log_{10}$ 減少させた。抗菌試験においては、抗菌効果の判定基準として抗菌活性値が 2.0 以上を“効果あり”として規定している。抗ウイルス効果の判定基準は定められていないが、ウイルス試験においては、所定作用時間経過後の対照と試験品の LRV の差を求めて抗ウイルス効果を判定している。抗菌試験の判定基準を適応した場合、本試験においては、10 時間作用させた場合、 $4.2 \log_{10}$ の LRV が認められ、ウイルス不活化効果があると判断される。

以上

表-1 試験品作用後のネココロナウイルス感染価の変化

試験品	作用時間		感染価対数減少値 (LRV)	
	0 時間 (初期)	10 時間	A	B
白金ナノ粒子液 (2 倍希釈)	3.3×10^5	1.9×10^1	4.2	3.9
対照 (PBS)		1.5×10^5	0.3	***

感染価単位：TCID₅₀/mL検出限界値： 1.3×10^2 TCID₅₀/mL

感染価対数減少値：

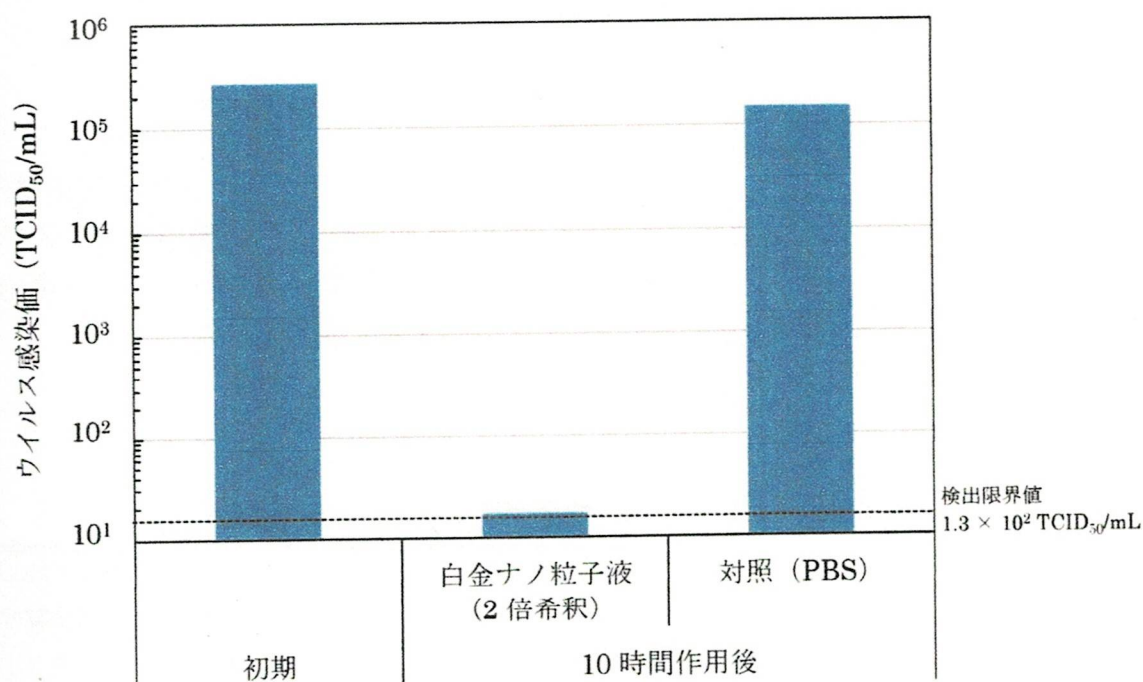
A：初期値からの減少、 \log_{10} (初期感染価 ÷ 各作用後の感染価)B：10 時間作用後の感染価の減少、 \log_{10} (コントロールの感染価 ÷ 試験品の感染価)

図-1 試験品作用後のネココロナウイルス感染価の変化