

研究開発受託報告書

プレイリーホームズ株式会社 様

新型コロナウイルスを用いた抗ウイルス性能評価

神奈川県海老名市下今泉705番地の1
地方独立行政法人
神奈川県立産業技術総合研究所

理事長 鈴木 邦雄



-
- * 本報告書の全部又は一部の無断転載・転用は固くお断りします。また、当該報告書を基に広告、カタログやインターネット等に、当法人の名義を使用する事を希望する場合には、使用内容ごとに書面にて事前に相談してください。
 - * 本報告書に記載の試験結果は、提供された試料に対するものであり、ロット全体の性能を代表するものではありません。
 - * 公印のない報告書は正式なものではありません。

① 仕様

- ・評価名： SARS-CoV-2を用いた抗ウイルス性能評価
- ・評価実施場所： (地独) 神奈川県立産業技術総合研究所 殿町支所
- ・ウイルス接種日： 令和3年10月15日
- ・試験品の素材・種類： 無垢フローリング (赤松材)
- ・評価方法： JIS R 1756 (フィルム密着法) を準用
- ・ウイルスの培養及び感
染価の測定方法： ISO 21702を参考
- ・無加工品名： あづみの松 無塗装
- ・光触媒加工品名： あづみの松ナチュラルVコート あづみの松TSVコート
- ・試験品の大きさ： 50 mm×50 mm×2 mm (厚さ)
- ・n数： n=3
- ・試験ウイルス： SARS-CoV-2/Hu/KngFJ/23RD5
宿主細胞： Vero細胞 (ATCC CCL-81)
- ・予備照射条件： 紫外光 (FL20S-BLB) 1.0 mW/cm²、24時間
- ・試験品の無菌化： 無水エタノール清拭
- ・光源の種類： 白色蛍光灯 (Panasonic FL10WF)
- ・照射条件： 照射時間 6時間
照射強度 1000 lx
シャープカットフィルター： 無し
- ・照度計： 株式会社トプコン IM-600M
- ・密着フィルム： ポリプロピレンフィルム (VF-10, KOKUYO)、 40 mm×40 mm
- ・保湿用ガラス： 硼珪酸ガラス
- ・ウイルス感染価の測定方法： プラーク法

※備考：各試験品は、以下の前処理を行った。

- ・あづみの松 無塗装：撥水シーリング塗装 (貴社)
- ・あづみの松ナチュラルVコート：撥水シーリング塗装 (貴社) 及び24時間の滅菌水中での浸漬処理 (弊所)
- ・あづみの松TSVコート：処理なし

② 評価の方法

2-1 培地

- ・細胞培養培地：イーグル培地 (EMEM) +10%非働化済み胎児ウシ血清+抗生物質
- ・維持培地：イーグル培地 (EMEM)
- ・寒天培地：維持培地+0.75%細胞培養用寒天
- ・ウイルス回収用培地：SCDLP培地

2-2 ウイルスの培養と試験ウイルス液の調製

Vero細胞（100%コンフルエント）を維持培地で洗浄後、SARS-CoV-2を接種する。15分毎に振盪し1時間後、維持培地を加え、37℃、5%CO₂環境下で5日間培養する。その後、凍結融解を2回行い、細胞を遠心分離で除去し、上清をウイルス原液とする。このウイルス原液を滅菌水で10倍に希釈したものを、試験ウイルス液として用いる（約1～5×10⁶ pfu/ml）。

pfu : plaque-forming unit. プラーク法で用いられ、感染性を有するウイルス量を表す。

2-3 ウイルス感染価の測定

ウイルスの感染価の測定には、プラーク法を用いる。まず、感染させるためのVero細胞を6穴プレートに培養する（100%コンフルエント）。その後、培地を除去し、ウイルス回収原液及び段階希釈液0.1 mlを接種する。15分毎に振盪し1時間後、寒天培地3.0 mlを重層し、37℃、5%CO₂環境下で5～7日間培養する。培養後、10%ホルマリン水溶液で固定し、寒天培地を除去する。最後に、メチレンブルー水溶液で染色し、ウイルスによって形成されたプラークの数を計測する。プラークの数、希釈倍率及びSCDLPの量より、試験品当たりのウイルスの感染価を算出する（図1参照）。

2-4 抗ウイルス評価

無菌化処理をした試験品を、加工面を上にしてシャーレの中のガラスU字管に設置し、2-2で調製した0.15 mlの試験ウイルス液を接種する。密着フィルムをかぶせ、試験品にウイルス液を密着させる。保湿用ガラス板を乗せる。計画書に示してある照射条件に従い、暗所静置または光照射を行う。接種直後のものは、静置せずすぐに回収作業を行う。その後、SCDLP培地0.85 mlで試験品及び密着フィルムからウイルスを回収する。次に、この回収液を維持培地を用いて10倍の段階希釈系列を作製する。この回収原液と希釈液を用いてプラーク法によってそれぞれのウイルス感染価を測定する（図1参照）。

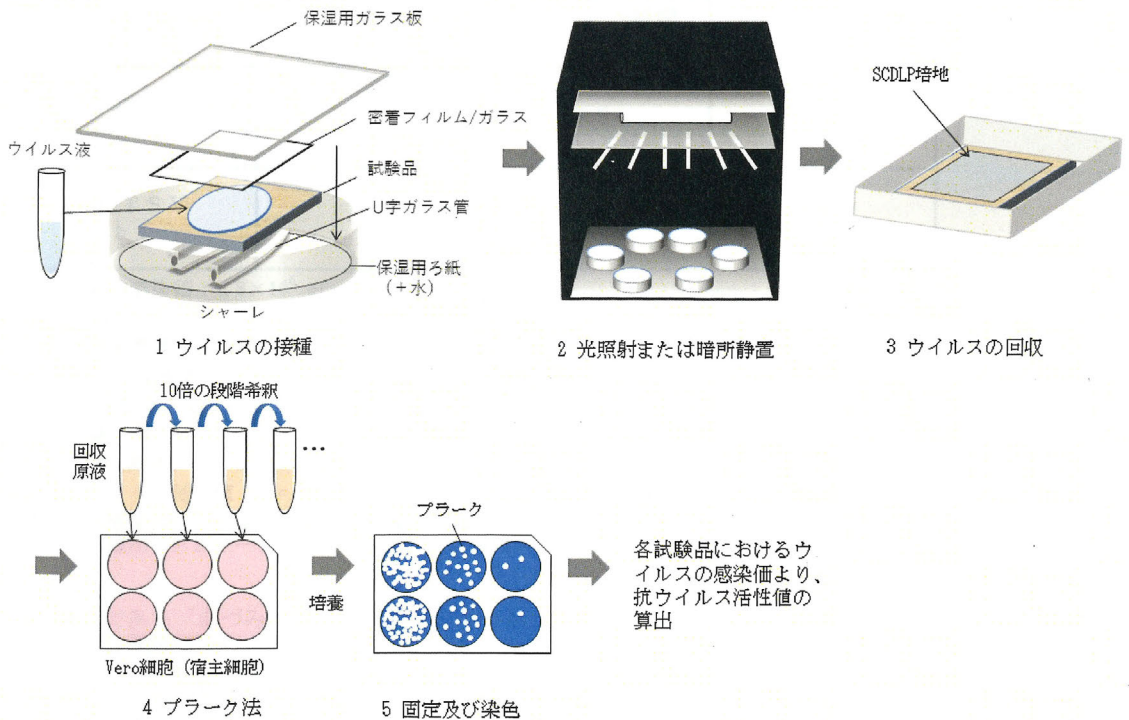


図1 抗ウイルス評価の概要

③ 抗ウイルス評価の結果

表1 抗ウイルス評価の結果

抗ウイルス試験 (SARS-CoV-2)	ウイルス感染価 (pfu/sample) ^{*1}		
	接種直後	暗所、6時間	1000 lx、6時間
あづみの松 無塗装	1.8E+05	1.6E+03	1.1E+02
	1.6E+05	6.0E+02	3.7E+03
	1.8E+05	9.5E+02	1.1E+03
あづみの松ナチュラルV コート	-	< 10	< 10
		< 10	< 10
		< 10	< 10
あづみの松TSV コート	-	3.0E+02	1.5E+01
		1.7E+02	1.0E+01
		5.0E+01	1.0E+01

表2 抗ウイルス評価のまとめ

抗ウイルス評価 (SARS-CoV-2)	ウイルス平均感染価 (pfu/sample) ^{*1}		
	接種直後	暗所、6時間	1000 lx、6時間
あづみの松 無塗装	1.7E+05	1.0E+03	1.6E+03
あづみの松ナチュラルV コート	-	< 10	< 10
あづみの松TSV コート	-	1.7E+02	1.2E+01

抗ウイルス評価 (SARS-CoV-2)	抗ウイルス活性値 ^{*2}		光照射による 抗ウイルス活性値 (ΔV) ^{*2}
	暗所、6時間 (V_D)	1000 lx、6時間 (V_{F-1000})	
あづみの松ナチュラルV コート	2.0	2.2	0.2
あづみの松TSV コート	0.8	2.1	1.4

・接種ウイルス液の感染価： 1.8×10^6 pfu/ml

・接種量：0.15 ml

・ウイルスの検出限界値：10 pfu/sample

*1 "E+05"とは" $\times 10^5$ "を表す。また、"< 10"は、検出限界以下を表す。

*2 抗ウイルス活性値は下記の式で求めた。

抗ウイルス活性値 (明所) $V_{F-L} = \text{Log}(B_{F-L}) - \text{Log}(C_{F-L})$

抗ウイルス活性値 (暗所) $V_D = \text{Log}(B_D) - \text{Log}(C_D)$

光照射による抗ウイルス活性値 $\Delta V = V_{F-L} - V_D$

B: 無加工品の平均感染価、C: 加工品の平均感染価

L: 可視光照射度、D: 暗所、F: シャープカットフィルターの種類 (A, BまたはF(フィルター無し))

貴社の評価品である「あづみの松ナチュラルVコート」及び「あづみの松TSVコート」について、SARS-CoV-2に対する抗ウイルス性能評価を行った。その結果、抗ウイルス活性値は、明所 (1000lx 6時間) において、それぞれ、2.2及び2.1 (ウイルスの減少率：99.4%及び99.3%)、暗所においては、2.0及び0.8 (ウイルスの減少率：99.0%及び83.4%)であった。明所 (あづみの松ナチュラルVコート及びあづみの松TSVコート) 及び暗所 (あづみの松ナチュラルVコート) 条件下、高い抗ウイルス効果が認められた。また、光照射による抗ウイルス活性値は、それぞれ、0.2及び1.4であった。

(参考) 抗ウイルス活性値の目安 (光触媒工業会 JIS R 1756)

抗ウイルス活性値 (R_{F-L}) ≥ 2.0 : 効果あり

④ プラークの写真

試験品からSCDLPによる抽出を行い、その原液、10倍希釈、100倍希釈したものを、それぞれ0.1 mlづつ宿主細胞に接種した時のプラークの写真を示す(図2)。1つのプラークは、感染性のある1個のウイルスより形成されるため、プラークの数を数えることで、ウイルスの感染価を測定することができる。

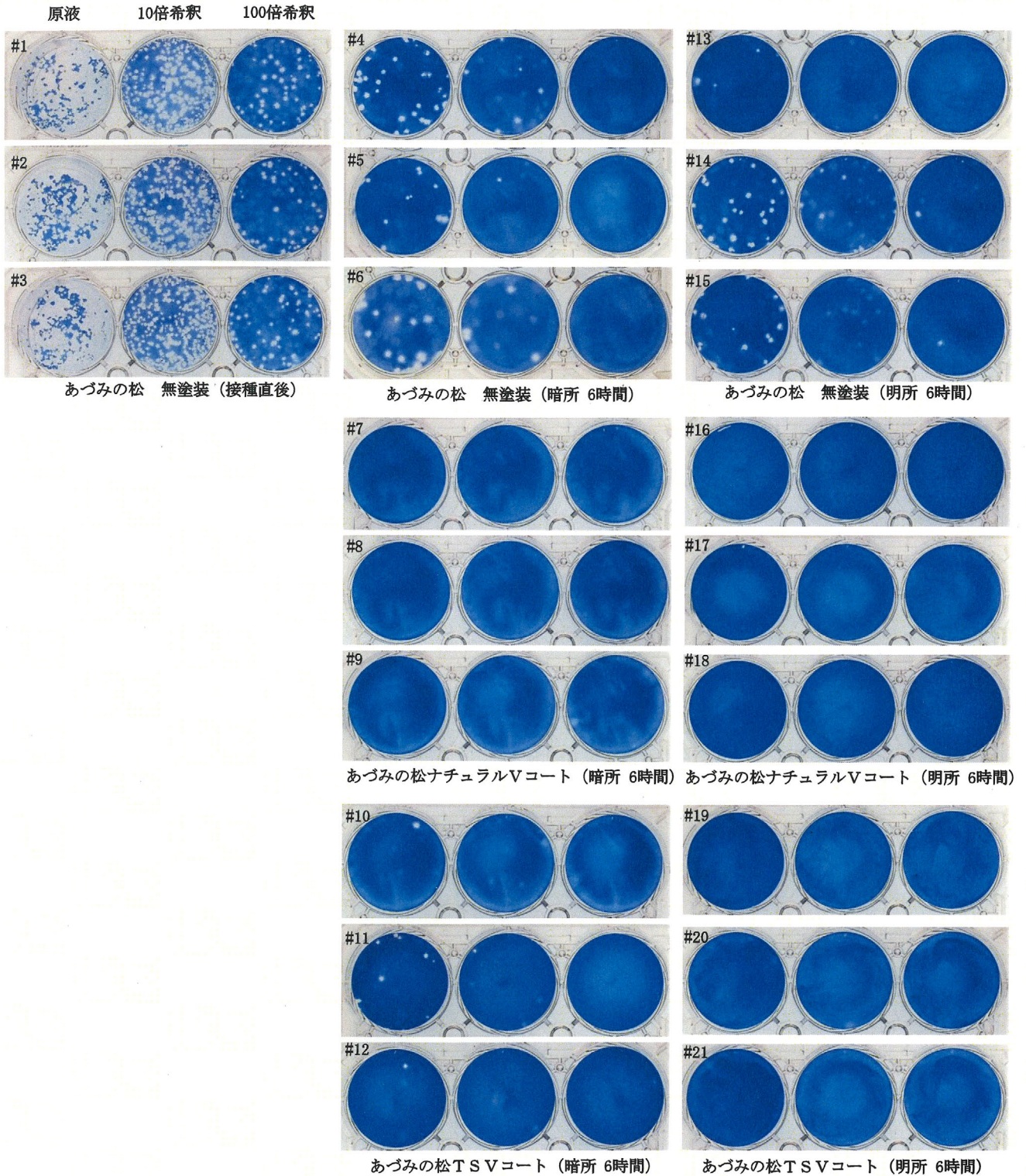


図2 SARS-CoV-2によって形成されたプラークの写真