

中衛検 第 20-V I -011 号

2021年 4月 26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 14 号  
(株)中部衛生検査センター  
〒428-0007 静岡県島田市島崎 6-2-1  
Tel. 0547-46-2348 Fax 0547-46-2343



依頼者名:日本カーヴィング株式会社 様

試験実施日:2021年3月22日～2021年4月19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  
スーパークリアレディ CL-1919(日本カービング株式会社)
3. 試験概要  
新型コロナウイルスのウイルス浮遊液を検体の開口部中央に設置し、検体を作動させ、作用液とした。室温で作用させ、10 秒後及び 15 秒後に作用液のウイルス感染価を測定した。
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整
    - 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整  
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)が起こっ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  
PBS(-)で 10 倍希釈したウイルス浮遊液1mL を、35mm シャーレ表面全体へ均一に流し込んだ。シャーレに石英ガラス製のフタをかぶせ、依頼者から供与された検体の開口部中央に治具を使いセットし、指定の時間電源を投入し紫外線を照射した。  
点灯 10 秒間及び 15 秒間室温で作用させ、ウイルス浮遊液をピペッティングで混合し、作用液とした。  
なお、対照として細胞維持培地を用いて同様に試験し、15 秒間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、作用液及び対照を、細胞維持培地を用いて 3 倍段階希釈した。その原液及び希釈液 100  $\mu$ L を単層培養したマイクロプレートへ 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 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

飛散防止のための石英ガラス製のカバーをかけ、指定時間電源を投入し、紫外線を照射した細胞維持培地を用いて予備試験を行った。

すべての指定時間において使用細胞の生存が確認され、検体の影響を受けずにウイルス感染価が測定できることを確認した。

2) ウイルス感染価の測定

結果を表1に示した。

表 1

試験ウイルス	対象	log TCID <sub>50</sub> /mL <sup>※</sup>	LRV	減少%
		10 分後	対数減少値	
新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)	10 秒後	<2.46	3.22	99.94
	15 秒後	<2.46	3.22	99.94
	対照	5.68	—	—

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

<2.46: 検出せず

※作用液1mL 当たりの TCID<sub>50</sub> の対数值

以上