

試 験 報 告 書

Kitasato Research Center for Environmental Science

一般財団法人 北里環境科学センター

〒252-0329 神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号

TEL : 042(778)9208 FAX : 042(778)4551

* * * 試験内容を公表する場合は、事前の承諾が必要です。 * * *

アンデス電気 株式会社 殿

試験報告書

紫外光照射下における光触媒加工品による
ネコ腸コロナウイルスに対する抗ウイルス試験

北環発 2019_0545 号

2020年6月27日

神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号

一般財団法人 北里環境科学センター

理事長 山田 陽城

試験内容を公表する際は、結果の表記等について専門的な立場から確認させていただいております。なお、確認目的と申込様式は、ホームページに掲載しております。
(http://www.kitasato-e.or.jp/?page_id=87)

1. 表題

紫外光照射下における光触媒加工品によるネコ腸コロナウイルスに対する抗ウイルス試験

2. 試験番号

依頼書番号：20197108号

報告書番号 2019_0545号

3. 目的

紫外光型光触媒加工品にウイルス液を滴下し、「ファインセラミックス-光触媒材料の抗ウイルス性試験方法-バクテリオファージ QB を用いる方法」(JIS R 1706:2020)を参考にネコ腸コロナウイルスに対する抗ウイルス効果を調べた。

4. 依頼者

名称：アンデス電気株式会社

所在地：〒039-2292 青森県八戸市桔梗野工業団地 1-3-1

5. 試験機関

名称：一般財団法人 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

6. 実施期間

2020年3月31日～2020年5月18日

7. 試験品および試験条件

1) 試験品 (各 50 × 50 mm)

① 光触媒加工品：光触媒加工ガラス板

試験前にブラックライトで $1\text{mW}/\text{cm}^2$ 、24 時間の予備照射を行った。

② 無加工品：未加工ガラス板

2) 光照射条件

紫外光 $0.25\text{ mW}/\text{cm}^2$

3) 照射線源

ブラックライト (東芝ライテック FL20SBLB-A)

4) 静置時間

光照射：4 時間

暗所：0 時間（初期、未加工品のみ）、4 時間

8. 主な使用培地、試薬および機材

1) 培地

- ① Dulbecco's Modified Eagle's Medium（以下 DMEM、シグマアルドリッチ）
- ② ダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」②（以下 DME、日水製薬）
- ③ SCDLP ブイヨン培地（以下 SCDLP、栄研化学）

2) 試薬

- ① ウシ胎児血清（FBS：Fetal Bovine Serum、シグマアルドリッチ）
- ② Dulbecco's PBS (-) "Nissui"（PBS：Phosphate buffered saline、日水製薬）

3) 機材

- ① マイクロピペット 200 μ L、1000 μ L（ギルソン）
- ② 電動 8 連マルチチャンネルピペット（10 ～ 300 μ L、ザルトリウス）
- ③ 電動 8 連マルチチャンネルピペット（50 ～ 1200 μ L、ザルトリウス）
- ④ 安全キャビネット（BHC-1902 IIB、エアーテック）
- ⑤ CO₂ インキュベータ（MCO-20AIC、三洋）
- ⑥ 恒温槽（MIR-154-PJ、パナソニック）

9. 供試ウイルスとウイルス液の調製方法

1) 試験ウイルス

ネコ腸コロナウイルス（Feline enteric coronavirus, WSU 79-1683）

2) 感染価測定用細胞

全ネコ胎児由来株化細胞（fcwf-4：Felis catus whole fetus）

細胞株は、5% FBS 加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium で継代培養を行った。

3) 試験ウイルス液の調製

細胞培養フラスコに単層に培養した fcwf-4 細胞にウイルスを添加し、37℃の CO₂ インキュベータで 1 時間静置し、細胞にウイルスを感染させた。1 時間静置後、0.2% FBS 加 DMEM を加え、37℃の CO₂ インキュベータで 1～2 日間培養した。培養中、細胞培養面積の約 90% 以上が細胞変性効果（CPE: cytopathic effect）を示したとき培養上清を回収し、-30℃の冷凍庫に凍結保存した。その後、凍結融解操作を行い、3,000 × *g* で 10 分間遠心した上澄みをポリエチレングリコール沈殿法で濃縮

したウイルス液を保存ウイルス液とし、 -80°C に保存した。試験には、保存ウイルス液を PBS で 10 倍に希釈したウイルスを用いた。

10. 試験方法

1) 試験方法

試験は、光触媒試験法「ファインセラミックス-光触媒材料の抗ウイルス性試験方法-バクテリオファージ Q8 を用いる方法」(JIS R 1706:2020)の試験手順を参考にて実施した。すなわち、保湿シャーレ(図-1)中に入れた試験品に、ウイルス液 0.15 mL を滴下した後、 $40 \times 40 \text{ mm}$ のポリプロピレン製フィルムを載せた。ウイルス液を接種した試験片は、 $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ の条件で所定の時間、光照射した。また、暗所条件は遮光した容器に入れ、 25°C に設定した恒温槽で所定の時間静置した。

なお、0 時間(初期)は「無加工品」にウイルス液を接種して直ちに誘出操作を行ったものを用いた。

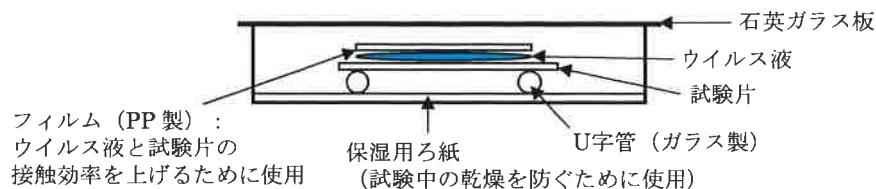


図-1 保湿シャーレ

2) ウイルスの回収

所定の時間、明所および暗所に静置した試験品を保湿シャーレから取り出し、PBS で 5 倍に希釈した SCDLP 10 mL で試験品の表面を洗い流す操作によりウイルスを誘出した。この液をウイルス感染価測定用の試料原液として用いた。

3) TCID₅₀ 法によるウイルス感染価測定

ウイルス感染価測定用の fcwf-4 細胞をあらかじめ 96 ウエルプレートに播種して CO_2 インキュベータで 4 日間培養した。ウイルスを接種する前に、培養上清を除き 1% FBS 加 DME に交換した。次いで、ウイルス感染価測定用試料の原液を PBS で 10 倍段階希釈した。培養液を除いたウエルに、感染価測定用試料の原液または PBS で 5.5 倍段階希釈した試料 25 μL を接種し、 37°C で 1 時間、ウイルスを細胞に感染させた。1 時間後、接種したウイルス液を除去し、0.2% FBS 加 DMEM を各ウエルあたり 0.1 mL 加え、 CO_2 インキュベータで 4 日間培養した。培養後、ウイルスの増殖により生じた CPE を顕微鏡で観察し、Reed-Muench

法によりウイルス感染価 (TCID₅₀) を求め、誘出液量 (10 mL) から試験片当たりのウイルス感染価 (TCID₅₀/試験片) に換算して記載した。

4) 試験品の抗ウイルス活性値

抗ウイルス活性値 (V_L)、光照射による効果 (ΔV) および暗所における効果 (V_D) は、試験結果を基に「ファインセラミックス-光触媒材料の抗ウイルス性試験方法-バクテリオファージ QB を用いる方法」(JIS R 1706:2020) を参考に、以下の計算式により求めた。

$$\textcircled{1} \quad V_{L(0.25)} = [\log (B_{0.25} / A) - \log (C_{0.25} / A)] = \log [B_{0.25} / C_{0.25}]$$

$$\textcircled{2} \quad \Delta V = \log [B_{0.25} / C_{0.25}] - \log [(B_D / A) - \log (C_D / A)] \\ = \log [B_{0.25} / C_{0.25}] - \log [B_D / C_D]$$

$$\textcircled{3} \quad V_D = \log [B_D / C_D]$$

A : 無加工試験片の接種直後のウイルス感染価 (TCID₅₀/試験片)

$B_{0.25}$: 無加工試験片を紫外放射照度条件 0.25 mW/cm² で 4 時間照射した後のウイルス感染価 (TCID₅₀/試験片)

$C_{0.25}$: 光触媒加工試験片を紫外放射照度条件 0.25 mW/cm² で 4 時間照射した後のウイルス感染価 (TCID₅₀/試験片)

B_D : 無加工試験片を 4 時間暗所に保存した後のウイルス感染価 (TCID₅₀/試験片)

C_D : 光触媒加工試験片を 4 時間暗所に保存した後のウイルス感染価 (TCID₅₀/試験片)

11. 試験結果

結果を表-1 に示した。また、試験のまとめを表-2 に示した。表には、4 時間作用時のネコ腸コロナウイルス感染価をもとに、上記“4) 試験品の抗ウイルス活性値”に記載した計算式で求めた「抗ウイルス活性値」ならびに「光照射による効果」を併せて示した。

初期感染価は 3.0 × 10⁶ TCID₅₀/試験品であった。ウイルスを接種した「光触媒加工品」に 0.25 mW/cm² の光を 4 時間照射した際の感染価は、検出限界値未満 (< 2.3 × 10² TCID₅₀/試験品) となった。また、同試験品の 4 時間暗所に静置した後の感染価は、3.1 × 10⁴ TCID₅₀/試験品であった。「光触媒加工品の抗ウイルス活性値、光照射による効果および暗所における効果」を求めると、それぞれ、> 2.1、0.2 および 1.8 となった。

以上

表-1 ネコ腸コロナウイルスにおける 4 時間作用の試験結果

試験品	試験条件	時間	
		0時間 (接種直後)	4 時間
未加工ガラス板	暗所	3.0×10^6 <i>A</i>	2.5×10^6 <i>B_D</i>
	光照射 BLB 0.25mW/cm ²	—	3.3×10^4 <i>B_{0.25}</i>
光触媒加工ガラス板	暗所	—	3.1×10^4 <i>C_D</i>
	光照射 BLB 0.25mW/cm ²	—	$< 2.3 \times 10^2$ <i>C_{0.25}</i>

試験ウイルス：ネコ腸コロナウイルス (Feline enteric coronavirus, WSU 79-1683)

単位：TCID₅₀/試験片

A： 無加工試験片の接種直後のウイルス感染価 (TCID₅₀/試験片)

B_{0.25}： 無加工試験片を紫外放射照度条件 0.25 mW/cm² で 4 時間光照射した後のウイルス感染価 (TCID₅₀/試験片)

C_{0.25}： 光触媒加工試験片を紫外放射照度条件 0.25 mW/cm² で 4 時間光照射した後のウイルス感染価 (TCID₅₀/試験片)

B_D： 無加工試験片を 4 時間暗所に保存した後のウイルス感染価 (TCID₅₀/試験片)

C_D： 光触媒加工試験片を 4 時間暗所に保存した後のウイルス感染価 (TCID₅₀/試験片)

表-2 試験条件詳細

項目 No.	試験条件	記録および結果
1	光触媒抗ウイルス加工した試験品の種類	「光触媒加工試験片」(試験品の大きさ: 50×50 mm)
2	光触媒加工していない試験品の種類	未加工ガラス板(試験品の大きさ: 50×50 mm)
3	光源の種類	東芝ライテック株式会社製 ブラックライト (FL20SBLB-A) 2本点灯
4	予備照射条件	BLB 1 mW/cm ² , 24時間
5	照度計	浜松フォトニクス 本体: UV POWER METER MODEL C9536-01、 受光部: H9958
6	密着フィルムの種類	手書き用 OHP フィルム (KOKUYO、VF-10、PP、40 mm 角)
7	保湿ガラスの種類	ホウケイ酸ガラス (100mm 角) TEMPAX (SCHOTT)
8	光照射条件	0.25 mW/cm ² 、4時間
9	ウイルス液の接種量	0.15 mL
10	試験に用いたウイルス株	Feline enteric coronavirus, WSU 79-1683
11	感染価測定用細胞	fcwf4 (ATCC CRL-2787)
12	接種ウイルス感染価 (TCID ₅₀ /0.15mL)	2.4 × 10 ⁶
13	A: 無加工試験品にウイルス液を接種し、直後に 誘出した感染価 (TCID ₅₀ /試験片)	3.0 × 10 ⁶
14	B _{0.25} : 無加工試験品にウイルス液接種後、4時間 光照射した後の感染価 (TCID ₅₀ /試験片)	3.3 × 10 ⁴
15	C _{0.25} : 光触媒加工品にウイルス液接種後、4時間 光照射した後の感染価 (TCID ₅₀ /試験片)	< 2.3 × 10 ²
16	V _{L(0.25)} : 0.25 mW/cm ² 、4時間照射後の抗ウイルス活 性値	> 2.1
17	B _D : 無加工試験品にウイルス液接種後、4時間暗 所に静置した後の感染価 (TCID ₅₀ /試験片)	2.5 × 10 ⁶
18	C _D : 光触媒加工品にウイルス液接種後、4時間暗 所に静置した後の感染価 (TCID ₅₀ /試験片)	3.1 × 10 ⁴
19	ΔV: 4時間作用時の光触媒加工試験片の光照射に よる効果	> 0.2
20	V _D : 4時間静置後の光触媒加工品の暗所での効果	1.8