

試験結果報告書

依頼者名 株式会社スリーエス 殿
品 名 液剤 BIKOUSEI SAKURA (BS-005) 1 点
試験項目 抗ウイルス性試験

2021 年 9 月 6 日提出の試料に対する試験結果は下記の通りです。

2021 年 12 月 15 日

一般財団法人 日本繊維製品品質技術センター
神戸試験センター 射本



記

○試験概要

- ・試験ウイルス：Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)
変異株（デルタ株）；hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021
* 国立感染症研究所より分与
- ・宿主細胞： VeroE6/TMPRSS2 JCRB1819
- ・細胞培養液：Dulbecco's modified Eagle's medium (low-glucose) ；DMEM
(SIGMA, Cat#D6046)
Minimum Essential Medium Eagle ；EMEM (SIGMA, Cat#M4655)
- ・ウシ胎児血清：Fetal Bovine Serum (FBS) (NICHIREI, Cat#174012)
- ・対照サンプル (Negative control)：滅菌精製水
- ・試験サンプル：液剤 BIKOUSEI SAKURA (BS-005) 1 点
- ・試験条件：
ウイルス懸濁液：試験サンプル＝1：10
作用温度 25℃
作用時間 15 分、30 分
(対照サンプル；Negative control のみ混合直後も測定)
- ・薬剤不活化剤：SCDLP を 2% FBS 含 DMEM で 10 倍希釈した溶液
- ・感染価測定法：プラーク測定法

* この報告書は、提出の試料に対する試験結果であり、ロット全体の品質を保証するものではありません。
* 本報告書の全部又は一部の無断転用を固くお断りします。

○試験方法

1) ウイルス懸濁液の調製:

宿主細胞にウイルスを感染させ、EMEM を加え 37℃ で所定時間培養後、4℃、1,000×g で 15 分間遠心分離した上清をウイルス懸濁液とする。
ウイルス懸濁液を滅菌蒸留水を用いて 10 倍希釈し、 $1\sim5\times10^7$ PFU/mL に調整したものを試験ウイルス懸濁液とする。

2) 宿主細胞検証試験:

2) - 1 細胞毒性確認試験

1. 試験サンプル 1.0 mL に EMEM 0.1 mL を加え、十分に攪拌する。
これを試験液とする。
2. 薬剤不活化剤 0.9ml に試験液 0.1ml を添加し、十分に攪拌する。
3. 2%FBS 含 DMEM を用いて、10 倍希釈系列を作製する。
4. プラーク測定法にて各希釈系列の細胞毒性の有無を確認する。

2) - 2 ウイルスへの細胞の感受性確認試験

1. 試験サンプル 1.0 mL に EMEM 0.1 mL を加え、十分に攪拌する。
これを試験液とする。
2. 薬剤不活化剤 4.5ml に試験液 0.5ml を添加し、十分に攪拌する。
3. 2%FBS 含 DMEM を用いて、10 倍希釈系列を作製する。
4. EMEM を用いて $4\sim6\times10^4$ PFU/mL に調製したウイルス懸濁液を 3. の各希釈系列の 1/100 量添加する。
5. 室温で 10 分間静置する。
6. プラーク測定法にて各希釈系列 1mL 当たりのウイルス感染価を測定し、ウイルスへの細胞の感受性を確認する。

* 宿主細胞検証試験は、以下の基準を満たすことを判定基準とする。

2) - 1 細胞毒性:無し

2) - 2 ウイルスへの細胞の感受性確認:

$\lg(\text{対照サンプルのウイルス感染価 (PFU/mL)}) - \lg(\text{試験サンプルのウイルス感染価 (PFU/mL)}) \leq 0.5$

3) 本試験:

1. 試験サンプル 1.0 mL に試験ウイルス懸濁液 0.1 mL を加え、十分に攪拌する。
2. 25℃ で所定時間静置する。これを試験液とする。
3. 宿主細胞検証試験で不活化が確認された条件で試験液を不活化する。
これを反応停止液とする。

4. 上記3.の反応停止液を 10^0 として、2%FBS 含 DMEM で 10 倍希釈系列を作製し、反応停止液 0.1ml 当たりのウイルス感染価をプラーク測定法にて測定し、試験液 1ml 当たりのウイルス感染価を算出する。

○試験結果

2) 宿主細胞検証試験

- ・試験ウイルス：SARS-CoV-2 変異株（デルタ株）；hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021
- ・ウイルス懸濁液濃度： 5.0×10^4 PFU/ml

検 体	2) - 1 細胞毒性の有無	2) - 2 ウイルスへの細胞の感受性確認
		ウイルス感染価 (PFU/mL) 常用対数平均値
滅菌精製水 (Negative control)	無	2.67
液剤 BIKOUSEI SAKURA (BS-005)	無	2.66

*試験サンプル：

試験液を薬剤不活化剤で 10 倍希釈することにより、
検体の影響を受けずにウイルス感染価測定ができることを確認した。

○試験結果

3) 本試験

- ・試験ウイルス：SARS-CoV-2 変異株（デルタ株）；hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021
- ・試験ウイルス懸濁液濃度： 1.2×10^7 PFU/ml

検 体		試験液 1ml 当たりの ウイルス感染価 (PFU/mL) の常用対数値			Negative control との常用対数値差
		常用対数値		常用対数値平均値	
滅菌精製水 (Negative control)	混合 直後	n1	6.13	6.03	
		n2	6.06		
		n3	5.90		
	15 分間 作用後	n1	6.02	5.98	
		n2	5.81		
		n3	6.10		
	30 分間 作用後	n1	5.93	5.93	
		n2	5.88		
		n3	5.98		
液剤 BIKOUSEI SAKURA (BS-005)	15 分間 作用後	n1	4.11	4.01	2.0
		n2	3.90		
		n3	4.02		
	30 分間 作用後	n1	3.13	3.16	2.8
		n2	3.19		
		n3	3.16		

* この報告書は、提出の試料に対する試験結果であり、ロット全体の品質を保証するものではありません。
* 本報告書の全部又は一部の無断転用を固くお断りします。

<参考情報>

○本試験に供したウイルス懸濁液のリアルタイム RT-PCR 測定

・試験ウイルス：SARS-CoV-2 変異株（デルタ株）；hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021

* 国立感染症研究所より分与

・ウイルス懸濁液濃度： $>10^8$ PFU/ml

・リアルタイム PCR 装置：Thermal Cycler Dice® Real Time System III (TaKaRa)

・検出キット：SARS-CoV-2 Detection Kit –N1 set– (Code NCV-301; Lot# 056700)
(TOYOBO CO.,LTD. Biotech support Department)

・Primer/Probe：

【N501Y Mutation】

・ 501N Wild Type Primer & Probe Mixture

・ N501Y Mutant Type Primer & Probe Mixture

(SARS-CoV-2 N501Y Mutation Detection Kit, Code No.287-35701; Lot# LEN9523,
FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)

【L452R Mutation】

・ 452L Wild Type Primer & Probe Mixture

・ L452R Mutant Type Primer & Probe Mixture

(SARS-CoV-2 E484K Mutation Detection Kit, Code No.287-36301; Lot# LEM9536,
FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)

【E484Q Mutation】

・ 484E Wild Type Primer & Probe Mixture

・ E484Q Mutant Type Primer & Probe Mixture

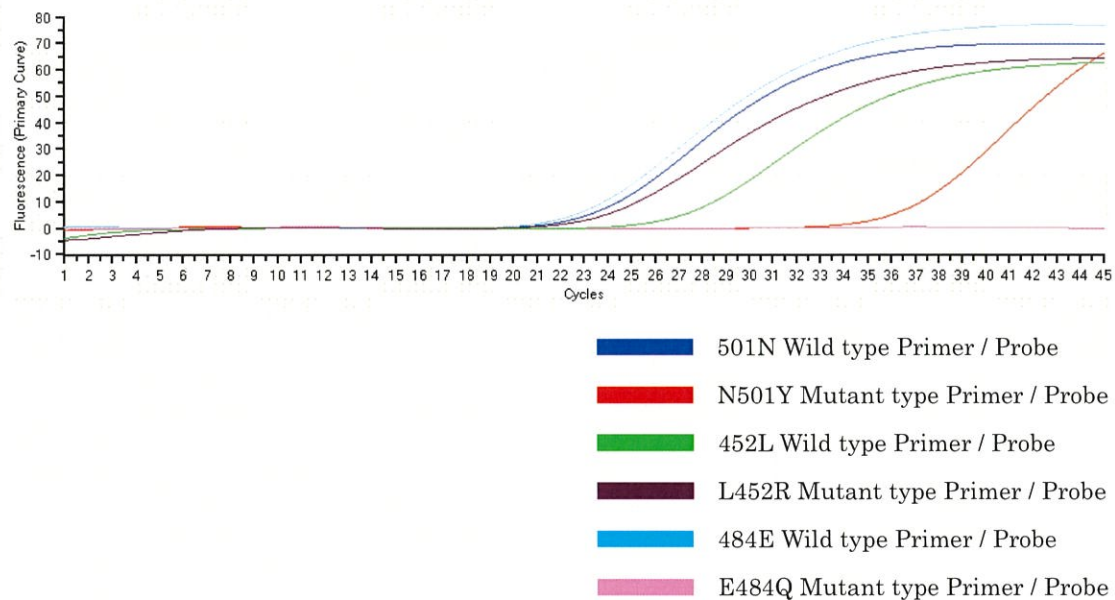
(SARS-CoV-2 E484K Mutation Detection Kit, Code No.283-36401; Lot# LEM9537,
FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)

* この報告書は、提出の試料に対する試験結果であり、ロット全体の品質を保証するものではありません。
* 本報告書の全部又は一部の無断転用を固くお断りします。

○測定結果

- ・試験ウイルス：SARS-CoV-2 変異株（デルタ株）；hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021
- *ウイルス懸濁液を PBS を用いて 10^2 倍希釈したものを検体とした。
- *変異株（デルタ株）は、N501Y 遺伝子変異なし、L452R 遺伝子変異、E484Q 遺伝子変異なし、の特徴を持つことが報告されている。

Amplification Plots



<N501Y 変異>

501N Wild type Primer / Probe の増幅曲線（■）が N501Y Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（■）に比べ、早期に立ち上がっていることから、N501Y 変異を持たないことが確認された。

<L452R 変異>

L452R Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（■）が 452L Wild type Primer / Probe の増幅曲線（■）に比べ、早期に立ち上がっていることから、L452R 変異株であることが確認された。

<E484Q 変異>

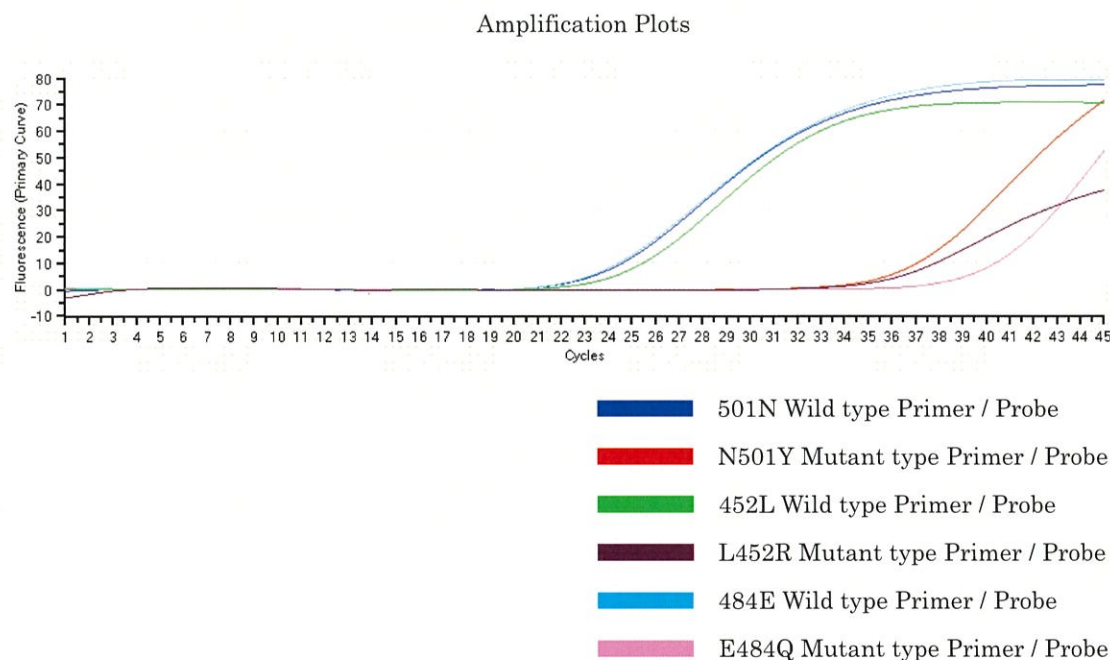
484E Wild type Primer / Probe の増幅曲線（■）が E484Q Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（■）に比べ、早期に立ち上がっていることから、E484Q 変異を持たないことが確認された。

* この報告書は、提出の試料に対する試験結果であり、ロット全体の品質を保証するものではありません。
 * 本報告書の全部又は一部の無断転用を固くお断りします。

本測定の妥当性を検証するため、従来株である SARS-CoV-2（JPN/TY/WK-521）を同様の手法で測定した。

・試験ウイルス：SARS-CoV-2 NIID 分離株；JPN/TY/WK-521（国立感染症研究所より分与）

* ウイルス懸濁液を PBS を用いて 10^2 倍希釈したものを検体とした。



<N501Y 変異>

501N Wild type Primer / Probe の増幅曲線（■）が N501Y Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（■）に比べ、早期に立ち上がっていることから、N501Y 変異を持たないことが確認された。

<L452R 変異>

452L Wild type Primer / Probe の増幅曲線（■）が L452R Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（■）に比べ、早期に立ち上がっていることから、L452R 変異を持たないことが確認された。

<E484Q 変異>

484E Wild type Primer / Probe の増幅曲線（■）が E484Q Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（■）に比べ、早期に立ち上がっていることから、E484Q 変異を持たないことが確認された。

以上