

試験報告書

依頼者； ウェルシー製薬株式会社 様

株式会社メイプルバイオラボトリーズ

化粧品製造業許可 12C Z 200259

化粧品製造販売業許可 12C O X 10014

〒270-1401 千葉県市井市平塚 2802-1

電話 04-7100-0001
e-mail; inquiry@maple-biolab.com

2021年 9月29日

供試検体の名称； 銀・アルコール製剤(液体)

試験検体供与者； ウェルシー製薬株式会社 様

目的； 供試検体のネコ・カリシウイルスに対する不活化試験を行う。

作用ポイント； (ネコ・カリシウイルス) 0時間(作用前)、20秒

宿主細胞； CRFK cell (JCRB Cell Bank 株, Cell#JCRB9035) ネコ・カリシウイルス感染用

Virus； Feline calicivirus (ATCC 株, #ATCC VR-782)

試験方法； ISO21702 (Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surface) に準拠

細胞毒性試験

検体自体に細胞毒性がないか確認するために宿主細胞をターゲットにした細胞毒性試験を実施した結果、10 倍希釈では細胞変性がみられ細胞の死滅を確認したが、100 倍以上の希釈では細胞の変性はみられなかった。

ウイルス不活化試験

ISO21702 (Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surface) の試験方法に準拠して試験を実施し、TCID₅₀測定法によりウイルス感染価を得た。

ウイルス不活化試験結果

ネコ・カリシウイルスに対する感染価

供試検体サンプル液 ⇒ 3.5 (LogTCID₅₀/ml ; 作用時間20秒)

陰性対照液の感染価 ⇒ 6.5 (LogTCID₅₀/ml ; 作用時間20秒)

ネコ・カリシウイルスに対する感染価の減少値は**2.8**(LogTCID₅₀/ml、作用時間20秒)であった。

試験報告書

依頼者 ; ウエルシー製薬株式会社 様

株式会社メイプルバイオラボラトリーズ
 化粧品製造業許可 12C-Z-200259
 化粧品製造販売業許可 12C-X-10014
 〒270-1401 千葉県市井市平塚 2802-1
 電話 04-7100-0001
 e-mail: inquiry@maple-biolab.com

2021年9月29日

ウイルス不活化試験

供試検体の名称 ; 銀・アルコール製剤(液体)

試験検体供与者 ; ウエルシー製薬株式会社 様

目的 ; 供試検体のネコ・カリシウイルスに対する不活化試験を行う。

作用ポイント ; (ネコ・カリシウイルス) 0時間(作用前)、20秒

試験方法 ;

宿主細胞 ; CRFK cell (JCRB Cell Bank 株, Cell#JCRB9035) ネコ・カリシウイルス感染用

Virus ; Feline calicivirus (ATCC 株, #ATCC VR-782)

試験方法はISO21702 (Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surface) に準拠した。

試験サンプル液900ulにウイルス懸濁液100ulを混合させ、所定の作用時間が経過したら混合液を回収し、迅速に10倍希釈していく。最終的にvirus懸濁液濃度を 10^{-2} から 10^{-9} に調整する。これを宿主細胞に添加し、感染させ、37℃ 5%CO₂ 条件にて5日間共培養しウイルス感染価を計測した。

サンプル形状 ; 試験に使用した検体は以下の写真 1 の通り。

写真 1



(写真左)外装 ; 試験サンプル受け入れ時形体



(写真右)試験サンプル原液 ; 無色透明

予備試験（細胞毒性試験）の実施

試験サンプルそのものに細胞毒性がないか確認するために、宿主細胞をターゲットにした細胞毒性試験を実施した。

細胞毒性試験結果

試験サンプル原液をDMEM培地で10倍ずつ連続的に希釈していき、最終的にサンプル濃度が 10^{-1} から 10^{-8} になるように調製した。

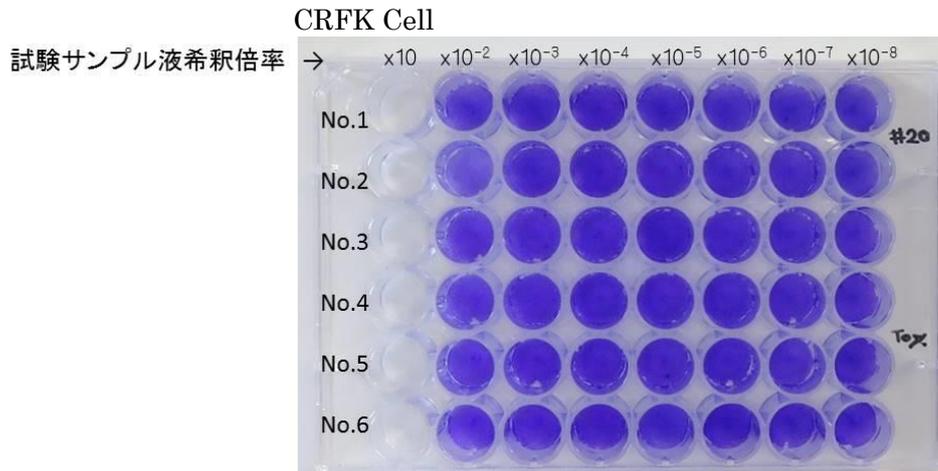
これを90%コンフルエントにまで培養した宿主細胞の各well上に添加した。

その後5日間、37℃ CO2 5%条件にて共培養し、細胞毒性の有無を確認した。

1. 細胞毒性試験結果

CRFK細胞に対する細胞毒性の結果を写真2.に示す。No.1～No.6/ n = 6とする。

写真 2



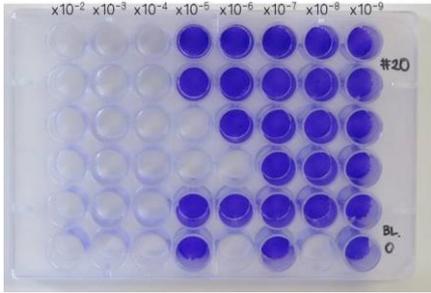
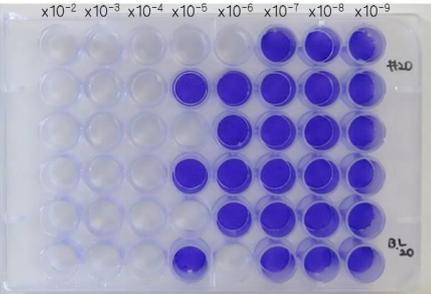
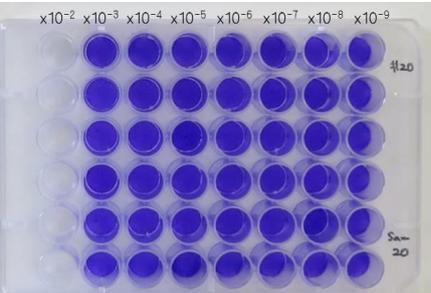
◎CRFK 細胞において $\times 10$ の用量で細胞変性がみられ細胞の死滅を確認した。(細胞剥離状態)
以後 100 倍以上の希釈では細胞の変性はみられなかった。

ウイルス不活化試験

ISO21702 (Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surface) の試験方法に準拠して試験を実施し、TCID₅₀法(Behrens and Karber法)によりウイルス感染価を得た。

試験結果

ウエルシー製薬株式会社様 試験サンプル液のネコ・カリシウイルスに対する 抗virus試験の結果

ネコ・カリシウイルス (n = 6)	陰性対照(DMEM培地)におけるウイルス感染価	試験サンプル液のウイルス感染価
作用前		—
	LogTCID ₅₀ /ml=6.3	—
作用時間20秒		
	LogTCID ₅₀ /ml = 6.3	LogTCID ₅₀ /ml = 3.5

結果の判定

感染価の算出はTCID50法(Behrens and Karber法)に従った。

$$Y=X \times 10^a$$

$$a=\Sigma p-0.5$$

Y:感染価(TCID50/1wellに接種したウイルス懸濁液量ml)

X:ウイルス懸濁液の希釈倍率(1レーン目の希釈倍率)

p ; 各希釈系列において細胞変性効果が認められる割合(細胞変性効果ありの穴数/総穴数)

$$\text{LogTCID}_{50}/\text{mL}=\text{感染価A}$$

ネコ・カリシウイルス	陰性対照(DMEM 培地)における ウイルス感染価 (A) (LogTCID ₅₀ /ml)	試験サンプル液における ウイルス感染価 (B) (LogTCID ₅₀ /ml)
作用前(0分)	6.3	—
作用時間 20 秒	6.3	3.5

※試験ウイルス感染価(ネコ・カリシウイルス)… 6.53 TCID₅₀/ml (自社検査実績平均値)

(A) 対照品(Medium)感染価

(B) 提供サンプル液の感染価

$$\text{抗 Virus 活性値} = \text{Log(A)} - \text{Log(B)}$$

ネコ・カリシウイルスに対する感染価の減少値

$$\text{試験サンプル液} \Rightarrow 6.3 - 3.5 = \mathbf{2.8} \text{ (LogTCID}_{50}/\text{mL、作用時間20秒)}$$

以上

報告日 2021年9月29日

株式会社メイプルバイオラボラトリーズ