

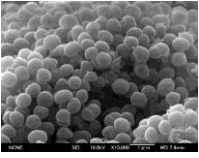
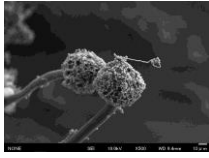
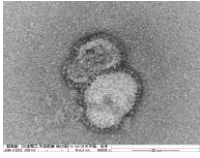
ウイルスの基礎知識とSIAA 抗ウイルス認証制度について

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 康夫



0

1. ウィルス概論		～ 微生物の分類 ～		
	細菌	真菌(かび、酵母)	ウイルス	
形態				
	単細胞で単純な形態	単・多細胞で複雑な形態 主に孢子、菌糸で構成	ウイルス粒子 カプシドの外側が脂質膜(エンベ ロップ)で覆われているものもある。	
大きさ	幅 1μm 長さ 10μm	幅 2~10μm (かび孢子)	直径 20~300 nm	
遺伝子	DNA	DNA	DNA or RNA	
増殖	二分裂	発芽後、菌糸形成	宿主細胞に感染後、 その細胞内で増殖	
代謝系 (ATPやタンパク質 などの合成)	あり	あり	なし 宿主となる生細胞に感染して 初めて、その細胞内で増殖 することができる。	

1

1. ウイルス概論 ～ 生物学的特徴～

細菌の増殖

2分裂で増殖

かびの増殖

発芽 菌糸伸長 胞子 胞子産生

ウイルスの複製

宿主細胞に吸着 細胞内への取込 脱殻 ウイルス粒子の複製 放出

ウイルスの遺伝子

> ウイルスは、細菌やかびと異なり、自己増殖しない。
 > 宿主細胞に感染し、宿主細胞の増殖機能により、自らの遺伝子由来のタンパク質を生産させることで、自己を複製する。
 > ウイルスの細胞への感染には特異性がある
 > ウイルスには、エンベロープを持つものと持たないものがある

ウイルス粒子の概略図

2

1. ウイルス概論 ウイルスの可視化

ミリ マイクロ ナノ
メートル メートル メートル

大きさのイメージ (mm, μm, nm)

1nm 10nm 100nm 1μm 10μm

タンパク質など インフルエンザウイルス 微生物 繊維製品

0.1mm 肉眼

0.2μm 光学顕微鏡

0.1nm以下 電子顕微鏡

分解能の限界

3

電子顕微鏡の種類

透過型電子顕微鏡/ TEM
(Transmission Electron Microscope)

走査型電子顕微鏡/ SEM
(Scanning Electron Microscope)



用途: **内部**構造の観察



用途: **表面**構造の観察

4

試料作製手順



試料作製に使用する機器類



臨界点乾燥装置



凍結乾燥装置



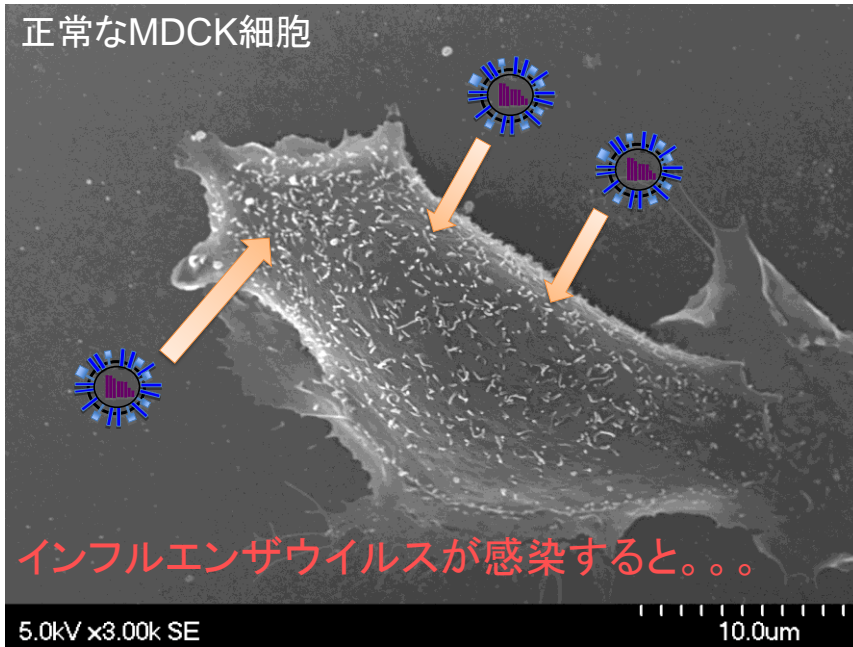
オスミウム蒸着装置

試料(ウイルス、微生物、布等の製品)と観察目的によって試料作製法は異なる。

5



正常なMDCK細胞



インフルエンザウイルスが感染すると。。。。

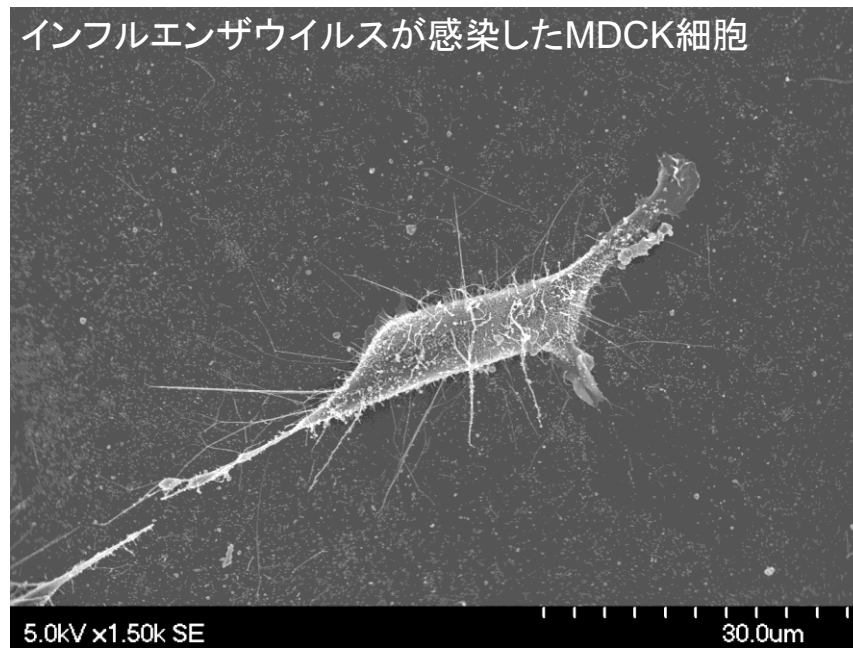
5.0kV x3.00k SE

10.0um

6



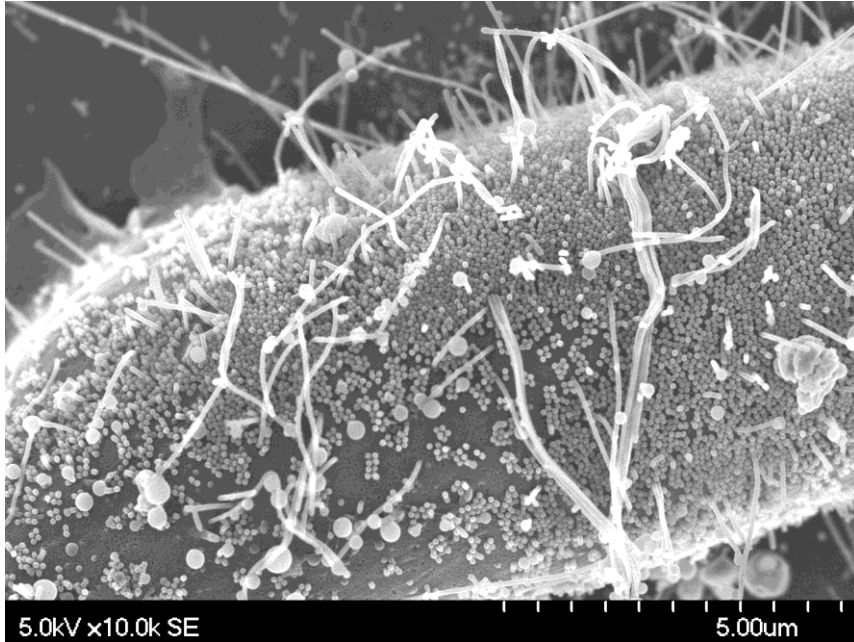
インフルエンザウイルスが感染したMDCK細胞



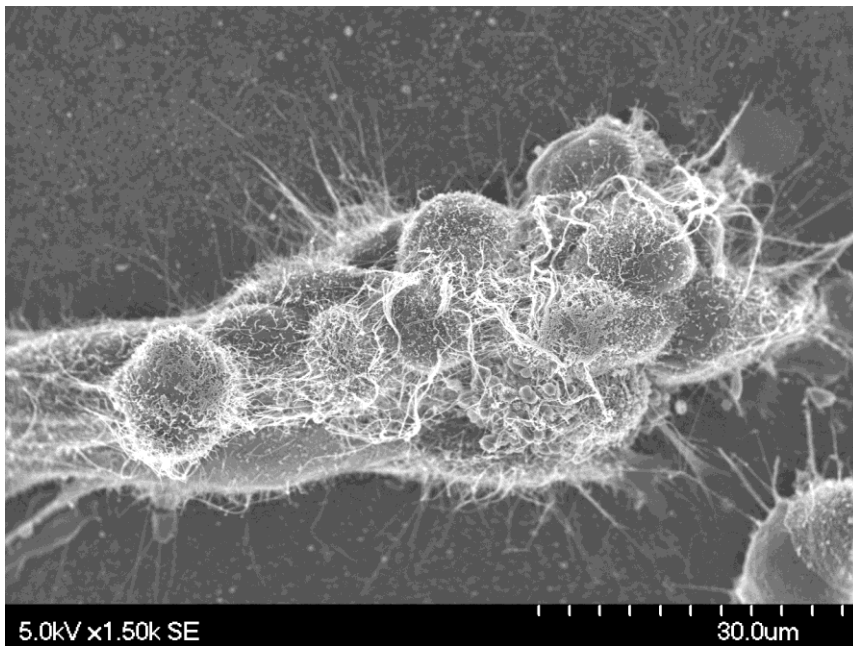
5.0kV x1.50k SE

30.0um

7



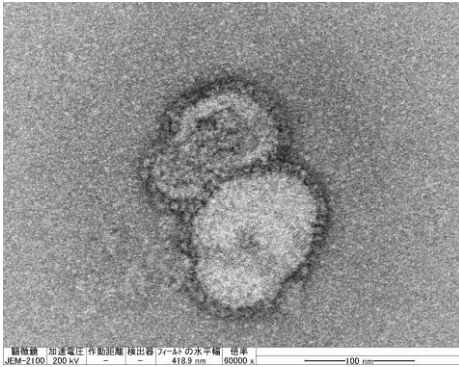
8



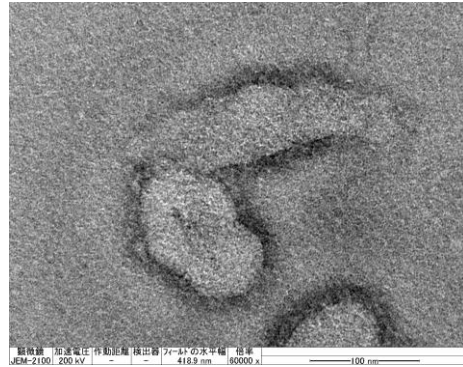
9

A型インフルエンザウイルス (H3N2)

Influenza A virus(H3N2): A/Hong Kong/8/68: TC adapted ATCC VR-1679



超純水処理:1分



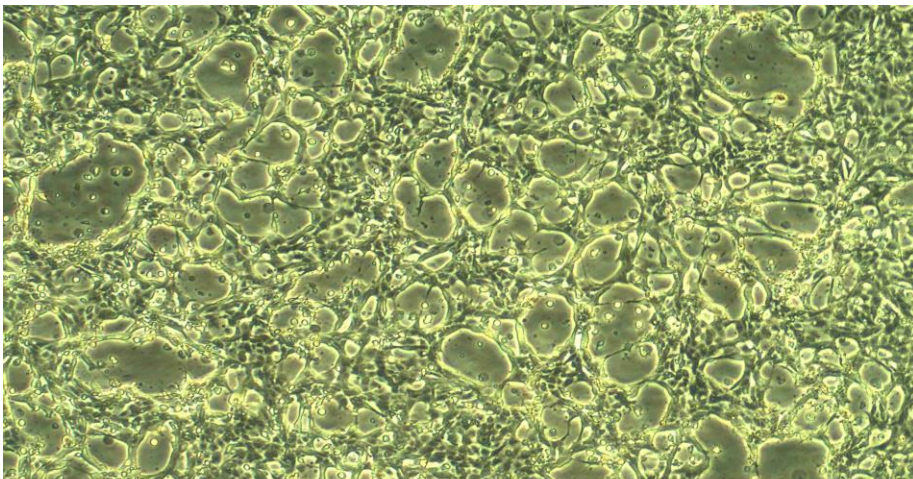
薬剤処理:1分

✓ 薬剤で処理したウイルス表面(エンベロープ)の一部に損傷が見られる。

10



11

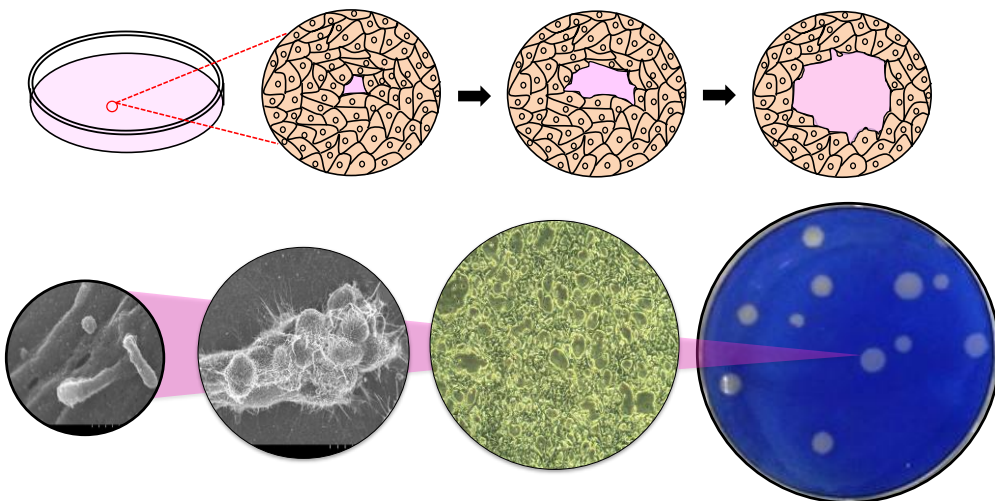


ウイルスが感染した細胞の変性(形態変化)を観察することで、
ウイルス数を定量評価することができる

12

プラーク形成のイメージ:

最初に感染した細胞から隣の細胞→隣の細胞→隣の細胞へとウイルス感染が広がる。



13

JIS/ISO Methods

Anti -	Textiles	Plastics
<i>Bacteria</i>	JIS L 1902 ISO 20743	JIS Z 2801 ISO 22196
<i>Virus</i>	JIS L 1922 ISO 18184	ISO21702
<i>Fungi</i>	JIS L 1921 ISO 13629	JIS Z 2911 ISO 846 / ISO 16869

14

繊維製品

- **ISO18184**—Textiles—Determination of antiviral activity of textile products
2014年 9月1日制定

➡ 2019年6月、Second edition 発行

- **JIS L 1922**—繊維製品の抗ウイルス性試験方法
2016年 12月20日制定

非多孔質製品(プラスチック製品など)

- ISO化 (一般社団法人抗菌製品等技術協議会)
- ✓ 2016年度政府戦略分野に係る国際標準化活動
「テーマ名: non-porous製品の抗ウイルス性評価試験法に関する国際標準化」
- ✓ 非多孔質製品の抗菌性試験方法—ISO22196をベースに、ISO18184を盛り込み作成
ISO21702—Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces
2019年5月7日 発行

15

2015年10月 PWI プレゼン（インド国際会議 ISO/TC61/SC/WG7）

2016年3月 NWIP 提出

5月 NWIP 登録→投票開始

8月 NWIP 投票 開票

9月 NWIP 承認（ドイツ国際会議 ISO/TC61/SC/WG7）

12月 WD 提出

2017年3月 CD 21702 登録→投票開始

5月 CD 投票 開票

9月 CD コメントに対する協議（韓国国際会議 ISO/TC61/SC6/WG7）

2018年9月 DISコメントに対する協議（大宮国際会議 ISO/TC61/SC6/WG7）

2018年12月 FDIS登録

2019年2月 FDIS投票開始

2019年4月 FDIS投票 開票



2019年5月7日 発行
ISO 21702

「Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces」

16

試験対象ウイルス

季節性A型インフルエンザウイルス（エンベロップ有）(BSL2)



組織培養継代株の季節性インフルエンザウイルスを使用する。
組織培養を繰返したインフルエンザウイルスは、組織培養に用いた宿主細胞に馴化し、反対にヒトへの感染性は低下する傾向がある。



ネコカリシウイルス（エンベロップ無）(BSL2)



ノロウイルスの代替ウイルスとして使用する。
ネコに対しての感染性を有し、ヒトには感染しない。



ISO21702: Example of Test Viruses and host cells

Virus name	Influenza virus	Feline calicivirus
Virus strain	Influenza A virus(H3N2): A/Hong Kong/8/68: TC adapted ATCC VR-1679	Feline calicivirus; Strain: F-9 ATCC VR-782
Host cell	MDCK cell (Dog kidney cell origin) ATCC CCL-34	CRFK cell (Cat kidney cell origin) ATCC CCL-94

* 適切な検証後（試験成立条件を満たす）、他の種類のウイルス、宿主細胞を使用することができる。

17

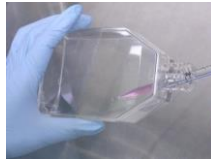
1. 細胞を単層培養する



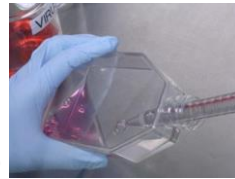
培地を除去



2. 細胞にウイルスを吸着・感染させる



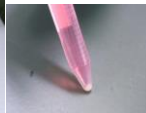
3. 培地を加え、ウイルスを増殖させる



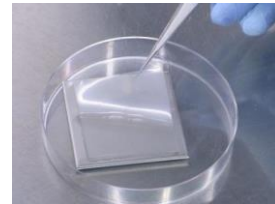
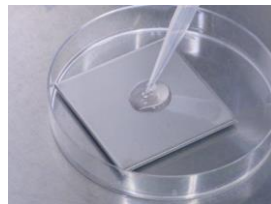
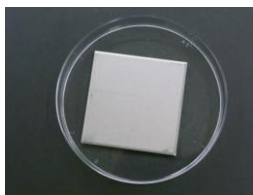
4. ウイルス懸濁液を回収する



5. 遠心分離し、細胞の残渣を沈殿させる

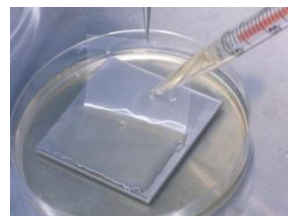
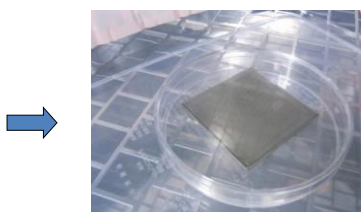
6. 上清を回収し、精製水で10倍希釈したものを試験ウイルス懸濁液とする
($1-5 \times 10^7$ pfu/ml)

18



1. 試験片(50mm×50mm)を採取する。

2. 試験ウイルス懸濁液0.4 mlを試験片に接種し、カバーフィルム(40mm×40mm)をかぶせる。

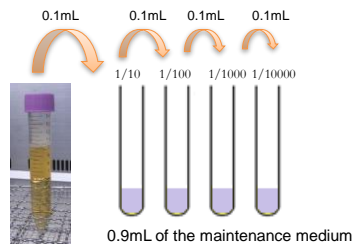


3. 25℃、90%RH以上で24時間静置し、ウイルスと検体とを作用させる。

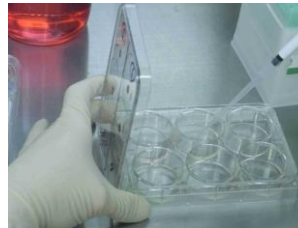
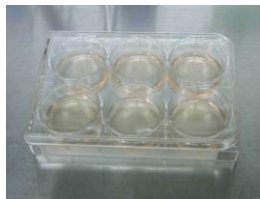
4. 洗い出し液 10ml を加え、検体からウイルスを回収する。

19

プラーク測定法

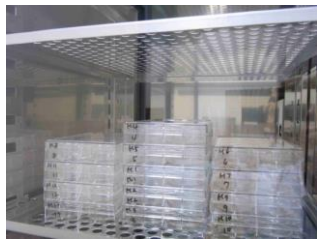


5. 細胞維持培地を用いて、洗い出し液の10倍希釈系列を作製する。



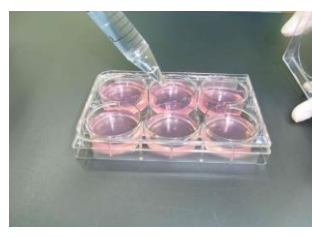
6. 6 wellプレートに単層培養した細胞に、各希釈系列から0.1 ml 接種する。

20



7. 37°C、1時間培養し、細胞にウイルスを吸着させる。

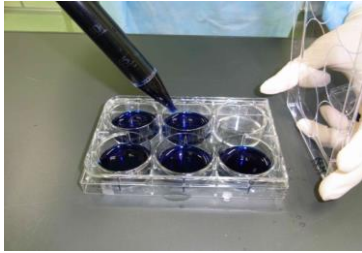
8. 細胞培養寒天培地を加える。



9. 37°C、5%CO₂で、2～3日培養する

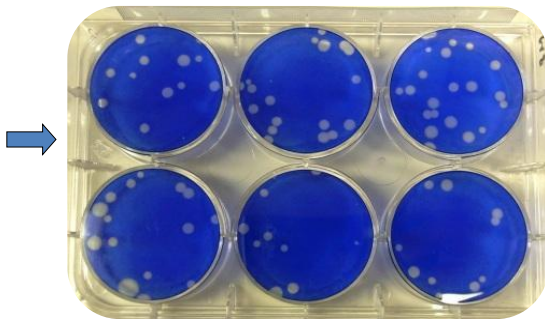
10. 固定液を加え、細胞を固定する

21



11. 寒天培地を除去し、メチレンブルー溶液を加え、細胞を染色する。

生細胞は青く染色され、変性細胞は染まらない



12. プラーク数をカウントする

* プラーク(左図白い斑点部分)

ウイルスが感染したことにより、細胞が変性している部分をカウントし、ウイルス数を測定する。

22

培養後、6～60個のプラークが現われた希釈系列のWellのプラーク数を測定する。

(例)

100倍希釈の希釈系列で、

プラーク数: 20個

$$\text{ウイルス感染価}/0.1 \text{ ml} = 20 \times 100 = 2.0 \times 10^3 \text{ PFU}/0.1 \text{ ml}$$



$$\text{ウイルス感染価}/\text{ml} = 20 \times 100 \times 10 = 2.0 \times 10^4 \text{ PFU}/\text{ml}$$

N (ウイルス感染価/試験片 1cm^2 当たり) = (ウイルス感染価/ml) × (洗い出し液量) ÷ (カバーフィルムの面積)

例 :

$$N(\text{ウイルス感染価}/\text{試験片}1\text{cm}^2\text{当たり}) = 2.0 \times 10^4 \text{ PFU} \times 10\text{ml} \div 16 = 1.3 \times 10^4 \text{ (PFU}/\text{試験片}1\text{cm}^2)$$

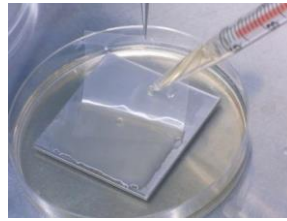
常用対数値



$$\text{Log}N = \text{Log}(1.3 \times 10^4) = 4.097$$

* 宿主細胞検証試験を上述の繊維製品の抗ウイルス性試験と同様に実施する。

23



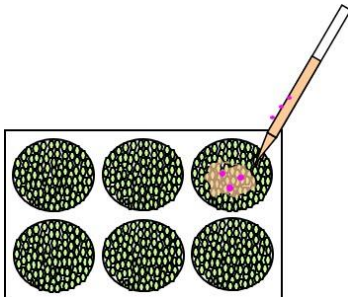
検体からウイルスを洗い出す操作の過程において、加工剤が溶出する可能性がある。



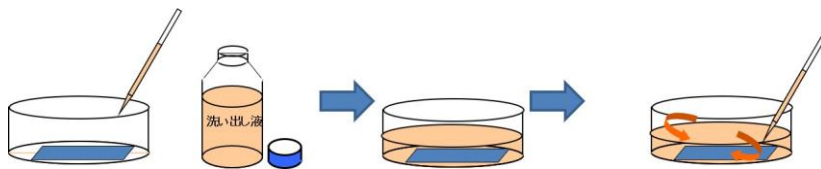
加工剤が溶出した場合、細胞毒性やウイルスへの細胞の感受性の低下を引き起こす可能性がある。



ウイルス感染価測定のための検証のために、測定するウイルス懸濁液が細胞毒性を示さないこと、ウイルスへの感染性の低下を引き起こさないこと、及び加工剤の抗ウイルス活性が不活性化されていることを確認する必要がある。



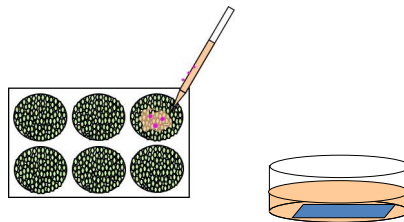
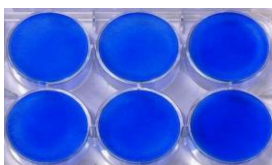
24



洗い出し液 10mlを加え、本試験と同様の洗い出し操作を行う。

1. 細胞毒性の確認

✓細胞の損傷の有無を確認



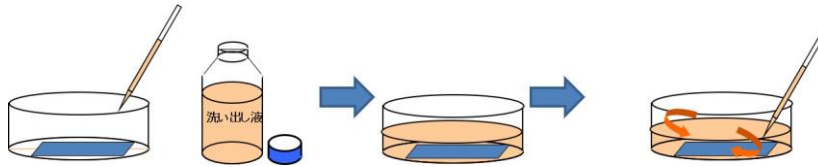
損傷が確認されない場合

2. ウイルスへの細胞の感受性及び加工剤の抗ウイルス活性の不活性化の確認

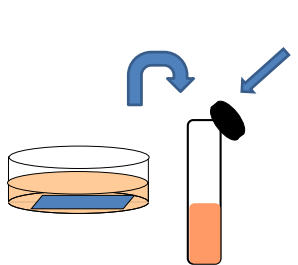
注記：細胞の損傷が認められた場合は、洗い出し液の組成を修正・変更するか、洗い出しの増量を行なう。

25

ウイルスへの細胞の感受性及び加工剤の抗ウイルス活性の不活性化の確認



1. 洗い出し液 10mlを加え、本試験と同様の洗い出し操作を行う。



2. 試験管に洗い出し液 5mlを入れる。



3. $4-6 \times 10^4$ PFU/ml に調製したウイルス懸濁液 50 μ l を加える。



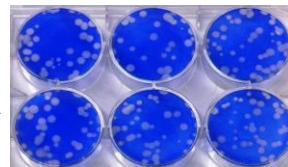
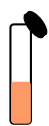
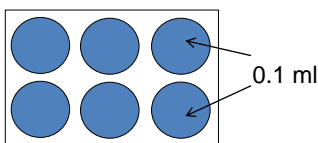
4. 25°Cで30分間静置する。



5. ウイルス感染価を測定する。

26

ウイルスへの細胞の感受性及び加工剤の抗ウイルス活性の不活性化の確認



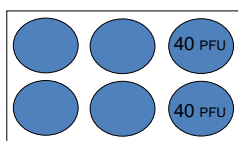
40-60 PFU

40-60 PFU

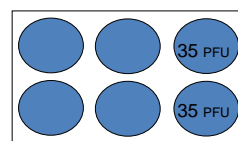
細胞毒性を示さず、ウイルスへの感染性の低下を引き起こさない場合、1 well 当たり40-60個のプラークが形成される。

(例)

陰性対照



抗ウイルス加工試料



試験成立の判定

$$\log(\text{対照試料のPFU/ml}) - \log(\text{抗ウイルス加工試料のPFU/ml}) \leq 0.5$$

注記: 上記の値が0.5を超える場合は、洗い出し液の組成を修正・変更するか、洗い出しの増量を行なう。

27

▶ 試験成立の判定

次のいずれにも該当する場合に、試験が成立していると判定する。

- a) 未加工試料の接種直後のウイルス感染価の常用対数値に関して以下の式を満たすこと。

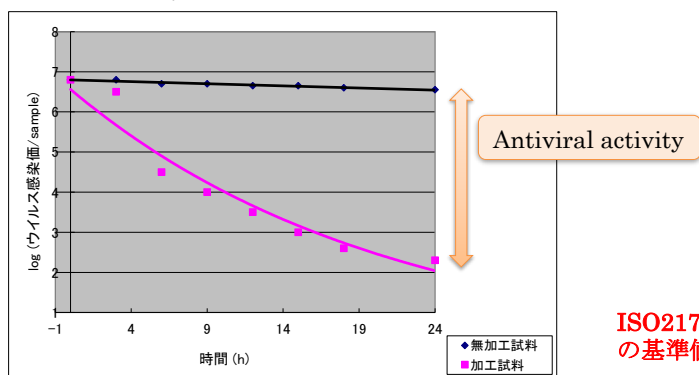
$$(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{mean}}) \leq 0.2$$

L_{\max} : 未加工試料の接種直後のウイルス感染価の常用対数値の最大値
 L_{\min} : 未加工試料の接種直後のウイルス感染価の常用対数値の最小値
 L_{mean} : 未加工試料の接種直後のウイルス感染価の常用対数値の平均値

- b) 未加工試料の接種直後のウイルス感染価の平均値が、
 2.5×10^5 PFU/cm² ~ 1.2×10^6 PFU/cm² であること。
 c) 未加工試料の24時間作用後の3検体それぞれのウイルス感染価が、
 6.2×10^2 PFU/cm² 以上であること。
 d) 試験片の加工剤活性の抑制効果が確認されていること。

28

Antiviral activity (抗ウイルス活性値)の計算



ISO21702には、抗ウイルス効果の基準値は記載されていない。

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t$$

R : Antiviral activity

U_0 : 未加工試料のウイルス懸濁液接種直後の3検体のウイルス感染価常用対数値の平均値

U_t : 未加工試料のウイルス24時間作用後の3検体のウイルス感染価常用対数値の平均値

A_t : 抗ウイルス加工試料の24時間作用後の3検体のウイルス感染価常用対数値の平均値

29

(一社)抗菌製品技術協会による 抗ウイルス加工SIAAマーク運用



➤ 抗ウイルス加工SIAAマークの運用

2019年 7月1日 開始

➤ 試験機関による抗ウイルス試験の受付

2019年 7月1日

30

(一社) 抗菌製品技術協会 K14_SIAAマーク管理運用規定より抜粋



➤ 抗ウイルス加工製品の抗ウイルスSIAAマークは、

- ①: 「基本図形」
- ②: 「抗ウイルス剤の種類、加工方法および加工部位を示す文字情報」
- ③: 「登録番号」
- ④: 「抗ウイルスに関する注意事項」
- ⑤: 「抗ウイルスSIAAマークの主旨の説明文」

から構成され、抗ウイルスSIAAマーク基本図形の近傍に、次の表現を記載する。

- ⑥: 「製品上の特定ウイルスの数を減少させます」

なお、希望する場合は「基本図形」以外の構成要素をSIAAマークから削除することが出来る。但し、その場合は削除した情報を、製品又は包装、パンフレット等の販売資料に表示することを原則とする。

31

抗ウイルスSIAAマークの記載の際の厳守事項

「K14_SIAAマーク管理運用規定」より抜粋

- ① 製品以外への表示は、原則、製品へのSIAAマーク表示と同様とする。
- ② SIAAマークや抗ウイルス加工の記載に即して、次のような表現をしてはならない。

- ✓ 「具体的なウイルス名の記載(試験ウイルス名の記載も不可)」
- ✓ 「病名の記載、或いは病気やその予防方法の説明」
- ✓ 「人の疾患の治療や予防に使用される旨、及び人の身体の構造機能に影響を及ぼす旨などを明示・暗示する表現」
- ✓ 「付記用語に定めた以外の表現、例えば“ウイルスの働きを抑制する”や“ウイルスを不活化させる”等の表現」

- ③ 登録製品本体およびそれに付属するパッケージ、ラベル、取扱説明書、カタログ、パンフレット、技術資料、新聞・雑誌広告、TVコマーシャル、インターネット等にウイルス名を一切記載してはならない。

但し、申請時に実施した抗ウイルス試験で使用したウイルス株のATCC番号を
技術資料(企業向け資料で一般消費者には渡らないもの)に記載することが出来る。

「K7_品質と安全性に関する自主規格」より抜粋

6. 抗ウイルス性能基準

<p>(抗ウイルス加工剤)</p> <p>(抗ウイルス加工製品の抗ウイルス活性で判断することとし、抗ウイルス加工剤としての性能基準は定めない)</p>	<p>(抗ウイルス加工製品)</p> <p>「持続性試験法(耐水処理、耐光処理)」により処理を行った後の製品が表5に示す抗ウイルス性能基準に適合すること。</p>
---	---

表5. 抗ウイルス加工製品の抗ウイルス性能基準

	試験法名	抗ウイルス性能基準	備考
ウイルス	ISO 21702法	antiviral activity 2.0 以上 インフルエンザウイルス、ネコカリシウイルスの1種類以上のウイルスで試験すること。	本法が適用出来ない形状の製品の場合、平板状に加工した試験片を用いて試験してもよい。

「K7_抗菌加工製品等のSIAAマークの取扱いに関する運用マニュアル」より抜粋

3. 無加工試験片および試験条件等の取扱い

抗菌加工製品、抗ウイルス加工製品共通

1. 本会が定める無加工試験片とは無加工製品そのものから採取した試験片を指す（規定）。
2. 無加工試験片自体に抗菌効果、抗ウイルス効果があり、試験成立条件を満たすことが不可能の場合でも、無加工試験片としてフィルムを用いることは本会では扱わない。
 - a. 無加工試験片（抗菌加工試験片、抗ウイルス加工試験片も同）に、加熱等の前処理を持続性試験（耐水性試験、耐光性試験）の前に実施することにより試験が成立する場合は、その条件を明示して試験に供する。

（例）試験片を60℃の乾燥機で24時間加熱。

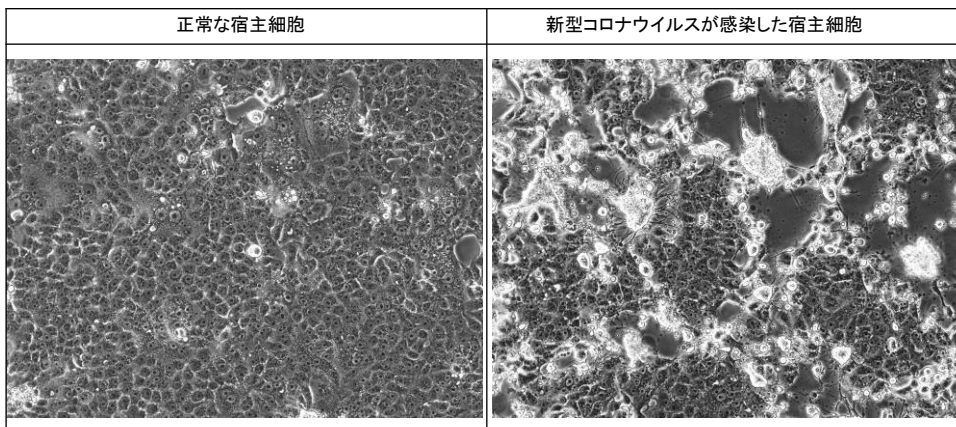
抗ウイルス加工製品

試験ウイルス懸濁液にタンパク質を添加することにより試験が成立する場合は、その条件を明示して試験に供することができる。但し、この試験方法の場合にはISO番号なしSIAAマークを表示する。

（例）試験ウイルス懸濁液中に終濃度0.3%となるようにBSAを添加。

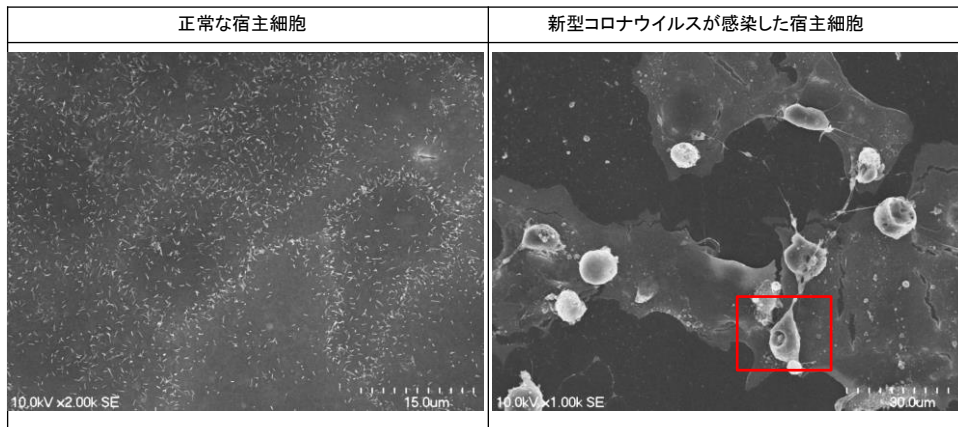
34

- 試験ウイルス： Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)
NIID分離株； JPN/TY/WK-521（国立感染症研究所より分与）
- 宿主細胞： VeroE6/TMPRSS2 JCRB1819



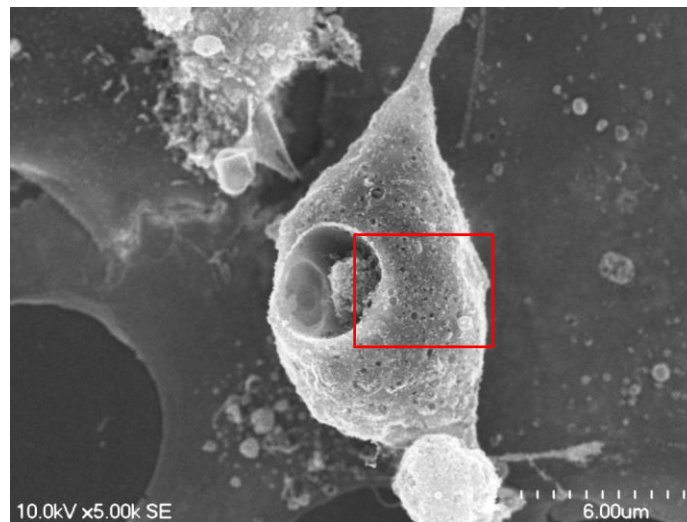
35

- 試験ウイルス： Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)
NIID分離株；JPN/TY/WK-521
- 宿主細胞： VeroE6/TMPRSS2 JCRB1819



36

- 試験ウイルス： Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)
NIID分離株；JPN/TY/WK-521
- 宿主細胞： VeroE6/TMPRSS2 JCRB1819



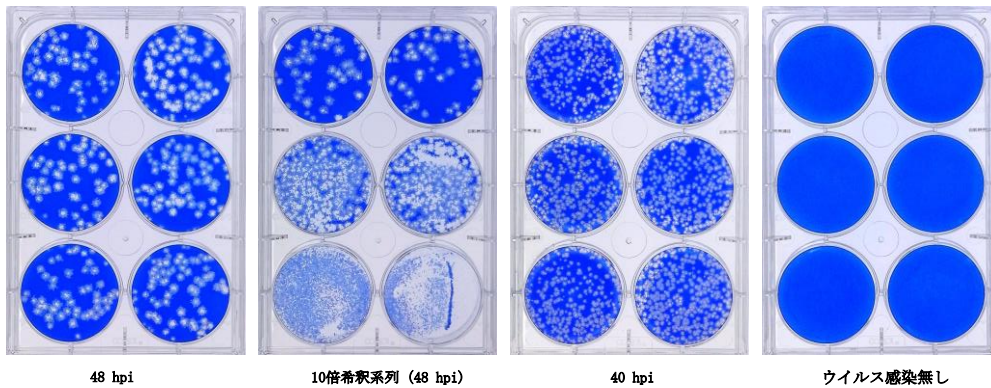
37

- 試験ウイルス：Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)
NIID分離株；JPN/TY/WK-521
- 宿主細胞：VeroE6/TMPRSS2 JCRB1819



38

- 試験ウイルス：Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)
NIID分離株；JPN/TY/WK-521
- 宿主細胞：VeroE6/TMPRSS2 JCRB1819



39



○試験概要

ISO21702

- ・試験ウイルス：Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)
NIID分離株；JPN/TY/WK-521（国立感染症研究所より分与）
- ・宿主細胞：VeroE6/TMPRSS2 JCRB1819
- ・無加工試料：ABS樹脂板（50mm×50mm）
- ・試験試料：銀ナノ粒子担持ABS樹脂板（50mm×50mm）
- ・作用条件：25℃、24時間
- ・感染価測定法：ブラック測定法
- ・試験ウイルス懸濁液濃度： 2.4×10^7 PFU/ml
（ウイルス懸濁液を滅菌超純水で10倍希釈）

検体	ウイルス感染価 (PFU/cm ²) 常用対数値			抗ウイルス活性値 【R】 ^(注3)
		常用対数値		
		常用対数値	常用対数値平均値	
ABS樹脂板（無加工）	接種直後【U ₀ 】	n1	5.67	5.65
		n2	5.61	
		n3	5.67	
	24時間放置後【U ₂₄ 】	n1	4.70	4.82
		n2	5.08	
		n3	4.67	
銀ナノ粒子担持ABS樹脂板	24時間放置後 【A ₂₄ 】	n1	0.97	1.06
		n2	1.10	
		n3	1.10	

40



○試験概要

JIS L 1922、ISO18184 準用

- ・試験ウイルス：Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)
NIID分離株；JPN/TY/WK-521（国立感染症研究所より分与）
- ・宿主細胞：VeroE6/TMPRSS2 JCRB1819
- ・無加工試料：標準布（綿） 0.4g
- ・試験試料：銀ナノ粒子担持標準布 0.4g
- ・作用条件：25℃、2時間
- ・感染価測定法：ブラック測定法
- ・試験ウイルス懸濁液濃度： 1.6×10^7 PFU/ml
（ウイルス懸濁液を滅菌超純水で10倍希釈）

試料	ウイルス感染価 (PFU/vial) 常用対数値			減少値 【M】 ^(注4)	抗ウイルス活性値 【Mv】 ^(注3)
		常用対数値			
		常用対数値	常用対数値平均値		
無加工試料 綿標準布	接種直後 【g(v0)】	n1	6.18	6.12	0.5
		n2	6.03		
		n3	6.15		
	2時間作用後 【g(v2)】	n1	5.64	5.65	
		n2	5.72		
		n3	5.57		
銀ナノ粒子担持繊維	2時間作用後 【g(v2)】	n1	4.10	3.62	—
		n2	2.95		
		n3	3.80		

41

○試験概要

液剤の抗ウイルス性試験

- ・試験ウイルス：Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)
NIID分離株；JPN/TY/WK-521（国立感染症研究所より分与）
- ・宿主細胞：VeroE6/TMPRSS2 JCRB1819
- ・対照サンプル（Negative control）：Phosphate buffered saline (PBS)
- ・試験サンプル：70% w/v エタノール
- ・試験条件：ウイルス懸濁液：試験サンプル＝1：9
- ・作用条件：25℃、30秒
- ・感染価測定法：ブラーク測定法

- ・試験ウイルス懸濁液濃度： 1.4×10^8 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		
PBS (Negative control)	混合直後	n1	7.16	7.15
		n2	7.15	
		n3	7.13	
	30秒作用後	n1	7.10	7.14
		n2	7.20	
		n3	7.11	
70% w/v エタノール	30秒作用後	n1	< 2.00	< 2.00
		n2	< 2.00	
		n3	< 2.00	

42

一般財団法人 日本繊維製品品質技術センター

Japan Textile Products Quality and Technology Center 略称(QTEC)

～ご清聴ありがとうございました～

ご不明な点がございましたら、お気軽にお問い合わせください。

お問い合わせ先

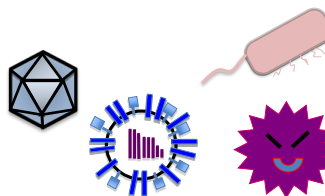
神戸試験センター
射本 康夫(イモト ヤスオ)

〒650-0011 神戸市中央区下山手通5-7-3

[TEL] 078-351-1891

[FAX] 078-351-1894

[E-MAIL] y-imoto@qtec.or.jp



43