

抗ウイルス性試験法（シェーク法）

1 適用範囲

この試験法¹は、何らかの抗ウイルス機能を付与された抗ウイルス加工製品の抗ウイルス試験に適用する²。シェーク法の抗ウイルス性試験法は、試験試料が特殊な形状または小物の場合など³に適した抗ウイルス試験方法である。ただし、抗ウイルス加工製品の抗ウイルス性試験方法—ISO 21702 法が適用できる試験試料については、原則としてこの試験法を用いてはならない。

1 試験片表面積とウイルス液及びウイルス数の関係を同じにすることが重要である。

そうしないと試験結果に変動が生じやすいので注意する。

2 表面の一部が抗ウイルス加工されているものは抗ウイルス加工面積が規定量となるように試験片を調整する。

3 次のような抗ウイルス加工製品においてはシェーク法の抗ウイルス性試験を適用することができる。

(1)この試験法で規定する試料表面積とウイルス液量の比が維持できる製品

(2)振とうすることにより、剥がれたり試験片が変化しないもの

(3)紙、布、不織布など繊維状で厚みが無視できるもの

シェーク法の抗ウイルス性試験実施にあたり下記の点について注意する。

- ・振とう容器の蓋が緩くなりウイルス液が漏れるおそれがある。その防止には蓋部分をパラフィルム等でテープシールすることが有効である。
- ・スポンジ製品は多孔質で乾燥させにくい問題があるため、清浄化にあたっては当事者間で協議の上、適当な方法（オートクレーブ処理、乾熱殺菌、紫外線照射、EOG 殺菌など）を決め、その条件を報告書に明記すること。
- ・スポンジ製品は水道水を用いる機会が多いことから、当事者間で協議の上、耐水性試験は水道水を用いて処理してもよい（その際は、報告書に明記すること）。多孔質で耐水試験処理後の乾燥が長時間になる場合がある。乾燥にあたっては依頼者と試験者の間で協議し適当な条件を決め、その条件（方法・温度・時間など）を報告書に明記すること。

2 試験ウイルス種⁴

- (1) *Influenza A virus* (H3N2) A/Hong Kong/8/68;TC adapted ATCC VR-1679
- (2) *Feline calicivirus*; Strain: F-9 ATCC VR-782

3 宿主細胞

- (1) MDCK cell ATCC CCL-34 (*Influenza A virus* (H3N2)の宿主細胞)
- (2) CRFK cell ATCC CCL-94 (*Feline calicivirus*の宿主細胞)

4 試験の準備

試験に用いる薬品、器具等は特に指定がないかぎり、ISO 21702:2019 に規定するものを用いる。

4.1 器具、機器

- (1) ピペット (10ml 以上分注可能なメスピペット)
- (2) 振とう培養器⁵ (± 1°C以内の精度で運転可能な機種)
- (3) 滅菌コップ⁶ (滅菌検査用コップとして市販されている内容積 60ml の検査用コップ (栄研器材など) を試験容器として使用する)
- (4) CO₂ インキュベーター (34±1°C及び 37±1°Cの温度で、炭酸ガス濃度 5%の環境を保てるもの)

4.2 試薬

イーグル培地 (EMEM)⁷

イーグル培地 (EMEM)	9.53 g
カナマイシン硫酸塩	60 mg
超純水	1000 mL

4 試験ウイルス種として、エンベロープ有り及びエンベロープ無しのウイルスの代表として、各 1 種類を選択した。

5 振とう培養器は水平方向振とう数 150 ±10rpm, 振幅 30±5mm, 温度調節精度±1°Cで運転可能な機種を使用する。

6 滅菌コップは、コップの形状が異なると試験結果に差異が生じるので栄研器材製滅菌 60ml 検査用コップ (外径 63mm, 深さ 35mm, 内容積 60ml), 又は同等品を使用する。

7 イーグル培地 (EMEM) については、ISO 21702:2019 の Annex A に記載されている組成を用いる。市販品を使用する場合、Annex A の組成で含まれていない成分がある場合は、追加する。

5 試験試料及び無加工試料

この試験法で対象とする試験試料は、原則として製品そのもの⁸とする。
無加工試料とは抗ウイルス加工をしていない製品のことを言う。スポンジが試料の場合、その大きさを記録して結果とあわせて報告する。

6 試験方法

6.1 試験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34又は37℃で所定時間培養する。培養液を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⁹。

EMEMで $1\sim 5\times 10^7$ PFU/mLに調製した後、0.055%Tween80含有滅菌超純水で10倍希釈したものを試験ウイルス懸濁液¹⁰とする。

(ウイルス感染価： $1\sim 5\times 10^6$ PFU/mL)

6.2 試験片の調製

(1)試験試料¹¹を全表面積の合計¹²が $32\pm 5\text{cm}^2$ となるように¹³切断又は複数個用意する。

試験試料の全面¹⁴についてエタノール¹⁵を染み込ませた¹⁶局法ガーゼまたは脱脂綿で軽く2～3回拭いた後、乾燥したもの(前処理)を3個用意し、これらを抗ウイルス加工試験片とする。

(2)無加工試料を表面積の合計が $32\pm 5\text{cm}^2$ となるように切断または複数個用意し、抗ウイルス加工試験片と同様に前処理したものを3個用意し、これらを無加工試験片とする。

8 この試験法は特殊な形状または小物の製品についても試験が可能であるので、試験試料は製品そのものを用いるものとする。

9 この試験法では、ウイルス懸濁液中の培地組成が抗ウイルス加工剤に対する抗ウイルス効果に影響を及ぼす可能性があるため、ウイルス懸濁液の調製方法については、ISO 21702:2019の6.4を参考にすることが望ましい。

10 試験ウイルス懸濁液中の培地組成に関しては、ISO 21702:2019の6.4と同様に、EMEMを滅菌超純水で10倍希釈した溶液(1/10 EMEM)を試験ウイルス懸濁液の培地組成とする。また、ウイルス感染価に関しては、事前の検証の結果、試験ウイルス懸濁液濃度が 10^7 PFU/mL以下でも試験が成立することが確認できたため、試験機関への負担も考慮し、 $1\sim 5\times 10^6$ PFU/mLとする。

11 吸水性がある試験試料については原則として適用してはならない。また、この試験法を適用する特殊な形状の試験試料のうち、連続気泡のスポンジ製品など嵩高く、ウイルス液との馴染みが均一に得られない試料について以下の条件で試験する。

⇒試験試料の全表面積は気泡を考慮せず、表面を平滑と想定した寸法で算出する。

また形状は、厚みが 3mm 以下の試料片で 2~4 個とする。

6.3 対照試験

抗ウイルス加工剤が細胞毒性を示さないこと、ウイルスへの細胞の感受性の低下及び抗ウイルス加工剤の抗ウイルス活性の不活性化の確認を行うため、対照試験を実施し、以下の基準を満たすことを確認する。

-
- 12 形状が複雑で表面積の算出が困難な試験片の場合でも、何らかの方法で表面積を求め、ウイルス液及びウイルス数との関係と同じにする。ここで言う試験片の表面積とは、試験試料のもともとの表面（固有表面という）のことであり、試験片を作るために切断又はスライスすることにより新しくできた表面（新表面という）は除外する。新表面は試験試料のもともとの表面でなく、固有表面と抗ウイルス性において相違する可能性があるため、試験片の新表面は固有表面 ($32 \pm 5 \text{ cm}^2$) の 10%以下 ($3 \pm 0.5 \text{ cm}^2$) とする。新表面も抗ウイルス面であれば除外しない。
 - 13 フィルム状の試験試料については、前項の制限の範囲で細かく裁断したものを試験片としてもよい。又、紙、布、不織布など吸水性があっても、厚さが無視できるものはフィルムの場合と同様に、前項の制限の範囲で細かく裁断したものを試験片としてもよい。
 - 14 試験片表面には、離型剤、洗浄剤、潤滑剤、手の脂などの汚れが付着していることがある。これらのある程度除去しないと試験結果が安定しないことがあるので、原則として試験片全面の汚れを拭き取ってから試験するものとする。
 - 15 拭き取り液としては、滅菌水では油分が取れない可能性もあり、油分の除去もある程度期待できるエタノール（純度 99%以上）を用いることとした。なお、イソプロピルアルコール、アセトン、トルエンなどは、試験片表面を溶かすことがあるので用いてはならない。
 - 16 試験片をエタノールに浸漬、または試験片に噴霧してはならない。あくまで試験片に付着している油分など汚れのある程度除去するのが目的であり、短時間に処置するとともに乾燥を十分に行なう。

6.3.1 細胞毒性確認試験

1. 無加工試験片（3個）又は抗ウイルス加工試験片（3個）を各試験容器に入れ、検体の表面積 32 cm^2 に対して 10 mL の比率で 0.05% Tween80 含有 $1/10$ EMEM を添加する。
2. 試験容器の蓋をして、 25°C で 24 時間振とうする。（試験液）
対照区用に 3 個の試験容器を用意し、それぞれに 0.05% Tween80 含有 $1/10$ EMEM を 10 mL 添加し、同様に 25°C で 24 時間振とうしたものを“陰性対照”とする。
3. 24 時間振とう後、試験液 0.5 mL を SCDLP 培地 $^{17} 4.5\text{ mL}$ に入れ、混合する 18 。
（反応停止液）
4. EMEM で反応停止液の 10 段階希釈系列を作製する 19 。
5. プラーク測定法 20 にて各希釈系列の細胞毒性の有無を確認する。

6.3.2 ウイルスへの細胞の感受性確認試験

1. 無加工試験片（3個）又は抗ウイルス加工試験片（3個）を各試験容器に入れ、検体の表面積 32 cm^2 に対して 10 mL の比率で 0.05% Tween80 含有 $1/10$ EMEM を添加する。
2. 試験容器の蓋をして、 25°C で 24 時間振とうする。（試験液）
対照区用に 3 個の試験容器を用意し、それぞれに 0.05% Tween80 含有 $1/10$ EMEM を 10 mL 添加し、同様に 25°C で 24 時間振とうしたものを“陰性対照”とする。
3. 24 時間振とう後、試験液 0.5 mL を SCDLP 培地 $^{17} 4.5\text{ mL}$ に入れ、混合する 18 。
（反応停止液）
4. EMEM で反応停止液の 10 段階希釈系列を作製する 19 。
5. EMEM を用いて、 $4\sim 6 \times 10^4$ PFU/mL に調製したウイルス懸濁液を上記 4. の各希釈系列の $1/100$ 量添加する。
6. 室温で 30 分間静置する。
7. プラーク測定法 20 にて各希釈系列 1 mL 当たりのウイルス感染価を測定し、ウイルスの細胞への感受性を確認する。

* 対照試験の判定基準

1. 細胞毒性: 無し
2. ウイルスへの細胞の感受性確認:
 $\lg(\text{陰性対照のウイルス感染価 (PFU/mL)}) -$

$$\lg(\text{無加工試験片又は抗ウイルス加工試験片のウイルス感染価 (PFU/mL)}) \leq 0.5$$

6.4 抗ウイルス性試験

1. 無加工試験片（3個）及び、抗ウイルス加工試験片（3個）を試験容器に入れ、検体の表面積 32 cm²に対して 10mL の比率で試験ウイルス液を添加する。
試験ウイルス液接種後に試料をピペットの先やコンラージ棒などで数回押す。
2. 試験容器の蓋をして、25℃で 24 時間振とうする。（試験液）
対照区用に 3 個の試験容器を用意し、それぞれに試験ウイルス液を 10mL 添加し、同様に 25℃で 24 時間振とうしたものを“対照区”とする。
また、試験ウイルス液添加後直ぐにウイルス感染価を測定したものを“対照区の接種直後”とする。
3. 所定時間振とう後、試験液 0.1mL を SCDLP 培地¹⁷ 0.9mL に入れ、混合する¹⁸。
（反応停止液）
4. EMEM で 10 段階希釈系列を作製し、プラーク測定法¹⁹にて反応停止液 0.1mL 当たりのウイルス感染価を測定し、試験液 10mL 当たりのウイルス感染価＝試験容器 1 個あたりのウイルス感染価（PFU/個）を算出する。

7 試験成立条件

下記項目の試験成立条件をすべて満たすとき、その試験は有効と見なす。

- (1) 「対照区の接種直後」および「対照区」の各 3 個の対数値のウイルス感染価について、次式による計算を行い、その計算値²¹が 0.2 以下であること。
$$(\text{最高対数値} - \text{最低対数値}) / (\text{対数平均値}) \leq 0.2$$
- (2) 「対照区の接種直後」の対数値の平均値に対する「対照区」の対数値の平均値の減少²²が 2.0 未満であること²³。

17 薬剤不活化剤は、ISO 21702:2019 の 4.3.16 に記載されている SCDLP 培地を使用する。

尚、当事者間で協議の上、薬剤不活化剤の組成や量を変更しても良い。

18 試験液とウイルス懸濁液との混合比が同様であれば、液量を変更しても良い。

19 反応停止液にて、対照試験の判定基準を満たさない場合は、反応停止液の 10 倍段階希釈系列を作製し、対照試験の判定基準を満たす希釈倍率を決定する。なお、対照試験で決定した希釈倍率にて、本試験でも同様の操作を行い、報告書にもその希釈倍率を記載する。

20 ウイルス感染価の測定方法は、ISO 21702:2019 の 7.5 に記載されているプラーク測定法を参考に実施する。

21 計算値は小数点 2 桁目を切り上げて有効数字 1 桁に丸めて表示する。

22 減少は小数点 1 桁目を切り上げて表示するものとする。

23 事前検証の結果、対照区の減少値は 2.0 未満になることが確認されている。

よって、対照区の 24 時間後のウイルス感染価の減少値が 2.0 以上になる場合には、試

験操作の確認も含めて、再試験を実施すること。

- (3) 「対照区の接種直後」の各 3 個のウイルス感染価について、それらの平均値が $1.0 \sim 5.0 \times 10^7$ PFU/個の範囲にあること²⁴。
- (4) 「無加工試験区」の各 3 個のウイルス感染価がすべて 1.0×10^5 PFU/個以上であること²⁵。

8 試験結果の表示

次式により、「抗ウイルス活性値」を計算²¹し、小数点以下 2 桁目を切捨て小数点以下 1 桁に丸めて表示する。

抗ウイルス活性値 = 「無加工試験区の 24 時間後のウイルス感染価の常用対数値平均値」
－ 「試験区の 24 時間後のウイルス感染価の常用対数値平均値」

また、抗ウイルス活性値が 2.0 以上の場合²⁶、試験サンプルに抗ウイルス効果があるとみなす。なお、抗ウイルス加工製品の SIAA 登録としては、インフルエンザウイルス、ネコカリシウイルスの 2 種のうちいずれか一方で抗ウイルス活性値が 2.0 以上の場合、登録可能である。

以上

24 対照区の接種直後のウイルス感染価が著しく低下している場合には、試験操作の確認も含めて、再試験を実施することが望ましい。

25 「無加工試験区」のウイルス感染価すべてが 1.0×10^5 PFU/個以上とならない場合は、無加工試料自体に抗ウイルス性があることになり、試験が成立しない。その場合には、無加工試料への加熱等の前処理あるいは試験ウイルス懸濁液へのタンパク質の添加などを行ってから再試験を実施しても良い。

26 ISO 21702:2019 を用いた抗ウイルス加工製品の SIAA 登録では、抗ウイルス性能基準として、antiviral activity が 2.0 以上と定めている。本試験法でも同様に、抗ウイルス活性値が 2.0 以上であることを抗ウイルス性能基準とした。

本文書の一部あるいは全部を無断で複写複製することは、法律で認められた場合を除き、著作権の侵害になります。

抗菌製品技術協議会

制定：2023年5月29日