

抗ウイルス加工剤の抗ウイルス性試験法

1 適用範囲

この試験法は、水溶性の抗ウイルス加工剤に適用する。なお、当事者間で協議の上、水に溶解し難い抗ウイルス加工剤にて、実施することも可能である。

2 試験ウイルス種¹

- (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。また、対照サンプルとして、日本薬局方に規定する精製水²を使用する。

4.1 器具、機器

- (1) 恒温器 (25±1℃の温度を保てるもの)
- (2) 天秤 (化学天秤)
- (3) オートクレーブ
- (4) CO₂ インキュベーター (34±1℃及び 37±1℃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)³

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

-
- 1 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。
 - 2 精製水はあらかじめ、高圧蒸気滅菌をしておくことが望ましい。
 - 3 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 試験方法

5.1 試験ウイルス懸濁液の調製⁴

宿主細胞にウイルスを感染させ、EMEMを加え34又は37°Cで所定時間培養する。培養液を4°C、1,000×gで15分間遠心分離した上清を試験ウイルス懸濁液とする。
(ウイルス感染価：1~5×10⁸ PFU/mL)

5.2 試験サンプルの調製⁵

滅菌済みの試験管に滅菌精製水を用いて試料を溶解又は希釈し、800 µg/mLとなるようにサンプル濃度をしたものを試験サンプルとする。800 µg/mLに調製後の試験サンプルを新たな試験管3本に分注する(N=3)。

5.3 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。

* 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:

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

4 この試験法では、試験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、試験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。

5 試料由来の微生物が試験結果に影響を及ぼすことが考えられるため、試料は無菌であることが望ましい。そのため滅菌が可能なものは、当事者間で協議の上、あらかじめ試料を滅菌(乾熱滅菌、高圧蒸気滅菌、フィルターろ過滅菌、ガス滅菌等)しても良い。また、水に溶解し難い抗ウイルス加工剤の場合は、当事者間で協議の上、N=3毎に試験サンプルを調製する方法を適用しても良い。

①高温加熱が可能な試料：加熱条件が180°Cの場合30分間以上、170°Cの場合60分間以上、160°Cの場合120分間以上加熱して試料の滅菌及び乾燥を行う。乾燥後はシリカゲルを入れたデシケータ中で放冷させる。

②高温加熱が不可能な試料：試料を適当な方法で滅菌後、試料が変質しない温度範囲および時間内で乾燥させる。これをシリカゲルを入れたデシケータ内で放冷させる。この場合は乾燥および滅菌条件を明記する。

5.3.1 細胞毒性確認試験

1. 試験サンプル 4.5 mL に EMEM 0.5 mL を加え、十分に攪拌する⁶。
これを試験液とする (N=3)。
2. EMEM を用いて、試験液の 10 倍段階希釈系列を作製する⁷。
3. プラーク測定法⁸にて各希釈系列の細胞毒性の有無を確認する。

5.3.2 ウイルスへの細胞の感受性確認試験

1. 試験サンプル 4.5 mL に EMEM 0.5 mL を加え、十分に攪拌する⁶。
これを試験液とする (N=3)。
2. EMEM を用いて、試験液の 10 倍段階希釈系列を作製する⁷。
3. 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
2. の各希釈系列の 1/100 量添加する。
4. 室温で 10 分間静置する。
5. プラーク測定法⁸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。

なお、判定基準を満たさない場合は、薬剤不活性化剤⁹ (SCDLP 培地等) を使用しても良い。薬剤の不活性化方法を変更した場合は、抗ウイルス性試験でも同様の操作を行い、報告書にその旨を明記する。

5.4 抗ウイルス性試験

1. 対照サンプル (滅菌精製水) 又は試験サンプル 0.9 mL に
試験ウイルス懸濁液 0.1 mL を加え、十分に攪拌する⁶ (N=3)。
2. 25°C で 24 時間、静置する。これを試験液とする。
3. EMEM を用いて、試験液の 10 倍段階希釈系列を作製する。
また、対照サンプルについて、1. の操作後、同様に上記の 10 倍段階希釈系列を
作製したものを対照サンプルの“接種直後”とする。
4. 試験液及び試験液の 10 倍段階希釈系列 0.1mL 当たりのウイルス感染価を
プラーク測定法⁸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。

6 各サンプル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。

7 試験液の 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、抗ウイルス性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。

8 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。また、適切な検証を行った上で、TCID₅₀ 測定法で実施しても良い。

5.5 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。

「対照サンプルの接種直後のウイルス感染価の常用対数値平均値」に対する
「対照サンプルの 24 時間後のウイルス感染価の常用対数値平均値」の減少が
2.0 未満であること¹⁰。

5.6 試験結果の表示

次式により、「抗ウイルス活性値」を計算し、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。

$$\text{抗ウイルス活性値} = \left[\begin{array}{l} \text{対照サンプルの 24 時間後のウイルス感染価の常用対数値平均値} \\ - \text{試験サンプルの 24 時間後のウイルス感染価の常用対数値平均値} \end{array} \right]$$

また、抗ウイルス活性値が 2.0 以上の場合¹¹、試験サンプルに抗ウイルス効果があるとみなす。なお、抗ウイルス加工剤の 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

-
- 9 この試験法ではプラーク測定法及び TCID₅₀ 測定法いずれのウイルス感染価測定法にも適用できるよう、EMEM による希釈で薬剤の不活性化を行うこととした。しかし、抗ウイルス加工剤の種類によっては、EMEM による希釈では測定限界値が高くなる可能性があるため、当事者間で協議の上、その他の薬剤不活性化剤を選択しても良い。
- 10 事前検証の結果、対照サンプルの減少は約 2.0 未満になることが確認されている。よって、対照サンプルの 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。
- 11 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。この試験法でも同様に、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