

殺生物性製品を備えた試験片の殺ウイルス活性の試験

改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA) に対する RKI ガイドライン (1995) に従った  
実践近キャリア試験システムを使用した殺ウイルス活性化化合物を備えた  
試験面の検査-スクリーニング試験 S11 日付 26.05.2021

短縮報告書 : スクリーニングテスト S11

by

PD Dr. Olaf Thraenhart und Dr. Christian Jursch

**Test period:** May - June 2021  
**Principal:** dyphox® Hygiene Solutions  
TriOptoTec GmbH  
Am Biopark 13  
D-93053 Regensburg / Germany

Principal : dyphox@HygieneSolutions

(主体主) TriOptoTec GmbH  
Am Biopark 13  
D-93053 Regensburg/Germany

**製品 :**

•検体品 : ロック 3 食品用ニス VGFL 510; 3 種の製品;

検体提供者 :

Varcotec GmbH, CurialSe 2, D-70563 シュトゥットガルト/ドイツ

•試験面 : PVC フォイルから 1.6 cm x 6 cm の寸法分(ニス塗工したもの、または塗工されていないもの)を切り取ります

•検体セット #1 : PVC フォイル、ニス塗工をしたフォイル/ロット番号 : 1296 検体セット、VFFGL 40-20、(i)光増感剤なしニス(-PS) および、(ii) PS(増感剤)入りのニス(+PS)

•検体セット #2 : PVC フォイル、ニス塗工したフォイル/ロット番号 : 1318 検体セット、VGFL 510-40、(i)光増感剤なしニス(-PS) および、(ii) PS(増感剤)入りのニス(+PS)

•検体セット #3 : PVC フォイル、ニス塗工したフォイル/ロット番号 : : 1371 検体セット、VJTICGGL 43-20、(i)光増感剤なしニス(-PS) および、(ii) PS(増感剤)入りのニス(+PS)

**テストパラメータ :**

•ウイルス材料 : ウイルス懸濁液[2%FCS] (または非ウイルス制御の場合は細胞培養培地[2%FCS]。それぞれ 4 倍希釈(PBS で希釈)で試験を実施)

•ウイルス懸濁液/培地を 5 x 10 pL の部分で試験片に置き、曝露を開始する前にランニング作業台の下で乾燥させました(乾燥時間 t = 35 分)。

•露光条件 : a) 、Dyphox 社によって提供された照明装置/光源の下、2.4mWatt / cm<sup>2</sup>に調整。または b) 暗闇の中で、各定時点; t = 240 分(4 時間)を採用

**テストシステム :**

•改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA)

(原産地 : IDT Biologika GmbH、デッサウロスラウ、ドイツ)

•DF-1 セル

(原産地 : IDT Biologika GmbH、デッサウロスラウ、ドイツ)

**スクリーニングテスト手順 :**

•キャリアテスト実験は、RKI ガイドライン(1995)に従って実施されました。

**表 1 : 概要-テストサンプル**

指定	意味	説明/製品	地点ごと測定回数
ウイルス汚染	汚染に使用されるウイルス材料	一般管理	2 滴定
ウイルス制御(ライトなしの入力)	光照射なしの基準点	- PS /- 光/ + ウィルス	2
不活性化	光照射での主検体	+ PS /+ 光/+ウィルス	2
細胞毒性制御	細胞毒性	+ PS /+ 光/-ウィルス	1

試験結果：

観察：

- ・異常は見られず、予期せぬ事態は記録されていません。

ウイルス滴定：

表 3.1：ウイルス汚染（希釈を制限することによるウイルス滴定）

サンプル	Inp-la	Inp-lb	Φ
	50pL ウイルス汚染/ 5,15mL 培地中		
力価/試験 vol. (lg ID <sub>50</sub> )	6,0 ± 0,6	5,7 ± 0,49	<b>5,85</b>
平均力価 ± K (95%) <sup>1</sup>	<b>6,85 ± 0,38/mL</b>		

1 = DW / RKI-Leitlinie によるウイルス力価とその 95%信頼区間の計算

表 3.2：ウイルス制御/ PS(増感剤)なし塗工、またはコーティングなし（限界希釈によるウイルス滴定）

サンプル	VK-la	VK-lb	Φ	VK-2a	VK-2b	Φ	VK-3a	VK-3b	Φ
	<b>1296 (-PS)</b>			<b>1318 (-PS)</b>			<b>1371 (-PS)</b>		
力価/試験 vol. (lg ID <sub>50</sub> )	4,5	4,5	<b>4,5</b>	4,2	4,35	<b>4,28</b>	3,15	3,6	<b>3,38</b>
平均力価 ± K (95%) <sup>1</sup>	5,50 ± 0,33/mL			5,28 ± 0,27/mL			4,38 ± 0,35/mL		
減少 <sup>2</sup> (lg ID <sub>50</sub> ± K [95%])	<b>1,35 ± 0,50 (vs. Aus)</b>			<b>1,57 ± 0,46 (vs. Aus)</b>			<b>2,47 ± 0,52 (vs. Aus)</b>		

1 = DW / RKI-Leitlinie によるウイルス力価とその 95%信頼区間の計算

2 = ウイルス減少：ウイルス入力(ウイルス制御)の lgID<sub>50</sub> からサンプルの lgID<sub>50</sub> を引いたもの(規定時点)

表 3.3：ウイルスの不活化/ + 製品 / + 光/ + ウイルス(限界希釈によるウイルス滴定)

サンプル	In-la	In-lb	Φ	In-2a	In-2b	Φ	In-3a	In-3b	Φ
	<b>1296 (+PS)</b>			<b>1318 (+PS)</b>			<b>1371 (+PS)</b>		
力価/試験 vol. (lg ID <sub>50</sub> )	1,8	1,95	<b>1,88</b>	0,45	0,75	<b>0,6</b>	0,45	<0,3	<b>&lt;0,38</b>
平均力価 ± K (95%) <sup>1</sup>	2,88 ± 0,22/mL			1,60 ± 0,27/mL			< 1,38/mL		
減少 <sup>2</sup> (lg ID <sub>50</sub> ± K [95%])	<b>2,62 + 0,40 (In-1 vs. VK-1)</b>			<b>3,68 + 0,38 (In-2 vs. VK-2)</b>			<b>3,0 + 0,38 (In-3 vs. VK-3)</b>		

1 = DW / RKI-Leitlinie によるウイルス力価とその 95%信頼区間の計算

2 = ウイルスの減少：ウイルス入力（ウイルス制御）の IgID<sub>50</sub> からサンプルの IgID<sub>50</sub> を引いたもの（規定時点）

表 3.4 : ウイルスの不活化/+製品/+光/+ウイルス (滴定中間板[LVP大判])

サンプル	In-1	In-2	In-2
製品	<b>1296 (+PS)</b>	<b>1318 (+PS)</b>	<b>1371 (+PS)</b>
分析サンプル量 <sup>1</sup>	5 mL (a) + 5 mL (b) = 10 mL	5 mL (a) + 5 mL (b) = 10 mL	5 mL (a) + 5 mL (b) = 10 mL
希釈係数 (VF)	2	2	2
細胞培養ユニット	96	96	96
ウイルス陽性	96	90	46
比率 p <sup>2</sup>	1,0	0,9	0,479
残留ウイルス (lg ID <sub>50</sub> per 1 mL)	>1,82	1,60	0,98
減少 <sup>3</sup> (lg ID <sub>50</sub> ± CI [95%])	<b>&lt; 3,68 ± 0,33 (In-1 vs. VK-1)</b>	<b>3,67 + 0,27 (In-2 vs. VK-2)</b>	<b>3,40 ± 0,35 (In-3 vs. VK-3)</b>

1 = 細胞培養に移された最初のウイルス不活化試験サンプルの量。

2 = 細胞培養の総数に対するウイルス陽性細胞培養ユニットの比率。

3 = ウイルスの減少 : ウイルス制御の力価(表3.1を参照)からサンプルの力価を引いたもの (lg ID<sub>50</sub>)

表 3.5 : 細胞毒性制御/+製品/+光/-ウイルス (限界希釈によるウイルス滴定)

Sample	T-1	T-2	T-3
製品	<b>1296 (+PS)</b>	<b>1318 (+PS)</b>	<b>1371 (+PS)</b>
力価/試験 vol (lg ID <sub>50</sub> ) <sup>1</sup>	< 1,3/mL	< 1,3/mL	< 1,3/mL

1 = DW / RKI-Leitlinieによる細胞毒性力価の計算

表 3.6 : コントロール-感受性試験 (検出細胞のウイルス感受性)

サンプル	VK/E	E-1	E-2	E-3
製品	-	<b>1296 (+PS)</b>	<b>1318 (+PS)</b>	<b>1371 (+PS)</b>
力価/試験 vol (lg ID <sub>50</sub> ) <sup>1</sup>	6,68 ± 0,25	6,90 ± 0,02	6,75 + 0,30	6,60 ± 0,35
力価 <sup>2</sup>	-	-0,22 + 0,25	-0,07 + 0,39	0,08 + 0,43
感受性 <sup>3</sup>	-	はい	はい	はい

1 = DW / RKI-Leitlinie によるウイルス力価とその 95%信頼区間の計算

2 = ウイルスコントロールの力価(lg ID<sub>50</sub>)からサンプルの力価(lg ID<sub>50</sub>)を引いたもの

3 = 力価 <lg 1,0 (EN14776) の場合、検出セルの感受性は与えられたとおりに受け入れられます。

**結果：**

- ウイルス汚染懸濁液(5,15mLの再懸濁溶液で 50pL) を滴定すると、 $\lg ID_{50} = 6,85 \pm 0,38 / \text{mL}$  になりました (表 3.1 を参照)。
- コーティングされた PVC テストキャリアから、光の影響を受けずに室温でインキュベートした場合、4 時間後に次の量のウイルスが回収されました (VK; 表 3.2 を参照) : VK-1 =  $\lg ID_{50} = 5,50 \pm 0,33 / \text{mL}$  (ロット 1296)、VK-2 =  $\lg ID_{50} = 5,28 \pm 0,27 / \text{mL}$  (ロット 1318) および、VK-3 =  $\lg ID_{50} = 4,38 \pm 0,35 / \text{mL}$  (ロット 1371)。
- ウイルス汚染のウイルス力価 ( $\ln_p$ ; 表 3.1 を参照) と比較した場合、ウイルスの減少は  $RF = 1,35 \pm 0,50$  (VK-1)、 $RF = 1,57 \pm 0,46$  (VK-2)、 $RF = 2,47 \pm 0,52$  (VK-3) および  $RF = 1,42 \pm 0,50$  (VK-4) に達しました。(表 3.2 を参照)。
- PS 含有製品 (+ PS) でコーティングされた主要な試験片を 4 時間露光すると、少量片から非常に少量の試験ウイルスが検出されました。ウイルス制御サンプル (VK) と比較すると、ウイルスの減少は  $RF = 2,62 \pm 0,40$  ( $\ln-1$ )、 $RF = 3,68 \pm 0,38$  ( $\ln-2$ )、および  $RF = 3,0 \pm 0,38$  ( $\ln-3$ ) に達しました。(表 3.3 を参照)。
- さらに、主要な試験サンプルのウイルス滴定には、大容量板 (LVP) 法が適用されました。この手法を使用すると、より多くのテスト量を分析できます。現在のテストでは、利用可能な全量の再懸濁溶液を細胞培養に移しました ( $2 \times 5 \text{ mL} = 10 \text{ mL}$ )。その後、以下の結果が得られました (表 3.4 を参照)。最初の製品 (ロット 1296) では、96 個の接種細胞培養物すべてがウイルス陽性になりました。したがって、テストシステムの検出上限に到達/超過しました。適用されたテイラー式を使用して、(仮想) ウイルス力価は  $\lg ID_{50} > 1,82 / \text{mL}$  と計算され、VK-1 で  $RF < 3,68 \pm 0,33$  ( $\ln-1$ ) の(仮想)ウイルス減少をもたらしました。
- 2 番目の製品 (ロット 1318) では、96 個の接種細胞培養のうち 90 個がウイルス陽性になりました。テイラー式を適用すると、ウイルス力価は  $\lg ID_{50} = 1,60 / \text{mL}$  と計算され、 $RF = 3,67 \pm 0,27$  のウイルス減少が得られました。
- 3 番目の製品 (ロット 1371) では、96 個の接種細胞培養のうち 46 個がウイルス陽性になりました。テイラー式を適用すると、ウイルス力価は  $\lg ID_{50} = 0,98 / \text{mL}$  と計算され、 $RF = 3,40 \pm 0,35$  のウイルス減少が得られました。
- PS 含有製品 (+ PS) でコーティングされた試験片で、試験項目が 4 時間光にさらされた後、細胞毒性は 3 つの製品ロットすべてで検出セルに転送されませんでした。これは  $\lg$  の細胞毒性力価に相当します。  $TD_{50} < 1,3 / \text{mL}$  (表 3.5 を参照)。
- さらに、感受性試験では、細胞に LVP 試験サンプルを接種した場合、検出細胞は試験ウイルスに対して完全に感受性を維持していることが示されています (表 3.6 を参照)。

**結論 :**

- ・限界希釈法を使用した細胞毒性制御実験では、3つの製品すべてがウイルス検出またはウイルス定量化に悪影響を及ぼさなかったことが示されています。同じことがLVP(大量板)テストサンプルにも当てはまりました。
- ・製品でコーティングされているがPSがないテスト項目を使用し、暗所でのインキュベーション後、汚染懸濁液と比較した場合、特定のウイルスの減少(1.3~1,57 Log)が観察されました。これは、ウイルス材料の乾燥の結果である可能性があります。基本コーティング1371を使用すると、このウイルスの減少は約1 Log高くなりました(RF=2,47)。そのコーティングで、追加の要因が効果を発揮した可能性があります。
- ・PSを含むコーティングされたテスト項目を使用し、光を照射した後、3つの製品すべてで少量から非常に少量の残留テストウイルスを検出できました。ウイルス制御(-PS;暗所でのインキュベーション)を参照して、ウイルスの減少はRF=2,63±0,40(ロット1296)、RF=3,68±0,38(ロット1318)およびRF=3,0±0,38(ロット1371)と決められました。
- ・この結果は、LVP滴定法で確認され、RF=3,67±0,27(ロット1318)およびRF=3,40±0,35(ロット1371)にウイルスが減少しました。
- ・得られた結果に基づいて、この印刷ニス(光増感剤)の量がウイルスの減少に寄与したと結論付けることができます。

**Luckenwalde, 22<sup>th</sup> of June 2021**



**Dr. Ch. Jursch**  
**(GF und Laborleiter Eurovir)**

殺ウイルス活性に関する注釈: EN14476によると、改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)は、いわゆる「限定的な殺ウイルス活性」の(唯一の)テストウイルスです。この有効性の主張には、エンベロープウイルス(HIV、HCV、HBV、インフルエンザウイルス、SARS-CoV-1およびSARS-CoV-2[およびその他]など)に対する有効性が含まれます。