

新型コロナウイルス不活性化試験結果
イギリス株・南アフリカ株



作成日 2021 年 7 月 30 日

受託試験報告書

新型コロナウイルス不活化試験

委託者 有限会社やまがたスリートップ代
表取締役 佐藤 誠 様

受託者 国立大学法人宮崎大学
研究代表者 吉田彩子(産業動物防疫リサーチセンター・教授) 研
究分担者 齊藤暁(農学部獣医学科・准教授)

試験内容 材料と方法

検体①(ホッキ貝殻焼成粉末 0.1%濃度液)ならびに検体②(ホッキ貝殻焼成 10 倍希釈液)の SARS-CoV-2 に対する不活化効果について試験した。

すなわち、SARS-CoV-2 を 検体①(ホッキ貝殻焼成粉末 0.1%濃度液)に 2 分間もしくは 5 分間、もしくは検体②(ホッキ貝殻焼成 10 倍希釈液)に 2 分間、5 分間 もしくは 10 分間曝露し、プラークアッセイによりウイルスカ価を算出し、ホッキ貝殻焼成粉末液によるウイルス不活化効果を評価した。

細胞: VeroE6/TMPRSS2 細胞(24-well プレート)

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手

ウイルス: イギリス株: hCoV-19/Japan/QHN002/2020 (N501Y 変異型)、 1×10^6 PFU/mL

南アフリカ株: hCoV-19/Japan/TY8-612/2021 (N501Y, E484K 変異型)、

1.1×10^7 PFU/mL

いずれも国立感染症研究所より分与され、VeroE6/TMPRSS2 細胞で増幅した。

*PFU: Plaque Forming Unit (プラーク形成単位)

希釈用培地: 10% 牛胎仔血清添加 DMEM 培地(以下、D-10 培地)

重層培地: 3% 牛胎仔血清および 1.5%カルボキシメチルセルロース添加 MEM 培地細

胞固定液: 10% ホルマリン液

細胞染色液: 2% クリスタルバイオレット溶液

検体①: ホッキ貝殻焼成粉末 0.1%濃度液(貝殻焼成カルシウム、食品添加物適合品) 検

体②: ホッキ貝殻焼成 10 倍希釈液(貝殻焼成カルシウム、食品添加物適合品)

滅菌蒸留水: 陰性対照

試験手順

1. 100 μ L のウイルス液と 900 μ L の各試料もしくは滅菌蒸留水を 1.5 mL チューブ内で混合し、検体①については室温で 2 分間もしくは 5 分間、検体②については室温で 2 分間、5 分間もしくは 10 分間静置した。
2. 静置後、D-10 培地を添加し 10 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍希釈することで作用を停止させた。
3. 24-well プレート上の VeroE6/TMPRSS2 細胞に各希釈液を各穴 0.25 mL ずつ接種した。
4. 37°C、2 時間の吸着処理後、重層培地を各穴 0.5 mL ずつ添加した。
5. 37°C・5% CO₂の条件下で 3 日間培養した。

6. 培養後、10% ホルマリン液で細胞を固定し、2% クリスタルバイオレット溶液で細胞の染色を行った。
7. プレートの乾燥後、ウイルスの感染によって形成されたプラークの計数を行い、ウイルスカ価 (PFU/mL)を算出した。

試験結果

ウイルス不活化試験は triplicate (n=3)で実施し、その結果を表1ならびに表2に示した。検体①についてはいずれの処理条件においても対照群(滅菌蒸留水)と比較して減少率 99.91 %以上のウイルス不活化効果が確認された。検体②についてはイギリス株に対しては 92.44 %から 99.67 %の不活化効果を示した一方で、南アフリカ株に対しては有意な効果を示さなかった。

表1 ホッキ貝殻焼成粉末液水による SARS-CoV-2 イギリス株の不活化試験結果

<ウイルスカ価ならびに減少率>

	滅菌蒸留水				検体①		検体②		
	0分	2分間	5分間	10分間	2分間	5分間	2分間	5分間	10分間
#1	1.3E+06	6.8E+05	5.6E+05	1.2E+05	<4.0E+01	<4.0E+01	4.0E+04	2.4E+04	1.2E+03
#2	3.2E+05	6.0E+05	5.6E+05	3.2E+05	<4.0E+01	<4.0E+01	4.4E+04	1.2E+04	1.2E+03
#3	5.6E+05	3.6E+05	2.4E+05	4.0E+05	<4.0E+01	<4.0E+01	4.0E+04	1.2E+04	4.0E+02
平均値	7.2E+05	5.5E+05	4.5E+05	2.8E+05	4.0E+01	4.0E+01	4.1E+04	1.6E+04	9.3E+02
減少率	0%	0%	0%	0%	99.99%	99.99%	92.44%	96.47%	99.67%

<4.0E+01: 検出限界以下の意

ウイルスカ価は PFU/mL で表される。また、本試験の検出限界は 4.0E+01 PFU/mL である。

表2 ホッキ貝殻焼成粉末液水による SARS-CoV-2 南アフリカ株の不活化試験結果

<ウイルスカ価ならびに減少率>

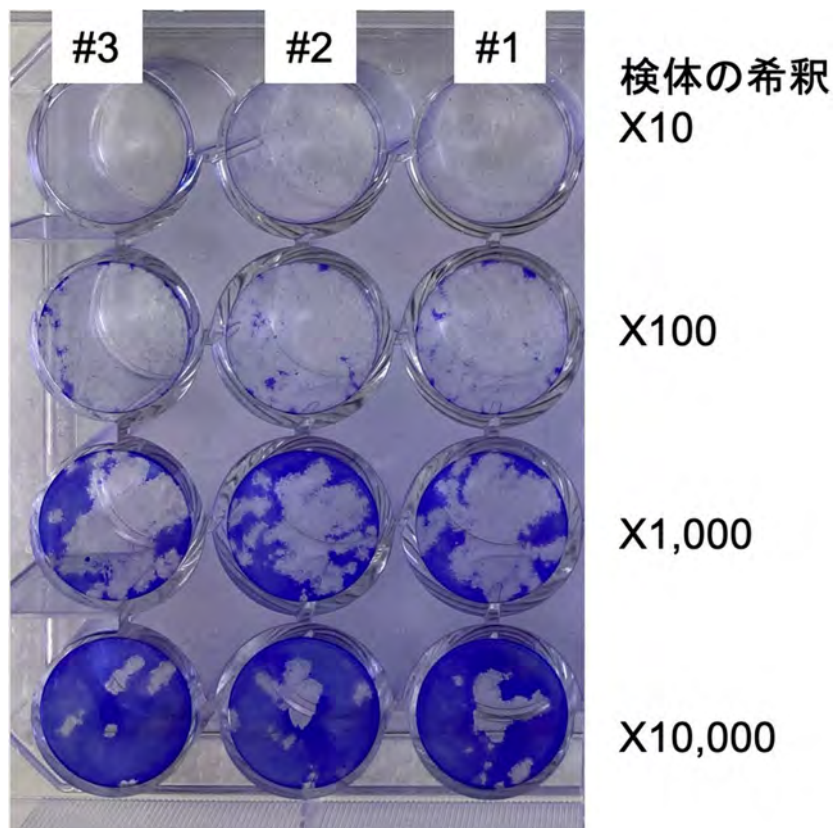
	滅菌蒸留水				検体①		検体②		
	0分	2分間	5分間	10分間	2分間	5分間	2分間	5分間	10分間
#1	8.0E+04	1.2E+05	8.0E+04	1.2E+05	1.2E+02	<4.0E+01	2.0E+05	1.2E+05	1.6E+05
#2	1.6E+05	8.0E+04	4.0E+04	3.6E+05	<4.0E+01	<4.0E+01	2.0E+05	7.6E+04	8.0E+04
#3	1.6E+05	8.0E+04	1.2E+05	1.6E+05	8.0E+01	4.0E+01	4.0E+04	2.0E+05	2.0E+05
平均値	1.3E+05	9.3E+04	8.0E+04	2.1E+05	8.0E+01	4.0E+01	1.5E+05	1.3E+05	1.5E+05
減少率	0%	0%	0%	0%	99.91%	99.95%	-57.14%	-65.00%	31.25%

<4.0E+01: 検出限界以下の意

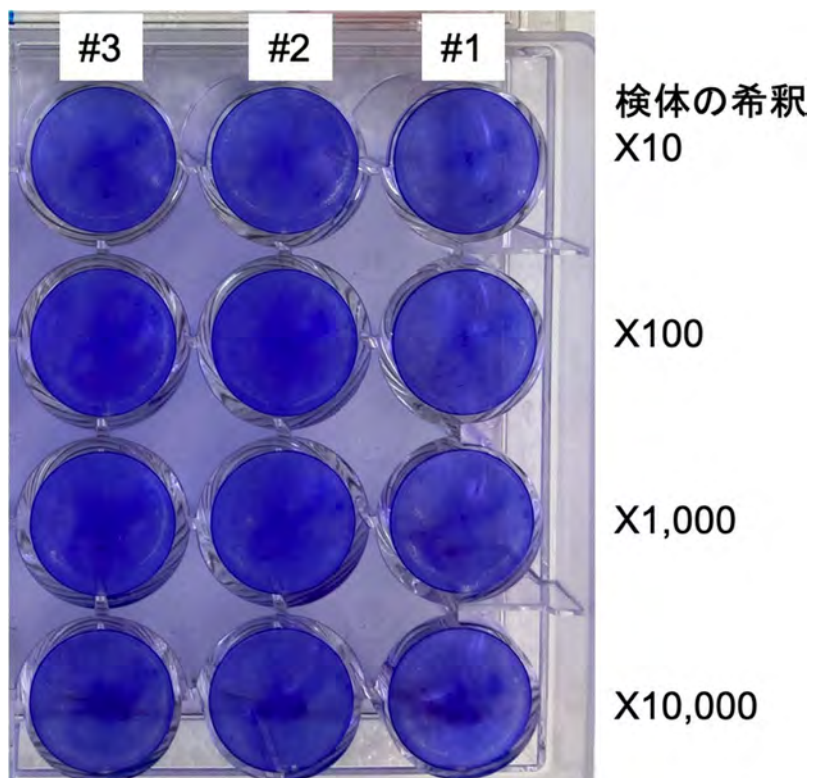
ウイルスカ価は PFU/mL で表される。また、本試験の検出限界は 4.0E+01 PFU/mL である。

プラークの一例

イギリス株、滅菌蒸留水、2分間



イギリス株、検体①、2分間



新型コロナウイルス不活性化試験結果

デルタ株



Fellenca

fellencazero@gmail.com

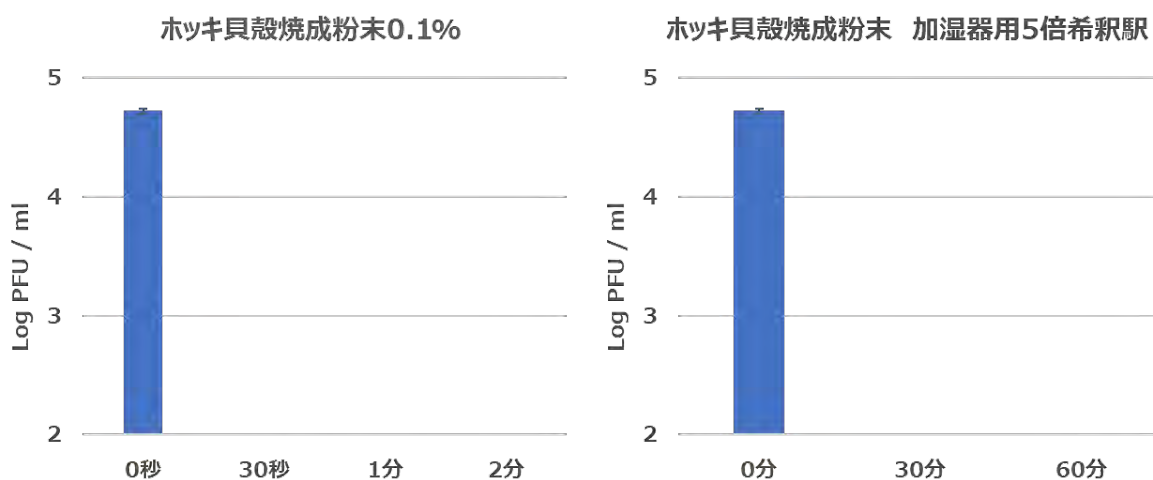
受託研究報告書

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の不活化性試験

2021年12月10日
山口大学共同獣医学部
早坂 大輔

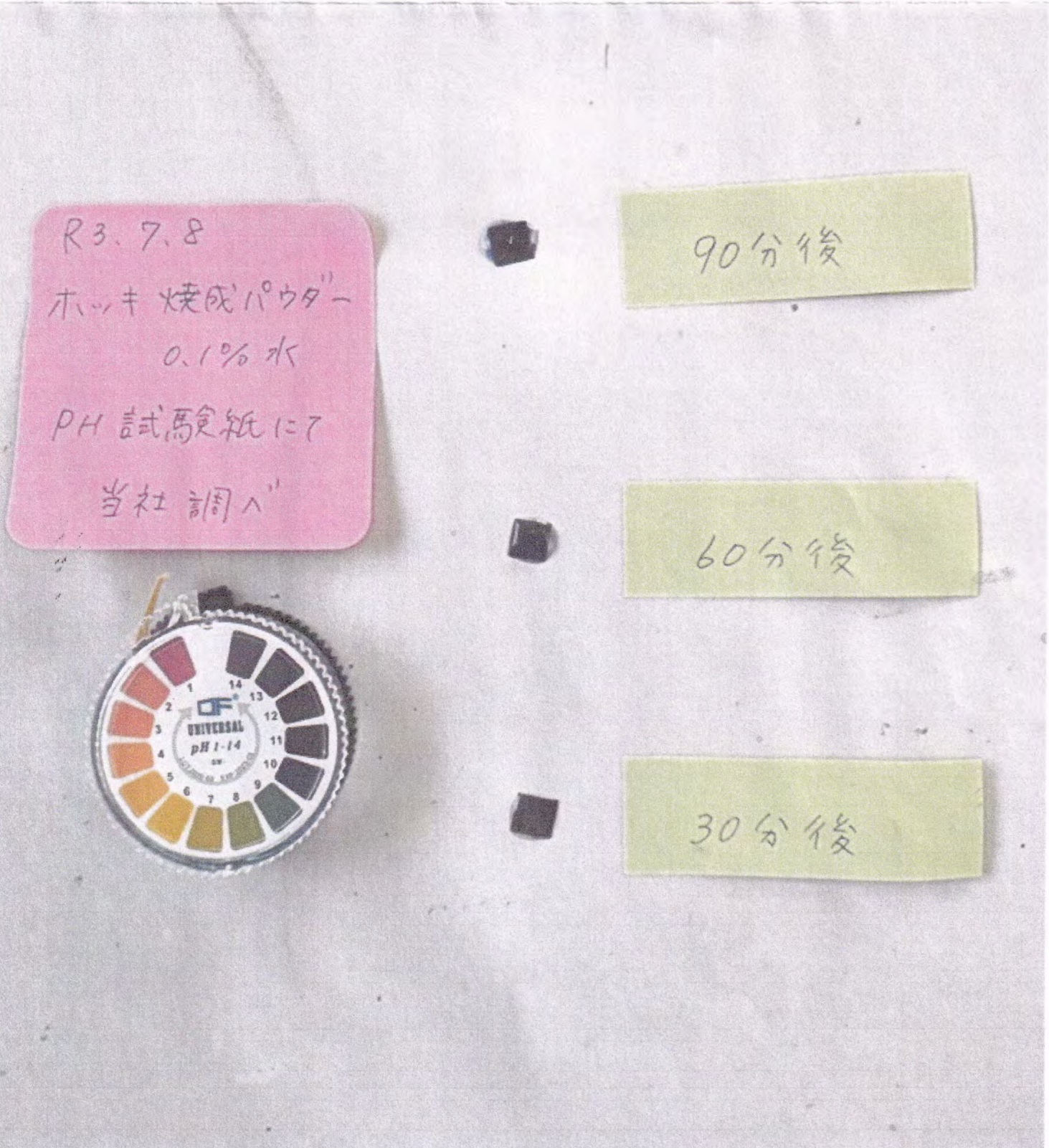
試験実施者	山口大学共同獣医学部 早坂大輔、下田宙
試験依頼者	有限会社やまがたスリートップ
試験名	新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の不活化効果検証
試験開始日	2021年11月1日
試験サンプル名	ホッキ貝殻焼成粉末 0.1% ホッキ貝殻焼成粉末 加湿器用 5倍希釈液
供試ウイルス	SARS-CoV-2 デルタ株
試験方法	1. 900 μ l の SARS-CoV-2 (MilliQ で 10 倍希釈) に対して、各サンプル液を 100 μ l 加え、室温に静置した。 2. ホッキ貝殻焼成粉末 0.1% では 30 秒、1 分、2 分後、ホッキ貝殻焼成粉末 加湿器用 5 倍希釈液では 30 分、60 分後に、各反応液を 10 倍階段希釈した。 3. VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いて、プラーク法によりウイルス力価を測定した。
結果	ホッキ貝殻焼成粉末 0.1% では、30 秒、1 分、2 分後のいずれにおいてもウイルス力価が検出限界以下となった (減少率 > 99.8%)。 ホッキ貝殻焼成粉末 加湿器用 5 倍希釈液では、30 分、60 分後のいずれにおいてもウイルス力価が検出限界以下となった (減少率 > 99.8%)。

ウイルス力価の減少量 (log pfu/ml)



持続効果1時間以上の証明画像 (PH12以上が90分持続)

※スポットで水滴を垂らして放置し、経過時間になったらPH試験紙を付けた



インフルエンザ A 型 資料



Fellenca

fellencazero@gmail.com

確認試験報告書

1999年12月21日
株式会社 エスアールエル
ウイルス細菌部 核酸・ウイルス課



5. 試験結果

結果を表3に示した。

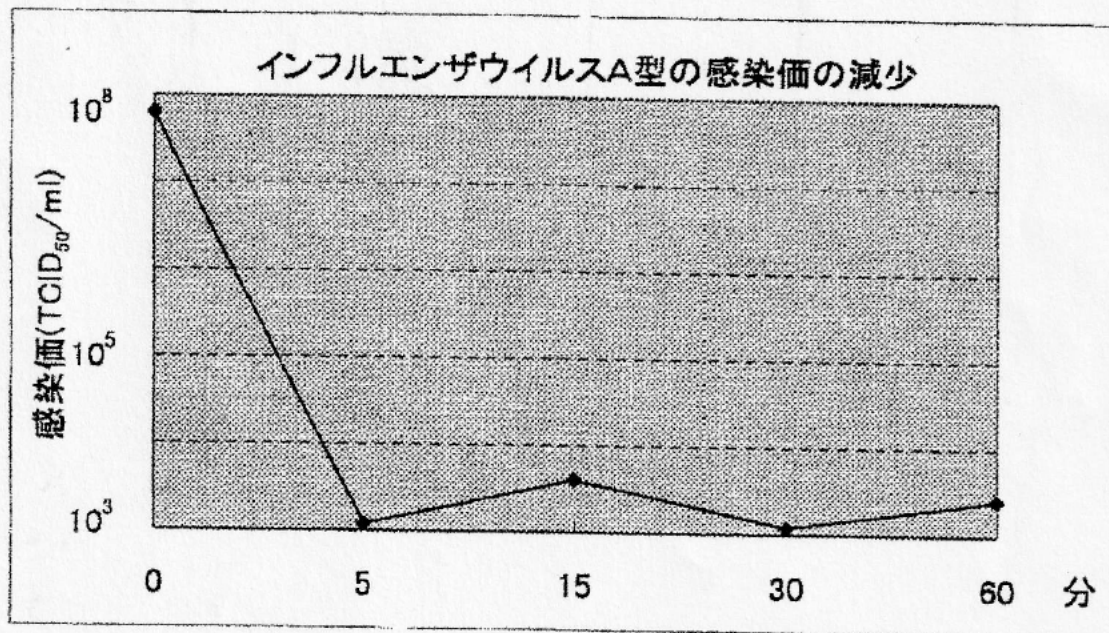
殺菌パウダー処理により、インフルエンザウイルスA型においては、 1.6×10^4 ($1/16000$) の感染価の減少が認められた。

表3 試験液のウイルス感染価(TCID₅₀/ml)

試験ウイルス	区分	開始時	5分後	15分後	30分後	60分後
インフルエンザウイルスA型	試験液	***	$< 1.2 \times 10^3$	4.0×10^3	$< 1.2 \times 10^3$	2.5×10^3
	対照	6.3×10^7	***	***	***	6.3×10^7

* 1.2×10^3 : 本測定系における測定限界値

*** : 測定せず



1. 試験目的

殺菌パウダー（カキガラ主原料）の抗ウイルス効果を試験するにあたり、使用する殺菌パウダーの培養細胞に対する影響等を検討し、試験方法を確立する事を目的とする。

2. 試験内容

- 1) 殺菌パウダーの培養細胞に対する影響
- 2) 各ウイルスの感染価の測定
- 3) 各ウイルスの精製水における安定性

3. 試験方法

3.1 材料

1) 検体

殺菌パウダー（カキガラ主原料）

2) 対象ウイルス

アデノウイルス 3 型

単純ヘルペスウイルス 1 型

コクサッキーウイルス B 群 1 型

インフルエンザウイルス A 型

3) 培養細胞及び培養液

HEp-2 細胞（ヒト喉頭癌由来細胞）……………アデノウイルス 3 型

MA104 細胞（アカゲザル腎由来細胞）…単純ヘルペスウイルス 1 型

コクサッキーウイルス B 群 1 型

MDCK 細胞（イヌ腎由来細胞）……………インフルエンザウイルス A 型

Eagle's-MEM 培養液(希釈用)及び 5%FBS 加 Eagle's-MEM 培養液

(アデノウイルス 3 型, 単純ヘルペスウイルス 1 型,

コクサッキーウイルス B 群 1 型)

MEM 培養液(希釈用)及び 0.2%BSA 加-MEM 培養液

(インフルエンザウイルス A 型)

3.2 方法

1) 殺菌パウダーの培養細胞に対する影響

a. 試験液の調製

滅菌精製水 9ml に対し PBS1ml の混合液に、殺菌パウダーを 0.5%濃度になるように添加、混合した。これを、0.2 μ m の滅菌フィルターで濾過 (10^0) した。次に、このろ液を Eagle's-MEM 培養液及び MEM 培養液で 10^{-1} ~ 10^{-7} まで 10^0 希釈し、 10^0 ~ 10^{-7} までの希釈系列を試験液とした。

b. 細胞の調整

HEp-2 細胞においては、細胞数 1.4×10^5 /ml に調整したものを 96 穴マイクロプレート各ホールに 100 μ l ずつ滴下し、用時調整した。

MA104 細胞においては、細胞数 3.0×10^5 /ml に調整したものを 96 穴マイクロプレート各ホールに 100 μ l ずつ滴下し、37°C、5%CO₂ 下で 3 日間培養したものを使用した。MDCK 細胞においては、細胞数 1.5×10^5 /ml に調整したものを 96 穴マイクロプレート各ホールに 100 μ l ずつ滴下し、37°C、5%CO₂ 下で 3 日間培養したものを使用した。

c. 試験方法

MA104 細胞は、あらかじめ、96 穴マイクロプレートの培養液を新しい 5%FBS 加 Eagle's-MEM 培養液に交換した。

準備した Hep-2 細胞及び MA104 細胞に、 $10^6 \sim 10^7$ 希釈した試験液を $25 \mu\text{l}$ ずつ 6 ホールに滴下し、 35°C で 7 日間培養した。MDCK 細胞には PBS で細胞を洗浄後、試験液を $25 \mu\text{l}$ ずつ滴下し、 33°C 、5% CO_2 下で 1 時間後、0.2% BSA 加 MEM 培養液 $100 \mu\text{l}$ を試験液の上に添加し、 33°C 、5% CO_2 下で 7 日間培養した。細胞の形態から細胞毒性の有無を観察し、細胞に対する影響を確認した。

2) 各ウイルスの感染価の測定

各ウイルスを Eagle's-MEM 培養液及び MEM 培養液で希釈し、使用するウイルスの TCID_{50} (50% 培養細胞感染価) を測定した。

3) 各ウイルスの精製水における安定性

a. ウイルス液の調製

滅菌精製水 9ml に対し各ウイルス液 1ml を混合した後、培養液で $10^{-1} \sim 10^{-8}$ までの希釈系列を作り、試験液とした。

b. 細胞の調整

Hep-2 細胞においては、細胞数 $1.4 \times 10^5 / \text{ml}$ に調整したものを 96 穴マイクロプレートの各ホールに $100 \mu\text{l}$ ずつ滴下し、用時調整した。MA104 細胞においては、細胞数 $3.0 \times 10^5 / \text{ml}$ に調整したものを 96 穴マイクロプレートの各ホールに $100 \mu\text{l}$ ずつ滴下し、 37°C 、5% CO_2 下で 3 日間培養したものを使用した。MDCK 細胞においては、細胞数 $1.5 \times 10^5 / \text{ml}$ に調整したものを 96 穴マイクロプレートの各ホールに $100 \mu\text{l}$ ずつ滴下し、 37°C 、5% CO_2 下で 3 日間培養したものを使用した。

c. 試験方法

MA104 細胞は、あらかじめ、96 穴マイクロプレートの培養液を新しい 5%FBS 加 Eagle's-MEM 培養液に交換した。

準備した Hep-2 細胞及び MA104 細胞に、 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 希釈したウイルス液を $25 \mu\text{l}$ ずつ 6 ホールに滴下し、 35°C で 7 日間培養した。MDCK 細胞は PBS で細胞を洗浄後、試験液を $25 \mu\text{l}$ ずつ滴下し、 33°C 、5% CO_2 下で 1 時間吸着後、0.2% BSA 加 MEM 培養液 $100 \mu\text{l}$ を試験液の上に添加し、 33°C 、5% CO_2 下で 7 日間培養した。細胞の変性からコントロールウイルスの力価と精製水と混和後のウイルス力価を比較し、各ウイルスの精製水における安定性を調べた。

インフルエンザウイルスA型による抗ウイルス効果試験

1. 試験ウイルス

インフルエンザウイルスA型標準株

2. 試験検体

滅菌精製水に、殺菌パウダー（カキガラ主原料）を0.05%濃度で添加、混合し、試験検体とした。

3. 培養細胞及び培養液

MDCK細胞（イヌ腎由来細胞）

MEM培養液(希釈用)及び0.2%BSA加MEM培養液

4. 試験方法

a. 試験液の調製

試験検体9mlにウイルス液1mlを添加、混合し、室温で5分、15分、30分、60分間反応後、0.2 μ m滅菌フィルターで濾過したろ液をMEM培養液で 10^{-1} ～ 10^{-8} 希釈したものを試験液とした。

b. 細胞の調整

MDCK細胞を、細胞数 1.5×10^5 /mlに調整したものを96穴マイクロプレートの各ホールに100 μ lずつ滴下し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で3日間培養したものを使用した。

c. 方法

MDCK細胞はPBSで細胞を洗浄後、試験液を25 μ lずつ滴下し、33 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で1時間吸着後、0.2%BSA加MEM培養液100 μ lを添加した。33 $^{\circ}$ C5%CO₂下で7日間培養を行い、試験液のウイルス感染価を測定した。また、滅菌精製水を対照とし、ウイルス液添加直後及び60分間後のウイルス感染価を同様に測定した。

* ウイルス感染価(TCID₅₀：50%培養細胞感染価)は、組織培養細胞におけるCPE(細胞変性効果)を指標とするウイルスの単位であり、常法により算出した。