

井直商事株式会社 御中

天然植物原料由来洗淨剤の
ノロウイルスに対する効果について
(報告書)

2014年4月7日

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

獣医学専攻獣医感染症学教室

向本 雅郁

活性化大豆不飽和脂肪酸水溶液のノロウイルスに対する不活化効果を検討した。ノロウイルスに対する評価については代替ウイルスとしてネコカリシウイルスを用いた。①②③□□倍希釈濃度の大豆脂肪酸とネコカリシウイルスを 0.5、5、30 分間反応後、ネコカリシウイルスの感受性細胞（CRFK 細胞）に添加し、ウイルス力価の変動により大豆脂肪酸のネコカリシウイルス不活化効果を評価した。

1. 材料

被検材料：活性化大豆不飽和脂肪酸水溶液（ナノ・クリーナ□□倍希釈液）

被検ウイルス：

ネコカリシウイルス（F9 株） 力価； 2.0×10^6 TCID₅₀/0.1ml

供試細胞：

ネコカリシウイルス用；CRFK 細胞（ネコ腎細胞株）

培地：

細胞培養用培地；Dulbecco's MEM(DMEM) /10%FCS

ウイルス増殖用培地；Dulbecco's MEM(DMEM) /1%FCS

被検材料希釈およびウイルス反应用試薬；PBS(-)または Dulbecco's MEM(DMEM) /1%FCS

2. 方法

1) 反応

MilliQ 水で 25、37.5 および□□倍に希釈した活性化大豆不飽和脂肪酸とウイルス希釈液（F9； 5.0×10^7 TCID₅₀/0.1ml）を等量混合し、25℃で 0.5、5、30 分間反応させた。陰性対照は試料非添加水を 0.5、5、30 分間反応させた。

2) ウイルス力価の測定

1. ウイルス増殖用培地を用いてウイルスとの混合液を□倍階段希釈した。
2. 96 ウェルに培養した供試細胞を PBS(-)で 1 回洗浄した。
2. PBS(-)を除去後、ウイルス希釈液を 0.1ml ずつウェルに添加した。各希釈の添加ウェルは 4 ウェルとした。
3. 5%CO₂ 存在下で 37℃、4 日間培養した。

3) 判定

顕微鏡観察で細胞増殖の有無によりウイルスの増殖を判定した。

増殖あり；+ 増殖なし；-

4) ウイルス力価測定

Reed and Munch 法によりウイルス力価を測定し、TCID₅₀/0.1 ml で示した。

結果：ネコカリシウイルスに対する不活化効果

1) 無処理対照

・0.5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
10 ⁴	+++++	0	19	100
10 ⁵	+++++	0	14	100
10 ⁶	+++++	0	9	100
10 ⁷	+++--	2	4	67
10 ⁸	+-----	6	1	14

$$-7 - (67 - 50 / 67 - 14) = -6 - 0.3 = -6.3 \quad \text{ウイルス力価} : 2.0 \times 10^7 \text{ TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$$

・5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
10 ⁴	+++++	0	17	100
10 ⁵	+++++	0	12	100
10 ⁶	+++++	0	7	100
10 ⁷	++----	3	2	40
10 ⁸	-----	8	0	0

$$-6 - (100 - 50 / 100 - 40) = -6 - 0.8 = -6.8 \quad \text{ウイルス力価} : 6.3 \times 10^6 \text{ TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$$

・30分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
10 ⁴	+++++	0	17	100
10 ⁵	+++++	0	12	100
10 ⁶	+++++	0	7	100
10 ⁷	++----	3	2	40
10 ⁸	-----	8	0	0

$$-6 - (100 - 50 / 100 - 40) = -6 - 0.8 = -6.8 \quad \text{ウイルス力価} : 6.3 \times 10^6 \text{ TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$$

2) 被検群

①□□希釈

・0.5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
10 ⁴	+++++	0	11	100
10 ⁵	++++-	1	6	86
10 ⁶	++---	4	2	33
10 ⁷	-----	9	0	0

$$-5 - (86 - 50 / 86 - 33) = -5 - 0.7 = -5.7 \quad \text{ウイルス力価} : 5.0 \times 10^5 \text{ TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$$

・5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
10 ²	+++++	0	9	100
10 ³	+++--	2	4	67
10 ⁴	+-----	6	1	14
10 ⁵	-----	11	0	0

$$-3 - (67 - 50 / 67 - 14) = -3 - 0.3 = -3.3 \quad \text{ウイルス力価} : 2.0 \times 10^3 \text{ TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$$

・30分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
10 ²	+++++	0	8	100
10 ³	+++--	3	3	50
10 ⁴	+-----	7	1	13
10 ⁵	-----	12	0	0

$$-2 - (100 - 50 / 100 - 50) = -2 - 1.0 = -3 \quad \text{ウイルス力価} : 1.0 \times 10^3 \text{ TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$$

②□□希釈

・0.5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
10 ⁴	++++-	1	10	91
10 ⁵	+++--	2	4	67
10 ⁶	+-----	6	1	14
10 ⁷	-----	11	0	0

$$-5 - (67 - 50 / 67 - 14) = -5 - 0.3 = -5.3 \quad \text{ウイルス力価} : 2.0 \times 10^5 \text{ TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$$

・5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
10 ³	+++++	0	8	100
10 ⁴	+++--	3	3	50
10 ⁵	+-----	7	1	13
10 ⁶	-----	12	0	0

$$-3 - (100-50/100-50) = -3 - 1.0 = -4 \quad \text{ウイルス力価} : 1.0 \times 10^4 \text{ TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$$

・30分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
10 ²	+++++	0	13	100
10 ³	+++++	0	8	100
10 ⁴	+++--	2	3	60
10 ⁵	-----	7	0	0

$$-4 - (60-50/60-0) = -4 - 0.2 = -4.2 \quad \text{ウイルス力価} : 1.6 \times 10^4 \text{ TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$$

③□□倍希釈

・0.5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
10 ⁴	+++++	0	12	100
10 ⁵	+++++	0	7	100
10 ⁶	+++--	3	2	40
10 ⁷	-----	8	0	0

$$-5 - (100-50/100-40) = -5 - 0.8 = -5.8 \quad \text{ウイルス力価} : 6.3 \times 10^5 \text{ TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$$

・5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
10 ⁴	+++++	0	11	100
10 ⁵	+++++	0	6	100
10 ⁶	+-----	4	1	20
10 ⁷	-----	9	0	0

$$-5 - (100-50/100-20) = -5 - 0.6 = -5.6 \quad \text{ウイルス力価} : 4.0 \times 10^5 \text{ TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$$

・30分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率 (%)
10 ³	+++++	0	10	100
10 ⁴	++++-	1	5	83
10 ⁵	++---	5	1	17
10 ⁶	-----	10	0	0

$$-4 - (83 - 50 / 83 - 17) = -4 - 0.5 = -5.5 \quad \text{ウイルス力価} : 3.2 \times 10^4 \text{ TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$$

まとめ：

反応時間 (分)	ウイルス力価 (TCID ₅₀ /0.1ml)		
	0.5	5	30
ナノソイ・コロイド*			
①□□倍	5.0 X 10 ⁵	2.0 X 10 ³	1.0 X 10 ³
②□□倍	2.0 X 10 ⁵	1.0 X 10 ⁴	1.6 X 10 ⁴
③□□倍	6.3 X 10 ⁵	4.0 X 10 ⁵	3.2 X 10 ⁴
陰性対照	2.0 X 10 ⁷	6.3 X 10 ⁶	6.3 X 10 ⁶

反応時間 (分)	抑制率 (%)		
	0.5	5	30
希釈倍率			
①□□倍	97.50	>99.99	>99.99
②□□倍	99.00	99.85	99.75
③□□倍	96.85	93.65	99.50

以上の結果

大豆脂肪酸 (ナノソイ・コロイド*) はノロウイルスの代替ウイルスであるネコカリシウイルスに対して、①□□倍希釈において、5分以上の反応で完全な不活化効果を示した。①□□倍希釈の0.5分および②□□倍希釈においても0.5分以上の反応で99%以上のネコカリシウイルスを不活化することができた。従って、ネコカリシウイルスを完全に不活化するためには大豆脂肪酸を①□□以上の濃度で使用する必要がある。99%程度の不活化効果を求める場合は②□□希釈でも可能である。

*商品は、①□□倍希釈にて製品化しています。