

井直商事株式会社 御中

天然植物原料由来浄化剤の
インフルエンザウイルスに対する効果について
(報告書)

2014年3月25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（商品名：植物性多機能浄化剤ナノ・クリーナ）のインフルエンザウイルスに対する不活化効果を検討した。植物原料由来多機能浄化剤ナノ・クリーナの主成分活性化大豆脂肪酸と各ウイルスを 0.5、5、30 分間反応後、各ウイルスの感受性細胞に添加し、ウイルス力価の変動により大豆脂肪酸の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（天然植物原料由来多機能浄化剤ナノ・クリーナ）

被検ウイルス：

①インフルエンザウイルス H1N1 (PR8 株) 力価； 4.7×10^4 TCID₅₀/0.1ml

供試細胞：

①インフルエンザ用；MDCK 細胞（イヌ腎細胞株）

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応用試薬；PBS (-) または Dulbecco's MEM (DMEM) /1%FCS

2. 方法

1) 反応

PBS (-) で□□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 (PR8； 2.0×10^4 TCID₅₀/0.1ml) を等量混合し、25℃で 0.5、5、30 分間反応させた。被検試料の代わりに滅菌生理食塩水を用い、0.5、5、30 分間反応させた試料を陰性対照とした。

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。
3. 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。
4. 37℃で 2 時間ウイルスを吸着させた。
5. ウイルス希釈液を除去し、Dulbecco's MEM (DMEM) /1%FCS を添加し、培養した。
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：

1. インフルエンザウイルスに対する不活化効果

1) 無処理対照 (PBS(-))

・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 ²	+++++	0	12	100
10 ³	+++++	0	7	100
10 ⁴	++---	3	2	40
10 ⁵	-----	8	0	0
10 ⁶	-----	13	0	0

$$-3 - (100 - 50 / 100 - 40) = -3 - 0.8 = -3.8 \quad \text{ウイルス力価} : 6.3 \times 10^3 \text{ TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$$

・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	13	100
10 ³	+++++	0	8	100
10 ⁴	+++--	3	3	50
10 ⁵	-----	8	0	0
10 ⁶	-----	13	0	0

$$-3 - (100 - 50 / 100 - 50) = -3 - 1 = -4 \quad \text{ウイルス力価} : 1 \times 10^4 \text{ TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$$

・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	11	100
10 ³	+++++	0	6	100
10 ⁴	+-----	4	1	20
10 ⁵	-----	9	0	0
10 ⁶	-----	14	0	0

$$-3 - (100 - 50 / 100 - 20) = -3 - 0.6 = -3.6 \quad \text{ウイルス力価} : 4.0 \times 10^3 \text{ TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$$

2) 被検群 (ナノ・クリーナ主成分活性化大豆不飽和脂肪酸)

・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 ²	-----	5	0	0
10 ³	-----	10	0	0
10 ⁴	-----	15	0	0
10 ⁵	-----	20	0	0
10 ⁶	-----	25	0	0

ウイルス力価：検出せず

・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	-----	5	0	0
10 ³	-----	10	0	0
10 ⁴	-----	15	0	0
10 ⁵	-----	20	0	0
10 ⁶	-----	25	0	0

ウイルス力価：検出せず

・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	-----	5	0	0
10 ³	-----	10	0	0
10 ⁴	-----	15	0	0
10 ⁵	-----	20	0	0
10 ⁶	-----	25	0	0

ウイルス力価：検出せず

まとめ：

反応時間 (分)	ウイルス力価 (TCID ₅₀ /0.1ml)		
	0.5	5	30
ナノ・クリーナ	<10 ²	<10 ²	<10 ²
滅菌生理食塩水	6.3 X 10 ³	1 X 10 ⁴	4.0 X 10 ³
抑制率 (%)	>98.41	>99.00	>97.50

以上の結果

活性化大豆不飽和脂肪酸（商品名：天然植物原料由来多機能浄化剤ナノ・クリーナ）はインフルエンザウイルスに対しては 0.5 分の反応でウイルス力価を検出限界以下まで減少させた。