

井直商事株式会社 御中

天然植物原料由来の洗浄剤の  
イヌパルボウイルスに対す不活化効果試験  
(報告書)

2013年8月12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のイヌパルボウイルス (CPV) への直接的不活化効果を検討した。ウイルスと活性化大豆不飽和脂肪酸・ $\square$ 倍希釈液および天然植物原料由来洗浄剤を反応後、ウイルス感受性細胞に添加し、細胞増殖の有無により効果判定を行った。

方法：

被検ウイルス；犬パルボウイルス (CPV) 29-F/LT 株 (市販ワクチン株)

力価； $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/0.1ml

供試細胞；FL-74 (ネコ白血球由来リンパ系株化細胞)

細胞用培地；Dulbecco's MEM(DMEM)/0.3% Tryptose Phosphate Broth(TPB)/10%FCS

被検材料；天然植物原料由来洗浄剤 (①活性化大豆不飽和脂肪酸・ $\square$ 倍希釈液②天然植物原料由来洗浄剤)

#### 1) 反応

CPV ( $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/0.1ml ) 0.75 ml と希釈した天然植物原料由来洗浄剤 (①および②) 0.75 ml を混合し、25℃で 0.5、5、30 分間反応させた。陰性対照として天然植物原料由来洗浄剤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。

#### 2) 希釈

予備試験において被検材料が直接細胞に影響しない濃度が・ $\square$ 倍希釈であったため、ウイルスとの混合液を細胞用培地で①は・ $\square$ 倍に希釈した。②の天然植物原料由来洗浄剤はウイルス混合液を希釈せず商品そのものとした。

#### 3) ウイルス力価の測定

1. 96 ウエルマイクロプレートで細胞用培地を用いてウイルスとの混合液を・ $\square$ 倍階段希釈した。各希釈で 5 ウエルを使用し、各ウエル 0.1ml とした。

2. 細胞を各ウエルに 0.1ml ( $5 \times 10^3$  cell) ずつ加えた。

3. 5%CO<sub>2</sub> 存在下で 37℃、6 日間培養した。

尚、予備実験の結果から活性化大豆不飽和脂肪酸・ $\square$ 倍希釈液は・ $\square$ 倍希釈で細胞毒性が見られたことから、ウイルス力価の測定は・ $\square$ 倍希釈から始めた。天然植物原料由来洗浄剤は・ $\square$ 倍希釈から始めた。

#### 4) 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；-

#### 5) 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、TCID<sub>50</sub>/0.1 ml で示した。

結果：

実験1 活性化大豆不飽和脂肪酸-□倍希釈液

1) 陰性対照 (滅菌生理食塩水)

① 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 <sup>0</sup>	+++++	0	20	100
10 <sup>1</sup>	+++++	0	15	100
10 <sup>2</sup>	+++++	0	10	100
10 <sup>3</sup>	+++--	2	5	71
10 <sup>4</sup>	++---	5	2	29
10 <sup>5</sup>	-----	10	0	0

$-3-(71-50/71-29) = -3.5 - 1.5$  (□倍希釈)      ウイルス力価： $10^{5.0}TCID_{50}/0.1 ml$

② 5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率 (%)
10 <sup>0</sup>	+++++	0	20	100
10 <sup>1</sup>	+++++	0	15	100
10 <sup>2</sup>	+++++	0	10	100
10 <sup>3</sup>	+++--	2	5	71
10 <sup>4</sup>	++---	5	2	29
10 <sup>5</sup>	-----	10	0	0

$-3-(71-50/71-29) = -3.5 - 1.5$  (□倍希釈)      ウイルス力価： $10^{5.0}TCID_{50}/0.1 ml$

③ 30分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率 (%)
10 <sup>0</sup>	+++++	0	20	100
10 <sup>1</sup>	+++++	0	14	100
10 <sup>2</sup>	+++++	0	9	100
10 <sup>3</sup>	+++--	2	4	67
10 <sup>4</sup>	+-----	6	1	14
10 <sup>5</sup>	-----	11	0	0

$-3-(67-50/67-14) = -3.3 - 1.5$  (□倍希釈)      ウイルス力価： $10^{4.8}TCID_{50}/0.1 ml$

2) 被検群 (活性化大豆不飽和脂肪酸・□倍希釈液)

④ 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 <sup>0</sup>	+-----	4	1	25
10 <sup>1</sup>	-----	9	0	0
10 <sup>2</sup>	-----	14	0	0
10 <sup>3</sup>	-----	19	0	0
10 <sup>4</sup>	-----	24	0	0
10 <sup>5</sup>	-----	29	0	0

ウイルス力価 : <1 TCID<sub>50</sub>/0.1 ml

⑤ 5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率 (%)
10 <sup>0</sup>	-----	5	0	0
10 <sup>1</sup>	-----	10	0	0
10 <sup>2</sup>	-----	15	0	0
10 <sup>3</sup>	-----	20	0	0
10 <sup>4</sup>	-----	25	0	0
10 <sup>5</sup>	-----	30	0	0

ウイルス力価 : 検出せず

⑥ 30分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率 (%)
10 <sup>0</sup>	-----	5	0	0
10 <sup>1</sup>	-----	10	0	0
10 <sup>2</sup>	-----	15	0	0
10 <sup>3</sup>	-----	20	0	0
10 <sup>4</sup>	-----	25	0	0
10 <sup>5</sup>	-----	30	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 <sub>50</sub> /0.1ml)		
	0.5	5	30
活性化大豆不飽和脂肪酸(1:7)	<10 <sup>1.5</sup>	<10 <sup>1.5</sup>	<10 <sup>1.5</sup>
滅菌生理食塩水	10 <sup>5.0</sup>	10 <sup>5.0</sup>	10 <sup>4.8</sup>

実験2 活性化大豆不飽和脂肪酸 $\cdot$ □倍希釈液

1) 陰性対照 (滅菌生理食塩水)

⑦ 0.5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
$10^0$	+++++	0	18	100
$10^1$	+++++	0	13	100
$10^2$	+++++	0	8	100
$10^3$	++---	3	3	50
$10^4$	+-----	7	1	13
$10^5$	-----	12	0	0

$-3-(50-50/50-13) = -3.0 - 1.5$  (□倍希釈)      ウイルス力価： $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub>/0.1 ml

⑧ 5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
$10^0$	+++++	0	18	100
$10^1$	+++++	0	13	100
$10^2$	+++++	0	8	100
$10^3$	++---	3	3	50
$10^4$	+-----	7	1	13
$10^5$	-----	12	0	0

$-3-(50-50/50-13) = -3.0 - 1.5$  (□倍希釈)      ウイルス力価： $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub>/0.1 ml

⑨ 30分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
$10^0$	+++++	0	20	100
$10^1$	+++++	0	15	100
$10^2$	+++++	0	10	100
$10^3$	+++--	2	5	71
$10^4$	++---	5	2	29
$10^5$	-----	10	0	0

$-3-(71-50/71-29) = -3.5 - 1.5$  (□倍希釈)      ウイルス力価： $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/0.1 ml

2) 被検群 (活性化大豆不飽和脂肪酸・□倍希釈液)

⑩ 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 <sup>0</sup>	-----	5	0	0
10 <sup>1</sup>	-----	10	0	0
10 <sup>2</sup>	-----	15	0	0
10 <sup>3</sup>	-----	20	0	0
10 <sup>4</sup>	-----	25	0	0
10 <sup>5</sup>	-----	30	0	0

ウイルス力価：検出せず

⑪ 5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率 (%)
10 <sup>0</sup>	-----	5	0	0
10 <sup>1</sup>	-----	10	0	0
10 <sup>2</sup>	-----	15	0	0
10 <sup>3</sup>	-----	20	0	0
10 <sup>4</sup>	-----	25	0	0
10 <sup>5</sup>	-----	30	0	0

ウイルス力価：検出せず

⑫ 30分

ウイルス希釈	結果		累積陽性率 (%)
	累積陰性	累積陽性	
10 <sup>0</sup>	-----	5	0
10 <sup>1</sup>	-----	10	0
10 <sup>2</sup>	-----	15	0
10 <sup>3</sup>	-----	20	0
10 <sup>4</sup>	-----	25	0
10 <sup>5</sup>	-----	30	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 <sub>50</sub> /0.1ml)		
	0.5	5	30
活性化大豆不飽和脂肪酸 (1:7)	<10 <sup>1.5</sup>	<10 <sup>1.5</sup>	<10 <sup>1.5</sup>
滅菌生理食塩水	10 <sup>4.5</sup>	10 <sup>4.5</sup>	10 <sup>5.0</sup>

実験3 天然植物原料由来洗浄剤

1) 陰性対照 (滅菌生理食塩水)

① 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 <sup>1</sup>	+++++	0	24	100
10 <sup>2</sup>	+++++	0	19	100
10 <sup>3</sup>	+++++	0	14	100
10 <sup>4</sup>	+++++	0	9	100
10 <sup>5</sup>	+++--	2	4	67
10 <sup>6</sup>	+----	6	1	14
10 <sup>7</sup>	-----	11	0	0

$$-5 - (67 - 50 / 67 - 14) = -5.3$$

ウイルス力価 : 10<sup>5.3</sup>TCID<sub>50</sub>/0.1 ml

② 5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
10 <sup>1</sup>	+++++	0	25	100
10 <sup>2</sup>	+++++	0	20	100
10 <sup>3</sup>	+++++	0	15	100
10 <sup>4</sup>	+++++	0	10	100
10 <sup>5</sup>	+++--	2	5	71
10 <sup>6</sup>	++---	5	2	29
10 <sup>7</sup>	-----	10	0	0

$$-5 - (71 - 50 / 71 - 29) = -5.3$$

ウイルス力価 : 10<sup>5.5</sup>TCID<sub>50</sub>/0.1 ml

③ 30分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率(%)
10 <sup>1</sup>	+++++	0	24	100
10 <sup>2</sup>	+++++	0	17	100
10 <sup>3</sup>	+++++	0	12	100
10 <sup>4</sup>	+++++	0	7	100
10 <sup>5</sup>	++---	3	2	40
10 <sup>6</sup>	-----	8	0	0
10 <sup>7</sup>	-----	13	0	0

$$-4 - (100 - 50 / 100 - 40) = -5.3$$

ウイルス力価 : 10<sup>4.8</sup>TCID<sub>50</sub>/0.1 ml

1) 被検群 (天然植物原料由来洗浄剤)

④ 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 <sup>1</sup>	+++++	0	9	100
10 <sup>2</sup>	+++--	2	4	67
10 <sup>3</sup>	+-----	6	1	14
10 <sup>4</sup>	-----	11	0	0
10 <sup>5</sup>	-----	16	0	0
10 <sup>6</sup>	-----	21	0	0
10 <sup>7</sup>	-----	26	0	0

$-2 - (67 - 50 / 67 - 14) = -2.3$       ウイルス力価 :  $10^{-2.3} \text{TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$

⑤ 5分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率 (%)
10 <sup>1</sup>	++----	3	2	40
10 <sup>2</sup>	-----	8	0	0
10 <sup>3</sup>	-----	13	0	0
10 <sup>4</sup>	-----	18	0	0
10 <sup>5</sup>	-----	23	0	0
10 <sup>6</sup>	-----	28	0	0
10 <sup>7</sup>	-----	33	0	0

$0 - (100 - 50 / 100 - 40) = -0.8$       ウイルス力価 :  $10^{-0.8} \text{TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$

⑥ 30分

ウイルス希釈	結果	累積陰性	累積陽性	累積陽性率 (%)
10 <sup>1</sup>	-----	5	0	0
10 <sup>2</sup>	-----	10	0	0
10 <sup>3</sup>	-----	15	0	0
10 <sup>4</sup>	-----	20	0	0
10 <sup>5</sup>	-----	25	0	0
10 <sup>6</sup>	-----	30	0	0
10 <sup>7</sup>	-----	35	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 <sub>50</sub> /0.1ml)		
	0.5	5	30
天然植物原料由来洗浄剤	10 <sup>2.3</sup>	10 <sup>0.8</sup>	<1
滅菌生理食塩水	10 <sup>5.3</sup>	10 <sup>5.5</sup>	10 <sup>4.8</sup>

以上の結果から、天然植物原料由来洗浄剤は原料の活性化大豆不飽和脂肪酸・□倍希釈液では反応時間 30 秒以上でイヌパルボウイルスの 99.9%以上、5 分以上では 100%のウイルスを不活化できることが確かめられた。

天然植物原料由来洗浄剤商品でも不活化の程度は活性化大豆不飽和脂肪酸・□倍希釈液に比べて低かったが、30 秒以上の反応で 99.9%以上ウイルスを不活化した。

(補足) 活性化大豆不飽和脂肪酸の FL24 細胞の増殖への影響

活性化大豆不飽和脂肪酸の細胞毒性を示す濃度を調べるため、本剤を希釈し、細胞増殖に影響をおよぼさない濃度を調べた。

方法：

供試細胞；FL-74

細胞用培地；Dulbecco's MEM(DMEM)/0.3% Tryptose Phosphate Broth(TPB)/10%FCS

被検材料；天然植物原料由来洗浄剤の原料活性化大豆不飽和脂肪酸・□倍希釈液

1) 本剤の希釈

96 ウエルマイクロプレートで本剤を細胞用培地を用いて・□倍階段希釈した。各希釈で 4 ウエルを使用し、各ウエル 0.1ml とした。(・□～・□□□倍希釈)

2) 培養

細胞を各ウエルに 0.1ml (5 X 10<sup>3</sup> cell) ずつ加えた。

活性化大豆不飽和脂肪酸の代わりに滅菌生理食塩水を対照として用いた。

5%CO<sub>2</sub> 存在下で 37℃、4 日間培養した。

7) 判定

細胞増殖の程度を MTT 法により測定した。

増殖あり；+ 増殖なし；-

結果：

	陰性対照		活性化大豆不飽和脂肪酸・□倍希釈液							
			1:14	1:28	1:56	1:112	1:224	1:448	1:896	1:1792
吸光度	1.862	0.235	0.252	0.639	1.196	1.725	1.788	1.813	1.796	

(4 ウェルの平均)

以上の結果より、活性化大豆不飽和脂肪酸は $\cdot$ □倍希釈まで FL-74 細胞の増殖を抑制したため、本試験では細胞に接種する場合、 $\cdot$ □倍（天然植物原料由来洗浄剤の原料活性化大豆不飽和脂肪酸 $\cdot$ □倍希釈液で $\cdot$ □倍）に希釈したものをを用いることとした。