

令和3年2月24日

ISOTANT の新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) および  
H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス  
に対する不活化活性の検証結果報告 3

国立大学法人帯広畜産大学  
グローバルアグロメディシン研究センター 武田 洋平,  
畜産学部 獣医学研究部門 小川 晴子

## SARS-CoV-2 不活化活性評価試験

### 材料

#### ・ウイルス液

国立感染症研究所より供与を受けた JPN/TY/WK-521 株を用いた。なお実験には、SARS-CoV-2 を含むウイルス増殖培地 (VGM; 組成は下記参照) を超純水 (UPW) で 5 倍希釈した液をウイルス液 (ウイルス力価: 約  $6.55 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml) として使用した。

#### ・使用細胞、培地

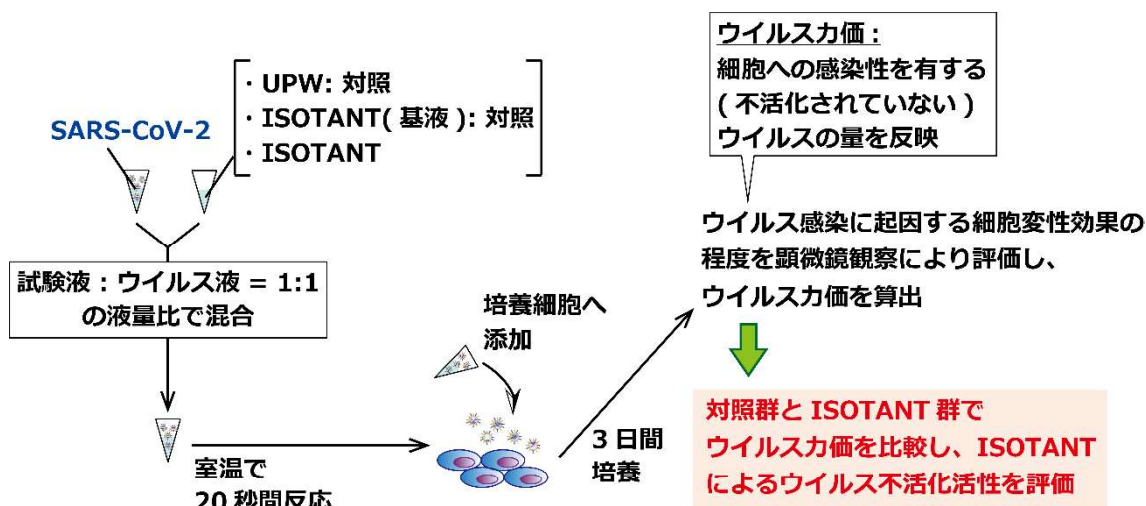
国立感染症研究所より供与を受けた VeroE6/TEMPRSS2 細胞を用いた。細胞増殖培地としては、10% FBS、2 mL-グルタミン、100 µg/ml カナマイシン、2 µg/ml アムホテリシン B、および 500 µg/ml G418 を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いた。VGM としては、1% FBS、2 mL-グルタミン、100 µg/ml カナマイシン、2 µg/ml アムホテリシン B を添加した DMEM を用いた。試験当日に VeroE6/TEMPRSS2 細胞が 90-100% confluent になるようあらかじめ 96 well plate を接種しておき、実験直前に血清不含 MEM で 1 回洗浄した後、VGM を 180 µl/well 加えた。

### 試験液

- ・ ISOTANT (イソタント): 2021 年 1 月受取サンプル

## 評価方法

ISOTANT は 10 秒以上 30 回以上スプレー缶を振った後に、スクリーキャップチューブ内にスプレー噴射した。ISOTANT 50  $\mu$ l とウイルス液 50  $\mu$ l をスクリーキャップチューブ内で混合し（液量比 1:1）、10 回以上ピペッティングを行った。その際、対照群として UPW または ISOTANT(基液、オゾン不含)とウイルス液を混合した群も置いた。なお、1 群 4 本のチューブを置いて試験を行った (n=4)。混合液を室温で 20 秒間反応させた後、チューブから 20  $\mu$ l の液を取り、あらかじめ VeroE6/TMPRSS2 細胞を接種しておいた 96 well plate に添加した。その後 96 well plate 上で 10 倍階段希釈を行った。37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 日間培養した後、顕微鏡で細胞変性効果を観察し、それをもとにウイルス力価を算出した。対照群と ISOTANT 群でウイルス力価を比較し、ISOTANT のウイルス不活化活性を評価した。なお、本評価試験は 2 回実施しており再現性確認を行った。



## 結果

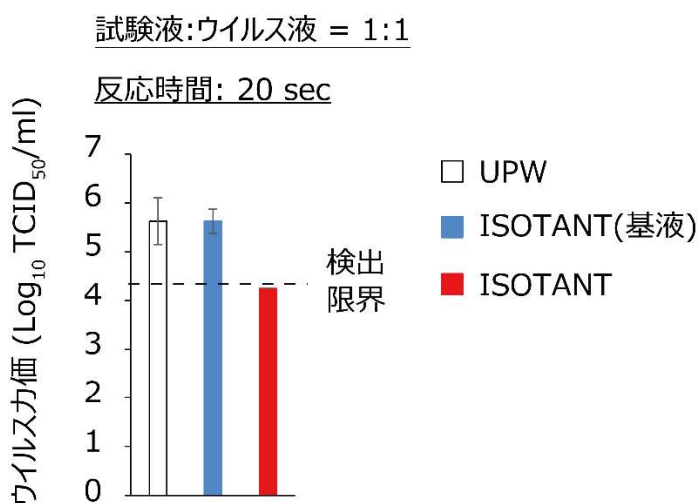
試験液:ウイルス液 = 1:1 の 20 秒の結果

		UPW	ISOTANT (基液)	ISOTANT
ウイルス力価 (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml)	Tube 1	5.25	5.75	≧ 4.25
	Tube 2	5.75	5.75	≧ 4.25
	Tube 3	6.25	5.25	≧ 4.25
	Tube 4	5.25	5.75	≧ 4.25
	平均値	5.63	5.63	≧ 4.25
	± 標準偏差	± 0.48	± 0.25	± 0.00
	UPW 群との 平均値の差	-	0.00	≧ 1.38
ISOTANT(基液) 群と ISOTANT 群 との平均値の差	-	-	≧ 1.38	
UPW 群と比較した際の ウイルス不活化率 (%)	-	0.00%	≧ 95.78%	
ISOTANT(基液)群と比較 した際の、ISOTANT 群での ウイルス不活化率 (%)	-	-	≧ 95.78%	

≧ 4.25: 検出限界以下

(検出限界は試験に用いた細胞に対する ISOTANT の細胞傷害性に基づく)

## 平均値のグラフ



試験液とウイルス液の混合比が 1:1、反応時間 20 秒の場合は、ISOTANT(基液)群では UPW 群と比較してウイルス不活化活性は認められなかった。一方、ISOTANT 群では UPW 群や ISOTANT(基液)群と比較して 95%以上のウイルス不活化活性が認められ、ウイルスカカ価は検出限界以下となった。

→ISOTANT に含まれるオゾンが SARS-CoV-2 不活化活性を有することが明らかとなった。

## H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス不活化活性評価試験

### 材料

#### ・ウイルス液

動物衛生研究所より供与を受けた H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスである A/chicken/Yamaguchi/7/04 株を用いた。なお実験には、ウイルスを含むウイルス増殖培地 (VGM; 組成は下記参照) を UPW で 50 倍希釈したウイルス液 (ウイルス力価: 約 6.55  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml) として使用した。

#### ・使用細胞、培地

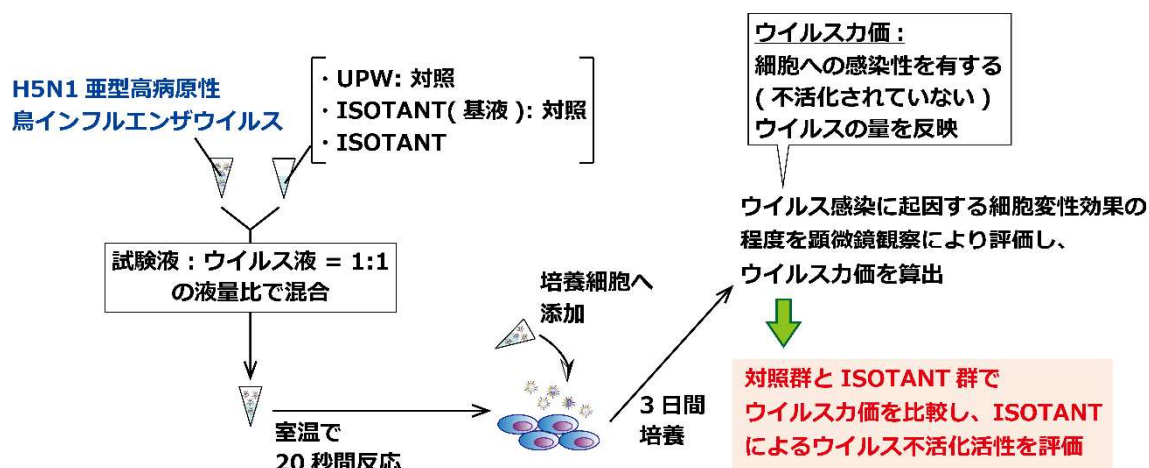
イヌ腎臓尿管上皮細胞由来細胞株である MDCK細胞を用いた。細胞増殖培地としては、10% FBS、2 mM L-グルタミン、100  $\mu$ g/ml カナマイシン、2  $\mu$ g/ml アムホテリシン B を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いた。VGM としては、0.2% 牛血清アルブミン、0.01% グルコース、2.5 mM HEPES、100  $\mu$ g/ml カナマイシン、2  $\mu$ g/ml アムホテリシン B を添加した DMEM を用いた。試験当日に MDCK 細胞が 90-100% confluent になるようあらかじめ 96 well plate を接種しておき、実験直前に血清不含 MEM で 1 回洗浄した後、VGM を 180  $\mu$ l/well 加えた。

### 試験液

- ・ ISOTANT (イソタント): 2021 年 1 月受取サンプル

## 評価方法

ISOTANT は 10 秒以上 30 回以上スプレー缶を振った後に、スクリーキャップチューブ内にスプレー噴射した。ISOTANT 50  $\mu\text{l}$  とウイルス液 50  $\mu\text{l}$  をスクリーキャップチューブ内で混合し（液量比 1:1）、10 回以上ピペッティングを行った。その際、対照群として UPW または ISOTANT(基液、オゾン不含)とウイルス液を混合した群も置いた。なお、1 群 4 本のチューブを置いて試験を行った (n=4)。混合液を室温で 20 秒間反応させた後、チューブから 20  $\mu\text{l}$  の液を取り、あらかじめ MDCK 細胞を接種しておいた 96 well plate に添加した。その後 96 well plate 上で 10 倍階段希釈を行った。37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 日間培養した後、顕微鏡で細胞変性効果を観察し、それをもとにウイルス力価を算出した。対照群と ISOTANT 群でウイルス力価を比較し、ISOTANT のウイルス不活化活性を評価した。なお、本評価試験は 2 回実施しており再現性確認を行った。



## 結果

試験液:ウイルス液 = 1:1 の 20 秒の結果

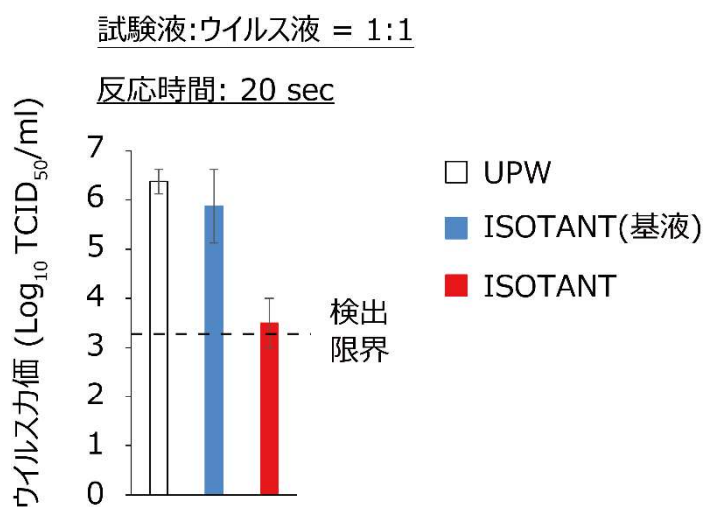
		UPW	ISOTANT (基液)	ISOTANT
ウイルス力価 (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml)	Tube 1	6.75	6.75	≧ 3.25
	Tube 2	6.25	5.25	4.25
	Tube 3	6.25	5.25	≧ 3.25
	Tube 4	6.25	6.25	≧ 3.25
	平均値	6.38	5.88	≧ 3.50
	± 標準偏差	± 0.25	± 0.75	± 0.50
	UPW 群との 平均値の差	-	0.50	≧ 2.88
ISOTANT(基液) 群と ISOTANT 群 との平均値の差	-	-	≧ 2.38	
UPW 群と比較した際の ウイルス不活化率 (%)		-	68.38%	≧ 99.87%
ISOTANT(基液)群と比較 した際の、ISOTANT 群での ウイルス不活化率 (%)		-	-	≧ 99.58%

≧ 3.25: 検出限界以下

(検出限界は試験に用いた細胞に対する ISOTANT の細胞傷害性に基づく)



## 平均値のグラフ



試験液とウイルス液の混合比が 1:1、反応時間 20 秒の場合は、ISOTANT(基液)群では UPW 群と比較して明確な(90%以上の)ウイルス不活化活性は認められなかった。一方、ISOTANT 群では UPW 群や ISOTANT(基液)群と比較して 99.5%以上のウイルス不活化活性が認められた。

→ISOTANT に含まれるオゾンが H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス不活化活性を有することが明らかとなった。