

令和2年9月8日

ALTANT の新型コロナウイルス
(SARS-CoV-2) に対する不活化活性の検証結果

実験期間: 2020年7月1日-2020年9月8日

国立大学法人帯広畜産大学

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、ただしアムホテリシン B は不含) をウイルス液 (ウイルス力価: 約 $6.75 \log_{10}$ TCID₅₀/ml) として使用した。

・使用細胞、培地

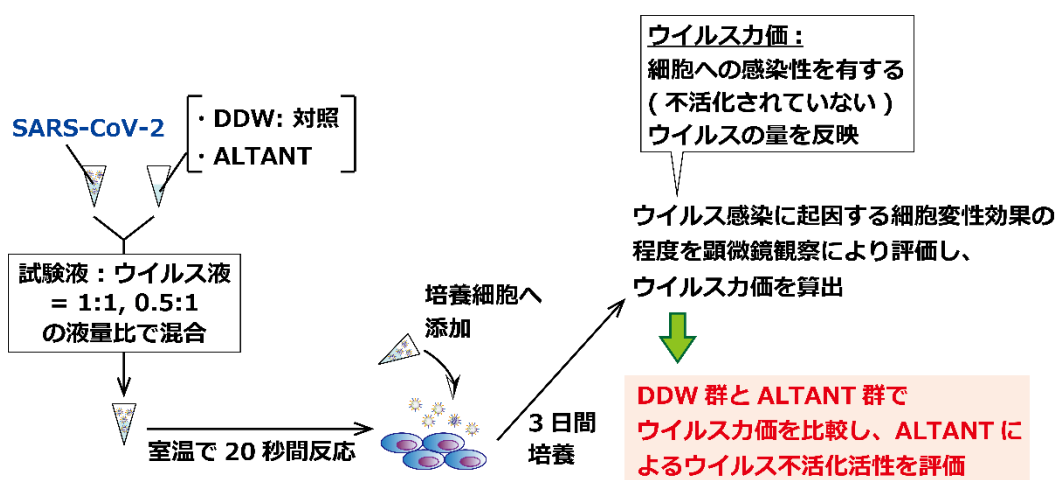
国立感染症研究所より供与を受けた VeroE6/TEMPRSS2 細胞を用いた。細胞増殖培地としては、10% 牛胎仔血清、2 mM L-グルタミン、100 µg/ml カナマイシン、2 µg/ml アムホテリシン B、および 500 µg/ml G418 を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いた。VGM としては、1% 牛胎仔血清、2 mM L-グルタミン、100 µg/ml カナマイシン、2 µg/ml アムホテリシン B を添加した DMEM を用いた。試験当日に VeroE6/TEMPRSS2 細胞が 90-100% confluent になるようあらかじめ 96 well plate に接種しておき、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

・ALTANT (アルタント)

評価方法

ALTANT とウイルス液 (SARS-CoV-2 / VGM) を液量比が 1:1 または 0.5:1 になる様にスクリーキャップチューブ内で混合し、10 回以上ピペッティングを行った。その際、対照群として蒸留水 (DDW) とウイルス液を混合した群も置いた。なお、1 群 3 本のチューブを置いて試験を行った (n=3)。混合液を室温で 20 秒間反応させた後、20 μ l の混合液をあらかじめ VeroE6/TMPRSS2 細胞を接種しておいた 96 well plate に添加した (各チューブから 2 well へ)。その後 96 well plate 上で 10 倍階段希釈を行った。37°C の CO₂ インキュベーター内で 3 日間培養した後、顕微鏡でウイルス感染・増殖に起因する細胞変性効果を観察し、それをもとにベレンスケルバー法を用いてウイルス力価 (TCID₅₀/ml) を算出した。DDW 群と ALTANT 群でウイルス力価を比較し、ALTANT のウイルス不活化活性を評価した。

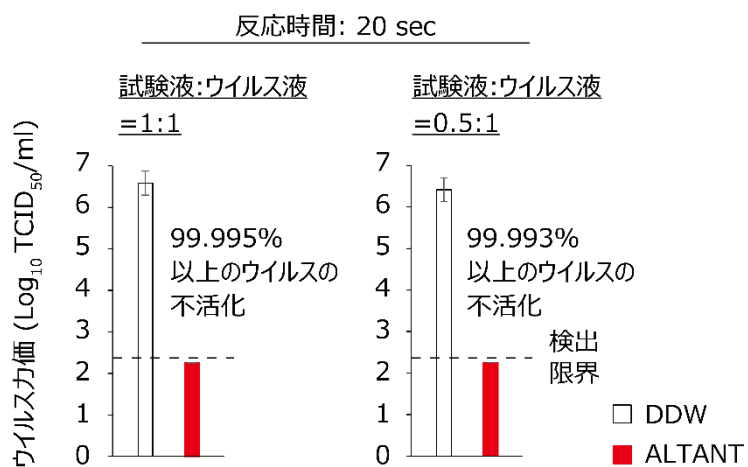


結果

反応時間 20 秒、試験液:ウイルス液 = 1:1, 0.5:1 (≤ 2.25 : 検出限界以下)

		混合比 1:1		混合比 0.5:1	
		DDW	ALTANT	DDW	ALTANT
ウイルス力価 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	Tube 1	6.75	≤ 2.25	6.25	≤ 2.25
	Tube 2	6.25	≤ 2.25	6.75	≤ 2.25
	Tube 3	6.75	≤ 2.25	6.25	≤ 2.25
	平均値 ± 標準偏差	6.58 ± 0.29	$\leq 2.25 \pm 0.00$	6.42 ± 0.29	$\leq 2.25 \pm 0.00$
	DDW 群と ALTANT 群との 平均値の差	-	≥ 4.33	-	≥ 4.17
DDW 群と比較した際の ALTANT 群でのウイルス 不活化率 (%)		-	≥ 99.995	-	≥ 99.993

平均値のグラフ



試験液とウイルス液の混合比が1:1または0.5:1の場合、20秒の反応時間においてALTANT群でウイルスカ価が検出限界以下となり、DDW群と比較して99.99%以上のウイルスが不活化された。