

令和2年10月5日

ALTANT の
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

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

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

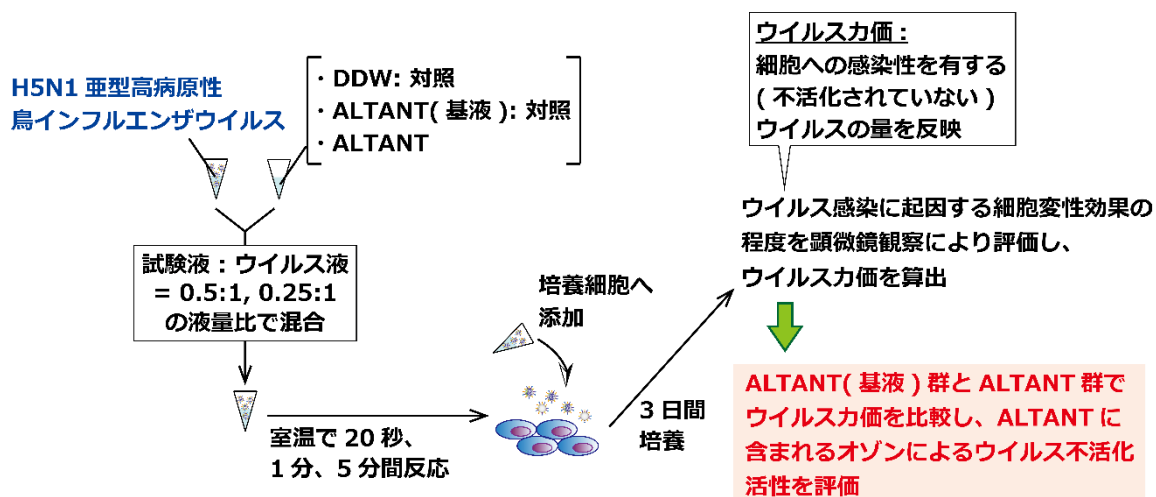
イヌ腎臓尿管上皮細胞由来細胞株である MDCK細胞を用いた。細胞増殖培地としては、10% FBS、2 mM L-グルタミン、100 µg/ml カナマイシン、2 µg/ml アムホテリシン B を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いた。VGM としては、0.2% 牛血清アルブミン、0.01% グルコース、2.5 mM HEPES、100 µg/ml カナマイシン、2 µg/ml アムホテリシン B を添加した DMEM を用いた。試験当日に MDCK 細胞が 90-100% confluent になるようあらかじめ 96 well plate を接種しておき、実験直前に血清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

試験液

・ALTANT (アルタント)

評価方法

ALTANT (オゾン含有)とウイルス液 (Yamaguchi 株 / VGM)を液量比が 0.5:1 または 0.25:1 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) または ALTANT(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、1 分、5 分間反応させた後、20 μ l の混合液をあらかじめ MDCK 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。ALTANT(基液)群と ALTANT 群でウイルス力価を比較し、ALTANT に含まれるオゾンによるウイルス不活化活性を評価した。



結果

①試験液:ウイルス液 = 0.5:1, 0.25:1 の 20 秒の結果

| | | 混合比 0.5:1 | | | 混合比 0.25:1 | | |
|--|--------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
| | | DDW | ALTANT (基液) | ALTANT | DDW | ALTANT (基液) | ALTANT |
| ウイルス力価 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) | Tube 1 | 5.75 | ≒2.25 | ≒2.25 | 5.75 | 5.25 | ≒2.25 |
| | Tube 2 | 5.25 | ≒2.25 | ≒2.25 | 5.25 | 5.25 | ≒2.25 |
| | Tube 3 | 5.25 | ≒2.25 | ≒2.25 | 5.25 | 5.75 | ≒2.25 |
| | Tube 4 | 5.25 | ≒2.25 | ≒2.25 | 5.75 | 5.25 | ≒2.25 |
| | 平均値 ± 標準偏差 | 5.38 ± 0.25 | ≒2.25 ± 0.00 | ≒2.25 ± 0.00 | 5.50 ± 0.29 | 5.38 ± 0.25 | ≒2.25 ± 0.00 |
| | DDW 群との 平均値の差 | - | ≒3.13 | ≒3.13 | - | 0.13 | ≒3.25 |
| | ALTANT(基液)群 と ALTANT 群と の平均値の差 | - | - | 0.00 | - | - | ≒3.13 |
| DDW 群と比較した際の、 ウイルス不活化率 (%) | | - | ≒99.93 | ≒99.93 | - | 25.01 | ≒99.94 |
| ALTANT(基液)群と比較 した際の、ALTANT 群での ウイルス不活化率 (%) | | - | - | 0.00 | - | - | ≒99.93 |

≒2.25: 検出限界以下

②試験液:ウイルス液 = 0.5:1, 0.25:1 の 1 分の結果

| | | 混合比 0.5:1 | | | 混合比 0.25:1 | | |
|--|------------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
| | | DDW | ALTANT (基液) | ALTANT | DDW | ALTANT (基液) | ALTANT |
| ウイルス力価 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) | Tube 1 | 5.25 | ≒2.25 | ≒2.25 | 6.25 | 5.25 | ≒2.25 |
| | Tube 2 | 5.25 | ≒2.25 | ≒2.25 | 5.25 | 5.75 | ≒2.25 |
| | Tube 3 | 5.25 | ≒2.25 | ≒2.25 | 5.75 | 5.75 | ≒2.25 |
| | Tube 4 | 5.25 | ≒2.25 | ≒2.25 | 5.25 | 5.25 | ≒2.25 |
| | 平均値 ± 標準偏差 | 5.25 ± 0.00 | ≒2.25 ± 0.00 | ≒2.25 ± 0.00 | 5.63 ± 0.48 | 5.50 ± 0.29 | ≒2.25 ± 0.00 |
| | DDW 群との 平均値の差 | - | ≒3.00 | ≒3.00 | - | 0.13 | ≒3.38 |

| | | | | | | | |
|--|---|---|--------|--------|---|-------|--------|
| | ALTANT(基液)群と ALTANT 群との平均値の差 | - | - | 0.00 | - | - | ≧3.25 |
| | DDW 群と比較した際の、ウイルス不活化率 (%) | - | ≧99.90 | ≧99.90 | - | 25.01 | ≧99.96 |
| | ALTANT(基液)群と比較した際の、ALTANT 群でのウイルス不活化率 (%) | - | - | 0.00 | - | - | ≧99.94 |

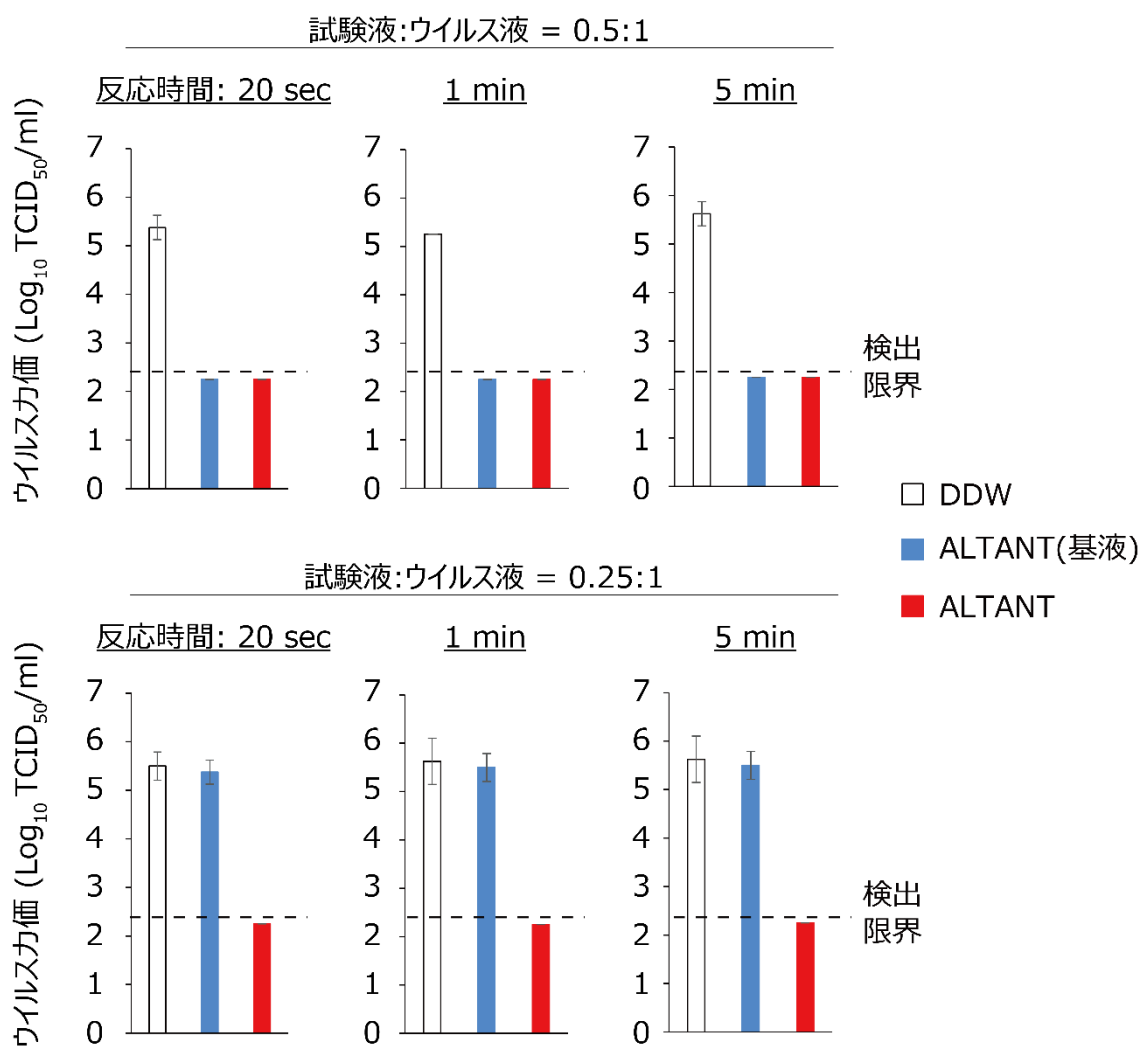
≧2.25: 検出限界以下

③試験液:ウイルス液 = 0.5:1, 0.25:1 の 5 分の結果

| | | 混合比 0.5:1 | | | 混合比 0.25:1 | | |
|--|---|-----------|-------------|--------|------------|-------------|--------|
| | | DDW | ALTANT (基液) | ALTANT | DDW | ALTANT (基液) | ALTANT |
| ウイルス力価 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) | Tube 1 | 5.75 | ≧2.25 | ≧2.25 | 6.25 | 5.75 | ≧2.25 |
| | Tube 2 | 5.75 | ≧2.25 | ≧2.25 | 5.25 | 5.25 | ≧2.25 |
| | Tube 3 | 5.75 | ≧2.25 | ≧2.25 | 5.25 | 5.25 | ≧2.25 |
| | Tube 4 | 5.25 | ≧2.25 | ≧2.25 | 5.75 | 5.75 | ≧2.25 |
| | 平均値 | 5.63 | ≧2.25 | ≧2.25 | 5.63 | 5.50 | ≧2.25 |
| | ± 標準偏差 | ± 0.25 | ± 0.00 | ± 0.00 | ± 0.48 | ± 0.29 | ± 0.00 |
| | DDW 群との平均値の差 | - | ≧3.38 | ≧3.38 | - | 0.13 | ≧3.38 |
| | ALTANT(基液)群と ALTANT 群との平均値の差 | - | - | 0.00 | - | - | ≧3.25 |
| | DDW 群と比較した際の、ウイルス不活化率 (%) | - | ≧99.96 | ≧99.96 | - | 25.01 | ≧99.96 |
| | ALTANT(基液)群と比較した際の、ALTANT 群でのウイルス不活化率 (%) | - | - | 0.00 | - | - | ≧99.94 |

≧2.25: 検出限界以下

結果①-③の平均値のグラフ



・①-③の実験はそれぞれ2回ずつ実施し同様の結果が得られており、再現性が確認されている。

・試験液とウイルス液の混合比が0.5:1の場合は、ALTANT(基液)群においても20秒の反応時間でウイルス力価が検出限界以下となった。混合比が0.25:1の場合は、20秒、1分、5分の反応時間全てにおいてALTANT(基液)群ではウイルス不活化活性が認められなかったのに対し、ALTANT群ではウイルス力価は検出限界以下となり、即ち99.9%以上のウイルスの不活化が認められた。

➤ALTANTに含まれるオゾンは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。