

# 試験報告書

## テラヘルツ水のインフルエンザウイルス に対する不活化効果試験

(試験番号：16-113)

試験の表題

テラヘルツ水のインフルエンザウイルスに対する不活化効果試験  
(試験番号：16-113)

試験委託者

名 称：株式会社 Santa Mineral  
所在地：〒105-0013 東京都港区浜松町 2-6-4-1401  
委託責任者：代表取締役 太西 るみ子  
委託担当者：阿部 麻美衣

試験実施施設

名 称：一般財団法人生物科学安全研究所  
所在地：〒252-0132 神奈川県相模原市緑区橋本台 3-7-11  
代表者：理事長 濱岡 隆文  
試験責任者：事業部 中島 隆二

試験実施期間

2017年1月6日～2017年2月10日

試験責任者の署名

一般財団法人生物科学安全研究所

中島 隆二



2017年2月21日

## 1. 試験の目的

テラヘルツ水の2種類のインフルエンザウイルスに対する不活化効果及び有機物の有無による不活化効果への影響を調べる目的で実施した。

## 2. 試験材料

### 1) 試験品

名称：テラヘルツ水  
仕様：CAC-717  
作成日：2017年1月30日  
入手年月日：2017年2月1日  
入手量：100 mL、2本

### 2) 供試ウイルス

- ・インフルエンザウイルス (IFV) A/Aichi/2/68 株 (亜型：H3N2)  
由来：北海道大学 大学院獣医学研究科・獣医学部 微生物学教室から分与を受け、当研究所にて SPF 発育鶏卵及び犬腎継代細胞 (MDCK 細胞) を用いて継代・増殖させたもの。  
ウイルス含有量： $10^{8.50}$  TCID<sub>50</sub>/mL  
保存条件：-70℃以下
- ・豚インフルエンザウイルス (SIV) A/swine/和田山/5/69 株 (亜型：H3N2)  
由来：動物用生物学的製剤協会から分与を受け、当研究所にて SPF 発育鶏卵および犬腎継代細胞 (MDCK 細胞) を用いて継代・増殖させたもの。  
ウイルス含有量： $10^{6.75}$  TCID<sub>50</sub>/mL  
保存条件：-70℃以下

### 3) 供試細胞

犬腎継代細胞 (MDCK 細胞)

由来：農林水産省動物医薬品検査所から分与を受け、当研究所にて継代培養しているもの。

## 3. 試験方法

### 1) 被験検体の調製

試験委託者から受領した試験品の原液を被験検体とした。

### 2) 不活化効果試験

#### (1) MDCK 細胞の調製

細胞培養フラスコに単層を形成した MDCK 細胞をトリプシン処理し、細胞増殖用培養液 [付記 1] に 8 倍希釈で浮遊させた。これを 24 ウェルプレートの各ウェルに 0.5 mL ずつ播きこみ、37℃、5%炭酸ガス孵卵器で 2 日間培養し、

単層形成した MDCK 細胞を試験に使用した。

(2) 供試ウイルス液の調製

IFV、SIV をそれぞれ希釈液 [付記 2] で 10 倍希釈及び 2 倍希釈したものを 0% 牛血清アルブミン (BSA) 供試ウイルス液とした。また、それぞれの 0% BSA 供試ウイルス液に牛血清アルブミン液 [付記 3] を 10% になるように加えたものを 10% BSA 供試ウイルス液とした。

(3) ウイルスの感作

被験検体 1.8 mL に 0% BSA 供試ウイルス液又は 10% BSA 供試ウイルス液を 0.2 mL 加え、室温で 1 分及び 15 分間感作させたものを試験試料とした。被験検体の代わりに滅菌 MilliQ 水で同様に処理したものを対照試料とした。

(4) ウイルス含有量の測定

感作終了後、直ちに試験試料及び対照試料をウイルス増殖用培養液 [付記 4] で 10 倍階段希釈した。24 ウェルプレートに単層形成した MDCK 細胞の表面をウイルス増殖用培養液で 1 回洗浄し、ウイルス増殖用培養液を 0.5 mL 入れた後、各希釈段階の試料を 1 ウェル当たり 0.1 mL、1 希釈当たり 4 ウェルに接種し、37℃、5% 炭酸ガス孵卵器で 7 日間培養した。培養最終日に各ウェルから培養上清を 0.05 mL 採取し、96 ウェル U 底プレートに移した。これに 0.5% モルモット赤血球浮遊液 [付記 9] を 0.05 mL 加え、室温で 2 時間静置し、赤血球凝集 (HA) の有無を観察した。HA が認められた培養液をウイルス陽性とみなし、ベーレンス・ケルバー法にてウイルス含有量を算出した。

(5) Log Reduction Value の算出

各感作時間における試験試料及び対照試料のウイルス含有量から、次式により LRV (Log Reduction Value) を算出した。

$$LRV = \log_{10}A - \log_{10}B$$

A : 対照試料のウイルス含有量

B : 試験試料のウイルス含有量

(6) 効果の判定

試験品における LRV が 2 以上、すなわち、スパイクしたウイルスの 99% 以上が不活化された場合、試験品はインフルエンザウイルスに対し、不活化効果を有すると判断した。

(7) 試験の繰り返し

試験は繰り返し 3 回実施した。

#### 4. 試験成績

1) インフルエンザウイルス (IFV) 不活化試験

ウイルス含有量の測定結果を表 1 に示す。

0% BSA 供試ウイルス液の試験において、滅菌 MilliQ 水と混合し 1 分及び 15 分間静置した対照試料のウイルス含有量の平均値はそれぞれ  $10^{6.42}$  及び  $10^{6.58}$  TCID<sub>50</sub>/mL、被験検体と混合し 1 分及び 15 分間感作した試験試料のウイ

ルス含有量の平均値はそれぞれ $\leq 10^{2.25}$  及び $\leq 10^{1.50}$  TCID<sub>50</sub>/mLであった。

10%BSA 供試ウイルス液の試験において、滅菌 MilliQ 水と混合し 1 分及び 15 分間静置した対照試料のウイルス含有量の平均値はそれぞれ  $10^{6.17}$  及び  $10^{6.08}$  TCID<sub>50</sub>/mL、被験検体と混合し 1 分及び 15 分間感作した試験試料のウイルス含有量の平均値はそれぞれ $\leq 10^{2.25}$  及び $\leq 10^{1.50}$  TCID<sub>50</sub>/mLであった。

また、0%BSA 供試ウイルス液の試験における 1 分及び 15 分間、10%BSA 供試ウイルス液の試験における 1 分及び 15 分間の LRV はそれぞれ $\geq 4.1$ 、 $\geq 5.0$ 、 $\geq 3.9$  及び $\geq 4.5$  となり、全ての試験条件において LRV は 2 以上であった。

## 2) 豚インフルエンザウイルス (SIV) 不活化試験

ウイルス含有量の測定結果を表 2 に示す。

0%BSA 供試ウイルス液の試験において、滅菌 MilliQ 水と混合し 1 分及び 15 分間静置した対照試料のウイルス含有量の平均値はそれぞれ  $10^{5.50}$  及び  $10^{5.83}$  TCID<sub>50</sub>/mL、被験検体と混合し 1 分及び 15 分間感作した試験試料のウイルス含有量の平均値はそれぞれ $\leq 10^{1.67}$  及び $\leq 10^{1.50}$  TCID<sub>50</sub>/mLであった。

10%BSA 供試ウイルス液の試験において、滅菌 MilliQ 水と混合し 1 分及び 15 分間静置した対照試料のウイルス含有量の平均値はそれぞれ  $10^{5.58}$  及び  $10^{5.67}$  TCID<sub>50</sub>/mL、被験検体と混合し 1 分及び 15 分間感作した試験試料のウイルス含有量の平均値はそれぞれ $\leq 10^{1.83}$  及び $\leq 10^{1.50}$  TCID<sub>50</sub>/mLであった。

また、0%BSA 供試ウイルス液の試験における 1 分及び 15 分間、10%BSA 供試ウイルス液の試験における 1 分及び 15 分間の LRV はそれぞれ $\geq 3.8$ 、 $\geq 4.3$ 、 $\geq 3.7$  及び $\geq 4.1$  となり、全ての試験条件において LRV は 2 以上であった。

## 5. 考察及び結論

滅菌 MilliQ 水と IFV 又は SIV を混合し、室温で 1 分及び 15 分間静置した時のウイルス含有量は 1 分と 15 分で大きな差はなく、時間経過によるウイルスの減少は認められなかった。また、試験品であるテラヘルツ水と IFV 又は SIV を室温で 1 分及び 15 分間感作させた時のウイルス含有量から LRV を算出すると 2 以上となり、実施した全ての試験条件において不活化効果が認められた。また、供試ウイルス液に含まれる有機物 (BSA) による不活化効果への影響は認められなかった。

以上から、本試験系において、試験品であるテラヘルツ水にインフルエンザウイルス又は豚インフルエンザウイルスを感作させた場合、1 分間以上の感作で不活化効果が認められ、供試ウイルス液に有機物 (10%のタンパク質) が含まれていても不活化効果への影響が無いことが確認された。

[付記 1] 細胞増殖用培養液

イーグル MEM (TPB 含有) [付記 5]	950 mL
牛胎子血清	30 mL
7%炭酸水素ナトリウム液	20 mL

[付記 2] 希釈液

イーグル MEM (TPB 不含) [付記 6]	980 mL
7%炭酸水素ナトリウム液	20 mL

[付記 3] 牛血清アルブミン液

牛血清アルブミンを PBS (-) [付記 10] で 10%に調製したもの

[付記 4] ウイルス増殖用培養液

イーグル MEM (TPB 不含)	923.8 mL
35%ウシ血清アルブミン液	5.7 mL
7%炭酸水素ナトリウム液	60 mL
10%グルコース	10 mL
結晶トリプシン (5 mg/mL)	0.5 mL

[付記 5] イーグル MEM (TPB 含有)

イーグル MEM 「ニッスイ」 ① (カナマイシン含有、日水製薬株式会社)	9.4 g
トリプトースホスフェイトブロス	3.0 g
MilliQ 水	1 L

溶解後、121°C、15 分間高圧蒸気滅菌し、室温まで冷ました後、以下の試薬を加える。

L-グルタミン液 [付記 7]	10 mL
ペニシリン・ストレプトマイシン液 [付記 8]	10 mL

[付記 6] イーグル MEM (TPB 不含)

イーグル MEM 「ニッスイ」 ① (カナマイシン含有、日水製薬株式会社)	9.4 g
MilliQ 水	1 L

溶解後、121°C、15 分間高圧蒸気滅菌し、室温まで冷ました後、以下の試薬を加える。

L-グルタミン液	15 mL
ペニシリン・ストレプトマイシン液	10 mL

[付記 7] L-グルタミン液

L-グルタミンを 200 mM 含む液体

[付記 8] ペニシリン・ストレプトマイシン液

1 mL 中に、ペニシリン 10,000 IU、ストレプトマイシン 10,000  $\mu$ g 力価を含む液体

[付記 9] 0.5% モルモット赤血球浮遊液

凝固阻止処理をしたモルモット赤血球を PBS (-) で 3 回洗浄し、PBS (-) で 0.5% に調製したもの

[付記 10] PBS (-)

PBS (-) 粉末「ニッスイ」(日水製薬株式会社) 9.6 g を 1 L の MilliQ 水に溶解し、121°C で 15 分間、高圧蒸気滅菌したもの

表1 インフルエンザウイルスに対する不活化効果試験成績

BSA濃度 (%)	試料の区分	n	感作時間とウイルス含有量	
			1分	15分
0	対照試料	1	6.00	7.00
		2	6.50	6.25
		3	6.75	6.50
		平均	6.42	6.58
	試験試料	1	≦ 1.75	≦ 1.50
		2	≦ 2.25	≦ 1.50
		3	2.75	≦ 1.50
		平均	≦ 2.25	≦ 1.50
	※1 LRV		≧ 4.1	≧ 5.0
	10	対照試料	1	6.25
2			6.25	5.75
3			6.00	6.25
平均			6.17	6.08
試験試料		1	≦ 2.50	≦ 1.50
		2	≦ 2.00	≦ 1.50
		3	≦ 2.25	≦ 1.50
		平均	≦ 2.25	≦ 1.50
LRV		≧ 3.9	≧ 4.5	

ウイルス含有量は試料 1 mL中の値 (単位: TCID<sub>50</sub>) を常用対数変換して表示した。

本試験系における検出限界: ≦ 1.50

※1:  $LRV = \log_{10} (\text{対照試料のウイルス含有量}) - \log_{10} (\text{試験試料のウイルス含有量})$



表2 豚インフルエンザウイルスに対する不活化効果試験成績

BSA濃度(%)	試料の区分	n	感作時間とウイルス含有量		
			1分	15分	
0	対照試料	1	5.25	5.50	
		2	5.50	6.25	
		3	5.75	5.75	
		平均	5.50	5.83	
	試験試料	1	≦ 1.50	≦ 1.50	
		2	≦ 2.00	≦ 1.50	
		3	≦ 1.50	≦ 1.50	
		平均	≦ 1.67	≦ 1.50	
	※1LRV			≧ 3.8	≧ 4.3
	10	対照試料	1	5.50	5.50
2			5.75	5.75	
3			5.50	5.75	
平均			5.58	5.67	
試験試料		1	≦ 2.00	≦ 1.50	
		2	≦ 1.75	≦ 1.50	
		3	≦ 1.75	≦ 1.50	
		平均	≦ 1.83	≦ 1.50	
LRV			≧ 3.7	≧ 4.1	

ウイルス含有量は試料 1 mL中の値 (単位: TCID<sub>50</sub>) を常用対数変換して表示した。

本試験系における検出限界: ≦1.50

※1: LRV=log<sub>10</sub> (対照試料のウイルス含有量) -log<sub>10</sub> (試験試料のウイルス含有量)