

# 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：15-069)

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：15-069)

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

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 萬田 富治  
試験責任者：事業部 中島 隆二

試験経過

試験申込み：2015年8月31日  
試験品受領：2015年11月2日  
試験報告書提出：2016年4月27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 (中島) 2016年4月27日

## 試験の目的

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を調べることを目的として実施した。

## 試験材料

### 1) 試験品

名 称：テラヘルツ水  
仕 様：CA-C-01 (pH12、アルカリ性テラヘルツ水)  
ロ ッ ト：CA-C717  
入手年月日：2015年11月2日  
入 手 量：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 発育鶏卵および犬腎臓上皮細胞由来株化細胞 (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 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

犬腎臓上皮細胞由来株化細胞 (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、試験実施施設にて継代培養しているもの。

## 試験方法

### 1) 検体の調製

試験委託者から受領した試験品の原液を検体とした。

### 2) MDCK 細胞の作製

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] で 5 倍希釈し、細胞浮遊液を作製した。この細胞浮遊液を 24 ウェルプレート各ウェルに 0.5 mL 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。

### 3) 予備試験

MDCK 細胞に対する検体の細胞毒性を確認する目的で実施した。

希釈液 [付記 2] と検体を 1 : 9 の割合に混合したものを希釈液で 10 倍階段希釈した。MDCK 細胞表面をウイルス増殖用培養液 [付記 3] で 1 回洗浄し、ウイルス増殖用培養液を 0.5 mL 入れた状態の 24 ウェルプレートに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°C、5% 炭酸ガス孵卵器で 7 日間培養した。

### 4) 本試験

#### (1) 供試ウイルス液の調製

IFV (A/Aichi/2/68 株) は希釈液で 10 倍希釈、SIV (A/swine/和田山/5/69 株) は原液を供試ウイルス液とした。

#### (2) ウイルスの感作

供試ウイルス液 0.1 mL と検体 0.9 mL を混合 (以下「試験試料」という。) し、室温で 1 分及び 15 分静置して感作させた。対照として、供試ウイルス液 0.1 mL と滅菌精製水 0.9 mL を混合 (以下「対照試料」という。) したものを作製した。

#### (3) 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希釈液で 10 倍階段希釈した。MDCK 細胞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 24 ウェルプレートに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°C、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、0.5% モルモット赤血球浮遊液 [付記 8] 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。

#### (4) Log Reduction Value の算出

各感作時間における試験試料およ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

#### (5) 効果の判定

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、当該ウイルスに対して有効と判断した。

#### (6) 試験の繰り返し

試験の繰り返し回数は予備試験が 1 回、本試験は 3 回とした。

## 試験成績

### 1) 予備試験

MDCK 細胞に対する検体の細胞毒性を確認する目的で希釈液と検体を 1:9 の割合に混合したものを希釈液で 10 倍階段希釈し、MDCK 細胞に接種した。その結果、混合したものを希釈液で 10 倍希釈したものにおいても細胞毒性が確認されなかったため、試験試料を希釈液で 10 倍希釈したものから本試験に用いた。

### 2) 本試験

IFV の試験成績を表 1、SIV の試験成績を表 2 に示す。

テラヘルツ水と供試ウイルス液を 9:1 で混合し、室温で 1 分及び 15 分感作させた後のウイルス含有量を測定し、LRV を算出した。その結果、IFV では 1 分で 3.2、15 分で  $\geq 4.4$ 、また、SIV では 1 分で 2.3、15 分で  $\geq 4.3$  であった。

## 結論

今回の試験において、テラヘルツ水と IFV 又は SIV を 9:1 の割合に混合し、室温で感作させたとき、どちらのインフルエンザウイルスにおいても、感作後 1 分で LRV が 2 以上になることが確認された。

以上から、テラヘルツ水 (CA-C-01、pH12、アルカリ性テラヘルツ水) は、インフルエンザウイルス (A/Aichi/2/68 株) 及び豚インフルエンザウイルス (A/swine/和田山/5/69 株) を短時間で不活化できることが示された。

[付記 1] 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

イーグル MEM (TPB 含有) [付記 4]	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

1,000mL 中

イーグル MEM (TPB 不含) [付記 5]	980 mL
7%炭酸水素ナトリウム液	20 mL

[付記 3] ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

イーグル MEM (TPB 不含)	929.5 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 4] イーグル MEM (TPB 含有)

イーグル MEM 「ニッサイ」 ①	9.4 g
(カナマイシン含有, 日水製薬株式会社)	
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℃, 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 6]	10 mL
ペニシリン・ストレプトマイシン液 [付記 7]	10 mL

[付記 5] イーグル MEM (TPB 不含)

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

溶解後、121℃, 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 6] L-グルタミン液

L-グルタミンを 200 mM 含む液体

[付記 7] 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 8] 0.5%モルモット赤血球浮遊液

アルセバー液 [付記 9] で凝固阻止処理をしたモルモット血液から赤血球を分離し、PBS (-) [付記 9] で 3 回洗浄し、PBS (-) で 0.5% に調製したもの。

[付記 9] アルセバー液

グルコース	2.05 g
塩化ナトリウム	0.42 g
クエン酸ナトリウム	0.80 g
MilliQ 水	100 ml

溶解後、0.22  $\mu$ L のフィルターで濾過滅菌したもの。

[付記 9] 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

試料の区分	試験の 繰り返し	感作時間とウイルス含有量		
		—	1分	15分
対照試料	1	6.00	—	—
	2	6.00	—	—
	3	5.75	—	—
	平均	5.92	—	—
試験試料	1	—	3.00	≤ 1.50
	2	—	2.75	≤ 1.50
	3	—	2.50	≤ 1.50
	平均	—	2.75	≤ 1.50
	※1LRV	—	3.2	≥ 4.4

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値（≤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）

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

試料の区分	試験の 繰り返し	感作時間とウイルス含有量		
		—	1分	15分
対照試料	1	6.00	—	—
	2	5.50	—	—
	3	6.25	—	—
	平均	5.92	—	—
試験試料	1	—	3.25	≤ 1.75
	2	—	3.50	≤ 1.50
	3	—	4.00	≤ 1.50
	平均	—	3.58	≤ 1.58
	※1LRV	—	2.3	≥ 4.3

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値（≤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）