

ECO-A 株式会社 様

報 告 書

(12-3-B)

平成24年4月26日

試験の名称：貝殻焼成カルシウム溶液のネコカリシウイルスに対する抗ウイルス作用

特定非営利活動法人 バイオメディカルサイエンス研究会
〒169-0075 東京都新宿区高田馬場 1-28-3 工新ビル 801号
TEL : 03-3200-6752 FAX : 03-3200-5206



試験の名称：貝殻焼成カルシウム溶液のネコカリシウイルスに対する抗ウイルス作用

依頼者：ECO-A 株式会社

受託者：バイオメディカルサイエンス研究会

試験主任者：常任理事 吉澤重克

試験実施施設：千葉県習志野市茜浜 1-12-3 バムサ環文研研究棟

資料の保管場所：同上

報告書作成日：平成 24 年 4 月 26 日

報告書作成者：バイオメディカルサイエンス研究会
常任理事 吉澤重克

貝殻焼成カルシウム溶液のネコカリシウイルスに対する抗ウイルス作用

目的：貝殻焼成カルシウム溶液のネコカリシウイルスに対する抗ウイルス作用を示すか調べる。

材料：

- 1 被験溶液：ECO-A 提供品の貝殻焼成カルシウム溶液
- 2 使用細胞：ネコ腎臓由来 CrFK 細胞
- 3 使用培地：イーグル MEM
- 4 使用ウイルス：ネコカリシウイルス (1X24) $10^7/0.1\text{mL}$

方法：

- ① 被験溶液 0.5mL にネコカリシウイルス 0.5mL を加え、また対照として被験溶液の代わりに蒸留水 0.5mL とウイルス 1 mL を加える。サンプリングは以下の表による

検体	作用時間
対照	10 分
被験溶液	0 分
	1 分
	5 分
	10 分

- ② 直後の 0 分にそれぞれ直ちに 10 倍希釈し、それを 10 倍段階希釈して、その 0.1mL を細胞のプレートに接種する。なお、対照は 0 分も 10 分後も変化がないというデータのため 10 分のみ行う。
- ③ 接種した後 34℃1 時間細胞に吸着させた後、寒天培地を加える。
- ④ 34℃3 日間培養し、生じたブラックを数え、ウイルスの感染価とする。

ウイルス感染価測定：ブラック法による

簡単に記すと、CrFK 細胞を 6 穴のプラスチックプレートに播き、3 日後シートになった時点で使用する。各サンプルの希釈 0.1mL を希釈当たり 2 穴に接種し、34℃1 時間吸着後寒天培地 3mL を加え、34℃3 日間培養する。その後生じたブラックの数を数えて感染価とする。

成績： 成績を下表に示す。対照として、被験溶液の代わりに蒸留水を使用した時、ウイルス感染価は 10 分放置して $10^{6.2}\text{PFU}/0.1\text{mL}$ であった。対照ウイルスは 10 分間ではウイルスの不活化は起こらないことがわかっているので 0 分のウイルス感染価も同じと考えてよい。これに対して被験溶液では、0 分すなわち溶液とウイルスを混合した直後で $10^{2.6}\text{PFU}/0.1\text{mL}$ 、1 分後、5 分後及び 10 分後ではそれぞれ $10^{1.9}\text{PFU}/0.1\text{mL}$ 、 $10^{1.5}\text{PFU}/0.1\text{mL}$ 、 $10^{1.4}\text{PFU}/0.1\text{mL}$ に低下した。

検体	作用時間	感染価 Log(PFU/0.1mL)
対照	10 分	6.2
被験溶液	0 分	2.6
	1 分	1.9
	5 分	1.5
	10 分	1.4

考察：上記の成績からネコカリシウイルスは貝殻焼成カルシウム溶液で、ある程度減弱されることがわかった。0 分の混合直後で反応時間がほとんどなかったのにもかかわらずウイルス感染価が約数千分の一の減少がみられるのは、高い PH のためすぐにウイルスが変性した可能性がある。

また通常の薬品であるとウイルスは時間とともに減少していく、つまりウイルスの減少度は時間の関数になるが、本被験溶液では 1 分の反応時間でウイルスは 1 万分の 1 に減少しているが、10 分後でもウイルスは検出でき、時間に比例して減少していないことが分かる。つまり、本溶液はネコカリシウイルスを短時間で大きく減少させるが、あるところまで行くとウイルスは少量ながら残存するといえる。

このような態度は以前焼成貝殻（溶液ではなく白濁した液）で行った試験と同様な結果で、この物質がウイルスを不活化（俗に言うと殺す）したのか、またはカルシウムに吸着された（もし微粒子の Ca があるとすると）のかは不明である。

結論としては、本被験溶液はネコカリシウイルスとの反応で、1 分以上反応させるとウイルス感染価の回収大幅に減少し、結果として著しい効果が認められた。しかし本被験品が真にウイルスを不活化しているかは本試験だけでは明確には言えない。

以上