

作成日 2021年7月30日

## 受託試験報告書

### 新型コロナウイルス不活化試験

委託者 有限会社やまがたスリートップ  
代表取締役 佐藤 誠 様

受託者 国立大学法人宮崎大学  
研究代表者 吉田彩子（産業動物防疫リサーチセンター・教授）  
研究分担者 齊藤暁（農学部獣医学科・准教授）

## 試験内容

### 材料と方法

検体①（ホッキ貝殻焼成粉末 0.1%濃度液）ならびに検体②（ホッキ貝殻焼成 10 倍希釈液）の SARS-CoV-2 に対する不活化効果について試験した。

すなわち、SARS-CoV-2 を 検体①（ホッキ貝殻焼成粉末 0.1%濃度液）に 2 分間もしくは 5 分間、もしくは検体②（ホッキ貝殻焼成 10 倍希釈液）に 2 分間、5 分間 もしくは 10 分間曝露し、プラークアッセイによりウイルス力価を算出し、ホッキ貝殻焼成粉末液によるウイルス不活化効果を評価した。

細胞：VeroE6/TMPRSS2 細胞(24-well プレート)

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手

ウイルス：イギリス株：hCoV-19/Japan/QHN002/2020 (N501Y 変異型)、 $1 \times 10^6$  PFU/mL

南アフリカ株：hCoV-19/Japan/TY8-612/2021 (N501Y, E484K 変異型)、

$1.1 \times 10^7$  PFU/mL

いずれも国立感染症研究所より分与され、VeroE6/TMPRSS2 細胞で増幅した。

\*PFU：Plaque Forming Unit (プラーク形成単位)

希釈用培地：10% 牛胎仔血清添加 DMEM 培地(以下、D-10 培地)

重層培地：3% 牛胎仔血清および 1.5%カルボキシメチルセルロース添加 MEM 培地

細胞固定液：10% ホルマリン液

細胞染色液：2% クリスタルバイオレット溶液

検体①：ホッキ貝殻焼成粉末 0.1%濃度液（貝殻焼成カルシウム、食品添加物適合品）

検体②：ホッキ貝殻焼成 10 倍希釈液（貝殻焼成カルシウム、食品添加物適合品）

滅菌蒸留水：陰性対照

### 試験手順

1. 100  $\mu$ L のウイルス液と 900  $\mu$ L の各試料もしくは滅菌蒸留水を 1.5 mL チューブ内で混合し、検体①については室温で 2 分間もしくは 5 分間、検体②については室温で 2 分間、5 分間もしくは 10 分間静置した。
2. 静置後、D-10 培地を添加し 10 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍希釈することで作用を停止させた。
3. 24-well プレート上の VeroE6/TMPRSS2 細胞に各希釈液を各穴 0.25 mL ずつ接種した。
4. 37°C、2 時間の吸着処理後、重層培地を各穴 0.5 mL ずつ添加した。
5. 37°C・5% CO<sub>2</sub> の条件下で 3 日間培養した。

6. 培養後、10% ホルマリン液で細胞を固定し、2% クリスタルバイオレット溶液で細胞の染色を行った。
7. プレートの乾燥後、ウイルスの感染によって形成されたプラークの計数を行い、ウイルス力価 (PFU/mL)を算出した。

## 試験結果

ウイルス不活化試験は triplicate (n=3)で実施し、その結果を表1ならびに表2に示した。検体①についてはいずれの処理条件においても対照群（滅菌蒸留水）と比較して減少率 99.91 % 以上のウイルス不活化効果が確認された。検体②についてはイギリス株に対しては 92.44 %から 99.67 %の不活化効果を示した一方で、南アフリカ株に対しては有意な効果を示さなかった。

表1 ホッキ貝殻焼成粉末液水による SARS-CoV-2 イギリス株の不活化試験結果

<ウイルス力価ならびに減少率>

	滅菌蒸留水				検体①		検体②		
	0分	2分間	5分間	10分間	2分間	5分間	2分間	5分間	10分間
#1	1.3E+06	6.8E+05	5.6E+05	1.2E+05	<4.0E+01	<4.0E+01	4.0E+04	2.4E+04	1.2E+03
#2	3.2E+05	6.0E+05	5.6E+05	3.2E+05	<4.0E+01	<4.0E+01	4.4E+04	1.2E+04	1.2E+03
#3	5.6E+05	3.6E+05	2.4E+05	4.0E+05	<4.0E+01	<4.0E+01	4.0E+04	1.2E+04	4.0E+02
平均値	7.2E+05	5.5E+05	4.5E+05	2.8E+05	4.0E+01	4.0E+01	4.1E+04	1.6E+04	9.3E+02
減少率	0%	0%	0%	0%	99.99%	99.99%	92.44%	96.47%	99.67%

<4.0E+01：検出限界以下の意

ウイルス力価は PFU/mL で表される。また、本試験の検出限界は 4.0E+01 PFU/mL である。

表2 ホッキ貝殻焼成粉末液水による SARS-CoV-2 南アフリカ株の不活化試験結果

<ウイルス力価ならびに減少率>

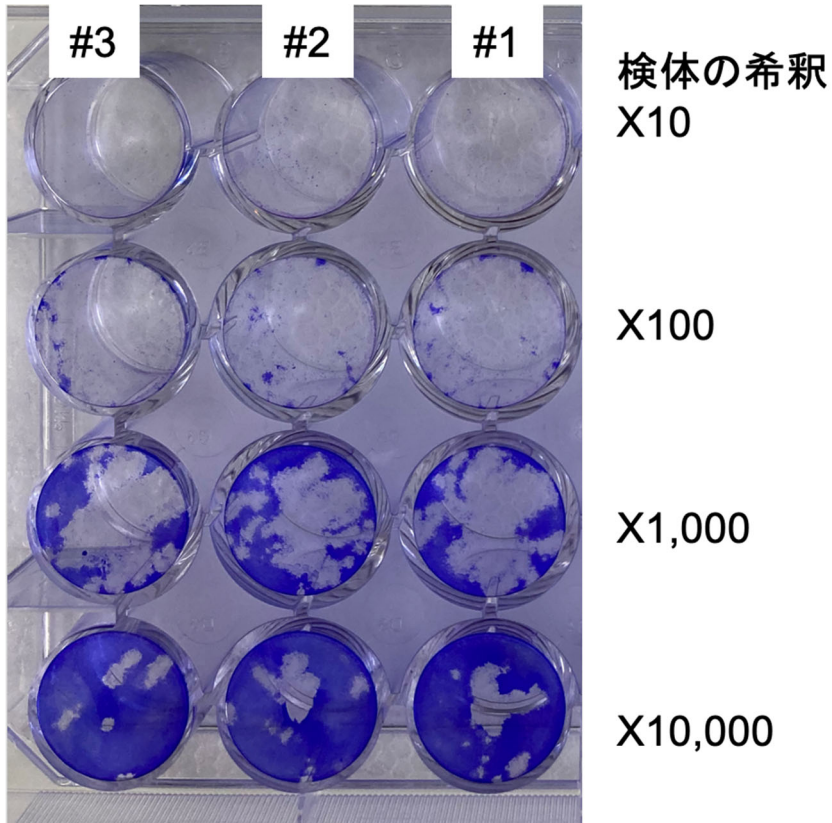
	滅菌蒸留水				検体①		検体②		
	0分	2分間	5分間	10分間	2分間	5分間	2分間	5分間	10分間
#1	8.0E+04	1.2E+05	8.0E+04	1.2E+05	1.2E+02	<4.0E+01	2.0E+05	1.2E+05	1.6E+05
#2	1.6E+05	8.0E+04	4.0E+04	3.6E+05	<4.0E+01	<4.0E+01	2.0E+05	7.6E+04	8.0E+04
#3	1.6E+05	8.0E+04	1.2E+05	1.6E+05	8.0E+01	4.0E+01	4.0E+04	2.0E+05	2.0E+05
平均値	1.3E+05	9.3E+04	8.0E+04	2.1E+05	8.0E+01	4.0E+01	1.5E+05	1.3E+05	1.5E+05
減少率	0%	0%	0%	0%	99.91%	99.95%	-57.14%	-65.00%	31.25%

<4.0E+01：検出限界以下の意

ウイルス力価は PFU/mL で表される。また、本試験の検出限界は 4.0E+01 PFU/mL である。

## プレートの一例

イギリス株、滅菌蒸留水、2分間



イギリス株、検体①、2分間

