

研究成果報告書

平成 22 年 7 月 12 日

セパレーターシステム工業株式会社
代表取締役
松澤 皓三郎 様

学校法人京都産業大学
理事長

廣岡 正久



受託研究題目 『天然素材から生成された除菌・消臭液の鳥インフルエンザウイルスに対する有効性』

試験期間 平成 21 年 11 月 1 日 ~ 平成 22 年 10 月 31 日

上記の受託研究について、受託研究契約書第 10 条の規定により、下記の書類を添えて報告いたします。

記

- 1. 受託研究成果報告書 (別添) 1 部

以上

BẢN BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Ngày 12 tháng 7 năm 2010

Separator System Kogyo Co., Ltd
Tổng giám đốc Matsuzawa Kozaburo

Trường đại học Kyoto Sangyo
Hiệu trưởng Hirooka Masahisa

Tiêu đề nghiên cứu nhận tài trợ: “Hiệu quả của dung dịch khử trùng và khử mùi được tạo ra từ các vật liệu tự nhiên chống lại vi-rút cúm gia cầm”

Thời gian thử nghiệm: từ ngày 01 tháng 11 năm 2009 đến ngày 31 tháng 12 năm 2010

Về nghiên cứu nhận tài trợ nói trên, theo quy định tại Điều 10 của Hợp đồng nghiên cứu nhận tài trợ, chúng tôi xin báo cáo tài liệu đính kèm dưới đây

- 1. Bản báo cáo kết quả nghiên cứu nhận tài trợ (tài liệu đính kèm riêng): 01 bản

SONG NGŨ

平成 22 年 7 月 12 日

京都産業大学
鳥インフルエンザ研究センター

高桑 弘樹
常國 良太
藪田 淑予
井上 瑞枝
大槻 公一

天然素材から生成させた除菌・消臭液のインフルエンザに対する有効性

【目的】

「バイオイオナース P」のインフルエンザウイルスに対する効果の検証を行う。

【研究期間】

平成 21 年 11 月 1 日 - 平成 22 年 10 月 31 日

Ngày 12 tháng 7 năm 2010

Trường đại học Kyoto Sangyo
Trung tâm nghiên cứu cúm gia cầm

Takakuwa Hiroki
Tsunekuni Ryota
Yabuta Toshiyo
Inoue Mizue
Otsuki Koichi

**Hiệu quả của dung dịch khử trùng và khử mùi được tạo ra từ các vật liệu tự nhiên
chống lại vi-rút cúm gia cầm**

[Mục đích]

Tiến hành kiểm chứng hiệu quả của KAMISAMA chống lại vi rút cúm.

[Thời gian nghiên cứu]

Từ ngày 01 tháng 11 năm 2009 đến ngày 31 tháng 10 năm 2010

【実験材料】

- 1、被検試料: バイオオナース P; セパレーターシステム工業株式会社より提供を受けた。
- 2、ウイルス: 鳥インフルエンザウイルス A/whistling swan/Shimane/499/83 (H5N3) 株
1983年大槻らが島根県に飛来したコハクチョウの糞から分離した弱毒の H5 亜型ウイルスを用いた。本ウイルス株はヒナを継代することにより強毒化させることに成功している。本試験に用いたウイルスの力価は、 $10^{9.5}$ EID₅₀/0.2ml である。
- 3、使用鶏卵: SPF10 日齢発育鶏卵
栃木県青木種鶏場から SPF 有精卵を購入し、本研究センターで孵卵して実験に供した。

【方法】

バイオオナース P を滅菌イオン交換水にて 8、4、2 および 1 mg/ml の濃度に溶解し、被検溶液とした。PBS にて $10^{7.5}$ EID₅₀/0.2ml に調整したウイルス液 400 μ l と各濃度の被検溶液 400 μ l を混合し、室温(25°C)で静置した。また、陰性対照として被検溶液の代わりに滅菌イオン交換水を用い、ウイルス液と同様に混合した。10 分または 30 分後、混合液を抗生物質入り PBS で 10 倍階段希釈し、10 日齢発育鶏卵漿尿膜腔内に 0.2 ml 宛接種した。これらの発育鶏卵をさらに 37°C で 2 日間孵化を続行した後 4°C に一夜置いた。漿尿液を採取し、HA 試験により漿尿液中のウイルスの増殖を判定した。ウイルス力価は Reed and Muench の方法により算出した。

【結果】

試験結果を表および図に示す。陰性対照としてウイルス液と滅菌イオン交換水を混合し、10 分間および 30 分間反応させた時の残存ウイルス力価は、それぞれ $10^{7.25}$ EID₅₀/0.2 ml および $10^{6.75}$ EID₅₀/0.2 ml であった。

被検溶液とウイルス液を 10 分間反応させた場合、反応液中の被検濃度が 2mg/ml 以上の時、残存ウイルス力価は $10^{0.83}$ EID₅₀/0.2 ml にまで大幅に減少していた。陰性対照のウイルス力価 ($10^{7.25}$ EID₅₀/0.2 ml) に比べると、1,000,000 分の 1 以下であった。また、被検体濃度が 1 mg/ml の場合も、 $10^{2.33}$ EID₅₀/0.2 ml にまで減少していたが、0.5 mg/ml 濃度では、 $10^{3.17}$ EID₅₀/0.2 ml のウイルスが生残していた。

被検溶液を 30 分間ウイルスに接触させた場合、さらに残存ウイルス力価は減少した。

[Vật liệu thí nghiệm]

1. Mẫu thử: KAMISAMA đã nhận sự cung cấp mẫu từ Separator Sangyo Co., Ltd
2. Vi rút: vi rút cúm gia cầm A/chúng whistling swan/Shimane/499/83 (H5N3)
Năm 1983, Otsuki và cộng sự đã sử dụng một loại virus phân nhóm H5 suy yếu được phân lập từ phân thiên nga từ tỉnh Shimane. Chúng virus này đã bị suy giảm thành công bởi di truyền sang gà con. Hiệu giá của virus được sử dụng trong nghiên cứu này là $10^{9.5}$ EID₅₀/0.2mL.
3. Trứng gà sử dụng: trứng gà 10 ngày tuổi SPF
Mua trứng tinh dịch từ khu chăn nuôi gà Aoki ở tỉnh Tochigi, ấp tại trung tâm nghiên cứu và đã sử dụng cho các thí nghiệm.

[Phương pháp]

KAMISAMA được hòa tan trong nước trao đổi ion khử trùng đến nồng độ 8, 4, 2 và 1 mg/ml để chuẩn bị dung dịch thử. 400 μ l dung dịch virus được điều chỉnh thành $10^{7.5}$ EID₅₀/0.2mL với PBS và 400 μ l dung dịch thử nghiệm của mỗi nồng độ được trộn lẫn và đặt đứng ở nhiệt độ phòng (25°C). Hơn nữa, nước trao đổi ion khử trùng đã được sử dụng thay cho dung dịch thử như là một đối chiếu âm tính, và việc trộn được thực hiện theo cách tương tự như dung dịch virus. Sau 10 hoặc 30 phút, hỗn hợp đã được pha loãng 10 lần với PBS có chứa kháng sinh và 0,2 ml được tiêm vào khoang chorioallantoic của gà 10 ngày tuổi. Những quả trứng phát triển phôi này tiếp tục được ấp ở 37°C trong 2 ngày và sau đó được đặt qua đêm ở 4°C. Dịch chorioallantoic được thu thập và sự phát triển của virus trong dịch chorioallantoic được xác định bằng xét nghiệm HA. Hiệu giá vi rút được tính theo phương pháp của Reed và Muench.

[Kết quả]

Các kết quả kiểm tra được hiển thị trong bảng số liệu và biểu đồ. Dung dịch virus và nước trao đổi ion khử trùng như là một đối chiếu âm tính được trộn lẫn, hiệu giá virus còn lại khi đã phản ứng trong 10 phút và 30 phút lần lượt là $10^{7.25}$ EID₅₀/0.2mL và $10^{6.75}$ EID₅₀/0.2mL.

Khi dung dịch thử và dung dịch vi rút được phản ứng trong 10 phút, khi nồng độ thử trong dung dịch phản ứng là trên 2mg/ml, hiệu giá của vi rút còn lại đã giảm đáng kể xuống còn $10^{0.83}$ EID₅₀/0.2mL. So với hiệu giá virus ($10^{7.25}$ EID₅₀/0.2mL của đối chiếu âm tính, nó thấp hơn 1 / 1.000.000. Ngoài ra, khi nồng độ chất phân tích là 1mg/ml, nó

表 バイオイオナース P の抗鳥インフルエンザウイルス活性

時間	残存ウイルス力価(log ₁₀ EID ₅₀ /0.2 ml)				
	バイオイオナース P の最終濃度(mg/ml)				
	4	2	1	0.5	0(対照)
10分	0.83	0.58	2.83	5.17	7.25
30分	-0.08	0.5	1.25	4.58	6.75

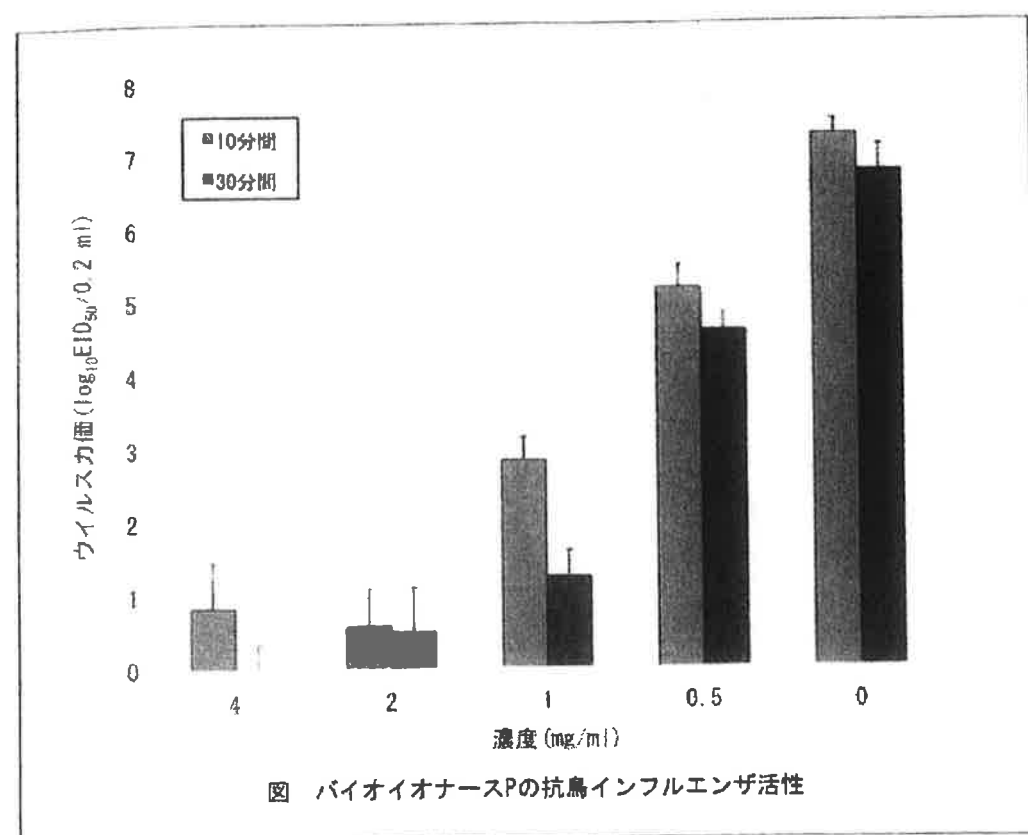


図 バイオイオナース P の抗鳥インフルエンザ活性

【結論】

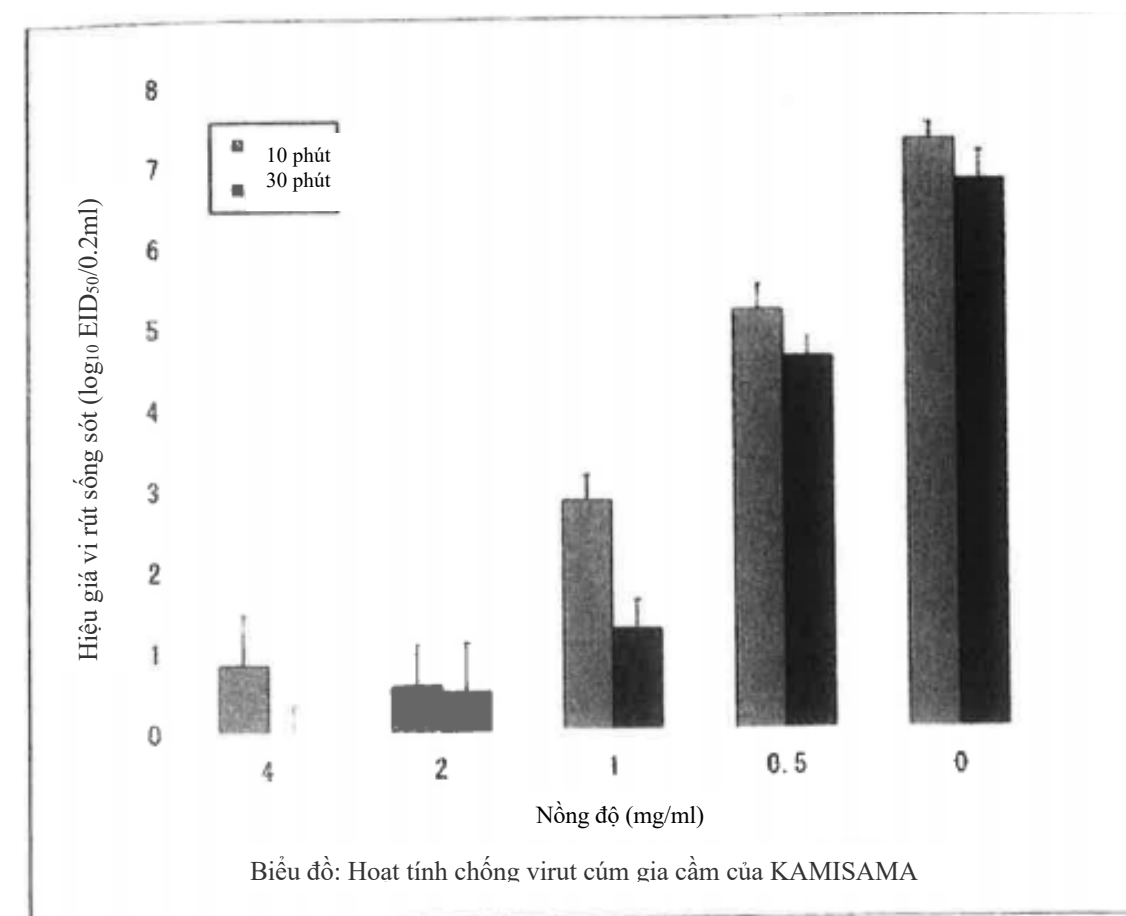
バイオイオナース P は、H5N3 亜型鳥インフルエンザウイルスに対して、1 mg/ml 以上の濃度で 10 分間接触させることによって明らかにウイルス不活化効果を示す。

giảm xuống còn 10^{2.83} EID₅₀/0.2mL, nhưng ở mức 0,5mg/ml thì virus của 10^{5.17} EID₅₀/0.2mL đã sống sót.

Khi dung dịch thử nghiệm được tiếp xúc với vi-rút trong 30 phút, hiệu giá của vi rút còn lại giảm thêm.

Bảng số liệu: Hoạt tính chống virus cúm gia cầm của KAMISAMA

Thời gian	Hiệu giá vi rút sống sót (log ₁₀ EID ₅₀ /0.2ml)				
	Nồng độ cuối cùng của KAMISAMA (mg/ml)				
	4	2	1	0.5	0 (đối chiếu)
10 phút	0.83	0.58	2.83	5.17	7.25
30 phút	-0.08	0.5	1.25	4.58	6.75



Biểu đồ: Hoạt tính chống virus cúm gia cầm của KAMISAMA

KAMISAMA thể hiện rõ ràng tác dụng làm bất hoạt virus khi tiếp xúc với virus cúm gia cầm H5N1 ở nồng độ 1mg/ml trở lên trong 10 phút.