

株式会社大平ホテル 御中

新型コロナウイルス不活化試験 結果報告書

令和3年6月

株式会社グッドアイ

〒376-8515 群馬県桐生市天神町1丁目5番地1号

TEL: 0270-46-9277 FAX: 0277-46-9275

ウイルス不活化評価結果報告書

2021年6月1日

責任者： 株式会社グッドアイ 板橋英之

依頼主：株式会社大平ホテル

被検体： 蔵王温泉 最上高湯善七乃湯 辻屋源泉

コントロール：反応時間0分のウイルス溶液

リファレンス：水道水

ウイルス：新型ヒトコロナウイルス (SARS-CoV-2 WK-521)

ウイルス力価 (原液)： 3.6×10^4 TCID₅₀ / mL

細胞：Vero 細胞 (株番号：JCRB0111、培地組成：10%血清(FBS)DMEM)

試験概要：

検体に対してウイルス液を混合させ、反応時間毎にウイルス液を採取し、細胞へ感染させ感染性ウイルス量を測定する。

試験方法：

1. ウイルスの準備

Vero 細胞を 3.0×10^5 cells/mL に調整後、10mL を 75 cm² のティッシュカルチャーに注ぎ、37°C、CO₂ 濃度 5% のインキュベーターで 1 日培養後、 $10^5 \sim 10^6$ TCID₅₀ / mL 程度の SARS-CoV-2 を 100 uL 播種した。その後、CO₂ 濃度 5% のインキュベーターで 3 日間培養後、TCID₅₀ 法に基づきウイルス力価を測定した。

2. 細胞の準備

Vero 細胞を 1.0×10^5 cells/mL に調整後、96well plate に 100uL/well ずつ播種し、37°C、CO₂ 濃度 5% のインキュベーターで 1 日培養した。

3. 被検体の準備

各被検体 975 uL を 24well plate に播種した。

4. ウイルスと検体の反応

ウイルス液 25uL を被検体に混合し反応させた。反応時間は 1 分で実施した。その後、反応を停止させるため、ウイルス混合液 100uL を無血清の DMEM 培地 900uL に添加した。

なお、ウイルスと検体の反応は、室温 23°C、湿度 44% のキャビネット内で行った。

5. Vero 細胞への添加と培養

3.で希釈した液を 1.で準備した細胞に 1 被検体・1 反応時間あたり 3well ずつ 100uL/well 播種した。37°C、CO₂ 濃度 5%のインキュベーターで 1 日間培養した後、感染性ウイルス量を測定し、各被検体の抗ウイルス活性を評価した。

結果：

コントロールのウイルス感染価を 100 とした場合の各検体におけるウイルス感染価

蔵王温泉 最上高湯善七乃湯 辻屋源泉：

反応時間 0 分におけるウイルス感染価に対して、1 分後に約 4% までウイルス減少が確認された。

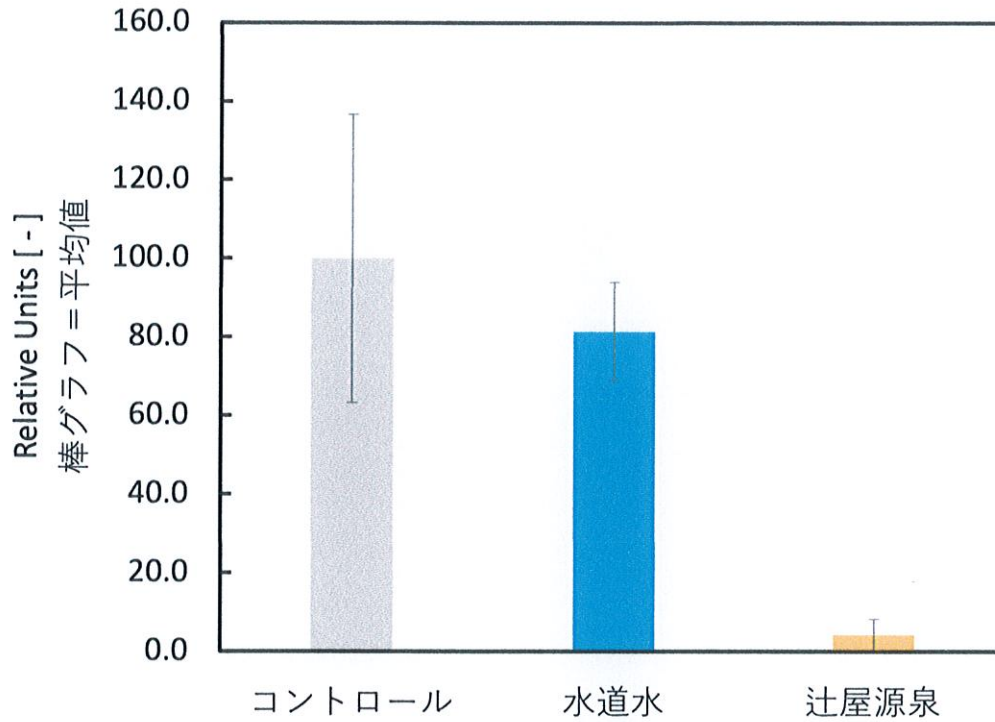


Fig1. コントロールのウイルス感染価を 100 とした場合の各検体におけるウイルス感染価

Table 1 コントロールのウイルス感染価を 100 とした場合の各検体におけるウイルス感染価

試料名	コントロール	水道水	辻屋源泉
平均値	100.0	81.4	4.1
標準誤差 SE	36.7	12.6	4.0

コントロールに対する各検体でのウイルス減少率

蔵王温泉 最上高湯善七乃湯 辻屋源泉：

反応時間 0 分におけるウイルス感染価に対して、1 分後に約 96%のウイルス減少が確認された。

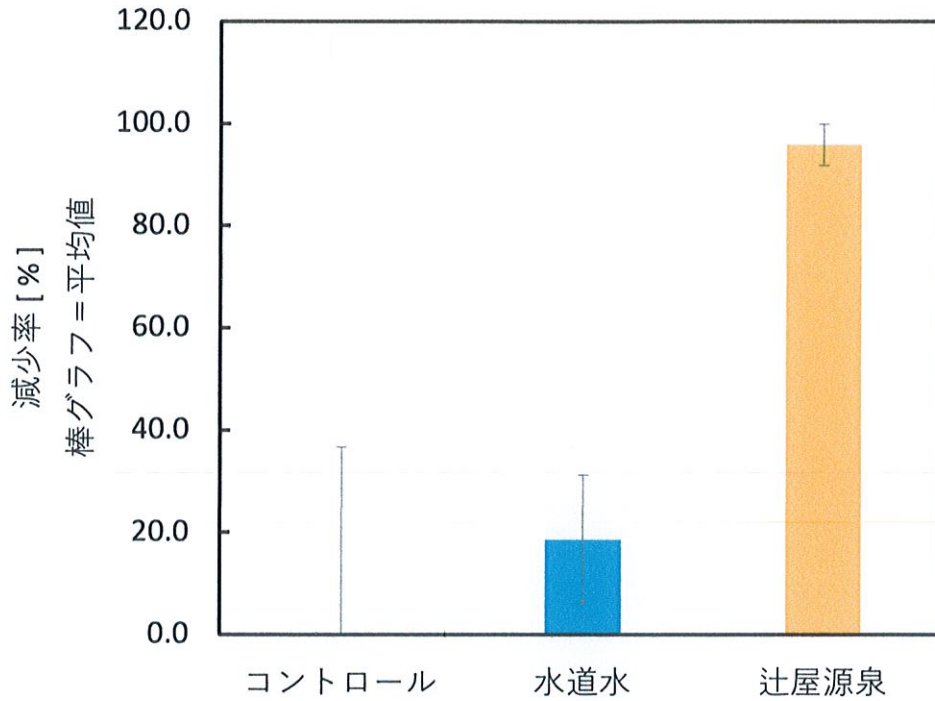


Fig.2 コントロールに対する各検体のウイルス減少率

Table 2 コントロールに対する各検体のウイルス減少率

試料名	コントロール	水道水	辻屋源泉
平均値	0.0	18.6	95.9
標準誤差 SE	36.7	12.6	4.0

リファレンスに対する不活化率

蔵王温泉 最上高湯善七乃湯 辻屋源泉：

反応時間 1 分後のリファレンスに対する、不活化率は 94.9%となった。

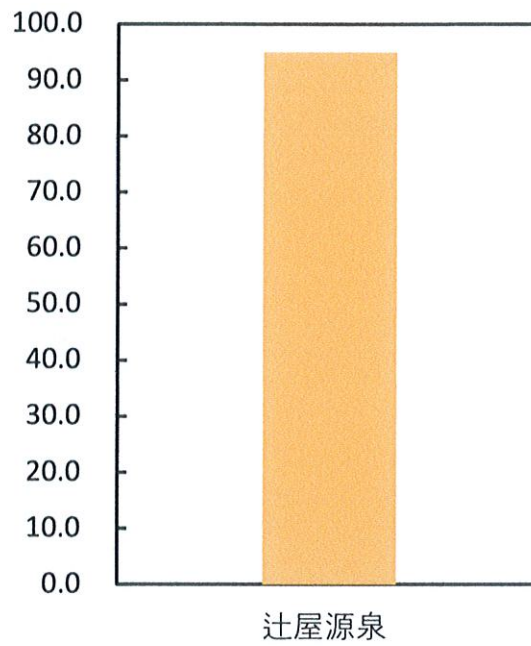


Fig.3 リファレンスに対するウイルス不活化率

Table 3 リファレンスに対するウイルス不活化率

試料名	辻屋源泉
平均値	94.9

結論：

今回の結果から、蔵王温泉ではウイルス感染価は1分後に25分の1以下となることが確認された。なお、リファレンスでもウイルス減少が確認されたことから、各温泉水が有する不活化能力の評価指標としては、リファレンスに対するウイルス不活化率の値(Table3)を用いるのが妥当と判断する。つまり、それぞれの温泉水の不活化能力は、蔵王温泉は94.9%となる。

備考：

試験を行うにあたり、本試験方法で被検体が細胞に毒性を示さないことを確認するために、以下のとおり細胞毒性評価（MTTアッセイ）を行った。

試験概要：

実験方法4「ウイルスと検体の反応」の試験を、ウイルス液の代わりに無血清DMEM25uLで行い、被検体に接触した溶液の希釈溶液を調製し、細胞毒性を評価した。

この試験では、細胞で起きるMTTの色素をホルマジン色素へ還元する酵素活性を光学的に測定する。これにより、細胞が死滅等により減少した場合は、発光量が小さくなる。

1. 細胞の準備

Vero細胞を 1.0×10^5 cells/mLに調整後、96well plateに100uL/wellずつ播種し、37°C、CO₂濃度5%のインキュベーターで1日培養した。

2. 被検体の準備

各被検体975 uLを24well plateに播種した。

3. 無血清DMEMと検体の反応

無血清DMEM 25uLを被検体に混合し反応させた。反応時間は1分で実施した。その後、反応を停止させるため、無血清DMEM混合液100uLを無血清のDMEM培地900uLに添加した。なお、無血清DMEMと検体の反応は、室温23°C、湿度20%のキャビネット内で行った。

4. Vero細胞への添加と培養

3.で10倍希釈、100倍希釈した溶液を、それぞれ、1.で準備した細胞に1被検体あたり3wellずつ100uL/well播種した。その後、37°C、CO₂濃度5%のインキュベーターで1日間培養した。

5. 細胞毒性試験

MTT溶液を各wellに10uLずつ添加し、37°C、CO₂濃度5%のインキュベーターで2時間呈色反応させた。その後、可溶化溶液を100uLずつ添加し、マイクロプレートリーダーを用いて、595nmの吸光度値を測定した。

6. 細胞毒性試験結果

被検体に接触させていない無血清 DMEM 培地を暴露した細胞の吸光度値に対して、蔵王温泉の値に大きな減少が見られなかったことから、各被検体に接触した溶液の細胞に対する毒性はないことが確認された。

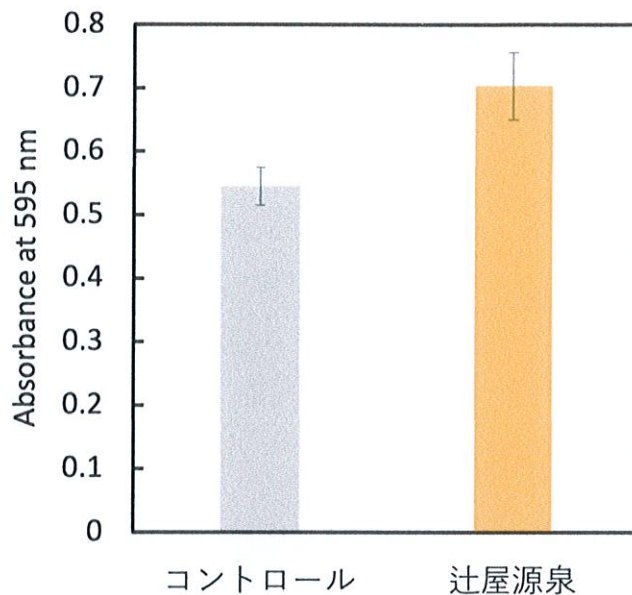


Fig.4 各検体における発光量

Table 4 各検体における発光量

試料名	コントロール	辻屋源泉
平均値	0.545	0.703
標準誤差 SE	0.03	0.05