

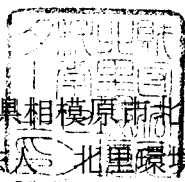
日本エコロジア株式会社 殿

試 験 報 告 書

ニームオイル含有薬剤の抗ウイルス試験

北環発 19_0025 号
平成 19 年 8 月 31 日

神奈川県相模原市北里 1 丁目 15 番 1 号
財団法人 北里環境科学センター
理事長 伊藤 俊 洋



試験内容を公表する場合は、事前に当センターの承諾が必要です。
また、本報告書記載の試験結果は供試品に対するものであり
荷口（ロット）全体の品質を証明するものではありません。

1. 試験目的

貴社 ニームオイル含有薬剤「機能性アロマ」のウイルス不活化効果のスクリーニングを行う。

2. 供試ウイルス

Influenza A virus (A型インフルエンザウイルス)

3. 試験品

貴社ご提供ニームオイル含有薬剤「機能性アロマ」(原液)

4. 試験品作用濃度

- ・「機能性アロマ」100倍希釈濃度 (但し希釈を供試ウイルス液で行った。)
- ・「機能性アロマ」1000倍希釈濃度 (但し希釈を供試ウイルス液で行った。)

5. 作用時間

0分、10分、30分、60分

6. 試験方法

(1) 供試ウイルスの培養方法

インフルエンザウイルスを発育鶏卵の漿尿液腔に接種して、フラン器で培養後、漿尿液を採取し、低速遠心処理後、超高速遠心機を使用したショ糖密度勾配遠心法によりウイルス精製を行ったものを供試ウイルス液とした。

(2) 試験手順

試験管内で試験品「機能性アロマ」原液 (もしくはリン酸緩衝生理食塩液(PBS)での10倍希釈溶液) を50 μ lと供試ウイルス液4950 μ lをボルテックスでよく混合して、室温で所定時間作用させた。所定時間後、直ちにこの混合液をPBSで200倍 (もしくは20倍) に希釈中和をして反応を停止させた。この溶液をウイルス感染価定量試料としてウイルス感染価を測定した。試験に用いた溶液量をそれぞれ表-1にまとめた。

なお、反応時間0分の試料は試験用サンプル水の代わりにPBSを用いて実施した。

表-1 試験に用いた溶液量

「機能性アロマ」 作用濃度	混合液作用工程		希釈中和工程		
	「機能性アロマ」	供試ウイルス	中和希釈率	混合液	PBS希釈
100倍希釈	50 μ l	4950 μ l	×200	100 μ l	19.9ml
1000倍希釈	×10希釈(PBS)を50 μ l	4950 μ l	×20	1ml	19ml

(3) ウイルス感染価の測定

ウイルスの感染価測定については、200 倍希釈試料（もしくは 20 倍希釈試料）を PBS で 10 倍階段希釈を行い、希釈したウイルス溶液と、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) + 5% FBS に懸濁されたイヌ腎臓細胞 (MDCK: Madin-Darby Canine Kidney) とを、96 穴ウエルプレートに植え込んだ。ウイルスと接触させた MDCK 細胞を 37°C の炭酸ガスフラン器内で 5 日間培養した。その後、ウエル中の細胞を 4% ホルマリン・0.1% クリスタルバイオレットで固定・染色し、水洗いを行った。水洗い後、ウエルを乾燥させ、エタノールを各ウエルに 50 μ l 加え、細胞から溶出したクリスタルバイオレットの吸光度 (OD 585nm) から Reed-Muench 法を用いて、ウイルス感染価 (1ml あたりの 50% 組織培養感染量 (TCID₅₀/ml)) を求めた。

7. 試験結果

結果を表-2 と図-1 に示す。なお、ウイルス感染価は中和前の状態に換算した。

A 型インフルエンザウイルスに関して、「機能性アロマ」100 倍希釈濃度で作用させたところ、作用時間 10 分で検出限界値 1.3×10^3 (TCID₅₀/ml) 未満になり、対照 (PBS) と比べて、 $>2 \log_{10}$ の不活化効果 (ウイルス感染価減少 99% 超) が認められた。

試験担当者 ウイルス部 鳴崎典子

以上

表-2 試験品の作用時間に対する A 型インフルエンザウイルス感染価

試験品条件	作用時間(分)			
	0	10	30	60
「機能性アロマ」100倍希釈濃度		<1.3E+03	<1.3E+03	<1.3E+03
「機能性アロマ」1000倍希釈濃度		2.1E+05	1.3E+05	1.1E+05
PBS(対照)	1.3E+05			1.1E+05

[単位:TCID₅₀/ml]

検出限界値: <1.3E+03

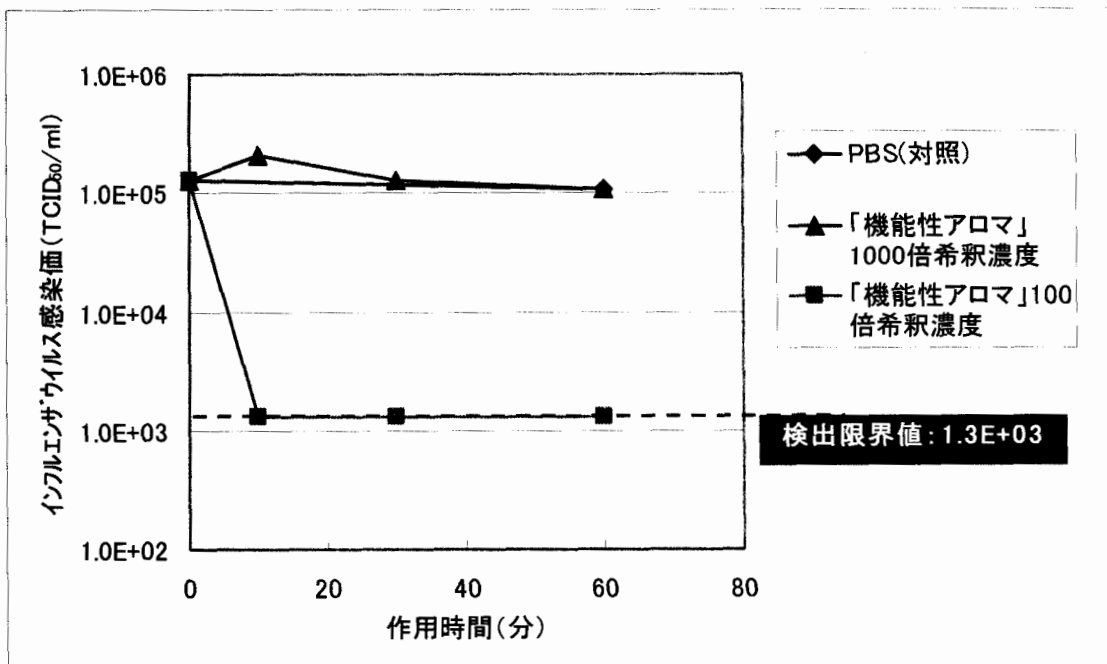


図-1 試験品の作用時間に対する A 型インフルエンザウイルス感染価