

成果報告

評估多層式中性電解水(Envirolyte's Electrolysis Anolyte Water) 去病毒活性之研究

委託單位： 台灣艾所生物科技股份有限公司

執行單位： 國立●●●大學醫學院

醫學檢驗暨生物技術學系所

計畫主持人： ●●● 副教授

執行期間：民國 100 年 5 月 1 日至民國 100 年 12 月

摘 要

本研究計劃主要是針對多層式中性電解水(Envirolyte's Electrolysis Anolyte Water)去病毒活性效果做一初步之探討。在實驗設計上，去病毒作用，分別挑選屬於 enveloped virus 的 herpes virus type 1(HSV-1)、influenza A, B 等病毒株，以及屬於 non-enveloped virus 的 adeno virus, enterovirus 等病毒株，作為研究的對象。利用病毒感染力價測定法 TCID₅₀ (Tissue Culture Infection Dose 50)，或病毒溶斑法(plaque assay)定出病毒之活性指標，以評估多層式中性電解水之去病毒活性效果。

當使用原倍的電解水進行作用時，對各類病毒皆可達到良好的抑制效果。電解水經過稀釋降低氯含量後，抑制效果則依病毒種類不同而有所差異。整體而言，依抑制效果由高至低依序為 Influenza A/H3N2, Echo6, 2009 pandemic influenza A/H1N1, seasonal Influenza A/H1N1, Enterovirus type 71, Influenza B, HSV-1, Coxsackie B5, Adenovirus。

研究目的

病毒時時威脅著人類的健康，這些看不見卻又可能造成致命性後果的微生物，在環境中處處存在。造成病毒性感染症，接觸感染為傳播之主要途徑之一。去除環境中病毒污染時，傳統上均使用漂白水。但因漂白水為強鹼且具腐蝕性及有臭味之缺點，因此發展較溫和性具去病毒活性之物質，為生技界努力之方向。本計畫擬針對「台灣艾所生物科技股份有限公司」所生產之多層式中性電解水 (Envirolyte's Electrolysis Anolyte Water) 進行檢測，以評估該產品抗病毒之效果。

研究背景

近年來，隨著人類經濟之進步、人類生活行為、氣候變遷及地球生態之變化快速導致新興感染症或再現型感染症不斷出現，並多次造成大規模甚至全球性感染。除大規模感染外，院內感染亦極為普遍。此些之感染傳播途徑中，接觸性之傳播佔了相當多之角色。因此在可能污染之環境，去除病毒活性，為阻斷傳播之最佳選擇。唯大多去除病毒活性之用藥 選用含次氯酸鈉之漂白水。但漂白水為強鹼且具腐蝕性有臭味之缺點。因此發展較溫和性且具去病毒活性之物質，為生技界努力之方向。最近科技產業利用多層電解技術，研發 pH 中性電解水(含 HClO) 以改進漂白水之缺點。但此些 pH 中性電解水(含 HClO)，對台灣本土分離之病毒是否真正有效果，有進一步檢測之必要。

台灣艾所生物科技股份有限公司本著服務社會、引進新技術生產出多層次 pH 中性電解水(含 HClO)。為瞭解此電解水對本土分離之病毒是否具有去病毒活性之效果，因此與國立台灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系暨研究所高全良副教授合作本研究計劃:「評估多層式中性電解水(Envirolyte's Electrolysis Anolyte Water)去病毒活性之研究」。

材料與方法

受試驗材料:

本次實驗的受試產品樣本由委託廠商提供。受試產品的濃度、純度、組成成份與穩定性等，由委託廠商承擔責任，執行單位測試結果，僅針對提供之樣

品提出評估報告。

本計劃研究方法如下：

1. 細胞培養

針對不同病毒株，選擇可於體外進行連續培養之合適細胞株。由冷凍保存用的液態氮中取出，經快速凍解及離心去除冰凍保存液，加入含有定量胎牛血清之細胞生長培養基，移至細胞培養瓶中後，置於內含 5% CO₂ 及飽和水蒸氣之 37°C 恆溫培養箱中進行培養。每三至四天進行一次細胞繼代培養，當細胞生長形成完整的單層細胞時，將培養基移除，以適量的磷酸鹽緩衝液 PBS (phosphate buffer saline) 清洗兩次後，加入胰蛋白質酵素(trypsin)，於 37°C 恆溫培養箱中作用 3 至 10 分鐘，見細胞脫落即可加入生長培養基，細胞經過充分混合均勻後，即以 1：4 之比例分裝於新的培養瓶中繼續培養。或經計數細胞數目後，調整成適當的濃度，以供培養病毒、後續測試或冷凍保存之用。

2. 病毒培養

取適量的細胞株預先培養於試管或培養瓶中，待細胞生長形成完整單層細胞時，即可接種病毒。倒除試管或培養瓶中的生長培養基，每瓶或每支試管加入 100~200µl 病毒懸浮液，置於內含 5% CO₂ 之 37°C 恆溫培養箱 1~2 小時，使病毒能充分吸附於細胞表面。再加入適量之生長培養基進行培養。每日觀察病毒產生細胞病變(cytopathic effect, CPE)之情況，並記錄之。當有 75% 培養細胞產生細胞病變時，即可收取病毒。此計畫中使用之新型流感病毒 H1N1 (2009 panademic influenza A/H1N1), 季節性流感病毒 H3N2 及 H1N1 (seasonal influenza A/H3N2, A/H1N1), B 型流感病毒(Influenza B), 以 MDCK 細胞培養。伊科病毒(Echo virus), 柯沙奇 B 型病毒(Coxsackie B)及 腸病毒 71 型 (enterovirus type 71) 以 RD 細胞培養。腺病毒(adeno virus)及單純疱疹病毒第一型(herpes simplex virus type 1)則使用 Hep-2 細胞培養。

3. 病毒溶斑試驗

病毒懸浮液以連續 10 倍稀釋後，接種於已長滿細胞之 6 孔培養盤（直徑 35 mm）中，每個濃度種二個孔，靜置於 37°C 恆溫培養箱中使病毒吸附於細胞。一小時後，吸除病毒液，加入含有 0.5% agarose 的維持培養基，置於含有 5% CO₂ 及飽和水蒸氣之 37°C 恆溫培養箱中進行培養。三天後，在培養盤中加入 formalin 以固定之，再以染劑 crystal violet 染色，以清水洗去多餘染劑後，計數病毒溶斑的數目以計算出病毒的濃度。

4. TCID₅₀ 病毒感染力價測定法

將病毒懸浮液，以生長培養基做連續 10 倍稀釋後，依照高濃度到低濃度的

順序，各取 50 μ l/well 加入 96 孔培養盤，同一種稀釋濃度至少加入 4 個孔。再加入 100 μ l/well 的生長培養基於含有病毒懸浮液之孔。另外以 150 μ l/well 的生長培養基，加入不含病毒之孔作為對照組。最後加入 50 μ l/well 的細胞懸浮液，經均勻混合後，靜置於內含 5% CO₂ 之 37°C 恆溫培養箱中進行培養。經培養 72 小時，觀察細胞病變的情況，並以 Reed-Meunch calculation 計算法算出病毒感染力價。

5. 受試物去病毒作用

Test system: mix 0.1ml virus with 0.9 ml Envirolyte's Electrolysis Anolyte Water by vortex mixer and stand at room temperature for 10 min.

Control system: mix 0.1ml virus with 0.9 ml **PBS** by vortex mixer and stand at room temperature for 10 min.

反應完成後再依病毒性質進行病毒活性分析。然後計算 Reduction of virus titer by test sample($-\text{Log}_{10}$)。

分析時將針對測試件嘗試以不同濃度序列稀釋(500ppm~5ppm)比較對不同病毒去病毒活性之差異性。

6. 實驗材料：

Cells：MDCK，RD，A549，Vero

Virus：Influenza A H1N1 (H090135)

Influenza A H3N2 (H090103)

Influenza A swine H1N1 (VI110809)

Influenza B (B110439)

Herpes simplex virus type 1 (D110647)

Enterovirus type 71 (VI061482)

Coxsackie B5 (D100302)

Echovirus type 6 (D110604)

Adenovirus (H3457)

Medium：MEM，DMEM，FBS，TPCK-trypsin，E-2，E-10，D-10，
E0-TPCK trypsin

電解水：平均氯含量為 410ppm

實驗結果

1. Inactivation

方法：將 100 μ L virus 與 900 μ L 電解水均勻混合後作用 10 分鐘，再進行病毒定量。Enveloped virus (Influenza A H1N1, Influenza A H3N2, Influenza A swine

H1N1, Influenza B, Herpes simplex virus type 1) 以 plaque assay 定量，Non-enveloped virus (Enterovirus type 71, Coxsackie B5, Echovirus type 6, Adenovirus) 以 TCID₅₀ 定量。

結果：

	Virus Control	Test	Inactivation ratio(%)
Influenza A/H1N1 (seasonal)	$8.35 \times 10^6 / \text{mL}$	<100/mL	99.9988
Influenza A (H3N2)	$4.8 \times 10^5 / \text{mL}$	<100/mL	99.979
2009 pandemic influenza A/H1N1	$2.7 \times 10^5 / \text{mL}$	<100/mL	99.963
Influenza B	$1.3 \times 10^6 / \text{mL}$	<100/mL	99.992
HSV-1	$1.155 \times 10^7 / \text{mL}$	<100/mL	99.999
Enterovirus 71	$\text{TCID}_{50} = 10^{-4.6}$	$\text{TCID}_{50} < 10^{-1}$	99.98
Coxsackie virus B5	$\text{TCID}_{50} > 10^{-7}$	$\text{TCID}_{50} < 10^{-1}$	99.9999
Echovirus 6	$\text{TCID}_{50} = 10^{-5.88}$	$\text{TCID}_{50} < 10^{-1}$	99.987
Adenovirus	$\text{TCID}_{50} = 10^{-5.4}$	$\text{TCID}_{50} < 10^{-1}$	99.996

結論：在 410ppm 的氯含量下，電解水與上述幾類病毒液作用 10 分鐘，可達到 99.9% 以上的抑制效果。

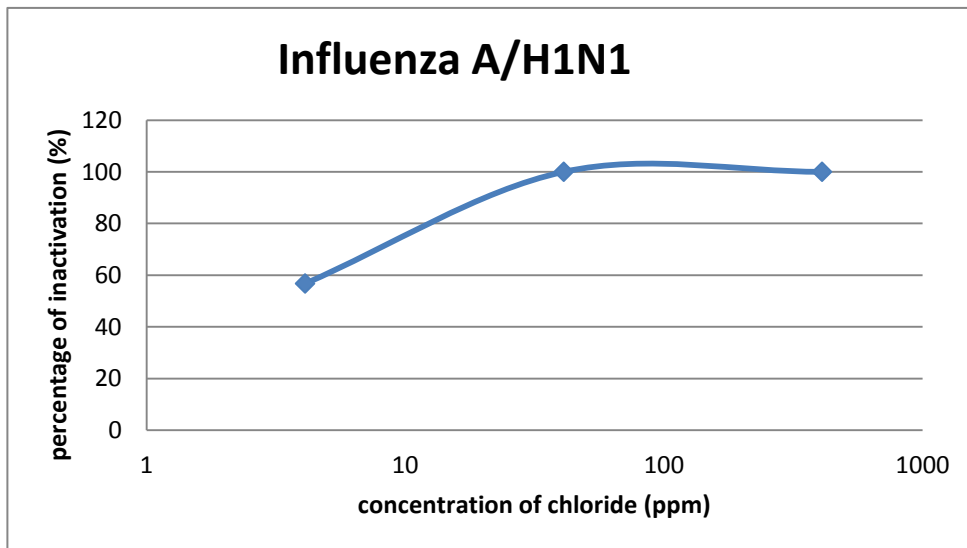
2. Endpoint test

方法：先將電解水以 PBS 稀釋 10 倍與 100 倍，再將 100 μL virus 與 900 μL 各濃度電解水均勻混合後作用 10 分鐘，再進行病毒定量。Enveloped virus (Influenza A/ H1N1, Influenza A/ H3N2, Influenza A swine H1N1, Influenza B, Herpes simplex virus type 1) 以 plaque assay 定量，Non-enveloped virus (Enterovirus type 71, Coxsackie B5, Echovirus type 6, Adenovirus) 以 TCID₅₀ 定量。

結果：

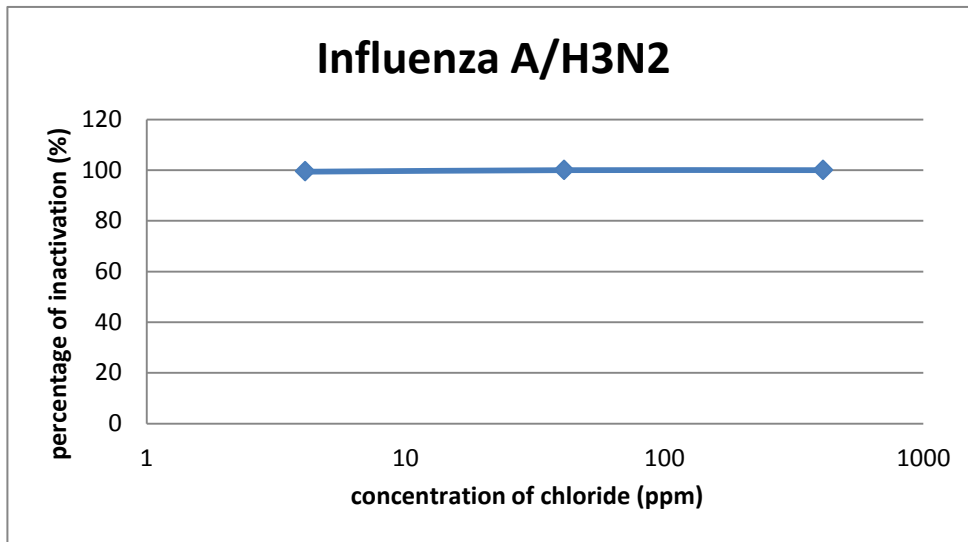
(a) Seasonal **Influenza A/H1N1**

	Titers (pfu/ml)	Percentage of inactivation(%)
PBS(control)	1.85×10^7	
410 ppm	$< 10^2$	99.9995
41 ppm	3×10^2	99.9983
4.1 ppm	8×10^6	56.757



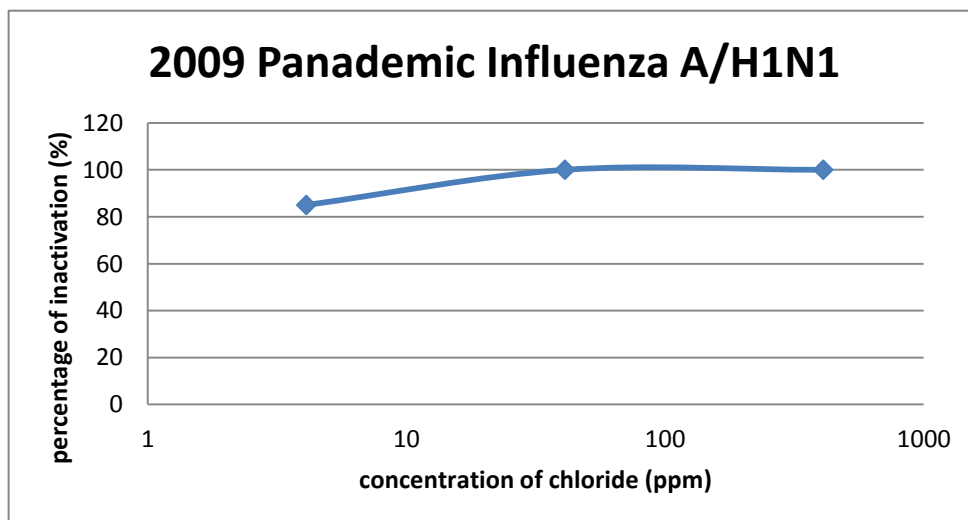
	Titers (pfu/ml)	Percentage of inactivation(%)
PBS(control)	9.5×10^6	
410 ppm	$<10^2$	99.999
41 ppm	$<10^2$	99.999
4.1 ppm	5.65×10^4	99.405

(b) Seasonal **Influenza A/H3N2**



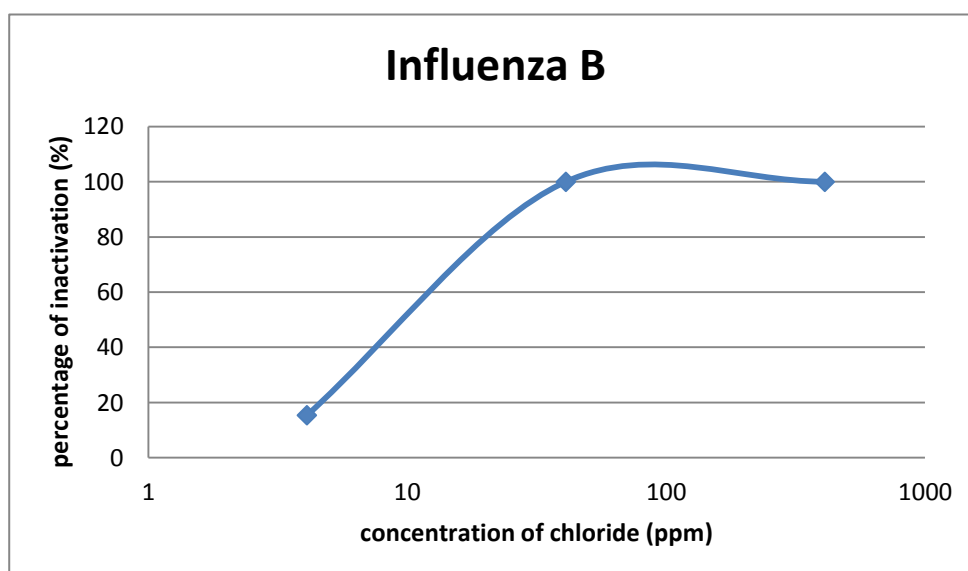
(c) 2009 Panademic **Influenza A/H1N1**

	Titers (pfu/ml)	Percentage of inactivation(%)
PBS(control)	9×10^5	
410 ppm	$<10^2$	99.989
41 ppm	$<10^2$	99.989
4.1 ppm	1.35×10^5	85



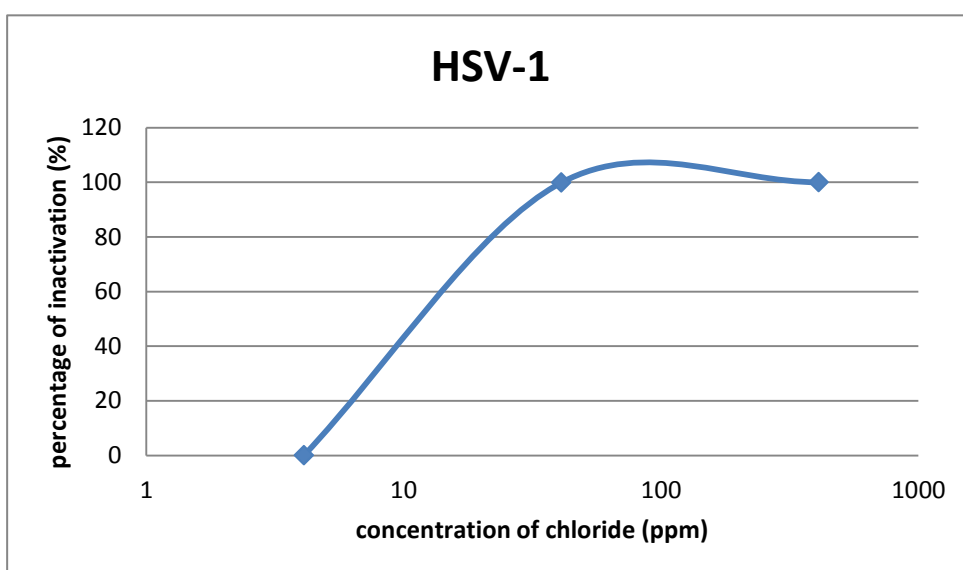
d) Influenza B

	Titers (pfu/ml)	Percentage of inactivation(%)
PBS(control)	1.3×10^6	
410 ppm	$<10^2$	99.992
41 ppm	$<10^2$	99.992
4.1 ppm	1.1×10^6	15.4



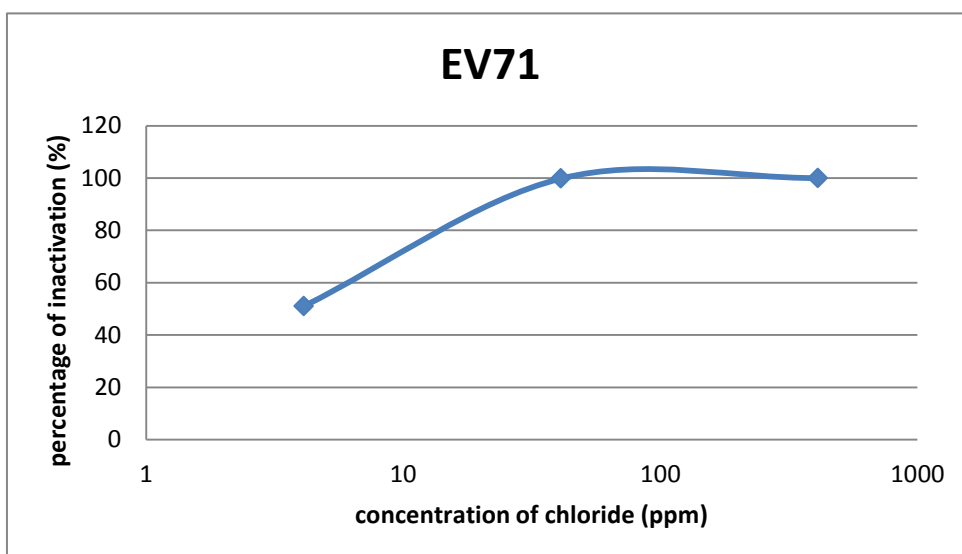
	Titers (pfu/ml)	Percentage of inactivation(%)
PBS(control)	1.155×10^7	
410 ppm	$<10^2$	99.999
41 ppm	1.54×10^4	99.867
4.1 ppm	1.185×10^7	Non-effective

(e) **Herpes simplex virus type 1**



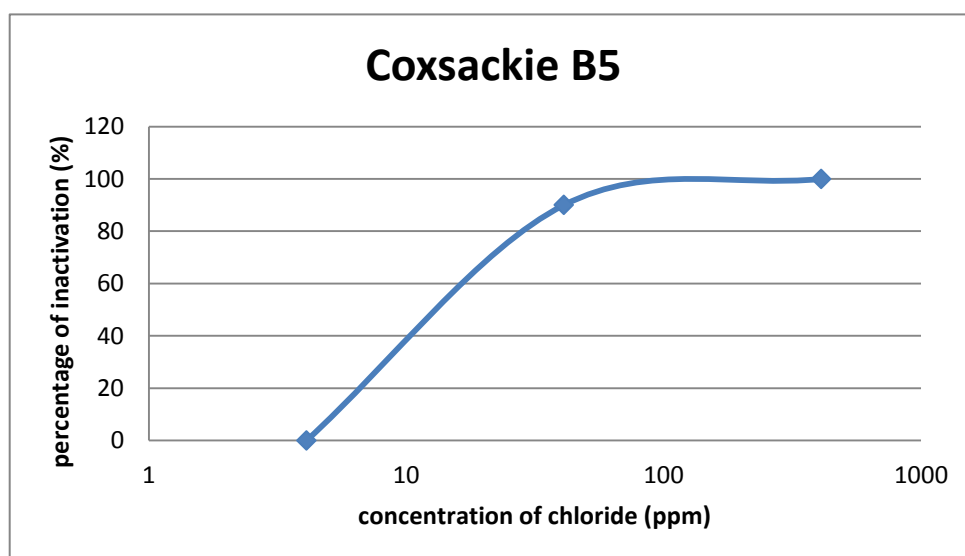
	Test	Percentage of inactivation(%)
PBS(control)	$TCID_{50}=10^{-6.31}$	
410 ppm	$TCID_{50}<10^{-1}$	99.9995
41 ppm	$TCID_{50}=10^{-3.64}$	99.79
4.1 ppm	$TCID_{50}=10^{-6}$	51.02

(f) Enterovirus type 71



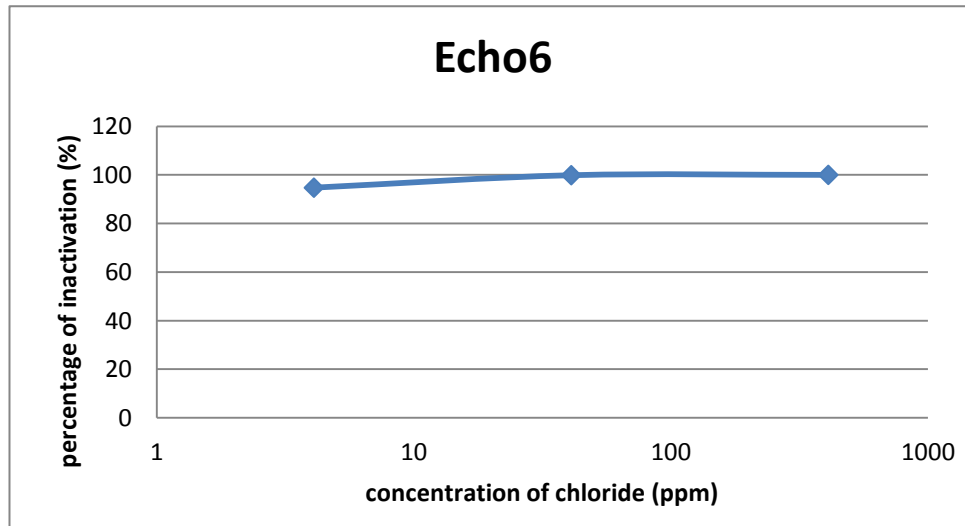
(g) Coxsackie B5

	Test	Percentage of inactivation(%)
PBS(control)	$TCID_{50} > 10^{-7}$	
410 ppm	$TCID_{50} < 10^{-1}$	99.9999
41 ppm	$TCID_{50} = 10^{-6}$	>90
4.1 ppm	$TCID_{50} > 10^{-7}$	Non-effective



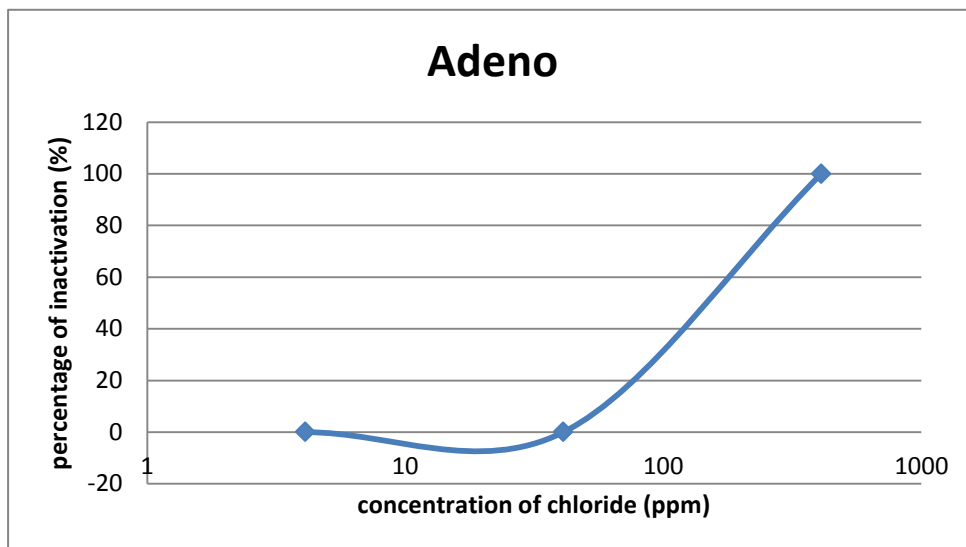
(h) **Echovirus type 6**

	Test	Percentage of inactivation(%)
PBS(control)	$TCID_{50}=10^{-5.88}$	
410 ppm	$TCID_{50}<10^{-1}$	99.9987
41 ppm	$TCID_{50}=10^{-3}$	99.868
4.1 ppm	$TCID_{50}=10^{-4.6}$	94.752



	Test	Percentage of inactivation(%)
PBS(control)	TCID ₅₀ =10 ^{-5.4}	
410 ppm	TCID ₅₀ <10 ⁻¹	99.996
41 ppm	TCID ₅₀ =10 ^{-5.5}	Non-effective
4.1 ppm	TCID ₅₀ =10 ^{-5.4}	Non-effective

(i) Adeno virus



結論：在 410ppm 的氯含量下，電解水與上述幾類病毒液作用 10 分鐘，可達 99.9% 以上的抑制效果。氯含量降至 41ppm，除 adenovirus 與 coxsackie virus 外，其他病毒尚可達到 99% 以上的抑制效果。氯含量降至 4.1ppm 時，對各類病毒的抑制效果呈現不同結果。

結果與討論

各類病毒與原倍之電解水作用後，皆可達到很好的抑制效果，隨著電解水的稀釋，抑制效果則有所差異。分析各種病毒抑制曲線的改變，可以發現電解水對於 RNA 病毒的抑制效果較 DNA 病毒佳，抑制效果與病毒套膜之有無則沒有顯著的相關性。而同一種類之病毒，如 Influenza virus，各個亞型之間也存在著差異，這些差異可能是由病毒蛋白的不同所造成，其確切之作用機制則有待更進一步之研究。