



立可適

中國醫藥大學

China Medical University

「立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑(微酸性電解次氯酸水) 體外病毒感
染培養抑制效果之評估」

委託單位：創研生技有限公司



中 華 民 國 1 0 4 年 1 0 月 0 9 日



中國醫藥大學
China Medical University

報告編號：	
報告頁碼：	1/13

目錄

目錄	1
簽署頁	2
實驗目的	3
實驗原理	4
實驗方法	5
實驗結果	8
結論	12
附件	13

中國醫藥大學 China Medical University

404-02 台中市北區學士路 91 號
(04)-2205-3366 #1580



實驗原理

選用實驗室之腸病毒 (EV-71) 與流感病毒 (Influenza A) 種毒，連續稀釋後，以體外細胞培養方式，分別接種於 RD (Human embryo rhabdomyosarcoma cells) 細胞及 MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells) 細胞二種細胞株，後續觀察細胞所產生細胞病變之變化，並計算出 CCID₅₀ 濃度。

實驗將分為兩組，實驗組為與立可適 (NeuKocyte) 抗菌噴霧劑以直接按壓三次噴灑的量(約 2.0 ml)與稀釋之種毒病毒液進行作用 3 分鐘後，再以體外細胞培養方式接種於細胞株；另一陽性對照組是以無噴灑評估試劑為主，以稀釋之種毒病毒液直接接種於細胞。接種後於每日觀察細胞株的細胞病變 (cytopathic effect; CPE) 變化，觀察七日後，分別計算 CCID₅₀ 濃度來分析立可適 (NeuKocyte) 抗菌噴霧劑與腸病毒 71 型及 A 型流感病毒作用後，是否會造成病毒有抑制的反應。



實驗方法-A 型流感病毒

1. 進行 MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells) 細胞株的培養。
2. 選用 A 型流感病毒株種毒，以連續稀釋方式稀釋至 10^{-6} ($10^{-1} \sim 10^{-6}$)，作為陽性對照組。
3. 立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑直接按壓三次的量(約 2.0 ml)，與病毒液來進行反應(滅菌液:病毒液=10:1)，待反應三分鐘，最後再加入培養基稀釋至總量 20ml，中止病毒液和立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑的作用，此時最後病毒液稀釋濃度為 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ 。
4. 將長滿 MDCK 細胞的細胞培養管中的培養基移除，再用 PBS 緩衝液清洗至少 3 次，再加入培養基後，分別加入陽性對照組病毒液及實驗組之病毒液；另 MDCK 細胞加入稀釋至 10 倍立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑，以評估是否對細胞具有毒性。
5. 依據中國醫藥大學附設醫院檢驗醫學部病毒培養標準作業流程進行病毒培養。
6. 觀察有無噴灑立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑的病毒液其細胞病變的產生與感染情形。
7. 如見細胞病變則利用免疫螢光染色進行鑑定，確認病毒感染。
8. 培養七天後無觀察到細胞病變，結束觀察，並利用免疫螢光染色進行鑑定，確認其無病毒感染。
9. 上述之實驗步驟共進行二次的重複測試。
10. 報告判讀：與噴灑組和陽性對照組相比，以抑制病毒感染之有無為報告內容。



實驗方法 - 腸病毒 71 型

1. 進行 RD (Human embryo rhabdomyosarcoma cells) 細胞株的培養。
2. 選用腸病毒 71 型病毒株種毒，以連續稀釋方式稀釋至 10^{-8} (10^{-1} ~ 10^{-8})，作為陽性對照組。
3. 與立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑直接按壓三次的量(約 2.0 ml)，與病毒液來進行反應(滅菌液:病毒液=10:1)，待反應三分鐘，最後再加入培養基稀釋至總量 20ml，中止病毒液和立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑的作用，此時最後病毒液稀釋濃度為 10^{-2} ~ 10^{-8} 。
4. 將細胞次培養後的細胞懸浮液，再加入培養盤內再分別加入及陽性對照組之病毒液及實驗組之病毒液；另 RD 細胞加入稀釋 10 倍立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑，以評估是否對細胞具有毒性。
5. 依據中國醫藥大學附設醫院檢驗醫學部病毒培養標準作業流程進行病毒培養。
6. 觀察有無噴灑立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑之病毒液其細胞病變的產生與感染情形。
7. 如見細胞病變則利用免疫螢光染色進行鑑定，確認病毒感染。
8. 培養七天後無觀察到細胞病變，結束觀察，並利用免疫螢光染色進行鑑定，確認其無病毒感染。
9. 上述之實驗步驟共進行二次的重複測試。
10. 報告判讀：與噴灑組和陽性對照組相比，以抑制病毒感染之有無為報告內容。



實驗結果- A 型流感病毒

1. 依據對流感病毒 Influenza A 病毒測試結果顯示，陽性對照組之 CCID₅₀ 為 $10^{-5.12}/50\mu\text{l}$ ，即為流感病毒 Influenza A 病毒液稀釋至 $10^{-5.12}$ 倍，可使得 MDCK 細胞仍有 50% 的細胞病變；實驗組的結果顯示，經與立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑反應後之病毒液無法使 MDCK 細胞產生細胞病變，其 CCID₅₀ 為 0，換句話說，立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑可有效抑制流感病毒 Influenza A 對 MDCK 細胞產生細胞病變。另 MDCK 細胞加入稀釋 10 倍立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑後，MDCK 細胞型態並未改變，結果顯示，稀釋 10 倍立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑不會對 MDCK 細胞產生毒性。
2. 流感病毒 Influenza A 病毒有噴灑立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑和無噴灑立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑進行病毒培養的測試結果如下說明：
 - 2.1 有噴灑立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑的實驗組中，接種完第一天的細胞型態(圖八)；
接種後第三天，MDCK 細胞未受感染無細胞病變(圖九)；接種後第七天，MDCK 細胞仍未受流感病毒感染，細胞型態仍為正常無細胞病變(圖十)。



實驗結果-腸病毒 71 型

1. 依據對腸病毒 EV-71 測試結果顯示，陽性對照組之 CCID₅₀ 為 $10^{-6.59}/50\mu\text{l}$ ，也就是 EV-71 病毒液稀釋至 $10^{-6.59}$ 倍可使得 RD 細胞仍有 50% 的細胞病變；實驗組的結果顯示，經與立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑試劑反應後之病毒液無法使 RD 細胞產生細胞病變，其 CCID₅₀ 為 0，也就是立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑試劑可有效的抑制 EV-71 病毒對 RD 細胞產生細胞病變。另 RD 細胞加入稀釋 10 倍立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑試劑後，RD 細胞型態並未改變，結果顯示此試劑不會對 RD 細胞產生毒性。
2. 腸病毒 71 型有無噴灑立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑試劑進行病毒培養的測試結果如下說明：
 - 2.1 有噴灑立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑試劑的實驗組中，接種完第一天的細胞型態(圖一)；接種後第三天，RD 細胞呈現些微老化，未受感染(圖二)；接種後第七天，RD 細胞仍未受腸病毒 71 型感染，細胞型態為正常無細胞病變(圖三)。



結 論

本次評估計畫主要是測試委託產品立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑(微酸性電解次氯酸水)，以直接按壓三次的量(2.0 ml)，進行腸病毒 71 型及 A 型流感病毒的體外感染細胞的實驗，依據感染天數觀察病毒對於細胞株是否具有典型的細胞病變表現，最後利用具高特異性之免疫螢光抗體，來進行病毒感染的確認測試，根據評估實驗的結果表現可得知，使用立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑(微酸性電解次氯酸水)對於 A 型流感病毒及腸病毒 71 型的細胞感染具有明顯的抑制反應。而 MDCK 及 RD 二種細胞株加入稀釋 10 倍立可適(NeuKocyte)抗菌噴霧劑(微酸性電解次氯酸水)後，細胞株的細胞型態均未有明顯改變，此結果顯示本次測試評估產品，對此二種細胞株未呈現細胞毒性。