

October 14, 2009  
2009年10月14日



カンサス州立大学

To: Joseph Urso – Aerus - Electrolux / ActivTek Environmental  
宛先: Joseph Urso – Aerus - Electrolux / ActivTek環境部

From: James Marsden, Ph.D.  
差出人: James Marsden, Ph.D.

Subject: Inactivation of *Influenza A H1N1* using Radiant Catalytic Ionization (RCI™)  
テーマ: 放射触媒イオン化(RCI™)によるインフルエンザA H1N1の不活性化

## Interim Progress Report

### 中間経過報告書

This is an interim progress report on the evaluation of the RCI™ system for inactivating Influenza H1N1 on environmental surfaces. Additional research is planned to fully evaluate the effect of the reactive oxygen species (ROS) produced by the RCI™ system on Influenza H1N1 under controlled laboratory conditions.

本稿は環境表面においてインフルエンザH1N1を不活性化するRCI™システムの評価に関する中間経過報告書です。管理された実験室内条件の下で、RCITMシステムにより生成された活性酸素(ROS)のインフルエンザH1N1に対する効果を十分に評価するための追加研究が計画されています。

I recommend that Aerus Corporation meet with FDA officials to obtain guidance on future research and how best to position the RCI technology to consumers.

私は今後の研究およびRCI技術を消費者に知ってもらい最善の方法に関する指導を受けるために、AerusコーポレーションはFDA職員とお会いすることをお勧めいたします。

## Background

### 背景

Novel influenza A (H1N1) is a new flu virus of swine origin that first caused illness in Mexico and the United States in March and April, 2009. H1N1 is an acute and highly contagious respiratory virus similar to seasonal flu but affecting a younger age group. Less immunity exists to this novel strain of the flu than to seasonal flu. H1N1 influenza in humans can vary in severity from mild to severe. The H1N1 virus is thought to spread in the same way seasonal flu is spread: from person to person through droplets produced by coughs and sneezes, or from touching contaminated surfaces and then touching your mouth, nose or eyes. Novel H1N1 infection has been reported to cause a wide range of flu-like symptoms, including fever, cough, sore throat, body aches, headache, chills and fatigue. In addition, many people also have reported nausea, vomiting and/or diarrhea. The virus can stay alive on surfaces and your hands and body for at least two hours.

新型インフルエンザA(H1N1)は、2009年3月にメキシコで、4月に米国で最初に発生したブタ由来の新型インフルエンザウィルスです。H1N1は季節的なインフルエンザと類似した感染力の強い急性の呼吸器系ウィルスですが、若年層がかかりやすくなっています。この新たな変種インフルエンザは季節的インフルエンザに比べ抗体があまりありません。人間に感染したH1N1インフルエンザは軽度なものから重症のものまで症状に差があります。H1N1ウィルスは季節的インフルエンザと同じように拡散すると考えられます。すなわち、せきやくしゃみによる飛沫を通して、または汚染された表面に触

れた後口や鼻や目に触れることにより人から人へと拡がります。新型インフルエンザH1N1に感染すると、発熱、せき、のどの痛み、身体の痛み、頭痛、寒気および疲労感などのインフルエンザに似た幅広い症状を発現することが報告されています。また、多くの人が吐き気、嘔吐および／または下痢の症状を訴えています。このウィルスは人の手や体の表面に留まって少なくとも2時間生き続けることができます。

The first novel H1N1 patient in the United States was confirmed by laboratory testing at CDC on April 15, 2009. The second patient was confirmed on April 17, 2009. It was quickly determined that the virus was spreading from person-to-person. On April 22, CDC activated its Emergency Operations Center to better coordinate the public health response. On April 26, 2009, the United States Government declared a public health emergency and has been actively and aggressively implementing the nation's pandemic response plan

米国における最初のH1N1患者は2009年4月15日にアメリカ疾病管理予防センター（CDC）の臨床検査によって確認されました。2番目の患者は2009年4月17日に確認されました。このウィルスは人から人へ感染することが速やかに特定されました。CDCは、4月22日、より効率よく公衆衛生への対応を図るためにその救急対策本部の活動を強化しました。2009年4月26日、米国政府は公衆衛生非常事態宣言を発令し、米国のパンデミック対応計画を積極的に実行に移しました。

By June 19, 2009, all 50 states in the United States, the District of Columbia, Puerto Rico, and the U.S. Virgin Islands have reported novel H1N1 infection. While nationwide U.S. influenza surveillance systems indicate that overall influenza activity is decreasing in the country at this time, novel H1N1 outbreaks are ongoing in parts of the U.S., in some cases with intense activity. 2009年6月19日、米国の全50州、コロンビア特別区、プエルトリコ、米国バージン諸島は新型H1N1の感染を報告しました。全米インフルエンザ監視システムは、米国におけるインフルエンザの活動全体がこの時点で弱体化してきていることを示しましたが、新型H1N1のアウトブレイクは米国の一部で続いており、その他でも活発な流行が続きました。

## **Preliminary Experiment – Inactivation of Influenza A H1N1 on Inoculated Stainless Steel Surfaces**

予備実験 — ステンレススチール表面に植菌されたインフルエンザA H1N1の不活性化

Influenza A *H1N1* (ATCC # VR-333) was evaluated in this study. The procedures for maintaining the virus culture and enumerating the virus prior to and after treatment were obtained from Dr. Rick Falkenberg – FSPT. The virus culture was maintained on ATCC complete growth medium and minimum essential medium (ATCC, Manassas, VA., USA) with 2  $\mu$ M L-glutamine and Earle's BSS adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1  $\mu$ M non-essential amino acids, and 1.0  $\mu$ M sodium pyruvate, 90%; fetal bovine serum, 10% and cultured in Trypticase Soy Agar with added; sodium bicarbonate, non-essential amino acids, and combination of sodium pyruvate and fetal bovine serum, in aerobic growth conditions at 37.0°C and *Influenza A* at 33-35°C. Cells from both of the above (approx.  $1 \times 10^7$  CFU/ml) from a 24 hour static culture incubated at 37.0°C and *Influenza A* at 33-35°C were used to inoculate various 5 cm x 3 cm stainless steel coupons. The inoculum suspensions were enumerated by surface plating in duplicate samples on TSA after serial dilution in 0.1% peptone solution. The plates were incubated for 24 hour at 37.0°C.

インフルエンザA H1N1 (ATCC#VR-333)は本研究で評価されました。処理前後にウィルス培養を維持し、ウィルスを計数化するための手順はDr. Rick Falkenberg – FSPTから得られました。ウィルス培養は、ATCC完全増殖培地および最小必須培地（米国バージニア州マナサス、ATCC）に、1.5 g/Lの炭酸水素ナトリウム、0.1  $\mu$ M非必須アミノ酸、1.0  $\mu$ Mピルビン酸ナトリウム90%、ウシ胎児血清10%を含有するよう調整された2  $\mu$ M LグルタミンおよびEarleのBSSで維持し、37.0°C の好気増殖条件下で炭酸水素ナトリウム、非必須アミノ酸、およびピルビン酸ナトリウムとウシ胎児血清の組合せ、および33-35°C下でインフルエンザAを加えたトリプチケースソイ寒天培地で培養されました。37.0°C下での24時間静置培養による上記（約 $1 \times 10^7$  CFU/ml）と33-35°C下でのインフルエンザAの両方の細胞が5 cm x 3 cmの各種ステンレススチール試片に植菌するため使用されました。懸濁接種源は0.1%ペプトン溶液での連続希釈後、TSA上の複製サンプル数を表面プレーティングによって計数化しました。各プレートは37.0°C下で24時間培養されました。

A 100 µl droplet from the initial inoculum suspension of each of the bacteria/viruses was used to inoculate the external surface (6.3 cm x 1.8 cm) on # 8 stainless steel coupons. This resulted in a final inoculum level of approximately 7.0-log CFU/5 g sample. The inoculated samples were air dried for 1 hour at 22.0°C prior to RCI™ treatment being initiated. The 1 hour drying allows the inoculated cells to attach to the surface host and minimize the growth of inoculated cells during drying. Four stainless steel coupons were used for each sampling time.

バクテリア/ウイルスそれぞれの最初の懸濁接種源から100 µlの小滴を使用して#8ステンレススチール試片の外部表面(6.3 cm x 1.8 cm)に植菌しました。こうして最後の接種レベル約7.0-log CFU/5 gサンプルの結果が得られました。接種標本はRCI™処理に着手する前に22.0°Cで1時間空気乾燥させました。1時間の乾燥により接種細胞が表面に宿主を付着させ、乾燥中に接種細胞の増殖を最小に抑えることができます。4個のステンレススチールが各サンプリング時間に使用されました。

A biocontainment chamber was equipped with an RCI™ cell (obtained from Aerus Corporation) and allowed to equilibrate for a period of two hours prior to placement of 12 inoculated coupons inside the chamber. The effect of the RCI™ treatment was measured at 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours. A control study was conducted in the same chamber without the presence of the RCI cell. Temperature, relative humidity, and ambient Ozone levels and Hydrogen Peroxide levels were monitored in the chamber.

バイオ封じ込めチャンバーにはRCITMセルが（Aerusコーポレーションから取得）装備されており、チャンバー内に12個の接種試片を置く前の2時間、平衡化することができました。0、1、2、4、6、8、12、24時間ごとにRCITM処理の効果を測定しました。対照群研究がRCITMセルなしのチャンバーで実施されました。チャンバー内の温度、相対湿度、大気オゾンレベルおよび過酸化水素レベルがモニターされました。

After treatment, each of the 5 cm x 3 cm coupons were transferred into a 400 ml stomacher bag (Fisher Scientific Inc., PA., USA) combined with 50 ml sterile 0.1% peptone solution, and then blended with a AES Easy Mix Stomacher (AES Laboratories, Princeton, NJ., USA) for 2 min at normal speed. Wash fluid was serially diluted, followed by surface plating for enumeration. A centrifugation method was used to recover low populations of ROS injured bacteria and viruses. The centrifugation method (Mossel and others 1991) was modified and used to concentrate the bacterial and virus populations in the wash fluid so that less than 250 CFU/ml of bacteria can be enumerated by the surface plating.

処理後、5 cm x 3 cmの各試片は50 mlの無菌0.1%ペプトン溶液と共に400 mlのストマッカー袋（米国ペンシルバニア州、Fisher Scientific Inc.）に移し、通常速度で2分間 AES簡易ミックスストマッカーで攪拌しました（米国ニュージャージー州、プリンストン、AES 研究所）。ウォッシャー液は連続希釈しその後表面プレーティングにより計数化しました。少量のROS障害のバクテリアおよびウイルス個体を回復するために遠心分離法を用いました。遠心分離法（Mosselその他1991年）をウォッシャー液内のバクテリアおよびウイルス個体を凝縮するために幾分修正して使用し、その結果、250 CFU/ml未満のバクテリアを表面プレーティングによって計数化することができました。

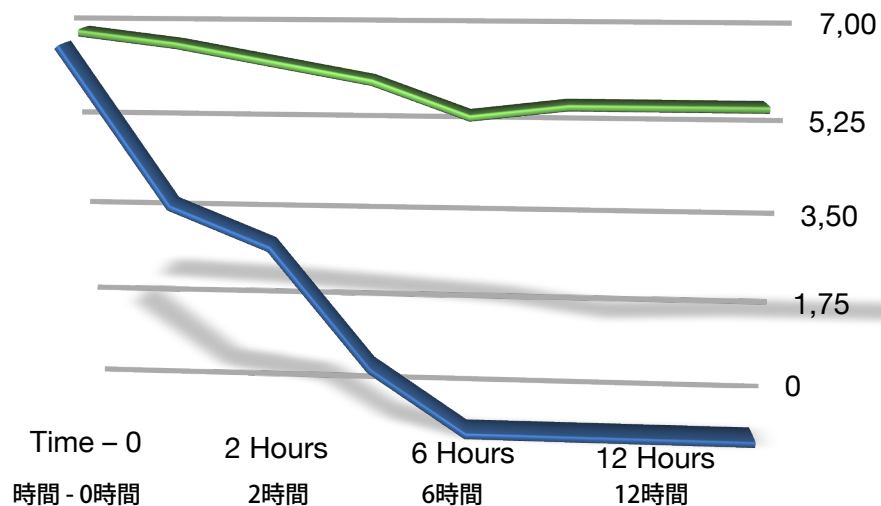
## Results and Discussion

結果および考察

**Table 1. Average recoveries (Log CFU/cm<sup>2</sup>) of *Influenza A H1N1* on inoculated stainless steel coupons treated using an RCI™ Cell for periods of 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 Hours**

表1. 1、2、4、6、8、12、24時間の間RCI™セルを使用して処理された植菌ステンレススティール試片上のインフルエンザA H1N1の平均回収率（ログCFU/cm<sup>2</sup>）

Sample サンプル	<i>Influenza A H1N1</i> Treated with RCI Cell RCIセルで処理された インフルエンザA	<i>Influenza A H1N1</i> Control インフルエンザA H1N1対照群
Initial – 0 Time 開始—0時間	6.8	6.9
1 Hour 1時間	4.1	6.7
2 Hours 2時間	3.4	6.4
4 Hours 4時間	1.2	6.1
6 Hours 6時間	BDL 未検出	5.5
8 Hours 8時間	BDL 未検出	5.7
12 Hours 12時間	BDL 未検出	5.7
24 Hours 24時間	BDL 未検出	5.7



— Influenza A H1N1 treated with a RCI cell  
— Influenza A H1N1 Control

RCIセルで処理されたインフルエンザA H1N1  
インフルエンザA H1N1対照群

Table 1 summarizes the results of the preliminary study. The study demonstrated the effectiveness of the reactive oxygen species produced by the RCI™ cell in the inactivation of Influenza A – H1N1. After 6 hours of treatment, levels of the H1N1 virus on inoculated stainless steel coupons were below the detection limit. No recovery was observed at 8, 12, or 24 hours. The ambient ozone levels in the chamber ranged from 0.02 – 0.04 PPM. Levels of vaporized Hydrogen Peroxide ranged from 0.06 – 0.09 PPM. The relative humidity ranged from 45 – 57% and the temperature from 70 – 73 degrees F.

表1は予備研究の結果をまとめたものです。本研究によりRCITMセルが生成した活性酸素のインフルエンザA-H1N1の不活性化に対する効果を実証されました。処理から6時間後、植菌されたステンレススチール試片上のH1N1ウィルスは検出限界を下回りました。8時間、12時間、または24時間で回復は観察されませんでした。チャンバー内の大気オゾンレベルは0.02 – 0.04 PPMの範囲でした。気化した過酸化水素の値は0.06 – 0.09 PPMの範囲でした。相対湿度は45 – 57%の範囲、温度は70 – 73°Fの範囲でした。

Based on the results of this preliminary study, it appears that the reactive oxygen species produced by the RCI™ cell are effective at inactivating *Influenza A H1N1* virus on inoculated stainless coupons under the conditions of these tests. Additional testing is recommended to evaluate other strains of the virus and other environmental surfaces and application parameters.

本予備研究の結果に基づき、本試験の条件下において、RCI™セルによって生成された活性酸素は、ステンレススチール試片上に植菌されたインフルエンザA H1N1ウィルスの不活性化に効果的であると認められます。他のウィルス変種、他の環境表面および応用パラメータを評価するために追加試験を推奨します。