

抗ウイルス性能評価試験の方法* (インフルエンザウイルス)

*本試験法は、ISO18184、JIS R 1706、JIS R 1756を参考に当試験室で作成したものです。

①ウイルスの調製 (図1)

インフルエンザウイルス (*Influenza A virus (H1N1)* A/PR/8/34株) を宿主細胞であるMDCK (Madin-Darby canine kidney cell) 細胞に感染させます(a)。培養後、90%以上の細胞変性効果 (cytopathic effect : CPE) が見られた時点で、培養上清を回収 (b) し、フィルター及び遠心分離により精製したものを、保存ウイルス液とします。

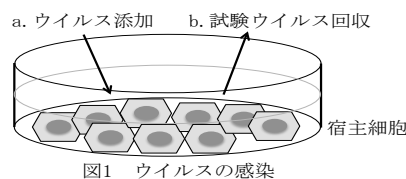


図1 ウイルスの感染

②毒性試験

試験中及び回収作業中に、試験サンプルに含まれる成分も同時に溶出されますので、それが宿主細胞を障害もしくは感染を阻害するおそれがあります。もし、このような細胞毒性があるサンプルの場合、正確に抗ウイルス活性を評価することができません。そのため、本試験の前に、試験サンプル自体の毒性を確認するために、毒性試験を推奨しています。

毒性がない場合は、本試験を行います。一方、毒性が認められる場合は、毒性の強さを考慮し、本試験の可否を判断します。

③試験方法 (図2, 3)

①の保存ウイルス液をりん酸緩衝液 (PBS) で、適当な濃度に希釈し (10倍以上)、これを試験ウイルス液とします。この試験ウイルス液150 μ l (必要に応じて、75~400 μ lまで変更可) を無加工品及び加工品に滴下し、密着フィルムを載せます (図2)。これらを、保湿環境下25 \pm 3 $^{\circ}$ Cで、仕様書の通り暗所静置及び光照射を行います (紫外光もしくは可視光、必要に応じてシャープカットフィルター使用、図3)。照射時間は、4時間を標準としています。所定時間静置後、試験ウイルス液を5mlのPBSにより回収します。0時間とは、ウイルスを接種後すぐに回収することを意味しています。

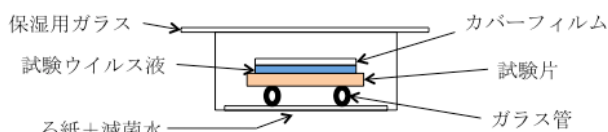


図2 試験サンプルの構成

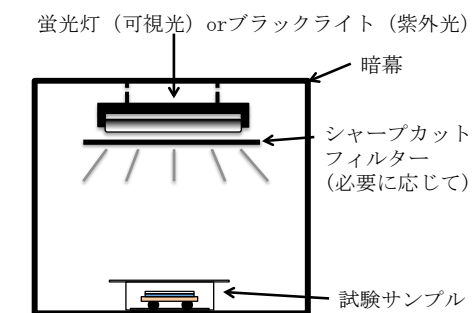


図3 光照射装置

④ウイルスの定量 (図4)

③で回収したウイルス液をPBSを用いて10倍の希釈系列を作成し、予め96穴プレートに培養しておいた感染価測定用のMDCK細胞に、50 μ lのウイルス希釈液を加えます。34 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下で4~5日間培養を行います。培養後、Viral ToxGlo Assay™ キット (プロメガ社) を用いた発光法により、それぞれのTCID₅₀ (50% Tissue Culture Infectious Dose : 宿主細胞のうち半分がウイルスに感染した時のウイルスの濃度) を測定します。

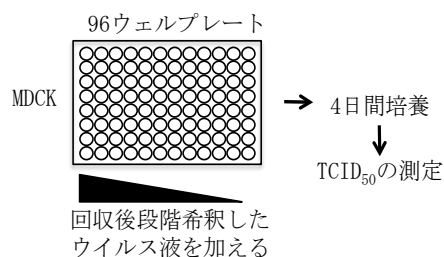


図4 ウイルスの定量

⑤抗ウイルス活性値の計算 (図5)

各水準で得られたTCID₅₀の値から下記の式により、抗ウイルス活性値 (V) を求めます。

明所でのウイルス活性値 (V_L) = log(B_L) - log(C_L)

暗所でのウイルス活性値 (V_D) = log(B_D) - log(C_D)

光照射による効果 (ΔV) = V_L - V_D

A : 0時間については、試験サンプルに吸着せず回収できているかの確認となります。

試験結果 (TCID₅₀/sample)

	0時間	Δ 時間	
		暗所	明所
無加工品	A	B _D	B _L
加工品		C _D	C _L

図5 典型的な試験結果の例 (n=1の場合)