

1. サンコーティング光触媒（液体）の 抗ウイルス効果評価試験

インフルエンザ (influenza) は、インフルエンザウイルスを病原とする気道感染症である。病原となるインフルエンザウイルスには A 型・B 型・C 型・D 型の 4 種類があり、そのうち A 型・B 型は季節性インフルエンザの病原ウイルスである。季節性インフルエンザは、世界中で繰り返し流行しており、日本では冬になると毎年のように流行がみられる。また、近年、新型コロナウイルスや、SARS、高病原性インフルエンザなど、新しいウイルスによる感染症が流行し、大きな社会問題となっている。

本試験では、サンコーティング光触媒（液体）をインフルエンザウイルス（H3N2 株）に作用させることで、ウイルスの感染力を低減させることができるかを評価した。

【評価サンプル】

サンコーティング光触媒（液体）（終濃度 25%）

【使用ウイルスおよび宿主細胞】

インフルエンザウイルス A 型（H3N2）A/Aichi/2/68, VR-1680 株
イヌ腎臓尿細管上皮（Madin-Darby canine kidney : MDCK）細胞

【使用培地】

細胞増殖培地 : Minimum Essential Medium (MEM) (含 1%ペニシリン-ストレプトマイシン、
10%ウシ胎児血清 (FBS) および非必須アミノ酸)

細胞維持培地 : Eagle's minimal essential Medium (EMEM) (含 10 mM HEPES buffer、0.125 %
FBS Fraction V、1 μ g/mL TPCK treated trypsin)

【方法】

◎宿主細胞の培養

インフルエンザウイルスの宿主となるイヌ腎臓尿細管上皮（Madin-Darby canine kidney : MDCK）細胞を、増殖培地を用いて、90%コンフルエントになるまで ϕ 10 cm ディッシュにて培養した。

◎ウイルス液の調製

90% コンフルエントになるまで培養した MDCK 細胞から増殖培地を除去し、ATCC 社より購入したインフルエンザウイルス A 型（H3N2）を 1 mL 接種し、CO₂ インキュベーター

(35°C、5% CO₂) で1時間インキュベートした。1時間後、維持培地を9 mL 添加し、CO₂ インキュベーター (35°C、5% CO₂) で3~7日間培養した。培養後、光学顕微鏡を用いて細胞の形態変化を観察し、ウイルス感染による形態変化が起こっていることを確認した。次に、培養上清を遠心分離 (1000 x g, 10分) し、得られた上清をウイルス液として試験に用いた。

◎ウイルス感染力評価試験

上記の方法で調整したウイルス液0.1 mL と評価サンプル0.9 mL を室温で5分間作用させた。その後、Bio-Beas SM-2 (BIO-RAD) を用いて、評価サンプルを除去後、維持培地で10倍に希釈し、これを作用液とした。作用液を維持培地でさらに10倍希釈していき、希釈列を作成した。

MDCK 細胞を、増殖培地を用いて、コンフルエントになるまでφ10 cm ディッシュにて前培養した。その後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、培地に再懸濁後、96穴プレートに1.0×10⁴ cells/well の濃度で播種し CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) でオーバーナイト培養した。

培養した MDCK 細胞から増殖培地を除去し、作用液の希釈液を100 μL ずつ、各希釈列8穴ずつに添加した。また、最後の列は比較対照のために、維持培地のみを添加した。ウイルスを感染させた細胞は、CO₂ インキュベーター (35°C、5% CO₂) で5~7日間培養した。培養後、ウイルスの感染による細胞変性を倒立顕微鏡下で確認し、細胞をクリスタルバイオレットで染色した。ウイルスの感染価 (TCID₅₀) は、Kerber の式を用いて算出した。

	原液	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰	培地のみ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ウイルスの希釈液を感染させた MDCK 細胞											ウイルス非感染
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

図 1-1 : 96 穴プレートにおけるウイルス感染イメージ

【結果および考察】

サンコーティング光触媒（液体）とインフルエンザウイルス A 型（H3N2）を 5 分間作用させたのち、インフルエンザウイルスの宿主細胞である MDCK 細胞に感染させ、ウイルスの感染価を評価した。その結果、サンコーティング光触媒（液体）を 5 分作用させたインフルエンザウイルスは、サンコーティング光触媒（液体）を作用させなかった場合と比較して、TCID₅₀ が 2 桁以上減少した。このことから、サンコーティング光触媒（液体）には、インフルエンザウイルス A 型（H3N2）の感染力を 99%以上低下させる効果があると判明した。

表 1-1：サンコーティング光触媒（液体）添加後のウイルス感染価

サンプル	作用時間	Log10 TCID ₅₀ / mL
サンコーティング光触媒 （液体）	0 分	7.18
	5 分	5.05

※JIS L 1922（繊維製品の抗ウイルス性試験方法）では、log TCID₅₀ が 2 以上減少すると、抗ウイルス効果があると判断される。

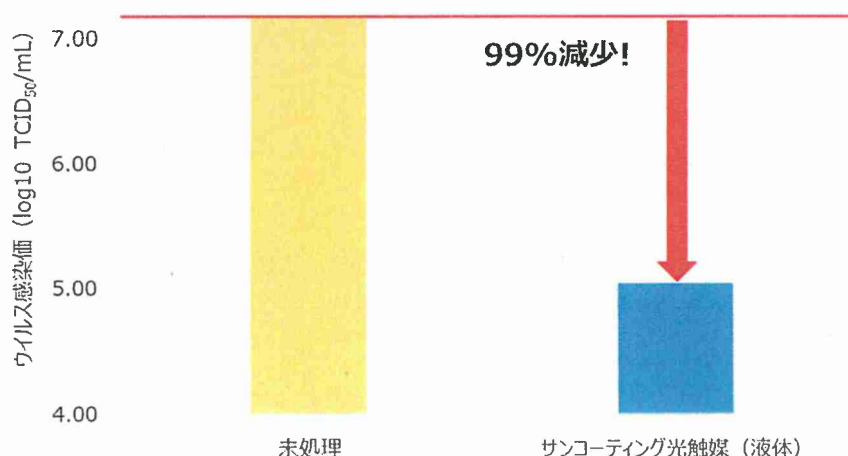


図 1-2：サンコーティング光触媒（液体）のインフルエンザウイルス感染力減少効果

参考

A



インフルエンザウイルス非感染細胞

B



インフルンフルエンザウイルス感染細胞

2021年2月25日

九州大学 大学院 環境農学部門

サステイナブル資源科学講座

森林圏環境資源科学研究分野

清水邦義 

サンコーティング光触媒の
抗ウイルス効果評価試験