

1. 試験目的

貴社ご提供白金ナノ粒子を加工したマスクの抗ウイルス性能を検討した。

2. 試験依頼者

名称：株式会社バイオフィェイス

所在地：京都府宇治市開町 39 番地の 2

3. 試験機関

財団法人 北里環境科学センター

所在地：神奈川県相模原市北里 1 丁目 15 番 1 号

4. 試験期間

平成 22 年 1 月 14 日～平成 22 年 1 月 20 日

5. 供試ウイルス

Influenza A virus (H1N1) (A 型インフルエンザウイルス)

6. 試験方法

本試験は、貴社担当者との打合せにより作成した試験仕様書を基に実施した。

1) 供試ウイルスの培養と調整方法

インフルエンザウイルスは発育鶏卵の漿尿膜腔に接種し、フラン器で培養後、漿尿液を採取し密度勾配遠心法により精製したウイルス液を供試ウイルス液とした。

2) 加工マスクおよび実験条件

加工マスク名称および作用時間の一覧を表-1 に示した。

表-1 試験条件一覧

試験品 (加工に用いた白金ナノ粒子溶液)	作用時間	
	0 時間	18 時間
サーマルボンド不織布	●	●
綿加工の時に付着させた不織布		●
スパンボンド不織布		●
未加工 (コントロール)		●

3) 試験手順

加工マスク（4cm×4cm）をプラスチックシャーレに入れ、供試ウイルス液 0.2mL を加工マスクに接種した。4cm 角のポリプロピレンフィルムで上面をカバーし、供試ウイルスと加工マスクとの接触効率を高めた（図-1）。乾燥しないように保湿した密閉容器に静置し、室温にて暗所で 18 時間作用させた。作用後、加工マスクをフィルムごとストマッカー袋に入れ、リン酸緩衝生理食塩水（PBS : phosphate buffered saline）10mL を加えた。ストマッカー袋中で加工マスクを揉み出す操作によりウイルスを誘出した。この溶液をウイルス感染価測定用試料の原液として用いた。

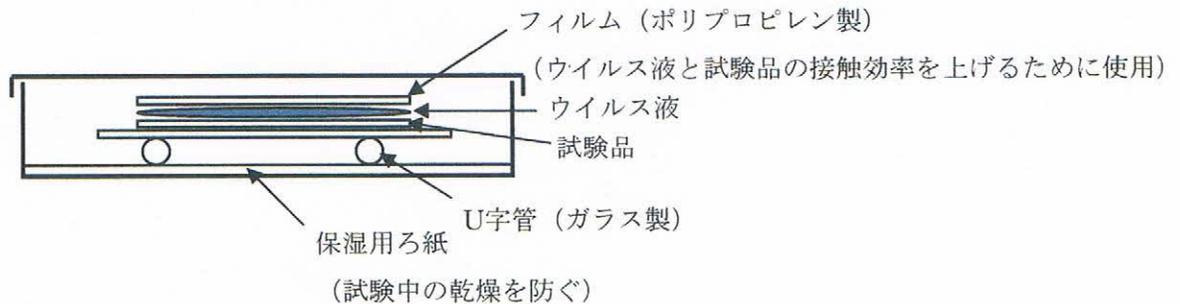


図-1 試験系概要

4) ウイルス定量法

ウイルス感染価測定用試料原液を PBS で 10 倍段階希釈した後、測定用試料原液または希釈液 50 μ L と 5% FBS を含む Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) に懸濁した Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞 50 μ L を 96 ウェルプレートに植え込んだ。その後、炭酸ガスふ卵器で 4 日間培養を行った。培養後、顕微鏡下で細胞変性効果 (cytopathogenic effect : CPE) を確認し、Reed-Muench 法を用いてウイルス感染価 (TCID₅₀/mL) を求めた。

7. 試験結果

ウイルス感染価の変化および感染価の減少値を表-2 に示した。未加工マスク（コントロール）に初期感染価（ 8.4×10^6 TCID₅₀/mL）のウイルスを接種し 18 時間作用させた場合、ウイルス感染価は 5.4×10^4 TCID₅₀/mL となり、 $2.2 \log_{10}$ のウイルス感染価減少値が認められた。

一方、加工マスクにウイルスを接種し 18 時間作用させた場合、ウイルス感染価はサーマルボンド不織布では 63 TCID₅₀/mL 以下（感染価減少値 $5.1 \log_{10}$ 以上）、綿加工の時に付着させた不織布およびスパンボンド不織布では 6.3 TCID₅₀/mL 以下（感染価減少値 $6.1 \log_{10}$ 以上）となった。18 時間作用後の各加工マスクと未加工マスクとの感染価減少値の差はサーマルボンド不織布で $2.9 \log_{10}$ 以上、綿加工の時に付着させた不織布およびスパンボンド不織布で $3.9 \log_{10}$ 以上であった。

加工マスク A においては、18 時間作用後のウイルス感染価の検出限界値が試験品から溶出した物質により、ウイルス感染価を測定する MDCK 細胞に対し毒性を示したため、検出限界値が 63TCID₅₀/mL になった。

8. コメント

本試験では貴社ご提供白金ナノ粒子加工マスクのインフルエンザウイルスに対する不活化効果を検討した。試験で用いたすべてのマスクにおいて 18 時間の作用で抗ウイルス効果が認められた。

白金ナノ粒子の抗ウイルス性については、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) および HBV での報告がある¹⁻³⁾。インフルエンザウイルスに対しても同様の作用により、抗ウイルス性を発揮している可能性が推測される。これらウイルスは、エンベロープを有しているため、エンベロープを持たないウイルスに対して抗ウイルス性を調べることも検討されたい。

参考文献

- 1) Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, Yacaman MJ. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology*. 2005, 29:3:6.
- 2) Lara HH, Ayala-Nuñez NV, Ixtapan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J Nanobiotechnology*. 2010, 20:8:1.
- 3) Lu L, Sun RW, Chen R, Hui CK, Ho CM, Luk JM, Lau GK, Che CM. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir Ther*. 2008, 13(2):253-262.

以上

表-2 作用後のウイルス感染価および感染価減少値

試験品 (加工に用いた白金ナノ粒子溶液)	感染価		感染価対数減少値	
	0 時間	18 時間	0-18hr ^{a)}	対コントロール ^{b)}
サーマルボンド不織布	8.4×10 ⁶	<63	>5.1	>2.9
綿加工の時に付着させた不織布		<6.3	>6.1	>3.9
спанボンド不織布		<6.3	>6.1	>3.9
未加工 (コントロール)		5.4×10 ⁴	2.2	0.0

感染価単位：TCID₅₀/mL

検出限界値：加工マスク A；63TCID₅₀/mL、加工マスク B および C；6.3TCID₅₀/mL

感染価対数減少値

a) 初期値からの減少

計算式： \log_{10} (初期感染価 ÷ 18 時間後の感染価)

b) 18 時間作用後の未加工マスクとの比較

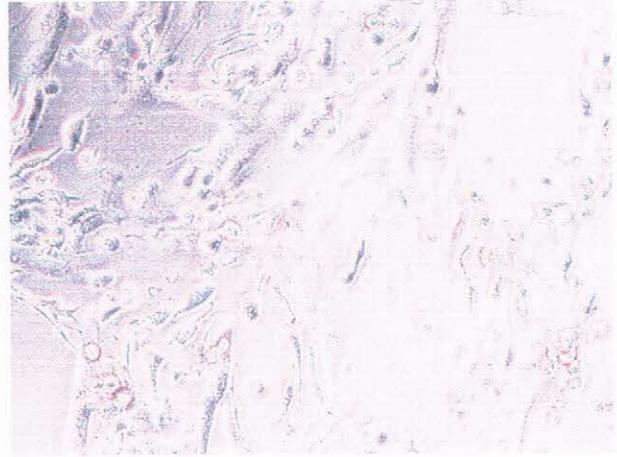
計算式： \log_{10} (未加工マスクの感染価 ÷ 加工マスクの感染価)

参考データ

インフルエンザウイルス感染による細胞変性効果



ウイルス非感染 MDCK 細胞



ウイルス感染 MDCK 細胞 (感染後 4 日)

ウイルスに感染していない細胞はシート状に生育しているが (写真左)、ウイルスに感染した細胞は、ウイルスの増殖により形態変化 (細胞変性効果) を起こしている (写真右)。