

1. 目的

貴社ご提供品 白金ナノ粒子溶液 (2 倍希釈液) によるコクサッキーウイルスおよびネココロナウイルスの不活化効果を評価した。

2. 依頼者

名 称：株式会社 バイオフェイス

所在地：〒611-0026 京都府宇治市開町 39-2

3. 試験機関

名 称：財団法人 北里環境科学センター

所在地：〒252-0329 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1

担 当：ウイルス部ウイルス課

4. 実施日

平成 23 年 7 月 15 日～平成 23 年 9 月 2 日

5. 試験品

白金ナノ粒子溶液 (2 倍希釈液)

6. 作用時間

0 分、60 分

7. 供試ウイルス

コクサッキーウイルス B6 (Coxsackie virus B6)

ネココロナウイルス (Feline enteric corona virus) 79-1683 株

8. 試験方法

1) 供試ウイルスの培養方法

ウイルスをウイルス培養細胞に感染させ、細胞培養面積の約 90%以上が細胞変性効果 (CPE : Cytopathic effect) を示したとき -80℃ の冷凍庫に凍結保存した。その後、凍結融解操作を 2 回繰り返して、3,500rpm で 10 分間遠心した上澄みを採取し、限外ろ過膜で濃縮精製したウイルス液を供試ウイルスとした。

2) 試験手順

試験管内に 900 μL の試験品と試験ウイルス液 100 μL をそれぞれ加え、ボルテックスでよく混合して、室温で所定の時間反応させた。所定時間作用後、直ちにこの混合液 100 μL を 0.2% のウシ胎児血清 (FBS : fetal bovine serum) を含む

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 9.9 mL に添加し、100 倍に希釈して試験品の作用を停止させた。この液をウイルス感染価測定用試料原液としてウイルス感染価を測定した。なお、作用時間 0 分の試料は試験品溶液の代わりにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS : phosphate buffered saline) を用いて実施した。

3) ウイルス感染価の測定

ウイルスの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ウイルス液 25 μ L をあらかじめ 96 穴プレートに単層培養しておいたウイルス感染価測定用細胞に加え、37°C の炭酸ガスふ卵器内で 1 時間静置した。静置後、0.2 % FBS を含む DMEM を 1 穴当たり 100 μ L 加え、37°C の炭酸ガスふ卵器内で 4 日間培養を行った。培養後、倒立顕微鏡下でウイルスの増殖による CPE を観察して Reed-Muench 法を用いてウイルス感染価 (TCID₅₀/mL) を求めた。

9. 試験結果

貴社ご提供試験品「白金ナノ粒子溶液」の 2 倍希釈液のкокサッキーウイルスおよびネココロナウイルスに対する不活化効果の検討試験を行った。кокサッキーウイルスの試験結果を表-1、図-1、ネココロナウイルスに対する結果を表-2、図-2 に示した。

1) кокサッキーウイルスに対するウイルス不活化効果

初期感染価 8.3×10^4 TCID₅₀/mL のウイルスをコントロール (PBS) に 60 分間作用させた場合、ウイルス感染価の変動はほとんど認められなかった。一方、試験品を 60 分間作用させた場合、感染価は検出限界値 (1.3×10^1 TCID₅₀/mL) 以下となり、3.8 log₁₀ 以上の感染価対数減少値が認められた。

2) ネココロナウイルスに対するウイルス不活化効果

初期感染価 2.7×10^4 TCID₅₀/mL のウイルスをコントロールに 60 分間作用させた場合のウイルス感染価は、初期値から変動しなかった。また、ウイルスを試験品に 60 分間作用させた場合、感染価は初期値からほとんど変動しなかった。

10. コメント

本試験で用いたкокサッキーウイルス、ネココロナウイルスはそれぞれ、口蹄疫ウイルス、SARS ウイルスの代替ウイルスとして認知されていない。しかし、本試験では以下の理由でそれぞれの代替ウイルスとして試験に用いた。

1) кокサッキーウイルス

偶蹄目の家畜における口蹄疫の原因となる病原体の口蹄疫ウイルスと同じピコルナ

ウイルス科に属し、ウイルスの構造が似ている。

2)ネココロナウイルス

SARS の原因となる病原体の SARS コロナウイルスと同じコロナウイルス科に属し、ウイルスの構造が似ている。

貴社ご提供品「白金ナノ粒子溶液 (2 倍希釈液)」は、白金ナノ粒子を用いた試験である。金属溶液による抗菌作用は、金属溶液中に溶出したイオンにより効果を示していることが知られている。特に、銀イオンによる抗菌作用については良く調べられており、その作用は酵素などのタンパク質や核酸に及ぶといわれている。しかしながら、ウイルス不活化効果についての情報はほとんど見られない。一方、金属イオンにおいては銅イオンがインフルエンザウイルスを不活化するという報告が見られる¹⁾。白金ナノ粒子から生じるイオンも銅イオンと同様の作用によりウイルスを不活化すると仮定した場合、本試験条件下では、コクサッキーウイルスに対しては作用時間 60 分間でウイルスを不活化させるために必要な遊離した白金イオン濃度が十分であったと推測される。一方、ネココロナウイルスに対しては不活化させるために必要な金属イオンが少なかったと推測される。ネココロナウイルスに関しては、白金ナノ粒子濃度の濃い試験品で試験すること等も検討されたい。

参考文献

- 1) Horie M *et al.* (2008) Inactivation and morphological changes of avian influenza virus by copper ions. *Arch Virol* 153, 1467-1472.

以上

表-1 コクサッキーウイルス感染価の経過変化

試験品	作用時間		感染価 対数減少値
	0 (初期)	60 分	
白金ナノ粒子溶液 (2 倍希釈)	8.3×10^4	$< 1.3 \times 10^1$	> 3.8
コントロール (PBS)		7.7×10^4	0.0

感染価単位：TCID₅₀/mL

検出限界値： 1.3×10^1 TCID₅₀/mL

感染価対数減少値計算式： \log_{10} (60 分後のコントロールの感染価 ÷ 試験品の感染価)

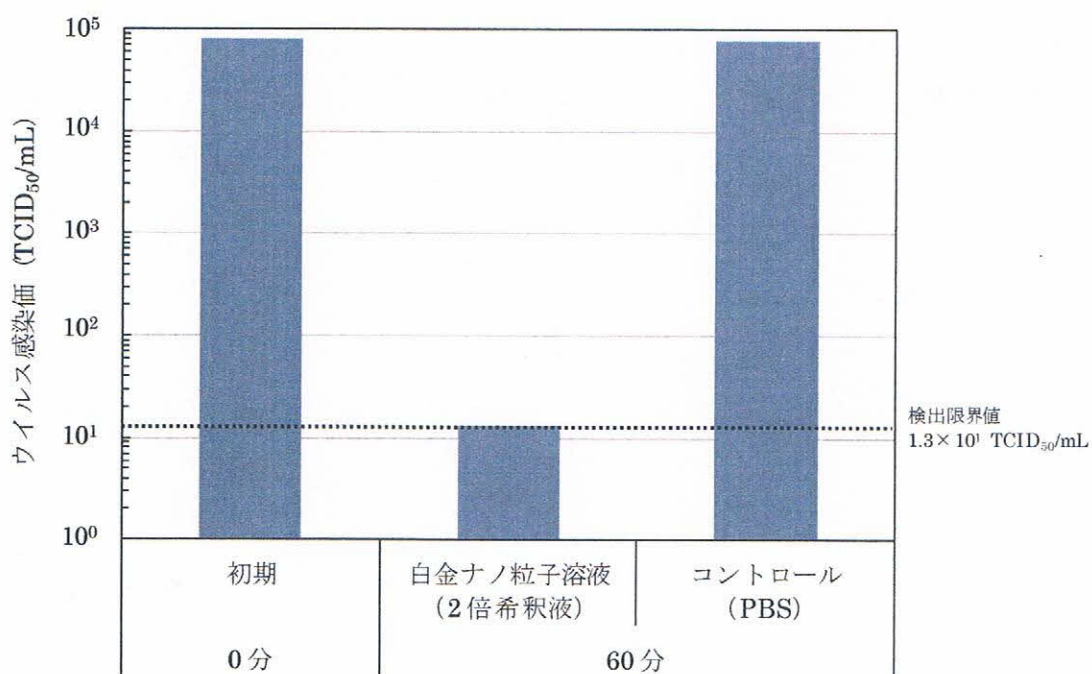


図-1 コクサッキーウイルス感染価の経時変化

表-2 ネココロナウイルス感染価の経過変化

試験品	作用時間		感染価 対数減少値
	0 (初期)	60 分	
白金ナノ粒子溶液 (2 倍希釈)	2.7×10 ⁴	1.3×10 ⁴	0.3
コントロール (PBS)		2.7×10 ⁴	0.0

感染価単位：TCID₅₀/mL

検出限界値：1.3×10¹ TCID₅₀/mL

感染価対数減少値計算式：log₁₀ (60 分後のコントロールの感染価÷試験品の感染価)

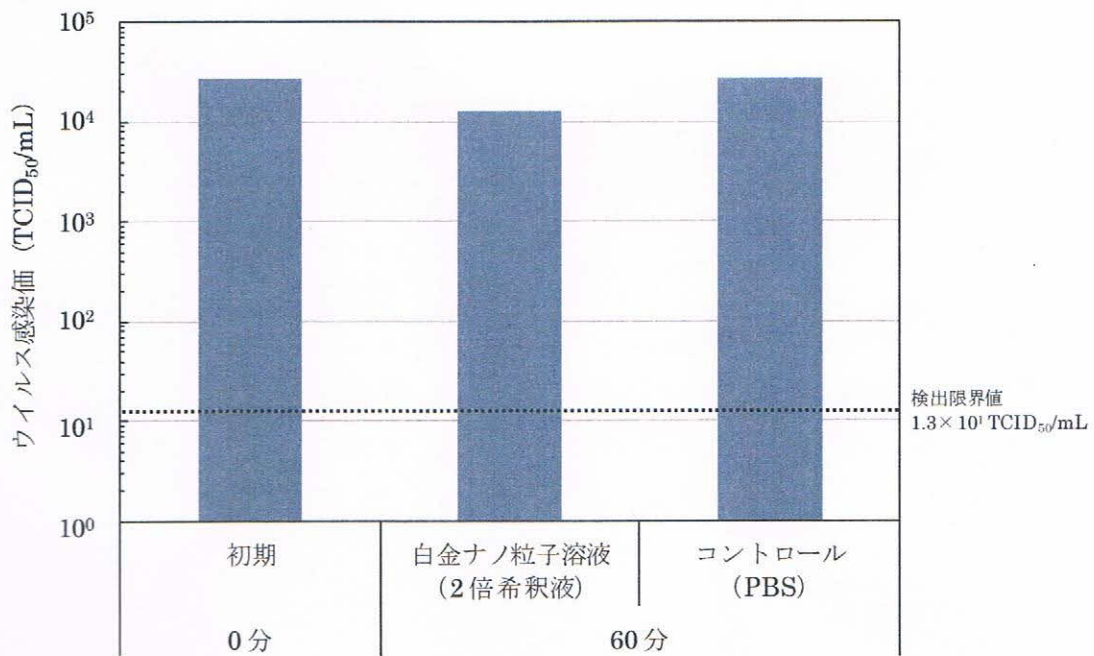


図-2 ネココロナウイルス感染価の経過変化