

1. ウイルス不活性化定量試験

①試験機関 北里大学 医療衛生学部

②試験内容 T-GSE PLUS のウイルス不活性化定量試験

③試験品 T-GSE PLUS

④ウイルスと細胞

- ・ influenza virus A 型/duck/Hokkaido/5/77 (H3N2)
- ・ MDCK 細胞

⑤試験方法

細胞毒性試験

ウイルス不活性化試験に先立って試験品の培養細胞に対する毒性濃度を測定し、不活性化試験が可能な薬剤濃度を検討した。試験品をリン酸緩衝液で希釈し、各濃度の調整液を培養細胞に接種した。1 時間後、これを除去してリン酸緩衝液で培養細胞を洗浄し、培養細胞の維持培地を加えて 3 日間培養した。細胞編成の有無から試験品の細胞毒性を判定した。

ウイルス不活性化定量試験

細胞毒性試験で得た細胞毒性濃度以下に調整した試験品の液 (10^4 倍希釈液) に、インフルエンザウイルスを $1/10$ 量加えた (ウイルスの最終濃度は 10^4 PFU/ml になるようにリン酸緩衝液で調整した)。作用温度は室温とし、作用時間は 5 分間、30 分間、1 時間及び 3 時間とした。作用液中の生残ウイルス量をブラック法で定量した。試験品の濃度 0% の作用液 (リン酸緩衝液) の生残ウイルス量を不活性化率 0% として、試験品のウイルス不活性化率を求めた。

⑥試験結果と評価

試験結果を表 1~2 に示す。

細胞毒性試験の結果、試験品は 10^3 倍希釈液で MDCK 細胞に対して細胞毒性効果を示し、 10^4 倍希釈液で細胞毒性効果を示さなかった。試験品を希釈し、細胞毒性濃度以下に調整した 10^4 倍希釈液にインフルエンザウイルスを作用させたところ、作用時間 5 分間でウイルス不活性化率は 99.98% 以上 (不検出) であった。

以上の結果から、試験品はインフルエンザウイルスに対して高い不活性化効果が認められる。

表 - 1 試験品の MDCK 細胞に対する細胞毒性効果

試験	試験品の希釈倍率					
	原液	× 10 ¹	× 10 ²	× 10 ³	× 10 ⁴	× 10 ⁵
1	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	-	-

+: 細胞変性を認める。

-: 細胞変性を認めず。

表 - 2 試験品のインフルエンザウイルスの不活性化効果

作用時間	作用液	試験	生残ウイルス PFU/ml	生残率%	不活性化率%
5分間	T-GSE PLUS (10 ⁴ 倍希釈液)	1	<5 不検出	<0.02	>99.98
		2	<5 不検出	<0.02	>99.98
	リン酸緩衝液 (対照)	1	2.5 × 10 ⁴	100	0
		2	2.3 × 10 ⁴	100	0
30分間	T-GSE PLUS (10 ⁴ 倍希釈液)	1	<5 不検出	<0.02	>99.98
		2	<5 不検出	<0.02	>99.98
	リン酸緩衝液 (対照)	1	2.4 × 10 ⁴	100	0
		2	2.3 × 10 ⁴ 1 0 ⁴	100	0
1時間	T-GSE PLUS (10 ⁴ 倍希釈液)	1	<5 不検出	<0.03	>99.97
		2	<5 不検出	<0.03	>99.97
	リン酸緩衝液 (対照)	1	2.0 × 10 ⁴	100	0
		2	1.8 × 10 ⁴	100	0
3時間	T-GSE PLUS (10 ⁴ 倍希釈液)	1	<5 不検出	<0.03	>99.97
		2	<5 不検出	<0.04	>99.96
	リン酸緩衝液 (対照)	1	1.7 × 10 ⁴	100	0
		2	1.4 × 10 ⁴	100	0

2. 最少発育阻止濃度(MIC)の測定

- ①試験機関 財団法人北里環境科学センター
- ②試験内容 T-GSE PLUS の最少発育阻止濃度(MIC)の測定
- ③試験品 T-GSE PLUS

④試験菌 (細菌)

Staphylococcus aureus IFO 12732
Esherrichia coli (O157:H7) ATCC 35150
Salmonera typhimurium ATCC 1311
Pseudomonas aeruginosa IFO 13736

(真菌)

Cadosporium cladosporioides IFO 6348
Aureobasidium pullulans IFO 6358
Penicillium funiculosum ATCC 9644

⑤使用培地

- ・感受性測定用ブイヨン(日水製薬)
- ・感受性培地(日水製薬)
- ・ポテトデキストロース寒天培地(栄研化学)

⑥試験結果

試験菌	MIC (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<0.3 8
<i>Esherrichia coli</i>	<0.3 8
<i>Salmonera typhimurium</i>	<0.3 8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.0
<i>Cadosporium cladosporioides</i>	0.75
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1.5
<i>Penicillium funiculosum</i>	0.75

⑦試験菌の解説

(細菌)

Staphylococcus aureus 黄色ブドウ球菌

グラム陽性通性嫌気性菌で、直径 $0.5\sim 1.5\mu\text{m}$ の球形の対および不規則集塊を形成する非運動性菌。自然界に広く分布し正常菌叢として皮膚、鼻粘膜に常在する。自然性感染菌として起病性を示す傾向が強い。主に可能症の原因菌が多く、抗生物質による治療がなされるが、罹患後でも免疫がほとんど出来ないため、MRSA に代表される抗生物質耐性菌が形成しやすい。

Escherichia coli 大腸菌

グラム陰性・通性嫌気性の桿菌で、直径 $1.1\sim 1.5\times 2\sim 6\mu\text{m}$ で短く肥満した形態を持つ。人および動物の腸管内に生息し、腸内細菌叢を形成している代表的な菌であるが、耐熱性の菌体抗原 (O 抗原) に由来する 0-157 の病原性が話題となっている。

Salmonera typhimurium ネズミチフス菌 (サルモネラ)

グラム陰性通性嫌気性桿菌で、直径 $2\times 0.5\mu\text{m}$ 、本属は血清学的分類によって 1000 種に区分される腸内細菌の一群で、本種は B 群サルモネラに分類される。ネズミなどのチフス症の原因菌で、人に食中毒を引き起こすきわめて代表的な菌種である。

Pseudomonas aeruginosa 緑膿菌

グラム陰性・好気性桿菌で、直径 $1.5\sim 3\times 0.5\sim 0.8\mu\text{m}$ 、両端が丸みを帯びた桿菌で、普通は菌体の一端に一本の鞭毛を持ち活発に運動する。自然界に広く分布し、水や下水などからよく検出され、人の皮膚特に腋下などにも検出される。元来病原性が弱い菌だが、一般に用いられる抗生物質に対して自然抵抗性を示す。そのため、慢性疾患や生体の抵抗力が弱まった時に生じる日和見感染を起こす代表的な菌種とされる。

(真菌) : カビ

Cladosporium cladosporioides クロカビ

風散布性の分生子を大量に産生、飛散する空中浮遊菌として最も多く検出される。湿潤な環境に生息し、結露を起こす外壁・台所などの水回り周辺を顕著に汚染する。

Aureobasidium pullulans 黒色酵母様菌

住環境でよく見られる暗色性不完全菌類。プラスチック等、合成高分子の変質、劣化の原因菌で、モルタル、コンクリート、タイルの目地、ビニールクロス、冷蔵庫のパッキンを顕著に汚染する。

Penicillium funiculosum アオカビ

帚状に発達した分生子形成細胞を特徴とする不完全菌類で、各所の気質に生息する。やや低温性で、温帯から寒帯にかけて分布する。古くから知られている菌で、代謝産物の探索やマイコトキシン（カビ毒）に関する研究が進んでいる。本種については、マイコトキシン産生菌ではないが、耐冷性があり冷凍食品などの汚染菌として分離された例がある。