

表-1 作用液のウイルス感染価測定結果

| 試験<br>ウイルス      | 対象 | log TCID <sub>50</sub> /ml* |      |      |      |      |
|-----------------|----|-----------------------------|------|------|------|------|
|                 |    | 開始時                         | 15秒後 | 30秒後 | 60秒後 | 3分後  |
| インフルエンザ<br>ウイルス | 検体 | 7.0                         | <1.5 | <1.5 | <1.5 | <1.5 |
|                 | 対照 | 7.0                         | ***  | ***  | ***  | 6.6  |

TCID<sub>50</sub>: median tissue culture infectious dose, 50 %組織培養感染量

\* 作用液1 ml当たりのTCID<sub>50</sub>の対数値

開始時: 作用開始直後の対照のTCID<sub>50</sub>を測定し, 開始時とした。

対照: 精製水

作用温度: 室温

ウイルス浮遊液: 精製水で10倍に希釈したもの

<1.5: 検出せず

\*\*\*: 試験実施せず

## 6 試験方法

### 1) 試験ウイルス

インフルエンザウイルスA型(H1N1)

### 2) 使用細胞

MDCK(NBL-2)細胞 ATCC CCL-34株[大日本製薬株式会社]

### 3) 使用培地

#### ① 細胞増殖培地

イーグルMEM培地「ニッスイ」①[日水製薬株式会社]に牛胎仔血清を10 %加えたものを使用した。

#### ② 細胞維持培地

以下の組成の培地を使用した。

|                        |          |
|------------------------|----------|
| イーグルMEM培地「ニッスイ」①       | 1,000 ml |
| 10 %NaHCO <sub>3</sub> | 14 ml    |
| L-グルタミン(30 g/l)        | 9.8 ml   |
| 100×MEM用ビタミン液          | 30 ml    |
| 10 %アルブミン              | 20 ml    |
| 0.25 %トリプシン            | 20 ml    |

#### 4) ウイルス浮遊液の調製

##### ① 細胞の培養

細胞増殖培地を用い、使用細胞を組織培養用フラスコ内に単層培養した。

##### ② ウイルスの接種

単層培養後にフラスコ内から細胞増殖培地を除き、試験ウイルスを接種した。次に、細胞維持培地を加えて37℃±1℃の炭酸ガスインキュベーター(CO<sub>2</sub>濃度：5%)内で1～5日間培養した。

##### ③ ウイルス浮遊液の調製

培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞の形態を観察し、細胞に形態変化(細胞変性効果)が起きていることを確認した。次に、培養液を遠心分離(3,000 r/min, 10分間)し、得られた上澄み液を精製水で10倍に希釈し、ウイルス浮遊液とした。

#### 5) 試験操作

検体1 mlにウイルス浮遊液0.1 mlを添加、混合し、作用液とした。室温で作用させ、15、30及び60秒並びに3分後に細胞維持培地を用いて10倍に希釈した。

なお、精製水を対照として同様に試験し、開始時及び3分後について測定を行った。

#### 6) ウイルス感染価の測定

細胞増殖培地を用い、使用細胞を組織培養用マイクロプレート(96穴)内で単層培養した後、細胞増殖培地を除き細胞維持培地を0.1 mlずつ加えた。次に、作用液の希釈液0.1 mlを4穴ずつに接種し、37℃±1℃の炭酸ガスインキュベーター(CO<sub>2</sub>濃度：5%)内で4～7日間培養した。培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞の形態変化(細胞変性効果)の有無を観察し、Reed-Muench法により50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)を算出して作用液1 ml当たりのウイルス感染価に換算した。

以 上