

【実験材料】

1、被検試料: Kyoto style 301: 株式会社バイオシールドサイエンスより提供を受けた。

2、ウイルス:

鳥インフルエンザウイルス A/whistling swan/Shimane/499/83 (H5N3) 株

1983年大槻らが島根県に飛来したコハクチョウの糞から分離した弱毒の H5 亜型ウイルスを用いた。本ウイルス株はヒナを継代することにより強毒化させることに成功している。本試験に用いたウイルスの力価は、 $10^{9.5}$ EID₅₀/0.2ml である。

3、使用鶏卵:

SPF10 日齢発育鶏卵

栃木県青木種鶏場から SPF 有精卵を購入し、本研究センターで孵卵して実験に供した。

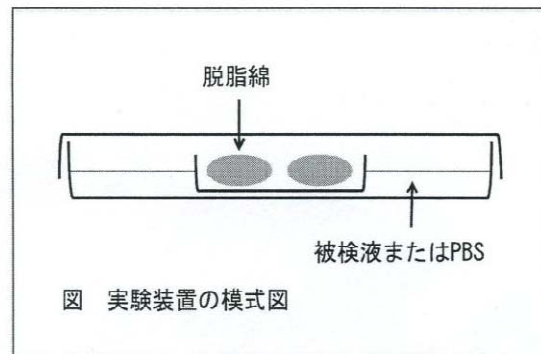
【方法】

(1) 予備試験

被検試料を原液および滅菌イオン交換水にて、10、100 倍に希釈し、被検溶液とした。滅菌イオン交換水にて $10^{7.5}$ EID₅₀/0.2ml に調整したウイルス液と被検溶液を等量混合し、室温(25°C)で 30 分静置し、反応させた。その後、混合液を、10 日齢発育鶏卵漿尿膜腔内に 0.2 ml 宛接種した。これらの発育鶏卵をさらに 37°C で 2 日間孵化を続行した後 4°C に一夜置いた。漿尿液を採取し、HA 試験により漿尿液中のウイルスの増殖を判定した。

(2) 本試験

後述の図に示したように、直径 90mm のシャーレの中に直径 60mm のシャーレを設置した。PBS で 100 倍に希釈したウイルス液 1ml を脱脂綿にしみ込ませ、60mm のシャーレの中に置き、90mm のシャーレに被検液を 10ml 入れ、シャーレを密閉し、室温(25°C)および 37°C で静置し反応させた。また、陰性対照として被検液の代わりに PBS を用い、同様にウイルス液と反応させた。8、30、60 または 120 分後、脱脂綿よりウイルス液を回収し PBS で 10 倍階段希釈し、10 日齢発育鶏卵漿尿膜腔内に 0.2 ml 宛接種した。これらの発育鶏卵をさらに 37°C で 2 日間孵化を続行した後 4°C に一夜置いた。漿尿液を採取し、HA 試験により漿尿液中のウイルスの増殖を判定した。ウイルス力価は Reed and Muench の方法により算出した。



【結果】

(1) 予備試験

原液および 10 倍希釈した被検溶液は、ウイルス増殖が認められなかったので、被検試料にウイルス不活化効果があると考え、以下の本実験を行った。

(2) 本試験

試験結果を表に示す。陰性対照として被検液の代わりに PBS を加え 120 分間で反応させた時の残存ウイルス力価は、室温(25℃)および 37℃ともに $10^{4.75}$ EID₅₀/0.2 ml であった。一方、被検溶液とウイルス液を反応させた場合、室温(25℃)および 37℃ともに、すべての反応時間で残存ウイルス力価は検出限界以下($\leq 10^{0.5}$ EID₅₀/0.2 ml)であった。

表 Kyoto style 301 の抗鳥インフルエンザウイルス活性

温度(℃)	残存ウイルス力価(log ₁₀ EID ₅₀ /0.2 ml)			
	反応時間(分)			
	8	30	60	120
25	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5 (4.75*)
37	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5 (4.75)

*陰性対照の残存ウイルス力価を括弧内に示した。

【結論】

以上の結果から、Kyoto style 301 は、H5N3 亜型鳥インフルエンザウイルスに対して気相で 8 分間以上反応させることによって、ウイルス不活化効果を示すことが明らかとなった。