

2015年 10月 31日

## 試験報告書

『ウイルス不活化に対するプロアントシアニジンの効果』に関する報告

東京工業大学大学院生命理工学研究科

岩澤 篤郎



## 供試プロアントシアニジンのウイルス不活化効果 結果報告

### 試験方法

#### 1. 供試サンプル

供試サンプルは、提供された以下のものを使用した。

- ✓ 「葡萄のちからplus」・・・以下サンプルα
- ✓ 「葡萄のちからplus」よりプロアントシアニジンを除いたもの・・・以下サンプルβ

#### 2. 試験ウイルス液

試験に用いたウイルスは、保有しているRNAウイルス、DNAウイルスからエンベロープの有無を考慮し、以下のウイルスを使用した。

- ✓ ネコカリシウイルス FCV/F9 (RNAウイルス・エンベロープなし)  
ネコカリシウイルスは、ネコの代表的な呼吸器感染症の一つである。このウイルスは、現在まで細胞培養ができないヒトノロウイルスの代替ウイルスとして実験・研究に使用されている。
- ✓ インフルエンザウイルス A/USSR/92/97 (RNAウイルス・エンベロープあり)  
インフルエンザウイルスは、毎年流行するインフルエンザを引き起こす原因ウイルスである。使用した株はソ連株である。
- ✓ アデノウイルス3型 Ad.3 (DNAウイルス・エンベロープなし)  
アデノウイルスは、咽頭炎・結膜炎・感冒や肺炎等の呼吸器疾患・胃腸炎など多様な感染症を引き起こすウイルスである。アデノウイルス3型は呼吸器感染症に関係するウイルスである。
- ✓ 単純ヘルペスウイルス1型(HF株) HSV-HF (DNAウイルス・エンベロープあり)  
単純ヘルペスウイルスは、歯肉口内炎や口唇ヘルペス、角結膜炎、脳炎の原因となるウイルスである。使用した株は1型である。

#### 3. 感受性細胞と使用培地

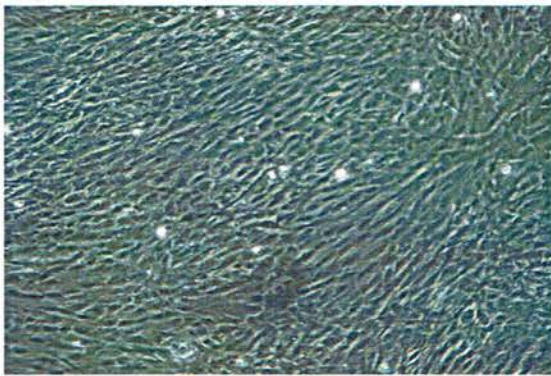
感受性細胞として、ネコカリシウイルス FCV/F9はCRFK細胞(JCRB9035)、インフルエンザウイルス A/USSR/92/97はMDCK細胞、アデノウイルス Ad.3 はA549細胞、単純ヘルペスウイルス HSV-HFはVero細胞を用いた。細胞増殖用培地は、CRFK細胞、A549細胞はEagle's MEM with non-essential A.A. and 10% FBS を、MDCK細胞とVero細胞はEagle's MEM with 5% FBSを使用し、継代時には 0.25% trypsin and 0.02% EDTA in PBS(-)を用いた。ウイルス感染後の維持培地には、増殖用培地のFBS量を1%にしたものを使用した。

#### 4. 試験方法

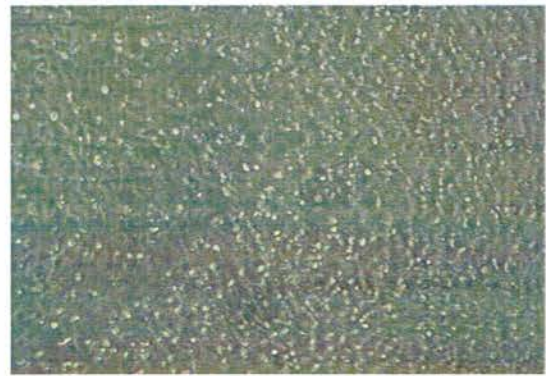
抗ウイルス効果は、以下の方法で実施した。

- ① 試験ウイルス液は、維持用培地で作成したものを分注、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存したものを実験前に溶解し、ウイルス液としてそのまま使用した。
- ② 試験実施日にあわせ、感受性細胞を96 well plateに播き、 $37^{\circ}\text{C}$  5% $\text{CO}_2$ インキュベーター内で培養した。
- ③ 供試液  $900\ \mu\text{l}$ にウイルス液  $100\ \mu\text{l}$ を混合し、10秒、60秒後に混合液  $20\ \mu\text{l}$ を採取し、維持用培地  $180\ \mu\text{l}$ に添加、さらにこの10倍希釈系列を作成した。この10倍希釈系列から  $10\ \mu\text{l}$ を96 well plateに添加し、 $\text{CO}_2$ インキュベーター内で4~10日培養した。倒立顕微鏡下で以下に示す細胞変性効果(CPE)を観察し、ウイルス力価( $\text{TCID}_{50}/10\ \mu\text{l}$ )を計算した。

CRFK細胞



ネコカリシウイルスFCV/F9感染CRFK細胞



MDCK細胞



インフルエンザウイルス感染MDCK細胞



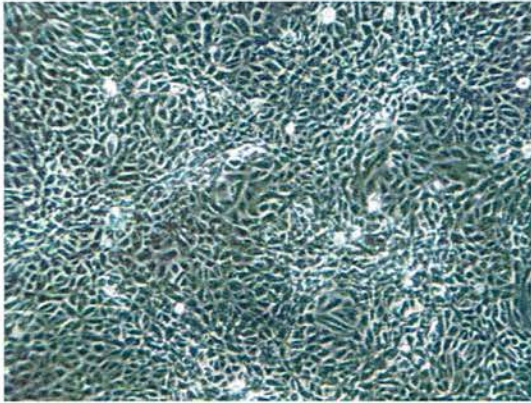
A549細胞



アデノウイルス感染A549細胞



Vero細胞



単純ヘルペスウイルス感染Vero細胞



5. 試験結果

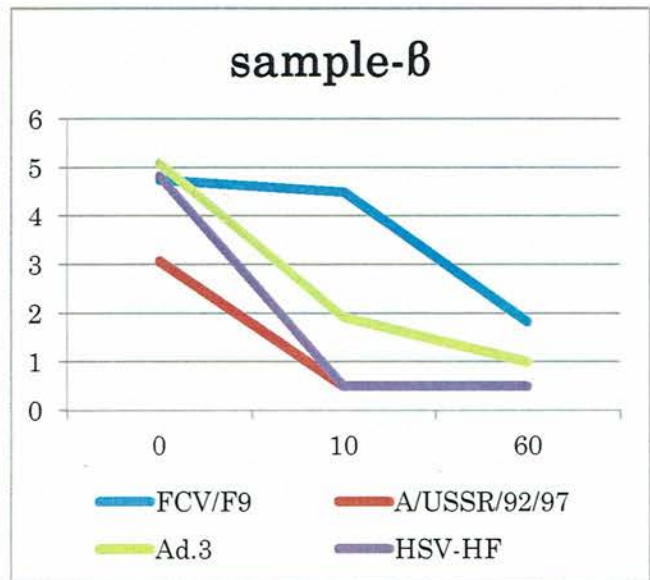
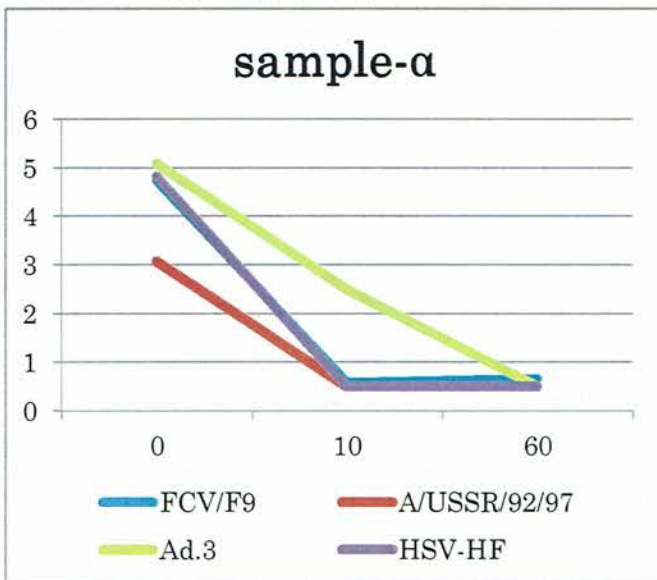
抗ウイルス効果の結果は、以下に示すようになった。

	FCV/F9		A/USSR/92/97		Ad.3		HSV-HF	
	10sec.	60sec.	10sec.	60sec.	10sec.	60sec.	10sec.	60sec.
Sample- $\alpha$	0.585	0.665	0.5	0.5	2.5	0.5	0.5	0.5
Sample- $\beta$	4.5	1.83	0.5	0.5	1.915	1	0.5	0.5
cont.	4.75		3.085		5.085		4.83	

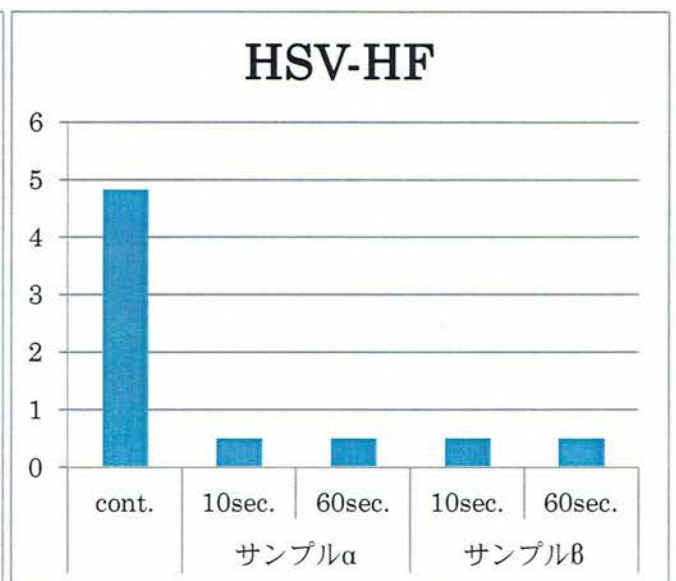
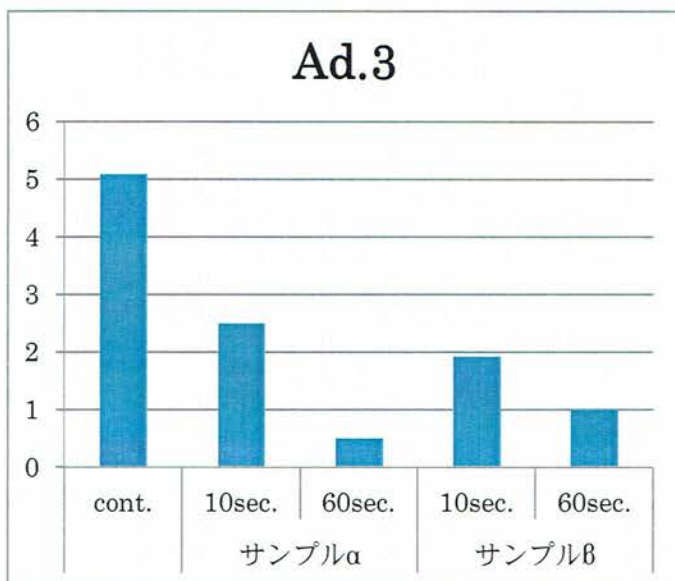
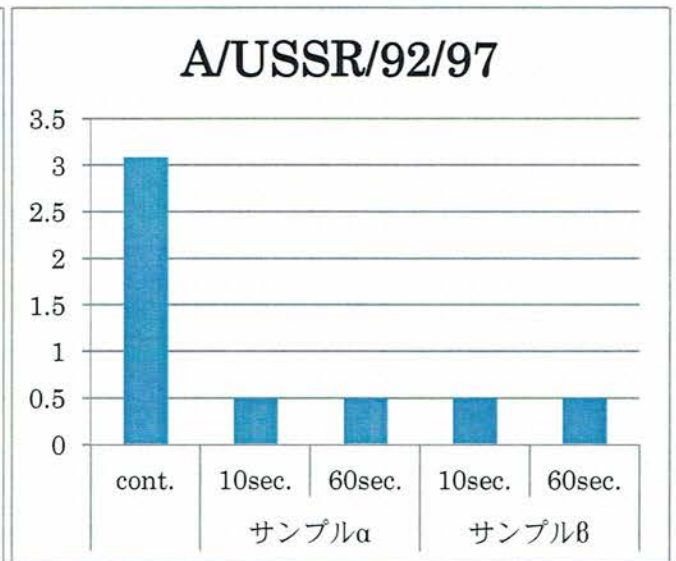
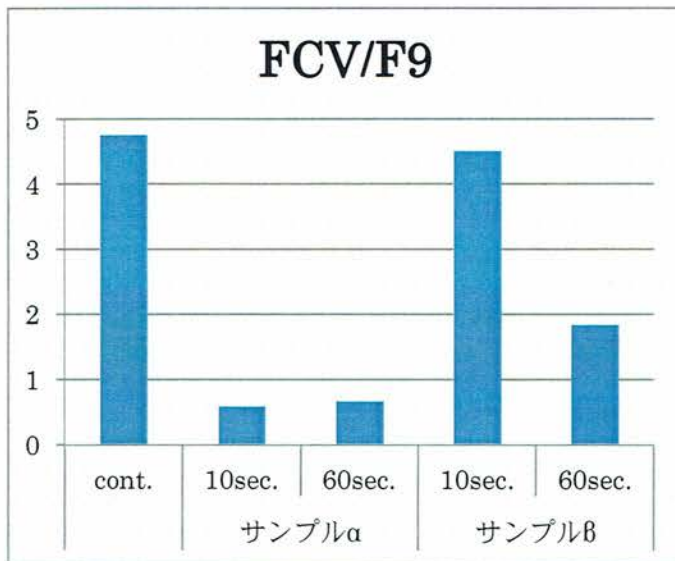
[TCID<sub>50</sub>/10 $\mu$ l ]

0.5は検出限界以下である。

サンプルの違いで図示した。



ウイルスごとに図示した。



以上、「葡萄のちからplus」は、エンベロープを有するインフルエンザウイルスや単純ヘルペスウイルスに効果的であるだけでなく、エタノールだけでは効果の低いエンベロープのないネコカリシウイルスやアデノウイルスに対しても十分な効果が認められた。

本報告書は、私が実施した結果に基づいて作成したものに相違ありません。

平成 27 年 10 月 31 日

試験実施者：岩澤 篤郎

岩澤 篤郎

