

スーパーミチタンの抗トリインフルエンザウイルス作用の調査

1. ブラック法による検査

材料と方法

A. 材料

- ・使用ウイルス

本研究ではトリインフルエンザウイルス（H5N3 型）を用いた。実験に用いる際ウイルス力価を 1,000～2,000 PFU/0.1ml に調整した。

- ・MDCK 細胞

本研究においてウイルスの培養には MDCK 細胞を用いた。

- ・スーパーミチタン

- ・PBS

- ・1×MM（維持培地）

- ・2×MM

- ・1.8%Bact Agar

- ・1%トリプシン（終濃度を 0.0005%になるように加える。）

- ・MDCK 細胞がフルシートになっている 6 穴プレート

- ・0.8% Crystal violet、50%Et-OH

- ・4%パラホルアミド

B. 方法

ブラック作成

1. 滅菌した PBS 10にスーパーミチタンを 1.1W%になるように加え、スターラーで混合した。
2. スターラーで混合したものを 10 分程静置した。その上清を採取しルミチタン溶解液として使用した。
3. トリインフルエンザ 0.1ml とルミチタン溶解液 0.9ml をローテーターで混合し、0, 15,

30分後にサンプリングした。コントロールとして、トリインフルエンザ 0.1ml と PBS 0.9ml を混合したのもでも同様の操作を行った。

4. 6 穴プレートの培地をアスピレーターで除去し、各穴に 2ml の 1×MM をいれて細胞を洗浄し、再びアスピレーターで除去した。
5. サンプリングした各混合液 0.1ml/1 穴を接種した。
6. 37°C で 1 時間インキュベートし、生残したウイルスを吸着させた。
7. この間に MM - Ager 混合液を準備する。40°C のウォーターバスを用意し、1.8% Bact Agar を溶解後、2×MM と 1.8% Bact Agar 液をウォーターバスで 40°C に温めてから、各液を等量混合した。トリプシンは重曹直前に 0.0005% 濃度になるように加えた。
8. ウイルス液をアスピレーターで吸い取った。
9. 各穴に 2ml の 1×MM をいれて細胞を洗い、再びアスピレーターで除去した（吸着しなかったウイルスを除去）
10. MM - Ager 混合液を各穴に 2ml 入れた。
11. 固化後、37°C の CO₂ インキュベーターで 3 日間静置した。

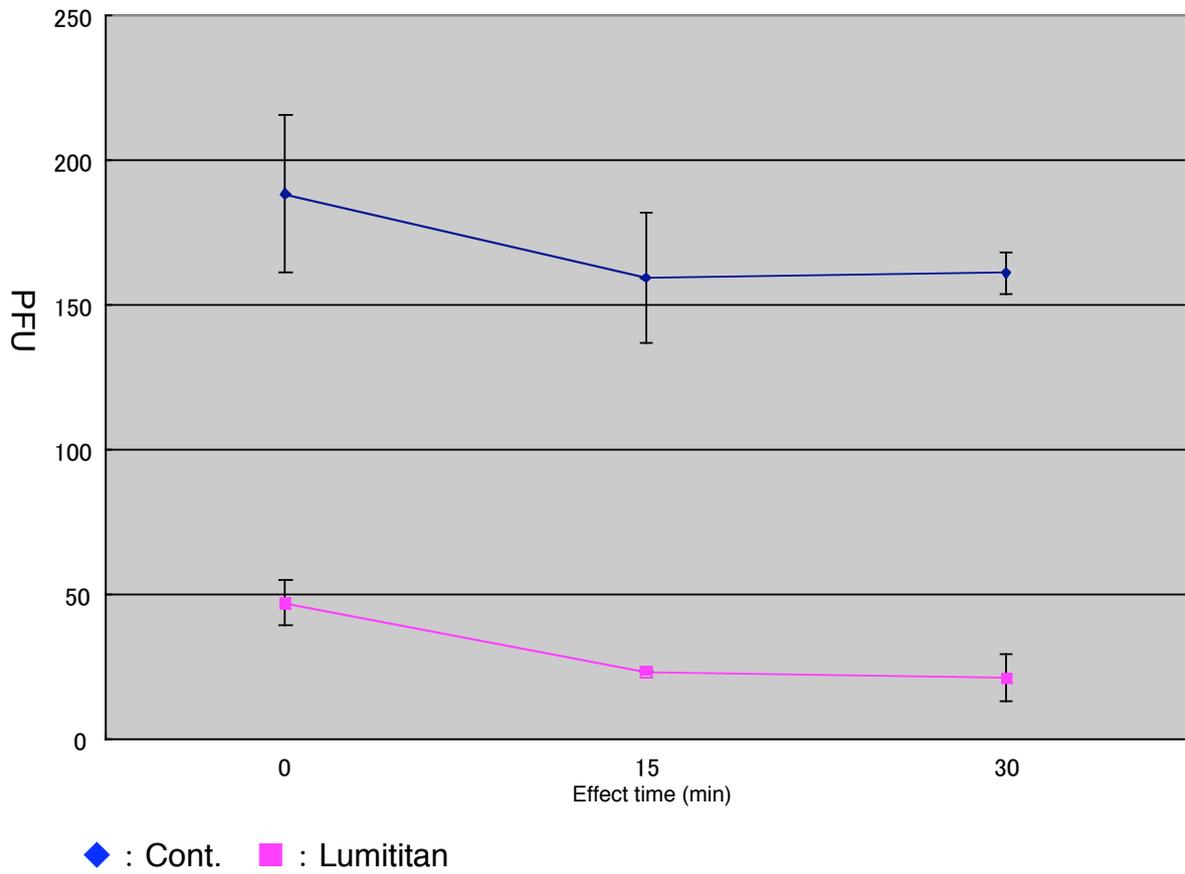
固定、染色

1. 4% パラホルアミドを各穴 2ml 入れて、30 分静置し、固定を行った。
2. 4% パラホルアミドを捨て、ゲルを除去し、0.8% Crystal violet を各穴 0.5ml 入れて 30 分静置し、染色した。
3. 細胞面をはがさないように洗浄し、ブラック数の測定を行なった。

結果と考察

今回の結果からは、スーパーミチタンはトリインフルエンザウイルスを混合直後から抗ウイルス作用を示した。その抑制は、混合 15 分後でほぼピークに達し、その後のウイルス価の変化はわずかであった。ピーク時の抑制は、ウイルスの力価を 10 分の 1 (90%) にした。

Effect of Lunititan on plaque formation by Avian influenza virus



	Effect time	1	2	3	Average	SD
Cont.	0	205	203	157	188.3	27.2
	15	185	149	144	159.3	22.4
	30	158	169	156	161.0	7.0
Lunititan	0	44	41	56	47.0	7.9
	15	23	23	24	23.3	0.6
	30	13	21	29	21.0	8.0