

次亜塩素酸水の抗ウイルス効果の検討

1. 目的: 次亜塩素酸水のインフルエンザウイルス消毒効果検証

2. 材料:

- 細胞: MDCK細胞(インフルエンザウイルス用)、RD-A細胞(エンテロウイルスA71用)
ウイルス: 1. A型 インフルエンザウイルス (PR8株) 【エンベロープあり】
2. エンテロウイルスA71 (EV-A71) 【手足口病の原因ウイルス、エンベロープなし】
次亜塩素酸水(非電解型、濃度: 80ppm)

3. 実験手順

A) 細胞とウイルスの準備:

- 凍結保存中のMDCK細胞を融解し、培養する。一部、凍結保存する。
- インフルエンザウイルスPR株をMDCK細胞に接種し(MOI:0.1)、増殖させ、ウイルスストックを作成する。
ウイルスストックの力価をplaque assay法を用いて測定する。
- RD-A細胞とEV-A71は Sci Rep (2020) 10:159 で作成したストックを使用する。

B) 次亜塩素酸水消毒効果検証(ウイルス感染力価の減少により判定)

- 細胞用意: MDCK細胞を6well plateに培養、subconfluent monolayer細胞を2回washする
- 次亜塩素酸水を希釈する。

| | | | | | | |
|---------------------------|------|-----|-----|-----|------|------|
| 最終濃度 (ppm) : | 80 | 60 | 40 | 20 | 10 | 0 |
| ddH ₂ O (μL) : | 0 | 300 | 600 | 900 | 1050 | 1200 |
| 次亜塩素酸水 (80ppm, μl) : | 1200 | 900 | 600 | 300 | 150 | 0 |

- ウイルスとの反応: 次亜塩素酸水 190μ + ウイルス液 10μl (10⁵⁻⁶ plaque forming units (PFU))
反応時間: 20秒、40秒、1分、2分、5分

- 次亜塩素酸水の中和: 0.01M チオ硫酸ナトリウム含有培地で7倍希釈
(0.01M チオ硫酸ナトリウム含有培地1200μlを(3)に入れる)

(5) 反応液中のウイルス力価の測定 (PR用)

- 反応液500μLをMDCK細胞に接種し、37℃、1時間インキュベート。
- 反応液を吸引除去し、細胞表面をを維持培養液で洗浄したのち、0.8%アガロース*を重層、アガロースが固まったのち、CO₂インキュベーター内で37℃、2-3日間培養する。
- 酢酸エタノール(酢酸1:エタノール5)で細胞を固定したのち、アガロースを吸引除去する。
- 細胞を0.5%アミドブラック10Bで30分間染色する。

*0.8% アガロース

| | |
|-----------------------------------|--------------------|
| 2XMEM | 50ml |
| 3% L-glutamine | 1ml |
| 10% BSA | 1ml |
| 100X MEM vitamin solution (Gibco) | 1ml |
| 0.25% trypsin in PBS(-) (Sigma) | 0.25ml (45℃温浴にて維持) |

1.6%アガロースをautoclaveし、45℃温浴にて維持、
使用直前に、使用直前に上記培養液に100mlになるまで添加する。

(6) 反応液中のウイルス力価の測定 (EV-A71用)

50%組織培養細胞感染率(Tissue culture infectious dose 50: TCID₅₀)にてウイルス力価を測定する。
(参照:Sci Rep (2020) 10:159)