

《別紙参考資料①》

## 試験報告書

---

「in vitro 抗インフルエンザウイルス活性評価試験」

20XX年 XX月 XX日



# 試験報告書(例)

題目: in vitro 抗インフルエンザウイルス活性評価試験

試験番号: AVS-XXX-XXXXXX

試験内容: 例として、2種の被験物質(a)、(b)について、培養細胞を用いたin vitroウイルス感染系にて「抗インフルエンザウイルス活性」並びに「細胞毒性」について評価した結果についての試験報告を以下に示します。

試験材料: ウイルス株 >>> A型インフルエンザウイルス (株名: A/WSN/33, H1N1)  
細胞株 >>> MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) 細胞

試験方法: ① 試験プロトコール: MDCK細胞を96ウェルプレートに播種する。  
細胞数:  $3.0 \times 10^4$  cells/well  
培養液: MEM-10%FBS, 100  $\mu$ L/well  
↓  
37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにて24時間培養する。  
↓  
被験物質の段階希釈系列を100  $\mu$ L/wellで添加する。  
ウイルス液(1000 TCID<sub>50</sub>/mL)を100  $\mu$ L/wellで添加する。  
↓  
37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにて72時間培養する。  
↓  
培養上清を除去する。  
↓  
70%エタノールを200  $\mu$ L/wellで添加する。  
↓  
室温で5分間静置する(細胞の固定)。  
↓  
70% エタノールを除去する。  
↓  
0.5% クリスタルバイオレット溶液を200  $\mu$ L/wellで添加する。  
↓  
室温で5分間静置する(細胞の染色)。  
↓  
クリスタルバイオレット溶液を除去し、水で軽く洗浄した後、風乾させる。  
↓  
マイクロプレートリーダーで各wellの560 nmにおける吸光度を測定する。

※本評価系の詳細については別紙「～抗インフルエンザウイルス活性評価試験について～」もご参照ください

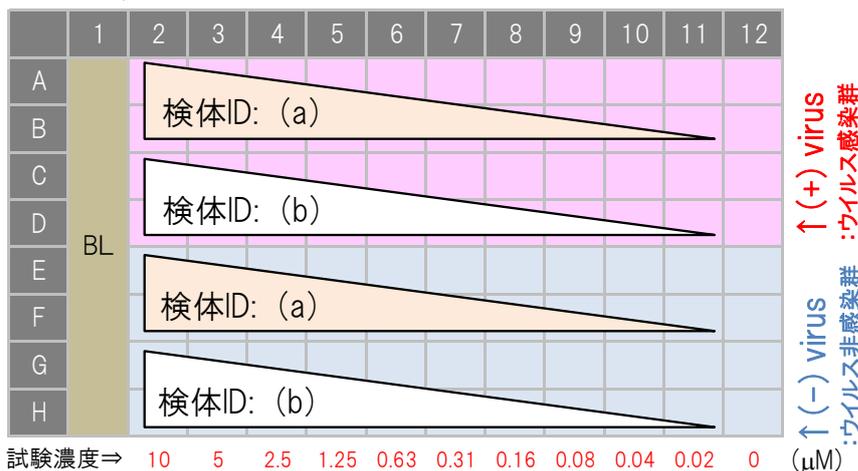
② 試験レイアウト:

《被験物質の段階希釈系列》

※被験物質は、最高試験濃度を設定し、そこから任意の段階希釈系列を調製後、評価系に添加いたします。

例として、2種の被験物質(a)、(b)について10  $\mu$ Mを最高試験濃度した2倍段階希釈系列を計10濃度調製し、N数=2 (duplicate)で実施した際の試験レイアウトを以下に示します。

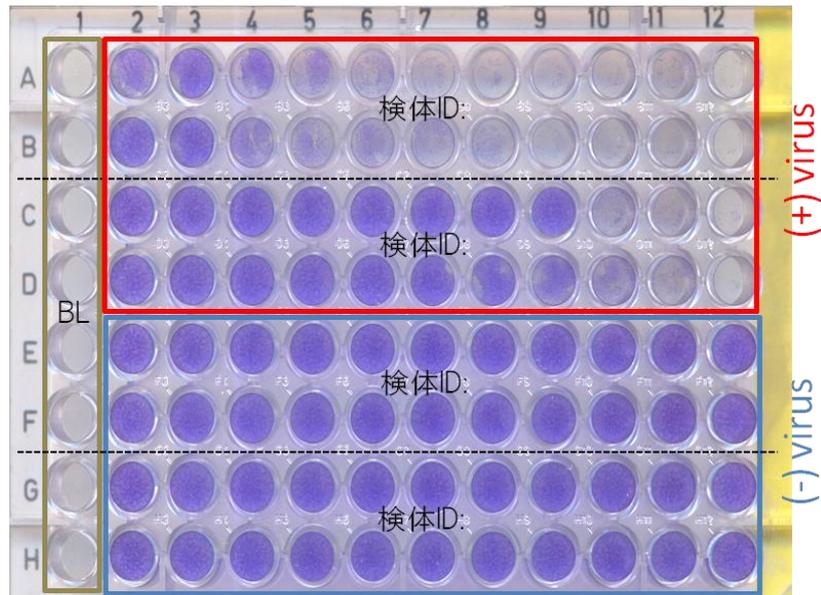
《96-well plateのレイアウト》



注1) BL …吸光度測定時の数値補正に用いる細胞非添加群

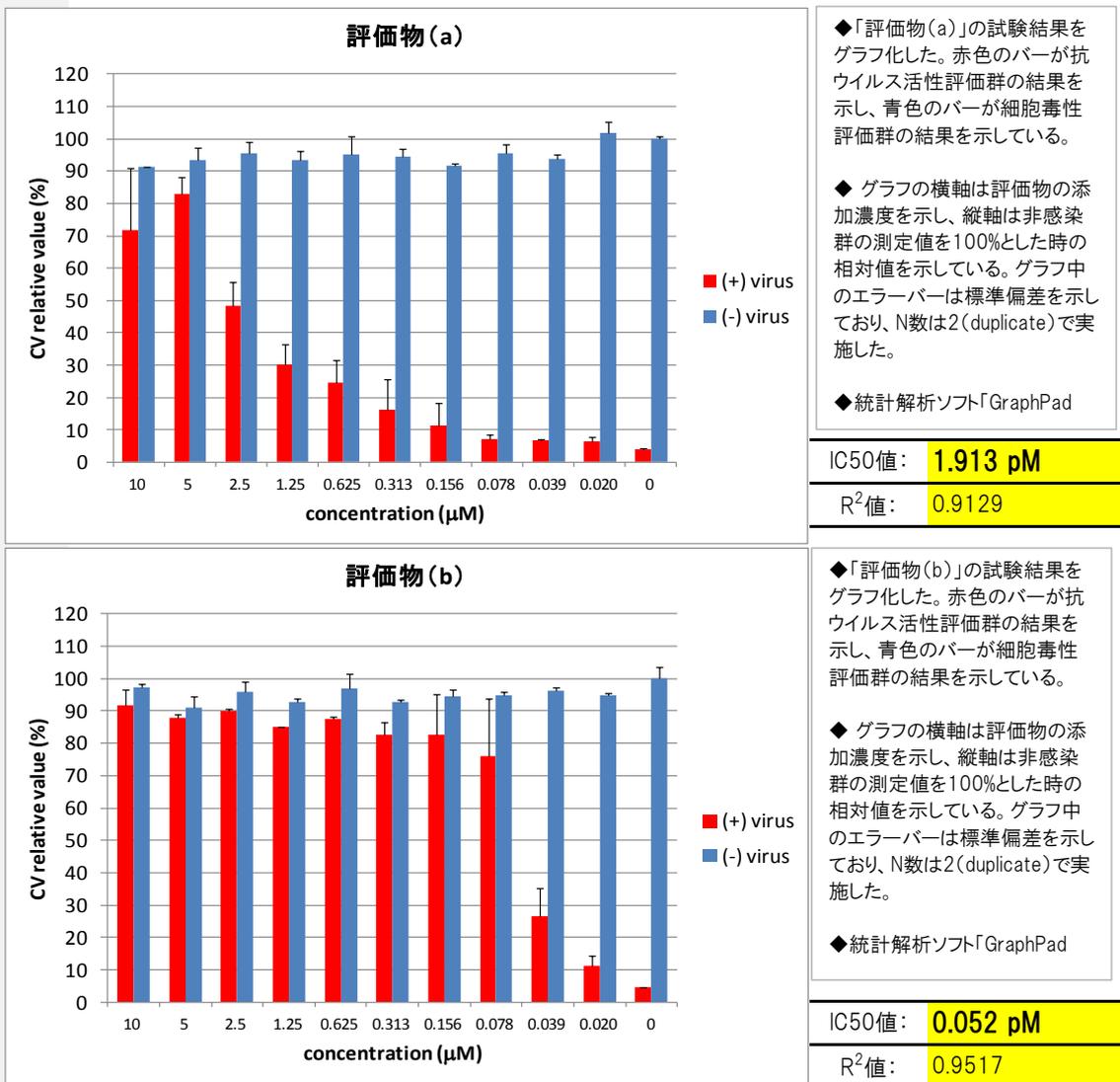
注2) N数= 2 (duplicate)で実施

試験結果: Fig.1 クリスタルバイオレット染色後の96-well plate写真



(a) (b) 試験濃度⇒ 10 5 2.5 1.25 0.63 0.31 0.16 0.08 0.04 0.02 0 (μM)

Fig. 2 試験結果のグラフとIC50の算出



結論:

- ◆ 被験物質(a)、(b) 共に顕著な抗インフルエンザウイルス活性が確認された。
- ◆ 被験物質(a)、(b) 共に細胞毒性は認められなかった。
- ◆ IC50値より、被験物質(b)の方がより強い抗インフルエンザウイルス活性を有することが示唆された。

## ～ 抗インフルエンザウイルス活性評価試験について ～

### 《評価系の概要》

評価対象となる被験物質について段階希釈系列を調製し、各濃度の被験物質存在下で MDCK 細胞に対しインフルエンザウイルスを感染させる。一定期間培養の後、ウイルス感染に伴って生じる CPE を免れ残存した生細胞数を定量することによって、当該被験物質の抗ウイルス活性を評価する。また、ウイルス非添加群を合わせて設定することにより、被験物質について抗ウイルス活性と同時に細胞毒性についても評価可能な系となっている。取得データにもとづき、「ウイルス感染を 50%阻害する濃度(=IC50; 50% inhibitory concentration)」及び「細胞生存を 50%阻害する濃度(=CC50; 50% cytotoxic concentration)」を算出することで、抗ウイルス活性並びに細胞毒性について評価の指標とする。

### 《評価系の構成》

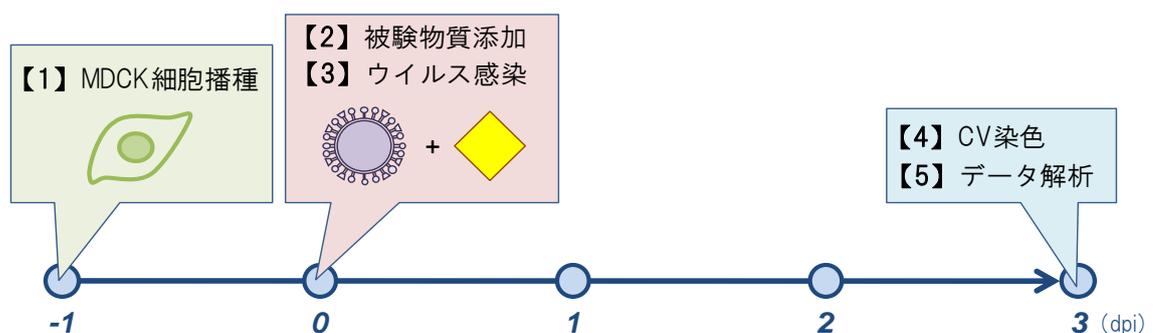
本評価系は以下に示す計 5 つの工程から構成されている。評価は通常、96-well plate にて実施する。

- 【1】 MDCK 細胞播種
- 【2】 被験物質添加
- 【3】 ウイルス感染
- 【4】 CV(クリスタルバイオレット)染色
- 【5】 データ解析

### 《評価系における各工程の詳細》

まず、96-well plate に MDCK 細胞を  $3.0 \times 10^4$  cells/well (培養液量= 100  $\mu$ l/well) で播種する(工程【1】)。37°C-5%CO<sub>2</sub> 下で一晩培養後、被験物質の段階希釈系列を 100  $\mu$ l/well で添加する(工程【2】)。続いて、インフルエンザウイルス液を 100  $\mu$ l/well で添加し感染させる(工程【3】)。通常、添加ウイルス量は 100 TCID<sub>50</sub>/well で一定とする(MOI 換算で 0.002 に相当)。ウイルス感染 72 時間(3 日)後にクリスタルバイオレットにて残存する生細胞を染色し(工程【4】)、マイクロプレートリーダーで各 well の染色量を定量する(工程【5】)。以下に本評価系のタイムラインを示す。

### 《評価系のタイムライン》

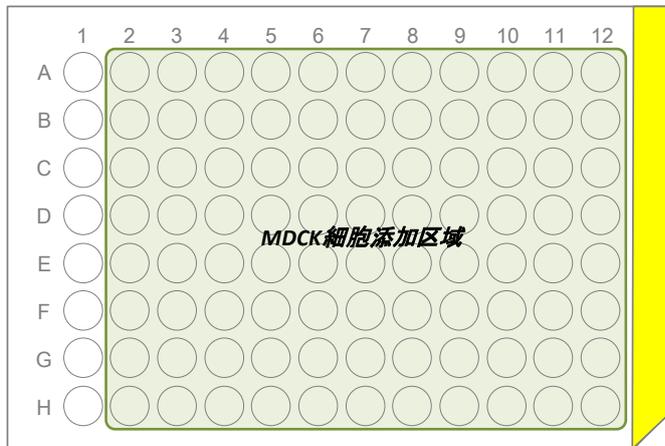


(dpi): days post infection... ウイルス感染後の経過日数

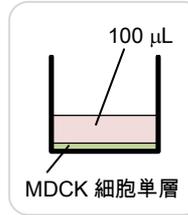
# 別紙

※以下に 96-well plate × 1 枚を使用し、2 種の被験物質[Sample (a) & Sample (b)]を N 数=2 (duplicate)で 評価した場合の試験内容についてイラストと共に概説する。

## 【1】MDCK 細胞播種



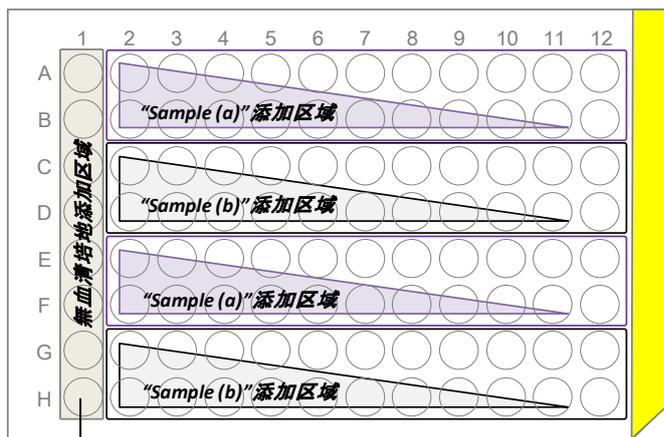
※各 well の断面図



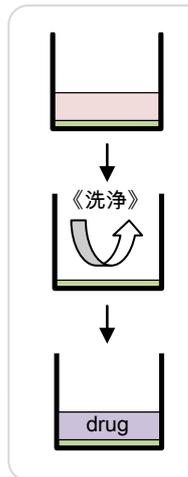
10%血清含有 MEM 培地で  $3.0 \times 10^5$  cells/mL に調製した細胞懸濁液を左図中 96-well plate の緑色で示した区画に 100  $\mu$ L/well で添加する。これにより、1 well あたりに播種した細胞数は  $3.0 \times 10^4$  cells となる。播種後、 $37^\circ\text{C}-5\%\text{CO}_2$  下で一晩培養する。



## 【2】被験物質添加



※細胞非添加の 1 列目には無血清 MEM 培地を 100  $\mu$ L/well で添加し、試験系のブランクとする。



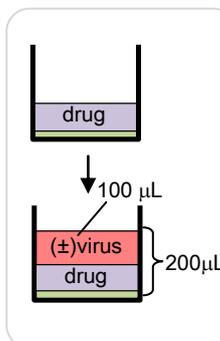
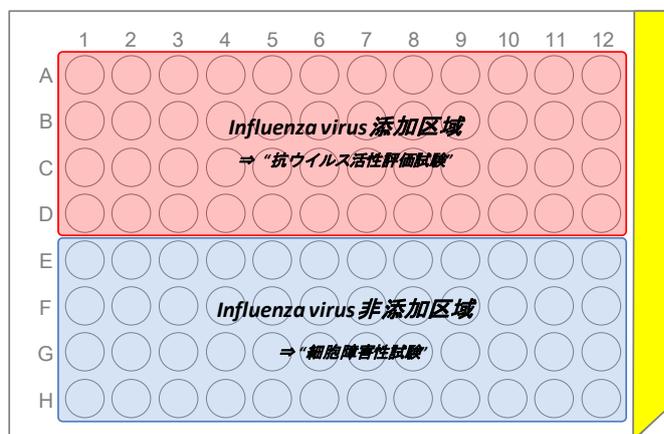
培養後の各 well から培養液を除去し、無血清 MEM 培地を 100  $\mu$ L/well で添加・除去することで MDCK 細胞単層を 1 回洗浄する。

洗浄後、予め調製しておいた被験物質の段階希釈系列を 100  $\mu$ L/well で添加する。

また、左図 plate 上の A, B 行と E, F 行には同一の被験物質を添加する (左図紫色の区域)。同様にして C, D 行と G, H 行にも他方の被験物質を添加し (左図紺色の区域)、一方はウイルス添加群 ( $\Rightarrow$  抗ウイルス活性評価区域)、他方はウイルス非感染群 ( $\Rightarrow$  細胞毒性評価区域) とする。



## 【3】ウイルス感染



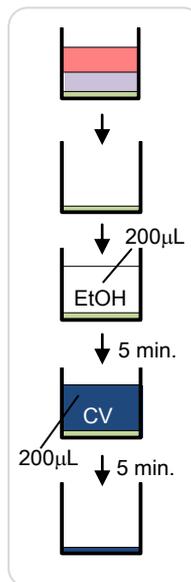
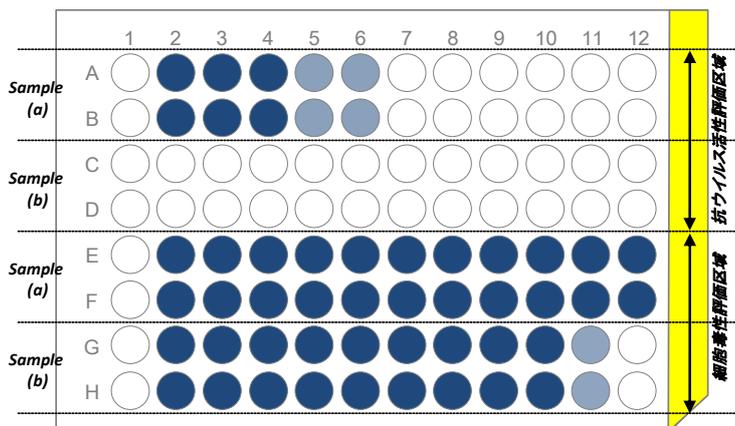
被験物質添加後、無血清 MEM 培地で 1,000 TCID<sub>50</sub>/mL に希釈したウイルス液を 100  $\mu$ L/well で左図赤色の区域に添加する。1 well あたりのウイルス添加量は 100 TCID<sub>50</sub> となる。一方、左図青色の区域には無血清 MEM 培地を 100  $\mu$ L/well 添加する。添加後の各 well の総液量は被験物質とウイルス液あるいは無血清 MEM 培地を合わせ 200  $\mu$ L となる。A 行～D 行は抗ウイルス活性区域となり、E 行～H 行は細胞毒性評価区域となる。

ウイルス添加後、 $37^\circ\text{C}-5\%\text{CO}_2$  下で 72 時間培養する。

72 時間 (3 日間)



【4】CV 染色



培養後、各 well から培養液を除去し、70%エタノール溶液を 200  $\mu\text{L}$ /well で添加し、室温で 5 分間細胞を固定する。固定後、70%(v/v)エタノール(EtOH)を除去し、0.5%(w/v)クリスタルバイオレット溶液(CV)を 200  $\mu\text{L}$ /well で添加して室温で 5 分間染色する。

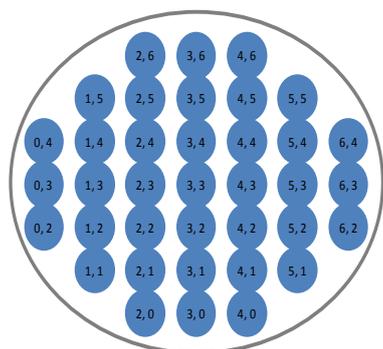
染色後、各 well から溶液を除去し、水道水で軽くリンスした後、plate を風乾させる。

風乾後、マイクロプレートリーダーにて各 well の 560 nm における吸光度を測定する。

測定値をもとに解析を行い、グラフ化並びに IC50 と CC50 の算出を行う。

【5】データ解析

Multiple Reads Per Well - Alignment



※各 well 内の測定スポット配置図

図中の大きな楕円が 96-well plate の 1 well を示す。各 well 中に図中の青色部分、計 37 点のスポットを均等に設定し、全スポットについて OD560 nm の吸光度を各々測定した。計 37 点における測定値の平均値を算出し、各 well の測定値とする。