



Japan
Food
Research
Laboratories

試 験 報 告 書

第 208101516-001 号
2008年(平成20年)11月14日

依 頼 者

検 体 貝化粉入り不織布ベタ(3)

表 題 ウイルス不活化試験

2008年(平成20年)10月17日当センターに提出された
上記検体について試験した結果は次のとおりです。

財団法人

日本食品分析センター

東京本部 〒151-0052 東京都渋谷区元代々木町52番1号
大阪支所 〒564-0051 大阪府吹田市豊津町3番1号
名古屋支所 〒460-0011 名古屋市中区大須4丁目5番13号
九州支所 〒812-0034 福岡市博多区下呉服町1番12号
多摩研究所 〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号
千歳研究所 〒066-0052 北海道千歳市文京2丁目3番
彩都研究所 〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目4番41号

ウイルス不活化試験

1 依頼者

2 検 体

貝化粉入り不織布ベタ(3)

3 試験目的

検体のインフルエンザウイルスに対する不活化試験を行う。

4 試験概要

約3 cm×3 cmの大きさに切断した検体(以下「試料」という。)にインフルエンザウイルス浮遊液を滴下し、室温にて6及び24時間保存した後、ウイルス感染価を測定した。

なお、あらかじめ予備試験を行い、検体による細胞変性効果について検討した。

5 試験結果

結果を表-1に示した。

なお、試料の洗い出し液そのものについて、検体による細胞変性効果が認められないことを予備試験により確認した。

表-1 試料洗い出し液のウイルス感染価測定結果

試験ウイルス	測定	対象	log TCID ₅₀ /ml ^{*1}
インフルエンザ ウイルス	接種直後	対照	6.7
		検体	<0.5
	6時間後 ^{*2}	対照	6.5
		検体	<0.5
	24時間後 ^{*2}	対照	5.5
		検体	<0.5

TCID₅₀: median tissue culture infectious dose, 50 %組織培養感染量

*1 洗い出し液1 ml当たりのTCID₅₀の対数値

*2 室温保存

対照: プラスチックシャーレ

<0.5: 検出せず

6 試験方法

1) 試験ウイルス

インフルエンザウイルスA型(H1N1)

2) 使用細胞

MDCK (NBL-2)細胞 ATCC CCL-34株[大日本製薬株式会社]

3) 使用培地

① 細胞増殖培地

イーグルMEM培地「ニッスイ」①[日水製薬株式会社]に牛胎仔血清を10 %加えたものを使用した。

② 細胞維持培地

以下の組成の培地を使用した。

イーグルMEM培地「ニッスイ」①	1,000 ml
10 %NaHCO ₃	14 ml
L-グルタミン(30 g/l)	9.8 ml
100×MEM用ビタミン液	30 ml
10 %アルブミン	20 ml
0.25 %トリプシン	20 ml

4) ウイルス浮遊液の調製

① 細胞の培養

細胞増殖培地を用い、使用細胞を組織培養用フラスコ内に単層培養した。

② ウイルスの接種

単層培養後にフラスコ内から細胞増殖培地を除き、試験ウイルスを接種した。次に、細胞維持培地を加えて37℃±1℃の炭酸ガスインキュベーター(CO₂濃度：5%)内で1～5日間培養した。

③ ウイルス浮遊液の調製

培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞の形態を観察し、細胞に形態変化(細胞変性効果)が起こっていることを確認した。次に、培養液を遠心分離(3,000 r/min, 10分間)し、得られた上澄み液をウイルス浮遊液とした。

5) 試料の調製

約3 cm×3 cmの大きさに切断した検体を試料とした。

6) 試験操作

試料の依頼者指定面にウイルス浮遊液0.2 mlを滴下し、室温にて保存した。

7) ウイルスの洗い出し

保存6及び24時間後、試料のウイルス浮遊液を細胞維持培地2 mlで洗い出した。

8) ウイルス感染価の測定

細胞増殖培地を用い、使用細胞を組織培養用マイクロプレート(96穴)内で単層培養した後、細胞増殖培地を除き細胞維持培地を0.1 mlずつ加えた。次に、試料洗い出し液及びその希釈液0.1 mlを4穴ずつに接種し、37℃±1℃の炭酸ガスインキュベーター(CO₂濃度：5%)内で4～7日間培養した。培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞の形態変化(細胞変性効果)の有無を観察し、Reed-Muench法により50%組織培養感染量(TCID₅₀)を算出して洗い出し液1 ml当たりのウイルス感染価に換算した。

以 上