

試験報告書

依頼者 sasamic

財団法人

日本食品分析センター

東京都渋谷区元代々木町52番1号



検体 スーパーミチタン

表題 ウイルス不活化試験

2010年(平成22年)03月11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をご報告いたします。

ウイルス不活化試験

1 依頼者
sasamic

2 検 体
スーパーミチタン

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
精製水を用いて検体溶液を調製し、試験液とした。試験液にインフルエンザウイルスのウイルス浮遊液を添加、混合し、作用液とした。室温で作用させ、15、30及び60分後に作用液の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、ウイルス感染価の測定方法について検討した。

5 試験結果
結果を表-1に示した。
なお、細胞維持培地で作用液を1000倍に希釈することにより、検体の影響を受けずにウイルス感染価が測定できることを予備試験により確認した。

表-1 作用液のウイルス感染価測定結果

試験 ウイルス	対象	濃度	log TCID ₅₀ /ml*			
			開始時	15分後	30分後	60分後
インフルエンザ ウイルス	検体	0.3 g/100 ml	6.3	6.0	6.0	5.5
	対照	—	6.3	***	***	6.5

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

* 作用液1 ml当たりのTCID₅₀の対数值

開始時: 作用開始直後の対照のTCID₅₀を測定し、開始時とした。

対照: 精製水

作用温度: 室温

***: 試験実施せず

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	1000 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(3000 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) 試験操作

精製水を用いて検体溶液(0.3 g/100 ml)を調製し、試験液とした。試験液1 mlにウイルス浮遊液0.1 mlを添加、混合し、作用液とした。室温で作用させ、15、30及び60分後に細胞維持培地を用いて1000倍に希釈した。

なお、精製水を対照として同様に試験し、開始時及び60分後に測定を行った。

6) 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、作用液の希釈液0.1 mlを4穴ずつに接種し、37 °C±1 °C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)を算出して作用液1 ml当たりのウイルス感染価に換算した。

以 上