



Japan  
Food  
Research  
Laboratories

第 14062182001-01 号 page 1/4  
2014 年(平成 26 年)07 月 28 日

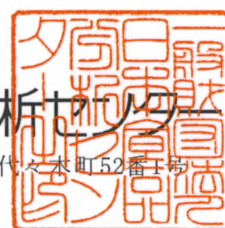
# 試験報告書

依頼者 笹野電線株式会社

一般財団法人

日本食品分析センター

東京都渋谷区元代々木 52 番 1 号



検体 ルミチタンNAG

表題 ウイルス不活化試験

2014 年(平成 26 年)06 月 26 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

笹野電線株式会社

### 2 検体

ルミチタンNAG

### 3 試験目的

検体のネコカリシウイルスに対する不活化試験を行う。

### 4 試験概要

検体(大きさ:約2.5 cm×2.5 cm, 以下「試料」という。)にネコカリシウイルスのウイルス浮遊液を滴下し,ブラックライト照射下及び遮光下で6及び24時間,室温保存した後,ウイルス感染価を測定した。また,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。

なお,ネコカリシウイルスは,細胞培養が不可能なノロウイルスの代替ウイルスとして広く使用されている。

### 5 試験結果

#### 1) 予備試験

試料の洗い出し液を細胞維持培地で10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。

#### 2) ウイルス感染価の測定

結果を表-1に示した。

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	試料	log TCID <sub>50</sub> /mL*1	
			光照射下*2	遮光下
ネコカリシウイルス*3	接種直後	対照	6.0	6.0
		検体	2.0	3.2
	6時間後*4	対照	5.7	5.7
		検体	3.0	2.0
	24時間後*4	対照	5.2	5.5
		検体		

TCID<sub>50</sub>: median tissue culture infectious dose, 50 %組織培養感染量

接種直後: 光照射下及び遮光下共通

対照: 標準布(綿)

ウイルス浮遊液: 精製水で10倍に希釈したもの

\*1 洗い出し液1 mL当たりのTCID<sub>50</sub>の対数値

\*2 光照射条件: 約2.0 μW/cm<sup>2</sup>(ドーム型紫外線強度計測定値)

[ブラックライトブルー FL20S・BL-B 20 W, 1本]

\*3 ノロウイルスの代替ウイルス

\*4 室温保存

## 6 試験方法

### 1) 試験ウイルス

*Feline calicivirus* F-9 ATCC VR-782(ネコカリシウイルス)

### 2) 使用細胞

CRFK細胞[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「ニッセイ」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

イーグルMEM培地「ニッセイ」①に牛胎仔血清を2 %加えたものを使用した。

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(CO<sub>2</sub>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)が起き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精製水で10倍に希釈し、ウイルス浮遊液とした。

5) 試料の調製

検体(大きさ：約2.5 cm×2.5 cm)をプラスチックシャーレに入れ、ブラックライト[ブラックライトブルー, FL20S・BL-B 20 W]を約1.0 mW/cm<sup>2</sup>で19時間照射したものを試料とした。

6) 試験操作

試料の依頼者指定面にウイルス浮遊液を0.2 mL滴下し、ブラックライト照射下及び遮光下で室温保存した。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、ウイルス感染価を測定した。

なお、対照として標準布(綿)を用いて同様に試験し、接種直後についても測定を行った。

7) 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、試料及び対照の洗い出し液を、細胞維持培地を用いて10倍段階希釈した。試料及び対照の洗い出し液並びにその希釈液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(CO<sub>2</sub>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(TCID<sub>50</sub>)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