Japan
Food
Research
Laboratories

2014年(平成26年)01月16日

試 験 報 告 書

依 頼 者　　株式会社　ナフタック

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町52番1号

検　　体　　ウィルスディフェンス

表　　題　　ウイルス不活化試験

2013年(平成25年)11月12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。

本報告書を他に掲載するときは当センターの掲載規約をお守りください。

ウイルス不活化試験

1　依 頼 者

株式会社　ナフタック

2　検　　体

ウィルスディフェンス

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

インフルエンザウイルスのウイルス浮遊液をシャーレ(φ60 mm)に入れたものを試料とした。ふたを全て取り外した検体及び試料を密閉容器(容量：9 L)内の底部に設置し，室温で保存した。保存24時間後に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

1)　予備試験

細胞維持培地で試料を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*1のウイルス感染価測定結果

試験ウイルス	対　象	log $TCID_{50}$/mL*2	
		開始時*3	24時間後
インフルエンザウイルス	検　体*4	6.7	<1.5
	対　照	6.7	6.5

$TCID_{50}$：median tissue culture infectious dose, 50 %組織培養感染量

対照：検体を設置しない密閉容器(容量：9 L)内で保存した試料

保存温度：室温

<1.5：検出せず

*1　ウイルス浮遊液(精製水を用いて100倍に希釈したもの)2 mLをシャーレ(φ60 mm)にいれたもの

*2　試料1 mL当たりの$TCID_{50}$の対数値

*3　保存前の対照の$TCID_{50}$を測定し，開始時とした。

*4　密閉容器内の底部にふたを全て取り外した検体1個及び試料1個を設置した。

6　試験方法

1)　試験ウイルス

Influenza A virus (H1N1) A/PR/8/34 ATCC VR-1469(インフルエンザウイルス)

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(CO_2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精製水で100倍に希釈し，ウイルス浮遊液とした。

5)　試験操作

ウイルス浮遊液2 mLをシャーレ(φ60 mm)に入れたものを試料とした。ふたを全て取り外した検体1個及び試料1個を密閉容器(容量：9 L)内の底部に設置し，室温で保存した。保存24時間後に試料を取り出して細胞維持培地で10倍に希釈し，ウイルス感染価を測定した。

なお，検体を設置しない密閉容器内で保存した試料について同様に試験し，対照とした。

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，10倍希釈後の試料及び対照を，細胞維持培地を用いて10倍段階希釈した。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_2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($TCID_{50}$)を算出して試料1 mL当たりのウイルス感染価に換算した。

以　上