

ウイルス不活化試験

1 依頼者

株式会社 カタライズ

2 検 体

- 1) ヒカリアクター A3 (光ミスト AS) 塗付試料
- 2) ヒカリアクター A3 (光ミスト AS) 未加工品

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3 cm×3 cm, 以下「試料」という。)にネコカリシウイルス(ノロウイルスの代替ウイルス)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。

なお、検体1)について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。

また、検体1)は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。

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。

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}
			光照射下 ^{*2}
ネコカリシ ウイルス ^{*3}	接種直後	—	6.7
	6時間後 ^{*4}	検体1)	4.0
		検体2)	6.5
	24時間後 ^{*4}	検体1)	<0.5
		検体2)	5.0

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

接種直後: 滴下したウイルス浮遊液のウイルス感染価を測定し, 洗い出し液1 mlあたりに換算した。

<0.5: 検出せず

*1 洗い出し液1 mlあたりのTCID₅₀の対数値

*2 光照射条件: 約100 μW/cm²(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

ウイルス浮遊液: 精製水で10倍に希釈したもの

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

イーグルMEM培地「ニッスイ」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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ の炭酸ガスインキュベーター(CO_2 濃度: 5 %)内で2~5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

検体そのもの(大きさ: 約3 cm×3 cm)を試料とした。

6) 試験操作

試料にウイルス浮遊液0.2 mlを滴下し、ブラックライト照射下で室温保存した。

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、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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