

試験報告書

第 107050755-001号

2007年(平成19年)06月15日

依頼者

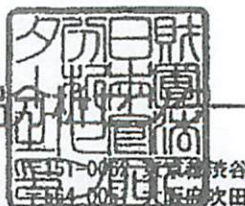
検体 ソイクリーナー

表題 ウイルス不活化試験

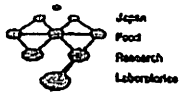
2007年(平成19年)05月07日当センターに提出された
上記検体について試験した結果は次のとおりです。

財団法人

日本食品



東京本部 〒151-0054 東京都渋谷区元代々木町52番1号
大阪支所 〒554-0051 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
彰都研究所 〒567-0085 大阪府茨木市彰都あさぎ7丁目4番41号



ウイルス不活化試験

1 依頼者

2 検 体

ソイクリーナー

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

精製水を用いて検体希釈液を調製し、試験液とした。試験液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添加、混合し、作用液とした。室温で作用させ、30秒並びに5及び30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。

また、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。

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 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 ^{*1}			
			開始時	30秒後	5分後	30分後
ネコカリシ ウイルス ^{*2}	検体	6倍希釈液	8.7	<3.5	<3.5	<3.5
	対照	-	8.7	***	***	8.5

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

*1 作用液1 ml当たりのTCID₅₀の対数値

*2 ノロウイルスの代替ウイルス

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

<3.5: 検出せず

***: 試験実施せず

6 試験方法

1) 試験ウイルス

Feline calicivirus vaccine strain(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

Eagle MEM(0.06 mg/mlカナマイシン含有)に新生コウシ血清を10 %加えたものを使用した。

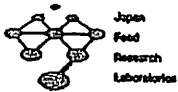
② 細胞維持培地

新生コウシ血清2 %添加Eagle MEM

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ウイルス浮遊液とした。

5) 試験操作

精製水を用いて検体希釈液(6倍希釈液)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、30秒並びに5及び30分後に細胞維持培地を用いて1000倍に希釈した。

なお、精製水を対照の試験液として同様に試験し、開始時及び30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、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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})を算出して作用液1 ml当たりのウイルス感染価に換算した。

以 上

1. 目的

ナノソイC・10倍希釈がインフルエンザウイルスを不活化するか確認するために実施した。

2. 試験委託者

名称

所在地

委託責任者

3. 試験実施機関

名称 株式会社 食環境衛生研究所

所在地 群馬県前橋市荒口町 561-21

運営管理者 久保 一弘

4. 試験実施者

試験責任者 松本 彰平

試験担当者 上谷 智英

5. スケジュール

1) 試験開始日 平成 21 年 8 月 12 日

2) 試験終了日 平成 21 年 8 月 22 日

3) 報告書作成日 平成 21 年 8 月 26 日

6. 報告書作成者

試験担当者 上谷 智英

7. 区の設定

試験区	被験液	被験ウイルス	検査時点
試験区 1	ナノソイC・10倍希釈	インフルエンザウイルス(H1N1)	30sec, 5min, 30min
試験区 2(対照)	滅菌生理食塩水	インフルエンザウイルス(H1N1)	0min, 30min

8. 試験手順

8.1 インフルエンザウイルス液の調製

- ① インフルエンザウイルスを受精後 9 日の発育鶏卵に接種した。
- ② 接種後 3 日目に漿尿液を採取後、リン酸緩衝液(PBS)で懸濁した。
- ③ ②で懸濁した PBS を 10 倍段階希釈し、発育鶏卵に接種した。
- ④ 接種後、EID₅₀を算出し、10⁶EID₅₀となるように調製し、試験に用いることとした。

8.2 ウイルス不活化効果試験手順

- ① 試験管内に被験液をそれぞれ 1mL 注入した。
- ② 被験液を注入した試験管内にインフルエンザウイルス液を 10 分の 1 量である 0.1mL 接種し(以下、試験液)、指定時間感作させた。但し、ウイルス量は、 10^4 EID₅₀とした。
- ③ 感作終了後、試験液を回収し、試験液を 10 倍段階希釈した。
- ④ 希釈後、発育鶏卵の漿尿膜腔内に試験液を 0.1mL 接種した。(希釈段階ごとに発育鶏卵を 3 個ずつ使用した。)
- ⑤ 発育鶏卵接種後、5 日目に開卵し、漿尿液を採取した。
- ⑥ 漿尿液を採取後、鶏赤血球を用い、赤血球凝集反応試験を行い、効果判定を行った。

9 試験結果

試験結果を下記に記した。

対照区は、試験期間通して、 $>10^{4.5}$ EID₅₀/0.1mL であった。試験区は、試験開始 30 秒後では、 <1 EID₅₀/0.1mL であり、5 分以上感作させると、ウイルス検出は全くなかった。

区	処置	検査結果(EID ₅₀ /0.1mL)			
		0min	30sec	5min	30min
試験区	ナノソイC・10倍希釈	$>10^{4.5}$	1 未満	検出されず	検出されず
対照区	滅菌生理食塩水	$>10^{4.5}$	-	-	$>10^{4.5}$

-:検査未実施

10. 考察

今回、被験液にインフルエンザウイルス液を感作させ、30 秒、5 分、30 分感作させた。30 秒感作させた結果、ウイルス量は、 <1 EID₅₀/0.1mL であり、5 分、30 分感作させた結果は、ウイルス検出なしであった。又、対照区においては、試験開始時、試験終了時とも、 $>10^{4.5}$ EID₅₀/0.1mL であった。

以上のことから、ナノソイC・10倍希釈は、30 秒の感作でほぼ完全に、5 分の感作では完全にインフルエンザウイルスを不活化することが確認された。

試験責任者名 松本孝平 (印)

1. 目的
大豆でできた除菌・消臭スプレーがインフルエンザウイルスを不活化するか確認するために実施した。
2. 試験委託者
名称
所在地
委託責任者
3. 試験実施機関
名称 株式会社 食環境衛生研究所
所在地 群馬県前橋市荒口町 561-21
運営管理者 久保 一弘
4. 試験実施者
試験責任者 松本 彰平
試験担当者 上谷 智英
5. スケジュール
 - 1) 試験開始日 平成 21 年 8 月 12 日
 - 2) 試験終了日 平成 21 年 8 月 22 日
 - 3) 報告書作成日 平成 21 年 8 月 26 日
6. 報告書作成者
試験担当者 上谷 智英

7. 区の設定

試験区	被験液	被験ウイルス	検査時点
試験区 1	大豆でできた除菌・消臭スプレー	インフルエンザウイルス(H1N1)	30sec, 5min, 30min
試験区 2(対照)	滅菌生理食塩水	インフルエンザウイルス(H1N1)	0min, 30min

8. 試験手順

8.1 インフルエンザウイルス液の調製

- ① インフルエンザウイルスを受精後 9 日の発育鶏卵に接種した。
- ② 接種後 3 日目に養液を採取後、リン酸緩衝液(PBS)で懸濁した。
- ③ ②で懸濁した PBS を 10 倍段階希釈し、発育鶏卵に接種した。

- ④ 接種後、 EID_{50} を算出し、 10^5EID_{50} となるように調整し、試験に用いることとした。

8.2 ウイルス不活化効果試験手順

- ① 試験管内に被験液をそれぞれ 1mL 注入した。
- ② 被験液を注入した試験管内にインフルエンザウイルス液を 10 分の 1 量である 0.1mL 接種し(以下、試験液)、指定時間感作させた。但し、ウイルス量は、 10^5EID_{50} とした。
- ③ 感作終了後、試験液を回収し、試験液を 10 倍段階希釈した。
- ④ 希釈後、発育鶏卵の漿尿膜腔内に試験液を 0.1mL 接種した。(希釈段階ごとに発育鶏卵を 3 個ずつ使用した。)
- ⑤ 発育鶏卵接種後、5 日目に開卵し、漿尿液を採取した。
- ⑥ 漿尿液を採取後、鶏赤血球を用い、赤血球凝集反応試験を行い、効果判定を行った。

9 試験結果

試験結果を下記に記した。

対照区は、試験期間通して、 $>10^{4.5} \text{EID}_{50}/0.1\text{mL}$ であった。試験区は、試験開始 30 秒後では、 $<1 \text{EID}_{50}/0.1\text{mL}$ であり、5 分以上感作させると、ウイルス検出は全くなかった。

区	処置	検査結果($\text{EID}_{50}/0.1\text{mL}$)			
		0min	30sec	5min	30min
試験区	大豆でできた除菌・消臭スプレー	$>10^{4.5}$	1 未満	検出されず	検出されず
対照区	滅菌生理食塩水	$>10^{4.5}$	-	-	$>10^{4.5}$

:検査未実施

10. 考察

今回、被験液にインフルエンザウイルス液を感作させ、30 秒、5 分、30 分感作させた。30 秒感作させた結果、ウイルス量は、 $<1 \text{EID}_{50}/0.1\text{mL}$ であり、5 分、30 分感作させた結果は、ウイルス検出なしであった。又、対照区においては、試験開始時、試験終了時とも、 $>10^{4.5} \text{EID}_{50}/0.1\text{mL}$ であった。

以上のことから、大豆でできた除菌・消臭スプレーは、30 秒の感作でほぼ完全に、5 分の感作では完全にインフルエンザウイルスを不活化することが確認された。

試験責任者名 松本彰平

