

試験資材のウイルスに対する不活化効果試験

—試験報告書—

試験番号：207316N

株式会社 食環境衛生研究所

〒379-2107

群馬県前橋市荒口町 561-21

Tel027-230-3411

Fax027-230-3412

1. 表題

試験資材のウイルスに対する不活化効果試験

2. 試験番号

No.207316N

3. 目的

資材と豚コロナウイルス（PEDV）を反応させた時のウイルス不活化効果を確認するために実施した。

4. 試験管理組織

試験依頼者の名称及び所在地

名称 株式会社大和バイオテック

所在地 〒633-1212 奈良県宇陀郡曽爾村今井 513-16

実施機関の名称、所在地及びその長の氏名

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

氏名 代表取締役 久保 一弘

試験実施責任者の氏名

松本 彰平

試験担当者の氏名

近藤 実紀

5. 試験スケジュール

試験受託日 2020年8月6日

試験開始日 2020年11月11日

試験終了日 2020年12月17日

6. 試験資材

バチルス菌混合飼料 大和バイオリキッド

※試験資材は10倍に希釈して使用した。また、対照資材として滅菌リン酸緩衝液を使用した。

7. 供試微生物

PED ウイルス : Porcine epidemic diarrhea virus P-5V 株

※豚感染性のコロナウイルス

培養細胞 : vero 細胞 (アフリカミドリザルの腎臓上皮由来株化細胞)

8. 区の設定

区	処置	感作時間
対照区	リン酸緩衝液 1mL にウイルス液 0.1mL 添加	試験開始後 0 分、10 分、6 時間
試験区	試験資材 1mL にウイルス液 0.1mL 添加	試験開始後 0 分、10 分、6 時間

9. 試験方法

「ウイルス実験学 総論 改訂二版 丸善株式会社 ウイルス中和試験法」を参考として実施した。

10. 試験手順

①予備試験 :

試験に先立って、試験資材が培養細胞に与える影響 (細胞毒性) を調査した。

試験資材をリン酸緩衝液で 10 倍段階希釈した後、培養細胞に接種し、培養後の細胞の正常な状態を示す最高濃度を確認し、試験に使用するウイルス濃度を決定した。その結果、細胞毒性について、試験資材 10000 倍液において細胞の発育不良が確認された。このため、試験に際しては、試験資材とウイルス液の混合液を 10000 倍以上希釈した後細胞に接種する必要があると判明した。また、ウイルス添加濃度は 10^7 TCID₅₀/mL 以上とした。

②本試験・試験液混合 :

試験区分に従い、試験資材及びリン酸緩衝液の各 1mL をそれぞれ分取し、予備試験で決定した濃度にウイルス液を添加した。

ウイルス液添加後、混合液として室温 (25°C) にて所定の時間静置した。

③本試験・細胞接種及び菌数測定 :

試験区分ごとに感作が終了した混合液をそれぞれ 10 倍段階希釈し、96well プレートに培養した細胞に 100μL ずつ接種した。

判定は、37°C、炭酸ガス培養 (5%) で 5 日間培養した後、培養細胞を顕微鏡観察し、培養細胞に現れる CPE (細胞変性) をもってウイルス増殖の有無を確認し、その濃度を算出した。

11. 結果

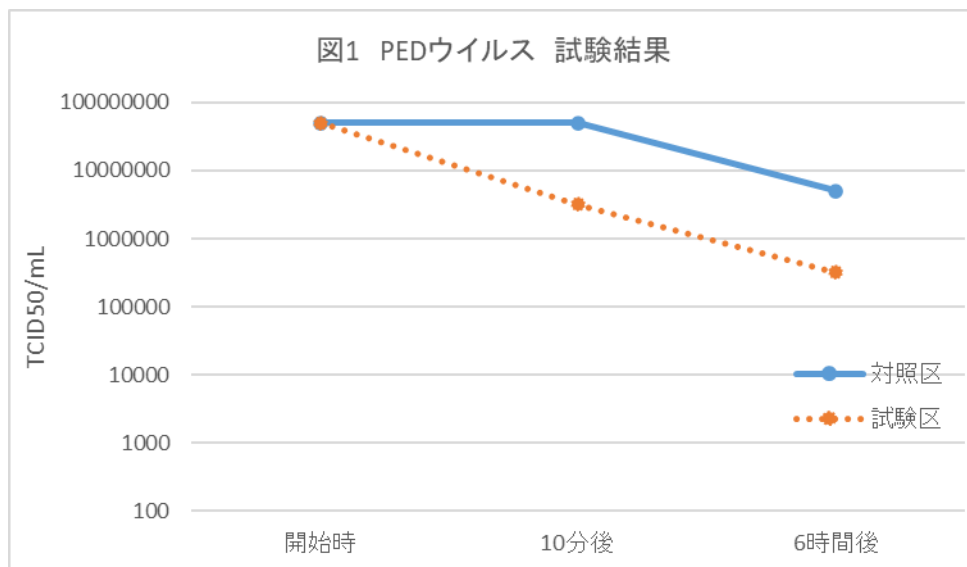
PED ウイルスに対する試験結果を下記に示した。

対照区では試験開始後から、試験開始後 6 時間までの間にウイルス量の自然減衰と思われる減少が見られた($10^{7.7} \rightarrow 10^{6.7}$ TCID₅₀/mL)。

試験区では開始後 10 分で $<10^{6.5}$ TCID₅₀/mL (93.6%減少) となり、6 時間後では、 $<10^{5.5}$ TCID₅₀/mL (検出限界未満：93.6%以上減少) となった。

表 2 PED ウイルス試験結果(TCID₅₀/mL)

区	試験開始時	開始後 10 分	開始後 6 時間
対照区	$10^{7.7}$	$10^{7.7}$ (50000000)	$10^{6.7}$ (5000000)
試験区		$10^{6.5}$ (3200000)	$<10^{5.5}$ (<320000)



12. 考察

今回、試験資材の PED ウイルス（豚感染コロナウイルス）に対する不活化効果試験を実施した。

その結果、10 分の接触で 93.6%、6 時間後では 93.6%以上の不活化効果があることが判明した。