

株式会社中村・フクイヤ 殿

試 験 報 告 書

ウイルス不活化効果の検討

北環発 21_0128 号

平成 21 年 12 月 18 日

神奈川県相模原市北里 1 丁目 1 5 番 1 号

財団法人 北里環境科学センター

理事長 伊 藤 俊 洋

試験内容を公表する場合は、事前に当センターの承諾が必要です。

また、本報告書記載の試験結果は供試品に対するものであり

荷口（ロット）全体の品質を証明するものではありません。

1. 試験目的

貴社ご提供試験品によるインフルエンザウイルスの不活化効果をフィルム密着法によって検討した。

2. 供試ウイルス

Influenza A virus (A型インフルエンザウイルス)

3. 試験方法

1) 供試ウイルスの培養と調製方法

インフルエンザウイルスは発育鶏卵の漿尿膜腔に接種し、フラン器で培養後、漿尿液を採取し、密度勾配遠心法により精製したウイルスを供試ウイルス液とした。

2) 試験品及び試験条件

ご提供試験品：加工不織布（NRC 触媒）、

未加工不織布（陰性対照）

作用時間：0 時間、0.5 時間、1 時間、8 時間

作用時間とウイルス感染価の測定ポイントを表-1 に示す。

表-1 試験条件

試験品	作用時間			
	0 時間	0.5 時間	1 時間	8 時間
NRC 触媒	●	●	●	●
陰性対照		●	●	●

測定ポイント数：7 ポイント

* 陰性対照に、試験品成分を含まないものとして未加工不織布を用いた。

3) 試験方法

試験品（4cm×4cm）をプラスチックシャーレに入れ、供試ウイルス液 0.2mL を試験品に接種し、さらに 4cm 角のポリプロピレンフィルムで上面をカバーすることで、供試ウイルス液と試験品との接触効率を高めた。次に、乾燥防止のため保湿した密閉容器に静置し、室温で所定時間作用させた後、試験品をプラスチック容器に移しリン酸緩衝生理食塩液（PBS：Phosphate buffered saline）5mL を加え、1 分間振盪してウイルスを回収した。回収液を PBS で 10 倍に希釈し、試験品のウイルス感染価の測定に用いる細胞に対する細胞毒性を回避し、ウイルス感染価定量用試料とした。なお、作用時間 0 時間（初期ウイルス感染価測定用）の試料は未加工不織布にウイルス液を加え、ただちに回収したものを用いた。

4) ウイルス定量法

定量用試料を原液とし PBS で 10 倍階段希釈を行い、原液または希釈液 $50\mu\text{L}$ を 96 穴プレートにそれぞれ 10 穴ずつ植え込んだ。さらに、5%FBS を含む DMEM で 8×10^4 cells/mL に調製したイヌ腎臓由来 (Madin-Darby canine kidney: MDCK) 細胞 $50\mu\text{L}$ を 96 穴プレートに植え込んだ。その後、 37°C の炭酸ガスフラン器内で 4 日間培養し、倒立顕微鏡下でウイルスの感染によって生じた細胞変性効果 (CPE) を観察し、Reed-Muench 法によりウイルス感染価 (TCID_{50}) を求めた。

4. 試験結果のまとめ

貴社ご提供試験品による、インフルエンザウイルスに対する不活化効果を検討した。その結果を表-2 および図-1 に示した。

作用時間 0 時間 (初期ウイルス感染価) のウイルス感染価は $1.0\times 10^7\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ であった。また、陰性対照では 8 時間作用後のウイルス感染価は $1.3\times 10^6\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ となり、初期ウイルス感染価と比較して $0.9\log_{10}$ のウイルス感染価の減少が認められた。

この様にウイルスは室温でも時間と共にウイルス感染価が減少する。そのため、試験品によるウイルス不活化作用を確認するためには、陰性対照と比較する必要がある。本試験では、試験品成分を含まない未加工不織布を陰性対照として用いた。

試験品にウイルス液を 0.5 時間、1 時間作用させたところ、ウイルス感染価は $4.5\times 10^6\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 、 $3.5\times 10^6\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ となった。また、陰性対照では 0.5 時間、1 時間作用後のウイルス感染価は $1.0\times 10^7\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 、 $4.7\times 10^6\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ となり、作用時間 0.5 時間、1 時間では有意な差が認められなかった。一方、8 時間、試験品とウイルス液を作用させたところ、ウイルス感染価は $2.5\times 10^3\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ と、ウイルス感染価の減少値が $2.7\log_{10}$ 以上となり、有意な差が認められた。

試験担当者	微生物部	原 正幸
		林 伸行

以上

表-2 インフルエンザウイルスに対する不活化効果試験のまとめ

試験品	時間 (時間)			
	0	0.5	1	8
NRC 触媒	1.0×10^7	4.5×10^6	3.5×10^6	2.5×10^3
陰性対照		1.0×10^7	4.7×10^6	1.3×10^6
感染価対数減少値*	***	0.3	0.1	2.7

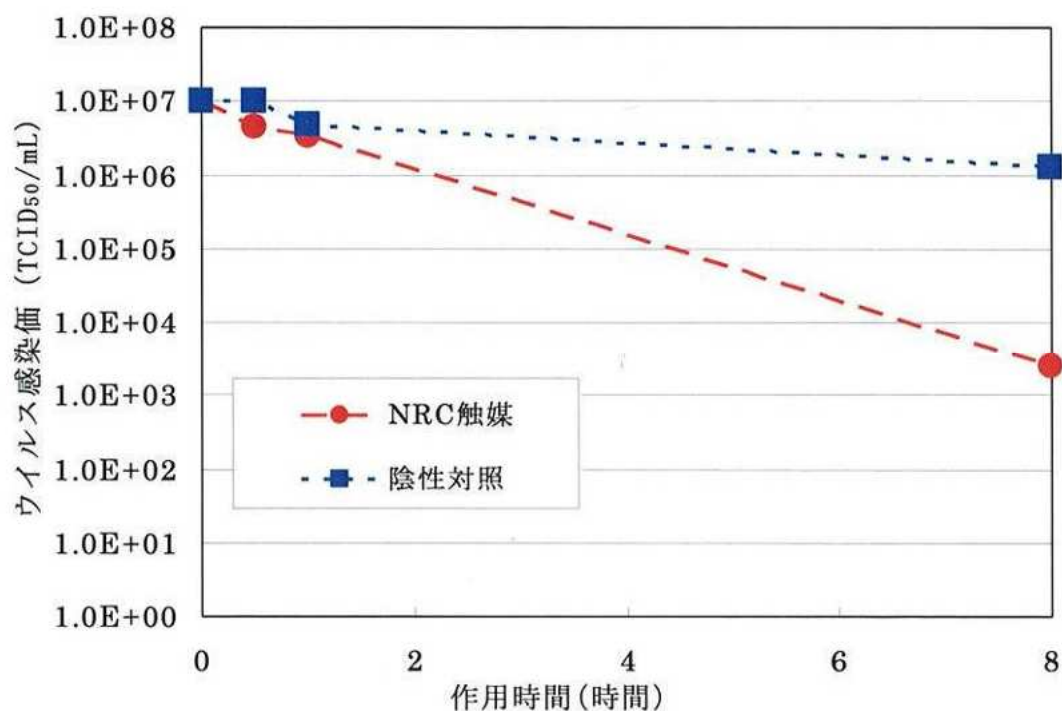
単位: TCID₅₀/mL検出限界値: 6.3 TCID₅₀/mL*感染価対数減少値: $\log_{10}$ (陰性対照のウイルス感染価÷試験品のウイルス感染価)

図-1 ウイルス感染価の経時変化