

Japan  
Food  
Research  
Laboratories

第 09023748001-01 号  
2009年(平成21年)12月22日

# 試験報告書

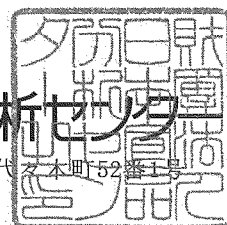
依頼者



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



表題 ウイルス不活化試験

2009年(平成21年)11月16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。



## 6 試験方法

### 1) 試験ウイルス

インフルエンザウイルスA型(H1N1)

### 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 <sub>3</sub>	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<sub>2</sub>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)が起き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10倍に希釈し、ウイルス浮遊液とした。

### 5) 試験操作

検体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、60、90及び120秒後に細胞維持培地を用いて10倍に希釈した。

なお、精製水を対照として同様に試験し、開始時及び120秒後に測定を行った。

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 °C±1 °Cの炭酸ガスインキュベーター(CO<sub>2</sub>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<sub>50</sub>)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