

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：217312N

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.217312N

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 エコ・サッポロ

所在地 〒065-0031 北海道札幌市東区北 31 条東 16 丁目 2 番 18 号

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 2021 年 7 月 27 日

試験開始日 2021 年 8 月 23 日

試験終了日 2021 年 10 月 28 日

6. 試験資材

気施気

※試験資材は、上記試験品（円筒型）中に滅菌精製水 100mL を約毎秒 1mL の通水量で通過して得られた液を使用した。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 50mL にウイルス液 0.1mL 添加	試験開始後 0、30、60 分
試験区	試験資材 50mL にウイルス液 0.1mL 添加	試験開始後 30、60 分

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 10 倍液において細胞の発育不良は確認されなかった。この為、ウイルス添加濃度は 10^6 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 :

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。

④評価：

試験結果において、検査時点ごとに、対照区に対する試験区の減少率（％）を算出し、効果を確認した。

なお、本試験において減少率は以下の式で算出した。

$$\text{減少率（％）} = \frac{\text{対照区} - \text{試験区}}{\text{対照区}} \times 100$$

11. 結果

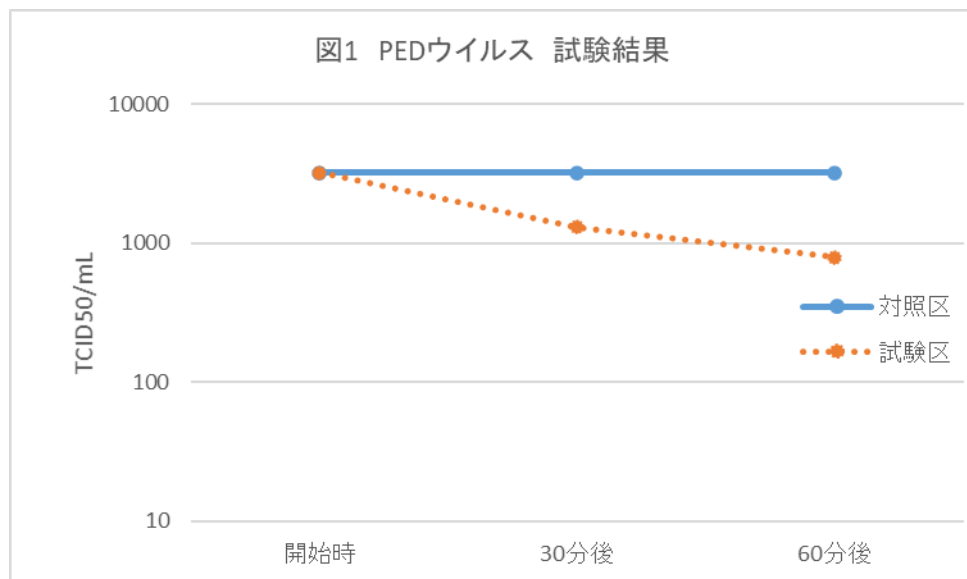
PED ウイルスに対する試験結果を表 1 及び図 1 に示した。

対照区では試験開始時から、開始後 60 分まで変化はみられなかった ($10^{3.5}$ TCID₅₀/mL)。

試験区では開始後 30 分で $10^{3.1}$ TCID₅₀/mL (59.3%減少)、60 分後で $10^{2.9}$ TCID₅₀/mL (75.3%減少) となった。

表 1 PED ウイルス試験結果(TCID₅₀/mL)

区	試験開始時	開始後 30 分	開始後 60 分
対照区	$10^{3.5}$	$10^{3.5}$ (3200)	$10^{3.5}$ (3200)
試験区		$10^{3.1}$ (1300)	$10^{2.9}$ (790)



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、30 分の接触で、59.3%、60 分の接触で 75.3%のウイルス感染価の減少がみられた。

(参考写真)

(試験機材)



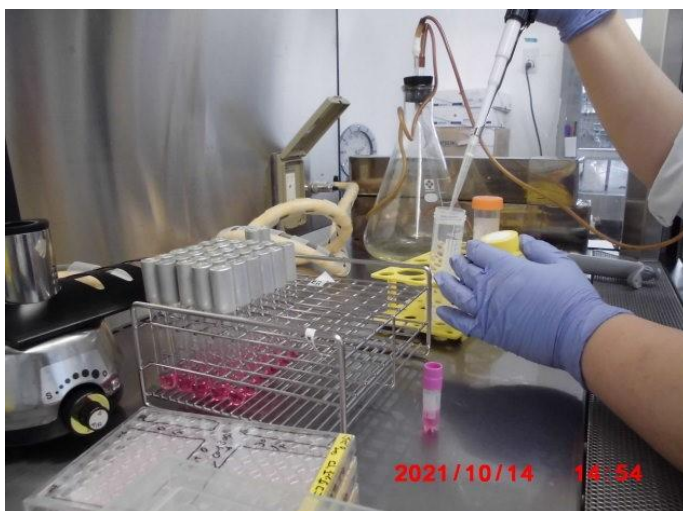
①試験資材設置



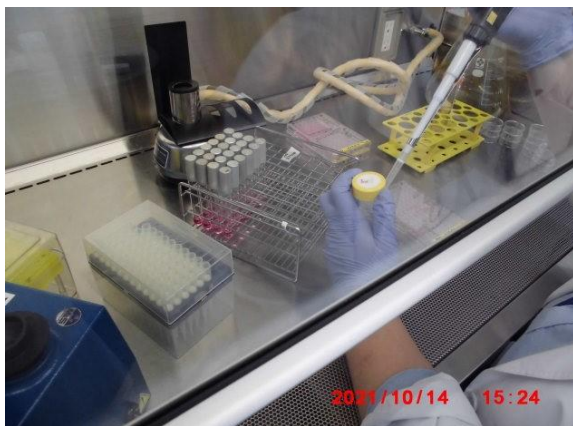
②試験資材作成



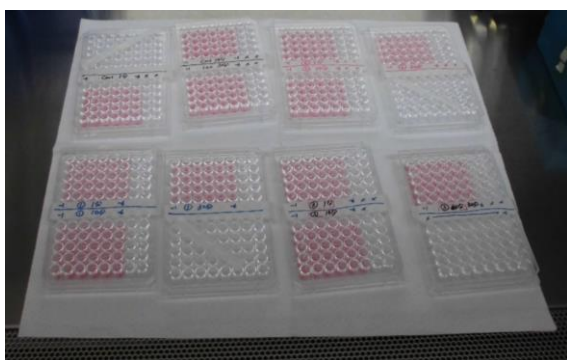
③試験資材へのウイルス液の添加



④反応後のウイルス測定(細胞接種)



⑤判定例



ウイルス陽性

ウイルス陰性

