



Japan
Food
Research
Laboratories

試験報告書

第 299091403-002 号

依頼者 アサヒブリテック株式会社

検体 アクアプロ21Rによる生成水(30ppm)

試験項目 ウイルス不活化試験

平成 11 年 08 月 20 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。

平成 12 年 02 月 17 日

財団法人

日本食品分析センター

東京本部 〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
大阪支所 〒564-0051 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

ウイルス不活化試験

1 依頼者

アサヒプリテック株式会社

2 検体

アクアプロ21Rによる生成水(30ppm)

備考：検体は財団法人 日本食品分析センターにて調製した。

なお、検体は依頼者により設置されたアクアプロ21Rを用いて調製した
(設置日：平成11年8月20日)。

3 試験実施場所

財団法人 日本食品分析センター 大阪支所
大阪府吹田市豊津町3番1号

4 試験担当責任者

財団法人 日本食品分析センター 大阪支所
微生物部 微生物試験課

5 試験実施年月日

平成11年11月15日～平成12年2月17日

6 試験目的

検体にウイルス浮遊液を接種し、経時的にウイルス感染価を測定する。

7 試験概要

検体0.9 mlにウイルス浮遊液0.1 mlを接種(以下「試験液」という。)し、室温に保存した。
保存3、5及び10分後に試験液中のウイルス感染価を測定した。
また、検体の有効塩素濃度を測定した。

8 試験結果

結果を表-1に示した。

表-1 試験液のウイルス感染価測定結果

試験ウイルス	有効塩素 濃度 (mg/L)	log TCID ₅₀ /ml ^{*1}			
		開始時 ^{*2}	3分	5分	10分
インフルエンザ ウイルス	45	5.3	<1.7	<1.7	<1.7
単純ヘルペス ウイルス	45	6.0	<1.7	<1.7	<1.7
アデノウイルス	35	4.3	2.0	<1.7	<1.7
ポリオウイルス	35	4.7	2.0	<1.7	<1.7

*1 試験液1 ml当たりの50 %組織培養感染量(TCID₅₀)の対数值

*2 ウイルス浮遊液の50 %組織培養感染量を測定し、試験液1 ml当たりに換算した。

9 試験方法

1) 試験ウイルス

- ① インフルエンザウイルスA型(H1N1)
- ② 単純ヘルペスウイルス1型
- ③ アデノウイルス5型
- ④ ポリオウイルス2型

2) 使用細胞

- ① インフルエンザウイルス：MDCK(NBL-2)細胞 ATCC CCL-34株[大日本製薬株式会社]
- ② 単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス及びポリオウイルス：Hep-2細胞 ATCC CCL-23株[大日本製薬株式会社]

3) 使用培地

① 細胞増殖培地

Eagle MEM[日水製薬株式会社, 0.06 mg/mlカナマイシン含有]に新生コウシ血清 [ICN]を10 %加えたものを使用した。

② 細胞維持培地

MDCK細胞については、以下の組成の培地を使用した。

Eagle MEM	1,000 ml
7.0 %NaHCO ₃	32 ml
L-グルタミン(29.2 g/L)	10 ml
100×MEM用ビタミン液	30 ml
10 %アルブミン	20 ml
トリプシン(5 mg/ml)	2 ml

Hep-2細胞については、Eagle MEMに新生コウシ血清を1 %加えたものを使用した。

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、MDCK細胞又はHep-2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、各ウイルスを接種した。次に、細胞維持培地を加えて炭酸ガスインキュベーター(CO₂濃度: 5 %)内でインフルエンザウイルス(MDCK細胞)は34℃3~5日間、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス及びポリオウイルス(Hep-2細胞)は37℃7~10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、80 %以上の細胞に形態変化(細胞変性効果)が起こっていることを確認した。次に、凍結融解を1~3回行った後、培養液を遠心分離(3,000 rpm, 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

検体0.9 mlに各ウイルス浮遊液0.1 mlを接種、かくはんした後室温で保存した。保存3、5及び10分後に各試験液0.1 mlを分取し、各細胞維持培地0.9 mlに添加した。

6) ウイルス感染価の測定

細胞増殖培地を用い、MDCK細胞又はHep-2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各細胞維持培地を0.1 mlずつ加えた。次に、各試験液を添加した細胞維持培地及びその希釈液0.1 mlを4穴ずつに接種し、炭酸ガスインキュベーター(CO₂濃度：5%)内でインフルエンザウイルス(MDCK細胞)は34℃3～5日間、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス及びポリオウイルス(Hep-2細胞)は37℃7～10日間培養した。

培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて各細胞の形態変化(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(TCID₅₀)を算出して試験液1 ml当たりのウイルス感染価に換算した。

また、検体の有効塩素濃度をよう素滴定法により測定した。

以 上