

試験報告書

依頼者 セパレーターシステム工業株式会社



検体 食品添加物 バイオイオナース

表題 ウイルス不活化試験

ノロウイルス試験(代替菌ネコカリシウイルス)

2012年(平成24年)05月28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。

26

BẢN BÁO CÁO THÍ NGHIỆM

Người yêu cầu: Separator System Kogyo Co., Ltd

Trung tâm phân tích thực phẩm Nhật Bản
52-1 Moyoyoyogi-cho, Shibuya-ku, Tokyo

Mẫu xét nghiệm: Phụ gia thực phẩm KAMISAMA

Tiêu đề: Thí nghiệm khử hoạt tính virut

Thí nghiệm Noro virus (vi khuẩn thay thế feline calicivirus)

Chúng tôi xin báo cáo kết quả thí nghiệm của mẫu thí nghiệm nói trên đã đưa cho trung tâm ngày 28 tháng 5 năm 2012

Nếu bạn xuất bản báo cáo này ở nơi khác, vui lòng tuân thủ các quy tắc đăng bài của Trung tâm.

Trung tâm phân tích thực phẩm Nhật Bản

ウイルス不活化試験

1 依頼者

セパレーターシステム工業株式会社

2 検体

食品添加物 バイオイオナーズ

3 試験目的

検体のネコカリシウイルスに対する不活化試験を行う。

4 試験概要

検体にネコカリシウイルスのウイルス浮遊液を添加，混合し，作用液とした。室温で作用させ，10分後に作用液のウイルス感染価を測定した。また，あらかじめ予備試験を行い，ウイルス感染価の測定方法について検討した。

なお，ネコカリシウイルスは，細胞培養が不可能なノロウイルスの代替ウイルスとして広く使用されている。

5 試験結果

1) 予備試験

細胞維持培地で作用液を1000倍に希釈することにより，検体の影響を受けずにウイルス感染価が測定できることを確認した。

2) ウイルス感染価の測定

結果を表-1に示した。

THÍ NGHIỆM KHỬ HOẠT TÍNH VIRUT

1. Người yêu cầu

Separator System Kogyo Co., Ltd

2. Mẫu thí nghiệm

Phụ gia thực phẩm KAMISAMA

3. Mục đích thí nghiệm

Tiến hành thí nghiệm khử hoạt tính cho feline calicivirus

4. Tóm tắt thí nghiệm

Một huyền phù virus calicillin đã được thêm vào mẫu và trộn lẫn để thu được dung dịch tác dụng. Dung dịch được phép hoạt động ở nhiệt độ phòng và hiệu giá nhiễm virus của dung dịch tác dụng được đo sau 10 phút. Ngoài ra, một thử nghiệm sơ bộ đã được tiến hành trước để kiểm tra phương pháp đo lường mức độ lây nhiễm của virus.

Feline calicillin được sử dụng rộng rãi như một loại virus thay thế cho norovirus không thể nuôi cấy trong tế bào.

5. Kết quả thí nghiệm

1) Thí nghiệm sơ bộ

Người ta đã xác nhận rằng hiệu giá nhiễm virus có thể được đo mà không bị ảnh hưởng bởi mẫu bằng cách pha loãng dung dịch tác dụng 1000 lần trong môi trường duy trì tế bào.

2) Đo hiệu giá nhiễm virus

Kết quả thể hiện trong bảng -1

表-1 作用液のウイルス感染価測定結果

試験 ウイルス	対 象	log TCID ₅₀ /mL*1	
		開始時	10分後
ネコカリシ ウイルス*2	検 体	8.0	4.0
	対 照	8.0	7.5

TCID₅₀: median tissue culture infectious dose, 50 %組織培養感染量

*1 作用液1 mL当たりのTCID₅₀の対数値

*2 ノロウイルスの代替ウイルス

開始時: 作用開始直後の対照のTCID₅₀を測定し、開始時とした。

対照: 精製水

作用温度: 室温

6 試験方法

1) 試験ウイルス

Feline calicivirus F-9 ATCC VR-782(ネコカリシウイルス)

2) 使用細胞

CRFK細胞[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

イーグルMEM培地「ニッスイ」①に牛胎仔血清を2%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、使用細胞を組織培養用フラスコ内に単層培養した。

Bảng -1: Kết quả đo hiệu giá nhiễm virus của dung dịch tác dụng

Virus thí nghiệm	Đối tượng	Log TCID ₅₀ /mL*1	
		Khi bắt đầu	Sau 10 phút
Feline calicillin *2	Mẫu thí nghiệm	8.0	4.0
	Đối chiếu	8.0	7.5

TCID₅₀/mL: median tissue culture infectious dose, 50% lượng nuôi cấy mô

*1 Log của TCID₅₀ tương ứng với 1ml dung dịch tác dụng

*2 Virus thay thế của noro virus

Khi bắt đầu: đo TCID₅₀ của đối chiếu ngay sau khi bắt đầu tác dụng và lấy là lúc bắt đầu.

Đối chiếu: nước tinh khiết

Nhiệt độ tác dụng: nhiệt độ phòng

6. Phương pháp thí nghiệm

1) Virus thí nghiệm

Feline calicillin F-9 ATCC VR-782 (vi rút calicillin trên mèo)

2) Tế bào sử dụng

Tế bào CRFK [Dainippon Pharma Co., Ltd]

3) Môi trường sử dụng

① Môi trường phát triển tế bào

Chúng tôi đã sử dụng môi trường đã thêm 10% huyết thanh bê vào [Nissui] ① [Công ty TNHH Dược phẩm Nissui] môi trường MEM Eagle.

② Môi trường duy trì tế bào

Chúng tôi đã sử dụng môi trường đã thêm 2% huyết thanh bê vào [Nissui] ① môi trường MEM Eagle.

4) Chuẩn bị dịch huyền phù vi rút

① Nuôi cấy tế bào

Sử dụng môi trường phát triển tế bào, các tế bào được sử dụng được nuôi cấy đơn lớp trong bình nuôi cấy mô.

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(CO₂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)が起こっ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、10分後に細胞維持培地を用いて1000倍に希釈した。

なお、対照として精製水を用いて同様に試験し、開始時についても測定を行った。

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、1000倍希釈後の作用液及び対照を、細胞維持培地を用いて10倍段階希釈した。その希釈液0.1 mLを4穴ずつに接種し、37℃±1℃の炭酸ガスインキュベーター(CO₂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(TCID₅₀)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

② Việc cấy vi rút

Sau khi nuôi cấy đơn lớp, môi trường phát triển tế bào được lấy ra khỏi bình và tiêm virus thử nghiệm. Tiếp theo, thêm vào môi trường bảo trì tế bào, nuôi cấy trong tủ áp khí carbon 37°C ±1°C (nồng độ CO₂: 5%) trong 1-5 ngày.

③ Chuẩn bị huyền phù vi rút

Sau khi nuôi cấy, hình thái của các tế bào đã được quan sát bằng kính hiển vi tương phản pha ngược và đã xác nhận rằng những thay đổi hình thái (hiệu ứng thoái hóa tế bào) xảy ra trong các tế bào. Tiếp theo, dung dịch nuôi cấy được phân ly ly tâm (3000r/min, 10 phút), dung dịch nổi phía trên thu được sẽ lấy làm huyền phù vi rút.

5) Thực hiện thí nghiệm

Thêm 0.1mL dịch huyền phù vi rút vào 1mL mẫu thí nghiệm, trộn lẫn và lấy làm dung dịch tác dụng. Để nó hoạt động ở nhiệt độ phòng, sau 10 phút, sử dụng môi trường duy trì tế bào hòa tan gấp 1000 lần.

Ngoài ra, thí nghiệm tương tự sử dụng nước tinh khiết làm đối chiếu, tiến hành đo khi bắt đầu.

6) Đo hiệu giá nhiễm vi rút

Sử dụng môi trường phát triển, sau khi thực hiện nuôi cấy đơn lớp tế bào sử dụng trong vi bản (96 lỗ) dùng để nuôi cấy mô, loại bỏ môi trường phát triển tế bào, thêm từng 0.1ml môi trường duy trì tế bào. Tiếp đó, sử dụng môi trường duy trì tế bào pha loãng 10 lần dung dịch tác dụng sau khi pha loãng 1000 lần và đối chiếu. Tiêm 0.1ml dịch pha loãng đó vào mỗi 4 lỗ, nuôi cấy trong tủ áp khí carbon 37°C ±1°C (nồng độ CO₂: 5%) trong 4-7 ngày.

Sau nuôi cấy, dùng kính hiển vi tương phản pha ngược quan sát có hay không sự biến đổi hình thái (hiệu ứng thoái hóa tế bào) của tế bào, bằng phương pháp Reed-Muech, tính toán 50% lượng truyền nhiễm nuôi cấy mô (TCID₅₀), chuyển đổi sang mức độ lây nhiễm vi rút trên 1ml dung dịch tác dụng.

Kết thúc