

2020年7月31日

## 「アルタント」による豚熱ウイルスの不活化

北海道大学大学院獣医学研究院 微生物学教室

迫田 義博



### 【目的】

「アルタント」の豚熱ウイルスに対する不活化効果を評価する。

### 【材料と方法】

#### 1. ウイルス

豚熱ウイルス GPE<sup>-</sup>株 (感染価  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml)

#### 2. 試験品

「アルタント」

#### 3. 感染価測定用細胞

ブタ腎臓由来株化細胞 (SK-L 細胞)

#### 4. 感染価測定用タンパク質検出試薬

Nano Glo HiBiT Lytic Detection System (プロメガ)

#### 5. ウイルス不活化試験

チューブに試験品 900 $\mu$ l を入れ、そこに滅菌蒸留水 (DW) で 5 倍希釈した GPE<sup>-</sup>株 100 $\mu$ l 加え、ボルテックスで混合後 25 $^{\circ}$ C で反応させた。15 秒、1 分、5 分後に 100 $\mu$ l ずつ回収して停止液として 0.3% チオ硫酸ナトリウム 10 $\mu$ l とウマ血清 400 $\mu$ l を加えて感染価測定用試料とした。また、対照として試験品の代わりに滅菌 DW を用いた。

感染価測定用試料及び対照試料を MEM (10% ウマ血清含) でそれぞれ 10 倍階段希釈し、96 穴プレート 4 穴に 10 倍階段希釈液を 50 $\mu$ l ずつ添加、そこにブタ腎臓由来株化細胞 (SK-L 細胞) を 100 $\mu$ l 同時まきこみした。4 日後、Nano Glo HiBiT Lytic Detection System (プロメガ) と反応させ、ルシフェラーゼ活性を測定、その後ウイルス感染価 (TCID<sub>50</sub>/ml) を算出した。

## 6. 停止液の確認

チューブに試験品または滅菌 DW を 90 $\mu$ l 入れ、そこに停止液として 0.3%チオ硫酸ナトリウム 10 $\mu$ l とウマ血清 400 $\mu$ l を加えたボルテックスで混合した。停止後の反応液に滅菌 DW で 5 倍希釈した GPE<sup>-</sup>株 10 $\mu$ l 加え、MEM (10%ウマ血清含) でそれぞれ 10 倍階段希釈し、96 穴プレート 4 穴に 10 倍階段希釈液を 50 $\mu$ l ずつ添加、そこにブタ腎臓由来株化細胞 (SK-L 細胞) を 100 $\mu$ l 同時まきこみした。4 日後、Nano Glo HiBiT Lytic Detection System (プロメガ) と反応させ、ルシフェラーゼ活性を測定、その後ウイルス感染価 (TCID<sub>50</sub>/ml) を算出した。

### 【結果】

#### 1. ウイルス不活化試験 (図 1, 左と中央)

試験品では 15 秒でウイルスが検出限界以下になった。DW と比べウイルスの感染価を 1,000 分の 1 以下まで下げた。

#### 2. 停止液の確認 (図 1, 左と右)

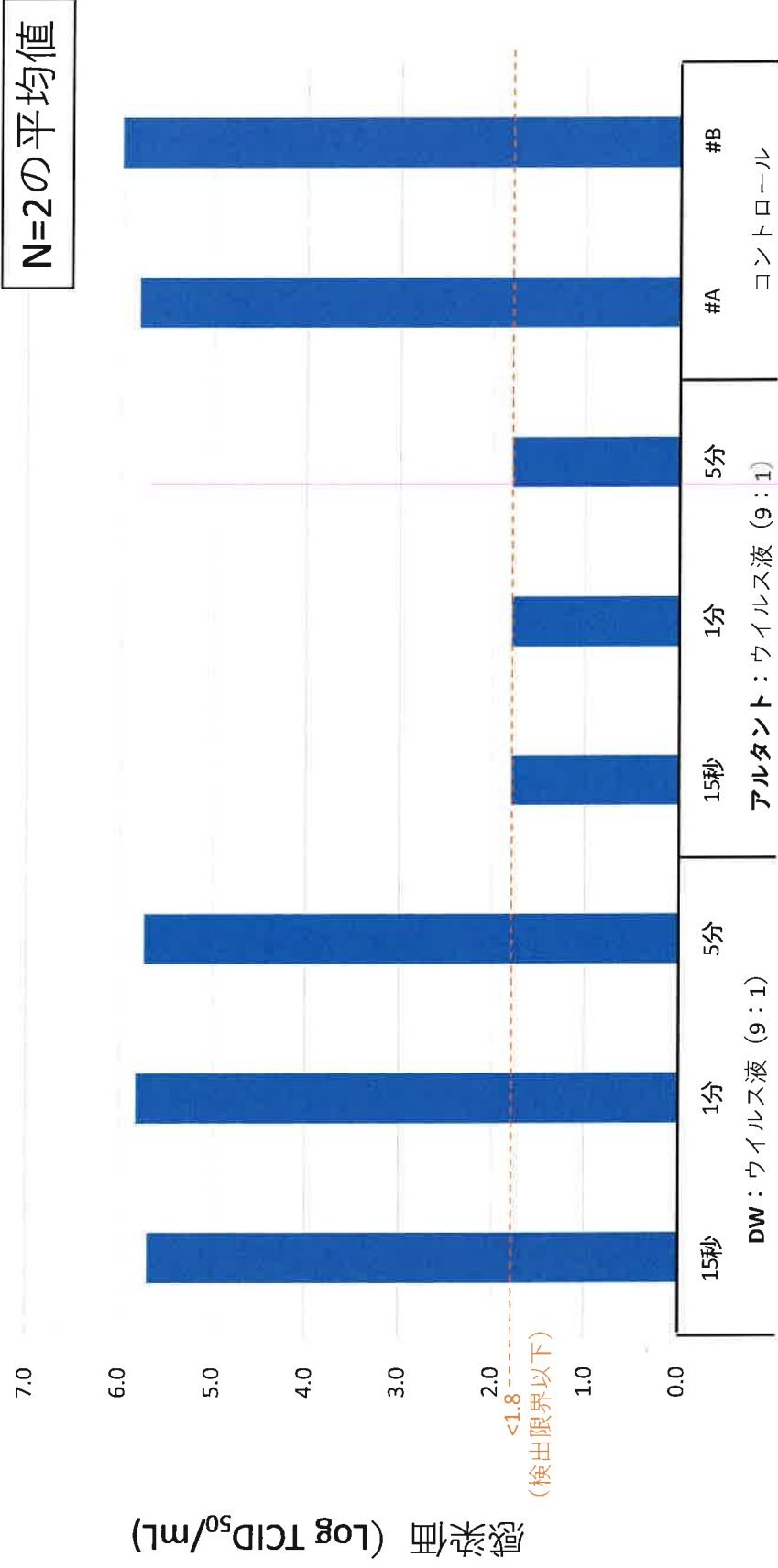
停止液と反応後にウイルスを加えた結果、ウイルス不活化試験で DW を使用した場合と同様の結果となった。よって停止液で試験品の反応が停止されることが確認できた。

### 【まとめと考察】

「アルタント」は瞬時に豚熱ウイルスを不活化することがわかった。養豚の現場での使用にあたっては、有機物の影響など追加で調べることが望ましい。

図1

# 「アルタント」による豚熱ウイルスGPE<sup>-</sup>/Hibit株の不活化



#A : DW、チオ硫酸ナトリウム、血清を混合後、ウイルス液を加え感染価を測定した。  
#B : アルタント、チオ硫酸ナトリウム、血清を混合後、ウイルス液を加え感染価を測定した。