

ISSN 0563-8461

東水試出版物通刊 No. 327

調査研究要報 No. 173

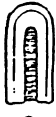
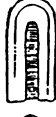
# 昭和58年度 魚病対策技術開発研究報告書

マス類の伝染性病原体の消毒法に関する研究

昭和59年3月

東京都水産試験場

# 正誤表

頁	桁	誤	正
1	25	ポリリオキッレン アルキル左ノールエーテル	ポリオキッレン アルキル左ノールエーテル
2	図1	 I P N (Buhl.) I H N (HV7601) 供試ウイルス調製液 C A V F V	 I H N (HV7601) I P N (Buhl.) 供試ウイルス調製液 C A V F V
3	13	CTEが発見せず	CTEが発現せず
8	28	1:125 溶液の $10^2$	1:125 溶液、1:250溶液の $10^2$
9	表5	BZE 1:125 $\searrow$ $\frac{4}{4}$ 希釈倍数 $10^{-2}$	BZE 1:125 $\searrow$ $\frac{0}{4}$ 希釈倍数 $10^{-2}$
13	表9	経過時間30分 $\searrow$ $\frac{4}{4}$ 希釈倍数 $10^{-6}$	経過時間30分 $\searrow$ $\frac{2}{4}$ 希釈倍数 $10^{-6}$
14	8	—△— は 1:125	—△— は 1:125
"	"	—○— は 1:250 溶液	—○— は 1:250 溶液
15	2	BZA - II の 1:250 溶液	BZA - II の 1:125 溶液
"	5	$Y = 0.250X + 7,300$ (BZA - I, 1:250 溶液)	$Y = -0.250X + 7,300$ (BZA - I, 1:250 溶液)
"	"	$Y = 0.240X + 7,600$ (BZA - II, 1:125 溶液)	$Y = -0.240X + 7,600$ (BZA - II, 1:125 溶液)
"	6	D値 (D - valne; .....	D値 (D - value; .....
16	19	BZA - I の 1:250 溶液	BZA - I の 1:250 溶液
"	22	$10t/D$	$10\%$
"	24	BZA - I	BZA - II
17	2	考えられる	考えられる
"	18	魚病の病原体	魚類の病原体
"	21	魚病病原体	魚類病原体

# 目 次

I はじめに .....	1
II IPN ウイルスに対する逆性石けんの効果について .....	1
1. 材料および方法 .....	1
1) IPN ウイルスに対する殺ウイルス効果 .....	1
2) 高濃度液による殺ウイルス効果 .....	3
2. 結 果 .....	4
1) IPN ウイルスに対する殺ウイルス効果 .....	4
2) 高濃度溶液による殺ウイルス効果 .....	5
3. 考 察 .....	6
III IHN ウイルスに対する逆性石けんの効果について .....	7
1.材料および方法 .....	7
1) IHN ウイルスに対する殺ウイルス効果 .....	7
2) 短時間処理の殺ウイルス効果 .....	7
3) 血清添加の影響 .....	8
2. 結 果 .....	8
1) IHN ウイルスに対する殺ウイルス効果 .....	8
2) 短時間処理の殺ウイルス効果 .....	11
3) 血清添加の影響 .....	12
3. 考 察 .....	15
IV 要 約 .....	17
V 昭和54年度から58年度(5ケ年間)の取りまとめ .....	17
VI 参 考 文 献 .....	20

- |           |   |
|-----------|---|
| 1. 実施機関   | 東京都水産試験場奥多摩分場   |
| 2. 指導・助言者 | 農林水産省養殖研究所病理部<br>病原生物研究室長 原 武 史   |
| 3. 研究担当者  | 主 事 井上 潔(試験、研究、取りまとめ)<br>主 事 池谷文夫(試験、研究)<br>主 事 小松俊夫(同 上 )<br>主任研究員 田中米満(総 括) |

## I はじめに

逆性石けんはハロゲン系消毒剤と同様に我が国のサケ・マス類養殖場における使用頻度の高い消毒剤である。しかし逆性石けんの魚類ウイルスに対する効果についての資料は少ない。逆性石けんのウイルスに対する効果はウイルスの種類によって異なり、脂質、特にコレステロールと結合し易い親油性 (lipophilic) ウイルスに有効とされている (渡辺; 1980, Klein and Deforest; 1963, 北村ら; 1976)。しかしエンテロウイルスのように親水性 (hydrophilic) のウイルスでは効果が無いとされている。サケ・マス類の代表的病原ウイルスである IPN、IHN ウイルスに対する効果について山崎ら (1976) は IPN ウイルスに対し塩化ベンザルコニウム製剤 (商品名: オスパン) の 1:125 希釈液 (原液濃度 0.08%)、30 分処理で効果が無いこと、佐々木ら (1976) は IHN ウイルスに対して上記製剤の 1:250 希釈液 (原液濃度 0.04%)、30 分処理で有効であることを報告している。本年度は逆性石けんの IPN、IHN ウイルスに対する効果をさらに詳細に検討した。

## II IPN ウイルスに対する逆性石けんの効果について

### 1. 材料および方法

#### 1) IPN ウイルスに対する殺ウイルス効果

##### ① 供試ウイルス

IPN ウイルスの Buhl. 株 (以降 IPNV と略記する。) を使用した。

##### ② 供試株化細胞

供試ウイルス液の調製および生残ウイルス量の定量はともに CHSE-214 細胞を使用した。

##### ③ 供試ウイルス液の調製

十分に繁茂した細胞単層を 2 倍に分散後 500 ml のガラス製ルー形培養ビン中に 50 ml の培養液 (MEM<sub>2</sub>) とともに植え、20℃ 24 時間培養液に MOI を 10・TCID<sub>50</sub>/cell で接種し、20℃ 15 時間培養ののち細胞内ウイルス (CAV) を PBS (-) で回収し供試ウイルス液とした。供試ウイルス液の感染力価は 10<sup>7.8</sup> TCID<sub>50</sub>/ml であった。〔詳細は東京水試 (1983) を参照のこと〕

##### ④ 供試消毒剤および濃度

塩化ベンザルコニウム (8%) とポリオクチルポリアミノエチルグリシン (1.8%)、ポリリオキソエチレンアルキルフェノールエーテル (1.2%) の合剤 (商品名: 北研ゼット, 以降

BZA-Iと略記する。)および塩化ベンザルコニウム10%製剤(商品名:オスパン、以降BZA-IIと略記する。)、塩化ベンゼトニウム10%溶液(以降BZEと略記する。)を原液としPBS(-)で所定濃度に希釈し供試液とした。濃度は原液の1:125、250、500、1,000希釈の4濃度を設定した。

⑤ 感作温度および時間

感作温度は15℃、時間は5、15、30、60分とした。

⑥ 操作手順

操作手順を図1に示した。所定濃度の2倍濃度の消毒剤希釈液をバイアルビン(5ml容)

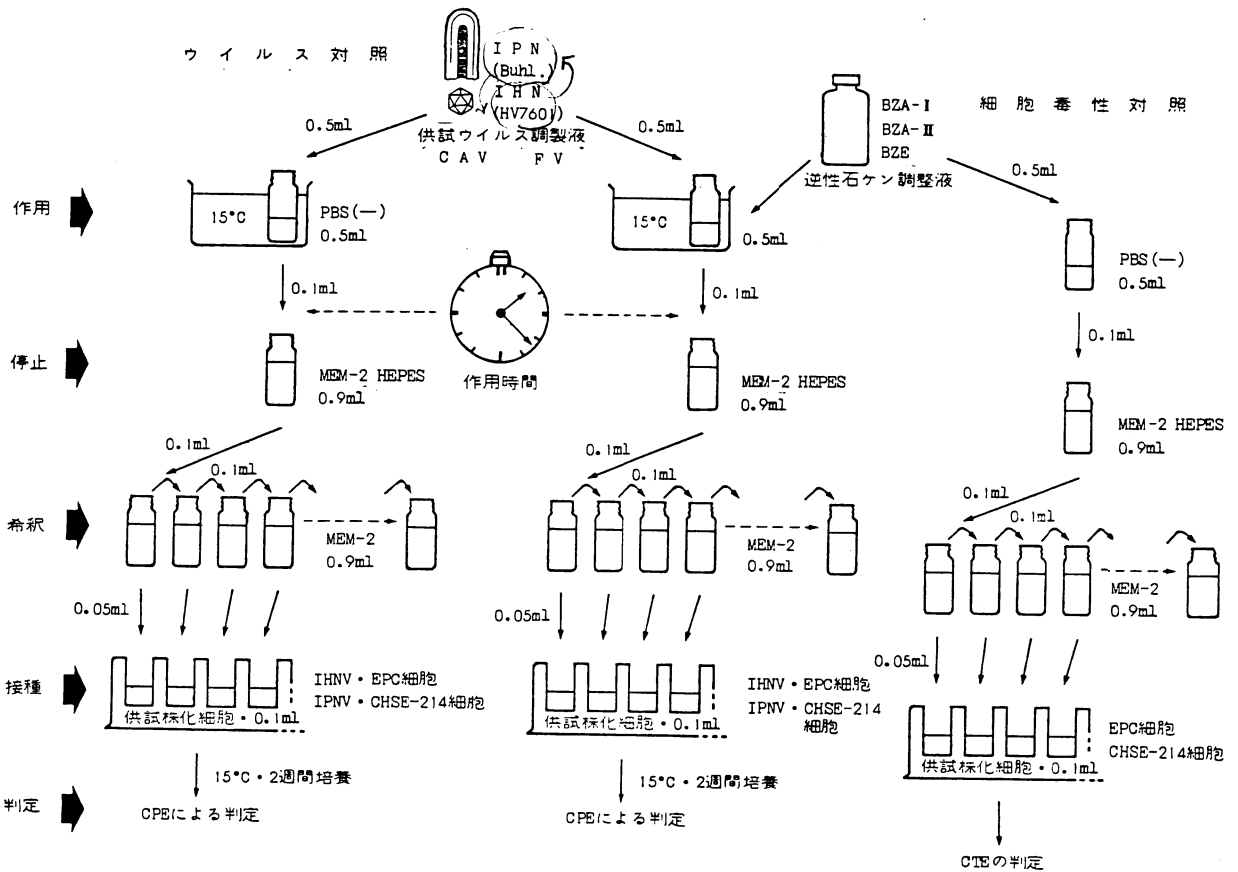


図 1 逆性石けんのIPNV、IHNウイルスに対する効力評価のための操作手順

に0.5 ml分注して水浴中に静置し、同様に水浴中に静置したウイルス液0.5 mlを混合し、ストップウオッチを作動させ所定時間経過後混合液0.1 mlをMEM<sub>2</sub>・HEPESを0.9 ml分注したバイアルビンに取り、さらにMEM<sub>2</sub>で10倍段階希釈し各希釈液をマイクロプレートの4 wellに0.05 mlずつ接種した。

⑦ 消毒剤の細胞毒性対照

15℃水浴中で消毒剤希釈液とPBS(-)を等量混合し、混合液をMEM<sub>2</sub>で10倍段階希釈し各希釈液をマイクロプレートの4 wellに0.05 mlずつ接種した。

⑧ ウイルス対照

15℃水浴中でPBS(-)とウイルス液を等量混合し、所定時間経過後にその0.1 mlを取りMEM<sub>2</sub>で10倍段階希釈し各希釈液をマイクロプレートの4 wellに0.05 mlずつ接種した。

⑨ 効果の判定

マイクロプレートを15℃の恒温器に置いてCPE発現の有無を2週間観察し、感染力価(TCID<sub>50</sub>/ml)を算出した。さらに、細胞毒性対照でCTEが発見せず、ウイルス対照で十分量のウイルスの存在が保証される希釈倍数を求め、ウイルスと消毒剤混合液をこの倍数に希釈し接種したwellのCPE観察結果から、4 well全部にCPEが観察された場合無効(-)、4 well中の1~3 wellにCPEが観察された場合(±)、4 wellすべてCPEが観察され無かった場合は有効(+)として殺ウイルス効果を判定した。

2) 高濃度溶液による殺ウイルス効果

材料および方法は前記の1)とほぼ同じであり、相異点のみを以下に示す。

① 供試ウイルス液

供試ウイルス液の感染力価は10<sup>8.8</sup> TCID<sub>50</sub>/mlであった

② 供試消毒剤濃度

供試消毒剤濃度を原液の1:25、50、100希釈の3濃度とした。

③ 操作手順

図1に示すとおりである。所定時間経過後ウイルスと消毒剤の混合液0.1 mlを0.9 mlのMEM<sub>10</sub>で10倍希釈した後、さらにMEM<sub>2</sub>で10倍段階希釈しマイクロプレートに接種した。

④ 消毒剤の細胞毒性対照

特に設定せず、ウイルスと消毒剤混合液を接種したマイクロプレートにおいて変性の起こる時間、変性細胞の形態からCTEとCPEを区別した。

## 2. 結 果

### 1) IPNウイルスに対する殺ウイルス効果

細胞毒性対照の結果を表1に示した。所定濃度の消毒剤溶液の $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 倍希釈液を

表1 逆性石けんのCHSE-214に対する細胞毒性

接種液 希釈倍数	消毒剤 濃度	B Z A - I				B Z A - II				B Z E			
		1:125	1:250	1:500	1:1000	1:125	1:250	1:500	1:1000	1:125	1:250	1:500	1:1000
$10^{-2}$		*4/4	4/4	0/4	0/4	4/4	4/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4
$10^{-3}$		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
$10^{-4}$		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

\*…分子はCTEの発現したwellの数、分母は接種したwellの数を示す。

細胞単層に接種しBZA-I、BZA-IIでは1:125、1:250溶液の $10^2$ 倍希釈液でCTEが観察され、BZEでは1:125溶液の $10^2$ 倍希釈液でCTEが観察された。

ウイルス対照の結果を表2に示した。所定時間毎にウイルス液の $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 倍希釈液

表2 IPNウイルス対照

希釈倍数	経 過 時 間 (分)			
	5	15	30	60
$10^{-2}$	*4/4	4/4	4/4	4/4
$10^{-3}$	4/4	4/4	4/4	4/4
$10^{-4}$	4/4	4/4	4/4	4/4

\*…分子はCPEの発現したwellの数、分母は接種したwellの数を示す。

を細胞単層に接種し、5、15、30、60分すべての時点で $10^4$ 倍希釈液を接種した4well全部にCPEが観察された。

細胞毒性およびウイルス対照の結果から、ウイルスと消毒剤の混合液の $10^3$ 倍希釈液を接種したwellのCPEを観察し、IPNVに対する逆性石けんの効果を判定して表3に示した。表

表3 逆性石けんのIPNVウイルスに対する効果

消毒剤	時間 (分)	濃 度 (希釈倍率)			
		1:125	1:250	1:500	1:1000
BZA-I	5	—	—	—	—
	15	—	—	—	—
	30	—	—	—	—
	60	—	—	—	—
BZA-II	5	—	—	—	—
	15	—	—	—	—
	30	—	—	—	—
	60	—	—	—	—
BZE	5	—	—	—	—
	15	—	—	—	—
	30	—	—	—	—
	60	—	—	—	—

より明らかなようにBZA-I、BZA-II、BZEとも1:125溶液で60分間処理した場合でも殺ウイルス効果は認められなかった。また感染力価の低下も認められなかった。

## 2) 高濃度溶液による殺ウイルス効果

消毒剤の1:25、1:50、1:100溶液の殺ウイルス効果を前記1)の結果と同様に $10^3$ 倍希釈液について判定し表4に示した。さらに表中の括弧内に生残ウイルス量を感染力価( $\text{Log} \cdot \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ )で示した。表より明らかなようにBZA-I、BZA-II、BZEともに1:25溶液で60分間処理した場合でも効果は認められず、感染力価の低下も認められなかった。



表4 逆性石けんのIPNVウイルスに対する高濃度溶液の効果

消毒剤	時間 (分)	濃度 (希釈倍率)		
		1:25	1:50	1:100
BZA-I	5	* -(8.8)	-(8.8)	-(8.8)
	15	-(8.8)	-(8.8)	-(8.8)
	30	-(8.8)	-(8.3)	-(8.8)
	60	-(8.1)	-(7.8)	-(8.8)
BZA-II	5	-(8.8)	-(8.8)	-(8.8)
	15	-(8.8)	-(8.8)	-(8.8)
	30	-(8.6)	-(7.8)	-(8.8)
	60	-(8.6)	-(8.3)	-(8.8)
BZE	5	-(8.8)	-(8.8)	-(8.8)
	15	-(8.8)	-(8.8)	-(8.8)
	30	-(8.6)	-(8.3)	-(8.8)
	60	-(8.3)	-(8.6)	-(8.1)

\*... ( ) 内は生残ウイルス量を感染力価・TCID<sub>50</sub>/ml  
で示す。

### 3. 考 察

今回IPNVに対する逆性石けんの効果を濃度と処理時間を変えて検討した。その結果塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウムともに0.4%の60分処理でも効果は無く感染力価の低下さえ認められなかった。感染力価に変化が認められなかったことからこれら両薬剤の濃度をさらに濃くしても殺ウイルス効果は規待出来ないと考えられる。吐山(1976)によれば逆性石けんの中のセタコニウムはウイルスに対し効果が高いとされている。しかしIPNVに対する他の消毒剤の効果(東京水試;1983)を見ると、IPNVはKlein and Deforest(1963)のいう親水性ウイルス、渡辺ら(1975)のエンテロウイルスと同じ挙動を示すことから逆性石けんによるIPNVの不活化は期待出来ないと考えられる。したがってIPNV防除に際し逆性石けんに期待するものがあるとするれば、逆性石けんの持つ洗浄作用によるIPNV汚染量の低減で

あろう。

### III IHN ウイルスに対する逆性石けんの効果について

#### 1. 材料および方法

##### 1) IHNウイルスに対する殺ウイルス効果

###### ① 供試ウイルス

長野県においてニジマスより分離されたIHNウイルスのHV7601株(以降IHNVと略記する)を使用した。なお本ウイルスは東京水産大学水族病理学講座、西村定一講師より分与いただいたものである。

###### ② 供試株化細胞

供試ウイルス液の調整および生残ウイルス量の定量はともにEPC細胞を使用した。

###### ③ 供試ウイルス液の調製

十分に繁茂した細胞単層を2倍に分散後500mℓのガラス製ルー形培養ビン中に50mℓの培養液(MEM<sub>2</sub>)とともに植え、20℃24時間培養後にMOIを10・TCID<sub>50</sub>/cellで接種し20℃で12時間30分培養のち細胞内ウイルス(CAV)をPBS(-)で回収し供試ウイルス液とした。供試ウイルス液の感染力価は10<sup>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>/mℓであった。

###### ④ 供試消毒剤および濃度

前記IIのIPNV実験で供試したBZA-I、BZA-II、BZEの3剤を使用し、濃度は1:125、250、500、1000、2000の5段階を設定した。(BZEについては1:2000を省略した。)

###### ⑤ 感作温度および時間

感作温度は15℃、時間は5、15、30、60分とした。ただしBZA-I、IIの1:2000については60分を省略した。

###### ⑥ 操作手順

図1に示すとおりである。

###### ⑦ 効果の判定

前項IPNVの場合と同様に細胞毒性対照とウイルス対照を設定し、殺ウイルス効果を判定した。

##### 2) 短時間処理の殺ウイルス効果

材料および方法は前記1)とほぼ同じであり相異点のみを以下に示す。

① 供試ウイルス液

供試ウイルス液の感染力価は  $10^{8.6}$  TCID<sub>50</sub>/mℓ であった。

② 供試濃度

原液の 1 : 125、250、500、1000 の 4 濃度を設定した。

③ 感作時間

15、30、60 秒とした。

④ 消毒剤の細胞毒性対照

特に設定せず、ウイルスと消毒剤の混合液を接種したマイクロプレートにおいて変性の起こる時間、変性細胞の形態から CTE と CPE を区別した

3) 血清添加の影響

前記 1) との相異点のみを以下に示す。

① 供試株化細胞

供試ウイルス液の調整には FHM 細胞、生残ウイルス量の定量には EPC 細胞を使用した。

② 供試ウイルス液の調整

十分に繁茂した FHM 細胞単層を 2 倍に分散後 500 mℓ ガラス製ルー形培養ビンに 50 mℓ の MEM<sub>10</sub> とともに植え、20℃ 24 時間培養後に MOI を  $10^{-3}$  TCID<sub>50</sub>/cell で接種し、15℃ で細胞が完全に剝離するまで培養したのち培養液を 0.45 μ のメンブランフィルターでろ過し、ロ液を -80℃ で凍結保存した。実験に際してはウイルス液の感染力価を  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub>/mℓ に調整し使用した。

③ 供試濃度

原液の 1 : 125、250、500、1000 の 4 濃度である。ただし希釈液には MEM<sub>10</sub> を使用した。

④ 感作温度および時間

15℃ で 5、15、30 分とした。

2. 結 果

1) IHN ウイルスに対する殺ウイルス効果

細胞毒性対照の結果を表 5 に示した。所定濃度の消毒剤溶液の  $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  倍希釈液を細胞単層に接種し BZA-I、BZA-II の 1 : 125 溶液の  $10^2$  倍希釈液で CTE が観察された。BZE では 1 : 125 溶液の  $10^2$  倍希釈液でも CTE は観察されなかった。

表5 逆性石けんのEPCに対する細胞毒性

接種液 希釈倍数	消毒剤	B Z A - I				B Z A - II				B Z E			
	濃度	1:125	1:250	1:500	1:1000	1:125	1:250	1:500	1:1000	1:125	1:250	1:500	1:1000
$10^{-2}$		*4/4	4/4	0/4	0/4	4/4	4/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4
$10^{-3}$		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
$10^{-4}$		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

\*...分子はC T Eの発現したwellの数、分母は接種したwellの数を示す。

ウイルス対照の結果を表6に示した。所定時間毎にウイルス液の $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 倍希釈液を細胞単層に接種し5、15、30、60分すべての時点で $10^4$ 倍希釈液まで、接種した4well全部にC P Eが観察された。

表6 I H Nウイルス(C A V)対照

希釈倍数	経過時間 (分)			
	5	15	30	60
$10^{-2}$	*4/4	4/4	4/4	4/4
$10^{-3}$	4/4	4/4	4/4	4/4
$10^{-4}$	4/4	4/4	4/4	4/4
$10^{-5}$	2/4	3/4	4/4	2/4

\*...分子はC P Eの発現したwellの数、分母は接種したwellの数を示す。

細胞毒性およびウイルス対照の結果から、ウイルスと消毒剤の混合液の $10^3$ 倍希釈液を接種したwellのCPEを観察し、IHNウイルスに対する逆性石けんの効果を判定して表7に示した。

表7 逆性石けんのIHNウイルス(CAV)に対する効果

消毒剤	時間 (分)	濃 度 (希釈倍率)				
		1:125	1:250	1:500	1:1000	1:2000
BZA-I	5	+	+	+	+	-(6.8)
	15	+	+	+	+	-(6.8)
	30	+	+	+	+	-(6.6)
	60	+	+	+	+	** NT
BZA-II	5	+	+	+	*+(3.3)	-(6.8)
	15	+	+	+	+(3.1)	-(6.8)
	30	+	+	+	+	-(6.6)
	60	+	+	+	+	NT
BZE	5	+	+	+	±(4.3)	NT
	15	+	+	+	+	NT
	30	+	+	+	+	NT
	60	+	+	+	+	NT

\* ... ( )内は生残ウイルス量を感染力価・TCID<sub>50</sub>/mℓで示す。

\*\*... 実施せず。

BZA-I、BZA-IIでは1:1000溶液の5分処理で有効であった。しかしBZEでは1:1000溶液5分処理では効果は不完全であり、有効となるのに15分を要した。表中の括弧内に生残ウイルス量を感染力価(TCID<sub>50</sub>/mℓ)で示した。BZA-II、BZEの1:1000溶液の場合5~15分処理ではウイルスの生残が認められた。BZA-I、BZA-IIの1:2000溶液は無効であった。

2) 短時間処理の殺ウイルス効果

逆性石けんの I H N V に対する短時間の効果を表 8 に示した。B Z A - I は 1 : 1 2 5、1 : 2 5 0 溶液の 1 5 秒処理で、また B Z A - II および B Z E では 1 : 1 2 5 溶液の 1 5 秒処理で測

表 8 逆性石けんの I H N ウイルス ( C A V ) に対する短時間処理の効果

消 毒 剤	時 間 ( 秒 )	濃 度 ( 希釈倍率 )			
		1 : 1 2 5	1 : 2 5 0	1 : 5 0 0	1 : 1 0 0 0
B Z A - I	1 5	+	+	±	-
	3 0	+	+	+	-
	6 0	+	+	+	-
B Z A - II	1 5	+	±	-	-
	3 0	+	+	-	-
	6 0	+	+	-	-
B Z E	1 5	+	±	-	-
	3 0	+	±	-	-
	6 0	+	-	-	-

定限界以下となり、短時間で殺ウイルス効果が認められた。図 2 には感染力価の経時的变化を示した。これを見ると B Z A - I の 1 : 5 0 0 溶液では 1 5、3 0 秒後の感染力価がそれぞれ  $10^{3.8}$ 、 $10^{3.3}$  TCID<sub>50</sub>/mℓ となり 6 0 秒で測定限界以下となった。B Z A - II の 1 : 2 5 0 溶液では 1 5、3 0、6 0 秒後の感染力価はそれぞれ  $10^{4.6}$ 、 $10^{3.6}$ 、 $10^{3.3}$  TCID<sub>50</sub>/mℓ であった。B Z A - II の 1 : 5 0 0、1 : 1 0 0 0 溶液では感染力価の低下は認められなかった。B Z E の 1 : 2 5 0 溶液では 1 5、3 0、6 0 秒後の感染力価はそれぞれ  $10^{4.8}$ 、 $10^{4.1}$ 、 $10^{3.3}$  TCID<sub>50</sub>/mℓ であった。B Z A - I の 1 : 2 5 0 溶液と B Z A - II および B Z E の 1 : 5 0 0 溶液の減少曲線は類似する傾向がみられ、B Z A - II、B Z E よりも B Z A - I の効果が高いことがうかがわれた。

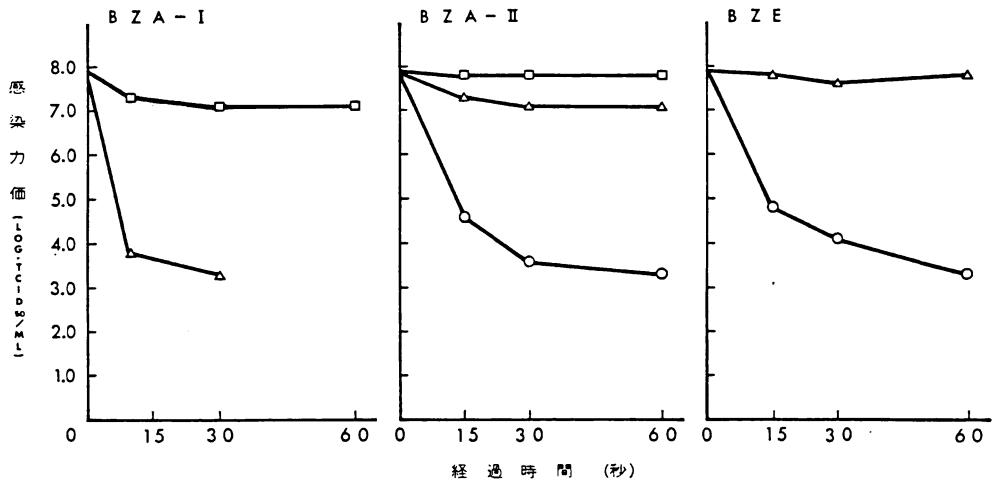


図2 逆性石けんの短時間処理に伴うIHN生残ウイルス量の変化

(—○— は1:250、—△— は1:500、—□— は1:1000溶液  
を表わす。)

### 3) 血清添加の影響

細胞毒性対照については1)に示した結果と同様にBZA-I、IIの1:250溶液の $10^2$ 希釈液でCTEが観察された。またウイルス対照の結果は表9に示すように $10^5$ 希釈液を接種した4well全部にCPEが観察された。これらの結果から $10^3$ 希釈液を接種したwellのCPEを観察し、逆性石けんの殺IHNウイルス効果に及ぼす血清添加の影響を判定し表10に示した。

表9 IHNウイルス( c F B S ) 対照

希釈倍数	経過時間 (分)		
	5	15	30
$10^{-3}$	* 4 / 4	4 / 4	4 / 4
$10^{-4}$	4 / 4	4 / 4	4 / 4
$10^{-5}$	4 / 4	4 / 4	4 / 4
$10^{-6}$	4 / 4	3 / 4	4 / 4

\*...分子はCPEの発現したwellの数、分母は接種したWellの数を示す。

表10 血清の存在下における逆性石けんのIHNウイルスに対する効果

消毒剤	時間 (分)	濃度 (希釈倍数)			
		1:125	1:250	1:500	1:1000
BZA-I	5	+	-	-	-
	15	+	±	-	-
	30	+	+	-	-
BZA-II	5	-	-	-	-
	15	±	-	-	-
	30	+	-	-	-
BZE	5	-	-	-	-
	15	-	-	-	-
	30	-	-	-	-



牛胎児血清を10%添加した場合の逆性石けんの殺ウイルス効果は、BZA-Iでは1:125溶液の5分処理、1:250溶液の30分処理で認められ、BZA-IIでは1:125溶液の30分処理で認められた。一方BZEでは1:125溶液の30分処理でも効果は認められなかった。

各消毒剤処理における生残ウイルス量の変化を図3に示した。BZA-Iの1:125溶液で

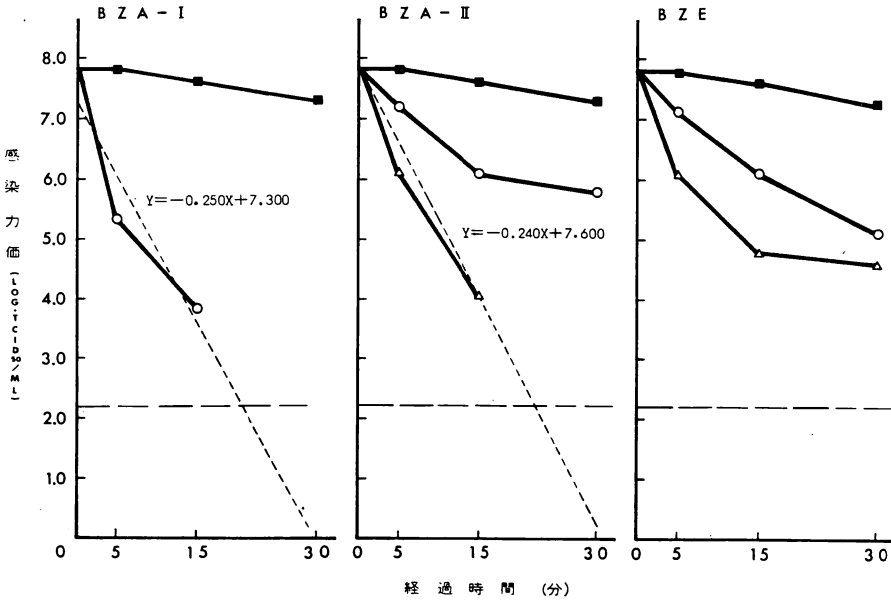


図3 牛胎児血清(10%)存在下での逆性石けん処理に伴うIHN生残ウイルス量の変化

( $\blacktriangle$ は1:125、 $\circ$ は1:250溶液、 $\blacksquare$ はウイルス対照を表わす。

また図中の点線は回帰直線、破線は測定限界を表わす。)

は5分で測定限界以下となり、1:250溶液では5分、15分後の感染力価はそれぞれ $10^{5.3}$ 、 $10^{3.8}$  TCID<sub>50</sub>/mlとなり30分後には測定限界以下となった。BZA-IIの場合1:125溶液の5、15分処理後の感染力価がそれぞれ $10^{6.1}$ 、 $10^{4.1}$  TCID<sub>50</sub>/mlとなり、30分後には測定限界以下となった。また1:250では30分後にも感染力価は $10^{5.8}$  TCID<sub>50</sub>/mlであった。BZEでは1:125、1:250溶液ともに30分後の感染力価はそれぞれ

$10^{4.6}$ 、 $10^{5.1}$  TCID<sub>50</sub>/mℓと高い値を示した。BZA-Iの1:250溶液およびBZA-IIの1:250溶液の30分処理後の感染力価を $10^0$  TCID<sub>50</sub>/mℓと仮定した場合、感染力価は時間の経過とともにほぼ直線的に低下する傾向が認められる。このことから時間と感染力価の関係について最少2乗法により回帰直線を求めると図3の点線となり、回帰式は
 
$$Y = 0.250X + 7,300 \text{ (BZA-I, 1:250溶液)}, Y = 0.240X + 7,600 \text{ (BZA-II, 1:125溶液)}$$
 であらわされる。この回帰式からD値(D-value; Decimal reduction time)を求めると、時間をx、生残ウイルス量の対数値をyとするとD値は生残曲線式 $y = ax + b$ から $D = \frac{1}{-a}$ で求められ、BZA-Iの1:250溶液のD値は4分、BZA-IIの1:125溶液のD値は4.2分となりほぼ等しい値を示した。

### 3. 考 察

逆性石けんは魚類株化細胞に対する毒性が高く(東京水試; 1983)、殺ウイルス効果の判定に際しては消毒剤の作用停止および細胞毒性除去操作を考慮する必要がある。この操作に中和法を導入する場合、中和剤としてはレブロールW+レシチンや陰イオン界面活性剤、牛乳等が知られている(北村; 1976、吐山; 1976、飯塚ら; 1977)。しかしこれらの中和剤では中和後にも細胞毒性の残存が認められ、ハロゲン系消毒剤の場合のチオ硫酸ナトリウム中和に比べて使用法は複雑である。一方、希釈法の導入については逆性石けんの毒性の高さから毒性除去に要する希釈倍率が高くなることが予想され、この為に実験精度の低下が懸念される。しかし、操作の簡便さやウイルス対照と細胞毒性対照を置くことによって精度の低下をある程度補うことも可能と考えられたことから希釈法を導入した。

結果の項で示したように本実験では $10^3$ 倍希釈液についてウイルスの生残を観察し殺ウイルス効果を判定した。したがって有効(+)とは $10^3$ 倍希釈液を接種した4wellすべてにおいてCPE(-)であることを示している。ここで $10^2$ 倍希釈液ではすべてCPE(+)と仮定すると、この場合の感染力価は $\leq 10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.05mℓ、つまり $\leq 10^{3.8}$  TCID<sub>50</sub>/mℓであり、有効(+)とは当初の感染力価を $10^{3.8}$  TCID<sub>50</sub>/mℓ以下へ減少させたことを示している。いま1)、2) 3)の結果についてみると1)の供試ウイルス液の感染力価は $10^{6.9}$  TCID<sub>50</sub>/mℓ、2)では $10^{6.6}$  TCID<sub>50</sub>/mℓ、3)では $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub>/mℓであり、1)の場合の有効(+)は感染力価の減少率が99.920%以上であることを示すことになる。同様に2)の場合は99.998%、3)の場合は99.990%以上であることを示している。

IHNウイルス(CAV)に対する逆性石けんの殺ウイルス効果を最低有効濃度(希釈倍数)と

最低処理時間で示すと B Z A - I では 1 : 2 5 0 の 1 5 秒、 B Z A - II および B Z E では 1 : 1 2 5 の 1 5 秒であり、 B Z A - I は B Z A - II および B Z E の 2 倍の効果を示している。これは B Z A - I がグリシン系両性石けんととの合剤であることから両性石けんの相乗効果と考えられる。また B Z A - II および B Z E の結果から逆性石けんの有効濃度を原抹濃度に換算すると、塩化ベンザルコニウムおよび塩化ベンゼトニウムともに 0.08% である。

牛胎児血清の存在下における逆性石けんの殺ウイルス効果を最低有効濃度（希釈倍数）と最低処理時間で示すと B Z A - I では 1 : 1 2 5 の 5 分、 B Z A - II では 1 : 2 5 0 の 3 0 分であり、 B Z E は設定濃度および時間の範囲では無効であった。そこで 3 0 分処理の効果を比較すると B Z A - I は 1 : 2 5 0、 B Z A - II は 1 : 1 2 5 で有効となり C A V の場合と同様に B Z A - I は B Z A - II より 2 倍の効果を示した。さらに、 3 0 分処理の効果を C A V の場合と比較すると、血清の添加によって B Z A - I は  $\frac{1}{4}$ 、 B Z A - II は  $\frac{1}{8}$  に効果が低下し、 B Z E では  $\frac{1}{8}$  以下に低下しており B Z E、 B Z A - II、 B Z A - I の順で有機物による阻害を受けやすいと考えられる。 B Z A - I と B Z A - II の差については両性石けんは有機物の存在による効果低下が少ない（芝崎； 1 9 7 7）ことから、 B Z A - I の効果の低下が少なかったことによると考えられる。

実験の結果から逆性石けんは I H N ウイルスに有効であることが明らかになった。そこで、実際に養殖現場において逆性石けんを使用する場合について考えてみると、養殖場では種々の阻害要因の存在下で使用され、特に有機物による活性阻害が大であることから、血清添加実験の結果は現場における使用効果に近い値を示していると考えられる。したがって 3) の結果についてみると B Z A - I の 1 ; 2 5 0 溶液および B Z A - II の 1 : 1 2 5 溶液では時間の経過とともにほぼ直線的に生残ウイルス量が減少している。いま B Z A - II の 1 : 1 2 5 を例にとると D 値は 4.2 分である。この値から次式により 1 分および 6 0 分後の Inactivation Factor を求めると、それぞれ  $10^{0.2}$ 、  $10^{14.3}$  Inactivation Factor =  $10^{t/D}$  [ t : 処理時間(分)、 D : D 値 ] となり、 1 分を手指や靴の消毒、 6 0 分を器具・機材の消毒と仮定すると、 1 5 ° C の水温条件下で B Z A - I の 1 : 1 2 5 溶液による手指・靴の消毒では汚染ウイルス量を  $10^{0.2}$  T C I D <sub>50</sub> / m l だけ減少させる効果しかないと推定される。一方、器具・機材の消毒ではこの条件で 1 時間浸漬することにより  $10^{14.3}$  T C I D <sub>50</sub> / m l のウイルス量を  $10^0$  T C I D <sub>50</sub> / m l に減少させる効果を有することになる。このことは逆性石けんは器具・機材の消毒のように、一定時間以上浸漬する方法では I H N ウイルスに対する効果は高いが、手指、靴の消毒のように短時間処理を前提とする場合、条件によっては十分な効果が得られないことを示唆している。したがって、逆性石けんで I H N ウイルスの消毒をする場合は原則として養殖器具・機材の消毒に使用する方が良く、その常用濃度は原抹換算で 0.1 % 程度であろう。また、手指や靴など短時間処理を要するものでは処理前の汚染度を出来る限り小さくする必要があり、汚物や血液、粘液等を消毒前に洗浄したり、数個の消

毒槽を準備して繰返し消毒をするなどの工夫が必要であろう。あるいはアルコールとの併用により効果の向上を計ることも有益と考えられる。

逆性石けんを器具・機材の消毒に使用する場合に問題となるのは金属腐食性と繊維への吸着性であろう。前者については高橋(1982)によれば、亜硝酸ナトリウムを0.2%の割合に加えることにより防錆が可能である。後者についてはタモ、網地等の消毒に使用する薬液の作りかえを頻繁にすることにより効力の低下を防ぐ必要があろう。

#### IV 要 約

1. IPNウイルスに対する逆性石けんの殺ウイルス効果は認められなかった。
2. 逆性石けんはIHNVウイルスに対して高い効果を示した。
3. 逆性石けんのIHNVウイルスに対する効果は血清の存在下で $\frac{1}{4}$ ～ $\frac{1}{8}$ に低下した。
4. IHNVウイルスに対する塩化ベンザルコニウムの常用濃度は0.1%程度である。
5. 逆性石けんに両性石けんを加えることにより効果が高くなる傾向が認められた。
6. 逆性石けんは器具・機材の消毒の場合に高い効果が期待できる。
7. 手指等の短時間処理では消毒前の汚染度を低くする為の工夫、あるいはアルコールとの併用を考えるべきである。

#### V 昭和54年度から58年度(5ケ年間)の取りまとめ

##### 1. 研究の目約

年々増加する魚病の基本的対策の一つは防疫対策であり、防疫対策の一環として消毒剤の使用があげられる。今日、サケ・マス類の養殖場ではウイルス病の蔓延を契機として衛生思想が高揚し、それとともに各種の消毒剤が使用されるようになった。しかし魚病の病原体への消毒剤の効果に関する資料は少なく、現状では人畜の知見に基づいて使用されることが多い。このような状況が遷延すれば、養殖魚家の不利益はもとより、水産における無秩序な薬剤の使用という批判を惹起することも懸念される。本研究は魚病病原体に対する消毒剤の効果に関して基礎的知見を集積し、養殖場における消毒剤使用の適正化に資することを目的とした。

##### 2. 結 果

1) 細菌 (昭和54～56年度実施)

最も一般的な消毒剤効力評価法とされる石炭酸係数測定法を魚病細菌に応用する場合の問題点について、*A. salmonicida* *V. anguillarum*, *Staph. aureus* の三菌種を用いて、培地、培養温度、効果判定時間、標準菌種菌株を検討し、その結果に基づいて各種消毒剤のせつそう病菌石炭酸係数を求めた。また、ハロゲン系消毒剤についてはA O A C法に基づく効力評価試験を実施した。さらに現場における消毒剤の活性阻害要因を考慮し、ニジマス糞中細菌殺滅効果を検討した。得られた結果を以下に示す。

- (1) 検査指針ではブイオン培地を指定しているが、*A. salmonicida* と *V. anguillarum* の場合市販のハートインフュージョン乾燥粉抹培地と指定培地の結果に差は無く、市販のハートインフュージョン培地の使用が可能である。
- (2) 石炭酸係数を測定する場合の培養温度は20℃が最適と考えられる。
- (3) 消毒剤の効果判定が可能となる培養時間は *A. salmonicida* では48時間、*V. anguillarum* では72時間である。
- (4) 石炭酸の殺菌濃度は *A. salmonicida* では1:135～1:170、*V. anguillarum* では1:213～1:350となり、対照として供試した *Staph. aureus* (1:75) と比較して殺菌濃度が類似する *A. salmonicida* を標準菌種とした。
- (5) *A. salmonicida* は保存株と野外株、分離場所のちがいがによる石炭酸感受性のちがいが無く、ATCC14174株を標準菌株とした。
- (6) 界面活性剤の *A. salmonicida* に対する効果は *Staph. aureus*(ATCC 6538 p株) に対する効果に比べ2～4倍高くなった。
- (7) 各種消毒剤のせつそう病菌石炭酸係数は *Staph. aureus* と類似する傾向が認められた。
- (8) ハロゲン系消毒剤は魚病細菌を極めて低濃度短時間で殺滅するが効果の持続は短かく、現場において反覆使用する場合、有機ヨード剤で100ppm以上、次亜塩素酸ナトリウムで200ppm以上の濃度が必要である。
- (9) 糞便の混入により逆性石けん、両性石けん、ヨード剤の効力は著るしく低下した。糞便中の細菌の殺滅コストを算出し、市販消毒剤を用途別に比較した結果、細菌を対象とした場合は手指の消毒には逆性石けん、靴などの踏込消毒槽にはクレゾール石けん、養殖機材の消毒にはヨード剤や逆性石けん、池の消毒には塩素剤が適していると考えられる。

## 2) ウイルス (昭和56～58年度実施)

魚類ウイルスに対する消毒剤の効力評価のための基礎実験として、IPN、IHNVウイルスを対象に供試株化細胞、供試ウイルス液、感作温度、細胞毒性除去について検討し、その結果から各種消毒剤の殺ウイルス効果を明らかにした。得られた結果を以下に示す。

- (1) IPNウイルスではCHSE-214、IHNVウイルスにはEPC細胞が供試株化細胞として適している。
- (2) ウイルス液の調整法としては細胞内ウイルス(CAV)の回収による方法が適し、回収法は凍結融解法が適している。
- (3) CAV回収のためのウイルス培養時間はIPNウイルスでは15℃12.5時間、IHNVウイルスでは15℃15時間である。
- (4) CAVはIPNウイルスでは-20℃で凍結保存が可能である。しかしIHNVウイルスではその都度調整する必要がある。
- (5) 消毒剤の感作温度は15℃とする。
- (6) 消毒剤の細胞毒性除去はハロゲン系では中和法、アルコール系、フェノール系、界面活性剤系では希釈法によった。
- (7) アルコール系消毒剤はIPNウイルスではメタノールで効果が認められるが、イソプロパノール、エタノールでは効果は認められない。
- (8) フェノール系消毒剤ではクレゾール石けんがIHNVウイルスに対してのみ有効である。
- (9) ハロゲン系消毒剤では次亜塩素酸ナトリウム、サラン粉、ヨード剤が両ウイルスに対して有効である。
- (10) 界面活性剤では逆性石けんがIHNVウイルスに対し高い効果を示す。しかしIPNウイルスに対しては効果は認められない。
- (11) IHNVウイルスに比べIPNウイルスは消毒剤に対する抵抗性が高く、化学的消毒が困難であることが示唆される。

## VI 参 考 文 献

- 飯塚三喜・伊藤治(1977) : 消毒薬効力試験法、P. 236-264, 小華和忠・吐山豊秋・  
米村寿男編 動物用医薬品・飼料添加物・新飼料の有用性評価法, フジ・テクノシステム,  
東京, 500pp.
- 北村敬 (1976) : ウイルス検査のための組織培養技術, 近代出版, 東京, 418pp.
- \*北村敬ら(1976) : 第35回日本公衆衛生学会総会誌, 556pp.
- \* Klein M., and A. Deforest (1963) : Soap Chem Specialties 34, 70.
- 佐々木治雄・本西晃・三城勇・山崎正幸・山崎隆義(1976) : ニジマスのIHNについて, 長野  
水試研報, 魚病, 45-58.
- 芝崎勲 (1977) : 薬剤による殺菌, P131~210, 綿貫詰・實川佐太郎・榊原欣作編  
滅菌法・消毒法第1集, 文光堂, 東京 238pp.
- 高橋修和・薩田清明・三木康(1982) : 滅菌・消毒法マニュアル, 藤田企画出版, 埼玉 175pp.
- 東京水試(1983) : マス類の伝染性病原体の消毒法に関する研究, 昭和57年度魚病対策技術開  
発研究報告書, 東水試出版物通刊 №319 38pp.
- 吐山豊秋(1976) : 獣医領域における薬剤選択(2) 1. 消毒薬(その2), 動薬研究5, 5-8.
- 渡辺実・野田伸司・山田不二造・藤本進(1975) : エンテロウイルスに対する消毒薬の効果,  
岐衛所報. 20, 1-5.
- 渡辺実 (1980) : 消毒剤によるウイルスの不活化, 臨床とウイルス. 8(2), 41-45.
- 山崎隆義・佐々木治雄・田代文男(1976) : ニジマスのIPNについて. 長野水試研報, 魚病,  
28-44.

(\*...渡辺(1980)よりの間接引用)

昭和59年3月発行

登録番号10

昭和58年度魚病対策技術開発研究報告書  
(マス類の伝染性病原体の消毒法に関する研究)

編集・発行 東京都水産試験場技術管理部  
〒125 東京都葛飾区水元公園1-1  
電話 03-600-2873

印刷会社名 原口印刷株式会社  
〒101 東京都千代田区猿樂町1-5-19  
電話 03-291-8819