

東水試出版物通刊 No. 319

調査研究要報 No. 166

昭和57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 58 年 4 月

東京都水産試験場

# 目 次

I はじめに .....	1
II 魚類ウイルスに対する消毒剤の殺ウイルス効果の評価 .....	1
1. 供試株化細胞に関する検討 .....	1
2. 供試ウイルス液の検討 .....	4
1) 細胞内ウイルス回収法の検討 .....	5
(1) IPNV、IHNVの一段増殖曲線 .....	5
(2) CAVの回収手順と保存 .....	8
2) 調製法の異なるウイルス液に対するヨード剤の殺ウイルス効果の比較 .....	12
3. 消毒剤の作用温度に関する検討 .....	14
4. 消毒剤の作用停止および細胞毒性除去法の検討 .....	16
III IPN、IHNVウイルスに対する各種消毒剤の 殺ウイルス効果(中間報告) .....	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(試験補助)<br>主任研究員 田 中 米 満(総括) |

## I はじめに

サケ・マス類の養殖場においては市販消毒剤の使用が一般化しつつある。消毒剤の普及は各地に大きな被害をもたらしたIPN(伝染性すい臓壊死症)やIHN(伝染性造血器壊死症)などのウイルス性疾病の流行を契機とするものである。これらのウイルス病を予防するため各種の防疫対策が講じられ、消毒剤もその一環として利用され、魚卵や飼育池、飼育器具、手指、はき物等の消毒に使用され防疫上の効果を上げている。サケ・マス類の養殖場で使用されている消毒剤の主なものは、サラシ粉や次亜塩素酸ナトリウム等の塩素化合物およびヨードホルムやポビドンヨード等のヨウ素化合物、クレゾール石けん等のフェノール類、塩化ベンザルコニウムや塩化ベンゼトニウム等の界面活性剤、アルコール類である。しかしながら、これらの消毒剤のIPN・IHNウイルスに対する効果に関する基礎資料は少なく、Amend & Pietsch(1972)および山崎ら(1976)、佐々木ら(1976)、Elliot(1978)により報告されている程度である。既報の文献のなかで塩素化合物とヨウ素化合物については繰り返し取り上げられており、資料も比較的多いが、他の消毒剤に関しては十分とは言い難い。このように基礎的知見が不十分な状態で、一方で市販消毒剤の水産への利用頻度の増加は使用法に混乱を生ずるばかりでなく、将来“乱用”との批判を招来する結果と成り得ることも懸念され、現在使用されている消毒剤について資料の蓄積が急がれるところである。この現状を踏まえ當場では昭和54～56年度の魚病細菌を対象とした消毒剤の検討に引き続き、IPN・IHNウイルスに対する消毒剤の殺ウイルス効果を検討した。

## II 魚類ウイルスに対する消毒剤の殺ウイルス効果の評価

### 1. 供試株化細胞に関する検討

一般に消毒剤の殺ウイルス効果判定には株化細胞が使用される。またウイルスの増殖に適した株化細胞はウイルスの種類によって限定される。つまり株化細胞の種類によってウイルスの感受性が異なることが知られている。魚類由来株化細胞についても同様で、Kellyら(1978)はIPNウイルスに対してはFHMよりRTG-2の感受性が高く、IHNウイルスに対してはCHSE-214、RTG-2に比べFHMの感受性が高いことを報告した。またFendrickら(1982)はCHSE-214およびSTE-137、RTG-2、EPC、FHMのIHNウイルスに対する感受性を比較し、EPCとFHMの感受性が他の3種に比べて高いことを報告した。このように両ウイルスに対する株化細胞の感受性が異な

ることから、消毒剤の殺ウイルス効果の評価に際して供試細胞の選択が必要と考えられたため以下の実験を行った。

### 材料および方法

- ①供試ウイルス IPNウイルス (Buhl.) および IHNウイルス (HV7601) を供試した (以降 IPNV、IHNV と略記する)。両ウイルスは東京水産大学水族病理学講座西村講師より分与いただいた。
- ②供試ウイルス液の調製 IPNV は RTG-2、IHNV は FHM で 15℃・7 日間培養後 PEG 6000 吸着濃縮法 (佐野・西村; 1980、1981) により培地成分と血清を除去し供試ウイルス液とした。両ウイルスの感染力価は IPNV が  $10^{10.8}$ 、IHNV が  $10^{9.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml であった。
- ③供試株化細胞 RTG-2 および FHM、CHSE-214、STE-137、EPC の 5 種の魚類由来株化細胞を供試した。
- ④供試消毒剤および濃度 PVP-I 製剤 (商品名: 水産用イソジン液、以降イソジンと略記する) を供試した。実験に際しては IPNV では 10 ppm の有効ヨウ素量になるように PBS (-) で希釈し使用した。
- ⑤消毒剤とウイルスの接触時間 接触時間は 30 秒および 1 分、5 分、15 分、30 分とし消毒剤とウイルス液を混和後ストップウォッチを作動させ、所定時間後中和剤を加えイソジンの作用を停止させた。
- ⑥実験温度 9~11℃ の室温中で実施した。
- ⑦供試中和剤  $N/_{10}$  チオ硫酸ナトリウム溶液 (蒸留水希釈・高圧滅菌) を使用した。
- ⑧消毒剤との接触方法 三角フラスコに上記濃度のイソジン液を 40 ml 取り、ウイルス液 0.4 ml を加え、所定時間毎にその混合液 1 ml をあらかじめ中和剤 0.1 ml を分注して置いた 5 ml 容のスクリーバイアルに移し、イソジンの作用を停止させ株化細胞への接種材料とした。
- ⑨株化細胞への接種法 ガラス製培養ビン中で十分に繁茂した各細胞単層を 2 倍に分散し、ME M<sub>2</sub> 0.1 ml とともにマイクロプレートに植え、20℃ で 20~24 時間培養した後、上記により準備した材料 0.05 ml を接種した。なお、接種に際しては同一材料について 4 well を使用した。
- ⑩判定 接種後のマイクロプレートを 15℃ で培養し 14 日間 CPE の発現の有無を観察した。

## 結 果

I P N VおよびI H N Vに対するイソジンの殺ウイルス効果をそれぞれ表1、表2に示した。

表1 イソジン液のI P N Vに対する殺ウイルス効果

株化細胞	接 触 時 間 (分)				
	0.5	1	5	15	30
RTG-2	0/4*	0/4	0/4	0/4	0/4
FHM	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
CHSE-214	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4
STE-137	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
EPC	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

\*分母は使用したwell数、分子はCPE(+)のwell数である。

表2 イソジン液のI H N Vに対する殺ウイルス効果

株化細胞	接 触 時 間 (分)				
	0.5	1	5	15	30
RTG-2	2/4*	2/4	0/4	0/4	0/4
FHM	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4
CHSE-214	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4
STE-137	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
EPC	4/4	1/4	2/4	0/4	0/4

\*分母は使用したwell数、分子はCPE(+)のwell数である。

I P N Vについては表1に示すように、有効ヨウ素量10 ppmのイソジン液に接触させた場合1分以上の接触時間では完全に不活化された。接触時間が30秒の場合にはCHSE-214にのみ接種したwellの半数にCPEが観察された。

I H N Vについては表2に示すように、有効ヨウ素量1 ppmのイソジン液に接触させた場合接触時間毎のCPEの発現状況は株化細胞によってかなり異なり、FHMやCHSE-214、STE-137では接触時間が1分以上になるとCPEは観察されなかった。

しかしRTG-2では1分でもCPEが観察され、さらにEPCについては5分でも接種したwellの半数にCPEが観察された。

## 論 議

今回の実験結果についてIHNVでは各株化細胞間の感受性の違いを比較出来たが、IPNVではインジンの濃度設定がやや高すぎたことから、CPEの発現がCHSE-214のみに限られ、他の4種の株化細胞間の比較は出来なかった。しかしIPNVに対するCHSE-214の感受性が他の4種よりも高いことは今回の結果からも推定できる。また、これらの結果はKellyら(1978)およびFendrickら(1982)の結果や我国における荒井ら(1982)の結果と一致することから、IPNVに対するCHSE-214、IHNVに対するEPCの感受性は他4種よりも明らかに高いと言える。したがって、現時点においては両ウイルスに対する消毒剤の効果を評価する場合にはCHSE-214、EPCが供試株化細胞として適していると考えられる。

## 2. 供試ウイルス液の検討

ウイルスに対する消毒剤の効果の評価において実験成績の再現性を左右する要因の一つは供試ウイルス液である。一般に細菌と比較するとウイルスの実験では消毒剤の阻害要因の影響が大きいとされ、培養液中の血清や塩類は消毒剤の活性を阻害するばかりでなく、ウイルス保護作用も有している(飯塚;1977)。このため消毒剤の効力評価にはウイルス粒子以外の培地や血清、細胞成分を含まないウイルス液の調製が要求され、一般に超速心法や吸着濃縮法が用いられている。

ウイルス液の調製法に関して渡辺ら(1978)はポリオウイルスを使用して簡易な調製法を報告した。それは、細胞内で増殖したウイルスが培地中へ遊離する直前に細胞破壊によってウイルスを効率的に回収する方法である。この方法で調製したウイルス液は他の方法よりも消毒剤活性阻害が少なく、また操作に特殊な機器を必要としない。そこで、本法を魚類ウイルスに応用することを目的として、IPN・IHNVの細胞内ウイルス回収に必要な培養条件を明らかにした。

さらに従来からの調製法の一つである吸着濃縮法によるウイルスおよび培地成分を含むウイルス液と消毒剤の活性阻害について比較した。

## 1) 細胞内ウイルス回収法の検討

### (1) IPNV、IHNVの一段増殖曲線

#### 材料および方法

- ①供試ウイルス IPNV (Buhl.) および IHNV (HV7601) である。
- ②供試株化細胞 IPNVはCHSE-214、IHNVはEPCである。
- ③供試培地 牛胎児血清 (Gibco) を10%の割合に加えたイーグルMEM培地 (アール塩、日水) を使用した。
- ④培養温度 IPNV・IHNVとも15℃である。
- ⑤ウイルス接種法 十分に繁茂した細胞単層を分散剤で2倍に分散後25cm<sup>2</sup>のプラスチックボトル (コーニング社製) に5mlの培養液とともに植え20℃で24時間培養後、古い培地を捨て、細胞単層表面をハンクス液で洗浄し、ウイルスをMOIを10で接種した。接種後ティルティングを行いつつ吸着させ、1時間後に余分のウイルスをハンクス液で洗浄除去し、新しい培地5mlを加えて培養した。
- ⑥感染力価の定量 ウイルス接種後IPNVでは2、6、8、10、12、15、20、25、30、48時間培養、IHNVでは2、7、10、12、15、20、25、30時間培養時の液内ウイルス (Fluid virus:以降FVと略記する。) と細胞内ウイルス (Cell-associated virus:以降CAVと略記する。) の感染力価 (TCID<sub>50</sub>/ml) をマイクロタイター法によって定量した。CAVの回収手順は北村 (1976) に準じ、細胞の回収にはラバーポリスマンを使用し、細胞破壊は音波処理によった。

#### 結 果

IPNV、IHNVの一段増殖曲線をそれぞれ図1、2に示した。

IPNVのCAVの力価はウイルス接種後6~8時間目より上昇を始め、25時間目をピークとしてその後30、48時間目にかけて直線的に低下した。25時間目のCAVの力価は10<sup>6.7</sup>TCID<sub>50</sub>/mlであった。なお、細胞の顕微鏡観察では15時間目に微弱なCPEが観察された。一方、FVについてはCPEが観察された15時

間以降に力価の上昇が認められ、その後48時間目まで上昇した。48時間目のFVの力価は $10^{26}$  TCID<sub>50</sub>/mlに達した。

IHNVのCAVの力価はウイルス接種後の7時間目より上昇を始め、10時間から20時間目にかけて急激に上昇し、その後30時間までゆるやかに上昇した。30時間目のCAVの力価は $10^{5.1}$  TCID<sub>50</sub>/mlであった。細胞の顕微鏡観察では20時間目に明らかなCPEが認められた。一方FVの力価は12時間以降に急激に上昇し、30時間後の力価は $10^{5.8}$  TCID<sub>50</sub>/mlになった。

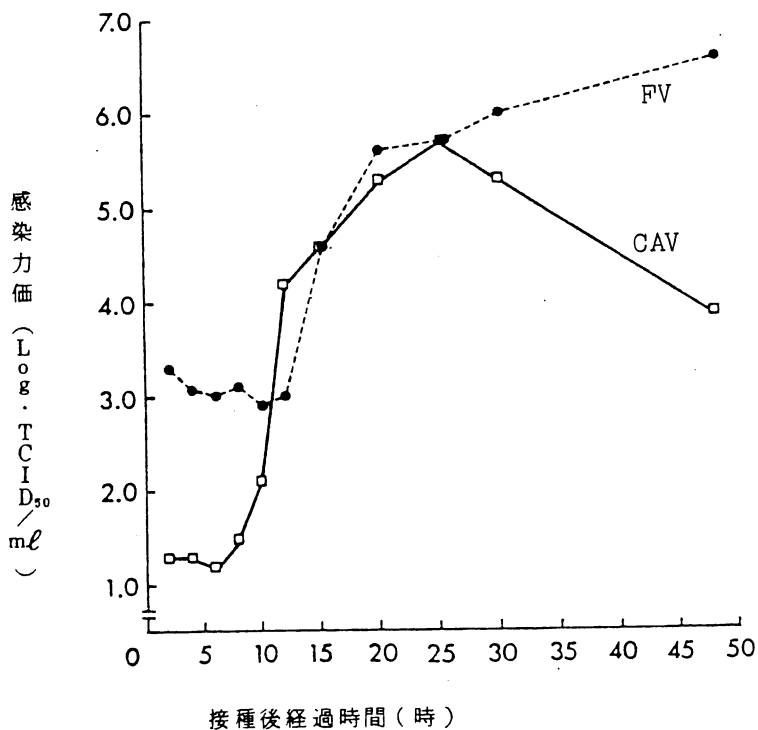


図1 IPNV (Buhl.) のCHSE-214における一段増殖曲線 (FVは液内ウイルス、CAVは細胞内ウイルスを示す。)



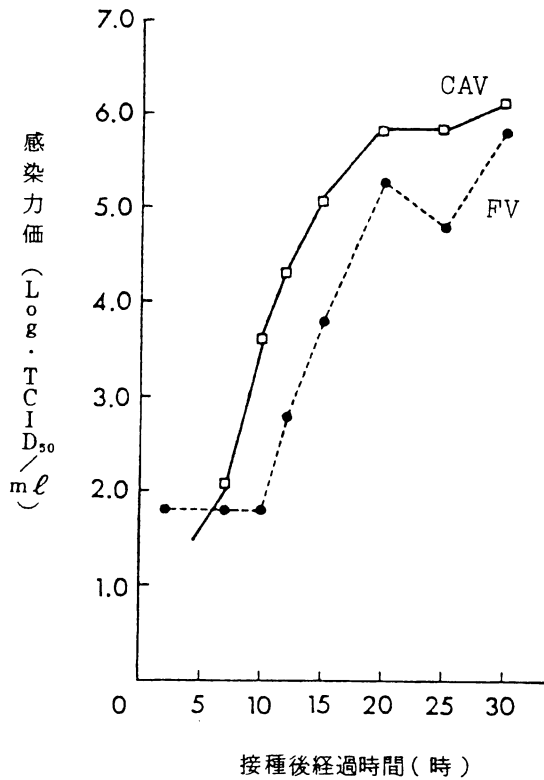


図2 IHN<sub>V</sub>(HV7601)のEPCにおける一段増殖曲線  
(FVは液内ウイルス、CAVは細胞内ウイルスを示す。)

## 論 議

CAVの回収にあたってはIPN・IHN<sub>V</sub>の一段増殖曲線からウイルス回収に最適な培養温度と時間を決定する必要がある。培養温度についてはIPNVの増殖適温は15～22℃と考えられ(Malsberger & Cerini; 1965, Kelly & Loh; 1975, Scherre, Bic & Cohen; 1974)、IHN<sub>V</sub>では13～18℃(Wingfield; 1969)とされており、今後両ウイルスに対する消毒剤の殺ウイルス効果実験を遂行するに際して培養温度が統一されていることは大きな利点と考えられることから、IPN・IHN<sub>V</sub>とも15℃とした。

IPNVの一段増殖曲線に関してはMossら(1969)がRTG-2で24℃において、Ahneら(1978)が同じ株化細胞で20℃における増殖曲線を報告して

いる。今回のCHSE-214での15℃における増殖曲線はこれらの文献と一致した。この増殖曲線から、CPEが未発現でFVの力価が低い培養時間内でCAVの力価の最も高い12~13時間がCAV回収に最適な培養時間と考えられる。

IHNVについてはCPEの発現がウイルス接種後20時間目であったことから、CPEの発現する以前でCAVの力価が最も高い15時間がCAV回収に最適な培養時間と考えられる。なお、CPEの発現とFVの力価上昇開始時間に違いがみられるが、これはIHNVの増殖様式がIPNVと異なり、細胞内ウイルスが細胞崩壊を起こす以前に出芽によって培養液中に放出されることに起因すると考えられる。

## (2) CAVの回収手順と保存

### 材料および方法

- ①供試ウイルス IPNV (Buhl.) および IHNV (HV7601) を用いた。
- ②供試株化細胞 IPNVはCHSE-214、IHNVはEPCを用いた。
- ③供試培地 牛胎児血清 (Gibco) を10%の割合に加えたイーグルMEM培地 (アール塩、日水) を使用した。
- ④ウイルス接種 十分に繁茂したCHSE-214およびEPCを2倍に分散後500 mlガラス製ルー形培養びん中に40 mlの培養液とともに植え、20℃で24時間培養した。その後MOIを10 TCID<sub>50</sub>/cellにしてIPNVとIHNVを接種した。
- ⑤培養温度と時間 両ウイルスとも培養温度は15℃、培養時間はIPNVが13時間、IHNVは15時間とした。
- ⑥細胞破砕法 所定時間培養後古い培地を捨て、細胞をPBS (-) で3回洗浄後分散剤処理し、8 mlのPBS (-) に再浮遊させ凍結融解法により破砕した。細胞破砕後3000 rpm、15分の遠心分離を行ない上清を回収しCAV液とした。なお、凍結融解の回数を1、2、3、4回としたときのCAVの回収量を比較した。
- ⑦CAVの保存 上記により回収したCAV液を5 mlのスクリーバイアルに0.1 mlずつ分注し、-20℃および-80℃に保存し8週間まで感染力価を測定した。
- ⑧感染力価の測定 マイクロタイター法によりTCID<sub>50</sub>/mlを測定した。

## 結 果

### ① 凍結融解の回数とCAVの感染力価

Shell-freezing により回収されたCAVの感染力価を図3に示した。

凍結融解の回数とCAVの感染力価についてIPNVでは1回で $10^{7.6}$ 、2回で $10^{7.4}$ 、3回で $10^{7.4}$ 、4回で $10^{7.3}$ となり、回数が増えても得られるCAVの感染力価は変わらなかった。またIHNVでは1回で $10^{6.8}$ 、2回で $10^{7.6}$ 、3回で $10^{7.3}$ 、4回で $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/mlとなり、回数が2～4回では感染力価は変わらなかったが、1回ではやや低くなった。

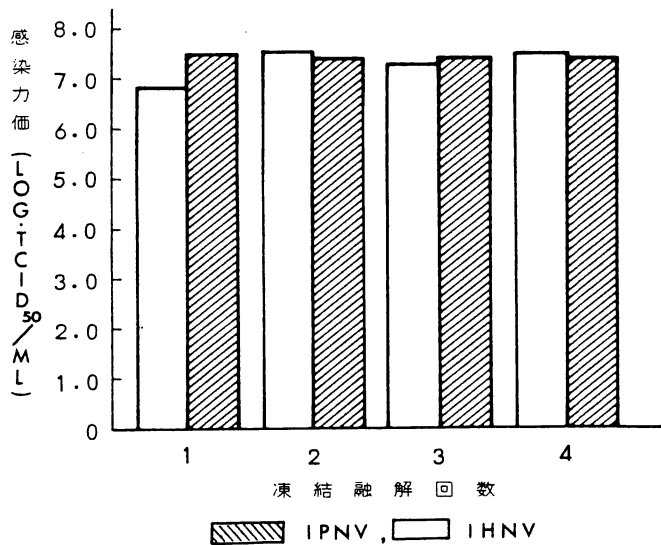


図3 凍結融解回数とCAVの感染力価

### ② CAVの保存

-20℃および-80℃の凍結保存に伴うIPNVとIHNVの感染力価の変化を図5に示した。

IPNVでは-20℃保存で8週後まで感染力価の変化は認められなかった。また-80℃では保存開始後1週目に感染力価の低下する傾向が認められたが、その後は8週目まで安定であった。IHNVでは-20℃ -80℃保存とも保存開始後1週目に感染力価の低下がみられ、-20℃では開始時に $10^{7.3}$  TCID<sub>50</sub>/mlであった感染力価は1週目には $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/mlに、また-80℃

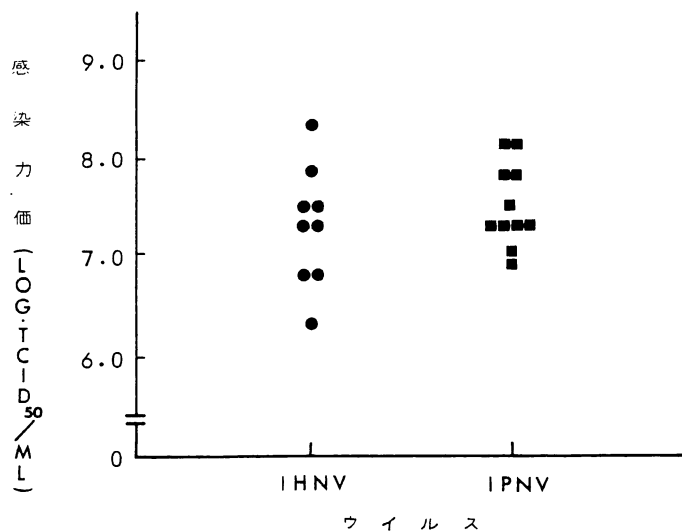


図4 凍結融解法によって得られるCAVの感染力価

では開始時に  $10^{7.6}$  TCID<sub>50</sub>/mlであった感染力価は1週目に  $10^{5.1}$  TCID<sub>50</sub>/mlに低下した。しかし、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $-80^{\circ}\text{C}$ とも1週目以降は感染力価の低下は認められなかった。

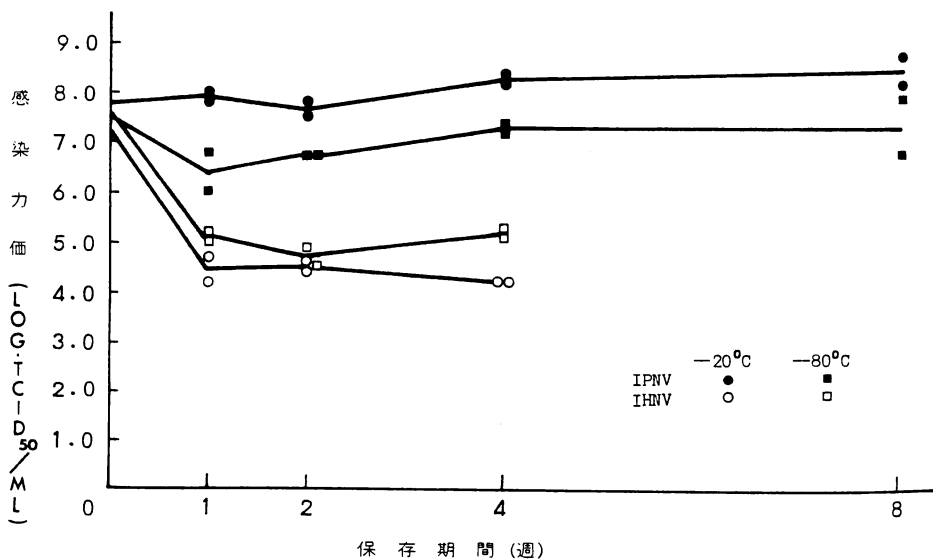


図5 IPNV・IHNの保存と感染力価の変化

## 考 察

### ① 凍結融解とCAVの感染力価

細胞破砕法には凍結融解法、ガラスホモジナイザー法、音波処理法がある。消毒剤実験における供試ウイルス液の調製ではCAVの活性を損なうことと回収効率を上げることはもとより、消毒剤、特にハロゲン系消毒剤では細胞破砕片は重要な活性阻害因子となることから、ウイルス液中の細胞破砕片を出来る限り少なくすることは重要である。凍結融解法はガラスホモジナイザー法や音波処理よりも破砕力が弱く、微小な細胞破砕片の生ずる可能性が低いと考えられ、目的に最も適する細胞破砕法であろう。このような理由から渡辺ら(1978)も凍結融解法によっている。一方、凍結融解法は破砕力が弱いために、株化細胞によっては100%の細胞をこわすことが出来ず、CAVの回収効率が低下することも考えられる。しかし今回の実験ではIPNV、IHNVともに回収液の感染力価はほぼ $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/mlを示し(図4)、消毒剤実験用のウイルス液として十分な力価であることから凍結融解法が導入出来る。さらに凍結融解の回数について渡辺ら(1978)は細胞破砕片を少なくする目的で回数を1回に限定している。しかし供試株化細胞間で破砕性に差のあることも懸念されたため、回数によるCAVの力価の違いを調べた。その結果IHNVについては1回では2~4回に比べ感染力価はやや低くなった。しかしその差は小さく、またIPNVについては回数による差が認められないことから、IPNV、IHNVとも凍結融解の回数は1回で十分と考えられる。

### ② CAVの保存

IPNVとIHNVの保存についてはWolfら(1968)、Wolf & Quimby(1971)、Mc Michelら(1975)、Pietchら(1977)の報告があり、IPNVはスキムミルクや乳糖などの添加物とともに-20℃以下で保存すれば長時間安定であること、また低温での安定性はウイルス株によって異なることが知られている。IHNVについてはMEM<sub>10</sub>中で-20℃で保存した場合52週間安定であったことが報告されている。このように血清や添加物等のウイルス保護剤の存在下での保存性については知られているが保護剤を何ら含まない条件下での保存性についての資料は無い。消毒剤の実験においては、調製したCAV液の凍結保存が可能であれば実験の能率あるいは再現性の面で好都合である。実験の結果IPNVについては-20℃での凍結保存が可能と考えられ

たが、IHN Vについては凍結開始後1週目の定量において明らかな感染力価の低下が認められた。これについては感染力価が1週目以降比較的安定していることから、凍結時にウイルスの不活化が起こった可能性が強く、Pietschら(1977)の言うように凍結速度の影響もしくはウイルス保護剤を含まないことの影響、両方の相乗的作用によるものと考えられ、IHNのCAVの保存に際してはさらに凍結条件等に検討を要することから、当面はIHN Vについては実験にCAVを調製することが望ましいと考えられる。

## 2) 調製法の異なるウイルス液に対するヨード剤の殺ウイルス効果の比較

### 材料および方法

- ①供試ウイルス IHN V (HV7601)である。
- ②供試株化細胞 FVの調製にはFHM、CAVの調製およびFVとCAVに対するヨード剤の効果判定にはEPCを使用した。
- ③FV液の調製 十分に繁茂したFHM細胞単層を2倍に分散させ、500mlのガラス製ルービンに培養液40mlとともに培養し、MOIを $10^{-3}$  TCID<sub>50</sub>/cellにしてウイルスを接種し15℃で培養した。8日後に、CPEが十分発現して細胞がガラス面よりほとんど完全に剝離したものを回収し、2,000g-20分の遠沈後上清をFV液とした。
- ④PEG6,000 吸着濃縮ウイルス液の調製 上記により調製したFV液を佐野・西村(1980)の方法により吸着濃縮し、供試ウイルス液(FV・PEG液と略記する。)とした。
- ⑤CAV液の調製 十分に繁茂したEPC細胞単層を2倍に分散させ、500mlのガラス製ルービンに培養液40mlとともに植え20℃で1日培養したものにウイルスをMOI10 TCID<sub>50</sub>/cellで接種した。接種後15℃で15時間培養し、CPE発現以前の細胞を回収、8mlのPBS(-)に再浮遊させ凍結融解を1回実施した。その後3,000rpm-15分遠沈し上清をCAV液とした。
- ⑥ヨード剤による殺ウイルス実験 前項1の供試株化細胞に関する検討の実験方法に準じ各ウイルス液に対するイソジンの殺ウイルス効果を検討した。実験に際しては各ウイルス液の感染力価を $10^{2.0}$  TCID<sub>50</sub>/mlに調整した。

⑦感染力価の測定 各ウイルス液とも調製直後にマイクロタイター法により感染力価を測定した。

### 結果と論議

各ウイルス液の調製時の感染力価はFV液が $10^{8.3}$ 、FV・PEG液が $10^{9.0}$ 、CAV液が $10^{7.4}$  TCID<sub>50</sub>/mlであった。イソジン液の各ウイルス液に対する殺ウイルス効果を表3に示した。イソジンの濃度が10 ppm(有効ヨウ素量)では各ウイルス液とも30秒で不活化された。しかし、1 ppmの場合には各ウイルス液間で不活化の程度に差が認められFV液では30分でも完全な不活化は行われず、FV・PEG液では5分、CAV液では15分で完全に不活化された。このようにヨード剤の活性阻害はFV液が最も大きくFV・PEG液が最も少なかった。ウイルス液の消毒剤活性阻害について渡辺ら(1978)はCAV液は極度阻害が小さいことを報告しており、今回のCAV液の結果とくいちがいを見せている。これは今回の実験で凍結融解後のCAV回収時に細胞破砕片が混入したことが考えられることから、CAV液を消毒剤実験の供試ウイルス液として使用する場合には細胞破砕片が混入しないよう十分な注意が必要であろう。

表3 調製法の異なるIHNVに対するヨード剤の殺ウイルス効果

ウイルス液	ヨード剤濃度	接 触 時 間 (分)				
	(ppm)	0.5	1	5	15	30
FV	1	4/4	3/4	3/4	2/4	2/4
	10	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
FV・PEG	1	4/4	2/4	0/4	0/4	0/4
	10	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
CAV	1	4/4	4/4	1/4	0/4	0/4
	10	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

### 3. 消毒剤の作用温度に関する検討

消毒剤の殺菌作用は一般化学反応と同じように作用時の温度の影響を受ける。一般にかなり広い範囲にわたって温度係数 ( $Q_{10}$ ) は 2~3 の範囲にあるが、20℃以下の低温では  $Q_{10}$  の値が著しく増大することがあり、逆に 2 以下のこともある (芝崎; 1977) とされる。したがって消毒剤の作用温度は消毒剤の活性からは 20℃以上であることが望ましい。一方、魚類ウイルス、特にサケ科魚類の病原ウイルスは至適温度が低温域にあるため作用温度はウイルス側からの制限を受ける。IPNV・IHNV に関しては IPNV は高温にも比較的耐性がある (江草; 1978) とされるが、IHNV は高温では不安定で McAllister ら (1974) は淡水中で 20.6℃ で 24 時間以内に 90% の活性が失われたと報告している。そこで、IPNV・IHNV に対する消毒剤の作用温度を決定するために、各種温度条件下における両ウイルスの蒸留水中の活性の変化を検討した。

#### 材料および方法

- ①供試ウイルス      IPNV (Buhl.) の CAV 液、IHNV (HV7601) の CAV 液および FV 液を供試した。それぞれの感染力価は IPNV  $10^{6.1}$  IHNV の CAV 液  $10^{6.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml である。
- ②供試温度          IPNV は 10、20、37℃、IHNV は 10、20、37℃ および 15℃ における活性の変化を調べた。
- ③観察時間          上記温度の水浴中に静置し 30 分、1、2、4、6 時間後の感染力価を測定した。なお IHNV・37℃ 区のみ 15 分後の測定を行った。
- ④操作手順          PBS (-) で調製した各ウイルス液を 5 ml のスクリーバイアルに 0.5 ml ずつ分注し、所定温度の恒温水槽中に静置し、所定時間毎にバイアル 2 本ずつを取り出し感染力価を測定した。
- ⑤感染力価の測定      常法によりマイクロタイター法によって測定した。

#### 結 果

IPNV および IHNV の 10、20、37℃ における感染力価の変化を図 6 に、IHNV の CAV 液および FV 液の 15℃ における変化を図 7 に示した。IPNV は 10~37℃ において感染力価の低下は認められず安定であった。IHNV は 10、15℃ においては感染力価は低下しなかった。しかし 37℃ では開始時に  $10^{6.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml であった感染力



価が15分後には $< 10^{1.8}$ となり、99.99%以上の低下を示した。また20℃においても2時間後には $10^{3.9}$ TCID<sub>50</sub>/mlとなり99%以上の感染力価の低下が認められた。

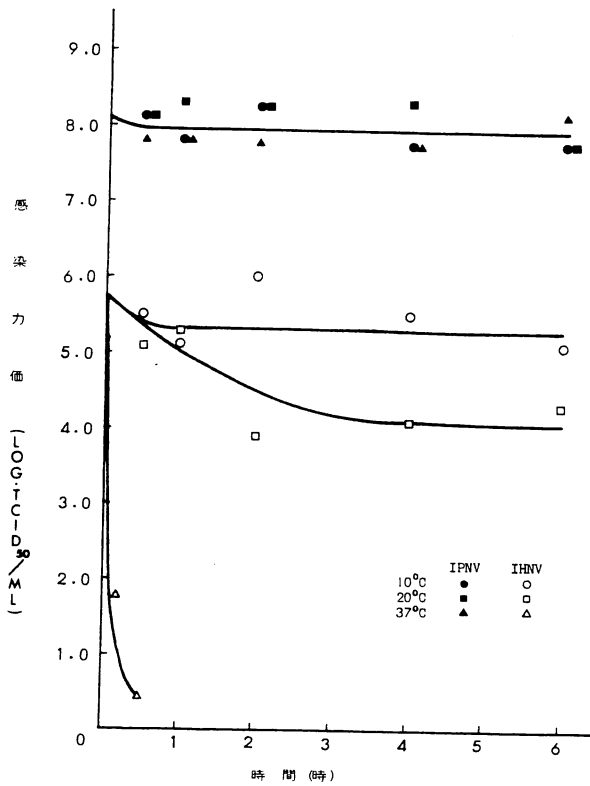


図6 各種温度でのIPNVおよびIHNVの感染力価の変化

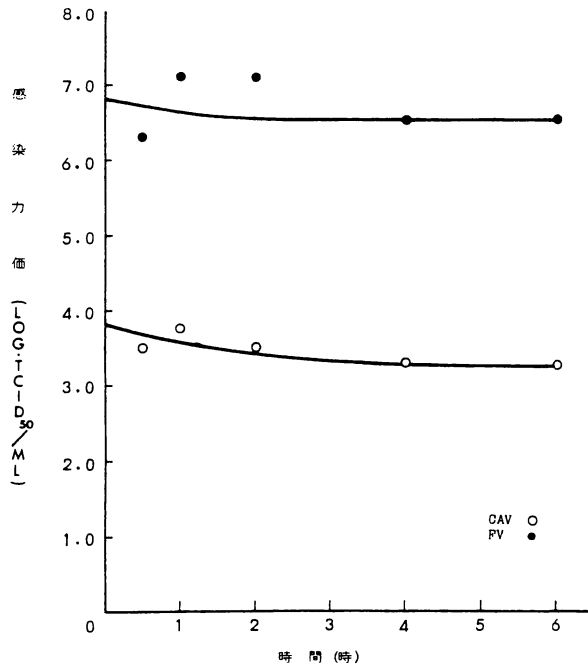


図7 15℃におけるIHNVの感染力価の変化

## 考 察

IPNVについては10～37℃の条件下で活性の低下は認められず20℃以下での殺ウイルス効果の評価が可能である。しかしIHNVについては20℃以上の温度条件下ではウイルスの不活化が起こる。したがって両ウイルスに対する消毒剤の殺ウイルス効果を評価する場合には①今後の実験において結果を比較検討する場合に両ウイルスに対する作用温度を統一することが望ましいこと、②両ウイルスはサケ科魚類の主として稚魚の病原体であり、冬から春の産卵期や稚魚育成期の低温条件下での殺ウイルス効果を確認する必要があること、③サケ科魚類は冷水性魚類であり養殖の現場は年間を通じて温度条件は低く、20℃を起す条件下での使用はむしろ少ないこと、などから作用温度は15℃とすべきであろう。また、IPNVについては20℃以上、さらに両ウイルスについて10℃以下の低温における殺ウイルス効果を確認しておくことが望ましいと考えられる。

## 4. 消毒剤の作用停止および細胞毒性除去法の検討

消毒剤の殺ウイルス効果を検討するには、消毒剤を作用させ所定時間経過後にウイルスの

活性を株化細胞のCPEによって確認しなければならない。その際には、接種に先立って消毒剤の作用停止および細胞毒性の除去を行なう必要があり、一般に中和法と希釈法が用いられる。本年度はアルコール系およびフェノール系、逆性石ケン製剤、ホルマリンに関する希釈法の導入に関し若干の検討を行った。

## 材料および方法

### ①供試薬剤

アルコール系消毒剤 エチルアルコール(試薬特級)、イソプロピルアルコール(試薬特級)、メチルアルコール(試薬特級)を使用した。

フェノール系消毒剤 石炭酸(試薬特級)および市販のクレゾール石ケン液を使用した。

逆性石ケン製剤 塩化ベンザルコニウム製剤(商品名;「北研」セット、本剤1,000 ml中に塩化ベンザルコニウム80gを含む。および商品名;オスバン液「ダイゴ」、塩化ベンザルコニウムの10<sup>w/v</sup>%水溶液)を使用した。

ホルマリン 試薬特級(ホルムアンデヒド35%含有)を使用した。

②供試株化細胞 CHSE-214およびEPCを使用した。

③薬剤の濃度および希釈液 アルコール系は試薬を原液とし、その他の薬剤はPBS(-)で5%になるように希釈し原液とした。実験に際しては原液を10<sup>0</sup>~10<sup>7</sup>までPBS(-)で10倍段階希釈し細胞接種液とした。

④消毒剤の細胞への接触方法 培養ビン中で十分に繁茂した細胞単層を分散後MEM<sub>2</sub>で2倍に希釈しマイクロプレートに植え20℃で24時間培養した後供試した。培養液量は1wellあたり0.1mlである。実験法として2つの方法を実施した。その一つは各消毒剤の所定濃度の希釈液を1wellあたり0.05ml加え、そのまま20℃で培養する方法。もう一つは消毒剤希釈液を1wellあたり0.05ml加え、15℃の室温下で1時間静置し細胞単層をPBS(-)で3回洗浄した後新しいMEM<sub>2</sub>を0.1ml加え20℃で培養する方法である。

⑤判定 20℃で培養し、CPEの発現の有無を光学顕微鏡下で1週間観察した。

## 結 果

各消毒剤のCHSE-214およびEPCに対する毒性を除去するために必要な最低希釈倍数を表4に示した。消毒剤希釈液を加え、細胞単層を洗浄せずに培養した場合にCTEが発現しなくなる最低希釈倍数はアルコール系消毒剤で $10^2$ 倍、逆性石ケンで $10^5$ 倍であった。また、細胞単層を洗浄したのち培養した場合にはアルコール系消毒剤で10倍、フェノール系消毒剤で $10 \sim 10^2$ 倍、ホルマリンで $10^4$ 倍、逆性石ケン製剤で $10^4$ 倍 $\sim 10^5$ 倍となり、逆性石ケン製剤のオスパンを除き細胞単層を洗浄することによって細胞毒性は $1/10 \sim 1/100$ と低くなった。

表4 消毒剤の細胞毒性除去に要する最低希釈倍数

	消毒剤	希釈倍数 (log10)	
		CHSE-214	EPC
洗 浄 せ ず	プロパノール	2.0	2.0
	エタノール	2.0	2.0
	メタノール	2.0	2.0
	クレゾール石ケン	3.0	3.0
	石炭酸	3.0	3.0
	ホルマリン	6.0	6.0
	北研ゼット	5.0	5.0
	オスパン	5.0	5.0
一 時 間 接 触 後 洗 浄	プロパノール	1.0	1.0
	エタノール	1.0	1.0
	メタノール	1.0	1.0
	石炭酸	1.0	2.0
	クレゾール石ケン	2.0	2.0
	ホルマリン	4.0	4.0
	北研ゼット	4.0	4.0
	オスパン	5.0	4.0

## 考 察

消毒剤の作用停止と細胞毒性除去法として中和法と希釈法が代表的であることはすでに述べた。このうち中和法に関して飯塚ら(1975)、北村(1976)、吐山(1976)は消毒剤の中和剤として表5に示す薬剤を挙げている。このうちハロゲン系消毒剤に対するチオ硫酸ナトリウムの中和効果は高く、渡辺ら(1978)は塩素剤、ヨード剤の殺ウイルス効果実験に際し $N_{10}$ チオ硫酸ナトリウムを使用した。著者ら(1981)も魚類ウイルスの実験において $N_{10}$ チオ硫酸ナトリウムの使用が可能であることを確認した。一方、ハロゲン系以外の消毒剤の中和剤については中和による消毒剤の作用停止後も細胞毒性が残るためさらに作用停止後の影響を除去するために、ウイルス粒子の分画遠心による洗浄や透析による毒性成分の除去等の操作が必要となり、その使用については今後の検討が必要である。

希釈法については、今回の結果からアルコール系、フェノール系消毒剤については細胞毒性除去に要する希釈倍数が低く、接種材料を希釈することによるウイルス力価の低下等の影響が少ないと考えられ、希釈法による実験が可能であろう。また、ホルマリンや逆性石ケン製剤については細胞毒性除去に要する希釈倍数が高く、これらの消毒剤に関する希釈法の導入と中和剤の使用は今後検討を要する重要な課題と考えられる。

表 5 消毒剤とその中和剤

消毒剤	飯塚ら(1975)	北村(1976)	吐山(1976)
次亜塩素ソーダ	チオ硫酸ナトリウム	チオ硫酸ナトリウム	チオ硫酸ナトリウム
ヨード剤	チオ硫酸ナトリウム	チオ硫酸ナトリウム	チオ硫酸ナトリウム
ホルマリン	ジメドン	重ソウ(3%)、 アンモニア	ジメドン
逆性石ケン	リュブロールw+ レンチン、牛乳	陰イオン界面活性剤 (3%)+レンチン(2%)	レンチン、牛乳
クロールヘキシンジ	リュブロールw+ レンチン	陰イオン界面活性剤 (1%)+レンチン(0.5%)	レンチン
グルタルアルデヒド	重炭酸ナトリウム	重ソウ(1%)、 二硫化水素	
水銀剤	チオグリコレート		シスチン
ヘキサクロロフェン	Tween 80、血清	Tween 80(0.5%)	Tween 80

### Ⅲ IPN、IHNウイルスに対する各種消毒剤の殺ウイルス効果

前項Ⅱの検討結果に基づいて本年度はアルコール系およびフェノール系、ハロゲン系消毒剤のIPN、IHNウイルスに対する殺ウイルス効果を検討した。

#### 材料および方法

- ①供試ウイルス IPNV (Buhl.) および IHN (HV7601) のCAV および FV (MEM<sub>10</sub>懸濁液) を使用した。
- ②供試消毒剤 アルコール系としてエタノールおよびメタノール、イソプロパノール (試薬特級)、フェノール系として石炭酸 (試薬特級) およびクレゾール石ケン液 (局方)、ハロゲン系として次亜塩素酸ナトリウム (鶴見曹達社、有効塩素濃度 120,000 ppm) および高度サラシ粉 (南海化学工業社、有効塩素濃度 600,000 ppm)、ヨード剤 (商品名; イソジンおよびダイザン) を使用した。これらの消毒剤の希釈は、ハロゲン系は PBS (pH 8.0) で行ない他は PBS (-) によった。
- ③ウイルス不活化実験 実験手順の模式図を図 8 に示した。IPN、IHN を PBS (-) (FV では MEM<sub>10</sub>) で  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml になるように希釈し、ハロゲン系消毒剤では消毒剤希釈液 0.5 ml にウイルス希釈液 0.5 ml を加え、アルコールおよびフェノール系消毒剤では消毒剤希釈液 0.9 ml にウイルス希釈液 0.1 ml を加えたのち、恒温水槽で 15℃ に所定時間放置した。
- 所定時間毎の消毒剤の反応停止はハロゲン系では  $N/10$  チオ硫酸ナトリウムを  $1/10$  容加え、その他の消毒剤は希釈によった。
- 不活化の判定は感作の終了したウイルスと消毒剤混合液 0.1 ml を IPNV では CHSE-214、IHN では EPC 細胞試験管 4 本およびマイクロプレート 4 穴に接種し、15℃ で 2 週間培養し CPE を観察し全ての試験管およびマイクロプレートの well で CPE の阻止が認められるものを +、一部に CPE の阻止が認められるものを ±、全ての試験管およびマイクロプレートの well で CPE の発現したものを - と判定した。

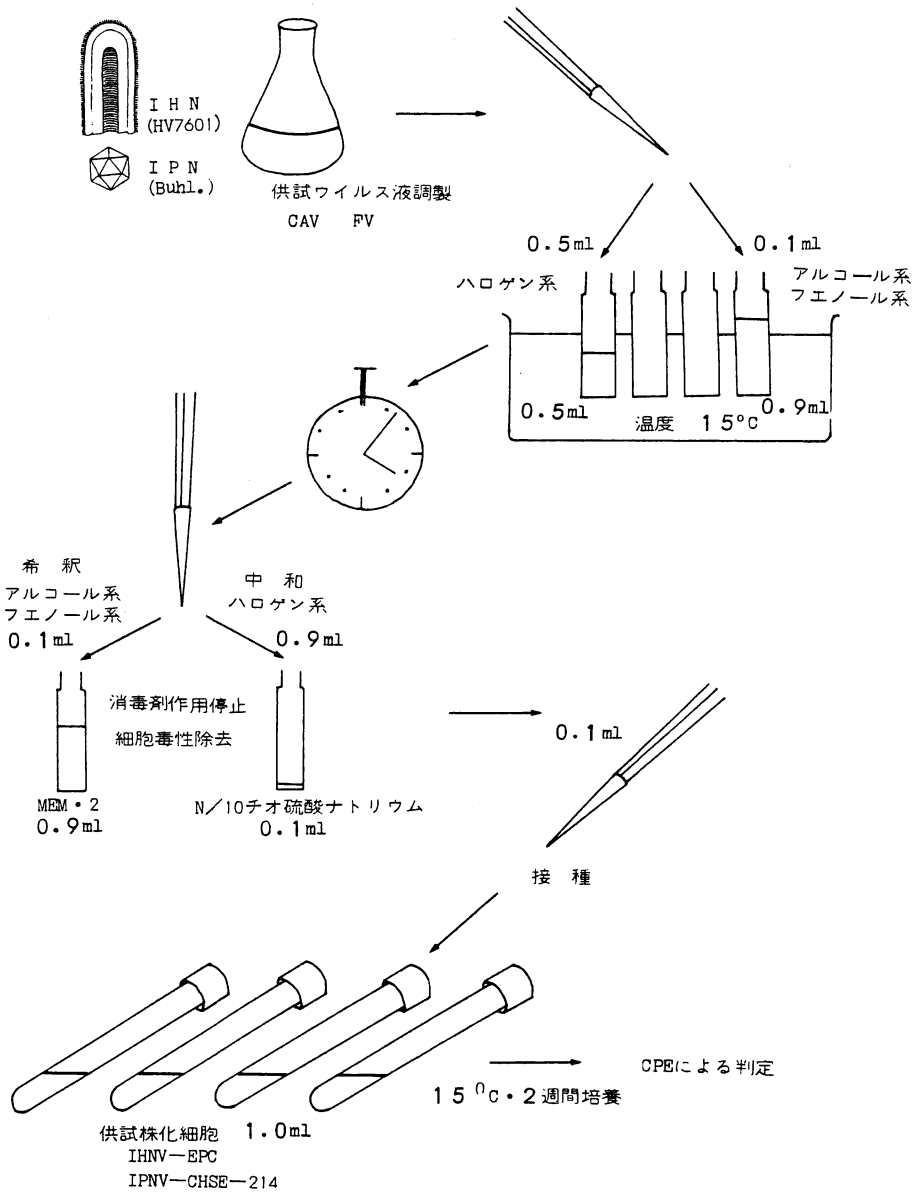


図 8 ウィルス不活化実験手順

## 結 果

### 1. IPNVウイルス (Buhl.) に対する消毒剤の殺ウイルス効果

#### 1) イソプロパノール

表6および表7に示すとおりIPNVに対してイソプロパノールは90%以下の濃度では効果は認められなかった。

表6 IPNV(CAV) に対するイソプロパノールの効果

時間 (分)	濃 度 (%)				
	50	60	70	80	90
5	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—
30	—	—	—	—	—
60	—	—	—	—	—

表7 IPNV(FV) に対するイソプロパノールの効果

時間 (分)	濃 度 (%)
	90
5	—
10	—
15	—
30	—
60	—

(マイクロプレート使用)

#### 2) エタノール

表8および表9に示すとおりIPNV(CAV)に対しては90%、60分のみ効果が認められ、血清を含む場合(FV)は90%、60分でも効果は認められなかった。



表8 IPNV(CAV)に対するエタノールの効果

時間 (分)	濃 度 (%)				
	50	60	70	80	90
5	—	—	—	—	±
10	—	—	—	—	±
15	—	—	—	—	±
30	—	—	—	—	±
60	—	—	—	—	±

表9 IPNV(FV)に対するエタノールの効果

時間 (分)	濃 度 (%)	
	80	90
5	—	—
10	—	—
15	—	—
30	—	—
60	—	—

(マイクロプレート使用)

### 3) メタノール

表10および表11に示すとおりIPNV(CAV)に対しては60%では60分、70%では10分以上、80、90%では2.5分でCPEは認められなかった。また血清を含むFVの場合でも80%以上で30分で効果が認められた。

表10 IPNV(CAV)に対するメタノールの効果

時間 (分)	濃 度 (%)				
	50	60	70	80	90
2.5	-	-	-	+	+
5	-	-	±	+	+
10	-	±	+	+	+
15	-	±	+	+	+
30	-	±	+	+	+
60	-	+	+	+	+

表11 IPNV(FV)に対するメタノールの効果

時間 (分)	濃 度 (%)				
	50	60	70	80	90
30	-	-	-	+	+
60	-	-	-	+	+

(マイクロプレート使用)

#### 4) 石炭酸

表12および表13に示すとおりIPNV(CAV)に対しては5%で5分以上で効果が認められたがFVの場合には5%、60分でも効果は認められなかった。

表12 IPNV(CAV)に対する石炭酸の効果

時間 (分)	濃 度 (%)			
	0.1	0.5	1.0	5.0
5	-	-	-	+
15	-	-	-	+
30	-	-	-	+
60	-	-	-	+

表 13 IPNV ( FV ) に対する石炭酸の効果

時間 (分)	濃 度 (%)			
	0.5	1.0	2.5	5.0
5	—	—	—	—
15	—	—	—	—
30	—	—	—	—
60	—	—	—	—

5) クレゾール石ケン

表 14 および表 15 に示すとおり CAV に対しては 5 % で 5 分以上で効果が認められたが FV の場合には 5 %、60 分でも効果は認められなかった。

表 14 IPNV ( CAV ) に対するクレゾール石ケンの効果

時間 (分)	濃 度 (%)			
	0.1	0.5	1.0	5.0
5	—	—	—	+
15	—	—	—	+
30	—	—	—	+
60	—	—	—	+

表 15 IPNV ( FV ) に対するクレゾール石ケンの効果

時間 (分)	濃 度 (%)			
	0.5	1.0	2.5	5.0
5	—	—	—	—
15	—	—	—	—
30	—	—	—	—
60	—	—	—	—

( マイクロプレート使用 )

6) 次亜塩素酸ナトリウム

表 16 および表 17 に示すとおり CAV に対しては有効塩素濃度 4 ppm で 2.5 分で効果が認められたが FV では 800 ppm、60 も効果は認められなかった。

表 16 IPNV (CAV) に対する次亜塩素酸ナトリウムの効果

時間 (分)	濃度 (有効塩素量 ppm)			
	2	4	8	16
2.5	—	+	+	+
5	—	+	+	+
15	—	+	+	+
30	—	+	+	+
60	—	+	+	+

表 17 IPNV (FV) に対する次亜塩素酸ナトリウムの効果

時間 (分)	濃度 (有効塩素量 ppm)				
	50	100	200	400	800
2.5	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—
30	—	—	—	—	—
60	—	—	—	—	—

(マイクロプレート使用)

#### 7) サラシ粉

表 18 および表 19 に示すとおり CAV に対しては有効塩素濃度 2 ppm、15分あるいは 4 ppm 以上、2.5 分で効果が認められた。FV に対しては 200 ppm、60 分でも効果が認められず、400、800 ppm では細胞毒性のために判定不能であった。

表 18 IPNV (CAV) に対するサラシ粉の効果

時間 (分)	濃度 (有効塩素量 ppm)			
	2	4	8	16
2.5	—	+	+	+
5	—	+	+	+
15	+	+	+	+
30	+	+	+	+
60	+	+	+	+

表19 IPNV(FV)に対するサラン粉の効果

時間 (分)	濃度 (有効塩素量 ppm)				
	50	100	200	400	800
2.5	—	—	—	CTE	CTE
5	—	—	—	CTE	CTE
15	—	—	—	CTE	CTE
30	—	—	—	CTE	CTE
60	—	—	—	CTE	CTE

CTE ; 細胞毒性発現 (マイクロプレート使用)

8) ヨード剤

表20および表21に示すとおりCAVに対してイソジンは有効ヨウ素量2.5 ppm、60分あるいは5 ppmで15分以上、10、20 ppmで2.5分以上で効果が認められ、ダイヤザンでは5 ppmで15分、10、20 ppmで2.5分以上で効果が認められた。FVに対してはイソジンの場合1,000 ppm、ダイヤザンの場合250 ppmで効果は認められなかった。なお、ダイヤザンについては500、1000 ppmでは細胞毒性のために判定不能であった。

表20 ヨード剤のIPNV(CAV)に対する効果

消毒剤 (商品名)	時間 (分)	濃度 (有効ヨウ素量 ppm)				
		1.25	2.5	5.0	10.0	20.0
イ ソ ジ ン	2.5	—	—	—	+	+
	5	—	—	±	+	+
	15	—	—	+	+	+
	30	—	±	+	+	+
	60	—	+	+	+	+
ダ イ ヤ ザ ン	2.5	—	—	—	+	+
	5	—	—	—	+	+
	15	—	—	+	+	+
	30	—	—	+	+	+
	60	—	—	+	+	+

表 21 ヨード剤の IHNV ( FV ) に対する効果

消毒剤 (商品名)	時間 (分)	濃度 (有効ヨウ素量 ppm)				
		62.5	125	250	500	1,000
イ ソ ジ ン	2.5	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—
	30	—	—	—	—	—
	60	—	—	—	—	—
ダ イ ヤ ザ ン	2.5	—	—	—	CTE	CTE
	5	—	—	—	CTE	CTE
	15	—	—	—	CTE	CTE
	30	—	—	—	CTE	CTE
	60	—	—	—	CTE	CTE

CTE ; 細胞毒性の発現 ( マイクロプレート使用 )

2. IHNV ウイルス ( HV 7 6 0 1 ) に対する消毒剤の殺ウイルス効果

1) イソプロパノール

表 2 2 および表 2 3、2 4 に示すとおり CAV に対しては 30 %、15 秒で効果が認められ、FV に対しても同様の効果が認められた。

表 2 2 IHNV (CAV) に対するイソプロパノールの効果 (1)

時間 (秒)	濃度 (%)					
	40	50	60	70	80	90
10	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+
120	+	+	+	+	+	+
240	+	+	+	+	+	+

( マイクロプレート使用 )

表 2 3 I H N V ( C A V ) に対する  
イソプロパノールの効果 ( 2 )

時間 (秒)	濃 度 (%)		
	2 0	3 0	4 0
1 5	—	+	+
3 0	—	+	+
1 2 0	—	+	+
3 0 0	±	+	+

表 2 4 I H N V ( F V ) に対する  
イソプロパノールの効果

時間 (秒)	濃 度 (%)		
	2 0	3 0	4 0
1 5	—	+	+
3 0	—	+	+
1 2 0	—	+	+
3 0 0	—	+	+

2) エタノール

表 2 5 および表 2 6、2 7 に示すとおり C A V に対しては 4 0 %、1 0 秒で効果が認められ、F V に対しても同様の効果が認められた。

表 2 5 I H N V ( C A V ) に対するエタノールの効果 ( 1 )

時間 (秒)	濃 度 (%)					
	4 0	5 0	6 0	7 0	8 0	9 0
1 0	+	+	+	+	+	+
3 0	+	+	+	+	+	+
6 0	+	+	+	+	+	+
1 2 0	+	+	+	+	+	+
2 4 0	+	+	+	+	+	+

( マイクロプレート使用 )

表 2 6 I H N V ( C A V ) に対する  
エタノールの効果 ( 2 )

時間 (秒)	濃 度 (%)		
	2 0	3 0	4 0
1 5	—	—	+
3 0	—	—	+
1 2 0	±	±	+
3 0 0	—	±	+

表 2 7 I H N V ( F V ) に対する  
エタノールの効果

時間 (秒)	濃 度 (%)		
	2 0	3 0	4 0
1 5	—	±	+
3 0	—	—	+
1 2 0	—	—	+
3 0 0	—	—	+

### 3) メタノール

表28および表29に示すとおりCAVに対しては40%、15秒で効果が認められた。なお、FVに対する実験は行わなかった。

表28 IHNV(CAV)に対するメタノールの効果 (1)

時間 (秒)	濃 度 (%)					
	40	50	60	70	80	90
10	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+
120	+	+	+	+	+	+
240	+	+	+	+	+	+

(マイクロプレート使用)

表29 IHNV(CAV)に対するメタノールの効果 (2)

時間 (秒)	濃 度 (%)		
	20	30	40
15	-	-	+
30	-	±	+
120	-	-	+
300	-	±	+

### 4) 石炭酸

表30および表31に示すとおりCAVに対しては1%、15分以上で効果が認められた。FVに対しては2.5%、15分でも効果は認められなかった。

表30 IHNV(CAV)に対する石炭酸の効果

時間 (分)	濃 度 (%)				
	0.25	0.5	1.0	2.5	5.0
5	-	-	-	CTE	CTE
15	±	-	+	CTE	CTE
30	-	±	+	CTE	CTE
60	±	±	+	CTE	CTE

CTE ; 細胞毒性の発現



表 3 1 I H N V ( F V ) に対する石炭酸の効果

時間 (分)	濃 度 (%)				
	0.25	0.5	1.0	2.5	5.0
5	—	—	—	—	CTE
15	—	—	—	—	CTE
30	—	—	—	CTE	CTE
60	—	—	—	CTE	CTE

CTE ; 細胞毒性の発現

5) クレゾール石ケン

表 3 2 および表 3 3 に示すとおり C A V に対しては 0.1 %、5 分で効果が認められ、F V に対しては 0.5 %、5 分以上で効果が認められた。

表 3 2 I H N V ( C A V ) に対するクレゾール石ケンの効果

時間 (分)	濃 度 (%)			
	0.1	0.3	1.0	3.0
5	+	+	+	+
15	+	+	+	+
30	+	+	+	+
60	+	+	+	+

表 3 3 I H N V ( F V ) に対するクレゾール石ケンの効果

時間 (分)	濃 度 (%)			
	0.125	0.25	0.5	1.0
5	—	±	+	+
15	—	±	+	+
30	—	±	+	CTE
60	—	±	+	CTE

CTE ; 細胞毒性の発現

6) 塩素剤

表34および表35に示すとおりCAVに対しては次亜塩素酸ナトリウムでは有効塩素量8ppm30秒、サラン粉では4ppm30秒で効果が認められた。FVに対しては次亜塩素酸ナトリウム200ppm、30秒で効果が認められた。なお、FVに対するサラン粉の実験は行わなかった。

表34 IHNV(CAV)に対する塩素剤の効果

消毒剤	時間 (分)	濃度(有効塩素量 ppm)				
		0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
次亜 塩素 酸 ナ トリ ウ ム	0.5	-	-	-	±	+
	1	-	-	-	±	+
	2.5	-	-	-	+	+
	5	-	-	-	±	+
	15	-	-	-	±	+
サ ラ ン 粉	0.5	-	-	-	+	NT
	1	-	-	-	+	NT
	2.5	-	-	±	+	NT
	5	-	-	±	+	NT
	15	-	-	±	+	NT

NT 実験を行わず

表35 IHNV(FV)に対する次亜塩素酸ナトリウムの効果

時間 (分)	濃度(有効塩素量 ppm)		
	50	100	200
2.5	-	-	+
5	-	-	+
15	-	±	+
30	-	±	+
60	-	±	+

7) ヨード剤

表36に示すとおりCAVに対してインジンは有効ヨウ素量8ppmで30秒、ダイザンでは4ppmで5分あるいは8ppmで2.5分以上で効果が認められた。なお、FVに対するヨード剤の実験は行わなかった。

表36 IHNV(CAV)に対するヨード剤の効果

消毒剤 (商品名)	時間 (分)	濃度(有効ヨウ素量 ppm)				
		0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
インジン	0.5	-	-	-	-	+
	1	-	-	±	±	+
	2.5	-	-	-	±	+
	5	+	±	+	+	+
	15	±	+	+	±	+
ダイザン	0.5	-	-	-	-	±
	1	-	-	-	±	±
	2.5	-	-	-	-	+
	5	-	-	-	+	+
	15	-	+	±	+	+

考 察

以上の結果からIPN、IHNVに対するアルコール系、フェノール系、ハロゲン系消毒剤の殺ウイルス効果を整理すると表37のようになる。

アルコール系消毒剤のIPN、IHNVに対する効果についての報告は無い。今回の結果ではIPNVに対しイソプロパノールは効果が無く、エタノールの場合も90%-60分でかろうじて不活化されることから、その効果は低いと考えられる。一方、メタノールでは60%-60分、80%-2.5分で効果が認められ、血清を含むFVの場合でも効果は変わらなかった。しかし、一般にメタノールは微生物に対する作用力が弱く、消毒剤としては用いられてはおらず、Coxら(1947)やPollarら(1949)によればインフルエンザやポリオウイルス(MEF)などはメタノールにより沈澱を生ずるが感染能力は消失しないとしていることから、今回の結果についてはCPEが発現しないことと感染能力との関連についてさらに検討する必要がある。IHNVに対してはイソプロパノール、エタノール、メタノールともに30~40

%の低濃度で短時間に効果を示し、血清を含む場合にも効果は変わらないことから、手指等の消毒剤として現場においても使用出来ると考えられる。

表 37 各種消毒剤の殺ウイルス効果

Virus	C A V		F V (MEM <sub>10</sub> )	
	殺ウイルス効果(+)	殺ウイルス効果(-)	殺ウイルス効果(+)	殺ウイルス効果(-)
I PNV	エタノール (90%-60分) メタノール (60%-60分) メタノール (80%-2.5分) ヨード剤 (5ppm-15分) ヨード剤 (10ppm-2.5分) 次亜塩素酸ナトリウム (4ppm-2.5分) サラシ粉 (2ppm-15分) クレゾール石ケン (5%-5分) 石炭酸 (5%-5分)	イソプロパノール (90%-60分)	メタノール (80%-30分)	イソプロパノール (90%-60分) エタノール (90%-60分) ヨード剤 (1000ppm-60分) 次亜塩素酸ナトリウム (800ppm-60分) サラシ粉 (200ppm-60分) クレゾール石ケン (5%-60分) 石炭酸 (5%-60分)
I HNV	イソプロパノール (30%-15秒) エタノール (40%-15秒) メタノール (40%-15秒) ヨード剤 (8ppm-2.5分) 次亜塩素酸ナトリウム (8ppm-30秒) サラシ粉 (4ppm-30秒) クレゾール石ケン (0.1%-5分) 石炭酸 (1%-15分)		イソプロパノール (30%-15秒) エタノール (40%-15秒) 次亜塩素酸ナトリウム (200ppm-2.5分) クレゾール石ケン (0.5%-5分)	石炭酸 (2.5%-15分)

フェノール系消毒剤についてはクレゾール石ケンの効果についてIPNVでは山崎ら(1976)、IHNVでは佐々木ら(1976)の報告があり、山崎ら(1976)はIPNVに対して0.1%、30分で有効とし、佐々木ら(1976)はIHNVに対して0.4%、30分で有効とした。IPNVに対するクレゾール石ケンの効果については山崎ら(1976)と今回の結果とは明らかに異なることから、今後の検討が必要と考えられる。IHNVについては佐々木ら(1976)のウイルス液調製法では若干の消毒剤阻害因子の混入が推定されることから、著者らのFVの結果と比較するのが妥当と考えられ、今回の結果は佐々木ら(1976)と一致した。したがってIHNVに対しクレゾール石ケンは有効と考えられる。石炭酸は一般的にウイルスに対する作用は期待できない(高橋ら;1982)とされており、今回の結果でもIPN、IHNVに対する効果はほとんど認められなかった。

ハロゲン系消毒剤については、ヨードホルムや無機塩素化合物のIPN、IHNVに対する効果についてAmend & Pietsch(1972)、山崎ら(1976)、佐々木(1976)、Elliot(1978)の報告があり、これらの消毒剤が両ウイルスに有効であることが知られている。しかしこれらの報告の有効濃度や時間についてみると、研究者によってかなりの差が認められる。たとえばIPNVに対するヨードホルム(PVP-I)の有効濃度および時間はIPNVに対してAmend & Pietsch(1972)は32 ppm I<sub>2</sub>-5分、山崎ら(1976)は80 ppm I<sub>2</sub>-30分と報告し、IHNVに対してはAmend & Pietsch(1972)は25 ppm I<sub>2</sub>-15秒、佐々木ら(1976)は40 ppm I<sub>2</sub>-30分と報告した。このような研究者による有効濃度のちがいは各種の実験条件が異なることに起因することは無論のことであるが、その中で供試ウイルス液の調製法の違いが大きく影響していると考えられる。一般にハロゲン系消毒剤は有機物による活性阻害が大きいことが知られており、ヨード剤に関していえば、今回の結果において血清の存在下では、IPNVに対して1,000 ppm-60分で効果が認められなかったことから明らかである。つまり既報の実験においてウイルス液調製法の違いから、その中に含まれる有機物の量に差が生じ、実験データの差となって現われたものと考えられる。したがって今後、ハロゲン系消毒剤の効果を検討する場合にはウイルス液調製法に留意する必要がある。また、現場での使用に際してはハロゲン系消毒剤の特性を把握し、使用条件や方法に細かな配慮が必要であろう。

今回の結果をみると消毒剤の効果がIPNVとIHNVとで異なる傾向が認められ、IPNVはIHNVよりも消毒剤に対する抵抗性が高いと考えられる。このことはIPNVは化学的消毒による防疫策の困難性を示唆している。

## 参 考 文 献

( \* ……間接引用 )

- Ahne, W. ( 1987 ) : Isolation and characterization of infectious pancreatic necrosis virus from pike (Esox lucius). Arch. of Virology 58, 65-69.
- Amend, D.F., and J.P. Pietsch ( 1972 ) : Virucidal activity of two iodophors to salmonid viruses. J. Fish. Res. Bd. Canada 29, 61-65
- 荒井 真・田代文男・岡本信明・西村定一・佐野徳夫 ( 1982 ) : 各種魚類由来株化細胞のサケ科魚類ウイルスに対する感受性の違いについて、第一回魚病学会。口頭発表。
- \*<sup>1</sup> Cox, H. R., J. Van der Scheer, S. Aiston, and E. Bohnel ( 1947 ) : The purification and concentration of influenza virus by means of alcohol precipitation. J. Immunol. 56, 149-166
- 江草周三 ( 1978 ) : 魚の感染症。恒星社厚生閣，東京，554 pp.
- Elliot, D. G., and D. F. Amend ( 1978 ) : Efficacy of certain disinfectants against infectious pancreatic necrosis virus. J. Fish. Biol. 12, 277-286
- Fendrick, J. L. Groberg, Jr., and J. C. Leong ( 1982 ) : Comparative sensitivity of five fish cell lines to wild type infectious haematopoietic necrosis virus from two Oregon sources. J. Fish Diseases 5, 87-95.
- 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，東京，500 pp.
- \* Kelly, R. K., and P. C. Loh ( 1975 ) : Replication of IPN virus : a cytochemical and biochemical study in SWT cells ( 38611 ). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148, 688-693.
- Kelly, R. K., B. W. Souter, and H. R. Miller ( 1978 ) : Fish cell lines : comparisons of CHSE-214, FHM, and RTG-2 in

- assaying IHN and IPN viruses. J. Fish. Res. Bd. Canada  
35, 1009-1011.
- 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, 418 pp.
- Malsberger, R. G., and C. P. Cerini(1965): Multiplication of  
infectious pancreatic necrosis virus. Ann. N. Y. Acad. Sci.  
129(Art 1), 320-327
- McAllister, P. E., J. L. Fryer, and K. S. Pilcher(1974): Further  
characterization of infectious hematopoietic necrosis virus  
of salmonid fish (Oregon strain). Arch. ges. Virosoforsch.  
44, 270-279.
- McMichel, J. S., J. L. Fryer, and K. S. Pilcher(1975): An anti-  
genic comparison of three strains of infectious Pancreatic  
necrosis virus of salmonid fishes. Aquaculture 6, 203-210
- Moss, L. H., and M. Gravell(1969): Ultrastructure and sequential  
development of infectious pancreatic necrosis virus. Jour.  
Virol. 3, 52-58.
- Pietsch, J. P., D. F. Amend, and C. M. Miller(1977): Survival  
of infectious hematopoietic necrosis virus held under vari-  
ous environmental conditions. J. Fish. Res. Bd. Canada 34,  
1360-1364.
- \*<sup>2</sup> Pollard, M., J. Connolly, and S. Fromm(1949): The pre-  
cipitating effect of methanol on virus. Proc. Soc.  
Exptl. Med. 71, 290-293.
- 佐野徳夫・西村定一(1980): 魚類ウイルス病の迅速診断法の開発に関する研究. 魚病対策  
技術開発研究報告書, 18 pp.
- 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.
- Scherrer, R., F. Bic, and J. Cohen(1974): Infectious pancreatic  
necrosis virus: a study of the influence of temperature and  
host-cell on virus replication and virus included interferon  
synthesis. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur 125a, 455-467.

- 芝崎 勲(1977):薬剤による殺菌. P131~210, 綿貫 詰・實川佐太郎・榎原欣作  
編 滅菌法・消毒法第1集, 文光堂, 東京 238 pp.
- 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  
175 pp.
- 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・南部敏博・山田不二造・藤本 進(1978):ウイルスの塩素消毒に関  
する研究1. ウイルス液の組成による塩素消費および塩素消毒効果に対する影響, 岐  
衛研所報. 23, 6-11.
- \* Wingfield, W. H., J. L. Fryer, and K. S. Pilcher (1969): Proper-  
ties of the sockeye salmon virus (Oregon strain). Proc. Soc.  
Exp. Biol. Med. 130, 1055-1056
- Wolf, K., M. C. Quimby, C. P. Carlson, and G. L. Bullock (1968):  
Infectious pancreatic necrosis: selection of virus-free stock  
from a population of carrier trout. J. Fish. Res. Bd. Canada  
25, 383-391.
- \* Wolf, K., and M. C. Quimby (1971): Salmonid virus. Infectious  
pancreatic necrosis virus. Morphology, pathology, and serology  
of first European isolations. Arch. ges. Virustorsch.  
34, 144-156.
- 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.



Publication of The Tokyo Metropolitan

Fisheries Experiment Station №319

Memoir of Tokyo Metropolitan

Fisheries Experiment Station №166

昭和57年度

魚病対策技術開発研究報告書

印刷物規格表第2類

印刷番号(1)

マス類の伝染性病原体の消毒法に関する研究

昭和57年4月 発行

編集・発行 東京都水産試験所 技術管理部

〒125 東京都葛飾区水元公園1番1号

電話 03(600)2873

印刷所 株式会社 東 邦