

東水試出版物通刊 No. 308

調査研究要報 No. 156

昭和56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 57 年 3 月

東京都水産試験場

# 目 次

I はじめに .....	1
II 魚病細菌に対する消毒剤の効力評価試験 .....	1
1. ハロゲン系消毒剤の効力試験 .....	1
a. 材料および方法 .....	1
b. 結 果 .....	2
2. 消毒剤の効力に及ぼす化学的阻害要因の検討 .....	3
1) ニジマス糞便添加による殺菌力の変化 .....	4
a. 材料および方法 .....	4
b. 結 果 .....	4
2) 消毒剤の糞中細菌殺滅効果 .....	6
a. 材料および方法 .....	6
b. 結 果 .....	6
III 日光消毒に関する検討 .....	9
1. <i>A. salmonicida</i> に対する紫外線の殺菌効果 .....	9
a. 材料および方法 .....	9
b. 結 果 .....	9
IV 魚類ウイルスに対する消毒剤の効力評価試験（中間報告） .....	10
1. 魚類ウイルスに対する効力評価法の検討 .....	10
1) 供試ウイルス液の調製法に関する検討 .....	11
(1) 吸着法によって調製した IHN ウイルス液の検討 .....	11
a. 材料および方法 .....	11
b. 結果と考察 .....	12
(2) IHN・IPN ウイルスの増殖曲線と細胞内ウイルス回収に適する 培養時間の推定 .....	12
a. 材料および方法 .....	12
b. 結果と考察 .....	13

(3) IHNウイルスに対する消毒剤の効力評価に使用する細胞の選択 ..... 15  
a. 材料および方法 ..... 15  
b. 結 果 ..... 15

V 参 考 文 献 ..... 16



- 1) 実 施 機 関 東京都水産試験場 奥多摩分場
- 2) 指 導、助 言 者 水産庁養殖研究所病理部  
病原生物研究室長 原 武史
- 3) 研 究 担 当 者 主任研究員 田 中 米 満 ( 総 括 )  
主 事 井 上 潔 ( 試 験、研 究、取 り ま と め )  
主 事 池 谷 文 夫 ( 試 験 補 助 )

## I はじめに

本研究は本年度で三ケ年を経過した。昭和54・55年度は消毒薬効力の公的評価法である石炭酸係数測定法の魚病細菌への応用に関して検討し、サケ・マス類の代表的病原細菌である *A. salmonicida* を使用して、せつそう病菌石炭酸係数を求めた。

本年度は石炭酸係数法では効力試験成績が不安定で再現性が低いハロゲン系消毒剤について A O A C 法に基づく効力評価を実施するとともに、消毒剤の作用に対する阻害要因を明らかにするため、ニジマス糞便を使用し有機物添加による消毒剤の効力評価を行った。さらに、当初の目的である消毒剤の効力評価とはそれるが、池等の日光消毒の効果を明らかにする目的で日光消毒において重要な要素と考えられる紫外線・熱・の相乗作用効果の検討も試みた。

また、過去二ケ年間の研究内容を振り返り検討が不十分だったと考えられる点や、研究に着手できなかった問題点のなかから早急に検討を要する事項を整理した結果、第一点として養殖現場において消毒剤の作用を阻害する物理・化学的要因を明らかにすることであり、第二点として魚病ウイルスに対する消毒剤の効力評価法を確立し現在使用されている各種の消毒剤の殺ウイルス効果を明らかにすること等が必要であることが浮彫りされた。このような観点から本年度は魚病ウイルスに対する消毒剤の効力評価法についても基礎的な研究をあわせて実施した。

## II 魚病細菌に対する消毒剤の効力評価試験

### 1. ハロゲン系消毒剤の効力試験

塩素やヨード剤などのハロゲン系消毒剤は養殖場で広く利用され、特にポビドンヨード剤は水産用として販売される唯一の消毒剤でもある。したがって魚病病原体に対するこれら消毒剤の効果に関する文献は比較的多く、ハロゲン系消毒剤は低濃度・短時間で魚病病原体に対し有効であることが知られている。

ハロゲン系消毒剤は溶媒の pH によって効力や効力の持続性が異なり効力試験を行う場合、試験成績が不安定となり易く再現性が低くなる可能性がある。そこで、飯塚(1977)に基づいて溶媒の pH を調製するとともに効力の持続性を確認するための実験を行った。

#### a. 材料および方法

〔供試菌株〕 *Staph. aureus* ATCC 6538 p 株と *A. salmonicida* ATCC 14174 株の2種を供試した。

〔供試消毒剤〕 塩素系の消毒剤として次亜塩素酸ナトリウム、ヨウ素系の消毒剤として

イソジンとダイヤザンの合計3剤を供試した。

〔消毒剤の希釈〕 滅菌したリン酸緩衝液(pH 8.0)によって次亜塩素酸ナトリウムは50・100・200 ppm(有効塩素濃度)、イソジンとダイヤザンは12.5・25・50・100・200 ppm(有効ヨウ素濃度)になるように希釈した。

〔菌液の調整〕 ハートインフュージョン培地(ニッサン)で*A. salmonicida*は20℃・24時間、*Staph. aureus*は37℃・24時間培養し供試菌液とした。

〔操作手順〕 消毒剤の希釈液10 mlを作用試験管に分注し20℃の恒温水槽に設置後、供試菌液0.05 mlを作用試験管に加え攪拌し、1分後に白金耳で釣菌した後培養試験管に移植する。釣菌後30秒後にさらに同一作用試験管に供試菌液を0.05 mlに加え、その1分後に釣菌する。この釣菌と菌液の混和を10回繰り返えし、1作用試験管あたり10本の後培養試験管への移植を行い、*A. salmonicida*は20℃で培養し48・72時間後、*Staph. aureus*は37℃で培養し24・48時間後の菌の発育を観察した。

b. 結 果

*A. salmonicida*と*Staph. aureus*における試験結果をそれぞれ表1、2に示した。

表1 *A. salmonicida* (ATCC 14174株)に対するハロゲン系消毒剤の効果

薬 剤 名	有 効 濃 度 (ppm)	後 培 養 試 験 管									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
次亜塩素酸 ナトリウム	200	-*	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	100	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	50	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
イソジン	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	50	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	25	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	12.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ダイヤザン	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	50	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	25	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	12.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\* …… -発育せず、 +発育

表2 *Staph aureus* (ATCC 6538p株) に対するハロゲン系消毒剤の効果

薬剤名	有効濃度 (ppm)	後 培 養 試 験 管									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
次亜塩素酸 ナトリウム	200	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	50	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
イソジン	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	50	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ダイヤザン	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	50	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- 発育せず、 + 発育

*Staph.aureus* に比べ *A. salmonicida* の消毒剤に対する感受性が高いことについてはすでに報告 (昭和55年度) したが、本実験も同様の結果であった。供試した3剤は両細菌に対して次亜塩素酸ナトリウム100ppmとイソジン・ダイヤザンの50ppm液がほぼ同程度の効力を示した。また、*A. salmonicida* に対するイソジン・ダイヤザンの有効量は25ppm・1分で、これは原ら(1975)の報告したイソジンの8ppm・15秒、ダイヤザンの4ppm・15秒より効力が低いことを示している。この理由としては培地成分による効力の阻害およびpHの違いが考えられる。効力の持続についてはイソジン・ダイヤザンの25ppmは極めて短く、反覆使用の場合には少なくとも100ppm以上の濃度が必要であろう。

現在、養鱈場ではウイルス病の伝染を防ぐためイソジン液(有効ヨウ素量50ppm・15分浸せき)による消毒が行われ、消毒液の使用を1回に限っているが、今回の結果はその操作の妥当性を裏付けたものといえよう。

## 2. 消毒剤の効力に及ぼす化学的阻害要因の検討

養殖場で利用される機会の多い消毒剤の、せつそう病菌石炭酸係数についてはすでに報告したが、消毒剤の実際の使用にあたっては有機物などの環境中に存在する消毒剤の活性阻害

要因を考慮しなければならない。養殖場における活性阻害要因としては糞便、粘液、体腔液、血液、魚卵（死卵）などが考えられ、本年度はそのうちの糞便の影響についてニジマスの糞便の存在下で消毒剤の殺菌力を観察し、糞便中細菌殺滅効果を検討した。

#### 1) ニジマスの糞便添加による殺菌力の変化

##### a. 材料および方法

〔供試菌株〕 *A. salmonicida* ATCC 14174 株を供試した。

〔供試消毒剤〕 ヨード製剤としてダイヤザン、逆性石けん製剤の北研セット、両性石けん製剤のテレメスの3剤を使用した。

〔糞便原液の調製〕 ニジマス飼育水槽の排水口付近から新鮮な糞便を飼育水とともに採取し、20分間静置後沈殿した糞便を1,500rpm・10分速沈処理し、その沈渣をホモゲナイズした後蒸留水で10% (W/V) に希釈し高圧滅菌したものを糞便原液とした。

〔操作手順〕 ダイヤザン0.05%、北研セット0.02%、テレメス0.2%の希釈液に、糞便の濃度を0.1、1.0、2.5%になるように加え糞便と消毒剤の混合液10mlを調製し、20℃の恒温槽で*A. salmonicida*を加え生菌数の経時変化を観察した。生菌数の測定は普通寒天平板を使用し常法により実施した。

##### b. 結果

ダイヤザン0.05%液における糞便濃度と生菌数の関係を図1に示した。糞便の添加濃度の増加に伴い殺菌に要する時間は長くなり、菌が検出されなくなるのに要する時間は糞便濃度0.1%で2分、1.0%で3分を要し、2.5%では15分後においても1mlあたり $10^5$ 個の菌が検出された。

北研セット0.02%液の結果は図2に示した。

北研セットもダイヤザンと類似する結果となり、菌が検出されなくなるまでに糞便濃度0.1%で5分、1.0%で15分を要し、2.5%では15分後にも $10^5$ 個の菌が検出された。

テレメス0.2%液の結果は図3に示した。

テレメスでは糞便濃度1.0、2.5%で15分後にそれぞれ $10^4 \cdot 10^3$ 個の菌が検出され、0.1%では2分後に菌は検出されなくなった。糞便を加えない場合は3薬剤とも1分後には菌は検出されなかった。

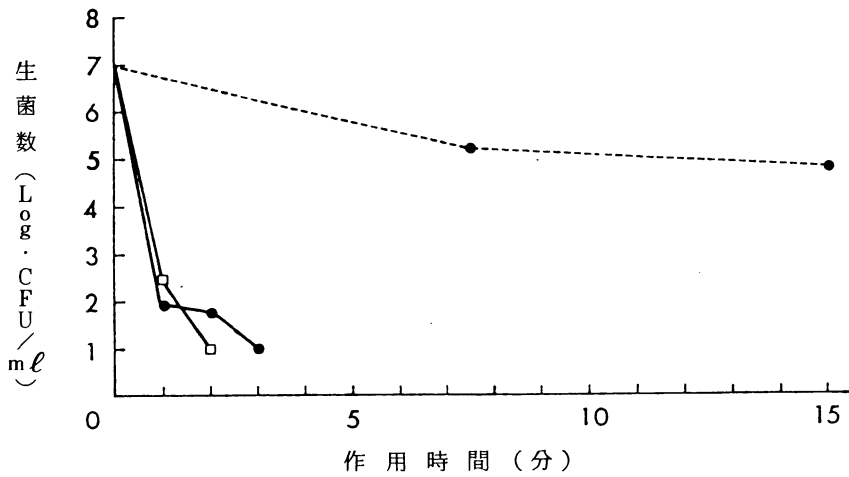


図1 ダイアザムの殺菌効果に対する糞便の影響

---●--- 糞便濃度 2.5 %、—●— 糞便濃度 1.0 %、  
—□— 糞便濃度 0.1 %、ダイアザムの濃度；0.05 %、

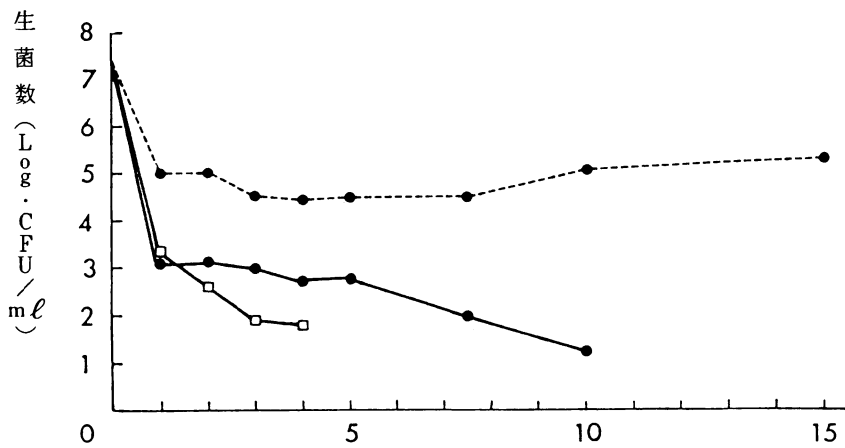


図2 北研ゼットの殺菌効果に対する糞便の影響

---●--- 糞便濃度 2.5 %、—●— 糞便濃度 1.0 %、  
—□— 糞便濃度 0.1 %、北研ゼットの濃度；0.02 %、



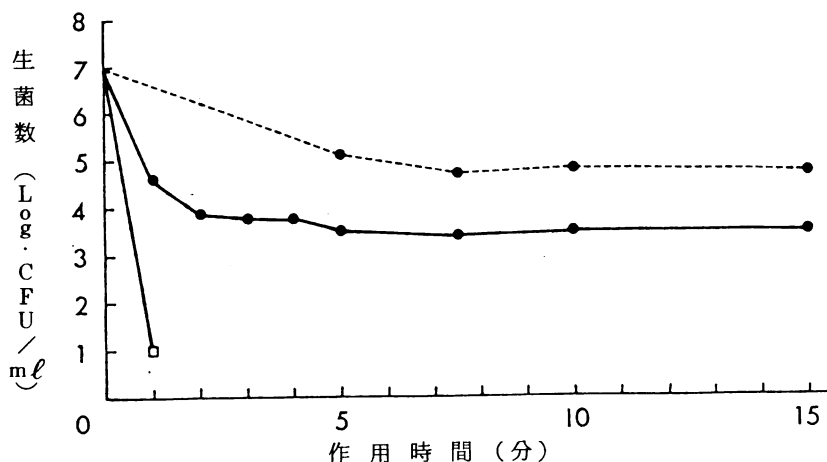


図3 テレメスの殺菌効果に対する糞便の影響

---●--- 糞便濃度 2.5 %、 —●— 糞便濃度 1.0 %、  
—□— 糞便濃度 0.1 %、テレメスの濃度 ; 0.2 %、

## 2) 消毒剤の糞中細菌殺滅効果

### a. 材料および方法

〔供試消毒剤〕 塩素系消毒剤：2 剤（高度サラシ粉、ツルクロン）、ヨード製剤：2 剤（イソジン・ダイヤザン）、逆性石けん製剤（オスパン）、両性石けん製剤（テレメス）、クレゾール石けんの合計 7 剤を供試した。

〔操作手順〕 ニジマス糞便 4 % 滅菌水希釈液 5.0 ml と各消毒剤（製剤濃度）の 0.02、0.04、0.1、0.4、1.0、2.0 % 液 5.0 ml を強振混合し、感作時間 1 分、60 分後に混合液 0.1 ml 中の総菌数を計測した。同時に *A. salmonicida* の懸濁液（ $3.7 \times 10^7$  CFU/ml）と滅菌した 4 % 糞便液を等量混合し、その 5.0 ml と各消毒剤の希釈液 5.0 ml を混合し、1 分・60 分後に生菌数を計測した。

### b. 結 果

4 % 糞便液中の総菌数は  $8.4 \times 10^8$  CFU/ml であった。試験結果は表 3 に示したとおりである。

鈴木（1977）は子豚糞便混入時の市販消毒剤の殺菌効果について報告し、大腸菌殺滅濃度と消毒剤の価格から大腸菌殺滅コストを求め殺菌力と経済性の面から比較を行った。鈴木の結果に準じせつそう病菌殺滅コストを算出し表 4 に示した。

表3 各種消毒剤のニジマス糞中殺滅効果

濃度 (%)	高度サラシ粉		ツルクロン				イソジン					
	1		60		1		60		1		60	
	せっそう菌	総菌	せっそう菌	総菌	せっそう菌	総菌	せっそう菌	総菌	せっそう菌	総菌	せっそう菌	総菌
0.01	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
0.02	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
0.05	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
0.10	+	-	+	±	-	-	+	+	-	-	-	-
0.20	+	-	+	±	+	-	+	+	-	-	-	-
0.50	+	-	+	+	+	-	+	+	±	-	+	-
1.00	+	-	+	+	+	-	+	+	±	-	+	-

濃度 (%)	ダイヤザン				オスバン				テレメス			
	せっそう菌	総菌	せっそう菌	総菌	せっそう菌	総菌	せっそう菌	総菌	せっそう菌	総菌	せっそう菌	総菌
0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.10	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
0.20	±	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
0.50	+	-	+	+	+	-	+	+	±	-	+	+
1.00	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+

濃度 (%)	クレゾール石ケン			
	せっそう菌	総菌	せっそう菌	総菌
0.01	-	-	-	-
0.02	-	-	-	-
0.05	-	-	-	-
0.10	-	-	-	-
0.20	-	-	+	-
0.50	-	-	+	-
1.00	+	+	+	+

注) + 有効      - 無効

± 2枚のシャーレのいずれか一方に菌の発育が認められたもの。

表4 市販消毒剤のせつそう病菌殺滅コスト

消毒剤名	菌種 作用時間(分)	最低殺滅濃度		殺滅コスト(円/100ℓ) <sup>2)</sup>	
		せつそう病菌	総菌	せつそう病菌	総菌
		%	%	円	円
高度サラン粉	1	< 0.01	> 1.00	< 7.0	> 700
	60	< 0.01	0.50	< 7.0	350
ツルクロン	1	0.20	> 1.00	22	> 110
	60	< 0.01	0.10	< 1.1	11
イソジン	1	> 1.00	> 1.00	> 4,400	> 4,400
	60	0.50	> 1.00	2,200	> 4,400
ダイヤザン	1	0.50	> 1.00	1,000	> 2,000
	60	0.10	0.50	200	1,000
オスバン	1	0.50	> 1.00	380	> 760
	60	0.10	0.10	76	76
テレメス	1	1.00	> 1.00	770	> 770
	60	0.50	0.50	385	385
クレゾール石けん	1	1.00	1.00	330	330
	60	0.20	1.00	66	330

注) 1) 消毒剤の単価は1982年2月に調べた。

2) 消毒剤の最低殺滅濃度溶液100ℓを調製するのに要する費用

その結果、高度サラン粉、ツルクロン、オスバン、クレゾール石けんが、作用時間の違いにかかわらず経済性に優れていた。そこで、作用時間1分の場合は手指や靴等の消毒、60分は池や養殖器材を消毒対象と仮定すると、手指や靴の消毒液は繰返しの使用にも効力を失わないこと、刺激性や腐食性が低いという条件が要求されるため高度サラン粉やツルクロンの塩素系消毒剤は不適である。

クレゾール石けんはせつそう病菌にも一般細菌にも同程度の効力を有するが臭気があり、オスバンは一般細菌に対して効力がおとる点を考慮すると手指の消毒にはオスバンをはじめとする逆性石けん製剤、靴等の消毒を目的とした踏込消毒槽にはクレゾール石けんが適すると考えられる。

池の消毒に関しては高度サラン粉、ツルクロンなどの塩素系消毒剤が優れており、とくに次亜塩素酸ナトリウム製剤であるツルクロンは高度サラン粉より7~30倍も経済

性に優れ、液状であるため取扱いに便利で人体への吸入などの問題もなく養殖池の消毒剤として推薦出来る消毒剤である。

しかし、養殖器材の消毒の場合は塩素系消毒剤は腐食性、効力の持続性の点で適さず、ダイアザン、クレゾール石ケン、オスパンが有効と考えられるが、ダイアザンは効力の持続性、クレゾール石けんは臭気に問題があり、オスパンの場合、逆性石けん製剤は金属腐食性（古橋・宮前；1976）、セルローズ製品への吸着による薬液濃度の低下が起こる（細淵・佐藤；1978）などの点を考慮する必要がある。

本実験において評価した経済性については消毒対象を細菌に限定したものであり、消毒対象に寄生虫・真菌・ウイルスを加えた場合には当然各消毒剤の経済的評価は変わることが予想され、今後は特にウイルスに対する効力の評価が急がれる。

### III 日光消毒に関する検討

#### 1. *A. salmonicida* に対する紫外線の殺菌効果

*A. salmonicida* を含め魚病病原体に対する紫外線の効果については、木村ら（1976）をはじめ比較的多くの報告がある。そこで本実験では紫外線を照射する際の温度条件を変えたときの *A. salmonicida* に対する殺菌効果を検討した。

##### a. 材料および方法

普通寒天平板で培養した *A. salmonicida* ATCC 14174 株を  $10^8$  CFU/ml になるよう蒸留水に懸濁し直径 60 mm のシャーレに 1 ml 分注後、液面より 10 cm の高さから紫外線を照射した。照射は恒温器内で行い、照射時間 5、10、20、30、45、60、90、120 秒における生残菌数を計測した。実験は 10、20、30℃ の温度条件下で行った。

##### b. 結果

菌懸濁液の液面における紫外線照射量は  $320 \mu\text{W} \cdot \text{sec} / \text{cm}^2$  であった。各温度における *A. salmonicida* の生菌数の変化は図 4 に示した。

この結果から *A. salmonicida* を 99.9% 殺菌するのに要する温度別の殺菌線量は  $10^\circ\text{C} \cdot 2340$ 、 $20^\circ\text{C} \cdot 2240$ 、 $30^\circ\text{C} \cdot 1920 \mu\text{W} \cdot \text{sec} / \text{cm}^2$  となり、温度が高くなるとわずかに殺菌効果が高くなる傾向が認められた。

木村らは ATCC 14174 株に対する殺菌線量を  $4.0 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{sec} / \text{ml}$  と報告している。今回はこの値より低い結果となったが、これは紫外線照射の際の供試菌の

条件が異なることによると考えられる。

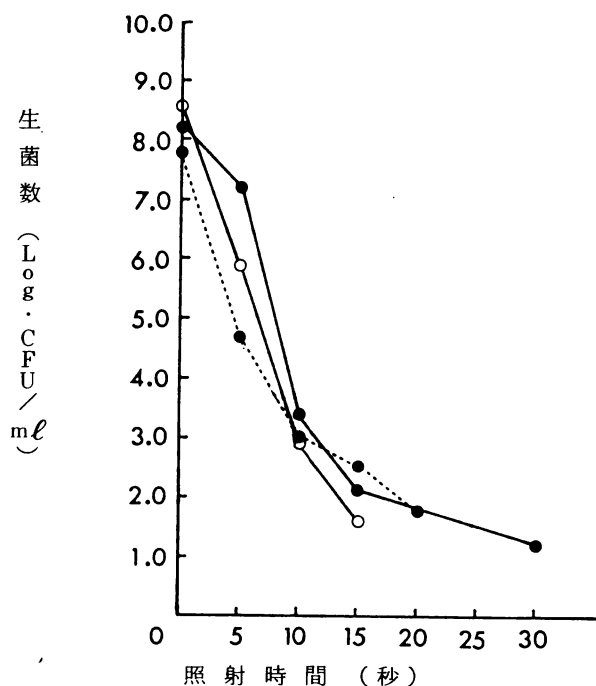


図4 紫外線照射による *A. salmonicida* 生菌数の変化  
照射時の温度は (●—) 10°C、(-●-) 20°C、(○—) 30°C  
である。

#### IV 魚類ウイルスに対する消毒剤の効力評価試験 (中間報告)

##### 1. 魚類ウイルスに対する効力評価法の検討

サケ・マス類の代表的病原ウイルスである IHN・IPNウイルスに対する消毒剤の効果については Amendら(1972)、山崎ら(1976)、佐々木(1976)、Elliottら(1978)の報告がある。しかし、これらの報告も魚病ウイルスに対する消毒剤の有効性を評価・決定するには十分とは言えず、また、効力評価手法が統一されていないためそれぞれの結果の比較検討が困難な面があるため、今後は魚類ウイルスに対する消毒剤の効力評価手法を統一する努力が必要であろう。

飯塚(1977)によれば人畜等のウイルスに関しても消毒剤効力評価のための安定した方法は少なく、今後推薦できると考えられる代表的手法として液相法 (Suspension test)

と固相法 (Carrier test) の二つをあげている。これらの効力評価法においても試験成績の再現性を左右する大きな要因の一つとして供試ウイルス液の調製法が考えられる。

一般に細菌の試験に比較すればウイルスでは消毒剤へ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作用を阻害するばかりでなくウイルスの保護作用も有すると言われている (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および細胞成分を出来るだけ含まないウイルス液の使用が要求され、従来は主として高速遠心法や吸着法によってウイルス液の調製が行われている。渡辺ら (1978) はポリオウイルスを使用し、細胞内ウイルスを効率的に回収することによって消毒剤の作用阻害の少ないウイルス液を得ることができ、その操作も比較的簡単であると報告している。

そこで、魚類ウイルスに対する消毒剤効力評価のためのウイルス液調製法を決定する目的で、まず、IHNウイルスを使用して佐野・西村 (1980) の報告した吸着法によって調製したウイルス液と、血清成分を含んだウイルス液の比較を行い、さらに渡辺らの方法を応用するためにIHN・IPNウイルスの増殖曲線を作成した。

また、培養細胞はその種類によってウイルスに対する感受性が異なり、魚病ウイルスについても細胞によってIHN・IPNウイルスに対する感受性が異なることが知られており (荒井ら; 1982)、IHNウイルスの不活化判定に適した細胞を選択するための予備試験を行った。

## 1) 供試ウイルス液の調製法に関する検討

### (1) 吸着法によって調製したIHNウイルス液の検討

#### a. 材料および方法

1 ℓのガラス製ルービンにMEM<sub>10</sub> (日水) で培養したEPC細胞にIHNウイルス (HV7601) をM.O.I. を $10^{-3}$ にして接種し、15℃で7日間培養を行いCPEが十分に発現した後ウイルスを培養液ごと回収、2,000g・20分・4℃の遠沈処理の後その上清をウイルス原液 (ウイルスI液) とした。

ウイルス原液にポリエチレングリコール (PEG) 6,000を6% (W/V) とNaClを0.5Mになるように加え溶解した後4℃で2時間攪拌、さらに2,000g・20分・4℃の遠沈処理を行い、生じた沈渣をPBS(-)に再浮遊させ供試ウイルス液 (ウイルスII液) とした。

上記ウイルスI・II液の力価が等しくなるようにII液をPBS(-)で希釈した後その0.5mlを有効ヨウ素濃度1・10ppmのポビドンヨード液 (商品名: 水産用イソジン液) 50mlに混和し、30秒、1、5、15、30、60分後に混和液1ml

をN/10 チオ硫酸ナトリウム溶液 0.1 ml で中和してマイクロプレートで培養した EPC細胞に接種した。接種量は 1 well あたり 0.1 ml とし同一試料を 4 well に接種した。実験中インジン液の液温を 20℃ に保った。

b. 結果と考察

調製したウイルス I・II 液の力価は  $10^{8.4} \cdot 10^{9.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml であった。両ウイルス液を使用した、インジン液による IHNウイルス不活化実験では両液の力価を  $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml に統一した。結果は表 5 に示したとおりである。

表 5 ウイルス液調製法の異なる IHNウイルスに対するヨード剤の効果

ウイルス液		ヨード剤濃度*	時間(分)*	0.5	1	5	15	30	60
				4/4**	3/4	3/4	2/4	2/4	3/4
ウイルス液 A	1 ppm			4/4**	3/4	3/4	2/4	2/4	3/4
	10			0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
ウイルス液 B	1			4/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	10			0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

\* ヨード剤濃度は有効ヨウ素濃度 (ppm) で示す。

\*\* 分母は Well の数、分子は CPE(+)を示した Well 数

インジン液の IHNウイルスに対する効果はウイルス I 液の場合、1 ppm・60 分でも不活化はされないが、ウイルス II 液では 1 ppm・5 分で不活化されウイルス I 液におけるインジン液の効力阻害が認められた。また、ウイルス II 液については完全に血清や培地成分等を除去することは出来ないと考えられ、渡辺ら(1978)も高速遠心法や吸着法によって精製されたウイルス液でもある程度の効力阻害作用が残っているとしている。さらに、ウイルスの精製に要する操作の煩雑さも無視出来ない問題である。したがって魚類ウイルスについても渡辺らの方法が応用出来ればこれらの問題は解決されると考えられ、今後魚類ウイルスへの応用に関する種々の検討を行う必要がある。

(2) IHN・IPNウイルスの増殖曲線と細胞内ウイルス回収に適する培養時間の推定

a. 材料および方法

IHNウイルスの増殖曲線作成には EPC細胞を使用した。十分に繁茂した EPC

細胞単層を細胞分散剤で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20℃で24時間培養し、IHNウイルス(HV7601)をMOIを10にして接種した。

ウイルスを接種後15℃で培養し2、7、10、12、15、20、25、30時間後に常法(北村;1976)により細胞内ウイルスと培養液中の遊離ウイルスを回収しそれぞれの感染力価を測定した。

IPNウイルスについてはCHSE細胞を使用し、ウイルスはBuhl株を用いた。実験手技はほぼIHNウイルスの場合に準じ、ウイルス接種後15℃で培養し、2、4、6、8、10、12、15、20、25、30、48時間後の試料について感染力価を測定した。

#### b. 結果と考察

IHN・IPNウイルスの一段増殖曲線をそれぞれ図5、6に示した。

IHNウイルスでは、細胞内ウイルスの増加は接種後7時間で認められ、10時間から20時間にかけて急激に増加し、その後30時間目までゆるやかな増加のカーブを示した。時間の経過に伴うCPEの観察では12時間までCPEはまったく発現せず、明らかなCPEの発現が認められたのは接種後20時間であった。一方、遊離ウイルスの増加は10時間で認められず、12時間以降顕著であった。30時間後の細胞内ウイルスと遊離ウイルス

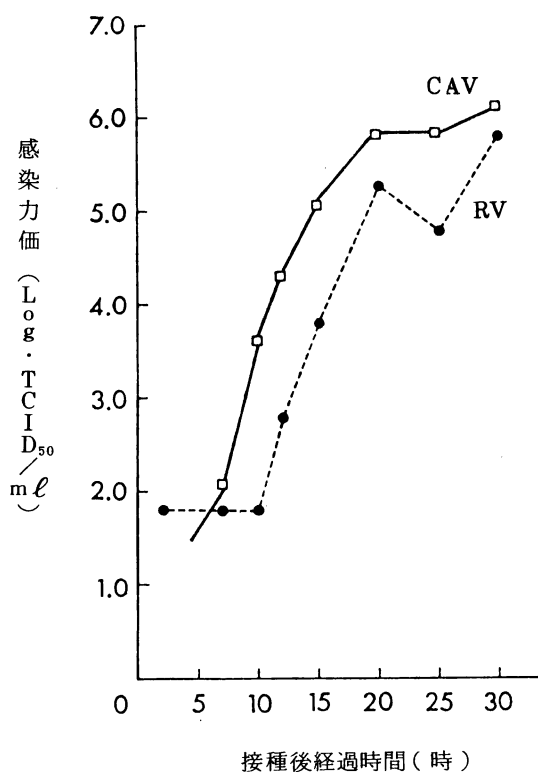


図5 IHN V (HV 7601) のEPC細胞における一段増殖曲線  
培養温度15℃、(RV)は遊離ウイルス、CAVは細胞内ウイルスを示す。



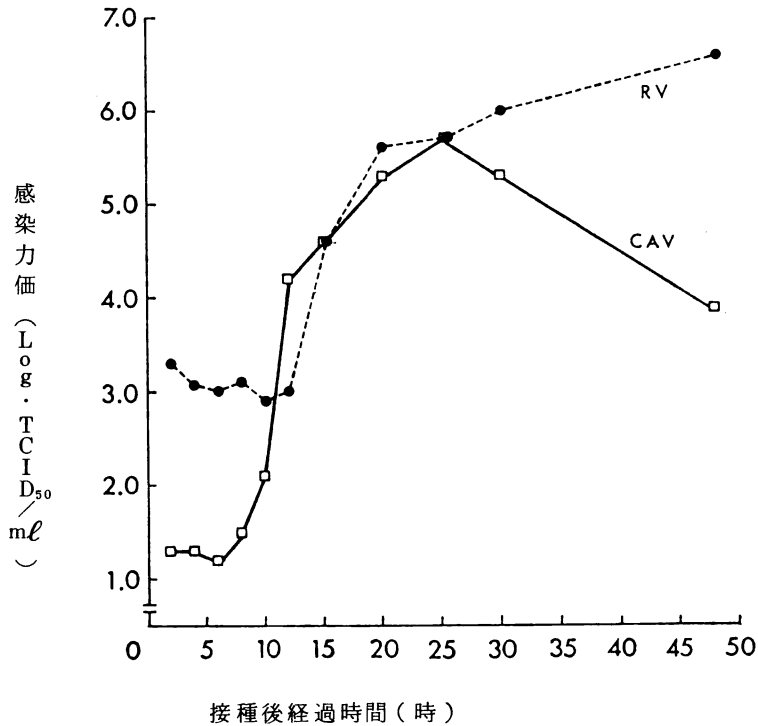


図6 IPNV (Buhl) のCHSE細胞における一段増殖曲線  
 培養温度は15℃、(RV)は遊離ウイルス、(CAV)  
 は細胞内ウイルスを示す。

の感染力価はそれぞれ  $10^{5.8} \cdot 10^{6.1}$  TCID<sub>50</sub>/ml であった。

IPNVウイルスでは細胞内ウイルスの増加は6～8時間で起こり、その後25時間目まで急激に増加した後、30・48時間にかけて減少した。

25時間目の細胞内ウイルス力価は  $10^{6.7}$  TCID<sub>50</sub>/ml であった。CPEは12時間では発現せず15時間目ではじめて発現した。一方、遊離ウイルスの増加はCPEの発現状況と一致し15時間以降に顕著となり、48時間まで増加し感染力価は  $10^{7.6}$  TCID<sub>50</sub>/ml に達した。

IPNVウイルスの一段増殖曲線に関してはMossら(1969)がRTG-2細胞での24℃における増殖曲線を、Ahneら(1978)が同じ細胞で20℃における増殖曲線についてそれぞれ報告している。今回の実験結果は、Mossらの結果と極めて類似した。

以上の結果からIHN・IPNVウイルスを比較すると、両ウイルスの遊離ウイルス

とCPEの発現時期の関係が異なっている。これは両ウイルスの増殖様式の違い、つまり、IPNウイルスは細胞の崩壊によってウイルスが放出されるがIHNウイルスは出芽によってウイルスの放出が起こることに起因すると考えられる。したがってIHNウイルスの場合は、渡辺ら報告したポリオウイルスとは増殖様式が異なることから細胞内ウイルスの回収に適した培養時間を決定するには今後若干の検討が必要であろう。一方、IPNウイルスについては、細胞内ウイルスの回収はCPEが発現し遊離ウイルスが増加する以前で細胞内ウイルス量の最も高い培養時間で行えばよく、本実験の結果では12時間が最適培養時間と考えられる。

(3) IHNウイルスに対する消毒剤の効力評価に使用する細胞の選択

a. 材料および方法

吸着法により調製したIHNウイルス液(HV7601)を使用し、前項のウイルス液の比較実験と同様の条件下で有効ヨウ素量1ppmのイソジン液とウイルス液を混和しウイルスの不活化状況を5種の細胞を用いて観察した。供試した細胞はEPC、RTG-2、FHM、STE、CHSE-214の5種である。

b. 結果

結果は表6にCPEの発現したWellの数で示した。

表6 各種細胞におけるイソジン液によるIHNウイルス不活化試験結果

時間(分) 細胞	0.5	1	5	15	30	60
EPC	4/4*	1/4	2/4	0/4	0/4	0/4
RTG-2	2/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4
FHM	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
STE	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
CHSE-214	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

\* 分母は使用したWellの数、分子はCPE(+ )のWell数である。

同一試料を5種の細胞に接種した結果はEPC細胞では1ppm・5分のイソジン処理試料でもCPEが認められたが、RTG-2細胞では5分処理試料ではCPEは認められず、FHM、STE、CHSE細胞では1分処理試料でもCPEは認められなかった。このことはIHNウイルスに対してEPC細胞の感受性が高いことを示しており、この結果は荒井ら(1982)の報告とも一致する。したがってIHNウイルスに対する消毒剤の効力評価にはEPC細胞が適すると考えられる。

## V 参 考 文 献

- Ahne, W. (1978): 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、第一回魚病学会にて口頭発表
- Elliot, D.G., and D.F. Amend (1978): Efficacy of certain disinfectants against infectious pancreatic necrosis virus.  
J. Fish. Biol. 12, 277-286
- 古橋正吉・宮前卓之(1976): 消毒薬の殺菌作用とその使用法. p. 103~146,  
綿貫 吉・実川佐太郎・榊原欣作編 滅菌法・消毒法 第3集, 文光堂・東京, 248pp
- 原 武史・井上 潔・村井 衛(1975): ヨード剤のpH調整と魚病細菌に対する in vitro の効果について, 昭和49年度東京都水産試験場病害研究報告書, 69pp
- 細淵和成・佐藤健二(1978): 殺菌剤に対する放射線照射の影響(第4報), 塩化ベンザルコニウム, 塩化ベンゼトニウムおよび塩化セチルピリジウムの3種類の陽イオン界面活性剤について, 防菌防黴誌, 6(4), 154-160
- 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
- 木村喬久・吉水 守・田島研一・絵面良男・坂井 稔(1976): 養魚用水の紫外線殺菌について, 1. 魚病原因菌ならびに養魚水中生存菌の紫外線感受性について, 日水誌42(2), 207-211
- 佐野徳夫・西村定一(1980): 魚病ウイルス病の迅速診断法の開発に関する研究. 昭和55年度魚病対策技術開発研究報告書, 17pp
- 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, 長野水指研報, 魚病, 45-58
- 鈴木国弘(1977): 各種消毒剤の糞中細菌殺滅効果, 飼料の研究, 242, 15-17

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

山崎隆義・佐々木治雄・田代文男( 1976 ) : ニジマスの IPN について, 長野水指研報, 魚病, 28-44

Publication of The Tokyo Metropolitan  
Fisheries Experiment Station № 308

Memoir of The Tokyo Metropolitan  
Fisheries Experiment Station № 156

昭和56年度

魚病対策技術開発研究報告書

マス類の伝染性病体の消毒法に関する研究

昭和57年3月 発行

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番1号

電話 03 (600) 2373

印刷所 株式会社 東 邦

印刷物規格表第2類  
印刷番号(56)2031  
刊行番号(I)137