

各種消毒剤のred sea bream iridovirus(RSIV)、striped jack nervous necrosis virus(SJNNV)、yellowtail ascites virus(YTAV) に対する不活化効果

中居 裕, 景山 哲史

Virucidal effect of disinfectants against susceptibility of red sea bream iridovirus(RSIV), striped jack nervous necrosis virus(SJNNV) and yellowtail ascites virus(YTAV)

YUTAKA NAKAI AND TETSUSHI KAGEYAMA

治療法のないウイルス病は、防疫対策による発病予防が大変重要である。その対策を行うための基礎的知見である各種消毒剤に対する不活化効果を把握することが必要となる。本研究では、実施に先立つ文献調査により、重要な魚類病原ウイルスの中で、red sea bream iridovirus(RSIV)、striped jack nervous necrosis virus(SJNNV)とyellowtail ascites virus(YTAV)の3種のウイルスで各種消毒剤に対する不活化効果に関する知見が存在しないことが判明した。以上のことから、本研究ではこれら3ウイルスに対する各種消毒剤の不活化効果を検討した。なお、本研究は独立行政法人水産総合研究センター委託事業「平成14・15年度魚類防疫技術対策委託事業」の一部として実施した。

方 法

1. 供試ウイルス

①RSIV (Ehime-1株) :

実験感染により死亡したマダイ脾臓濾液をGF細胞に接種した。その後25°Cで培養して、CPEが十分発現したことを確認後、その培地をウイルス液とした。

②SJNNV(SJNag93) :

SSN-1E11細胞¹⁾に接種して、20°C¹⁾で培養した。CPEが完全に広がった時点で-80°Cで保存した。急速解凍後、4°C下で1470g、20分の低速遠心して上清を回収し、1mLずつ小分けして-80°Cで保存した。

③YTAV(YAV-1) :

CHSE-214細胞²⁾に接種して、20°C²⁾で培養した。CPEが完全に広がった時点で-80°Cで保存した。急速解凍後、4°C下で1470g、20分の低速遠心して上清を回収し、1mLずつ小分けして-80°Cで保存した。

2. 供試消毒剤

以下の11剤を供試した。

- ・エタノール (試薬特級 和光純薬)
- ・イソプロパノール (日本薬局方 和光純薬)
- ・ポビドンヨード製剤 (有効ヨウ素1% 水産用イソ

ジン液 明治製菓)

- ・次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素5%以上アンチホルミン 和光純薬)
- ・クレゾール石鹼液 (日本薬局方 山田製薬)
- ・フェノール (試薬特級 和光純薬)
- ・グルコン酸クロルヘキシジン (グルコン酸クロルヘキシジン5%溶液 5%ヒビテン液 住友製薬)
- ・塩化ベンザルコニウム溶液 (塩化ベンザルコニウム10%溶液 オスバン液「ダイゴ」 日本製薬)
- ・塩化ベンゼトニウム溶液 (塩化ベンゼトニウム10%溶液 ハイアミン液 三共)
- ・北研ゼット (塩化ベンザルコニウム8.0%・ポリオクチルポリアミノエチルグリシン1.8%・ポリオキシエチレンアルキルフェノールエーテル1.2% 東邦化学工業)
- ・水産用グルタール (主成分グルタルアルデヒド25% ヤシマ産業)

次亜塩素酸ナトリウム溶液は比較的短期間で有効成分(遊離塩素)が減少することから、供試30日以内にジエチル-p-フェニレンジアミン(DPD)滴定法³⁾で遊離塩素濃度を測定した。

フェノールは常温では固体のため、約50°Cで融解

した後、供試した。

水産用グルタールは後述の消毒剤希釈液で10%に希釈した後、添付の緩衝剤（炭酸水素ナトリウム60%・炭酸ナトリウム40%）を希釈液に対して0.3%となるよう混合したものを10%溶液として供試した。

3. 供試消毒剤による細胞毒性の確認

SSN-1、GF、CHSE-214細胞について、前述の11消毒剤の細胞毒性について、次のとおり事前に検討した。96穴プレートに接種した細胞に細胞培養液と同じ培地で希釈した各消毒剤を0.05ml/穴接種して、そのCTEの有無を観察した。その結果、CTEが発現しなかった濃度のうち、最も高い濃度の1/10以上を最低希釈率とした。なお、後述の消毒剤希釈液である人工海水による細胞毒性も確認したところ、いずれの細胞も1/8希釈で細胞毒性が認められなかったことから、その毒性については実験上特に考慮する必要はないと考えられた。

4. ハロゲン系消毒剤に使用する中和剤および中和生成物の殺ウイルス効果の確認

①中和剤の殺ウイルス効果の検討

CHSE-214細胞を用いて、10倍階段希釈により、YTAVの力価測定を行った。希釈液にMEM-10（HEPES緩衝系pH7.6）と中和液（MEM-10と滅菌N/10チオ硫酸ナトリウム溶液を9:1で混合したもの）を用いた。その結果、MEM-10希釈では $10^{7.05}$ TCID₅₀/ml、中和液では $10^{6.8}$ TCID₅₀/mlであった。この差は本方法の誤差範囲内であることから、中和剤（チオ硫酸ナトリウム）は殺YTAV効果を持たないと考えられた。なお、細胞毒性も認められなかった。

5. 中和生成物の殺ウイルス効果の確認

CHSE-214細胞を用いて、YTAVの力価測定を行った。10倍階段希釈とし、希釈液にMEM-10と中和後液を用いた。中和後液は1000ppm次亜塩素酸ナトリウム溶液と中和液を1:9で混合し、MEM-10で10倍に希釈したものである。その結果、MEM-10希釈では $10^{9.05}$ TCID₅₀/ml、中和液では $10^{9.8}$ TCID₅₀/mlであった。この差は本方法の誤差範囲内であることから、中和生成物が殺YTAV効果を持たないと考えられた。なお、細胞毒性も認められなかった。

6. 消毒剤希釈液

蒸留水と人工海水を蒸気滅菌して用いた。

人工海水は山梨県水産技術センターにおけるアユ種苗生産で使用しているアレン処方を変更したものである。その組成は以下のとおりである。

NaCl:30.1g MgSO₄:7.8g MgCl₂:6.0g
CaCl₂:0.18g KCl:0.08g NaHCO₃:0.3g
蒸留水:1L

供試時のpHは以下のとおりであった。

蒸留水:pH5.27

人工海水:pH7.52

7. 実験手順

①RSIV

・供試消毒剤とその濃度

RSIVは、高力価のウイルス液が得られないため、ウイルス力価が低くても結果が得られる可能性のある消毒剤として、エタノール・イソプロパノール・ポビドンヨード製剤および次亜塩素酸ナトリウム溶液を選び供試した。供試濃度は第1表のとおりである。

・消毒剤の処理方法、処理時間

エタノールとイソプロパノールでは、供試濃度の10/9となるように消毒剤希釈液で調整して、希釈消毒液0.9mLにウイルス液（原液）0.1mLを加えて30秒反応させた。その後0.9mLのBME-10に反応液0.1mLを加えて細胞毒性を除いたものを、24穴プレートに播種したGF細胞に各0.1mL、4穴に接種した。陽性対照は消毒剤希釈液0.9mLとし、実験区と同様に処理を行った。

ポビドンヨード製剤と次亜塩素酸ナトリウム溶液では、供試濃度の10/9となるように消毒剤希釈液で調整して、希釈消毒液0.9mLにウイルス液（原液）0.1mLを加えて30秒および20分反応させた。その後中和液（BME-10と滅菌N/10チオ硫酸ナトリウム溶液を9:1で混合したもの）0.9mLに反応液0.1mLを加えて消毒剤を中和し、24穴プレートに播種したGF細胞に各0.1mL、4穴に接種した。陽性対照は消毒剤希釈液0.9mLとし、実験区と同様に処理を行った。

供試ウイルスの力価は別途測定した（24穴プレート）。

以上の操作はすべて20°Cで行った。

・経過観察

反応液接種後25°C、14日間観察し、CPEの有無を観察した。

②SJNNV

・供試消毒剤とその濃度

先に示した11の消毒剤を供試した。供試濃度は第2表、第3表のとおりである。

・消毒剤の処理方法、処理時間

エタノールとイソプロパノールでは、供試濃度の

10/9となるように消毒剤希釈液で調整して、希釈消毒液0.9mLにウイルス液（原液）0.1mLを加えて30秒および20分反応させた。その後0.99mLのL-15-10に反応液0.01mLを加えて細胞毒性を除いたものを、96穴プレートに播種したSSN-1細胞に各0.05mL、4穴に接種した。陽性対照は消毒剤希釈液0.99mLとし、実験区と同様に処理（時間は20分のみ）を行った。

ポビドンヨード製剤と次亜塩素酸ナトリウム溶液では、供試濃度の10/9となるように消毒剤希釈液で調製して、希釈消毒液0.9mLにウイルス液（原液）0.1mLを加えて30秒および20分反応させた。その後中和液（L-15-10と滅菌N/10チオ硫酸ナトリウム溶液を9:1で混合したもの）0.9mLに反応液0.1mLを加えて消毒剤を中和し、その液0.1mLを0.9mlのL-15-10に加えてたものを、96穴プレートに播種したSSN-1細胞に各0.05mL、4穴に接種した。陽性対照は消毒剤希釈液0.9mLとし、実験区と同様に処理（時間は20分のみ）を行った。その他の7消毒剤では、供試濃度の10/9となるように消毒剤希釈液で調整して、希釈消毒液0.9mLにウイルス液（原液）0.1mLを加えて30秒および20分反応させた。その後、0.99mLのL-15-10に反応液0.01mLを加えて100倍希釈し、さらにこの液を同様に100倍希釈（都合10000倍希釈）した。ただしクレゾール石鹼液については2回目の希釈は10倍希釈（都合1000倍希釈）とした。その液を96穴プレートに播種したSSN-1細胞に各0.05mL、4穴に接種した。陽性対照は消毒剤希釈液0.9mLとし、実験区

と同様に処理（時間は20分のみ）を行った。

供試ウイルスの力価は別途測定した(96穴プレート)。

以上の操作はすべて15°Cで行った。

・経過観察

反応液接種後20°C、21日間観察し、CPEの有無を観察した。

③YTAV

・供試消毒剤とその濃度

先に示した11の消毒剤を供試した。供試濃度は第4～7表のとおりである。

・消毒剤の処理方法、処理時間

供試細胞はCHSE-214細胞を使用し、培地はMEM-10（HEPES緩衝系pH7.6）を使用した。

・経過観察

反応液接種後20°C、14日間観察しCPEの有無を観察した。

結果

RSIVの結果を第1表に、SJNNVの結果を第2表、第3表に、YTAVの結果を第4～7表に示した。また、それぞれのウイルスを完全に不活化するのに必要な供試消毒剤の最小濃度を第8表に示した。また、これまで検討された各種ウイルスと比較するために、第9表に今回得られた知見とともに取りまとめた。

第1表 RSIVにおける各消毒剤の殺ウイルス効果

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液												
		蒸留水 濃度(%)					人工海水 濃度(%)							
		30	40	50	60	70	80	30	40	50	60	70	80	
エタノール	30秒	-(1/4)	+	+	+	+	+	-(1/4)	+	+	+	+	+	+
イソプロパノール	30秒	+	+	+	+	+	NT	+	+	+	+	+	+	NT

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水 濃度(ppm)					人工海水 濃度(ppm)						
		1000	500	250	125	62.5	31.25	1000	500	250	125	62.5	31.25
次亜塩素酸ナトリウム溶液	30秒	+	+	+	+	+	-(4/4)	+	+	+	+	-(4/4)	-(4/4)
	20分	+	+	+	+	+	-(4/4)	+	+	+	+	+	-(2/4)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液									
		蒸留水 濃度(ppm)					人工海水 濃度(ppm)				
		400	200	100	50	25	400	200	100	50	25
ポビドンヨード製剤	30秒	+	+	+	+	-(4/4)	+	+	+	+	-(4/4)
	20分	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-(1/4)

次亜塩素酸ナトリウム溶液・ポビドンヨード製剤は有効濃度で示した。

供試ウイルス力価：10^{8.0}TCID₅₀/mL

＋：CPE発現せず

－：CPE発現（CPE発現穴数／供試穴数）

NT：未実施

第2表 SJNNVにおける各消毒剤の殺ウイルス効果 (1)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液												
		蒸留水						人工海水						
		濃度 (%)						濃度 (%)						
		40	50	60	70	80	90	40	50	60	70	80	90	
エタノール	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
イソプロパノール	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液												
		蒸留水						人工海水						
		濃度 (ppm)						濃度 (ppm)						
		500	250	125	62.5	31.25	15.625	500	250	125	62.5	31.25	15.625	
ポビドンヨード製剤	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液							
		蒸留水				人工海水			
		濃度 (%)				濃度 (%)			
		10	5	1	0.5	10	5	1	0.5
クレゾール石鹼液	30秒	+	-(3/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	+	+	+	-(1/4)	-(3/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
フェノール	30秒	+	-(1/4)	-(4/4)	-(4/4)	+	+	-(4/4)	-(4/4)
	20分	+	+	-(4/4)	-(4/4)	+	+	-(4/4)	-(4/4)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液							
		蒸留水				人工海水			
		濃度 (%)				濃度 (%)			
		0.5	0.25	0.125	0.0625	0.5	0.25	0.125	0.0625
グルコン酸クロルヘキシジン	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水						人工海水					
		濃度 (%)						濃度 (%)					
		2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
塩化ベンザルコニウム溶液	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
塩化ベンゼトニウム溶液	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	+	-(2/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
北研ゼット	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(3/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水						人工海水					
		濃度 (%)						濃度 (%)					
		1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125
水産用グルタラル	30秒	+	+	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	+	+	-(1/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	+	+	+	+	+	-(4/4)	+	+	+	+	+	+

次亜塩素酸ナトリウム溶液・ポビドンヨード製剤は有効濃度で示した。
 供試ウイルス力価：10^{8.9}TCID₅₀/mL (蒸留水) 10^{9.3}TCID₅₀/mL (人工海水)
 +：CPE発現せず
 -：CPE発現穴数 (CPE発現穴数/供試穴数)

第3表 SJNNVにおける各消毒剤の殺ウイルス効果 (2)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水						人工海水					
		濃度 (ppm)						濃度 (ppm)					
		125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.90625	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.90625
ポビドンヨード製剤	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	+	+	+	+	-(4/4)	-(4/4)
次亜塩素酸ナトリウム溶液	30秒	+	+	-(2/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	+	+	+	+	-(4/4)	-(4/4)
	20分	+	+	-(1/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	+	+	+	+	-(2/4)	-(4/4)

*：供試ウイルス液は原液を蒸留水で100倍希釈した。

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水						人工海水					
		濃度 (ppm)						濃度 (ppm)					
		1000	500	250	125	62.5	31.25	1000	500	250	125	62.5	31.25
ポビドンヨード製剤	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
次亜塩素酸ナトリウム溶液	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)

*：供試ウイルス液は原液をL-15で100倍希釈した。
 次亜塩素酸ナトリウム溶液・ポビドンヨード製剤は有効濃度で示した。
 供試ウイルス力価：10^{9.47}TCID₅₀/mL (希釈前)
 +：CPE発現せず
 -：CPE発現 (CPE発現穴数/供試穴数)

第4表 YTAVにおける各消毒剤の殺ウイルス効果 (1)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水 濃度(%)						人工海水 濃度(%)					
		40	50	60	70	80	90	40	50	60	70	80	90
エタノール	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
イソプロパノール	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液							
		蒸留水 濃度(%)				人工海水 濃度(%)			
		10	5	1	0.5	10	5	1	0.5
クレゾール石鹼液	30秒	-(3/4)	+	-(4/4)	-(4/4)	+	+	-(4/4)	-(4/4)
	20分	+	+	-(4/4)	-(4/4)	+	+	-(4/4)	-(4/4)
フェノール	30秒	+	+	-(4/4)	-(3/4)	+	+	-(4/4)	-(4/4)
	20分	+	+	-(3/4)	-(4/4)	+	+	-(4/4)	-(4/4)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液							
		蒸留水 濃度(%)				人工海水 濃度(%)			
		0.5	0.25	0.125	0.0625	0.5	0.25	0.125	0.0625
グルコン酸クロルヘキシジン	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水 濃度(%)						人工海水 濃度(%)					
		10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125
塩化ベンザルコニウム溶液	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
塩化ベンゼトニウム溶液	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
北研ゼット	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水 濃度(%)						人工海水 濃度(%)					
		1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125
水産用グルタラル	30秒	+	+	+	+	-(4/4)	-(4/4)	+	+	+	-(1/4)	-(2/4)	-(3/4)
	20分	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

次亜塩素酸ナトリウム溶液・ポビドンヨード製剤は有効濃度で示した。
 供試ウイルス力価：10^{7.3}TCID₅₀/mL (蒸留水) 10^{7.97}TCID₅₀/mL (人工海水)

+: CPE発現せず

-: CPE発現 (CPE発現穴数/供試穴数)

第5表 YTAVにおける各消毒剤の殺ウイルス効果 (2)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液			
		蒸留水 濃度(%)			
		10	5	1	0.5
クレゾール石鹼液	30秒	+	+	-(3/4)	-(4/4)
	20分	+	+	+	-(1/4)

供試ウイルス力価：10^{6.55}TCID₅₀/mL

+: CPE発現せず

-: CPE発現 (CPE発現穴数/供試穴数)

考 察

RSIVの消毒は、アルコール系消毒剤を使用することにより可能であると示唆された (第8表)。また、ハロゲン系消毒剤は他の魚類病原ウイルスと比較すると低濃度で消毒可能であることが示唆された。また、実験の範囲内において、人工海水による消毒効果への悪影響は認められなかった。ただし、今回の実験ではRSIVのウイ

ルス力価が10^{3.5}TCID₅₀/mLであったため、陽性対照区においても計算上接種したウイルス力価は10^{0.5}TCID₅₀/0.1mLとなる。したがって、消毒剤により完全に不活化されたとしても、10^{0.5}TCID₅₀/0.1mLのウイルスが不活化されただけとなる。したがって、本実験より得られた結果から供試消毒剤の有効性を判断するには、十分なウイルス力価低下を確認できないため、その効果については参考程度に止まるものと考えられた。

SJNNVの消毒については、実用上、有効な消毒剤は水産用グルタラルのみと考えられた (第8表)。本剤の使用説明書によると200倍希釈・30分以上浸漬して使用となっており、実用上消毒は十分可能と考えられた。クレゾール石鹼液と塩化ベンゼトニウム溶液については高濃度で有効との結果が得られたが、人工海水での悪影響が見られることから、実際の使用は困難と考えられた。有機物がハロゲン系消毒剤の消毒効果に与える影響を見るため、SJNNV液を蒸留水で100倍に希釈した場合と、

第6表 YTAVにおける各消毒剤の殺ウイルス効果 (3)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水						人工海水					
		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)	
		200	100	50	25	12.5	6.25	200	100	50	25	12.5	6.25
ポビドンヨード製剤	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	+	+	+	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	+	-(1/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水						人工海水					
		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)	
		1000	500	250	125	62.5	31.25	1000	500	250	125	62.5	31.25
次亜塩素酸ナトリウム溶液	30秒	+	+	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	+	+	-(2/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	+	+	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	+	+	-(1/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水						人工海水					
		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)	
		200	100	50	25	12.5	6.25	200	100	50	25	12.5	6.25
ポビドンヨード製剤	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	+	+	+	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	+	+	+	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)

* : 供試ウイルス液は原液をMEM-10で100倍希釈した。

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水						人工海水					
		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)	
		1000	500	250	125	62.5	31.25	1000	500	250	125	62.5	31.25
次亜塩素酸ナトリウム溶液	30秒	+	+	+	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	+	+	+	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	+	+	+	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	+	+	+	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)

* : 供試ウイルス液は原液をMEM-10で100倍希釈した。

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水						人工海水					
		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)	
		200	100	50	25	12.5	6.25	200	100	50	25	12.5	6.25
ポビドンヨード製剤	30秒	+	+	-(1/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	+	+	-(1/4)	-(4/4)
	20分	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* : 供試ウイルス液は原液を蒸留水で100倍希釈した。

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液											
		蒸留水						人工海水					
		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)	
		1000	500	250	125	62.5	31.25	1000	500	250	125	62.5	31.25
次亜塩素酸ナトリウム溶液	30秒	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20分	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* : 供試ウイルス液は原液を蒸留水で100倍希釈した。
 次亜塩素酸ナトリウム溶液・ポビドンヨード製剤は有効濃度で示した。
 供試ウイルス力価：10^{9.05}TCID₅₀/mL (原液)
 + : CPE発現せず
 - : CPE発現 (CPE発現穴数/供試穴数)

第7表 YTAVにおける各消毒剤の殺ウイルス効果 (4)

消毒剤	作用時間	消毒剤希釈液									
		蒸留水					人工海水				
		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)		濃度 (ppm)	
		1000	500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	15.625	7.8125
ポビドンヨード製剤	30秒	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(1/4)	-(2/4)	-(4/4)	-(4/4)	-(4/4)
	20分	-(4/4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* : 供試ウイルス液は原液を蒸留水で100倍希釈した。
 濃度は有効濃度で示した。
 供試ウイルス力価：10^{7.55}TCID₅₀/mL (希釈後)
 + : CPE発現せず
 - : CPE発現 (CPE発現穴数/供試穴数)

L-15-10で100倍に希釈した場合で消毒効果を比較した (第3表)。蒸留水希釈のポビドンヨード製剤では、SJNNV液の蒸留水希釈により有機物を軽減した効果は全く見られず、供試した濃度の範囲内での消毒効果は認められなかった。しかし、次亜塩素酸ナトリウム溶液では、62.5ppm・30秒で消毒効果が認められた。このこ

とはsea bass由来株のウイルス液を蒸留水で希釈し、両剤に顕著な消毒効果を示した結果⁴⁾とは異なった。その原因として可能性が高いのは供試製剤の相違と考えられた。人工海水希釈のポビドンヨード製剤・次亜塩素酸ナトリウム溶液では、蒸留水希釈以上にSJNNV液の蒸留水希釈により有効な消毒結果が見られた。後述するよ

第8表 RSIV・SJNNV・YTAVを完全に不活化するのに必要な供試消毒剤の最小濃度

消毒剤	作用時間	RSIV		SJNNV		YTAV	
		消毒剤希釈液					
		蒸留水	人工海水	蒸留水	人工海水	蒸留水	人工海水
エタノール	30秒	40%	40%	×	×	×	×
	20分	NT	NT	×	×	×	×
イソプロパノール	30秒	30%	30%	×	×	×	×
	20分	NT	NT	×	×	×	×
ポビドンヨード製剤	30秒	50ppm	50ppm	×	×	×	×
	20分	25ppm	50ppm	×	×	50ppm	200ppm
次亜塩素酸ナトリウム溶液	30秒	62.5ppm	125ppm	×	×	500ppm	500ppm
	20分	62.5ppm	62.5ppm	×	×	500ppm	500ppm
クレゾール石鹼液	30秒	NT	NT	10%	×	5%	5%
	20分	NT	NT	1%	×	1%	5%
フェノール	30秒	NT	NT	10%	5%	5%	5%
	20分	NT	NT	5%	5%	5%	5%
グルコン酸クロルヘキシジン	30秒	NT	NT	×	×	×	×
	20分	NT	NT	×	×	×	×
塩化ベンザルコニウム溶液	30秒	NT	NT	×	×	×	×
	20分	NT	NT	×	×	×	×
塩化ベンゼトニウム溶液	30秒	NT	NT	×	×	×	×
	20分	NT	NT	2%	×	×	×
北研ゼット	30秒	NT	NT	×	×	×	×
	20分	NT	NT	×	×	×	×
水産用グルタラール	30秒	NT	NT	0.5%	0.5%	0.125%	0.25%
	20分	NT	NT	0.0625%	0.03125%	0.03125%	0.03125%

次亜塩素酸ナトリウム溶液・ポビドンヨード製剤は有効濃度で示した。

×：実験した範囲内の濃度で殺ウイルス効果は認められなかった。

NT：未実施

第9表 *in vitro*で検討された各種ウイルスを完全に不活化するのに必要な消毒剤の最小濃度－作用時間の一覧

消毒剤\消毒剤希釈液	RSIV		SJNNV		YTAV		IPNV	IHNV	OMV	HIRRV	CyHV-1	VHSV	
	蒸留水	人工海水	蒸留水	人工海水	蒸留水	人工海水	PBS	PBS	蒸留水	蒸留水	水道水	PBS	人工海水
エタノール	40%-30秒	40%-30秒	×	×	×	×	× ⁵⁾	30%-15秒 ⁹⁾	--	--	6ppm-30秒 ¹¹⁾	× ¹²⁾	40%-2分 ¹²⁾
イソプロパノール	30%-30秒	30%-30秒	×	×	×	×	× ⁵⁾	40%-15秒 ⁹⁾	--	--	--	30%-30秒 ¹²⁾	20%-2分 ¹²⁾
ポビドンヨード製剤	50ppm-30秒	50ppm-30秒	×	×	×	×	× ⁵⁾	10ppm-30秒 ¹⁰⁾ 40ppm-30秒 ⁷⁾ 100ppm-30秒 ⁷⁾	--	--	--	50ppm-1分 ¹²⁾	50ppm-1分 ¹²⁾
次亜塩素酸ナトリウム溶液	62.5ppm-30秒	125ppm-30秒	×	×	500ppm-30秒	500ppm-30秒	× ⁵⁾	200ppm-2.5分 ⁹⁾ 100ppm-30秒 ⁷⁾ 50ppm-30秒 ⁷⁾	--	--	--	50ppm-1分 ¹⁷⁾	100ppm-5分 ¹²⁾
クレゾール石鹼液	--	--	10%-30秒	×	5%-30秒	5%-30秒	5%-5分 ⁵⁾	0.25%-5分 ⁹⁾	0.1%-30秒 ⁷⁾	0.1%-30秒 ⁷⁾	--	0.1%-5分 ¹²⁾	0.25%-15分 ¹²⁾
フェノール	--	--	10%-30秒	5%-30秒	5%-30秒	5%-30秒	5%-5分 ⁵⁾	×	--	--	--	2.5%-5分 ¹²⁾	2.5%-5分 ¹²⁾
5%グルコン酸クロルヘキシジン	--	--	×	×	×	×	--	--	--	--	--	--	--
10%塩化ベンザルコニウム溶液	--	--	×	×	×	×	× ⁶⁾	0.8%-30分 ⁹⁾	0.1%-30秒 ⁷⁾	1%-30秒 ⁷⁾	--	0.1%-5分 ¹²⁾	0.1%-5分 ¹²⁾
10%塩化ベンゼトニウム溶液	--	--	2%-20分	×	×	×	× ⁶⁾	×	--	--	--	0.1%-5分 ¹²⁾	0.1%-5分 ¹²⁾
北研ゼット	--	--	×	×	×	×	× ⁶⁾	0.8%-5分 ⁹⁾	--	--	--	0.1%-5分 ¹²⁾	0.1%-5分 ¹²⁾
水産用グルタラール	--	--	0.5%-30秒	0.5%-30秒	0.125%-30秒	0.25%-30秒	--	--	--	--	--	--	0.0125%-10分 ¹³⁾

上付数字は「文献」の数字を示した。

次亜塩素酸ナトリウム溶液・ポビドンヨード製剤は有効濃度で示し、その他の消毒剤は製剤に対する希釈率で示した。

×：知見の範囲内の濃度で殺ウイルス効果は認められなかった。

--：知見無し

うにYTAVではSJNNVと逆の結果となっていることから、ウイルスの種類により、消毒剤の人工海水希釈による影響は異なるのかもしれない。以上のことから、SJNNVの消毒には水産用グルタラルが有効であり、また汚れ等のない器具類を迅速に消毒したい場合に、100ppm程度の次亜塩素酸ナトリウム溶液が使用可能と考えられた。

YTAVの消毒剤感受性はハロゲン系を除いて、IPNVの結果⁵⁶⁾とほぼ一致した(第9表)。YTAVがIPNVと血清学的に近縁²⁾とされていることから、消毒剤感受性も同様であると考えられた。混入有機物の影響を受けやすいハロゲン系消毒剤では結果にばらつきが見られる⁷⁾とされる。YTAVとIPNVの結果の相違も、ウイルスの相違より混入有機物の影響等、実験条件の差異を反映したものかもしれない。クレゾール石鹼液は5%で消毒可能との結果が得られたが、高濃度のため、実用上、使用しにくいと考えられた。有機物がハロゲン系消毒剤の消毒効果に与える影響を見るため、YTAV液を蒸留水で100倍に希釈した場合と、MEM-10で100倍に希釈した場合で消毒効果を比較した(第6表)。蒸留水希釈では、両剤ともにMEM-10希釈に比べてより高い消毒効果を示した。特に次亜塩素酸ナトリウム溶液では顕著であった。このことから、同じハロゲン系消毒剤でも、ポビドンヨード製剤より次亜塩素酸ナトリウム溶液の方が有機物の影響を受けやすいことが示唆された。水産用グルタラルはSJNNV同様に高い消毒効果を示したことから、YTAVの消毒には水産用グルタラルが有効であり、また汚れ等のない器具類を迅速に消毒したい場合に、50ppm程度の次亜塩素酸ナトリウム溶液が使用可能と考えられた。

また、本実験における実験手法上の問題点は以下のとおりである。

第4表に示したYTAVにおけるクレゾール石鹼液の蒸留水希釈・30秒作用において、10%でCPEが発現し、5%で発現しないという結果となった。ウイルス接種後の攪拌はボルテックスミキサーで数秒間行っていたが、20秒間に伸ばした結果が第5表であり、整合性のとれた結果が得られた。このことから、消毒剤により、適切な攪拌時間が異なることが示唆された。攪拌時間は可能な限り長くすることが必要と考えられた。

また、第6表に示したYTAVにおけるポビドンヨード製剤の人工海水希釈・ウイルス液蒸留水100倍希釈において、200・100ppmでCPEが発現し、50・25ppmで発現しないという結果となった(作用時間30秒)。再実

験の結果が第7表に示したが、1000ppmでCPEが発現し、500ppm以下でCPEが発現しなかった(作用時間20分)。ポビドンヨード製剤の殺菌成分は遊離ヨウ素であり、その濃度は一定の範囲内での希釈により上昇する。⁸⁾このことと本実験結果が符合する点もある(第7表)が、これだけではすべての結果を十分に説明できず、詳細な原因は不明である。ポビドンヨード製剤の消毒効果を検討する場合、ウイルス・消毒剤希釈液・ウイルス液中の有機物の濃度・実験手法等が影響して、このような結果が起こりうることも十分考慮すべきと思われる。

要 約

1. RSIV：アルコール系消毒剤を使用することにより有効であると示唆された。また、ハロゲン系消毒剤は他の魚類病原ウイルスと比較すると低濃度で消毒可能と判断された。ただし、本研究より得られた効果については参考程度に止まるものと考えられる。
2. YTAV：有効と考えられた消毒剤はグルタラル(0.03125%・30秒)と次亜塩素酸ナトリウム溶液(500ppm・30秒)であった。ただし、次亜塩素酸ナトリウム溶液はウイルス液を蒸留水で100倍希釈した場合、31.25ppm・30秒で不活化可能であった。
3. SJNNV：有効と考えられた消毒剤はグルタラル(0.125%・30秒)のみであった。ただし、次亜塩素酸ナトリウム溶液はウイルス液を蒸留水で100倍希釈した場合、62.5ppm・30秒で不活化可能であった。

今回の研究に際し、貴重なるウイルス株を分与して下さった広島大学大学院中井敏博教授に感謝いたします。

また、RSIVの調製およびCPEの経過観察にご協力戴きました独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所病害防除部栗田潤博士、佐野元彦博士には特に感謝いたします。

文 献

- 1) 渡辺研一, 吉水 守. 魚類由来培養細胞の魚類ノダウイルス感受性. 魚病研究 1999; 34: 213-214.
- 2) 反町 稔, 原 武史. 腹水症を呈するブリ稚魚から分離されたウイルスについて. 魚病研究 1985; 19: 231-238.
- 3) 日本水道協会. 上水試験方法, 東京. 2001; 247-250.
- 4) Frerichs G N, Tweedie A, Starkey W G, Richards

- R H. Temperature pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture*, 2000 ; 185 : 13-24.
- 5) 井上 潔, 池谷文夫, 山崎隆義, 原武史. IPNウイルスに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果. 魚病研究 1990 ; 25 : 81-86.
 - 6) 井上 潔, 池谷文夫, 山崎隆義, 原 武史. IPNウイルスおよびIHNウイルスに対する逆性石鹼製剤の殺ウイルス効果. 魚病研究 1991 ; 26 : 195-200.
 - 7) 羽鳥秀一, 本西晃, 西澤豊彦, 吉水 守. 各種消毒剤の*Oncorhynchus masou virus*(OMV)に対する不活化効果. 魚病研究 2003 ; 38 : 185-187.
 - 8) 小林寛伊. 感染制御学. へるす出版, 東京. 1996; 125-156.
 - 9) 井上 潔, 池谷文夫, 山崎隆義, 原 武史. IHNウイルスに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果. 魚病研究 1991 ; 26 : 189-194.
 - 10) 井上 潔, 池谷文夫, 山崎隆義, 原 武史. IPNウイルスおよびIHNウイルスに対する消毒剤の効力評価法に関する検討. 魚病研究 1990 ; 25 : 69-79.
 - 11) 佐野徳夫, 福田穎穂. 魚病委託研究報告 (コイ乳頭腫ならびに稚魚不明病に関する研究: 平成2年度成果報告). 茨城県内水面水産試験場調査研究報告. 1990 ; 28 : 94-109.
 - 12) 栗田 潤, 飯田悦左, 中島員洋, 井上 潔. ヒラメVHSウイルスに対する各種市販消毒剤の殺ウイルス効果. 魚病研究 2002 ; 37 : 175-181.
 - 13) 広島県水産試験場. ヒラメの卵および孵化仔魚に対するVHSVの病害性に関する研究. 平成14年度魚病対策技術開発研究成果報告書. 2003 ; 135-148.