



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	日本魚病学会大会KHVシンポジウム（その2）．コイヘルペスウイルス（KHV）の環境水中での生存性およびその効果的不活化・消毒法について
Author(s)	吉水，守；清水，智子；笠井，久会
Description	日本魚病学会の講演内容を記事として編集したもの（講師：吉水守）
Citation	鱗光，45(8)，89-96
Issue Date	2005-12-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39502
Type	journal article
File Information	yoshimizu-225.pdf



日本魚病学会大会
KHVシンポジウム(その2)

コイヘルペスウイルス (KHV) の 環境水中での生存性 およびその効果的不活化・ 消毒法について



講師 吉水 守教授
[清水智子・笠井久会(北大院水)]

河川の上流でコイヘルペス病が発生すると、下流でも確実に病気が発生します。感染症ですから仕方がないことなんですが、このウイルスはどのくらい感染性を保っているのか大きな疑問がありました。

もう一つの疑問点は、病気が発生した池だとか施設をどうやって消毒すればいいのか。しかも、どんな消毒をすればいいのかということです。いままでにも多くのウイルス病が

目的

魚体を離れたKHVの生存性を検討するとともに、KHVの不活化法について検討し、KHVDの蔓延防止を図る上で重要な施設・器具等の消毒を効果的に実施するための基礎的な知見を得ること

環境省

- ・KHVの環境水中での生存性は？
- ・環境中に出たKHVはどうなるのか？

農林水産省

- ・熱および紫外線による不活化条件は？
- ・消毒薬によるKHVの不活化条件は？

発生しておりますので、大まかな知見といえますか、この消毒薬で、これくらいの濃度でやればウイルスは死ぬだろうということがわかってきております。

しかし、KHVというコイヘルペスウイルスを対象にして「そんな対処法でほんとにいいんですか」と質問を受けますと、なかなか答えられなかったというのが実情でした。

最初は岡山県でKHVが発生したのですが、大々的に問題になったのは霞ヶ浦でした。「霞ヶ浦で鯉が大量に死んだ」と各マスコミが取り上げました。

さっそく環境省から「水の中に放たれたウイルスはどうなるのか」、「どのくらい感染性を保っているのか」という質問を受けました。

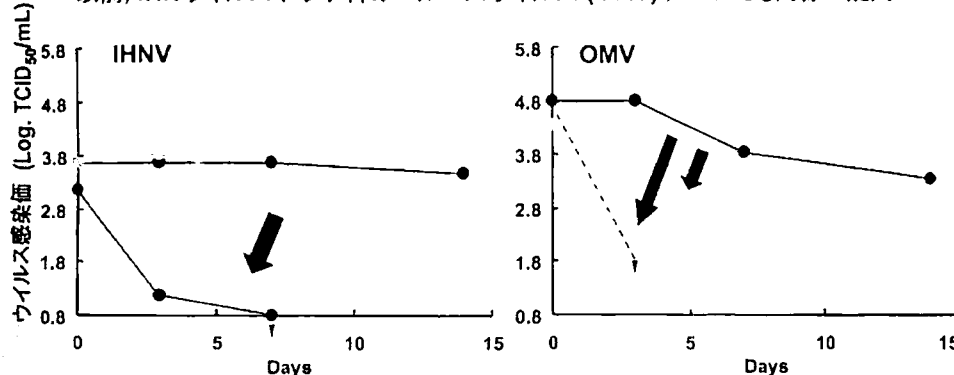
その一方で、物理的な不活化要件とか、消毒薬の不活化条件を調べる研究について、農林水産省の養殖研究所から要請がまいりました。

私もはこういつた疑問に答える実験を昨年行ないましたので、その結果をご紹介します。

サケ・マス類でも同じようにヘルペスウイルス病がございます。この

他のウイルスも同様な疑問が

以前、IHNウイルスやサケ科のヘルペスウイルス (OMV) についても同様の疑問が？



IHNV および OMV の飼育水中での15°Cにおける生存性。

- 高圧滅菌
- 濾過除菌 (0.22μm)
- 無処理
- ↓ 検出限界以下

- ➡ 抗ウイルス物質産生細菌が重要な働きを演じている。
(魚病研究, 21: 222-231, 1986)
- ➡ 抗ウイルス物質産生細菌による魚類ウイルス病の制御
(Microbes & Environment, 14: 269-275, 1999)

ウイルスの生存性に関しまして二十数年前から質問を受けておりました。現在では魚病対策として、紫外線でウイルスを殺した水を使ってコンクリート池で飼育されています。

この表はニジマスとサクラマス

例にしたものです。ニジマスとかサクラマスを飼っている水の中にウイルスを混ぜます。グラフで示した水温は一五℃ですが、いろんな温度で実験を行いました。

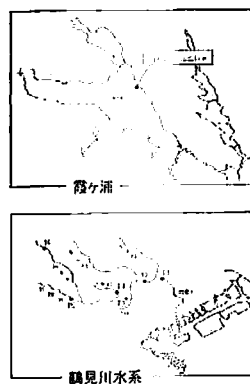
一五℃でこの経過を観察しますと、

河川水、湖水および底泥中でのKHV感染価の消長

材料： 霞ヶ浦の湖水および底泥
鶴見川水系河川水

方法： ウイルス液 試料
1:9の割合で混合（底泥：10% W/V）
感染価を測定

反応温度： 15, 20, 25, 30℃（霞ヶ浦）
15, 30℃（鶴見川水系）



霞ヶ浦採水地点の水質および底質

項目	計測結果	計測方法
水温	24.6℃	JIS K102 7.2
pH	8.2	JIS K102 12.1
溶存酸素量	7.1 mg/L	JIS K102 32.1
BOD	2.3 mg/L	JIS K102 21.32.3
COD	8.6 mg/L	JIS K102 17
SS	35 mg/L	S46報告第59号 付表8
大腸菌群数	7.0×10 MPN/mL	S46報告第59号 表2
全窒素	1.21 mg/L	JIS K102 4.5
全りん	0.15 mg/L	JIS K102 46.3
アンモニウム態窒素	0.11 mg/L	JIS K102 42.2
亜硝酸態窒素	0.04 mg/L	JIS K102 43.1.1
硝酸態窒素	0.12 mg/L	JIS K102 43.2.3
塩化カルシウム	40.4 mg/L	JIS K102 35.3
りん酸カルシウム	0.04 mg/L	JIS K102 46.1.1
有機物	0.37 mg/g	既報調査方法H-17
全窒素	0.160 mg/kg	既報調査方法H-18.2
全りん	19.50 mg/kg	既報調査方法H-19.2
有機物	17.2 %	既報調査方法H-4

一週間経つと感染性は見当たらないと言いますか、測定できなくなつてきます。ただ、その水を一二℃で十五分間ほど加熱しますと、その中にいる微生物は全部死んでしまします。それがこのグラフの青いラインで示したものです。

それから濾過除菌といいまして、微生物を全部取り除いてしまうと、この緑のラインになりますけども、ウイルスは安定します。「安定する」というのは「生き続ける」という意味です。

ヘルペスウイルスの場合も同様で、バクテリア、カビ、その他の微生物を全部殺したり、取り除いてしまうとかなり安定します。しかし、そのまま混ぜるとヘルペスウイルスはすぐ死んでしまうことがわかっています。なぜかという理由については、水中のウイルスを不活化するような物質を出す菌がいるわけです。微生物生態系がすごく重要な働きをしていることを、いまから二十年ほど前にわかりました。

そういう菌がいるんだったら魚病の治療に使おうということですが、ここ何年か実験をやっておりますが、う

まく使えるような事例も出てまいりました。

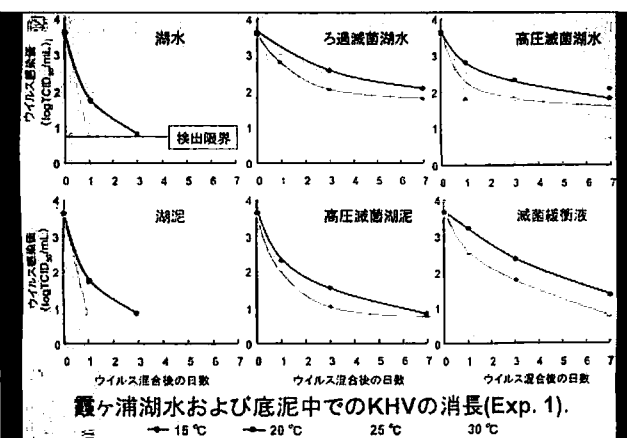
KHVの弱点

コイヘルペスウイルスを調査する目的で、生簀のまわりの水を採集するため霞ヶ浦には二度行きました。

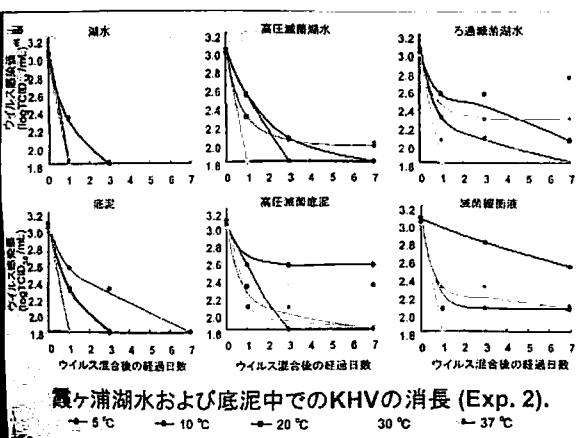
培養したコイヘルペスウイルスはアメリカで最初に発表したカルフォルニア大学のヘンドリック教授から譲ってもらいました。教授の培養ウイルスは世界的に知られていますので、この株を選びました。ウイルスは水と混ぜて、一五℃・二〇℃・二五℃・三〇℃で実験を行いました。

また、神奈川県鶴見川で鯉がたぐさん死にましたので、下流から上流に向かって六地点を選んで川の水を採取しました。水温は一五℃と三〇℃に設定して、ウイルスの感染価はどうなるかということ調べたわけですね。

この図は霞ヶ浦の採集地点の水質です。一回目のデータなんですけど、さほど汚れてはいません。でも、アオミドロが結構浮遊していますので、水質としてBODは二・三、COD



霞ヶ浦湖水および底泥中でのKHVの消長(Exp. 1).



霞ヶ浦湖水および底泥中でのKHVの消長(Exp. 2).

は八・六。SSが三五くらい湖です。バクテリアも結構存在するという状況です。

同じようなグラフを書いてみました。何も手を加えていない湖水。生簀の下にあった泥。それから霞ヶ浦の水を濾過して微生物をなくした水などです。

結論から申しますと、ここにございますけど赤いラインは検出限界で、これ以下はわかりません。たぶんコイヘルペスウイルスは死んだんだろうと思われる。これ以下は数字として出せないもんですから、ここで切っています。

三〇℃・二五℃・二〇℃・一〇℃と表にありますが、温度が高いほどコイヘルペスウイルスは早く死にます。とくに三〇℃の水温であれば、一日で検出できないという状況になります。死んでしまつて、不活化されている状況になったわけです。

また、微生物を取り除いたり微生物を殺した水で実験した結果、二五℃・二〇℃・一〇℃では、三日後にコイヘルペスウイルスが検出されなくなっています。

三〇℃では早いんですが、温度が

低い……、たとえば一五℃であればゆつくりとウイルスは死んで不活化されるという現象がみられます。

この実験ですと、最長で三日間ということになります。

私どもとしては三日間というのは長いと思つたんです。でも、湖の生態環境を研究されている方からは「三日でいいんですか」とつていう質問が返つてきました。

霞ヶ浦の水を全部入れ換えるのであれば相当な時間が掛かります。しかし三日間というコイヘルペスウイルスの生存期間は、すごく短い期間と受けとめられたようです。もし可能なら鯉をどこかに揚げて、三日間ほど鯉がいない状態にすれば霞ヶ浦は元に戻るという発想です。

それに関しましては、のちほどみなさんとディスカッションをしたいと思います。



こちらのデータは鶴見川水系の河水です。「汚い」と言う用語弊がありますが、下流域では場所によっては汚れがひどいところもありました。

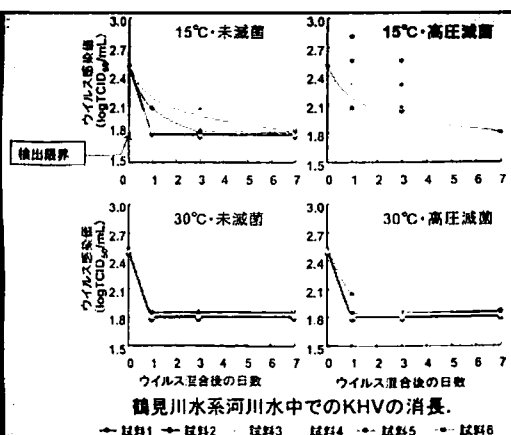
しかし、上流はかなり綺麗という感じでした。

水採取した一番から六番に向かうほど水質はよくなりました。いわゆる水質データだけなんですけど、上流の水が綺麗なところはヘルペスウイルスは少し長く生き続けますが、一般的な川の水質ですと三日でウイルスは検出されなくなつてしまつたり、つまり、不活化してしまひます。

この図は一五℃の場合です。三〇℃になりますと一日で検出限界を切つている。通常、二〇℃以上で病気は発症しますが、三日あればウイルスは死ぬんじゃないかと考えられます。しかし、微生物を全部殺してしまうと、ウイルスは比較的長く生存しています。皇居のお堀で鯉が死んだということがございました。私は知らなかつたんですが、お堀の水は下水処理場で処理されています。いろいろなところで処理水が使用されていますので、処理水が流れ込んで病気が発生すると困るというご相談を受けました。

つまり、処理場の活性汚泥の中でこのウイルスはどのくらい生き続けるのか、具体的に数字を出してほしいというリクエストがあつたのです。

鶴見川水系河川水中でのKHVの消長



鶴見川水系河川水採水地点の水質

鶴見川水系	鶴見川					
	天古橋	大崎橋	亀の子橋	大竹橋	都橋	地蔵橋
水温	14.6	14.7	14.2	12.9	12.3	17.4
pH	6.35	6.95	7.08	6.72	6.63	6.99
溶存酸素量	8.8	7.4	8	9.8	11.5	9.1
BOD	1.7	5.1	7.6	1.2	0.9	2.5
CODMn	6.1	7	7.4	4.4	2.6	5.9
SS	9	6	4	1	2	3
全窒素	7.6	9.17	9.76	11	5.11	6.01
全りん	0.38	0.57	0.41	0.11	0.03	0.51
アンモニア態窒素	1.61	1.47	2.2	0.52	<0.01	0.54
亜硝酸態窒素	0.29	0.43	0.66	0.16	0.02	0.15
硝酸態窒素	5.02	6.54	6.16	10.3	5.06	4.73
塩化カルシウム	3610	71.3	39.3	31.5	13.7	29.5
りん酸塩りん	0.33	0.51	0.36	0.08	0.02	0.49

鶴見川水系河川水採水地点の水質

下水処理場の活性汚泥中での
KHV感染価の消長

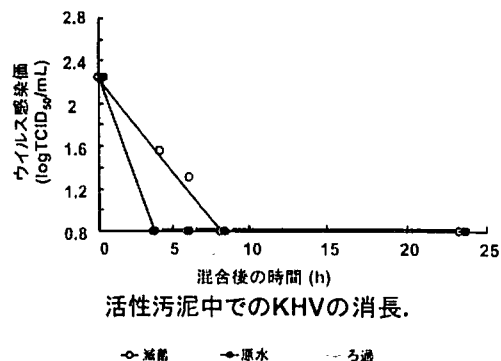
材料: 東京都下水道局で採取した活性汚泥
(エアレーションで状態保持)

方法: KHV液 試料 (原液・10倍液)

1:9の割合で混合

感染価を測定

反応温度: 20℃



塩素処理でさらにもう一回消毒されますから、この段階でウイルスが仮に死んでいれば安心感が得られるというご説明でした。

私は羽田空港で処理場の水を受け取って、函館に持ち帰って実験してみました。水温は二〇℃という条件が設定されたので、この水温で

感染価を測定しました。

そうしますと、原水ですと四時間でウイルスは検出されなくなりました。ということは、かなり早い時間でウイルスは死んでしまっているわけです。「この水を塩素処理すればまず大丈夫じゃないですか」という結論になりました。

実際に鯉がいて微生物が存在する水で試してみようと、函館市内の公園にあるお堀の水を汲んできました。水槽には八割程度の鯉が死ぬ量のウイルスを注入して、鯉を入れたらどうなるか。この状態で三日間放置して魚を入れたらどうなるかという実験を行いました。

環境水中でウイルスを3日間保持すると、ウイルスは本当に不活化するか？

飼育条件

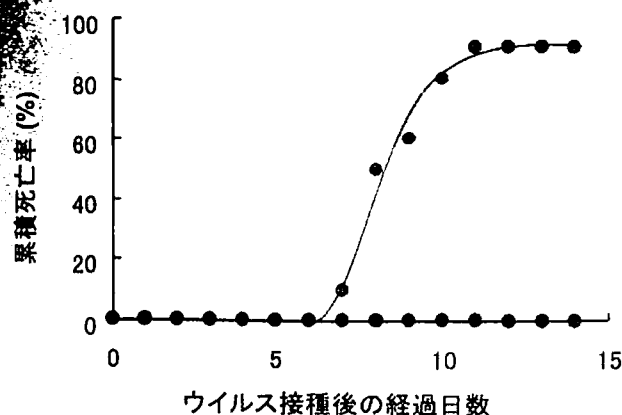
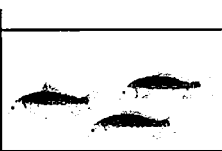
飼育期間: 14 days
温度: 21.0~23.6 °C
尾数: 10

魚入りの水槽に
直接添加

500 TCID₅₀/mL

ウイルス液を添加3日後に魚を投入

500 TCID₅₀/mL



五稜郭公園の堀の水にKHVを混ぜ
3日間保持した場合のコイの累積死亡率.

本研究で検討したKHV不活化法

物理的不活化法

- ・加熱
- ・紫外線

消毒薬による不活化法

- ・水産用イソジン
- ・次亜塩素酸
- ・オスパン
- ・エタノール

環境水およびコイの腸内容物から分離した細菌を対象とした抗KHV物質産生細菌のスクリーニング結果

試料	陽性菌数/供試菌株数
鶴見川の河川水	10/137
霞ヶ浦の湖水	0/47
コイの腸内容物	4/65

実験に使った鯉は、長野県水産試験場で隔離飼育されている鯉を送っていたいただきました。温度は二一℃から二三℃くらいに設定しました。

ウイルスを入れてすぐ鯉を入れると、累積死亡率は八〇パーセントになりました。ところが三日後に入れると、鯉は一尾も死なないという結果でした。

この結果だけで結論づけていいのかといわれると自信がありませんが、微生物がいてかつ鯉のいない水系を作ればウイルスはそんなに長く生きられないし、微生物生態系によってウイルスが死んでしまうのではないかと思います。

この結果をもとにして、たとえば釣堀の場合は魚を全部取り上げて、三日間放置したあとで消毒液を入れていただければいいと思います。

実験でわかった
五つのポイント

いろいろな微生物が存在する水中ではウイルスは長く生きられない。自然界の微生物生態系はうまくできています。また、病魚から出た直後のウイルス、もしくは粘液といっしょに出たウイルスはすごく感染性が

強いのですから、防疫体制を立てるときに両側面を考えればいいと思います。

ウイルスを確実に殺すには何℃で加熱すればいいのか、水を確保するときに紫外線でウイルスが殺せるのか、市販されている消毒薬でウイルスは殺せるのかという実験をしました。五〇℃・六〇℃・七〇℃で調べたところ、五〇℃で一分間ほど加熱処理したら検出限界以下でした。したがって五〇℃で一分間加熱処理するだけでいいことがわかりました。

紫外線を照射して九十九パーセント減らすには、表にあるように市販されている紫外線殺菌装置で十分対応できます。

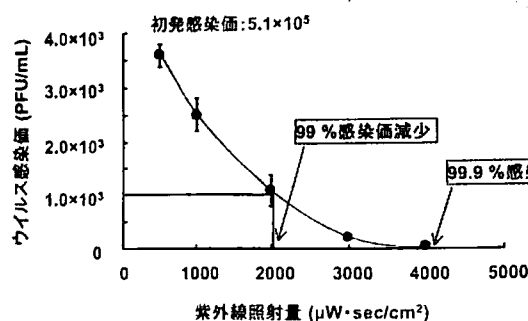
消毒薬について試験しました。消毒薬のラベルには二〇℃で三〇秒間ほど薬液の中に手を入れておくように書いてありますが、実際にはほとんどの人が一〇秒間程度しか手を浸けていません。また、消毒用の汲み置き槽に何秒間立ち止まっているかといえ、三〇秒間も立ち止まっていける人はまずいらいしませんね。できるだけ長く消毒していただきたい。

その結果は表の通りです。〇℃は

加熱処理後のKHV感染価

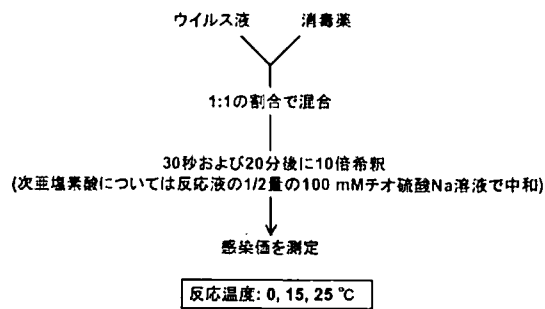
温度	ウイルス感染価 (PFU/mL)	
	対照区	1, 3, 5分
50℃	3.4×10^3	検出限界以下 (<5)
60℃	3.4×10^3	検出限界以下 (<5)
70℃	3.4×10^3	検出限界以下 (<5)

50℃, 1分の加熱処理で全て不活化



紫外線照射後のKHV感染価。

消毒薬によるKHV不活化効果判定試験法



供試消毒剤

商品名	正式名称	有効成分	販売元	原液中有効成分濃度
水産用イソジン	ポビドンヨード液	ポビドンヨード	明治製薬	10,000 mg/L
次亜塩素酸ナトリウム溶液	次亜塩素酸ナトリウム溶液	遊離塩素	和光純薬工業	50,000 mg/L
オスバン	塩化ベンザルコニウム液	塩化ベンザルコニウム	武田薬品工業	100,000 mg/L
エタノール	エタノール	エタノール	日本アルコール販売	100 %



余り必要ないのですが、北海道では冬場は消毒液が凍ってしまいます。「凍る直前は消毒効果があるのか」という質問を必ず受けるので、いつも0℃から調べています。

ご存知のように塩素は有機物があると壊れて有効成分が減ってしまいますので、「有効な濃度はどのくらいか」という数字が必要だと考えて調べてみました。

コイヘルペスウイルスと塩素液を混ぜてから最終的な濃度を調べて、三〇秒後・二〇分後の不活化率を求めました。その結果、〇・三 PPM

あればウイルスは殺せることがわかりました。

しかし、この数字ではどうも不安なので、安全率を考えて十倍すると三 PPM。この濃度にするためにはどのくらいの塩素を入れるといいのか。そのため大学構内にある池の水と、近くを流れている川の水をサンプルにして塩素濃度を測定しました。

その結果、一・二 PPM くらいの数字が出ました。実際の目安としては一〇〜一五 PPM の濃さになるように塩素を入れていただければいいように思います。しかし、使用する環境によって違いがありますから、実際に濃度を測定しながら使っていた方がいいと思います。

一般には一〇 PPM の濃度があれば安心ですが、大都市の真ん中でこの濃度の塩素を使うと「臭い」という苦情が出るそうなので、十分の一くらいなら大丈夫だろうと思います。

いままでお話ししたことをまとめる
と……、

(一) コイヘルペスウイルスはそんなに強いウイルスではない。

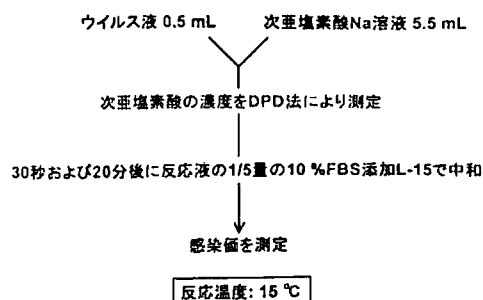
魚をすぐ殺しますが、環境中に

各消毒剤がKHVに対して99%以上の不活化率を示す最小濃度

消毒薬	処理時間	0 °C	15 °C	25 °C
水産用イソジン (mg/L)	30 秒	130	200	200
	20 分	200	200	200
次亜塩素酸Na (mg/L)	30 秒	>400	>400	>400
	20 分	200	200	250
オスバン (mg/L)	30 秒	60	60	30
	20 分	60	60	30
エタノール (%)	30 秒	40	40	30
	20 分	40	30	25

Kasai et al., (Fish Pathol., 40:137-138)

次亜塩素酸Na溶液によるKHV不活化効果判定試験法 (終濃度測定法)



実際に終濃度が 3.0 mg/L となるようにするには、計算上何 mg/L となるよう次亜塩素酸Na溶液を添加すればよいか？

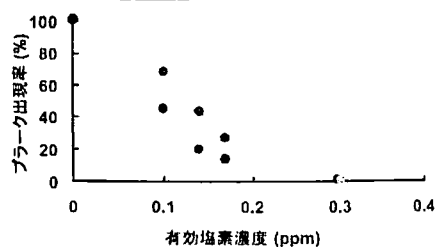
供試水

大学構内の金魚・メダカ飼育池3カ所
大学近くの河川水2河川

方法

有効塩素濃度が 3 mg/L となるよう供試水に次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加し、添加量を蒸留水に加えた場合の有効塩素濃度を測定して消費量を求めた。

	飼育池			河川	
	No.1	No.2	No.3	A	B
蒸留水に添加した場合	5.2	11.2	4.8	7.2	6.6
試料に添加した場合	3.4	2.9	2.8	3.0	2.7



次亜塩素酸によるKHV不活化効果。

○ 30 秒間 ● 20 分間

実用的には、その10倍量 (3 mg/L) が推奨される。

追加で検討した消毒剤の詳細

商品名	正式名称	有効成分	販売元	原液中 有効成分濃度
せいけつ君	DDAC含有 消毒剤	DDAC (ジデシルジメチルアンモニウムクロライド)	奥野薬品工業	100,000 mg/L
リバルス	AAC含有 消毒剤	AAC (アルキルアンモニウム化合物)	濃和薬品	200,000 mg/L
ハイエスト	エタノール 含有消毒剤	エタノール	濃和薬品	50 %
スケールスカット	過酢酸含有 消毒剤	過酢酸	奥野薬品工業	—

出たあとはサケ・マス類のヘルペスウイルスなどと同じようにどんどん死んでしまう。

(二) コイヘルペスウイルスの生存期間は三日間くらいが最長だと思われる。

それを確かめるため、ウイルスを混ぜた水を三日間放置したあと鯉を入れたが死ななかつた。うまく使えば利用できるような数字ではないかと考えています。

その根拠として、水中のバクテリアなどの微生物がウイルスを不活化させる能力があることがわかってき

要約

- ・KHV は湖水、河川水、底泥中において 1~3 日で不活化した。さらに KHV は活性汚泥中でも 1 日以内で不活化した。
- ・*in vivo* の試験においても、環境水中で 3 日間保持した KHV 懸濁水中でコイは死亡しなかつた。死亡魚からはウイルスが再分離・検出された。
- ・河川水およびコイの腸内容物から分離した細菌の中に抗 KHV 活性を示す細菌が存在した。
- ・KHV は 50 °C 以上、1 分間の処理で完全に不活化した。
- ・KHV は $4.0 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ の紫外線照射により 99.9 % 以上不活化された。
- ・KHV を不活化するのに要する各消毒液の有効成分濃度は、イソジンでは 200 mg/L、オスバンでは 60 mg/L、エタノールでは 30 % であった。
- ・次亜塩素酸ナトリウムでは、有効塩素濃度 200 mg/L の場合、15、25 °C での不活化率は 90 % 程度であったが、終濃度測定法では、有効塩素濃度 0.30 mg/L で不活化した。実用的には、その10倍量 (3 mg/L) が推奨される。

ました。サケ・マス類や異体類では抗ウイルス活性のある腸内細菌を餌と共に食べさせてお腹の中で抗ウイルス物質を産生させ病気を防ぐ試験を行なっています。鯉も同じことが可能じゃないかと思っています。

(三) 消毒に関しては 50 °C で一分間あればウイルスは殺せます。

〔日本魚病学会の講演内容を記事として編集したものです〕

(四) 紫外線殺菌は、市販されている一般的な殺菌灯で対応できます。

(五) 消毒液は市販されている商品で十分効果がある。

以上のような結論に達しました。