



Title	各種消毒剤の Oncorhynchus masou virus (OMV) 不活化効果
Author(s)	羽鳥, 秀一; 本西, 晃; 西澤, 豊彦 他
Citation	魚病研究, 38(4), 185-187 https://doi.org/10.3147/jsfp.38.185
Issue Date	2003-12-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53173
Type	journal article
File Information	article117.pdf



各種消毒剤の *Oncorhynchus masou virus* (OMV) 不活化効果

羽鳥秀一¹・本西 晃²・西澤豊彦¹・吉水 守^{1*}

(2003年 5月 6日受付)

Virucidal Effect of Disinfectants against *Oncorhynchus masou virus* (OMV)

Shuichi Hatori¹, Akira Motonishi², Toyohiko Nishizawa¹ and Mamoru Yoshimizu^{1*}

¹Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

²Suwa Branch of Nagano Prefectural Fisheries Experimental Station, Shimosuwa, Nagano 393-0034, Japan

(Received May 16, 2003)

ABSTRACT—Virucidal effects of six kinds of disinfectants were examined against *Oncorhynchus masou virus* (OMV), and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) and hiramavirus (HIRRV). At 15°C for 20 min, minimum concentrations showing 100% plaque reduction of OMV by iodophor, sodium hypochlorite solution, benzalkonium chloride solution, saponated cresol solution, formaldehyde solution and potassium permanganate solution were 40, 50, 100, 100, 3,500 and 16 ppm, respectively. Susceptibility of OMV against these disinfectants was higher than that of IPNV, IHN and HIRRV, suggesting that the usage of disinfectants against IPNV and/or IHN is also effective against OMV.

Key words: virucidal effect, *Oncorhynchus masou virus*, disinfectant, OMV, fish virus

Oncorhynchus masou virus (OMV) による感染症は、近年では本州中部のニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) 主産県下で大きな問題となっており¹⁾、ニジマスにみられる本感染症は、出荷サイズの魚が大量に死亡するため被害が大きい。そこで本研究では、OMV 防除対策の確立

を目的に、ポピドンヨード液、次亜塩素酸ナトリウム液、塩化ベンザルコニウム液、クレゾール石ケン液、ホルムアルデヒド液、過マンガン酸カリウム溶液の *in vitro* における OMV に対する不活化効果について検討した。

ウイルスとして OMV OO-7812株 (サクラマス由来)、魚類ラブドウイルスである IHN ChAb-7601株および HIRRV H8401-H株および魚類ビルナウイルスである IPNV VR-299株を供した。OMV, IHN および IPNV は CHSE-214 細胞で、HIRRV は EPC 細胞で培養し、0.45 μm フィルターで濾過した後、実験に供するまで -80°C に保存した。なお、両細胞は 10% 牛胎児血清、ペニシリン 100 IU/mL (Sigma)、ストレプトマイシン 100 μg/mL (Sigma)、トリス緩衝液 (8 mM Tris-HCl, pH 7.8) および 0.075% NaHCO₃ を含む Eagle's MEM (Gibco) を用い、15°C で培養した。また、消毒剤はハロゲン系消毒剤としてポピドンヨード液 (有効ヨウ素 50 ppm, 水産用イソジン®, 明治製菓) と次亜塩素酸ナトリウム液 (和光純薬工業) を、界面活性剤として塩化ベンザルコニウム液 (10% 水溶液, オスバン®, 武田薬品工業) を、フェノール系消毒剤としてクレゾール石ケン液 (ヤクハン製薬) を、アルデヒド系消毒剤としてホルムアルデヒド液 (和光純薬工業) を、過酸化系消毒剤として過マンガン酸カリウム溶液 (和光純薬工業) を用いた。なお、ホルムアルデヒド液、クレゾール石ケン液および塩化ベンザルコニウム液は公称含有量換算で、ポピドンヨード液は公称有効ヨード濃度換算で、次亜塩素酸ナトリウム液は実測有効塩素量で、また過マンガン酸カリウム溶液は純度換算で示した。

まず、供試消毒剤を再蒸留水で所定の濃度に調整した後、0.45 μm フィルターで濾過し、あらかじめ Hanks' balanced salt solution (HBSS) で 2,000 あるいは 3,000 PFU/200 μL に調整したウイルス液と等量混合し、0°C、15°C および 25°C で 30 秒間または 20 分間反応させた。消毒剤の細胞毒性を軽減させるため、反応液を HBSS で 10 倍に希釈し、24 穴プレートに培養しておいた細胞に 200 μL/well ずつ 2 穴に接種し、プラーク法²⁾ で反応液のウイルス感染価の減少率を求めた。なお、次亜塩素酸ナトリウム液は、ウイルスと反応させた後、混合液の 1/2 量の 0.01 M チオ硫酸ナトリウムで中和した後 HBSS で 10 倍希釈し、ウイルス感染価を求めた。対照区は、薬剤液にかえて HBSS を加え、同じ温度に所定時間おいた。

OMV を完全に不活化した (プラーク減少率: 100%) 各種消毒剤の最小濃度を Table 1 に示した。なお、OMV を 25°C で 20 分間静置した場合、対照区でもプラーク減少率が 80% 以上であったため実験結果から削除した。反応条件が 15°C・20 分間の場合、ポピドンヨード液、次亜塩素酸ナトリウム液、ベンザルコニウム液、クレゾール石ケン液、ホルムアルデヒド液および過マンガン酸カリウ

¹ 北海道大学大学院水産科学研究科 水圏細胞工学研究室

² 長野県水産試験場諏訪支場

* Corresponding author

E-mail: yosimizu@fish.hokudai.ac.jp

Table 1. Minimum concentration of disinfectants to show the 100% plaque reduction of OMV at different temperature and reaction time

Disinfectant	Reaction time	Concentration of disinfectant (ppm)		
		0°C	15°C	25°C
Iodophor	30 s	40	40	40
	20 min	40	40	NT
Sodium hypochlorite	30 s	100	100	100
	20 min	50	50	NT
Benzalkonium chloride	30 s	100	100	100
	20 min	100	100	NT
Saponated cresol	30 s	500	500	500
	20 min	100	100	NT
Formaldehyde	30 s	3,500	3,500	700
	20 min	3,500	3,500	NT
Potassium permanganate solution	30 s	32	16	16
	20 min	16	16	NT

NT: Not tested.

ム溶液の各消毒剤が OMV を完全に不活化する最小濃度は、各々40, 50, 100, 100, 3,500および16 ppmであった。次亜塩素酸ナトリウム液およびクレゾール石ケン液では、反応時間の短縮により消毒効果の減少が認められ、反応時間30秒の場合、20分間に比べ2倍および5倍濃度の消毒剤が必要であった。これに対しホルムアルデヒド液は、反応温度25°C・700 ppm・30秒で OMV が完全に不活化され、反応温度の上昇により消毒効果の増大が認められた。また過マンガン酸カリウム溶液では、反応時間の短縮および反応温度の低下による消毒効果の減少が認められた。

次に、OMV, IHN, HIRRV および IPNV の感染価を

90%以上減少させるに要する各種消毒剤の最小濃度を求めた (Table 2)。ポピドンヨード液、ホルムアルデヒド液およびクレゾール石ケン液に対する OMV の感受性は IHN, HIRRV あるいは IPNV に比べ高かった。しかし、次亜塩素酸ナトリウム液、塩化ベンザルコニウム液および過マンガン酸カリウム溶液に対する OMV の感受性は、他のウイルスとほぼ同様であった。

最後に、有機物存在下での各種消毒剤のウイルス効果について検討するために、所定の濃度に調整した各種消毒剤にペプトン (BACTO™ peptone, DIFCO) を終濃度が0.1あるいは1.0%となるよう添加し、前述同様にウイルス液と反応させた後ウイルス感染価の減少率を求めた。OMV に対しホルムアルデヒド液では、0.1および1.0%ペプトン存在下でのプラーク減少率が各々89および92%となり、有機物存在下でも不活化効果に減少は認められなかった。しかしながら、ポピドンヨード液では、ペプトン1.0%存在下でのプラーク減少率が0%で、その他の消毒剤においても0.1%ペプトン存在下でのプラーク減少率は5%以下となり、有機物存在下でのウイルス不活化効果の減衰が認められた。一方、IHN, HIRRV および IPNV に対しては、塩化ベンザルコニウム液、クレゾール石ケン液およびホルムアルデヒド液は、有機物存在下でもウイルス不活化効果の減衰が認められなかったが、次亜塩素酸ナトリウム液および過マンガン酸カリウム溶液では有機物存在下でウイルス不活化効果が大幅に減衰した。

本実験で得た IHN の消毒剤感受性結果は、井上ら^{3,4)} および栗田ら⁵⁾ の結果にほぼ一致していた。一方、本実験結果では HIRRV の感受性が IHN に比べ5~10倍程度低かったが、木村・吉水^{*1)} の報告では HIRRV の

Table 2. Minimum concentration of disinfectants to show the 90% plaque reduction of OMV, IHN, HIRRV and IPNV at different temperature and reaction time

Disinfectant	Reaction Time	Concentration of disinfectant (ppm)							
		OMV		IHN		HIRRV		IPNV	
		0°C	15°C	0°C	15°C	0°C	15°C	0°C	15°C
Iodophor	30 s	40	40	100	100	100	100	200	100
	20 min	40	40	100	100	100	100	100	100
Sodium hypochlorite	30 s	50	50	50	50	50	50	100	100
	20 min	1	1	50	10	50	50	100	100
Benzalkonium chloride	30 s	100	100	200	200	200	1,000	ND*	ND
	20 min	100	100	200	100	100	100	ND	ND
Saponated cresol	30 s	100	100	500	100	1,000	500	5,000	ND
	20 min	100	100	100	50	500	500	5,000	ND
Formaldehyde	30 s	700	700	3,500	3,500	3,500	3,500	3,500	3,500
	20 min	700	350	3,500	3,500	3,500	700	3,500	700
Potassium permanganate solution	30 s	16	16	160	160	160	160	32	32
	20 min	16	16	32	16	16	16	16	16

*ND: Not determined.

感受性は IHNV より 5 ～20 倍程度高いとしている。また、木村・吉水^{*1)} の示した IPNV のポピドンヨード液および次亜塩素酸ナトリウム液に対する感受性は、本実験結果に比べ20倍程度高かった。この様に、ラブドウイルスやアクアビルナウイルスの消毒剤に対する感受性については、報告者により若干の差異が認められるが、これはウイルス懸濁液中の有機物濃度に起因すると考えられる。すなわち、実験に供するウイルスを調整する際、ウイルス懸濁原液には10%程度の FBS が有機物として存在することが一般的である。IPNV のように感染価の高いウイルスは、高倍率に希釈し実験に供するため FBS の影響を受けづらいが、OMV のように感染価の低いウイルスは希釈倍率が低いため、残存する FBS が消毒効果に影響する可能性が高いと考える。事実、ポピドンヨード液および次亜塩素酸ナトリウム液など有機物の影響を受けやすい消毒剤においては、報告結果にばらつきが認められる^{3-8, *2, *3)}。

以上の結果から、OMV の各種消毒剤に対する感受性は IHNV に比べ何れも高かったことから、IHNV に対す

る防除対策を実施することで OMV に対しても十分な防除効果が期待できることが明らかになった。すなわち、従来実施してきたポピドンヨード液による発眼卵および施設の消毒に加え、受精直後卵の消毒を行うと共に、OMV 伝播経路として重要な作業者の手足の消毒、衣類やおく屋の消毒に次亜塩素酸ナトリウム溶液、塩化ベンザルコニウム液、クレゾール石けん液、ホルムアルデヒド液を有効に使用すべきであろう。

文 献

- 1) 降幡 充・細江 昭・竹居 薫・小原昌和・中村 淳・本西 晃・吉水 守 (2003) : 魚病研究, **38**, 23-26.
- 2) Kamei, Y., M. Yoshimizu and T. Kimura (1987) : *Fish Pathol.*, **22**, 147-152.
- 3) 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史 (1991a) : 魚病研究, **26**, 189-194.
- 4) 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史 (1991b) : 魚病研究, **26**, 195-200.
- 5) 栗田 潤・飯田悦左・中島員洋・井上 潔 (2002) : 魚病研究, **37**, 175-181.
- 6) Amend, D. F. and J. P. Pietsh (1972) : *J. Fish. Res. Board. Can.*, **29**, 61-65.
- 7) Elliott, D. G. and D. F. Amend (1978) : *J. Fish Biol.*, **12**, 277-286.
- 8) 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史 (1990) : 魚病研究, **25**, 81-86.

*1) 木村喬久・吉水 守 (1990) : 平成元年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 20 pp.

*2) 山崎隆義・佐々木 治雄・田代文夫 (1976) : 長野県水試研報, 魚病, 28-44.

*3) 佐々木 治雄・本西 晃・三城 勇・山崎正幸・山崎隆義 (1976) : 長野県水試研報, 魚病, 45-48.