電気分解陽極水によるウシコロナウイルスの不活化

松本光代・大塚美奈・鈴木祐子・福井宏行・町田季衣子・向井孝夫・大堀 均

北里大学獣医畜産学部，十和田市 034-8628

(2004. 6. 18 受付, 2004. 9. 14 受理)

要 約 ウシコロナウイルス (BCV) は主な牛下痢症を発症し，また牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) はウシに重篤な粘膜病を発症する可能性を持った病原体で，どちらも家畜飼育現場からの根絶が困難なウイルスである．本研究では消毒剤の新たな候補として電気分解陽極水の BCV および BVDV に対する不活化効果を検討した．電気分解陽極水は 0.12% の NaCl を含む水を電気分解して調製した．電気分解陽極水で 1 分間処理した両ウイルスを牛腎細胞に接種し，細胞上清の赤血球凝集反応もしくは細胞内 RNA の RT-PCR によって，ウイルスの存在を検討した．その結果，電気分解陽極水で処理したウイルスは細胞内および培養上清から検出されなかった．本研究で調製した電気分解陽極水は，低 pH 値 (3.0 前後) であり，低濃度 (7.0~20.0 ppm) の遊離形有効塩素 (EC) を含むことが示された．BCV の増殖は EC を含まない低 pH 溶液あるいは低濃度の EC を含むが高 pH 値 (9.0 以上) を示す溶液による各処理では阻害されなかったことから，電気分解陽極水のウイルス不活化は pH と EC の相乗効果によるものと推察された．

日本畜産学会報, 76 (1) : 59-65, 2005

ウシコロナウイルス (BCV) は乳牛および肉牛群の子牛に重篤な下痢症を引き起こすウイルスとして知られ (Mebus ら 1973 ; Crouch と Acres 1984)，また成牛における冬季赤痢の主な病原ウイルスである (Saif ら 1988)．本ウイルスに対する特異的中和抗体は無症候状態にある成牛の約 70% の血清や糞便から検出されるが (Clark 1993)，BCV は年間を通して分離されている (Crouch ら 1985)．このことから BCV は無症候期間を通して持続感染している可能性が考えられている．現在，本ウイルスの感染予防法としてはワクチン接種の試みがなされ，接種牛の血清中抗体価は上昇するが感染部位における粘膜からの IgA 分泌には至らないことも報告されている (Heckert ら 1991)．さらに，ヒト幼児への BCV 感染の報告 (Zhang ら 1994) および BCV と同じ抗原型に属するヒトコロナウイルスの human respiratory coronavirus-OC43 (HCoV-OC43) の遺伝子が BCV と *in vivo* で組み換えを起こしているという Wu ら (2003) の報告は，BCV が人獣共通感染症になり得る可能性を推察させるものである．また最近，重症急性呼吸器症候群 (SARS) 患者から分離され，その遺伝子配列から BCV と同属のコロナウイルス科に分類された SARS ウイルス (Holmes 2003) は，正確な宿主の起源はいまだ不明であるものの，動物からヒトへの感染が疑われており (Enserink 2003)，コロナウイルスは人獣共通に感染する可能性を秘めたウイルスであると考えられる．

一方，牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) はフラビウイルス科ペスチウイルス属に分類されるウイルスで，抗原性の類似した異なるバイオタイプ，すなわち培養細胞に細胞変性を示す CP 型とそれを示さない NCP 型の 2 型が存在する．NCP 型の持続感染牛に CP 型のウイルスが重感染すると重篤な粘膜病を併発することが多い (Meyers と Thiel 1996)．わが国においても 1975 年に北海道の十勝地方での流行が記録されており，その致死率は 50% に及んでいる (Inui ら 1978)．また NCP 型 BVDV に感染した母牛において子宮内感染したウシは BVDV に対して免疫寛容となる (McClurkin ら 1984)．このような持続感染牛は粘膜病を誘発する危険性を高めるだけでなく，乳中からもウイルスが検出され (Radwan ら 1995 ; Drew ら 1999)，群の感染源となる (Houe 1995)．実際，持続感染牛が 1~2% 存在する牛群ではその 60~80% が BVDV 抗体陽性すなわち感染の拡大がみられるとの報告がある (Houe 1999)．したがって，本ウイルスの除去には持続感染牛の摘発淘汰がもっとも重要であるが，通常症状をほとんど示さない持続感染牛の摘発は難しい．また，現在 BVDV の感染予防にはワクチン接種が用いられているが，本ウイルスに対する免疫寛容牛にとってその効果は無効であり，生ワクチンの場合応々にして接種牛で粘膜病が惹起されたりする事故例の報告もある (Becher ら 2001)．

このように BCV および BVDV はどちらも飼育現場に

連絡者：向井孝夫 (fax : 0176-23-8703, e-mail : mukai@vmas.kitasato-u.ac.jp)

常在しているウイルスでありながら、ワクチン接種を中心とした現行予防法では牛群内から根絶させることの困難なウイルスである。これらウイルスの感染予防にとって、より有効なワクチン等の開発が今後なお重要な課題であることは当然のことながら、畜舎の消毒などによって少なくともこれらウイルスの水平感染を制御していくことが、現段階における予防のための有効策ではないかと考える。そこでわれわれは家畜およびヒトに無害で、これらのウイルスを不活化できる消毒剤として、細菌およびウイルスの不活化剤としてすでに一部医療現場で使用されている電気分解陽極水に注目した。

これまで、コロナウイルスをはじめとする他の家畜に感染発症するウイルスに対する電気分解陽極水の不活化効果についての報告はなく、本研究では電気分解陽極水によってBCVおよびBVDVの不活化効果が得られるか否かを調査すること、および電気分解陽極水の特徴の中でも主にウイルス不活化効果を示すと考えられる低pHもしくは遊離形有効塩素（EC）の濃度に対するBCVの影響を検討することを目的とした。

材料および方法

1. ウイルスおよび細胞

供試ウイルスであるBCV Kakegawa株（Akashiら1980）およびBVDV Nose株（genotype 1a, Kodamaら1974）は日本全薬工業株式会社（郡山）から分与された。

細胞は牛腎細胞（MDBK細胞, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA）を用い、 1.4×10^4 細胞を48穴マイクロプレートに播種し、10%（v/v）ウシ胎児血清（FBS）および50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシン（Gibco BRL, Grand Island, NY, USA）を添加したイーグル最小必須培地（MEM；Sigma, St. Louis, MO, USA）でコンフルエント培養期になるまで培養した。ウイルス接種は細胞をリン酸緩衝液（PBS, pH 7.4）で1回洗浄した後、各試験溶液で処理したウイルス溶液100 μl を細胞に添加し、37℃の5% CO_2 培養器内で90分間吸着させた。その後、未吸着のウイルスを除くために細胞をPBSで1回洗浄し、500 μl の維持培地（5% FBS含有MEM）で3～6日間培養した。両ウイルスの感染価はReedとMuench法（1938）に従って50%組織培養感染価（TCID₅₀）/mlとして算出した。

2. 各試験溶液の調製

電気分解陽極水は終濃度0.12%の塩化ナトリウム含むイオン交換蒸留水（DW）を市販の隔膜式電気分解強酸性水生成装置（AQUA-21, Club More International Co, 東京）を用いて10分間電気分解することによって調製した。電気分解陽極水の性状については、水素イオン濃度指数（pH）、酸化還元電位（ORP）およびEC濃度を測定した。pHおよびORPの測定にはion/pH meter IM-22 P（TOA, 東京）を用いた。EC濃度はジエチル-p-フェニ

レンジアミンによる吸光光度法によって測定した（Clesceriら1998）。

低pH溶液として塩酸をDWに添加することでpHを2.6に調整した溶液、および電気分解陽極水に5%チオ硫酸ナトリウムを100:1で添加することでpHを調整した溶液を用いた。高pH溶液は電気分解陽極水に1%アンモニアを100:1で添加することで調製し、実験に供した。なお、アンモニア添加溶液のEC濃度は5.6～9.0 ppm内にあり、電気分解陽極水のEC濃度の下限値に相当していた。さらに、pHおよびEC濃度を共に調整した溶液（pH・EC濃度調整溶液）は、DWに塩酸を添加することによってpHを5.0および3.0に調整し、次亜塩素酸ナトリウムを添加することによってEC濃度を10.0, 20.0, 30.0, 40.0および50.0 ppmに調整した。

3. 各試験溶液によるウイルス処理

BCVおよびBVDV溶液100 μl を各試験溶液900 μl に加え、室温で1, 5, 10分間静置後、それぞれをMEMで10倍に希釈し、試験溶液処理ウイルス液とした。コントロールとして各試験溶液の代わりにDWを用い、同様の処理を行った。なお、この時実験に用いたBCVおよびBVDVの感染価はそれぞれ $10^{6.25}$ および $10^{5.15}$ TCID₅₀/mlであった。

4. 細胞上清および細胞内におけるウイルスの検出

ウイルス不活化の評価は、各試験溶液処理前後のウイルス溶液を細胞に接種してから4日間の培養上清中に放出されたウイルスを赤血球凝集（HA）反応によって経時的に測定すること、あるいは6日後の細胞内ウイルス遺伝子をreverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）によって検出することにより行った。HA反応は培養上清の2倍段階希釈を作製し、0.8%（v/v）グルタルアルデヒド固定化マウス赤血球を用いて行い、HA価はHAを示した最高希釈倍数で示した。RT-PCRは下記のように行った。すなわち、ウイルスを接種したMDBK細胞の総RNAをIsogen（Nippon Gene Co., 東京）を用いて調製し、cDNA合成にはreverse transcriptase SuperScript II（Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA）を用い、PCRにはExTaq DNA polymerase（Takara, 東京）を用い94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で1分間を30サイクル行った。この際、BCVのcDNA合成には3'末端非翻訳領域（3'UTR）遺伝子に特異的なプライマー3UF（5'-GAGAATGAACCTTATGTCGGCAC-3'）を用い、PCRには同じく3'UTR遺伝子に特異的なプライマーである3UFとNR（5'-GTGATTCTTCCAATTGGCC-ATAATTAACCTTCATTCA-3'）を用いて285塩基のBCV遺伝子の増幅を試みた。

同様にBVDVの検出には、ウイルスRNAの中でもBVDV間でよく保存されているNS2-3領域内の299塩基を標的とし、cDNA合成にはプライマーNS23F（5'-GAGATGGTCAAGATAAC-3'）を用い、PCRにはプライ

マー NS23F および NS23R (5'-TTTGGTTGAGGCATT-TGGCA-3')を用いた。また、BCV および BVDV とともにコントロール遺伝子として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子の mRNA を抽出し、RT-PCR によってプライマー (GPF, 5'-GAAGGTGAAGGTC-GGAGTC-3'; GPR, 5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3')を用いて 226 塩基の遺伝子を増幅した。

結 果

1. BCV および BVDV 不活化に対する電気分解陽極水の効果

電気分解陽極水の BCV および BVDV 不活化効果を調べる前に、MDBK 細胞に対する電気分解陽極水の細胞毒性評価を行った。電気分解陽極水および MEM で希釈した電気分解陽極水をコンフルエント培養期の MDBK 細胞と 90 分間反応させた後、除去し、新鮮な培地を加え培養した。72 時間後、細胞をトリパンブルーによって染色し、顕微鏡下で生細胞数を計数した。その結果、電気分解陽極水を 10 倍以上希釈した時 (pH: 7.0~8.0, EC 濃度: <2.0 ppm, ORP: 600~500 mV) 生細胞数に有意な差はみられず、MDBK 細胞に対する毒性は全く示さないことを確認した。

さらに、本研究で用いた BCV Kakegawa 株は牛胎児腎細胞 (BEK-1 細胞) を用いて分離されており (Akashi

ら 1980), MDBK 細胞は通常このウイルスの増殖に使用していないことから、 $10^{6.25}$ TCID₅₀/mL の Kakegawa 株を電気分解陽極水の代わりに DW で処理をし、MDBK 細胞に接種して 4 日間の細胞上清中の HA 価を経時的に測定し、MDBK 細胞での Kakegawa 株の増殖能を検討した。その結果、図 1 に示したように、細胞上清中の HA 価は、感染後 48 時間において上昇がみられた (○)。そこで同様の方法で、電気分解陽極水の BCV 不活化効果について検討したところ、96 時間後においても HA 価は検出限界以下であった (●)。さらにウイルス感染後 6 日目の感染細胞内ウイルス遺伝子の検出を RT-PCR 法によって行ったところ、図 2A に示したとおり BCV 遺伝子は増幅されなかった。なお、電気分解陽極水とウイルスの反応時間を 1, 5, 10 分間と変えて BCV 不活化効果の検討を行ったが、1 分間処理においてすでにウイルスの感染性は完全に消失し、10 分間処理におけるウイルスの不活化効果との間に差が見られなかったことから、図には 1 分間処理の結果についてのみ表示した。

また、電気分解陽極水の BVDV に対する不活化効果についても RT-PCR 法を用いて BCV と同様に検討したところ、図 2B に示したように BVDV 遺伝子は増幅されず、電気分解陽極水が 1 分間で完全に BCV と BVDV を不活化することが確認された。

2. 電気分解陽極水の希釈液がウイルス不活化におよぼす影響

Fig. 1. Effect of electrolyzed anode-side water on BCV proliferation in MDBK cells. An aliquot amount of virus ($10^{6.25}$ TCID₅₀/mL) was treated with electrolyzed anode-side water or ion-exchanged-distilled water at room temperature for 1 min. Then, viruses were inoculated into MDBK cells by 10-fold dilution with MEM as described in Materials and Methods. Virus treated with electrolyzed anode-side water (●) and ion-exchanged-distilled water (○) was determined by HA method every 12 hours after infection. Data represent mean values ($\pm$ SD) of three independent experiments.

Fig. 2. Effect of electrolyzed anode-side water on BCV (A) or BVDV (B) proliferation in MDBK cells. Viruses in culture fluids were detected by amplifying viral genome by RT-PCR method (see Materials and Methods). GAPDH mRNA was detected as the cellular standard RNA. Lanes 1, mock-infected cells (cells treated with electrolyzed anode-side water); 2, cells infected with intact viruses; 3, cells infected with viruses treated with electrolyzed anode-side water.

指標ウイルスとして BCV を用い、ウイルス不活化に及ぼす電気分解陽極水の希釈の影響を調べた。DW で電気分解陽極水濃度を 80% および 50% に希釈した溶液での不活化を試みたところ、80% まではウイルスの増殖を抑制したが、50% では上清の HA 価が上昇し、抑制効果はみられなくなった (表 1)。同時に、細胞内ウイルス遺伝子も 50% 希釈溶液では検出された (図には示さない)。実験に供した希釈溶液の pH, ORP および EC 濃度を表 1 に併記したが、電気分解陽極水濃度を 50% に希釈することによって、EC 濃度も希釈され、pH 値は若干上昇し、ORP 値は若干低下する傾向が見られた。なお、HA 反応で十分 BCV を検出することが可能であったので、以降の検討では HA 価のみをウイルス不活化の評価の対象とした。

3. ウイルス不活化における電気分解陽極水の作用因子

表 1 に示したとおり、電気分解陽極水の pH は 3.0 前後を示したので、電気分解陽極水のウイルス不活化が低 pH による効果であるかを調べるために、EC を含まない低 pH 溶液を新たに調製し、ウイルス不活化効果を調べた。すなわち、DW に塩酸を添加することで pH 2.6 に調整した溶液および電気分解陽極水へ 5% チオ硫酸ナトリウムを添加することによって EC を中和した低 pH 溶液を調製し、実験に供した。その結果、表 2 に示したように EC を含まない低 pH 溶液では HA 価の低下、すなわちウイルスの不活化効果は見られず、ウイルス不活化が低 pH によるものではないことが示された。一方、電気

分解陽極水に 1% アンモニアを添加し、pH を 8.9~9.9 に調整した溶液を調製した。この溶液は EC を 5.6~9.0 ppm 含んでいたにもかかわらず、HA 価の減少がみられなかった。これらの結果から、電気分解陽極水のウイルス不活化効果は pH と適切な濃度の EC に依存して発揮されていることが推察された。

4. pH - EC 濃度調整溶液のウイルス不活化効果

pH 値を 3.0, 5.0 および 9.0 前後に調整し、EC を 10.0~50.0 ppm に調整した溶液 (pH - EC 濃度調整溶液) のウイルス不活化効果を検討した。その結果、表 3 に示したように pH 9.0 以上および EC 濃度 40.0 ppm 以下では HA 価が検出され BCV の不活化効果は示されなかった。しかし、pH を 5.0 もしくは 3.0 に調整した場合、EC 濃度が 10.0 ppm といった低濃度でも BCV が不活化することが判明した。以上より、電気分解陽極水によるウイルスの不活化は低 pH 下における低濃度の EC の存在によって生じているものと示唆された。

考 察

図 1 と 2 に示したように、本研究から電気分解陽極水が BCV と BVDV を不活化することが判明した。電気分解陽極水は強酸性次亜塩素酸水として食品添加物にも指定されており (食品衛生法執行規則別表第二中第 125 号, 平成 14 年), その場合の定義は 0.2% 以下の NaCl 水溶液を有隔膜電解槽内で電解して陽極側から生成したもので、EC 濃度は 20.0~60.0 ppm, pH 2.2~2.7 および ORP は 1,100 mV 以上であると定義されている。本研究

Table 1. Effect of diluted electrolyzed anode-side water on BCV proliferation

% of electrolyzed anode-side water	HA titer (±SD)	pH	ORP ¹ (mV)	ECC ² (ppm)
100	0.0 (± 0.0)	2.9-3.2	1103-1122	7.8-20.0
80	0.0 (± 0.0)	3.0-3.5	1100-1048	6.2-16.0
50	26.7 (± 9.2)	3.2-3.7	1072-1022	3.9-10.0
0	42.7 (±18.5)	5.4-5.9	416- 754	0.0

¹ ORP : oxidation reduction potential.

² ECC : free effective chlorine concentration.

Table 2. Effect of pH- or ECC¹-adjusted water on BCV proliferation

Type of solution	pH	ECC (ppm)	HA titer (±SD)
HCl-distilled water	2.6	0.0-0.0	32 (±0.0)
Adjusted with sodium thiosulfate ²	2.8-3.7	0.0-0.0	32 (±0.0)
Adjusted with ammonia ³	8.9-9.9	5.6-9.0	42.7 (±18.5)

¹ ECC : free effective chlorine concentration.

² Five % sodium thiosulfate was diluted 1 : 100 in electrolyzed anode-side water.

³ One % ammonia was diluted 1 : 100 in electrolyzed anode-side water.

Table 3. Effects of pH- and ECC¹-adjusted water on BCV proliferation

pH	ECC (ppm)	HA titer (±SD)
9.1-9.6	20.0	32 (±0.0)
	30.0	32 (±0.0)
	40.0	6.7 (±2.3)
	50.0	0.0 (±0.0)
	10.0	0.0 (±0.0)
5.0	20.0	0.0 (±0.0)
	30.0	0.0 (±0.0)
	10.0	0.0 (±0.0)
3.0	20.0	0.0 (±0.0)
	30.0	0.0 (±0.0)

The pH value was adjusted with HCl and ECC was adjusted with sodium hypochlorous acid.

¹ ECC : free effective chlorine concentration.

に用いた電気分解陽極水は食品添加物認定を受けたものと比較して pH が 0.2～1.0 高く、EC 濃度が 0.0～52.2 ppm 低い値を示したが、それでも十分にウイルス不活化効果を示した。

BCV は幼獣下痢症の病原となるだけでなく冬季に集中して流行する赤痢の病原である (Takahashi ら 1980)。BCV による幼獣下痢症には母牛へのワクチン接種が効果的で受動免疫が増強されるが、その抗体価は分娩後急激に低下する (Kohara ら 1997)。また、移行抗体によって子牛の血清中における抗体価が増強されても BCV のように腸管局所の感染症の場合その感染を完全に防御するのは困難であると考えられる。一方で弱毒化生ワクチンによる免疫失敗例が報告され、その原因は弱毒化したウイルスの接種では感染増殖の場である粘膜においてほとんど抗体が産生されないことにあった (Kapil ら 1994)。これらのことから BCV に対する効果的なワクチンを考えるならば粘膜免疫を惹起させることが重要であると思われ、その試みとなる研究も行われている (Baca-Estrada ら 1995, 1997)。

BVDV は異なるパイオタイプの重感染によってウシに致死性の高い粘膜病を惹起する。BVDV の感染防御には不活化および弱毒化生ワクチンが用いられている。BVDV は子宮内感染するが弱毒化生ワクチン接種によって胎児への感染は高効率で阻害される (Covács ら 2003)。しかし一方で弱毒化生ワクチンは免疫寛容牛には効果が無く、さらに粘膜病を惹起する要因となり得る可能性が危惧されている (Ridpath と Bolin 1995 ; Becher ら 2001)。感染症の個体への予防を考えるとワクチンによる免疫の増強が期待されるが、上述したように BCV および BVDV において現行ワクチンによる完全防御の可能性は低く、ワクチンと併行して畜体および畜舎

等の衛生管理が重要となるであろう。

電気分解陽極水は単純ヘルペスウイルス (HSV-1) を不活化することが報告されている。HSV-1 では塩酸で pH を 2.68 に調整した単なる低 pH 溶液でも不活化されることから、この効果は電気分解陽極水の低 pH によるものであると考えられている (清水 1994)。本研究において BCV における不活化因子を検討したところ、表 1 および 2 に示したように、低 EC 濃度を示す低 pH 溶液もしくは EC を含まない単なる低 pH 溶液では不活化されないことから、本ウイルス不活化には EC の関与が必須であることが推察された。しかし、アンモニア添加電気分解陽極水はおよそ 5.0～9.0 ppm の EC 濃度を示したにもかかわらず、BCV を不活化しなかった (表 2)。アンモニア添加溶液の pH は 9.0 前後を示したことから、BCV の不活化には EC 濃度に加え pH 値も影響を及ぼすものと考えられた。そこで、pH - EC 濃度調整溶液による BCV 不活化を試みたところ、表 3 に示したように pH が 9.0 以上の場合、電気分解陽極水と同様程度の EC 濃度 (20.0 ppm 以下) を示す溶液でも BCV は不活化されず、pH が 3.0 の場合、BCV は電気分解陽極水と同様程度の EC 濃度を示す溶液で、不活化されることが判明した。これらの結果から、電気分解陽極水は低 pH 値を示し、7.0 ppm 以上の EC 濃度を示すため BCV 不活化効果を示すものと考えられた。さらに、水中における EC (Cl_2 , HClO および ClO^-) は pH によってその存在比が変化すると報告されており (土井 2002)、pH 値がアルカリ側の場合、EC の 90% 近くは ClO^- の形で水溶液中に存在しているのに対し、pH 3.0 では 90% 近くが HClO であり、その他は Cl_2 の形で存在し、また HClO は pH 4.0～5.0 付近の溶液でその存在比はほぼ 100% となる。表 3 に示したように、pH 5.0 においても BCV は電気分解陽極水と同程度の EC 濃度で不活化されたことから、BCV の不活化には EC の中でも HClO の濃度に強く依存して発揮されている可能性が考えられた。

電気分解陽極水は本研究で示したウシに下痢などの病症を示す BCV および BVDV 以外にも、下痢の原因菌の一つである大腸菌等いくつかの細菌およびウイルスに対して死滅させる能力を有するが、ウイルスに対する作用機序についての詳細は不明である (Hotta ら 1994 ; 奥田 1994 ; 清水 1994)。電気分解陽極水は電気分解強酸性水、酸化電位水、アクア水、電気分解陽極水などのいくつかの名称を持ち、種々の作製機も市販されているが、その原理は塩化ナトリウムを添加した希薄な電解質水溶液を有隔膜電解槽内で電解して陽極側から生成したものである。電気分解陽極水は強力な殺菌・消毒効果を有しながら塩素系殺菌剤で、問題となっている有機物との接触による発癌物質との指摘もあるトリハロメタン類の生成がみられず (土井 2002)、また簡便な装置で簡単な操作によって水道水から調製可能なため、医療現場や農業その

他多くの分野への適用が検討されている (Fujiwara ら 2000)。いずれヒトの口に入る家畜周辺における消毒剤にはヒトの医療現場と同様もしくはそれ以上に安全性が問われる。畜産分野での電気分解陽極水の使用を考えた場合、今後、糞尿中におけるウイルスの不活化等の更なる検討が必要であるものの、アンモニア添加による効果の消失を考慮すると電気分解陽極水は消毒効果のある「水」として認識し、流水で使用するべきであろう。さらに低 pH によって発生する塩素ガスを厭うならば、これを発生しない pH を 5.0 付近に調整した極低濃度 (10.0~20.0 ppm) の塩素水の使用および微酸性次亜塩素酸水 (土井 2002) も BCoV および BVDV の不活化には有効であると考えられる。本研究が畜産分野におけるウイルス感染の予防のための一助になることを期待する。

謝 辞

本研究の遂行に際し、ご協力を頂いたアクアメディカル株式会社 河野秀樹氏に感謝の意を表します。

文 献

- Akashi H, Inaba Y, Miura Y, Tokuhisa S, Sato K, Satoda K. 1980. Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 5 : 265-276.
- Baca-Estrada ME, Babiuk LA, Yoo D. 1997. Hemagglutinin-esterase glycoprotein gene of bovine corona virus delivered by adenovirus vector induces mucosal immunity in cotton rats. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 412 : 431-433.
- Baca-Estrada ME, Liang X, Babiuk LA, Yoo D. 1995. Induction of mucosal immunity in cotton rats to hemagglutinin-esterase glycoprotein of bovine corona virus by recombinant adenovirus. *Immunology*, 86 : 134-140.
- Becher P, Orlich M, Thiel H-J. 2001. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain : generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *Journal of Virology*, 75 : 6256-6264.
- Clark MA. 1993. Bovine coronavirus. *The British Veterinary Journal*, 149 : 51-70.
- Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD. 1998. Inorganic nonmetallic constituents. In : *Standard methods for the examination of water and wastewater* 20th ed. 76-77. American public health association, Washington, DC.
- Covács F, Magyar T, Rinehart C, Elbers K, Schlesinger K, Ohnesorge WC. 2003. The live attenuated viral diarrhea virus components of a multi-valent vaccine confer protection against fetal infection. *Veterinary Microbiology*, 96 : 117-131.
- Crouch CF, Acres SD. 1984. Prevalence of rotavirus and coronavirus antigens in the feces of normal cows. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 48 : 340-342.
- Crouch CF, Ohmann HB, Watts TC, Babiuk LA. 1985. Chronic shedding of bovine enteric coronavirus antigen-antibody complexes by clinically normal cows. *Journal of General Virology*, 66 : 1489-1500.
- Drew TW, Yapp Fenella, Paton DJ. 1999. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Veterinary Microbiology*, 64 : 145-154.
- Enserink M. 2003. Clues to animal origins of SARS. *Science*, 300 : 1351.
- Fujiwara K, Doi R, Imoto M, Fujii T. 2000. Fundamental studies on crop disease control by spraying electrolyzed anode-side water (4) Effect of pH and available chlorine concentration on the severity of powdery mildew infection and percentage of leaves with a leaf burn-like physiological disorder on tomato leaves. *Environment Control in Biology*, 38 : 263-271.
- Heckert RA, Saif LJ, Myers GW. 1991. Mucosal and systemic isotype-specific antibody responses to bovine coronavirus structural proteins in naturally infected dairy calves. *American Journal of Veterinary Research*, 52 : 852-857.
- Holmes KV. 2003. SARS-associated coronavirus. *The New England Journal of Medicine*, 348 : 1948-1951.
- Hotta K, Kawaguchi K, Saitoh F, Saito N, Suzuki K, Ochi K, Nakayama T. 1994. Antimicrobial activity of electrolyzed NaCl solution : Effect on the growth of *Streptomyces* spp. *Actinomycetology*, 8 : 51-56.
- Houe H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. The Veterinary clinics of North America. *Food Animal Practice*, 11 : 521-47.
- Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*, 64 : 89-107.
- Inui S, Narita M, Kumagai T. 1978. Bovine virus diarrhoea- mucosal disease. I. Pathological changes in natural experimental cases. *National Institute of Animal Health Quarterly*, 18 : 109-117.
- Kapil S, Trent AM, Goyal SM. 1994. Antibody responses in spiral colon, ileum, and jejunum of bovine coronavirus-infected neonatal calves. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 17 : 139-149.
- Kodama K, Sasaki N, Fukuyama S, Izumida A, Ishii F. 1974. Studies on cytopathogenic bovine virus recovery, identification, and properties of the isolated virus. *Bulletin of Nippon Veterinary and Zootechnical College*, 23 : 51-59.
- Kohara J, Hirai T, Mori K, Ishizaki H, Tsunemitsu H. 1997. Enhancement of passive immunity with maternal vaccine against newborn calf diarrhoea. *Journal of Veterinary Medical Science*, 59 : 1023-1025.
- McClurkin AW, Littledike ET, Cutlip RC, Frank GH, Coria MF, Bolin SR. 1984. production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 48 : 156-161.
- Mebus CA, Stair EL, Rhodes MB, Twiehaus MJ. 1973. Neonatal calf diarrhoea : propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. *American Journal of Veterinary Research*, 34 : 145-150.
- Meyers G, Thiel H-J. 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Advances in Virus Research*, 47 : 53-118.
- 奥田禮一・笹崎弘己・兼平正史・岡部太一・安部 敏・田上 篤・岩松洋子・宮 豊・清水義信. 1994. 形態変化から観た酸化電位水の殺菌効果. *日本歯科保存学雑誌*, 37 : 755-765.
- Radwan GS, Brock KV, Hogan JS, Smith KL. 1995. Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology*, 44 : 77-92.
- Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimation 50

- percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27 : 493-497.
- Ridpath JF, Bolin SR. 1995. Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV. *Virology*, 212 : 259-262.
- Saif LJ, Redman DR, Brock KV, Kohler EM, Heckert RA. 1988. Winter dysentery in adult dairy cattle : detection of coronavirus in the faeces. *Veterinary Record*, 123 : 300-301.
- 清水義信. 1994. 酸化電位水の殺ウイルス・殺菌ポテンシャル. 歯科ジャーナル, 40 : 145-152.
- Takahashi E, Inaba Y, Sato K, Ito Y, Kurogi H, Akashi H, Satoda K, Omori T. 1980. Epizootic diarrhoea of adult cattle associated with a coronavirus-like agent. *Veterinary Microbiology*, 5 : 151-154.
- 土井豊彦. 2002. 微酸性次亜塩素酸水とその利用. ミルクサイエンス, 51 : 165-168.
- Wu H-Y, Guy JS, Yoo D, Vlasak R, Urbach E, Brian DA. 2003. Common RNA replication signals exist among group 2 coronaviruses : evidence for in vivo recombination between animal and human coronavirus molecules. *Virology*, 315 : 174-183.
- Zhang XM, Herbst W, Kousoulas KG, Stortz J. 1994. Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child. *Journal of Medical Virology*, 44 : 152-161.

Inactivation of Bovine Coronavirus by Electrolyzed Anode-side Water

Mitsuyo MATSUMOTO, Mina OTSUKA, Yuko SUZUKI, Hiroyuki FUKUI,
Kieko MACHIDA, Takao MUKAI and Hitoshi OHORI

School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University, Towada-shi 034-8628, Japan

Corresponding : Takao MUKAI (fax : +81 (0) 176-23-8703, e-mail : mukai@vmas.kitasato-u.ac.jp)

Bovine coronavirus (BCV) and bovine viral diarrhoea disease virus (BVDV) are associated with calf diarrhoea and severe mucosal disease of bovine, respectively. It is quite difficult to eradicate these virus infections in cattle-breeding farms. In the present study, we examined the effect of electrolyzed anode-side water on proliferation of these viruses *in vitro*. Electrolyzed anode-side water was prepared by electrolyzing the water containing 0.12% of NaCl. Both viruses were treated with electrolyzed anode-side water for 1 min, and then they were separately inoculated to Madin-Darby bovine kidney cells and detected by RT-PCR (for both viruses) or hemagglutination assay (for BCV). After cultivation for 3 to 6 days, neither BCV nor BVDV were detected in the cells or in the culture supernatant fractions, indicating that electrolyzed anode-side water inactivates BCV and BVDV. Electrolyzed anode-side water prepared in this study showed a low pH value (about 3) and contained a low concentration of free effective chlorine (7.0 to 20.0 ppm). However, the viruses were inactivated with neither the solution adjusted at a low pH value with HCl nor those adjusted at a high pH value (above 9.0) contained a low concentration of free effective chlorine. These results indicate that antiviral effect of electrolyzed anode-side water may be synergistically depended on pH and a concentration of free effective chlorine.

Nihon Chikusan Gakkaiho, 76 (1) : 59-65, 2005

Key words : Electrolyzed anode-side water, Bovine coronavirus, Bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus, Inactivation