消毒剤によるバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (BMN) ウイルスの不活化効果

桃 山 和 夫^{*1}

(1988 年 12 月 9 日受付)

Virucidal Effect of Some Disinfectants on Baculoviral Mid-gut Gland Necrosis (BMN) Virus

Kazuo MOMOYAMA

Yamaguchi Prefectural Naikai Fisheries, Experimental Station, Yamaguchi 754, Japan

(Received December 9, 1988)

Virucidal effect of some disinfectants on baculoviral mid-gut gland necrosis (BMN) virus prepared from frozen naturally infected post-larvae was examined by infectivity experiments using larval and postlarval kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*.

BMN virus was inactivated by contact for 10 minutes at 25°C with 5 ppm as active principle-concentration of chlorine, 25 ppm as active principle concentration of iodine, 100 ppm of bezalkonium chloride, 100 ppm of benzethonium chloride, 0.5% of formalin and 30% of ethanol.

クルマエビの種苗生産時に発生するバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (BMN) は、病原体がウイルスであり、かつ、死亡率が極めて高い疾病であることから、病害対策としては予防対策が特に重要である。本症と同属ウイルスによって起こるカイコの核多角体病 (NP) では、蚕室・蚕具等の消毒に各種消毒剤の使用が効果を挙げている (福原, 1979)。しかしながら、クルマエビ類を含む甲殻類由来のバキュロウイルスに対する消毒剤の不活化効果は未だ全く調べられていない。

今回、筆者は前報 (MOMOYAMA and SANO, 1988) で確立したクルマエビ稚仔の浸漬接種による感染実験方法を用いて、数種消毒剤による BMN ウイルスの不活化効果を調べたので報告する。

材料および方法

1. 供試クルマエビ

山口県内海栽培漁業センターで種苗生産されたミシスから P-4 (4 日齢のポストラバ) までのいずれかの発育期にある健康な稚仔を用いた。これらの稚仔は BMN ウ

イルスに対して高い感受性を示すことが桃山・佐野^{*2}によって明らかにされている。

2. 供試ウイルス液

サンプルビンに小分けされ、-80°C で 1~3 年間凍結保存されていた同一群由来の BMN の自然発病エビ 1 g 約 400 尾 (平均体重 2.5 mg) に滅菌海水 10 ml を加えた後、前報 (MOMOYAMA and SANO, 1988) に従って調整されたホモジネート濾液 (450 nm) をウイルス液として用いた。

なお、本ウイルス液のクルマエビ稚仔に対する浸漬接種による感染力価は、クルマエビの発育期によって多少異なるが、 10^{-5} から 10^{-7} の範囲にあった。

3. 供試消毒剤のウイルス不活化方法

用いた消毒剤は塩素剤 (ビューラックス; 次亜塩素酸ナトリウム 10% 含有)、ヨード剤 (イソジン; ポピドンヨード 10% で有効ヨウ素 1% 含有)、逆性石けん (オスバン; 塩化ベンザルコニウム 10% 含有、ハイアミン; 塩化ベンゼトニウム 10% 含有)、ホルマリン (ホルムアルデヒド 37% 含有)、およびエタノール (エチルアルコール 99.5% 含有) の 6 剤とし、BMN ウイルスの不活化方法は以下の手順に従った。

^{*1} 山口県内海水産試験場

^{*2} 桃山和夫・佐野徳夫; 昭和 63 年度 日本魚病学会大会, 講演要旨, p. 22.

塩素剤およびヨード剤

海水 100 ml とウイルス液 0.1 または 0.5 ml を入れた三角フラスコに、各消毒剤（有効濃度を予め正確に分析）を Table 1 に示す所定の濃度となるように加えて混合後、10 分間静置して作用させる。直ちに予め求めている必要量の N/10 または N/100 のチオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて中和し消毒剤の作用を停止させた後、海水 900 ml を入れたビーカーに移す。

なお、消毒剤添加後の海水の pH は、ヨード剤では無添加海水の 7.95 から 1 ppm の 7.92、5 ppm の 7.91、10 ppm の 7.88、25 ppm の 7.80、50 ppm の 7.72 へと若干の低下がみられ、塩素剤では 1 ppm の 7.98、5 ppm の 8.08、10 ppm の 8.18、50 ppm の 8.56、100 ppm の 8.63、200 ppm の 8.72 へと上昇した。

逆性石けん、ホルマリンおよびエタノール

所定量の海水（ウイルス液と消毒剤を加えて 10 ml とする）を入れた試験管にウイルス液 1.0 ml を添加した後、各消毒剤を Table 1 に示す所定の濃度となるように加えて混合する。10 分間静置後、海水 2 l を入れたビーカーに移して希釈（200 倍）することにより作用を停止する。

以上の不活化操作は、恒温水槽を用いて 25°C の一定温度で行った。

4. 接種方法

消毒剤で不活化処理後、海水で希釈された各ウイルス液に 30 尾の供試エビを 2 時間浸漬して行った。

なお、供試エビの発育期は消毒剤の種類によって異なり、塩素剤はミンス I 期、塩化ベンゼトニウムとホルマリンは P-3、その他の消毒剤は P-4 が用いられた。

5. ウイルス不活化効果の判定方法

接種された供試エビを水温 24.0～28.1°C で 4 日間飼育後、無作為に採取した 10 尾の生鮮中腸腺について、暗視野観察法（桃山, 1983）により感染の有無を調べて効果を判定した。

結果および考察

今回供試した消毒剤はいずれも BMN ウイルスに対して不活化効果を有し、25°C 10 分間作用では、それぞれ有効成分濃度として塩素剤 5 ppm、ヨード剤 25 ppm、逆性石けん（塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム共）100 ppm、ホルムアルデヒド 1,850 ppm（ホルマリンとしては 0.5%）、エタノール 30% で本ウイルスは完全に不活化された（Table 1）。これら BMN ウイルスに対して不活化効果を示す消毒剤の濃度は、カイコの NP ウイルスで得られている値（有賀, 1979; 宮島, 1979, 1986）に比べて著しく低いが、これは後者のほとんどが核多角体（封入体）に包埋されたウイルスについて調べ

Table 1. Virucidal effect*1 of some disinfectants on BMN virus

Concentration*2	Disinfectants					
	Sodium hypochlorite	Povidon-iodine	Benzalkonium chloride	Benzethonium chloride	Formalin	Ethyl alcohol
	Number of shrimp infected/number of shrimp examined					
200	0/10		0/10	0/10		
100	0/10		0/10	0/10	0/10	
90						0/10
70						0/10
50	0/10	0/10	6/10	8/10	0/10	0/10
30						0/10
25		0/10	7/10	9/10		
20						10/10
10	0/10	5/10	8/10	10/10	2/10	10/10
5	0/10	10/10	10/10	10/10	4/10	
1	10/10	10/10			9/10	
Untreated	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	10/10

*1 10 minutes exposure to disinfectants at 25°C.

*2 Sodium hypochlorite and povidone-iodine: ppm as active principle-concentration of chlorine and iodine, respectively. Benzalkonium chloride and benzethonium chloride: ppm. Formalin: % × 100 (1% of formalin is equivalent to 3,700 ppm of formaldehyde solution). Ethyl alcohol: %.

られているためと思われる。核多角体を溶解して得た遊離の NP ウイルスの不活化については、0.5% ホルマリン水 26°C, 40 分 (古田, 1981) や、さらし粉 5,000 倍液 (有効塩素濃度約 70 ppm), 30 分 (有賀, 1979) の値が得られている。

通常、水産増養殖における消毒対象物は、病原微生物に汚染された用・排水や飼育水槽・器具等の非生体材料と、受精卵等の生体材料の二つに大きく分けることができる。本症の発生に際しては、病原体がウイルスであり、かつ、その病原性が極めて強いことから、直ちに稚仔の殺処分を兼ねて飼育水と生産タンク等を消毒し、場内感染等汚染の拡大を防止することが生産現場においては特に肝要であると思われる。この場合、大量の飼育水を消毒するには、今回の実験で最も高いウイルス不活化効果を示した安価な消毒剤である塩素剤が最も適しているが、飼育水中に多量に含まれる有機物等による消毒剤の活性の低下を考慮しておく必要がある。その他の非生体材料に対してもその種類に応じて、今回調べた各消毒剤の不活化効果に加えて、有機物等による活性阻害、金属腐食作用、経費等各消毒剤の長所、短所 (古橋, 宮前, 1980) を考慮しながら使い分けることも必要である。

一方、本症の主要な伝染源は親エビであり (桃山, 1988), 糞とともに飼育水中に排泄された BMNV ウイルスは、ゾエア期幼生以後の摂餌活動に伴って経口的に稚仔の体内にとり込まれる可能性が高い*。サケ・マス類ではウイルス病の予防にヨード剤による受精卵の消毒が実用されているが (江草, 1978), クルマエビでは受精卵に対する各消毒剤の有用性を検討するためには、受精卵に対する毒性を併せて調べることが必要であろう。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、有益な御助言と本報告の御校閲をいただいた、東京水産大学・佐野徳夫教授に厚くお礼申し上げます。

なお、本研究費の一部は、水産庁・魚病対策技術開発研究委託費によったことを付記して感謝する。

引用文献

- 有賀久雄 (1979): 昆虫病理汎論。養賢堂、東京, pp. 648.
江草周三 (1978): 魚の感染症。恒星社厚生閣、東京, pp. 554.
福原敏彦 (1979): 昆虫病理学。学会出版センター、東京, pp. 218.
古橋正吉・宮前卓之 (1980): 消毒薬の殺菌作用とその使用法, 医科器械学叢書 3, 滅菌法・消毒法第 3 集, 文光堂、東京, 107-150.
古田要二 (1981): 家蚕における核多角体のホルマリンおよび熱処理による不活化, 蚕糸研究, **118**, 105-112.
宮島成寿 (1979): 数種の消毒剤による家蚕ウイルスの不活化効果, 愛知県農業総合試験場研究報告, **11**, 165-168.
宮島成寿 (1986): 数種のアルコール及び次亜塩素酸ナトリウムによる家蚕ウイルスの不活化効果, 同誌, **18**, 280-282.
桃山和夫 (1983): クルマエビのバキュロウイルス性中腸腺壊死症に関する研究—III. 仮診断法, 魚病研究, **17** (4), 263-268.
桃山和夫 (1988): クルマエビの種苗生産時に発生するバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (BMNV) の伝染源, 魚病研究, **23** (2), 105-110.
MOMOYAMA, K. and T. SANO (1988): A method of experimental infection of kuruma shrimp larvae, *Penaeus japonicus* Bate, with baculoviral mid-gut gland necrosis (BMNV) virus. *J. Fish Diseases*, **11**(2), 105-111.

* 未発表