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^{*1}

井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史

(1990 年 1 月 30 日受付)

Studies on the Method for Evaluating Virucidal Activities of Germicides to IPNV and IHN

Kiyoshi INOUE^{*2}, Fumio IKEYA^{*3}, Takayoshi YAMAZAKI^{*4}
and Takeshi HARA^{*5}

^{*2} Iki Branch Bureau, Nagasaki Prefectural Office, Gonoura-cho, Iki-gun,
Nagasaki 811-51, Japan

^{*3} Okutama Branch, Tokyo Metropolitan Fishery Experiment Station, Okutama-cho,
Nishitama-gun, Tokyo 198-01, Japan

^{*4} Nagano Prefectural Fishery Experiment Station, Akashina-cho, Higashichikuma-gun,
Nagano 399-71, Japan

^{*5} National Research Institute of Aquaculture, Nansei-cho, Watarai-gun, Mie 519-04,
Japan

(Received January 30, 1990)

Optimum methods for evaluating virucidal activities of germicides to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) were studied.

1. Among the fish cell lines examined CHSE-214 and EPC cells were best suited for examining virucidal activities.
2. Cell-associated virus suspension (CAV) was effectively obtained by freezing and thawing cell-sheet culture just before the appearance of cytopathological effects (CPE).
3. CAV of IPNV did not change in infectivity titer during the stocking period of 8 weeks at either -20°C or -80°C . However, infectivity titer of IHN in CAV significantly decreased infectivity titer at both -20°C and -80°C .
4. Virucidal activities of IPNV and IHN did not change during 6 h incubation at temperatures from 10°C to 37°C and from 10°C to 15°C , respectively. Hence, 15°C appears to be a reasonable temperature for routine use in this assay system.
5. Toxicities to IPNV and IHN of germicides other than halogenic compounds were successfully eliminated by 10^2 - 10^5 dilutions of PBS (-).

IPN (伝染性脾臓壊死症) や IHN (伝染性造血器壊死症) 等, ウイルス性疾病の流行を契機に, わが国のサケ・マス類の養殖場では塩素化合物, 沃素化合物, フェノール化合物, 界面活性剤およびアルコール類などの消毒剤が魚卵や飼育池, 飼育機材器具, 手指, 履物の消毒に使

用され防疫上の効果が期待されている。IPN や IHN などのサケ科魚類の病原ウイルスに対する消毒剤の効果に関しては, AMEND and PIETSCH (1972), 山崎ら (1976), 佐々木ら (1976) および ELLIOT and AMEND (1978) によって報告されているが, 主として塩素化合物と沃素化合物に関するものであり, 防疫という観点からの基礎資料としては不十分である。

そこで IPN および IHN ウイルスに対する消毒剤の基礎資料の蓄積が急がれるが, 魚類ウイルスに対する効力評価方法を標準化しなければ, 消毒効果を客観的に論

^{*1} サケ科魚類の伝染性病原体の消毒法に関する研究
1

^{*2} 長崎県苓岐支庁水産業改良普及所

^{*3} 東京都水産試験場奥多摩分場

^{*4} 長野県水産試験場

^{*5} 水産庁養殖研究所

ずることはできない。したがって効力評価に先立って実験方法の標準化のための検討が必要である。

魚類ウイルスの感受性は株化細胞の種類によって異なることが知られており、消毒剤の殺ウイルス効果判定に株化細胞を使用する場合、両ウイルスに対する株化細胞の感受性が異なることから、消毒剤の殺ウイルス効果の評価に際しては供試細胞の検討が必要である。

またウイルスに対する消毒剤の効果の評価において、実験成績の再現性を左右する要因の一つとして、供試ウイルス液の調製法があげられる。このため消毒剤の効力評価にはウイルス粒子以外の培地や血清、細胞成分を含まないウイルス液の調製法の検討が必要である。

さらに消毒剤の殺菌作用は化学反応と同じように作用時の温度の影響を受け、消毒剤の活性の面からは、消毒剤の作用温度としては 20°C 以上が適している。しかしサケ科魚類の病原ウイルスは増殖至適温度が低温域にあるため、効力評価の際の消毒剤の作用温度について検討する必要がある。

このような観点から、本報告では効力評価に用いる株化細胞の種類、供試ウイルス液の調製法と保存法、消毒剤のウイルスに対する作用温度について検討し、さらに消毒剤の作用停止と細胞毒性除去法についても検討した。

材料および方法

1. 効力評価に使用する株化細胞に関する検討

IPNV ウイルス (Buhl. 株, 以降 IPNV と略記する) は RTG-2 細胞を用いて, IHN ウイルス (野外分離株 HV 7601, 以降 IHNV と略記する) は FHM 細胞を用いて, 15°C で 7 日間培養後, PEG 6000 吸着濃縮法 (佐野・西村: 1980, 1981)*⁶ によって培地と血清成分を除去し, 供試ウイルス液を調製した。供試ウイルス液の感染力価は IPNV が $10^{10.8}$ TCID₅₀/ml, IHNV が $10^{9.0}$ TCID₅₀/ml であった。

IHNV では PBS (－) で有効汚素量が 10 ppm, IHNV では有効汚素量 1 ppm になるように希釈したポリビニールピロリドンヨード製剤 (商品名: 水産用イソジン液, 以降イソジンと略記する) 40 ml をガラス製三角フラスコにとり, 供試ウイルス液をそれぞれ 0.4 ml ずつ混和し, 正しく 30 秒, 1, 5, 15 および 30 分後に, 蒸留水で調製し高圧滅菌した N/10 チオ硫酸ナトリウム溶液 0.1

ml を予め分注した 5 ml 容のスクリーバイアルに, その混合液 1 ml を移し, イソジンの作用を停止させ, 細胞への接種材料とした。実験は $9\sim 11^{\circ}\text{C}$ の室温条件下で実施した。

CHSE-214, EPC, FHM, RTG-2 および STE-137 の 5 種の魚類株化細胞の細胞単層を分散して, MEM 2 でそれぞれ 2 倍に希釈し, マイクロプレートの 1 well あたり 0.1 ml を植え 20°C で 20~24 時間培養した。各株化細胞を植えたマイクロプレートには, 準備した接種材料を 1 well あたり 0.05 ml ずつ 4 well に接種し, 15°C の恒温培養器中に置いて 14 日間観察した。

2. 効力評価に使用するウイルス液の調製法に関する検討

1) IPNV および IHNV の一段増殖曲線

IPNV には CHSE-214, IHNV には EPC の各細胞を使用し, それぞれの細胞を 25 cm^2 のプラスチック培養瓶 (CORNING) 20 本に, 牛胎児血清 (GIBCO) を 10% 加えたイーグル MEM 培地 (アール塩, 日水。以降 MEM 10 と略記する) 5 ml とともに植え, 20°C で 24 時間培養後, 細胞単層表面を Hanks' BSS で洗浄し, IPNV および IHNV を MOI が 10 になるように接種した。1 時間吸着後に余分のウイルスを Hanks' BSS で洗浄除去し, 新しい培地 5 ml を加え 15°C で培養した。

ウイルス接種後 IPNV では 2, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 48 時間培養し, IHNV では 2, 7, 10, 12, 15, 20, 25, 30 時間培養して, それぞれ培養瓶 2 本について培養液内ウイルス (Fluid virus: 以降 FV と略記する) の感染力価 (TCID₅₀/ml) を測定するとともに, 北村 (1976) に基づいて, 感染細胞を超音波処理法により破壊し細胞内ウイルス (Cell-associated virus: 以降 CAV と略記する) を回収した後, マイクロタイター法で感染力価を測定した。

2) 凍結融解法による CAV の回収

CHSE-214 および EPC 細胞を 500 ml 容量のガラス製培養瓶 (ルー型) に 40 ml の MEM₁₀ とともに植え, 20°C で 24 時間培養後, CHSE-214 には IPNV を, EPC には IHNV をそれぞれ MOI が 10 TCID₅₀/ml になるように接種した。ウイルス接種後の細胞は 15°C で培養し, CHSE-214 では 13 時間, EPC では 15 時間培養後に以下に示す手順により CAV の回収を行った。所定時間培養した細胞を PBS (－) で 3 回洗浄後分散剤で処理し, 8 ml の PBS (－) に再浮遊させ, ドライアイスを加えたアセトンを用い凍結融解法により細胞を破壊し

*⁶ 佐野徳夫・西村定一 (1980): 魚類ウイルス病の迅速診断法の開発に関する研究, 昭和 54 年度魚病対策技術開発研究報告書。

た。細胞破壊後 3000 rpm で 15 分の遠心分離を行い、上清を回収して CAV 液とした。なお、凍結融解の回数を 1, 2, 3 および 4 回としたときの CAV の感染力価を比較した。

3) CAV の保存

上記の方法により、凍結融解を 3 回繰り返して回収した IPNV および IHNВ の CAV 液を 5 ml のスクリーバイアルに 0.1 ml ずつ分注し、 -20°C および -80°C で凍結保存し、1, 2, 4, 8 週間後にマイクロタイター法により感染力価を測定した。

4) CAV 液の消毒剤活性阻害

FHM 細胞を 500 ml のガラス製培養瓶 (ルー型) に 40 ml の MEM 10 とともに培養し、MOI が 10^{-8} TCID₅₀/cell になるように IHNВ を接種し 15°C で培養した。ウイルス接種 8 日後に CPE が発現し、ガラス面から完全に剝離した細胞を回収して、2000 G で 20 分高速遠心処理し、その上清を FV 液とした。

FV 液の感染力価は $10^{8.3}$ TCID₅₀/ml であった。また、この FV 液を佐野・西村 (1980) の方法によって PEG 6000 で吸着濃縮し、供試ウイルス液 (FV 濃縮液と略記する) とした。FV 濃縮液の感染力価は $10^{9.0}$ TCID₅₀/ml であった。さらに、EPC 細胞を 500 ml のガラス製培養瓶 (ルー型) に 40 ml の MEM 10 とともに植え、 20°C で 24 時間培養後ウイルスを MOI が 10^7 TCID₅₀/cell になるように接種し、ウイルス接種後 15°C で 15 時間培養後に前述の凍結融解法により CAV を回収した。CAV 液の感染力価は $10^{7.4}$ TCID₅₀/ml であった。

上記により調製した IHNВ の FV 液、FV 濃縮液および CAV 液の 3 種のウイルス液を用いて、IHNВ に対するヨード剤の殺ウイルス効果を以下の手順により検討した。イソジンを有効汚素量が 1 ppm および 10 ppm になるように希釈し、その 40 ml をガラス製三角フラスコにとり、感染力価を $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml に調製した供試ウイルス液をそれぞれ 0.4 ml ずつ混和し、 $9\sim 11^{\circ}\text{C}$ の室温中で接触させた。供試ウイルス液を混和後、正しく 30 秒および 1, 5, 15, 30 分後にその混合液を 1 ml とり、N/10 チオ硫酸ナトリウム溶液 0.1 ml を分注した 5 ml 容のスクリーバイアルに移し、イソジンの作用を停止させ、マイクロプレートに培養した EPC 細胞へ 0.05 ml ずつ接種した。接種後のプレートは 15°C の恒温器中に置き 14 日間観察した。

3. 作用温度

IPNV および IHNВ に対する消毒剤の作用温度を決定するため、IPNV では 10, 20, 37°C 、IHNВ では 10,

20, 37°C の温度条件下で、蒸留水中の両ウイルスの CAV 活性の変化を検討した。また IHNВ では 15°C におけるウイルス活性の変化を CAV と FV で比較した。PBS (ー) で調製した IPNV (CAV, 感染力価 $10^{8.1}$ TCID₅₀/ml) と IHNВ (CAV, 感染力価 $10^{8.3}$ TCID₅₀/ml) を 5 ml 容量のスクリーバイアルに 0.5 ml ずつ分注し、所定温度の恒温水槽中に静置し、30 分、1, 2, 4, 6 時間後にバイアル 2 本ずつを取り出し、マイクロタイター法により感染力価を測定した。なお、 37°C における IHNВ の実験では実験開始後 15 分にも感染力価の測定を行った。

15°C における IHNВ の実験も同手順により実施した。実験に用いた FV 液の感染力価は $10^{8.8}$ TCID₅₀/ml であった。

4. 消毒剤の細胞毒性除去

アルコール系消毒剤 (エチルアルコール、試薬特級: イソプロピルアルコール、試薬特級: メチルアルコール、試薬特級)、フェノール系消毒剤 (石炭酸、試薬特級: クレゾール石鹼液)、逆性石鹼製剤 (塩化ベンザルコニウム製剤、商品名オスバン液「ダイゴ」*7 およびホルマリンの CHSE-214 と EPC の各細胞に対する細胞毒性 (CTE) を調べた。

細胞単層を分散剤で分散後、MEM 2 で 2 倍に希釈しマイクロプレートに 1 well あたり 0.1 ml 植え、 20°C で 24 時間培養した後、アルコール系消毒剤は試薬原液を、その他の消毒剤は原液を PBS (ー) で 5% になるように希釈し、原液あるいは 5% 溶液の 10^0 から 10^7 までの 10 倍段階 PBS (ー) 希釈液を以下に示す手順により細胞に接種した。まず各消毒剤の希釈液を 1 well あたり 0.05 ml 加え、そのまま 20°C で 1 週間培養した。また消毒剤希釈液を 1 well あたり 0.05 ml 加え 15°C の室温下で 1 時間静置した後、細胞単層を PBS (ー) で 3 回洗浄し、新しい MEM 2 を 0.1 ml 加え 20°C で 1 週間培養し CTE の発現の有無を観察した。

結 果

1. 効力評価に使用する株細胞に関する検討

IPNV および IHNВ に対するイソジンの殺ウイルス効果をそれぞれ Table 1, 2 に示した。

Table 1 に示すように IPNV では有効汚素量 10 ppm のイソジン液に接触させた場合、接触時間が 1 分以上では IPNV は完全に不活化された。しかし接触時間が 30 秒の場合には不活化は完全ではなく、CHSE-214

*7 塩化ベンザルコニウムの 10 w/v% 水溶液である。

Table 1. Virucidal activity of Isodine (10 ppm I₂) to IPNV cultured in different cell lines

Cell line	Period of treatment (min)				
	0.5	1	5	15	30
RTG-2	0	0	0	0	0
FHM	0	0	0	0	0
CHSE-214	2	0	0	0	0
STE-137	0	0	0	0	0
EPC	0	0	0	0	0

Figures indicate as the number of IPNV-infected culture tubes which showed CPE in 4 culture tubes.

Table 2. Virucidal activity of Isodine (1 ppm I₂) to IHNH cultured in different cell lines

Cell line	Period of treatment (min)				
	0.5	1	5	15	30
RTG-2	2	2	0	0	0
FHM	2	0	0	0	0
CHSE-214	1	0	0	0	0
STE-137	4	0	0	0	0
EPC	4	1	2	0	0

Figures indicate the number of IHNH-infected culture tubes which showed CPE in 4 culture tubes.

細胞では半数の well に CPE が観察された。

IHNH では Table 2 に示すように、有効ヨウ素量 1 ppm のイソジン液に接触させた場合、接触時間毎の CPE の発現状況は株化細胞によって異なり、FHM や CHSE-214, STE-137 の各細胞では接触時間が 1 分以上になると CPE は観察されなかった。しかし RTG-2 細胞では 1 分、EPC 細胞では 5 分でも半数の well に CPE が観察された。

2. 効力評価に使用するウイルス液の調製

1) IPNV および IHNH の一段増殖曲線

IPNV および IHNH の一段増殖曲線をそれぞれ Fig. 1, 2 に示した。

IPNV の CAV の感染力価はウイルス接種後 6~8 時間目から上昇を開始し、25 時間目をピークに、その後 30~48 時間目にかけて直線的に低下した。25 時間目の感染力価は $10^{6.7}$ TCID₅₀/ml であった。なお顕微鏡観察では 15 時間目に CPE が観察された。一方 FV では 15 時間目以降に感染力価の上昇が認められ、その後 48 時間目まで上昇し、感染力価の上昇時期と CPE の発現時期が一致した。48 時間目の FV の感染力価は $10^{7.6}$ TCID₅₀/ml に達した。

IHNH の CAV の感染力価はウイルス接種後 7 時間目から上昇が始まり、10 時間から 20 時間後にかけて急

Fig. 1. One-step growth curve of IPNV (Buhl strain) in CHSE-214 cells at 15°C. CAV, cell-associated virus; FV, free virus.

Fig. 2. One-step growth curve of IHNV (HV 7601) in EPC cells at 15°C. CAV, cell-associated virus; FV, free virus.

激に上昇し、その後 30 時間まで緩やかに上昇した。30 時間後の CAV の感染力価は $10^{6.1}$ TCID₅₀/ml であった。顕微鏡観察では 20 時間目に明かな CPE が認めら

れた。一方 FV の感染力価は 12 時間目以降に急激に上昇し、30 時間後には感染力価は $10^{5.8}$ TCID₅₀/ml になり、IHNV では FV の感染力価上昇の時期と CPE の発現時期は一致せず、CPE 発現より早い時期に感染力価の上昇が認められた。

2) 凍結融解法による CAV の回収

凍結融解の回数と CAV の感染力価についてみると、IPNV では 1 回で $10^{7.6}$ 、2 回で $10^{7.4}$ 、3 回で $10^{7.4}$ 、4 回で $10^{7.3}$ TCID₅₀/ml となり、凍結融解の回数が増えても CAV の感染力価は変わらなかった。また IHNV では 1 回で $10^{6.8}$ 、2 回で $10^{7.6}$ 、3 回で $10^{7.3}$ 、4 回で $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml となり、凍結融解の回数が 2~4 回では感染力価は変わらなかったが、1 回の場合は感染力価がやや低くなった。

3) CAV の保存

-20°C および -80°C の凍結保存に伴う感染力価の変化を Fig. 3 に示した。

IPNV では -20°C 保存で 8 週間後まで感染力価の変化は認められなかった。また -80°C では 1 週間後に感染力価の低下する傾向がみられたが、その後は 8 週間目まで安定していた。IHNV では -20°C、-80°C とともに 1 週間目に感染力価の低下が起こり、-20°C 保存では開始時に $10^{7.3}$ であった感染力価が 1 週間目には $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml に低下し、-80°C 保存では開始時に $10^{7.6}$ であった感染力価が 1 週間後には $10^{5.1}$ TCID₅₀/ml に低下した。しかし 1 週間経過以降は -20°C、-80°C 保存

Fig. 3. Effect of stocking at -20°C and -80°C on infectivity titers of fish viruses (CAV) suspended in PBS (-). (●), IPNV; (○), IHNV at -20°C and (■), IPNV; (□), IHNV at -80°C.

Table 3. Comparison of virucidal activity of Isodine to IHNV among three different virus suspensions

Virus suspension	Concentration of Iodophor (ppm)	Period of treatment (min)				
		0.5	1	5	15	30
FV* ¹	1	4	3	3	2	2
	10	0	0	0	0	0
PFV* ²	1	4	2	0	0	0
	10	0	0	0	0	0
CAV* ³	1	4	4	1	0	0
	10	0	0	0	0	0

Figures indicate the number of IHNV-infected culture tubes which showed CPE out of 4 IHNV infected tubes.

*¹ FV (free virus), virus suspended in MEM 10 prepared from culture medium supernatant.

*² PFV, concentrated FV suspended in PBS (-). The FV was concentrated and purified by the method of NISHIMURA and SANO (1980) before it was resuspended in PBS (-).

*³ CAV (cell-associated virus), virus suspended in PBS (-).

Fig. 4. Changes in infectivity titers of fish viruses (CAV) suspended in PBS (-) at 10, 20 and 37°C. (●), IPNV; (○), IHNV at 10°C. (■), IPNV; (□), IHNV at 20°C. (▲), IPNV; (△), IHNV at 37°C.

とも感染力価の低下は認められなかった。

4) CAV の消毒剤活性阻害

イソジンの IHNV 液 に対する殺ウイルス効果を

Fig. 5. Changes in infectivity titers of IHNV in PBS (-) or MEM 10 at 15°C. (○), IHNV (CAV) in PBS (-); (●), IHNV (FV) in MEM 10.

Table 3 に示した。

イソジンの濃度が 10 ppm (有効ヨウ素量) では、各ウイルスとも 30 秒で不活化された。しかし 1 ppm の場合にはウイルス液の種類により不活化の程度に差が認められ、FV 濃縮液では 5 分、CAV では 15 分で不活化されたのに対して、FV 液は 30 分でも完全には不活化

されなかった。

3. 作用温度に関する検討

IPNV および IHNВ の 10, 20 および 37°C における感染力価の変化を Fig. 4 に, IHNВ の CAV および FV 液の 15°C における感染力価の変化を Fig. 5 に示した。

IHNВ は 10~37°C の範囲の温度条件下では感染力価の低下は認められなかった。また IHNВ は 10°C では感染力価の低下は認められなかったが, 20°C では開始時に $10^{8.8}$ TCID₅₀/ml であった感染力価が 2 時間後には, $10^{3.9}$ TCID₅₀/ml となり 99% 以上の低下を示し, 37°C では 15 分後に $10^{1.8}$ TCID₅₀/ml 以下となり 99.99%

Table 4. Minimum dilution of germicides with PBS (–) required to eliminate their toxicity to CHSE-214 and EPC cells

Treatment	Germicides	Minimum dilution (1:10 ⁿ)	
		CHSE-214	EPC
Not washed* ¹	propanol	2.48	2.48
	ethanol	2.48	2.48
	methanol	2.48	2.48
	cresol	4.78	4.78
	phenol	4.78	4.78
	formalin	7.78	7.78
	benzalconium chloride* ³	6.78	6.78
Washed* ²	propanol	1.48	1.48
	ethanol	1.48	1.48
	methanol	1.48	1.48
	cresol	3.78	3.78
	phenol	2.78	3.78
	formalin	5.78	5.78
	benzalconium chloride	6.78	5.78

*¹ Diluted germicidal solution (0.05 ml) was mixed with 0.1 ml MEM 2 containing fish cells in microtiter plate wells and then incubated at 20°C for 7 days.

*² Diluted solution (0.05 ml) was mixed with 0.1 ml MEM 2 in microtiter plate wells. After 1 hour incubation at 15°C, cell sheets were washed with PBS (–) and then incubated at 20°C for 7 days with 0.1 ml MEM 2.

*³ Ten % (w/v) solution of benzalconium chloride (Osban).

*³ 荒井ら (1982): 昭和 57 年度魚病学会春期大会口頭発表

以上の低下が認められ, いずれも顕著な感染力価の低下が起こった。さらに Fig. 5 に示すように, 15°C では IHNВ の FV および CAV 液ともに感染力価の低下は認められなかった。

4. 消毒剤の細胞毒性除去に関する検討

各消毒剤の CHSE-214 と EPC の各細胞に対する細胞毒性を除去するために必要な最低希釈倍数を Table 4 に示した。

消毒剤希釈液を加え, 細胞単層を洗浄せずに培養した場合に CTE が発現しなくなる最低希釈倍数はアルコール系消毒剤で $10^{2.48}$ 倍, 逆性石鹼で $10^{6.78}$ 倍であった。また, 細胞単層を洗浄した後培養した場合には, アルコール系消毒剤で $10^{1.48}$ 倍, フェノール系消毒剤で $10^{2.78} \sim 10^{3.78}$ 倍, ホルマリンで $10^{5.78}$ 倍, 逆性石鹼で $10^{5.78} \sim 10^{6.78}$ 倍となり, 細胞単層を洗浄することによって, 細胞毒性は 1/10~1/100 程度に低下した。

考 察

1. 効力評価に使用する株化細胞に関する検討

魚類ウイルスの感受性は株化細胞の種類によって異なることが知られており, KELLEY *et al.* (1978) は IPNV に対しては FHM 細胞より RTG-2 細胞において感受性が高く, IHNВ に対しては CHSE-214 細胞, RTG-2 細胞に比べ FHM 細胞の感受性が高いことを報告した。また FENDRICK *et al.* (1982) は CHSE-214, STE-137, RTG-2, EPC の各細胞および FHM 細胞の IHNВ に対する感受性を比較し, EPC と FHM の両細胞の感受性が他の 3 種類の細胞に比べて高いことを報告した。消毒剤の殺ウイルス効果判定に株化細胞を使用する場合, 両ウイルスに対する株化細胞の感受性が異なることから, 消毒剤の殺ウイルス効果の評価に際しては供試細胞の検討が必要である。本実験の結果では, IHNВ については EPC 細胞の感受性が他の 4 種類の細胞より高いことが明らかになった。一方 IPNV については CPE の発現が CHSE-214 細胞のみに限られたため, 株化細胞間の十分な比較が出来なかった。しかし, IPNV に対する CHSE-214 細胞の感受性が他の 4 種類の細胞よりも高いことが推測された。この結果は KELLEY *et al.* (1978) や荒井ら (1982)*³ の結果と一致した。消毒剤の効果判定では供試株化細胞のウイルス感受性が高いほど, 精度の高い結果が得られると考えられることから, 消毒剤の効果の評価するには, IPNV では CHSE-214 細胞が, また IHNВ では EPC 細胞が適していると考えられる。

2. 効力評価に使用するウイルス液の調製に関する検討

ウイルスに対する消毒剤の効果の評価において、実験成績の再現性を左右する要因の一つとして、供試ウイルス液の調製法があげられる。細菌と比較するとウイルスの実験では、消毒剤の阻害要因の影響が大きいとされ、培養液中の血清や塩類は消毒剤の活性を阻害するばかりでなく、ウイルス保護作用も有している(飯塚・伊藤, 1977)。このため消毒剤の効力評価にはウイルス粒子以外の培地や血清、細胞成分を含まないウイルス液の調製法の検討が要求され、超遠心法や吸着濃縮法によってウイルス液が調製されている。

ウイルス液の調製法に関して、渡辺ら(1978)はポリオウイルスを使用して簡易な調製法を報告した。それは細胞内で増殖したウイルスが培地中に遊離する直前に、細胞破壊によってウイルスを効率的に回収する方法である。この方法で調製したウイルス液は他の方法よりも消毒剤活性阻害が少なく、また操作に特殊な機器を必要としない。そこで、本法を魚類ウイルスに応用することを目的に、IPNV と IHNV の CAV 回収条件を明らかにした。さらに CAV 液と吸着濃縮法によるウイルス液、FV 液による消毒剤の活性阻害について比較した。

1) IPNV および IHNV の一段増殖曲線

CAV の回収では IPNV, IHNV の一段増殖曲線からウイルス回収に最適な培養温度と時間を決定する必要がある。培養温度については、IPNV の増殖適温が 15~22°C (MALSBERGER and CERINI, 1965; KELLY and LOH, 1975; SCHERRER *et al.*, 1974), IHNV は 13~18°C (WINGFIELD *et al.*, 1969) と報告されており、両ウイルスに対する実験を効率的に進める観点から、CAV 回収の際の培養温度を 15°C とした。

IPNV の一段増殖曲線に関しては、RTG-2 細胞で Moss *et al.* (1969) が 24°C, AHNE *et al.* (1978) が 20°C における増殖曲線を報告しており、本実験における CHSE-214 細胞での 15°C における結果はこれらの報告と一致していた。この増殖曲線から CPE が未発現で FV の感染力価が低く、CAV との感染力価の差が最も高くなる時期すなわち、接種後 12~13 時間が CAV 回収に最も適していると考えられた。IHNV では CPE の発現と FV の感染力価上昇に時間のずれがみられ、CPE が発現する以前に FV の感染力価が高くなった。これは細胞崩壊を起こす以前に、細胞内ウイルスが出芽によって培養液中に放出されるという IHNV の増殖様式に起因すると考えられる。したがって IHNV の CAV 回収

については CPE の発現前で CAV 感染力価が最も高くなる培養 15 時間後に行うのが最適と考えられた。

2) 凍結融解法による CAV の回収

CAV 回収のための細胞破壊法には凍結融解法、ガラスホモゲナイザー法および音波処理法がある。消毒剤実験における供試ウイルス液の調製では、CAV の活性を損なわないで回収効率を上げることはもとより、消毒剤、特にハロゲン系消毒剤では細胞破壊片が活性阻害要因となることから、ウイルス液中の細胞破壊片をできる限り少なくすることが重要である。この点からみると凍結融解法はガラスホモジナイザー法や音波処理よりも破壊力が弱く、微少な細胞破壊片の生ずる可能性が低く、目的に最も適した細胞破壊法と考えられる。そのため株化細胞によっては完全な細胞破壊ができず、CAV の回収効率が低下することも懸念されるものの、本実験結果では IPNV, IHNV とともに CAV 液の感染力価はほぼ $10^{7.8}$ TCID₅₀/ml を示し (Fig. 4), 消毒剤実験用の供試ウイルス液として十分な感染力価であることから、IPNV と IHNV に関しては凍結融解法の応用が可能である。さらに凍結融解の回数について、渡辺ら(1978)は細胞破壊片を少なくする目的で 1 回としたが、株化細胞の種類によっては、凍結融解の回数による破壊の程度が異なるのかどうか、凍結融解の回数による CAV 感染力価の違いを調べた。その結果 IPNV では回数による差は認められず、IHNV では凍結融解の回数が 1 回の場合には、2~4 回に比べて CAV 感染価が低くなったが、その差が小さいことから、凍結融解の回数は 1 回でも十分な量の CAV の回収が可能と考えられた。

3) CAV の保存

回収した CAV 液の保存性は、消毒剤に関する実験を効率的に行うために重要な要因である。IPNV と IHNV の保存については WOLF *et al.* (1968), WOLF and QUIMBY (1971), McMICHEL *et al.* (1975) および PIETSCH *et al.* (1977) の報告があり、スキムミルクや乳糖などの添加物とともに -20°C 以下で保存すれば、IPNV は長時間安定であることが知られている (WOLF *et al.*, 1968)。IHNV については MEM 10 中で -20°C で保存した場合 52 週間安定であったことが報告されている (PIETSCH *et al.*, 1977)。このように血清や添加物等のウイルス保護物質の存在下での保存性については調べられているが、保護物質を含まない条件下での保存性についての知見は少ない。CAV に関する本実験の結果、IPNV については -20°C での保存が可能であるが、IHNV については凍結開始 1 週間後に明らかな感染力価

の低下が認められた。しかし IHNV では 1 週間以降の力価が比較的安定であることから、凍結初期にウイルスの失活が起こったと考えられる。この点については PIETSCH *et al.* (1977) の言うように凍結速度の影響あるいはウイルス保護剤を含まないことの影響によるものであろう。したがって消毒剤の実験に際しては、IPNV では -20°C で凍結保存した CAV の使用が可能であるが、IHNV については実験の都度 CAV を調製する必要がある。

調製法の異なる 3 種のウイルス液に対するヨード剤の殺ウイルス効果を比較した結果、ヨード剤の活性阻害は FV 液が最も大きく、FV 濃縮液が最も少なかった。ウイルス液による消毒剤の活性阻害について、渡辺ら (1978) は CAV 液では消毒剤の活性阻害が極めて少ないと報告している。しかし本実験では CAV 液で消毒剤活性阻害が認められたが、これについては CAV 回収時の細胞破壊片混入の影響が考えられる。

3. 作用温度に関する検討

消毒剤の殺菌作用は化学反応と同じように作用時の温度の影響を受ける。一般に温度係数 (Q_{10}) は 2~3 の範囲にあるが、 20°C 以下の低温条件下では Q_{10} の値が著しく増大することがあり、逆に 2 以下のこともある (芝崎, 1977)。したがって消毒剤の活性の面からは、消毒剤の作用温度は 20°C 以上で適していることになる。しかしサケ科魚類では病原ウイルスの増殖至適温度が低温域にあるため、作用温度はウイルスの増殖温度条件という面からの制限を受ける。IPNV は高温にも比較的耐性があると言われているが、IHNV は高温では不安定で、McALLISTER (1974) は淡水中で 20.6°C で 24 時間以内に IHNV が 90% 以上失活したと報告している。本実験の結果では IPNV は $10\sim 37^{\circ}\text{C}$ の範囲で活性の低下は認められず、 20°C における殺ウイルス効果の評価が可能であった。しかし IHNV では 20°C 以上でウイルスの不活化が起こるため、 20°C での殺ウイルス効果の評価は困難である。また両ウイルスはサケ科魚類の稚魚の病原体であり、低温条件下での殺ウイルス効果を明らかにする必要があることも考え合わせると、両ウイルスに対する消毒剤の殺ウイルス効果の評価は、作用温度を 15°C に設定して行うのが妥当であろう。

4. 消毒剤の細胞毒性除去に関する検討

消毒剤の株化細胞に対する毒性除去法としては、中和法と希釈法が代表的方法である。中和法に関しては飯塚ら (1975)、北村 (1976) および吐山 (1976) が中和剤として、ハロゲン系消毒剤に対してはチオ硫酸ナトリウム

ホルマリンにはジメドン、炭酸水素ナトリウムおよびアンモニア、逆性石鹼とクロールヘキシジンには陰イオン界面活性剤、レシチンおよび牛乳、グルタルアルデヒドには炭酸水素ナトリウムおよび二硫化水素、水銀剤にはチオグリコレートおよびシスチン、ヘキサクロロフェンには Tween 80 および血清を挙げている。このうちハロゲン系消毒剤に対するチオ硫酸ナトリウムの中和効果は高く、渡辺ら (1978) は塩素剤、ヨード剤の殺ウイルス効力評価実験に際し、N/10 チオ硫酸ナトリウムを使用した。著者ら (1981) も魚類ウイルスの実験において、N/10 チオ硫酸ナトリウムの使用が可能であることを確認した。しかしハロゲン系以外の消毒剤の中和剤については、中和による消毒剤の作用停止後も中和剤の細胞毒性が残るため、作用停止後にウイルス粒子の分画遠心による洗浄や透析による毒性成分の除去等の操作が必要である。希釈法については本実験結果から、アルコール系およびフェノール系消毒剤については、細胞毒性除去に要する希釈倍数が低いため、接種材料を希釈することによるウイルス感染力価の低下などの影響が少ないと考えられ、希釈法の導入が可能である。しかしホルマリンや逆性石鹼製剤については、細胞毒性除去に要する希釈倍数が高いため、これらの消毒剤に関して希釈法を導入する場合には、濃縮などの供試ウイルス液の感染力価を高くするための処置が必要であろう。

以上、凍結融解法により調製した細胞内ウイルス液と消毒剤を 15°C の条件下で作用させ、IPNV では CHSE-214 細胞、IHNV では EPC 細胞を用いて、ウイルスの不活化の有無を判定することによって、両ウイルスに対する消毒剤の効力を評価することが可能と考えられた。

要 約

魚類ウイルスに対する消毒剤の効力評価法および供試細胞について検討した。供試した消毒剤はハロゲン系消毒剤、エタノール、プロパノール、石炭酸、クレゾール石鹼、塩化ベンザルコニウムおよびホルマリンである。実験には IPNV (Buhl 株) とヤマメから分離した IHNV 野生株 (HV 7601) を使用した。

効力評価に使用する株化細胞について検討したところ、ウイルスの増殖、分離、定量に IPNV では CHSE-214 細胞、IHNV では EPC 細胞が適していた。

ウイルス液の調製法に関する検討では、まず消毒剤の活性阻害の少ないウイルス液を調製することを目的に、細胞内ウイルス (CAV) 回収法を検討し、IPNV は CHSE-214 細胞に接種し 15°C で 12~13 時間培養後に、

IHNV は EPC 細胞に接種し 15°C で 15 時間培養後に凍結融解法によって効率的なウイルスの回収が可能であることが解った。

PVP-I 沃度を用いて消毒剤の活性阻害の程度を検討したところ、CAV 液は培養液中に遊離したウイルス (FV) を濃縮精製したもの (FV 濃縮液) に比べると、活性阻害が認められたものの、FV 液に比べると活性阻害ははるかに少なく、CAV 液調製法の簡便性を考慮すると CAV 液が消毒剤の効力評価実験に適すると考えられた。

CAV 液は高い感染力価を示し、IPNV では -20 および -80°C の凍結保存によって、感染力価に変化は見られなかったが、IHNV では凍結保存により感染力価が低下する事が明らかになった。

IHNV および IHNV の適温範囲が低いことから、消毒剤の効力評価には 15°C が適していると考えられた。

消毒剤の細胞に対する毒性除去はハロゲン系消毒剤では 0.1 M のチオ硫酸ナトリウム溶液による中和によって可能であったが、その他の消毒剤では PBS (-) による希釈が有効な毒性除去法であると考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり貴重なご助言と供試ウイルス株の分与を頂いた東京水産大学・佐野徳夫教授ならびに技術的指導を頂いた水産庁中央水産研究所内水面利用部西村定一氏に深謝致します。

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。

文 献

- AHNE, W. (1987): Isolation and characterization of infectious pancreatic necrosis virus from pike (*Esox lucius*). *Arch. of Virology*, **58**, 65-69.
- AMEND, D. F. and J. P. PIETSCH (1972): Virucidal activity of two iodophores to salmonid viruses. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **29**, 61-65.
- ELLIOT, D. G. and D. F. AMEND (1978): Efficacy of certain disinfectants against infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Biol.*, **12**, 277-286.
- FENDRICK, J., L. GROBERG Jr. and J. C. LEONG (1982): Comparative sensitivity of five fish cell lines to wild type infectious haematopoietic necrosis virus from two Oregon sources. *J. Fish Dis.*, **5**, 87-95.
- 飯塚三喜・伊藤 治 (1977): 消毒薬効力試験法, 「動物用医薬品・飼料添加物・新飼料の有用性評価法, 小華和忠・吐山豊秋・米村寿夫編, 500 p, フジ・テクノシステム, 東京」236-264.
- KELLY, R. K. and C. LOH (1975): Replication of IPN virus: a cytochemical and biochemical study in SWT cells (38611). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **148**, 688-693.
- KELLY, R. K., B. W. SOUTER and H. R. MILLER (1978): Fish cell lines: comparisons of CHSE-214, FHM, and RTG-2 in assaying IHN and IPN viruses. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **35**, 1009-1011.
- 北村 敬 (1976): ウイルス検査のための組織培養技術, 近代出版, 東京, 418p.
- MCALLISTER, P. E., J. L. FRYER, and L. S. PILCHER (1974): Further characterization of infectious hematopoietic necrosis virus of salmonid fish (Oregon strain). *Arch. ges. Virusforsch.*, **44**, 270-279.
- McMICHEL, J. S., J. L. FRYER and K. S. PILCHER (1975): An antigenic comparison of three strains of infectious pancreatic necrosis virus of salmonid fish. *Aquaculture*, **6**, 203-210.
- MALSBERGER, R. G., and C. P. CERINI (1965): Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **129** (Art 1), 320-327.
- MOSS, L. H. and M. GRAVELL (1969): Ultrastructure and sequential development of infectious pancreatic necrosis virus. *Jour. Virol.*, **3**, 52-58.
- PIETSCH, J. P., D. F. AMEND and C. M. MILLER (1977): Survival of infectious hematopoietic necrosis virus held under various environmental conditions. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **34**, 1360-1364.
- 佐々木治雄・本西 晃・三城 勇・山崎隆義 (1976): ニジマス の IHN について. 長野県水試研報, 魚病, 45-58.
- SCHERRER, R., F. BIC., and J. COHEN (1974): Infectious pancreatic necrosis virus: a study of the influence of temperature and host-cell on virus replication and virus included interferon synthesis. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur*, **125a**, 455-467.
- 芝崎 勲 (1977): 薬剤による殺菌, 「滅菌法・消毒法第1集, (綿貫喆・實川佐太郎・榊原欣作編), 238p, 光文堂, 東京」131-210.
- 吐山豊秋 (1976): 獣医領域における薬剤選択 (2), 動薬研究, **5**, 5-8.
- 渡辺 実・野田伸司・南部敏博・山田不二造・藤本 進 (1978): ウイルスの塩素消毒に関する研究. 1. ウイルス液の組成による塩素消費および塩素消毒効果に対する影響. 岐衛研所報, **23**, 6-11.
- WINGFIELD, W. H., J. L. FRYER and K. S. PILCHER (1969): Properties of the sockeye salmon virus (Oregon strain). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **130**, 1055-1056.
- WOLF, K., M. C. QUIMBY, C. P. CARRLSON and G. L. BULLOCK (1968): Infectious pancreatic necrosis: selection of virus-free stock from a population of carrier trout. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **25**, 383-

391.

WOLF, K. and M. C. QUIMBY (1971): Salmonid virus
Infectious pancreatic necrosis virus. Morphology,
pathology, and serology of first European isolations.

Arch. ges. Virusforsch., **34**, 144-156.

山崎隆義・佐々木治雄・田代文男 (1976): ニジマスの
IPN について. 長野県水産試験場研究報告, 魚病,
28-44.