IPN ウイルスおよび IHN ウイルスに対する 逆性石鹼製剤の殺ウイルス効果^{*1}

井上 潔^{*2}・池谷 文夫^{*3}・山崎 隆義^{*4}・原 武史^{*5}

(1991 年 7 月 8 日受付)

Virucidal Activities of Invert Soaps to IPNV and IHN

Kiyoshi Inouye^{*2}, Fumio Ikeya^{*3}, Takayoshi Yamazaki^{*4}
and Takeshi Hara^{*5}

^{*2} National Research Institute of Aquaculture, Tamaki-cho,
Watarai-gun, Mie 519-04, 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} Research Department, Fisheries Agency, Kasumigaseki,
Chiyoda-ku, Tokyo 100, Japan

(Received July 8, 1991)

Virucidal effects of invert soaps on IPNV and IHN were tested.

Three kinds of invert soap formulae were used: two formulae contained benzalkonium chloride and the other contained benzethonium chloride in the ingredient. All formulae inactivated IHN by the exposure to 0.08% solutions for 15 seconds, but did not inactivate IPNV. Addition of 10% fetal calf serum to IHN suspension reduced the virucidal activity of invert soaps: a fetal calf serum decreased the virucidal activities of benzalkonium chloride and benzethonium chloride to 1/8-1/4 and 1/16, respectively.

魚類病原ウイルスに対する逆性石鹼製剤の殺ウイルス効果についての知見は少ない。逆性石鹼製剤の殺ウイルス効果はウイルスの種類によって異なり、一般的には脂質、特にコレステロールと結合しやすいヘルペスウイルスやアデノウイルス等の親油性のウイルスには有効であるが、エンテロウイルス等の親水性ウイルスには効果がないとされている(渡辺, 1980; Klein and Deforest, 1963)。サケ・マス類の病原ウイルスに関して、山崎ら(1976)は塩化ベンザルコニウム製剤の 1:125 希釈液(原液濃度換算 0.08%)で、30 分間処理しても IPNV が不活化されなかったことを報告している。しかし、この

研究は作用時間が 30 分のみの単一時間について行われたもので、例えば手指等の消毒を想定した短時間処理や、長時間処理が可能な器具機材の消毒等における逆性石鹼の殺ウイルス効果を判断するためには、十分な資料とは言い難い。

本研究では、塩化ベンザルコニウムと塩化ベンゼトニウム製剤を用いて、市販の逆性石鹼消毒剤の IPNV および IHN に対する殺ウイルス効果について検討した。

材料及び方法

1. 供試ウイルス液

前報(井上ら, 1990)と同様に、IPNV (Buhl strain) は CHSE-214 細胞を用いて、また IHN (HV 7601) は EPC 細胞を用いて増殖させ、細胞内ウイルスを回収し、供試ウイルス液とした。

^{*1} サケ科験類の伝染性病原体の消毒法に関する研究 4

^{*2} 水産庁養殖研究所

^{*3} 東京都水産試験場奥多摩分場

^{*4} 長野県水産試験場

^{*5} 水産庁研究部

2. 供試消毒剤

塩化ベンザルコニウムを 8.0%, ポリオクチルポリアミノエチルグリシンを 1.8%, ポリオキシエチレンアルキルフェノールエーテルを 1.2% 含む合剤*⁶ (以降ベンザルコニウム A 液と表記する), 塩化ベンザルコニウムの 10% 製剤*⁷ (以降ベンザルコニウム B 液と表記する)。および塩化ベンゼトニウム (以降ベンゼトニウム液と表記する) 10% 製剤*⁸ の 3 種を使用した。

3. 逆性石鹼の細胞毒性

培養細胞に対する逆性石鹼の毒性を調べるために, 15°C の水浴中で 1:62.5 から 1:500 までの 4 濃度の逆性石鹼希釈液と Mg^{++} および Ca^{++} イオンを含まない磷酸緩衝食塩水 (PBS (-)) を等量混合し, 牛胎児血清を 2% の割合に添加した MEM 培地 (MEM₂) で 10^2 , 10^3 および 10^4 倍に 10 倍段階希釈した後, CHSE-214 または EPC 細胞を培養したマイクロプレートに 1 well あたり 0.05 ml/ ずつ, 4 well に添加した。

4. 無処理ウイルス液の活性

IPNV ($10^{7.8}$ ・TCID₅₀/ml) および IHN 液 ($10^{8.9}$ ・TCID₅₀/ml) を 15°C 水浴中に静置し, 5, 15, 30, 60 分後に, その 10^2 から 10^4 まで 3 段階の 10 倍段階希釈液を, マイクロプレートに培養した CHSE-214 および EPC 細胞にそれぞれ接種して, 時間の経過にともなうウイルス不活化の有無を調べた。

5. 逆性石鹼の濃度と作用時間

(実験 1)

IPNV に対する逆性石鹼の 1:125 から 1:1000 希釈液の殺ウイルス効果を調べるため, PBS(-) で 1:62.5, 1:125, 1:250, 1:500 に希釈した逆性石鹼液とウイルス懸濁液を等量混合し, 5, 15, 30, 60 分間作用させた。また, IHN に対しては逆性石鹼の 1:62.5, 1:125, 1:250, 1:500, 1:1000 倍希釈液を同様に作用させ, 殺ウイルス効果を調べた。供試ウイルス液の感染力価は IPNV が $10^{7.8}$ ・TCID₅₀/ml, IHN は $10^{8.9}$ ・TCID₅₀/ml であった。

(実験 2)

IPNV に対する各種消毒剤の高濃度溶液の殺ウイルス効果を調べるため, 逆性石鹼を PBS (-) で 1:12.5, 1:25, 1:50, に希釈し等量の IPNV 液 ($10^{8.1}$ ・TCID₅₀/ml) と混合して 15°C の水浴中に静置し, 5, 15, 30, 60 分間作用させた。

(実験 3)

IHN に対する短時間処理の殺ウイルス効果を調べるため, 逆性石鹼を PBS (-) で 1:62.5, 1:125, 1:250, 1:500 に希釈し等量の IHN 液 ($10^{8.8}$ ・TCID₅₀/ml) と混合し, 15°C の水浴中で 15, 30, 60 秒間作用させた。

(実験 4)

逆性石鹼の殺 IHN 効果に対する有機物の影響を調べるため, 血清を含む IHN 液を用いた場合の逆性石鹼の殺ウイルス効果を検討した。実験では逆性石鹼を牛胎児血清を 10% の割合で添加した MEM 培地(MEM₁₀) で 1:62.5, 1:125, 1:250, 1:500 に希釈し, 等量のウイルス液 ($10^{8.9}$ ・TCID₅₀/ml) と混合し, 15°C の水浴中で 15, 30, 60 分間作用させたときの殺ウイルス効果を調べた。

6. 実験手順

逆性石鹼希釈液を, 5 ml 容量のバイアル瓶に 0.5 ml/ 分注し, 15°C の水浴中に静置する。各バイアル瓶に 15°C の水浴中に静置したウイルス液を等量加え, 十分混和する。所定の時間を経過した後, 細胞毒性試験の結果から, あらかじめ HEPES 緩衝食塩水を含む MEM₂ (MEM₂・HEPES) を 0.9 ml/ 分注した別のバイアルにその混和液を 0.1 ml/ とり, 10 倍希釈した後, さらに MEM₂ で最終的に 10^{-8} となるよう希釈した。この希釈液を, マイクロプレートに培養した細胞に, 1 well あたり 0.05 ml/ ずつ接種した。接種には 1 希釈液に対し 4 well の培養細胞を使用した。

7. 殺ウイルス効果の判定

処理ウイルス液接種後, CPE の発現の有無を 15°C で 2 週間観察し, 全ての well で CPE の発現が阻止された場合を有効, 全てに CPE が発現した場合を無効として殺ウイルス効果を判定し, 有効を (+), 無効を (-), 4 well の一部に CPE 発現阻止が認められた場合を (±) と表示した。

なお, IPNV に対する高濃度消毒剤液の殺ウイルス効果については, 所定時間作用後の残存ウイルス量をマイクロタイター法により定量し, 感染力価 (Log・TCID₅₀/ml) を Behrens-Kärber 法によって算定した。

結 果

各種逆性石鹼の CHSE-214 細胞に対する毒性試験の結果を Table 1, EPC 細胞に対する結果を Table 2 にそれぞれ示した。

CHSE-214 の場合, ベンザルコニウム A および B 液

*⁶ 商品名: 北研ゼット

*⁷ 商品名: オスバン液「ダイゴ」, 武田薬品工業

*⁸ 商品名: ハイアミン液, 株式会社三共

Table 1. Cell toxic effect of invert soaps on CHSE-214 cell

Germicides	Concentration (1 : n)	Dilution (1 : 10 ⁿ)* ⁴		
		2.0	3.0	4.0
Benzalkonium chloride (A)* ¹	125	4* ⁵	0	0
	250	4	0	0
	500	0	0	0
	1,000	0	0	0
Benzalkonium chloride (B)* ²	125	4	0	0
	250	4	0	0
	500	0	0	0
	1,000	0	0	0
Benzethonium* ³ chloride	125	4	0	0
	250	0	0	0
	500	0	0	0
	1,000	0	0	0

*¹ The original solution contained 8% of benzalkonium chloride, 1.8% of polyoctylaminoethylglycine and 1.2% of polyoxyethylenealkylphenoether in solution (Hokken Z).

*² 10% (w/v) solution of benzalkonium chloride (Osuban).

*³ 10% (w/v) solution of benzethonium chloride (Hiamine).

*⁴ Germicide solution of each concentration were further diluted with PBS (-), mixed with 0.1 ml MEM 2 containing CHSE-214 cells in microtiter plate wells and incubated at 15°C.

*⁵ Figures indicate the number of microtiter plate wells which showed CTE out of 4 wells.

Table 2. Cell toxic effect of invert soaps on EPC cell

Germicides	Concentration (1 : n)	Dilution (1 : 10 ⁿ)* ¹		
		2.0	3.0	4.0
Benzalkonium chloride (A)	125	4* ²	0	0
	250	4	0	0
	500	0	0	0
	1,000	0	0	0
Benzalkonium chloride (B)	125	4	0	0
	250	4	0	0
	500	0	0	0
	1,000	0	0	0
Benzethonium chloride	125	0	0	0
	250	0	0	0
	500	0	0	0
	1,000	0	0	0

*¹ Germicide solution of each concentration were further diluted with PBS (-), mixed with 0.1 ml MEM 2 containing EPC cells in microtiter plate wells and incubated at 15°C.

*² Figures indicate the number of microtiter plate wells which showed CPE out of 4 wells.

Table 3. CPE on CHSE-214 and EPC by untreated viral solutions

Cell	Virus	Experimental Period (min)	Dilution (1 : 10 ⁿ)		
			2.0	3.0	4.0
CHSE- 214	IPNV	5	4*	4	4
		15	4	4	4
		30	4	4	4
		60	4	4	4
EPC	IHN	5	4	4	4
		15	4	4	4
		30	4	4	4
		60	4	4	4

* Figures indicate the number of wells which showed CPE out of 4 virus-infected wells.

では、1 : 125 と 1 : 250 溶液の 10² 倍希釈液で細胞毒性が発現し、ベンゼトニウム液では 1 : 125 溶液の 10² 倍希釈液で細胞毒性が発現した。また EPC の場合も、ベンザルコニウム A および B 液の 1 : 125 と 1 : 250 溶液の 10² 倍希釈液では細胞毒性が発現したが、ベンゼトニウム液では、本実験に使用した濃度では EPC 細胞に対する毒性は観察されなかった。

15°C で一定時間処理後のウイルス液接種による各細胞における CPE の発現の有無の観察結果を Table 3 に示した。

表に示したように IPNV および IHN 液は、本実験条件下で処理後も、すべての well で CPE を発現した。

IPNV に対する逆性石鹼の殺ウイルス効果 (実験 1) を Table 4 に示した。表より明かなように、いずれの逆性石鹼製剤でも設定した濃度、時間では IPNV に対する

殺ウイルス効果は認められなかった。また Table 5 には更に高い濃度の逆性石鹼で処理したときの IPNV の活性を感染力価 (Log·TCID₅₀/ml) で示した (実験 2) が、逆性石鹼の高濃度 (1 : 25) 溶液を 60 分間作用させても、感染力価は 10^{8.1}~10^{8.6}·TCID₅₀/ml を維持し、IPNV の感染力価の低下は認められなかった。

IHN ウイルスに対する各種逆性石鹼の殺ウイルス効果 (実験 1) を Table 6 に示した。

Table 4. Virucidal effect of invert soaps of IPNV

Germicides	Period of Treatment (min)	Concentration (1 : n)			
		125	250	500	1,000
Benzalkonium chloride (A)	5	—	—	—	—
	15	—	—	—	—
	30	—	—	—	—
	60	—	—	—	—
Benzalkonium chloride (B)	5	—	—	—	—
	15	—	—	—	—
	30	—	—	—	—
	60	—	—	—	—
Benzethonium chloride	5	—	—	—	—
	15	—	—	—	—
	30	—	—	—	—
	60	—	—	—	—

—: no effect.

ベンザルコニウム A および B 液は、1 : 1000 以上の濃度の溶液では 5 分間以上の処理で IHNВ を不活化し有効であった。しかし、1 : 2000 溶液では、30 分間作用させた場合でも、殺ウイルス効果は認められなかった。ベンゼトニウム液の 1 : 1000 溶液は、5 分では十分な効果が得られず、完全な殺ウイルス効果を得るのに 15 分以上を要した。

逆性石鹼製剤の IHNВ に対する短時間処理による殺ウイルス効果 (実験 3) を Table 7 に示した。

ベンザルコニウム A 液では 1 : 250 以上の濃度の溶液による 15 秒間以上の処理で殺ウイルス効果がみられた。しかし 1 : 500 溶液は、15 秒間では効果は充分でなく、

Table 5. Virucidal effect of invert soaps of high concentrations on IPNV

Germicides	Period of Treatment (min)	Concentration (1 : n)		
		25	50	100
Benzalkonium chloride (A)	5	8.8*	8.8	8.8
	15	8.8	8.8	8.8
	30	8.8	8.3	8.8
	60	8.1	7.8	8.8
Benzalkonium chloride (B)	5	8.8	8.8	8.8
	15	8.8	8.8	8.8
	30	8.6	7.8	8.8
	60	8.6	8.3	8.8
Benzethonium chloride	5	8.8	8.8	8.8
	15	8.8	8.8	8.8
	30	8.6	8.3	8.8
	60	8.3	8.6	8.1

* Figures indicate the infectivity titer (Log TCID₅₀/ml) of IPNV.

殺ウイルス効果を得るのには 30 秒以上を要した。1 : 1000 溶液では 60 秒以内の短時間処理による殺ウイルス効果は認められなかった。

ベンザルコニウム B 液では 1 : 125 溶液による 15 秒間以上の処理で殺ウイルス効果が認められたが、1 : 250 溶液は 15 秒間では十分な効果がなく、完全な殺ウイルス効果を得るのには 30 秒以上を要した。1 : 500 以下の濃度では 60 秒以内の短時間処理による殺ウイルス効果は認められなかった。

Table 6. Virucidal effect of invert soaps on IHNВ

Germicides	Period of Treatment (min)	Concentration (1 : n)				
		125	250	500	1,000	2,000
Benzalkonium chloride (A)	5	+	+	+	+	—
	15	+	+	+	+	—
	30	+	+	+	+	—
	60	+	+	+	+	—
Benzalkonium chloride (B)	5	+	+	+	+	—
	15	+	+	+	+	—
	30	+	+	+	+	—
	60	+	+	+	+	—
Benzethonium chloride	5	+	+	+	±	—
	15	+	+	+	+	—
	30	+	+	+	+	—
	60	+	+	+	+	—

+, inactivated; —, no effect; ±, inactivated in some experimental wells.

Table 7. Virucidal effect of invert soaps on IHNV by exposure of short periods

Germicides	Period of Treatment (sec)	Concentration (1 : n)			
		125	250	500	1,000
Benzalkonium chloride (A)	15	+	+	±	—
	30	+	+	+	—
	60	+	+	+	—
Benzalkonium chloride (B)	15	+	±	—	—
	30	+	+	—	—
	60	+	+	—	—
Benzethonium chloride	15	+	±	—	—
	30	+	±	—	—
	60	+	+	—	—

+, — and ± as in Table 6.

Table 8. Virucidal effect of invert soaps on IHNV with presence of 10% fetal calf serum

Germicides	Period of Treatment (min)	Concentration (1 : n)		
		125	250	500
Benzalkonium chloride (A)	5	+	—	—
	15	+	±	—
	30	+	+	—
Benzalkonium chloride (B)	5	—	—	—
	15	±	—	—
	30	+	—	—
Benzethonium chloride	5	—	—	—
	15	—	—	—
	30	—	—	—

+, — and ± as in Table 6.

ベンゼトニウム液では 1 : 125 溶液で 15 秒間以上の処理で殺ウイルス効果が認められたが、1 : 250 より低い濃度では短時間処理による殺ウイルス効果は認められなかった。

逆性石鹼およびウイルスの希釈に、牛胎児血清を 10% 含む MEM 培地を使用したときの結果 (実験 4) を Table 8 に示した。

ベンザルコニウム A 液では、1 : 125 溶液で 5 分以上、1 : 250 溶液では 30 分の作用で殺ウイルス効果が認められ、ベンザルコニウム B 液では 1 : 125 溶液で 30 分間の処理で殺ウイルス効果が認められたのに対して、ベンゼトニウム液ではいずれの条件下においても殺ウイルス効果は認められず、逆性石鹼の殺ウイルス効果は有機物の影響を受けて低下した。

考 察

逆性石鹼は魚類の株化細胞に対する毒性が高く (井上ら, 1990), 殺ウイルス効果の判定では細胞毒性除去が必要である。一般的な細胞毒性除去法として中和法と希釈法がある。逆性石鹼の中和剤としてはレンチン, 陰イオン界面活性剤あるいは牛乳などがある (北村, 1976; 吐山, 1976; 飯塚・伊藤, 1977)。しかし, これらの中和剤は, 中和剤自体あるいは中和生成物の細胞に及ぼす影響が懸念される。一方, 希釈法では希釈倍率が高くなると実験精度の低下が懸念される。

本実験条件下で, ウイルス・消毒剤混合液を 10^8 倍希釈することにより培養細胞に対する毒性を除去することができ, 一方, 無処理ウイルス液では設定実験時間処理後も 10^4 倍希釈ですべての well に CPE が観察されたことから, 本手法により逆性石鹼による殺ウイルス効果を高い精度で調べることができると考えられる。本報では 10^8 希釈液を接種した 4 well すべてに CPE が発現しなかったときに有効 (+) と判定した。

IPNV に対して, 供試した 3 種の逆性石鹼製剤は全く殺ウイルス効果を示さなかった。つまり Kline and Deforest (1963) が報告した親水性ウイルス, あるいは渡辺ら (1975) が報告したエンテロウイルスと同様に, 逆性石鹼製剤によって IPNV を不活化することは困難と考えられる。

IHNV に対して殺ウイルス効果を発揮する供試消毒剤の最大希釈倍数と, その濃度における最低処理時間を示すと, ベンザルコニウム A 液では 1 : 500 で 30 秒, ベンザルコニウム B 液では 1 : 250 で 30 秒, ベンゼトニウム液では 1 : 250 で 60 秒であり, ベンザルコニウム A 液はベンザルコニウム B 液およびベンゼトニウム液のほぼ 2 倍の効果を示した。ベンザルコニウム B 液とベンゼトニウム液の結果から, 逆性石鹼の IHNV に対する有効濃度をそれぞれの成分含量に換算すると, 塩化ベンザルコニウムと塩化ベンゼトニウムいずれも 0.04% であった。

各消毒剤の血清の存在下における殺ウイルス効果を, 30 分間処理で殺ウイルス効果が認められた最低濃度と比較すると, ベンザルコニウム A 液は 1 : 250, ベンザルコニウム B 液は 1 : 125 となり, 血清を含まない場合と同様にベンザルコニウム A 液は B 液の 2 倍の効果を示した。さらに 30 分間処理における有効濃度を, 血清を含まない場合と比較すると, 血清の添加によって, ベンザルコニウム A 液は効果が 1/4 に低下し, ベンザルコニ

ウム B 液では 1/8, ペンゼトニウム液では 1/16 以下に低下し, ペンゼトニウム液が最も有機物の影響を受け易く, 次いでペンザルコニウム B, ペンザルコニウム A 液の順であった。

これらの結果から, ペンザルコニウム A 液は他の 2 製剤よりも IHNV に対する殺ウイルス効果が高く, 有機物による影響を受けにくいことが明らかになった。これはペンザルコニウム A 液がグリシン系両性石鹼との合剤であり, 両性石鹼は有機物の存在による効果の低下が少ない(柴崎, 1977) ことによると考えられる。

以上の結果から逆性石鹼は IPN の防疫に関しては効果は期待できない。しかし IHNV に対する殺ウイルス効果は高く, IHN 防疫のための消毒剤として養殖現場で使用することは可能と考えられる。

養殖現場における本剤の使用に際しては, 防疫効果を高めるために, 有機物による影響, 逆性石鹼製剤の特性である金属腐食性と繊維への吸着性等, 使用上考慮すべき問題がいくつかある。これらの特性は, タモ網等の養殖機材の消毒の場合には無視できない問題である。金属腐食性の問題については亜硝酸ナトリウムを消毒液中に 0.2% の割合に添加することにより, 腐食防止が可能とされる(高橋, 1982)。しかし, 網地等への薬剤の吸着による消毒液の効力低下を防ぐ特別の方法が見当らず, 薬液を頻繁に取り替えるなどの使用上の注意が必要と考えられる。

文 献

- 飯塚三喜・伊藤 治 (1977): 消毒薬効力評価法, 「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, フジ・テクノシステム, 東京」, 236-264.
- 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史 (1990): 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. 魚病研究, 25, 69-79.
- 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, 418 p.
- Kline, M. and A. Deforest (1963): *Soap Chem. Specialties*, 34, 70. (渡辺, 1980 より間接引用).
- 柴崎 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), 光文堂, 東京」 131-210.
- 高橋修和・薩田清明・三木 康 (1982): 滅菌・消毒法マニュアル, 藤田企画出版, 埼玉, 175 pp.
- 吐山豊秋 (1976): 獣医領域における薬剤選択 (2), 動薬研究, 5, 5-1.
- 渡辺 実・野田伸司・山田不二造・藤本 進 (1975): エンテロウイルスに対する消毒薬の効果, 岐衛研所報, 20, 1-5.
- 渡辺 実 (1980): 消毒剤によるウイルスの不活化, 臨床とウイルス, 8, 41-45.
- 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, 魚病研究, 28-44.