

牛鼻炎Bウイルスと牛アデノウイルス7型に対する 各種処理を施した消毒薬の抗ウイルス効果

桐澤力雄^{1)†} 川本 哲²⁾ 永幡 肇¹⁾

1) 酪農学園大学獣医学群 (〒069-8501 江別市文京台緑町582)

2) 北海道立総合研究機構畜産試験場 (〒081-0038 上川郡新得町字新得西5-39-1)

(2012年5月31日受付・2012年7月18日受理)

要 約

家畜防疫に用いられている消毒用資材の現場の使用条件下での口蹄疫ウイルスに対する消毒効果の指標とするために、口蹄疫ウイルスと同様の性状を持つ牛鼻炎Bウイルス (BRBV) とエンベロープを持たない牛アデノウイルス7型 (BAdV-7) を用いて検討した。8種類の消毒薬 (消石灰、炭酸ナトリウム、クエン酸、ヨウ素系、塩素系、アルデヒド系、複合及び水酸化ナトリウム添加消毒薬) を用いた。スラリー処理で両ウイルスに効果を示したのは消石灰と炭酸ナトリウムであった。生乳処理では、BAdV-7に対する塩素系消毒薬以外はすべて効果を示した。土壌散布と堆肥散布後のBRBVに対する効果は消石灰と炭酸ナトリウムでみられ、BAdV-7に対しては消石灰のみが効果を示した。以上の成績より、口蹄疫ウイルスの土壌や堆肥における消毒には消石灰と炭酸ナトリウム、生乳に対してはすべての消毒薬の有効性が示唆された。——キーワード：消毒薬、口蹄疫ウイルス、牛鼻炎Bウイルス、牛アデノウイルス7型。

----- 日獣会誌 65, 864~870 (2012)

口蹄疫は海外悪性伝染病の一つで、ピコルナウイルス科アフトウイルス属の口蹄疫ウイルスに起因する [1]。本病は2010年4月に10年ぶりにわが国で発生し、約29万頭の家畜が殺処分された。終息するまで5カ月を要し、その後、2011年2月に「ワクチン非接種口蹄疫清浄国」として清浄国に復帰した。本病が発生すると畜産に対する大規模な直接被害だけでなく、物流、観光産業にも大きな影響を与え、地域社会が崩壊する危険性もある。適切な消毒法が確立されれば、伝播に菌止めがかかり、地域社会・地域経済への影響を小さくすることができる。

口蹄疫ウイルスの不活化について国際獣疫事務局 (OIE) は、2%水酸化ナトリウム、4%炭酸ナトリウム、0.2%クエン酸、2%酢酸、3%次亜塩素酸ナトリウム、1%ペルオキシ硫酸カリウム/塩化ナトリウムが有効であるとしている (Foot and mouth disease, <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/technical-disease-cards>)。白井 [2] は、ヨウ素系、塩素系、アルデヒド系、複合及びNaOH添加消毒薬が口蹄疫ウイルスに有効であることを報告している。しかし、これらの消毒薬の実際の使用条件下での有効性については不明

である。口蹄疫ウイルスを用いた実験は、わが国では動物衛生研究所でしか行えないため、本研究では、それに代わるウイルスとして、ピコルナウイルス科アフトウイルス属の牛鼻炎Bウイルス (BRBV) とアデノウイルス科アタデノウイルス属の牛アデノウイルス7型 (BAdV-7) を選択した。BRBVは口蹄疫と同様の酸感受性を持っており、以前は牛ライノウイルス2型と呼ばれライノウイルス属に分類されていたが、塩基配列等のデータにより [3]、近年、口蹄疫ウイルスと同じアフトウイルス属に分類された [4]。牛アデノウイルスは口蹄疫と同様エンベロープを持たず、野外に常在しているウイルスである。両ウイルスに対する消毒薬の評価を総合的に判断すれば、口蹄疫ウイルスに対する評価の推定が可能になると思われる。今回、家畜防疫の現場で用いられている消毒用資材について、現場の使用条件下での消毒効果を両ウイルスの生物活性を指標に検討した。

材料及び方法

消毒薬：試験には、消石灰 (アルカリ分65%、北海道石灰化工(株)、苫小牧)、クエン酸 (純度99.5%以上、シグマアルドリッチ ジャパン(株)、東京)、炭酸ナトリウ

† 連絡責任者：桐澤力雄 (酪農学園大学獣医学群獣医ウイルス学ユニット)

〒069-8501 江別市文京台緑町582 ☎011-388-4748 FAX 011-387-5890 E-mail : r-kirisa@rakuno.ac.jp

表1 各種消毒薬の牛鼻炎Bウイルス (BRBV) と牛アデノウイルス7型 (BAdV-7) に対する抗ウイルス効果

消毒薬	濃度・希釈倍数 ¹⁾	pH	BRBV		BAdV-7	
			25℃	0℃	25℃	0℃
消石灰乳	20(%)	12.6 (12.6) ²⁾	≥2.75 ³⁾	≥2.75	≥5.50	≥5.50
クエン酸	0.80(%)	2.0 (2.2)	≥2.75	≥2.75	2.25	2.75
	0.20	2.8 (3.0)	≥2.75	≥2.75	2.25	1.00
	0.05	3.6 (3.8)	≥2.75	≥2.75	0.50	0
炭酸ナトリウム	16(%)	11.8 (11.8)	≥2.75	≥2.75	≥5.50	≥5.50
	4	11.8 (11.8)	≥2.75	≥2.75	≥5.50	4.75
	1	11.8 (11.8)	≥2.75	≥2.75	4.25	0.25
ヨウ素系	100(倍)	1.8 (1.8)	≥2.75	≥2.75	3.50	3.50
	400	4.0 (4.8)	≥2.75	≥2.75	0.25	0.25
	1,600	5.4 (6.8)	0	-0.50	0	0.25
塩素系	500(倍)	2.6 (2.6)	≥2.75	≥2.75	≥5.50	≥5.50
	2,000	5.4 (6.0)	≥2.75	≥2.75	4.75	1.75
	8,000	6.0 (6.8)	0.75	0	0.25	0
アルデヒド系	200(倍)	8.4 (8.0)	≥2.75	≥2.75	≥5.50	≥5.50
	800	8.4 (8.0)	≥2.75	≥2.75	≥5.50	≥5.50
	3,200	8.4 (8.0)	≥2.75	1.50	≥5.50	1.50
複合	100(倍)	12.6 (12.6)	≥2.75	≥2.75	≥5.50	≥5.50
	400	11.4 (11.4)	≥2.75	≥2.75	1.25	0.25
	1,600	11.0 (11.0)	≥2.75	≥2.75	0.50	0.25
NaOH 添加	500(倍)	12.8 (12.8)	≥2.75	≥2.75	≥5.50	≥5.50
	2,000	12.8 (12.8)	≥2.75	≥2.75	≥5.50	≥5.50
	8,000	12.8 (12.8)	≥2.75	≥2.75	≥5.50	≥5.50
水道水		7.2 (7.2)	-0.25	-0.25	0	0.25

1) ヨウ素系以下の消毒薬の中央値は農林水産省が提示している口蹄疫ウイルス不活化に有効な最高希釈倍数

2) () 内は、消毒薬と維持培地を混合した後の pH

3) 対照のウイルス価との差 (log の指数差; 値が大きいほど不活化効果が高い)

ム (純度99%以上, シグマアルドリッチ ジャパン(株), 東京), ヨウ素系としてノノキシノール・ヨード (クリナップA, セラケム(株), 世羅), 塩素系としてペルオキソ-硫酸水素カリウム・塩化ナトリウム (アンテックビルコンS, バイエル薬品(株), 東京), アルデヒド系としてグルタルアルデヒド (グルタクリン, ヤシマ産業(株), 東京), 複合としてアルキルジアミノエチルグリシン・塩化ベンザルコニウムとアルカリ性ビルダー配合の洗浄性補助剤 (アリバンド, セラケム(株), 世羅) 及び NaOH 添加消毒薬として塩化ジデシルジメチルアンモニウム (クリアキル-100 (0.1% NaOH 含), 田村製薬(株), 東京) を用いた。クエン酸と消石灰以外の消毒薬の希釈倍数は農水省発表 (http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/katiku_yobo/k_fmd/pdf/syoudoku.pdf) の口蹄疫ウイルスに対して抗ウイルス効果を示す最高希釈倍数を中心に, 4倍高濃度と4倍低濃度を設定した。消毒薬の希釈は水道水で行った。クエン酸についてはOIE推奨濃度の0.2%を中心濃度に設定した。消石灰は粉末のまま, あるいは水道水で20%消石灰乳として試験に使用した。

ウイルス: ピコルナウイルス科アフトウイルス属のBRBVのEC11株 [5] とアデノウイルス科アタデノウイルス属のBAdV-7のFukuroi株 [6] を用いた。BRBVの増殖には子牛腎初代培養細胞を, BAdV-7では子牛精巣初代培養細胞を用いた。

ウイルス力価: 種々のpHの緩衝液あるいは各種消毒薬180 μ lとウイルス液20 μ lを混合し, 室温(25℃)で1時間反応させた。対照はMEM 180 μ lとウイルス液20 μ lを混和したものとした。緩衝液と消毒薬の除去はデキストラン誘導体ゲル (セファデックスLH-20, GEヘルスケア(株), 東京) を用いたゲル濾過で行った。濾液はMEMで2倍に希釈した後に10倍階段希釈し, 96ウェルプレートの培養細胞に接種し, BRBVでは33℃, BAdV-7は37℃で培養した。ウイルス力価はBRBVでは6日後に, BAdV-7は9日後に細胞変性効果の有無を指標に求めた。抗ウイルス作用は, 対照のウイルス力価を基準にlogの指数差で示し, 指数差2.5以上のもの(99.6%以上のウイルスを不活化)を抗ウイルス効果ありと判定した。

各種pHの緩衝液: pH3.0~11.5の緩衝液を用いた。

BRBV と BAdV-7 に対する消毒薬の抗ウイルス効果

表2 スラリー並びに生乳存在下での各種消毒薬の牛鼻炎Bウイルス (BRBV) と牛アデノウイルス7型 (BAdV-7) に対する抗ウイルス効果

消毒薬	濃度・希釈倍数 ¹⁾	スラリー			生乳		
		pH	BRBV	BAdV-7	pH	BRBV	BAdV-7
消石灰乳	20(%)	12.6 (12.6) ¹⁾	≥2.75 ²⁾	4.75	12.6 (12.6)	≥2.75	≥5.00
クエン酸	0.8(%)	4.2 (4.2)	≥2.75	-0.75	2.4 (2.4)	≥2.75	≥5.00
	0.2	7.8 (7.8)	0.25	-0.50	4.0 (4.0)	≥2.75	4.00
炭酸ナトリウム	16(%)	11.8 (11.8)	≥2.75	≥5.00	11.8 (11.8)	≥2.75	≥5.00
	4	11.8 (11.8)	≥2.75	1.75	11.8 (11.8)	≥2.75	≥5.00
ヨウ素系	100(倍)	8.0 (8.0)	-0.25	-0.75	4.2 (4.4)	≥2.75	≥5.00
	400	8.6 (8.4)	-0.25	-0.50	5.6 (6.0)	≥2.75	3.75
塩素系	500(倍)	8.6 (8.6)	0	-0.50	5.0 (5.0)	≥2.75	0.75
	2,000	8.6 (8.8)	0	-0.25	6.0 (6.0)	1.75	2.00
アルデヒド系	200(倍)	8.2 (8.2)	≥2.75	0.50	7.2 (7.2)	≥2.75	≥5.00
	800	8.8 (8.8)	1.75	-0.25	7.2 (7.2)	2.25	1.75
複合	100(倍)	10.8 (10.6)	≥2.75	-0.25	11.6 (11.6)	≥2.75	≥5.00
	400	10.4 (10.2)	-0.25	-0.50	11.0 (11.0)	≥2.75	3.00
NaOH 添加	500(倍)	10.4 (10.4)	-0.50	-0.25	11.8 (11.8)	≥2.75	≥5.00
	2,000	10.4 (10.4)	1.00	-0.25	11.8 (11.8)	≥2.75	≥5.00
水道水		8.8 (8.8)	0.25	0	6.6 (6.6)	1.25	3.50

1) () 内は、消毒薬と維持培地を混合した後のpH

2) 対照のウイルス価との差 (logの指数差; 値が大きいほど不活化効果が高い)

pH3.0～7.0の緩衝液は0.1Mクエン酸-0.2Mリン酸水素二ナトリウム, pH8.0と9.0の緩衝液は0.1M Tris-0.1M HCl, pH10.0～11.5の緩衝液は0.04Mホウ酸-0.01Mクエン酸で調整した。

スラリー存在下での消毒効果: スラリーは、新鮮牛糞40gと尿60mlを混和したものを、水道水で100倍に希釈して用いた。スラリー1mlと消毒薬9mlを混和し、室温で30分間作用後、2,500rpm 20分間遠心後の上清を実験に使用した。

生乳存在下での消毒効果: 生乳(クロスチェックサンプル, 北海道酪農検定検査協会分与)1mlと消毒薬9mlを混和し、室温で30分間作用後、2,500rpm 20分間遠心し、上清を実験に用いた。

土壌への浸透性, 浸透後の消毒効果: 土壌(北海道立総合研究機構畜産試験場の圃場由来)7kgをバケツ(直径26cm×高さ24.2cm)に詰め、消毒薬を500ml散布した。消石灰の場合、1平方メートル当たり500g(農林水産省推奨散布量, http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/katiku_yobo/k_fmd/pdf/syoudoku.pdf)になるように散布し、その後、水道水を500ml散布した。対照には水道水500mlを散布した。24時間後に表層及び表層より5cmと10cmから、それぞれ20gを採材し、生理食塩水20mlで振とう攪拌し、2,500rpm 20分間遠心後の上清を実験に用いた。

堆肥への浸透性, 浸透後の消毒効果: 堆肥(肉牛パーク敷料由来の肉牛飼養農家自家生産完熟堆肥, 北海道河

東郡)5kgをバケツに詰め、上記の土壌と同様に消毒薬を散布し、24時間後に20gを採材した。生理食塩水30mlで振とう攪拌し、2,500rpm 20分間遠心して得た上清を実験に用いた。

成 績

BRBVとBAdV-7のpH感受性をpH3.0～11.5の緩衝液を用いて調べたところ、BRBVはpH7.0～9.0の間では安定していたが、pH5.5以下並びにpH10.0以上では検出限界値以下に不活化された(データ示さず)。BAdV-7はpH4.0～11.0の間で安定していたが、pH3.0では99%程度が不活化され、pH11.5以上では99.99%以上が不活化された。

各種消毒薬のBRBVとBAdV-7に対する抗ウイルス効果を調べた(表1)。対照のゲル濾過濾液原液のBRBVのウイルス価は室温感作、零度感作ともに $10^{3.05}$ TCID₅₀/30μl, BAdV-7では両感作とも $10^{5.80}$ TCID₅₀/30μlであった。室温で消毒薬を作用させた場合、BRBVに対して消石灰乳は消毒効果を示し、クエン酸以外の6種類の消毒薬についても農林水産省が提示している口蹄疫ウイルスに対する抗ウイルス効果を示した最高希釈濃度もしくはそれよりも薄い濃度で効果を示した。クエン酸についてもOIE推奨濃度(0.2%)より薄い濃度で効果を示した。BAdV-7に対しては、5種類の消毒薬(消石灰乳, 炭酸ナトリウム, 塩素系, アルデヒド系, NaOH添加)がBRBVと同様の効果を示した。

表3 土壤に散布した各種消毒薬の牛鼻炎Bウイルス (BRBV) と牛アデノウイルス7型 (BAdV-7) に対する抗ウイルス効果

消毒薬	濃度・希釈倍数	pH			BRBV			BAdV-7		
		表層	5 cm ¹⁾	10 cm ¹⁾	表層	5 cm	10 cm	表層	5 cm	10 cm
消石灰		11.4 (11.4) ²⁾	5.6	5.6	≥2.75 ²⁾	0	0.50	4.50	-0.50	-0.50
消石灰乳	20 (%)	12.6 (12.6)	5.6	5.6	≥2.75	0	0.25	≥5.00	0	-0.25
クエン酸	0.8 (%)	5.4 (6.0)	5.6	5.6	1.25	0.25	0.50	-0.25	0	-0.50
	0.2	5.6 (7.2)	5.6	5.6	0	0.25	-0.25	-0.25	0	0.50
	0.05	5.6 (7.2)	5.6	5.6	0	0	-0.25	0	0	0
炭酸ナトリウム	16 (%)	11.0 (11.0)	6.4	5.6	≥2.75	0.50	0.50	0.25	-0.50	-0.25
	4	11.0 (11.0)	5.6	5.6	≥2.75	0.25	0.25	0	0.25	0
	1	7.6 (7.6)	5.6	5.6	-0.25	0	0.25	-0.25	-0.25	-0.25
ヨウ素系	100 (倍)	5.4 (7.2)	5.6	5.6	-0.25	-0.25	0.25	-0.50	0.25	-0.50
	400	5.6 (7.2)	5.6	5.6	0.75	0.50	0.25	0	0.50	0.50
	1,600	5.6 (7.2)	5.6	5.6	0.25	-0.25	0	0.50	0.25	-0.25
塩素系	500 (倍)	5.6 (7.2)	5.6	5.6	-0.25	-0.25	0	-0.50	-0.50	0
	2,000	5.6 (7.2)	5.6	5.6	0.50	0.25	0.25	-0.25	-0.25	0
	8,000	5.6 (7.2)	5.6	5.6	0.25	0.25	-0.25	-0.25	0.25	0
アルデヒド系	200 (倍)	5.6 (7.2)	5.6	5.6	≥2.75	0.50	0	≥5.00	0	-0.50
	800	5.6 (7.2)	5.6	5.6	0.25	0.25	0	0	0	0.25
	3,200	5.6 (7.2)	5.6	5.6	0.25	-0.25	0.25	0	-0.50	0.25
複 合	100 (倍)	7.6 (7.2)	5.6	7.4	0.25	0.25	0.25	-0.25	-0.25	-0.50
	400	5.6 (7.2)	5.6	5.6	0.50	0.50	-0.25	0	0.50	-0.25
	1,600	5.6 (7.2)	5.6	5.6	0	0.25	0.25	-0.5	-0.25	-0.25
NaOH添加	500 (倍)	5.6 (7.2)	5.6	5.6	0.25	0.25	0	0	-0.25	-0.5
	2,000	5.6 (7.2)	5.6	5.6	0.25	0.50	0.50	0.25	0.50	0
	8,000	5.6 (7.2)	5.6	5.6	0.25	-0.50	0	-0.25	0.25	-0.25
水道水		5.6 (7.2)	5.6	5.6	0.25	0.75	0.5	0	-0.25	-0.25

1) 表層から5cmと10cmの土壤から回収した消毒薬と維持培地を混合したときのpHは全て7.2

2) () 内は、消毒薬と維持培地を混合した後のpH

3) 対照のウイルス価との差 (logの指数差; 値が大きいかほど不活化効果が高い)

寒冷地での消毒薬の効果を検証する目的で、零度(氷上)で消毒薬とウイルス液を1時間作用させた後の抗ウイルス効果を調べた。その結果、BRBVに対して、アルデヒド系で消毒効果の低下が認められた。BAdV-7に対しては、炭酸ナトリウム、塩素系とアルデヒド系で消毒効果の低下が認められた。

有機物の消毒薬に対する影響を、スラリーと生乳を用いて調べた(表2)。スラリーのpHは8.8、生乳はpH6.6であった。スラリーに1/9量の消毒薬を入れた後の消石灰乳、炭酸ナトリウムとアルデヒド系消毒薬のpHは影響を受けなかったが、酸性のクエン酸、ヨウ素系と塩素系消毒薬は大きな影響を受けた。スラリー処理でBRBVに抗ウイルス効果を示したのは、消石灰乳、クエン酸、炭酸ナトリウム、アルデヒド系と複合であった。BAdV-7では消石灰乳と炭酸ナトリウムであった。

生乳に1/9量の消毒薬を入れた後のpHを測定したところ、消石灰乳と炭酸ナトリウムのpHは影響を受けなかったが、その他では中性側に0.4~2.4pH値が変動した。BRBV並びにBAdV-7に対する抗ウイルス作用は対照の生乳単独でも認められた。すべての消毒薬は

BRBVに対して生乳単独以上の抗ウイルス活性を示した。BAdV-7に対しては、塩素系以外はすべて生乳単独以上の抗ウイルス活性を示した。

ウイルスに汚染された可能性のある土壤や堆肥の消毒法を確立する目的で、消毒薬を直接表面に散布し、24時間後の消毒効果を調べた(表3, 4)。土壤から回収した消毒薬のpHを測定したところ、表層からの消石灰、消石灰乳、炭酸ナトリウム(16%と4%)がpH11以上を示した(表3)。それら以外は、すべて対照の水道水を散布した土壤から回収したものと同様のpH(5.6)を示した。これらの回収した消毒薬に1/9量の維持培地を入れた後のpHを測定したところ、表層から回収した消石灰、消石灰乳と炭酸ナトリウム(16%と4%)では変化は認められなかった。それら以外は、表層の0.8%クエン酸と1%炭酸ナトリウムを除き、すべてpH7.2を示した。BRBVに対して抗ウイルス効果を示したのは、消石灰、消石灰乳、炭酸ナトリウムとアルデヒド系で、いずれも表層のみで有効であった(表3)。BAdV-7に対しては、消石灰、消石灰乳とアルデヒド系が効果を示したが、いずれも表層のみであった。

BRBV と BAdV-7 に対する消毒薬の抗ウイルス効果

表 4 堆肥に散布した各種消毒薬の牛鼻炎 B ウイルス (BRBV) と牛アデノウイルス 7 型 (BAdV-7) に対する抗ウイルス効果

消毒薬	濃度・ 希釈倍数	pH			BRBV			BAdV-7		
		表層	5 cm ¹⁾	10 cm	表層	5 cm	10 cm	表層	5 cm	10 cm
消石灰		12.6 ²⁾	9.0	9.0	≥2.75 ³⁾	0.50	0.75	≥4.75	-0.25	-0.25
消石灰乳	20(%)	12.6	11.4	9.2	≥2.75	≥2.75	0.50	≥4.75	-0.50	-0.50
クエン酸	0.8(%)	8.6	8.8	8.8	0.50	0.75	0.50	0.25	0.25	0.25
	0.2	8.8	9.0	9.0	0.50	0	0.75	-0.25	-0.25	-0.50
	0.05	8.8	8.8	9.0	0.25	0	-0.25	0.25	-0.25	-0.25
炭酸ナトリウム	16(%)	11.0	10.4	10.4	≥2.75	≥2.75	≥2.75	-0.50	-0.75	-0.25
	4	11.0	10.4	9.2	≥2.75	2.00	0.50	0	0.50	0
	1	11.0	9.2	9.0	0.75	0.25	0	-0.25	0	0.25
ヨウ素系	100(倍)	8.8	8.8	9.0	0.25	0.75	0.50	-0.25	-0.25	-0.50
	400	8.8	9.0	9.0	0.25	0.25	0.50	0	0.25	0.50
	1,600	8.8	9.0	9.0	0.75	0.25	0.50	-0.25	-0.50	-0.50
塩素系	500(倍)	8.8	9.0	9.0	0.50	0.75	0.75	-0.50	-0.25	0.25
	2,000	8.8	8.8	9.0	0.50	0.50	0.50	0.25	-0.25	-0.25
	8,000	8.8	9.0	9.0	0.25	0.25	0.50	-0.50	0	0
アルデヒド系	200(倍)	8.8	9.0	9.0	0.50	0.50	0.50	-0.50	-0.25	-0.50
	800	8.8	9.0	9.0	0.50	0.50	1.00	0.25	-0.25	0.25
	3,200	8.8	8.8	9.0	0.25	0.25	0.25	-0.25	0	-0.50
複 合	100(倍)	9.2	9.0	9.0	0.50	0.75	0.75	0	-0.25	-0.25
	400	8.8	9.0	9.0	0.75	0.25	0.50	-0.50	-0.25	-0.25
	1,600	8.8	9.0	9.0	-0.25	0.25	-0.25	-0.50	-0.25	-0.25
NaOH 添加	500(倍)	8.8	9.0	9.0	0.75	1.50	0.75	0	-0.25	-0.50
	2,000	8.8	9.0	9.0	0.75	0.75	0.50	-0.50	-0.25	-0.50
	8,000	9.0	9.0	9.0	0	0.50	0	-0.50	-0.25	-0.50
水道水		8.8	9.0	9.0	0.50	0	0.50	0	-0.50	0

1) 表層からの深さ

2) 堆肥から回収した消毒薬の pH とそれに維持培地を加えた pH は同じ値

3) 対照のウイルス価との差 (log の指数差; 値が大きいかほど不活化効果が高い)

堆肥散布で BRBV に対して抗ウイルス効果を示したのは、消石灰と消石灰乳と炭酸ナトリウム (16%と 4%) であった (表 4)。16%炭酸ナトリウムでは表層から 10cm、消石灰乳では 5cm まで効果を示し、内部への浸透効果が認められた。BAdV-7 に対しては消石灰と消石灰乳のみが効果を示したが、いずれも表層のみであった。

考 察

初めに、本研究で選択した BRBV と BAdV-7 の pH 感受性を調べたところ、BRBV は口蹄疫ウイルスとほぼ同様の酸感受性並びにアルカリ感受性を有することが確認された。BRBV に対する消毒薬の直接効果についても口蹄疫ウイルスとほぼ同様の感受性を示していた [2]。これらのことから BRBV は口蹄疫ウイルスの消毒試験における代替ウイルスとして有用であることが示された。

低温下での消毒薬の作用を調べた結果、両ウイルスに対してアルデヒド系の消毒効果の低下が認められた。アルデヒド系の病原体不活化作用は、タンパクのアミノ基に対する作用及び SH 基に対する作用等であるため [7]、低温によりこれらの作用が低下するものと考えられた。

BAdV-7 に対しては、さらに炭酸ナトリウム、塩素系で消毒効果の低下が認められたが、これらの消毒薬の高濃度での消毒効果は維持されていた。冬期の使用では、承認された用法・要領の範囲内で高濃度のものを使用すべきと思われた。

スラリーを消毒薬に混入させると、酸性の消毒薬は pH が弱アルカリに変化するため、これらはスラリー消毒には効果が期待されないものと推察された。消石灰乳と炭酸ナトリウムは高い消毒活性を示したが、アルカリ性の複合や NaOH 添加では pH 10 を超えていたが、BRBV を不活化しなかった。これはスラリー成分が BRBV 粒子に吸着し、アルカリによる不活化作用を防御した可能性が考えられた。BAdV-7 に対しては、消石灰と炭酸ナトリウムが有効であることが示された。しかし、炭酸ナトリウムの有効濃度は溶液調整が困難な 16%と高濃度であったことから、実用的な濃度ではないと考えられた。

生乳で処理した消毒薬はすべて BRBV に対して不活化効果を示していた。これは生乳混入による pH 変動がスラリーに比べて少なかったためと考えられた。

BAdV-7に対しては塩素系以外の消毒薬が抗ウイルス効果を示していた。生乳のみでもBRBVやBAdV-7に対してウイルス不活化作用が認められたため、今回認められた抗ウイルス作用は消毒薬と生乳中の抗ウイルス作用物質との相乗作用と考えられた。生乳中の抗ウイルス作用を示す物質としてラクトフェリンと抗体の可能性が考えられた [8-10]。牛の常乳中にラクトフェリンは30～350 $\mu\text{g/ml}$ 存在している [11-13]。アデノウイルス2型に対する牛ラクトフェリンの50%増殖抑制濃度は70～270 $\mu\text{g/ml}$ [14]、ピコルナウイルス科のエンテロウイルス71に対しては10～25 $\mu\text{g/ml}$ と報告されている [15]。これらのことから、常乳中のラクトフェリン等である程度の抗ウイルス効果が期待されるが、生乳中の抗ウイルス物質の作用についてはさらに検討が必要である。

BAdV-7に対して生乳処理した塩素系の消毒効果は、消毒薬濃度が高いほど低くなっていた。これは塩素系消毒薬の生乳による阻害と塩素系が生乳中の抗ウイルス作用を持つ物質の作用阻害を起こしている可能性が考えられた。

土壌の両ウイルスの消毒には、消石灰、消石灰乳とアルデヒド系が有効で、BRBVについては炭酸ナトリウムも有効であったが、表層だけの効果であるので注意を要する。今回用いた土壌のpHは、5.6の弱酸性を示しており、このpH値は、BRBVを不活化できる値である。しかし、今回の実験条件では維持培地を混和するとpHが7.2になったため、BRBVは不活化されなかったものと思われた。BRBVが単独で環境に存在した場合、消毒薬がなくても土壌のみで十分に不活化される可能性が考えられた。

堆肥の両ウイルスの消毒には、消石灰と消石灰乳が有効で、BRBVに対しては炭酸ナトリウムも有効であった。アルデヒド系は土壌では両ウイルスに対して消毒効果を示したが、堆肥での効果は認められなかった。このことから、アルデヒド系の消毒効果は有機物による影響は受けないとされていたが、堆肥のような有機物そのものの消毒には適さないものと考えられた。堆肥では土壌に比べて消毒薬の内部への浸透性は良好であったが、十分浸透させるには大量の消毒薬散布が必要と考えられた。

今回の試験に用いたBRBVとBAdV-7の培養細胞での増殖性には差があり、BAdV-7の方がBRBVよりも増殖性がよいため $10^2 \sim 10^{2.75}$ 倍高い力価のウイルスを試験に供した。このため、BAdV-7の方が消毒効果に関してBRBVよりも厳しい基準で判定している可能性が考えられた。今後、BRBVと同程度の濃度での消毒効果を検討する必要があると思われた。

以上より、口蹄疫ウイルスを主眼においた消毒は、低温では通常より濃い濃度の消毒薬を使用し、生乳に対し

ては不活化効果を示す濃度になるように消毒薬を直接添加する方法がよいと考えられた。土壌と堆肥の消毒には消石灰、消石灰乳と炭酸ナトリウムが適していることが示され、これは農林水産省が推奨している消毒法を支持するものとなった。

本研究は、2010年度農林水産省新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業により実施された。

引用文献

- [1] Grubman MJ, Baxt B : Foot-and-mouth disease, *Clin Microbiol Rev*, 73, 175-181 (2004)
- [2] 白井淳資 : 口蹄疫ウイルスに対する市販消毒薬の効果, *日獣会誌*, 55, 575-579 (2002)
- [3] Hollister JR, Vagnozzi A, Knowles NJ, Rieder E : Molecular and phylogenetic analyses of bovine rhinovirus type 2 shows it is closely related to foot-and-mouth disease virus, *Virology*, 373, 411-425 (2008)
- [4] Knowles NJ, Hovi T, Hyypia T, King AMQ, Lindberg AM, Pallansch MA, Palmenberg AC, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Zell R : Family Picornaviridae, *Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King AMQ et al, 855-880, Academic Press, London (2012)
- [5] Reed SE, Tyrrell DA, Betts AO, Watt RG : Studies on a rhinovirus (EC11) derived from a calf. I. Isolation in calf tracheal organ cultures and characterization of the virus, *J Comp Pathol*, 81, 33-40 (1971)
- [6] Inaba Y, Tanaka Y, Sato K, Ito H, Ito Y, Omori T, Matumoto M : Bovine adenovirus. II. A serotype, Fukuroi, recovered from Japanese cattle, *Jpn J Microbiol*, 12, 219-829 (1968)
- [7] Hugo WB : *Disinfection Mechanism. Principles and Practice of Disinfection. Preservation and Sterilisation*. Russel, AD et al eds, 158-185, Blackwell, London (1982)
- [8] Berlutti F, Pantanella F, Natalizi T, Frioni A, Paesano R, Polimeni A, Valenti P : Antiviral properties of lactoferrin—a natural immunity molecule, *Molecules*, 16, 6992-7018 (2011)
- [9] Seganti L, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantoni A, Tinari A, Superti F : Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses, *Biometals*, 17, 295-299 (2004)
- [10] Valenti P, Antonini G : Lactoferrin : an important host defence against microbial and viral attack, *Cell Mol Life Sci*, 62, 2576-2587 (2005)
- [11] Harmon RJ, Schanbacher FL, Ferguson LC, Smith KL : Concentration of lactoferrin in milk of normal lactating cows and changes occurring during mastitis, *Am J Vet Res*, 36, 1001-1007 (1975)
- [12] Rainard P, Poutrel B, Caffin JP : Lactoferrin and transferrin in bovine milk in relation to certain physiological and pathological factors, *Ann Rech Vet*, 13, 321-328 (1982)
- [13] Sánchez L, Aranda P, Pérez MD, Calvo M : Concen-

- tration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk, *Biol Chem Hoppe Seyler*, 369, 1005-1008 (1988)
- [14] Arnold D, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantoni A, Valenti P, Seganti L, Superti F : Antiadenovirus activity of milk proteins : lactoferrin prevents viral infection, *Antiviral Res*, 53, 153-158 (2002)
- [15] Lin TY, Chu C, Chiu CH : Lactoferrin inhibits enterovirus 71 infection of human embryonal rhabdomyosarcoma cells in vitro, *J Infect Dis*, 186, 1161-1164 (2002)

Effects of Disinfectant Used in Japan on Bovine Rhinitis B Virus and Bovine Adenovirus Type 7 Under Mimic Conditions of Field Usage

Rikio KIRISAWA^{*†}, Satoshi KAWAMOTO and Hajime NAGAHATA

** Rakuno Gakuen University, School of Veterinary Medicine, 582 Bunkyoudai-Midorimachi, Ebetsu, 069-8501, Japan*

SUMMARY

To estimate the effects on foot-and-mouth disease virus (FMDV) of disinfectants used on Japanese farms, we investigated the effects on bovine rhinitis B virus (BRBV) and bovine adenovirus type 7 (BAdV-7), instead of FMDV, under conditions that mimicked field usage. We employed eight disinfectants : calcium hydroxide, sodium carbonate, citric acid, iodine, chlorine, aldehyde, disinfectant complex and quaternary ammonium compounds with a 0.1% sodium hydroxide. Among the disinfectants mixed with bovine excreta slurry, calcium hydroxide and sodium carbonate inactivated both viruses. After mixing them with bovine raw milk, all disinfectants could inactivate both viruses except for chlorine on BAdV-7. After sprinkling the disinfectants on soil and compost, calcium hydroxide and sodium carbonate could inactivate BRBV, and only calcium hydroxide could inactivate BAdV. These results suggested that FMDV on soil and compost might be inactivated by calcium hydroxide and sodium carbonate and that all disinfectants might inactivate FMDV in raw milk.

— Key words : disinfectant, foot-and-mouth disease virus, bovine rhinitis B virus, bovine adenovirus type 7.

† Correspondence to : Rikio KIRISAWA (*Rakuno Gakuen University, School of Veterinary Medicine*)

582 Bunkyouda-Midorimachi, Ebetsu, 069-8501, Japan

TEL 011-388-4748 FAX 011-387-5890 E-mail : r-kirisa@rakuno.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 65, 864 ~ 870 (2012)