

低温及び有機物存在下における石灰水を使用した 逆性石鹼系消毒薬の鳥インフルエンザウイルス 及び牛エンテロウイルスに対する消毒効果

長井 誠¹⁾ 江崎 唯²⁾ 関 令二³⁾ 上村良二³⁾

下山俊明¹⁾ 久保田拓海¹⁾ 白井淳資^{1)†}

1) 東京農工大学農学部 (〒183-8509 府中市幸町3-5-8)

2) 東京都芝浦食肉衛生検査所 (〒108-0075 港区港南2-7-19)

3) 田村製薬(株) (〒101-0051 千代田区神田神保町1-6)

(2013年3月19日受付・2013年6月24日受理)

要 約

塩化ジデシルジメチルアンモニウム (DDAC) の単剤 (単剤A) 及びDDACとフェノール誘導体との複合消毒薬 (複合剤B) を石灰水及び蒸留水で希釈し、低温及び有機物存在下における鳥インフルエンザウイルス (AIV) 及び牛エンテロウイルス (BEV) に対する消毒効果を調べた。AIVに対し両剤とも殺ウイルス効果を示したが、石灰水希釈は蒸留水希釈時よりも消毒効果が高くなり、さらに複合剤Bは単剤Aよりも低温及び有機物存在下で高い効果を示した。BEVでは、蒸留水希釈の単剤A及び複合剤Bは消毒効果を認めなかったが、両薬剤を石灰水で希釈すると効果が認められた。低温かつ有機物存在下では消毒効果は激減し、単剤Aでは効果が認められなくなったのに対し、複合剤Bは効果が認められた。このことから、石灰水で希釈した両薬剤はAIV及びBEVに蒸留水希釈よりも効果があるが、複合剤Bの方が特に低温及び有機物存在下で単剤Aよりも高い効果を示すことがわかった。

——キーワード：逆性石鹼系消毒薬，石灰水，低温，有機物混入，ウイルス。

----- 日獣会誌 66, 633～637 (2013)

わが国では2010～2011年にかけて高病原性鳥インフルエンザが9県24農場で発生し、その防疫措置の実施には多くの労働力と時間が費やされた。また2010年には口蹄疫が発生し、約29万頭の家畜が殺処分され、すべての措置を完了するのに5カ月を要した。このような感染症の発生は、畜産業のみならず国民の経済に大きな影響を与えた。これらの病気を発生させないためには衛生管理の徹底が大切であり、特に家畜が飼養されている現場における消毒は病気の侵入及び蔓延防止にきわめて重要である。一般的に消毒薬の効果は低温下で著しく低下することが知られているが [1, 2]、高病原性鳥インフルエンザをはじめ、冬季には下痢症や呼吸器病など多くの疾病が発生することから、冬季における有効な消毒法の確立が望まれている。また、エンベロープのないウイルスは一般的に消毒薬に対し抵抗性が強いいため、十分な

消毒効果を得るためには消毒薬の選択と使用条件の設定は重要である [1, 3, 4]。そこで今回、塩化ジデシルジメチルアンモニウム (DDAC) の単剤 (単剤A) 及びDDACとフェノール誘導体の複合消毒薬 (複合剤B) を石灰水及び蒸留水で希釈し、低温及び有機物の存在下における鳥インフルエンザウイルス (AIV) 及び牛エンテロウイルス (BEV) に対する消毒効果試験を行ったので、その概要を報告する。

材料及び方法

供試消毒薬：本試験には、100ml中に塩化ジデシルジメチルアンモニウム10gを含有する単剤A(クリアキル[®]、田村製薬(株)、東京)及び100ml中にオルトジクロロベンゼン70g、塩化ジデシルジメチルアンモニウム(80w/w%液)15g及びクロルクレゾール5gを含有する

† 連絡責任者：白井淳資 (東京農工大学農学部共同獣医学科)

〒183-8509 府中市幸町3-5-8 ☎・FAX 042-367-5780 E-mail : jshirai@cc.tuat.ac.jp

低温及び有機物存在下の消毒薬のウイルスに対する消毒効果

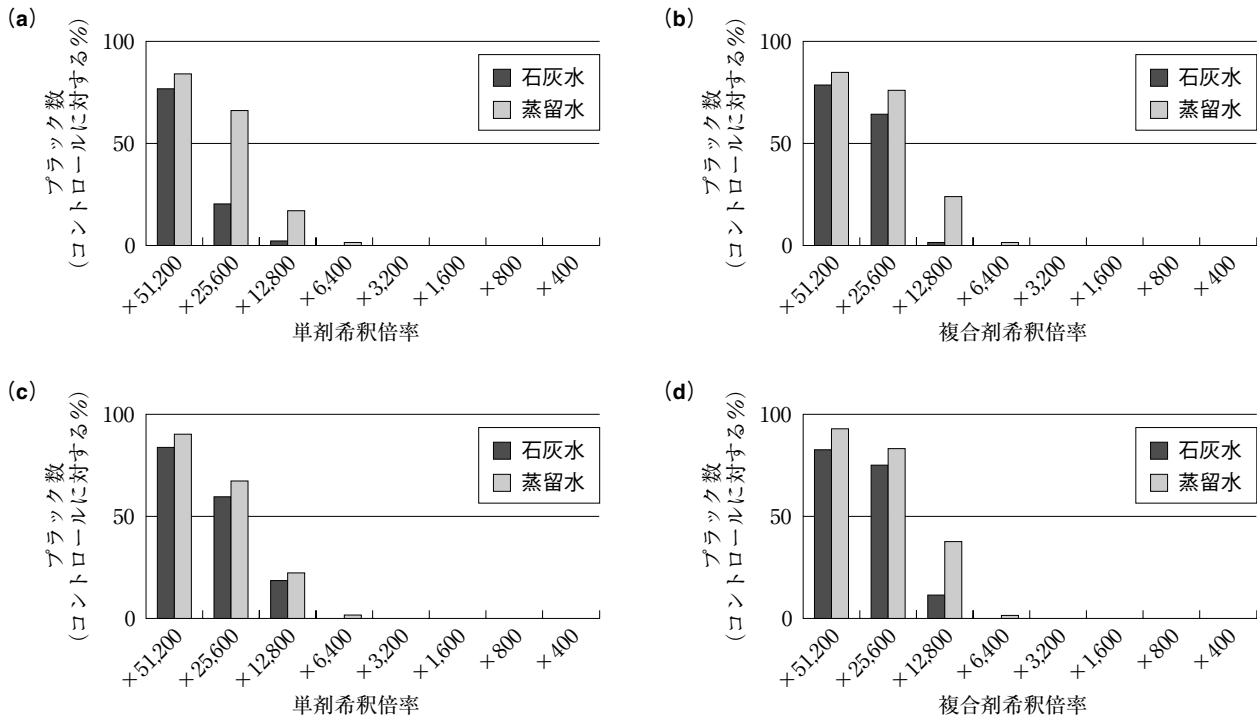


図1 有機物を含まない条件下の鳥インフルエンザウイルスに対する消毒効果
 有機物を含まない条件下において、室温（単剤A (a)，複合剤B (b)）及び低温（単剤A (c)，複合剤B (d)）で石灰水及び蒸留水を用いて希釈し、室温で鳥インフルエンザウイルスと等量混合し、ブラック減少法により消毒薬の効果を判定した。図はコントロールのブラック数を100%として表記した。

複合剤B（トライキル[®]，田村製薬株，東京）を用いた。それぞれの消毒薬を200～25,600倍まで2倍段階希釈した後、等量のウイルス液と混合したため、消毒薬の最終濃度は400～51,200倍となった。いずれの濃度においても消毒薬による細胞毒性が出現しないことを確認した。なお、用法、用量に記載されている畜舎消毒における推奨希釈濃度は、単剤Aは500～1,000倍（ただし発泡消毒では50～100倍）、複合剤Bは100～200倍である。

飽和石灰水（石灰水）：蒸留水に10%の割合で消石灰（農用65，北海道石灰化工株，苫小牧）を加え、攪拌した後、濾過を行い、上澄み液を消毒薬の希釈に用いた。pHを測定したところ19.7℃においてpH12.84であった。

供試ウイルス及び細胞培養：AIVはA/duck/Hokkaido/84/02株（H5N3，低病原性），BEVはBEV2型IS-1株を用いた。AIVの培養には犬腎臓由来細胞株であるMDCK細胞（Madin-Darby canine kidney cell），BEVには牛腎臓由来細胞株であるMDBK細胞（Madin-Darby bovine kidney cell）を用いた。これらの細胞は、イーグルMEM（ニッスイ株，東京）に0.295%トリプトースフォスフェイトブロス，0.3%L-グルタミン，0.01%炭酸水素ナトリウムを添加した培地に，牛胎子血清（FBS）をMDCK細胞は10%，

MDBK細胞は5%添加して培養した。

消毒効果の判定：消毒薬を石灰水または蒸留水によって200～25,600倍まで2倍段階希釈し，ウイルス量をAIVは 10^3 pfu/ml，BEVは 10^5 pfu/mlに調整して1：1の割合で混合した。ウイルスの希釈液は無血清のイーグルMEMを用いたが，有機物が存在する条件下における消毒薬の効果を調べる実験においては，最終濃度が5%になるようFBSを加えた。ウイルスと消毒薬混合物の反応条件として，反応時間はすべて30分間とし，反応温度（室温：約25℃，低温：4℃）及び有機物の有無を組み合わせて実施した。消毒薬の効果はブラック減少法で測定した。すなわち，消毒薬と30分反応させた後，ただちにFBSを10%含むイーグルMEMで10倍段階希釈し，6穴プレートに培養した細胞に200μlずつ接種して1時間吸着させた。その後，イーグルMEM-Bacto-agar溶液（AIVはトリプシンを最終濃度0.5μg/mlで添加）を加え72時間培養し，10%ホルマリンを含むクリスタルバイオレット染色液で染色してブラック数を数え，消毒薬の存在下におけるウイルス価が消毒薬を含まない蒸留水または石灰水におけるウイルス価からどの程度減少したか，また，ブラックがまったく現れない消毒薬の最高希釈倍率を求めた。

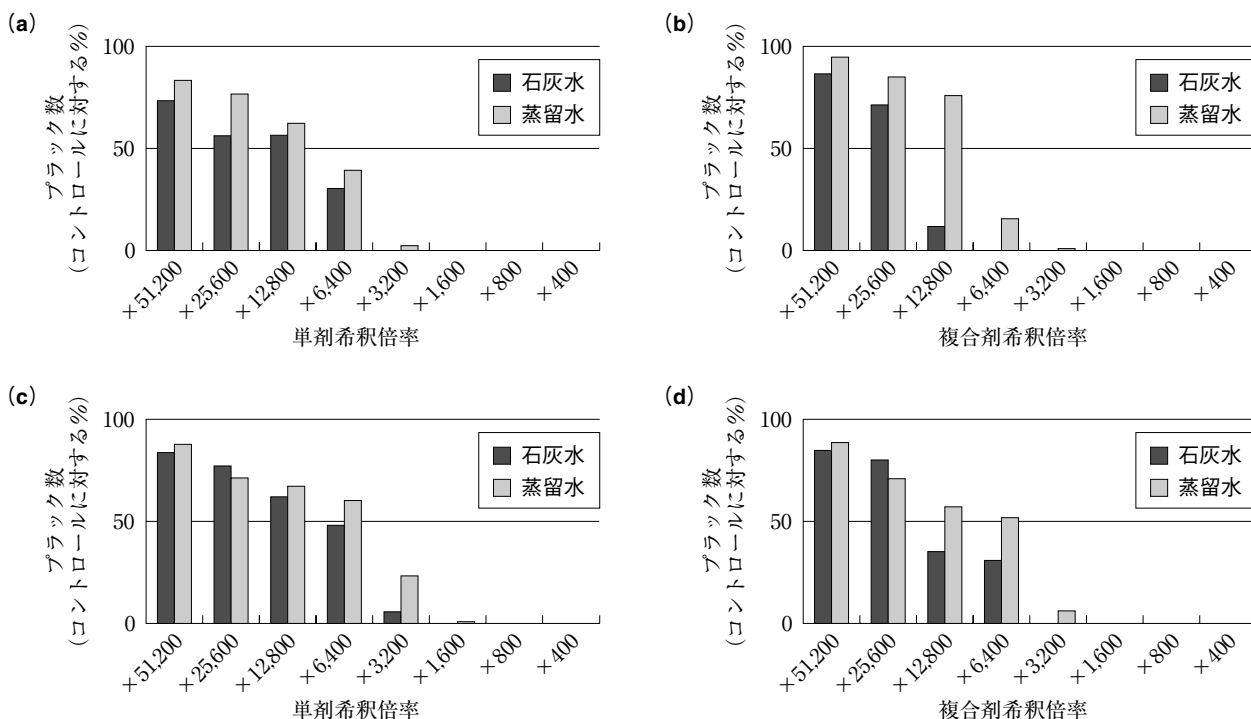


図2 有機物を含む条件下における鳥インフルエンザウイルスに対する消毒効果

有機物を含む条件下において、室温（単剤A (a)、複合剤B (b)）及び低温（単剤A (c)、複合剤B (d)）で石灰水及び蒸留水を用いて希釈し、室温で鳥インフルエンザウイルスと等量混合し、プラック減少法により消毒薬の効果を判定した。図はコントロールのプラック数を100%として表記した。

成 績

AIV に対する消毒効果：室温における有機物のない条件では、単剤A及び複合剤Bともに、蒸留水を用いて希釈すると3,200倍がウイルス感染価（プラック）が検出限界以下となる最高希釈であったのに対し、石灰水を用いることで最高希釈が6,400倍となり、石灰水で消毒薬を希釈することによる消毒薬の殺ウイルス効果の増強が確認された。低温下で有機物のない条件では、単剤Aに関しては、石灰水希釈の方が各希釈段階においてやや高い殺ウイルス効果を示した。石灰水で希釈した複合剤Bは、12,800倍希釈の時点においても80%近くウイルスを殺滅した（図1）。室温で有機物を含む条件下において、単剤Aは蒸留水を用いた希釈で1,600倍、石灰水を用いた希釈で3,200倍が終末点であり、石灰水希釈は有機物を含む条件下においても消毒薬の効果を増強した。複合剤Bは、蒸留水希釈で1,600倍がプラック形成を認めない最高希釈であったのに対し、石灰水を用いた希釈では6,400倍が最高希釈となり、より高い効果が確認された。低温下かつ有機物を含む条件では、単剤A及び複合剤Bのいずれも消毒効果は顕著に減弱し、単剤Aは蒸留水希釈でプラックの形成が認められない最高希釈は800倍、複合剤Bでは1,600倍に低下したが、石灰水希釈ではそれぞれ1,600倍及び3,200倍で、この条件にお

いても石灰水希釈が消毒効果の増強に有効であることが確認された（図2）。

BEV に対する消毒効果：室温において有機物のない条件では、蒸留水希釈では単剤A及び複合剤Bとも殺ウイルス効果をまったく認めなかったが、石灰水で希釈した場合には単剤A及び複合剤Bともに効果が認められ、単剤Aは400倍が完全殺滅を示す最高希釈濃度であったのに対し、複合剤Bは800倍と単剤Aよりも高かった（図3）。低温の有機物を含む条件下では、石灰水の効果は大きく減弱し、単剤Aでは最も濃度の高い400倍においてもプラックは減少しなかったが、複合剤Bにおいてはウイルスを完全に殺滅することはできなかったものの、400倍において50%以上のプラックの減少が確認された（図3）。

考 察

家畜伝染病の発生及び蔓延防止に消毒作業は重要であるが、消毒薬はすべての病原体に効能を示すものでないため、目的の病原体に適応した消毒薬を選択する必要がある [1, 3, 4]。また、消毒薬は用いられる条件によって有効性が左右され、特に低温下や有機物の混入は消毒薬の効能を著しく低下させる [1, 2, 5]。これらを十分に考慮し、消毒薬の選択や使用方法を決定することは重要である。単剤Aの成分である第4級アンモニウム塩

低温及び有機物存在下の消毒薬のウイルスに対する消毒効果

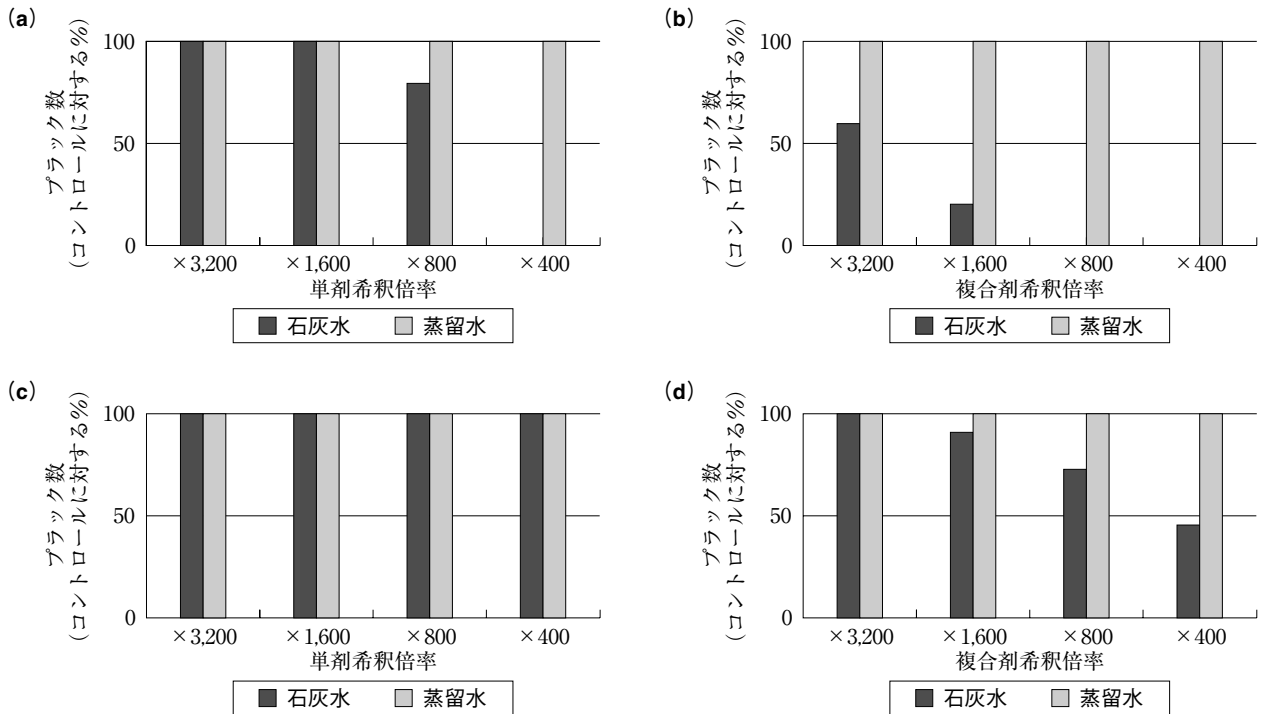


図3 牛エンテロウイルスに対する消毒効果

室温で有機物を含まない条件（単剤A (a)、複合剤B (b)）及び低温で有機物を含む条件（単剤A (c)、複合剤B (d)）において、石灰水及び蒸留水を用いて希釈し、牛エンテロウイルスと等量混合し、ブラック減少法により消毒薬の効果を判定した。図はコントロールのブラック数を100%として表記した。

は、毒性や金属に対する腐食性が低いため、広く畜舎環境の消毒に用いられている [1, 3, 6, 7]。複合剤Bは、多くの病原体に対する効果が実証されており、踏み込み消毒槽等での使用が推奨されている消毒薬である。第4級アンモニウム塩に少量の水酸化ナトリウムを加え、消毒薬のpHを12.2～12.5にアルカリ化することにより、通常のpHでは効果のないエンベロープを持たないウイルスである伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス及び豚水胞病ウイルスに消毒効果を示すことが明らかになっていることから [8, 9]、単剤A及び複合剤Bにおける石灰水希釈の有効性を検討した。その結果、石灰水を用いて希釈した単剤A及び複合剤Bは、蒸留水で希釈した場合と比較してAIVに対する消毒効果が增强されていることが示された。また、単剤A及び複合剤Bは蒸留水で希釈した時にはBEVへの消毒効果がまったく認められなかったが、石灰水で希釈することにより、BEVを不活化したことから、石灰水によるpH調整アルカリ法は、消毒薬の抗病原体スペクトルの拡大にも効果があることが証明された。

低温下における実験では、石灰水を用いて希釈した単剤A及び複合剤Bは、室温に比べて消毒効果が減弱される低温下においても蒸留水希釈と比較すると、1/2量の消毒薬でAIVに対する消毒効果を発揮した。迫田ら [10] も、同じ単剤を用いたAIV H5N1株に対する消毒試験

で、石灰水希釈により低温でも1/2量で消毒効果があることを報告している。これらのことは、消毒薬の効果が低下する冬場においても石灰水で単剤A及び複合剤Bを希釈することにより、消毒効果が期待されることを示唆している。

また、有機物の混入は消毒効果を大きく減弱させる要因の一つである。実際に有機物が存在する条件下では、単剤A及び複合剤BのAIVに対する殺ウイルス効果は顕著に減弱することが示された。しかし、この条件においても、石灰水で希釈した消毒薬の殺ウイルス効果最高希釈倍率は、蒸留水で希釈したものに比べて高く、消毒効果を增强することが確認された。

さらに、冬季の野外使用を想定した低温かつ有機物の存在下においても、石灰水希釈によってアルカリ化された単剤A及び複合剤Bは1,600～3,200倍希釈でAIVを完全に殺滅し、低濃度消毒液による消毒効果が認められた。これは、AIVが流行しやすく、消毒薬の効果が低下する冬場においても石灰水で単剤A及び複合剤Bを希釈することにより、低濃度での消毒効果が維持されることを示している。BEVについても、この条件下において消毒効果は激減したが、複合剤Bは完全な殺ウイルス作用は示さなかったものの、400倍において50%以上のブラック減少を示した。このことは、複合剤Bは石灰水希釈において低温及び有機物存在下でエンベロープのな

いウイルスについても有用であることを示している。

以上より、石灰水を用いて消毒薬を希釈しアルカリ化する使用法は、水酸化ナトリウムを用いてアルカリ化した時と同様の消毒効果の増強作用、病原体に対するスペクトルの拡大効果があることが明らかになった。本研究では、消石灰（農用65）は、農場で汎用されており、水酸化ナトリウムのような規制を受けず、安価に入手可能であることから、石灰水で消毒薬をアルカリ化する方法は、新たな消毒薬の使用法として現場で容易に応用できると考えられる。特に消毒薬の消毒効果が減弱しやすい冬季の野外における使用を想定した条件下において、pH調整アルカリ化消毒薬の効果が認められたことは、実際に鳥インフルエンザが流行しやすい冬季に、石灰水で消毒薬を希釈して使用することで、消毒効果をよりいっそう高め、病原体の流行の封じ込めに寄与できるものと考えられる。

引用文献

- [1] Grow AG : Writing guidelines to require disinfection, *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 14, 469-477 (1995)
- [2] Kahrs RF : General disinfection guidelines, *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 14, 105-122 (1995)
- [3] Jefferey DJ : Chemicals used as disinfectants: active ingredients and enhancing additives, *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 14, 57-74 (1995)
- [4] Shirai J : Disinfection against the outbreaks of foot and mouth disease (FMD), *J Dis Res*, 7, 264-273 (2012)
- [5] 迫田義博, 吉見 泰, 黒川 知, 喜田 宏 : 鳥インフルエンザウイルスに対する消毒薬の効果, *日獣会誌*, 60, 519-522 (2007)
- [6] Bruins G, Dyer JA : Environmental considerations of disinfectants used in agriculture, *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 14, 81-94 (1995)
- [7] McDonnell G, Russell AD : Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance, *Clin Microbiol Rev*, 12, 147-179 (1999)
- [8] Shirai J, Kanno T, Inoue T, Mitsubayashi S, Seki R : Effects of quaternary ammonium compounds with 0.1% sodium hydroxide on swine vesicular disease virus, *J Vet Med Sci*, 59, 323-328 (1997)
- [9] Shirai J, Seki R, Kamimura R, Mitsubayashi S : Effects of invert soap with 0.05% sodium hydroxide on infectious bursal disease virus, *Avian Dis*, 38, 240-243 (1994)
- [10] 迫田義博, 関 令二, 喜田 宏 : 各種消毒薬のトリインフルエンザウイルスに対する消毒試験, *家畜衛生学雑誌*, 32, 67-70 (2007)

Effect of Disinfectants of Quaternary Ammonium Compounds with Limewater Against Avian Influenza Virus and Bovine Enterovirus at Low Temperature and with Organic Matter Contamination

Makoto NAGAI¹⁾, Yui EZAKI²⁾, Reiji SEKI³⁾, Ryoji KAMIMURA³⁾, Toshiaki SHIMOYAMA¹⁾, Takumi KUBOTA¹⁾ and Junsuke SHIRAI^{1)†}

1) *Department of Veterinary Medicine, Faculty and Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, 183-8509, Japan*

2) *Shibaura Meat Inspection Center, 2-7-19 Konan, Minato-ku, 108-0075, Japan*

3) *Tamura Pharmaceutical Co., Ltd., 1-6 Kandajinbo-cho, Chiyoda-ku, 101-0051, Japan*

SUMMARY

Effects of a single disinfectant of didecyldimethylammonium chloride (DDAC) (single A) and a compound disinfectant (compound B) consisting of DDAC and phenolic compounds, with limewater or distilled water on avian influenza virus (AIV) and bovine enterovirus (BEV) were investigated at low temperature and with organic matter contamination. Both disinfectants showed a virucidal effect toward AIV. Using limewater increased these effects, but compound B showed higher effects than single A at low temperature and with organic matter contamination. Single A and compound B were effective against BEV with limewater, but not in the distilled water. These effects were significantly reduced at low temperature and with organic matter contamination, but compound B displayed virucidal effects against BEV. It was concluded that single A and compound B with limewater was more effective against AIV and BEV than with distilled water. And compound B showed more virucidal effects at low temperature and with organic matter contamination.

— Key words : disinfectant of quaternary ammonium compounds, limewater, low temperature, organic matter contamination, virus.

† Correspondence to : Junsuke SHIRAI (*Department of Veterinary Medicine, Faculty and Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology*)

3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, 183-8509, Japan TEL·FAX 042-367-5780 E-mail : jshirai@cc.tuat.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 633 ~ 637 (2013)