

口蹄疫ウイルスに対する市販消毒薬の効果

白井 淳資[†]

独立行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所 (〒187-0022 小平市上水本町6-20-1)

(2002年5月2日受付・2002年6月10日受理)

要 約

現在わが国で販売されている消毒薬について口蹄疫ウイルス (FMDV) に対する効果を検討した。試験に使用された消毒薬は13社16製品で、ヨウ素系、塩素系、アルデヒド系、フェノール系、逆性石鹼系、複合および水酸化ナトリウム (NaOH) 添加消毒薬の7種類に大きく分けられた。FMDVはわが国で分離されたO/JPN/2000株を用い、FMDVと消毒効果の比較を行うために対照ウイルスとして豚水泡病ウイルス (SVDV) J1株を使用し、判定はブラック減少法により行った。その結果、FMDVおよびSVDVに対する消毒効果は、ヨウ素系、塩素系およびアルデヒド系消毒薬において顕著に認められ、フェノール系および逆性石鹼系消毒薬では認められなかった。複合消毒薬およびNaOH添加消毒薬ではFMDVに対し効果の認められるものもあったが、FMDVはpHの影響を受けやすく、消毒薬のpHによりFMDVの感染価を下げるものが認められた。

—キーワード：市販消毒薬、消毒薬のpHの影響、口蹄疫ウイルス。

日獣会誌 55, 575～579 (2002)

海外病の中で最も重要な伝染病である口蹄疫 (FMD) が2000年3月、92年ぶりにわが国で発生した。わが国で発生したFMDは幸い早期に撲滅され、半年以内にふたたび清浄国に復帰することができた [13]。一方、2001年2月に発生した英国のFMDでは、約400万頭もの家畜の殺処分が余儀なくされ、発生が終息するまでに7カ月を要し、英国畜産は大打撃を被った [4]。本病は伝染力が強く、罹患した牛、豚、山羊、めん羊などは、形成される水疱の激痛のために採食が減退し、発育障害、運動障害および泌乳障害による著しい生産性の低下を来す。また間接的な被害としては、国際間の家畜および畜産物の厳しい移動規制、輸入畜産物の増大を招き、社会・経済に及ぼす影響が大きい [2]。FMDのような海外病など重要伝染病の発生時において、消毒薬は発生場所の消毒、未発生場所のFMD侵入防止のための消毒、汚染車両の消毒など、FMD伝播防止の重要な役割を担う [1]。今回のわが国でのFMDの発生に際して、FMDウイルス (FMDV) に対する市販消毒薬の効果について関係各所で議論された。FMD発生場所の消毒法については、海外悪性伝染病予防要領 (農林水産省畜産局長通知50畜A第3843号、1975年) に2%水酸化ナトリウム (NaOH)、4%炭酸ナトリウム、10%ホルマリンにより行うことが記載されているが、未発生農家への

FMDVの侵入を防ぐ手立てとして使用される一般消毒薬のFMDVの効果についてはわが国では調べられていない。そこで、(社)日本動物薬事協会が中心となり、(財)畜産生物科学安全研究所 (畜安研) と協力して、FMDVに対する市販消毒薬の効果判定を希望するメーカーの消毒薬について、その効果を調べた。

材料および方法

消毒薬：実験に使用した消毒薬は13社の16製品で、表1に示すように、ヨウ素系、塩素系、アルデヒド系、フェノール系、逆性石鹼系、複合およびNaOH添加消毒薬の7種類に大きく分類された。

ウイルス：実験に使用したウイルスはFMDV O/JPN/2000株 [9] で牛腎初代培養細胞で3代、豚腎株化細胞のSK-L細胞で4代継代されたウイルス液中に牛血清を含まないもの (FMDV-NS) と10%牛胎子血清 (FCS) を含むもの (FMDV-FCS) の2種類を使用した。FMDVの消毒効果判定の対照ウイルスとして、同じピコルナウイルス科の豚水泡病ウイルス (SVDV) J1株 [14] をFMDVと同様に牛血清を含まないもの (SVDV-NS) と、10% FCSを含むもの (SVDV-FCS) の2種類を用いた。

試験方法：表1の各消毒薬を希釈液 (滅菌蒸留水) で

[†] 連絡責任者：白井淳資 (独立行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所海外病研究部)

〒187-0022 小平市上水本町6-20-1 ☎042-321-1441 FAX 042-325-5122

口蹄疫ウイルスに対する市販消毒薬の効果

表1 実験に使用した消毒薬

消毒薬	主要成分	実験に使用した希釈倍率(最終濃度)
ヨウ素系消毒薬		
A	ノノキシノールヨード 13g/100g	100, 200, 400, 800, 1,600
B	ノノキシノールヨード 13g/100g	100, 200, 400, 800, 1,600
C	複合ヨードホル 23.53g/100g	250, 500, 1,000, 2,000, 4,000
D	ポピドンヨード 20mg/ml	2, 25, 50, 100, 200
E	ヨウ素グリシン複合体 3g/100g	200, 400, 800, 1,600, 3,200
塩素系消毒薬		
F	ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム 1g/1g	250, 500, 1,000, 2,000, 4,000
G	ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム 6.6g/20g	250, 500, 1,000, 2,000, 4,000
H	ペルオキソ-硫酸水素カリウム 50g +塩化ナトリウム 1.5g/100g	250, 500, 1,000, 2,000, 4,000
アルデヒド系消毒薬		
I	グルタルアルデヒド 25g/100ml 緩衝剤(炭酸水素ナトリウム 60g, 炭酸ナトリウム 40g)	100, 200, 400, 800, 1,600
フェノール系消毒薬		
J	オルトジクロロベンゼン 70g+クレゾール 10g/100g	50, 100, 200, 400, 800
逆性石鹼系消毒薬		
K	塩化ジデシルジメチルアンモニウム 10g/100ml	250, 500, 1,000, 2,000, 4,000
L	塩化ジデシルジメチルアンモニウム 10g/100ml	250, 500, 1,000, 2,000, 4,000
複合消毒薬		
M	ホノゾール 1g+塩化ベンザルコニウム 10g/100g	250, 500, 1,000, 2,000, 4,000
N	アルキルジアミニエチルグリシン 4g+塩化ベンザルコニウム 3g/100g 洗浄性補助剤アルカリ性ビルダー配合	100, 200, 400, 800, 1,600
NaOH 添加消毒薬		
O	塩化ジデシルジメチルアンモニウム 10g/100ml +0.2% NaOH	250, 500, 1,000, 2,000, 4,000
P	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 12g +クロルクレゾール 5g/100ml+0.2% NaOH	50, 100, 200, 400, 800

記載の濃度に希釈したものとFMDVおよびSVDVの無血清と10% FCSを含む2種類のウイルス液を1:1の割合で混合し、室温に30分反応させた。反応後、ただちに5% FCSを含む培地(イーグルMEM, 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)で10倍階段希釈し、6穴プラスチックプレートに培養したSK-L細胞に接種し、常法に従いブラック法で感染価を測定した[6]。FMDV接種細胞では接種後3日目に、SVDV接種細胞では接種後2日目に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を行い、ブラック数を算定し、感染価(log PFU/0.1ml)を求めた。なお、対照として消毒薬の代わりに滅菌蒸留水(pH 6.85)を用いて感染価を測定した。

FMDVおよびSVDVのpH感受性試験: FMDVおよびSVDVのpHに対する影響を調べるために、アルカリ域は1% NaOH溶液を2倍階段希釈し、酸性域は1N塩酸溶液を2倍階段希釈し、それぞれFMDV-NSおよびSVDV-NSとを1:1の割合に混合し、消毒薬の効果判定試験と同様にブラック法による感染価を測定した。

各消毒薬の効果判定: FMDVおよびSVDVに対する各消毒薬の効果は、ウイルス感染価が3 log PFU/0.1ml以上減少した各消毒薬の最高希釈をもって表した。実験に使用した最小希釈の消毒液で3 log PFU/0.1ml減少しなかったが、それ以下の希釈で消毒薬が効果を示すものは \geq の記号で効果を表した。しかし、最小希釈の消毒液でもまったく効果を示さず、それ以下の希釈でも効果を示さないものは $>$ の記号で効果を表した。

消毒薬のpH測定: 実験に使用した消毒薬のpH測定は、実験に用いた5段階の各希釈について、消毒薬と血清を含まない培地とを1:1に混合したものについてpHメーター(BECKMAN Φ 43 pH Meter: BECKMAN, USA)を用いて測定した。

成 績

FMDVに対する消毒効果: FMDVに対する消毒効果は表2に示した。ヨウ素系、塩素系およびアルデヒド系消毒薬においては、消毒薬の種類により効果の差はわずかに認められたものの、効果が明らかに認められた。しかし、フェノール系および逆性石鹼系消毒薬においては

表2 口蹄疫ウイルスおよび豚水胞病ウイルスに対する消毒効果と消毒薬の pH

消毒薬	口蹄疫ウイルス (効果が認められる消毒薬の最高希釈)*	豚水胞病ウイルス	各希釈消毒薬の pH (最終希釈倍数：消毒薬 + 培地)
ヨウ素系消毒薬			
A	400	100	3.43, 5.80, 6.42, 6.81, 6.99 (100, 200, 400, 800, 1,600)
B	400	100	3.35, 5.67, 6.39, 6.75, 6.97 (100, 200, 400, 800, 1,600)
C	1,000	250	2.76, 5.07, 6.34, 6.76, 6.99 (250, 500, 1,000, 2,000, 4,000)
D	2	2	6.74, 7.14, 7.31, 7.38, 7.38 (2, 25, 50, 100, 200)
E	400	200 \geq **	6.29, 6.67, 6.96, 7.16, 7.29 (200, 400, 800, 1,600, 3,200)
塩素系消毒薬			
F	2,000	1,000	5.68, 6.09, 6.47, 6.84, 7.14 (250, 500, 1,000, 2,000, 4,000)
G	1,000	500	5.18, 5.89, 6.50, 6.89, 7.21 (250, 500, 1,000, 2,000, 4,000)
H	2,000	250 \geq	3.87, 5.72, 6.44, 6.87, 7.17 (250, 500, 1,000, 2,000, 4,000)
アルデヒド系消毒薬			
I	800	100 \geq	7.45, 7.51, 7.65, 7.73, 7.82 (100, 200, 400, 800, 1,600)
フェノール系消毒薬			
J	50 $>$ ***	50 $>$	8.42, 8.25, 8.07, 8.04, 8.03 (50, 100, 200, 400, 800)
逆性石鹼系消毒薬			
K	250 $>$	250 $>$	8.06, 8.08, 8.09, 8.09, 8.09 (250, 500, 1,000, 2,000, 4,000)
L	250 $>$	250 $>$	8.06, 8.09, 8.11, 8.10, 8.11 (250, 500, 1,000, 2,000, 4,000)
複合消毒薬			
M	250 $>$	250 $>$	8.04, 8.09, 8.10, 8.10, 8.10 (250, 500, 1,000, 2,000, 4,000)
N	400	100 $>$	11.53, 10.77, 10.35, 9.94, 9.50 (100, 200, 400, 800, 1,600)
NaOH 添加消毒薬			
O	4,000	500	11.35, 11.40, 11.35, 11.43, 11.50 (250, 500, 1,000, 2,000, 4,000)
P	800	50 $>$	11.11, 11.35, 11.44, 11.44, 11.41 (50, 100, 200, 400, 800)

* ウイルス感染価が 3 log PFU/0.1 ml 以上減少した消毒薬の最高希釈倍数で消毒効果を示した。

** \geq ：試験により調べた最小希釈濃度では、明らかな消毒効果が認められていないが、それ以下の濃度で明らかな消毒効果が認められるものと判断した。

*** $>$ ：試験により調べられた最小希釈濃度でも消毒効果は認められず、それ以下の濃度で試験しても消毒効果は認められないと判断した。

効果は認められなかった。複合消毒薬では2製品中1製品 (N) のみに効果が認められた。

FMDV と SVDV に対する消毒効果の比較：ヨウ素系消毒薬の FMDV と SVDV に対する消毒効果を比較してみると、FMDV に対して強い消毒効果を示すものの、SVDV に対しては消毒効果の低い消毒薬 (A, B, C 製品) がみられた (表2)。同じヨウ素系消毒薬でも、

FMDV および SVDV に対し同様の消毒効果を示すもの (D, E 製品) も認められた。同様に塩素系消毒薬でも FMDV に対する消毒効果に比べて、SVDV に対する消毒効果の著しく低いものがあった (H 製品)。複合消毒薬の N 製品では FMDV では消毒効果が認められたが、SVDV に対してはまったく消毒効果を示さなかった。NaOH 添加消毒薬では、FMDV が消毒薬を含まない

0.2% NaOHのみで感染価が消失したのに対し、SVDVでは0.2% NaOHのみでも少量の感染価の低下はみられたが、O製品では消毒薬の濃度に応じて消毒効果を示すことが確認された。

血清を含む材料の消毒効果に及ぼす影響：それぞれの消毒薬の試験に際し、FCS 10%を含むウイルス材料についても試験を行った。本試験では0.2% NaOH添加O製品はSVDV-FCSに対しては、消毒効果への影響が観察されたが、塩素系、ヨウ素系およびアルデヒド系消毒薬においては、FCS 10%の消毒効果への影響は認められなかった。

FMDVのpH感受性と消毒薬のpHとの関係：FMDV-NSを用いて、pHの感受性を調べたところ、FMDVは酸性に対して特に感受性が高く、pH 6.5以下で完全に感染性が失われ、アルカリ側ではpH 11.0以上で感染性が失われた。これを参考にして、各消毒薬のpHを実験に使用した希釈に従い測定した(表2)。FMDVに対する消毒効果に比べて、SVDVに対する効果の著しく低いヨウ素系の3製品(A, B, C)はpHが800倍および1,000倍希釈までpH 6.5以下と低かった。また塩素系消毒薬で、SVDVに対する消毒効果が低かったH製品は他の2つの消毒薬に比べてpHが低かった。複合消毒薬でただ一つFMDVに消毒効果を示したN製品は400倍希釈までpHが10.35以上と高かった。

考 察

FMD発生場所の消毒薬としては、国際獣疫事務局が推奨するものとして、4%炭酸ナトリウム、2% NaOH、0.5%クエン酸、0.2%塩酸および2%ホルマリンで6時間消毒することとされている[8]。わが国の海外悪性伝染病防疫要領では、2% NaOH、2%水酸化カリウム、4%炭酸ナトリウム、10%ホルマリン液および蒸気で1週間間隔で3回以上消毒するように定められている。発生場所の消毒は厳重に行われるのは当然で、わが国では国際基準に従い、むしろそれ以上に厳重な消毒措置をとるようになっている。しかし、発生場所以外の農家で同様の消毒液を準備し、消毒を行わなければならない場合には消毒剤の保管や扱いに関してかなり危険を伴うことになる。

FMDVに対する消毒効果は古くから調べられ、効果を示す消毒薬が明らかにされている[3]。しかし、わが国で販売使用されている消毒薬が、FMDVに対しどの程度の消毒効果を示すかは調べられていなかった。英国ではFMD発生の際に農務省のホームページ(Ministry of Agriculture, Fisheries and Food-website home page, http://www.defra.gov.uk/maff_redirect.htm)で、FMDVに効果を示すすべての消毒薬とその使用濃度が掲載されていた。今回試験した結果は、これまで知

られているようにヨウ素系、塩素系およびアルデヒド系の消毒薬が効果を示した。複合消毒薬では1種類が、NaOH添加消毒薬ではすべてが効果を示した。しかし、FMDVの対照として用いたSVDVに対する消毒効果の比較において、ある種の消毒薬は、FMDVのみに強い消毒効果を示した。FMDVとSVDVは同じピコルナウイルス科に属するが、前者はアフトウイルス属で後者はエンテロウイルス属である[5]。エンテロウイルスはその名が示すように、胃を通過し、腸管に到達して増殖し、腸管や糞便から分離されるウイルスで、強い酸である胃酸に抵抗性を示す。それに比べてアフトウイルスは酸に弱く、病性鑑定のための水疱材料採材に際して、材料保存用緩衝液のpHが酸性にならないように注意が記されている[7]。したがって、FMDVがpHに対してどのような感受性を示すかを調べるとともに、使用した消毒薬のpHを調べた。その結果、ヨウ素系消毒薬の中で、FMDVに強い効果を示し、SVDVに対してはそれほど効果を示さなかったヨウ素系消毒薬の3製品(A, B, C)は400倍および1,000倍希釈まで、消毒薬と培地との混合液のpHが6.5以下であった。このことはFMDVがpH 6.5以下で失活することから、これら消毒薬のFMDVに対する消毒効果には消毒薬のpHが大きく関係していたものと考えられる。また同様な結果を示した塩素系消毒薬の3製品中1製品(H)は他の消毒薬よりpHが低いことが示され、このpHがFMDVの消毒効果に大きく影響していたと考えられた。複合消毒薬2製品中1製品(N)は、消毒薬に添加されたアルカリ性洗浄剤の影響で消毒薬のpHが高くなり、これがFMDVに対して効果を示したものと考えられた。同様な試験成績が0.2% NaOH添加消毒薬2製品(O, P)でも観察され、FMDVの試験では0.2% NaOH単独で強い効果を示し、消毒薬の効果は判定できなかった。しかしSVDVに対する試験結果から0.2% NaOH添加消毒薬O製品が前回のガンボロ病(伝染性ファブリキウス嚢病)ウイルスおよびSVDVに対する消毒効果報告[10, 11]と同様確かに消毒効果を示すことが確認された。しかしP製品は効果を示さず、0.2% NaOHを添加することにより増強される塩化ジデシルジメチルアンモニウムの消毒効果が、本剤に含まれるオルトクロロベンゼンやクロルクレゾールにより、抑制されるのではないかと推察された。また、野外において消毒薬を使用する際に問題となる糞便や血液などの混入を想定して、FMDV-FCSとSVDV-FCSについてそれぞれの消毒薬について試験を行った。前回行った海外病ウイルス(SVDV, アフリカ豚コレラウイルス, アフリカ馬疫ウイルス, 水胞性口炎ウイルス, 馬動脈炎ウイルス)に対するヨウ素系、塩素系、逆性石鹼系消毒薬の効果試験成績[12]と同様、塩素系およびヨウ素系消毒薬では、血清の消毒効果への影

響はなく、アルデヒド系消毒薬でも影響は認められなかった。

以上の成績をまとめると、FMDVに対して効果を示す消毒薬は基本的にヨウ素系、塩素系およびアルデヒド系の3種類の消毒薬である。しかし、0.2% NaOH添加消毒薬O製品もSVDVに対する消毒効果よりFMDVに対して十分有効であると考えられた。この結果が今後のFMD発生に際し活用されることを期待するが、今後FMDの発生が日本において起こらないことが一番望ましい。

本試験に際して、検査対象の消毒薬を取りまとめられた日本動物薬事協会貝塚一郎理事長、また実験条件の設定や試験資材の供与等の協力を終始続けられた財畜産生物科学安全研究所石井達郎理事長、藤本達男専務理事に深謝する。また、SVDVの消毒試験および消毒薬のpH測定に多大な協力を頂いた財畜産生物科学安全研究所の中島隆二技官に深謝する。

引用文献

- [1] Blancou J : Rev Sci Tech Off Int Epizoot, 14, 9-10 (1995)
- [2] Blancou J : Histoire de la Surveilliance et du Controle des Maladies Animales Transmissible, 55-80, Off Int Epizoot, Paris, France (2000)
- [3] Fotheringham VJC : Rev Sci Tech Off Int Epizoot, 14, 293-307 (1995)
- [4] Gibbens JC, Sharpe CE, Wilesmith JW, Mansley LM, Michalopoulou E, Ryan JBM, Hudson M : Vet Rec, 149, 729-743 (2001)
- [5] House JA, House CA : Diseases of Swine, Straw BE, et al, 8th ed, 327-340, Iowa State University Press, Ames, Iowa (1999)
- [6] Kanno T, Inoue T, Wang T, Sarai A, Yamaguchi S : J Gen Virol, 76, 3099-3106 (1995)
- [7] Kitching RP, Barnett PV, Donaldson AI, Mackay KJ : Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4th ed, 77-92, Off Int Epizoot, Prais, France (2000)
- [8] Owen JM : Rev Sci Tech Off Int Epizoot, 14, 381-391 (1995)
- [9] Sakamoto K, Kanno T, Yamakawa M, Yoshida K, Yamazoe R, Murakami Y : J Vet Med Sci, 64, 91-94 (2002)
- [10] Shirai J, Seki R, Kamimura R : Avian Dis, 38, 240-243 (1994)
- [11] Shirai J, Kanno T, Inoue T, Mitsubayashi S, Seki R : J Vet Med Sci, 59, 323-328 (1997)
- [12] Shirai J, Kanno T, Tsuchiya Y, Mitsubayashi S, Seki R : J Vet Med Sci, 62, 85-92 (2000)
- [13] Sugiura K, Ogura H, Ito K, Ishikawa K, Hoshino K, Sakamoto K : Rev Sci Tech Off Int Epizoot, 20, 701-713 (2001)
- [14] Tokui T, Kono M, Tokuda G, Kumagai T, Sasahara J : Natl Inst Anim Health Q (Jpn), 15, 165-173 (1975)

Effects of Disinfectants Marketed in Japan on the *Foot-and-mouth disease Virus*

Junsuke SHIRAI

National Institute of Animal Health, National Agricultural Research Organization,
6-20-1 Josui-honcho, Kodaira 187-0022, Japan

SUMMARY

This study on disinfectants marketed in Japan on the *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) employed 16 products supplied by 13 companies and classified into 7 groups according active disinfectant mixed with ingredient: iodine, chlorine, aldehyde, phenol, quaternary ammonium compound, disinfectant complex, and 0.2% NaOH. The representative virus was the FMDV Japanese isolate (O/JPN/2000 strain). The FMDV control was the swine vesicular-disease virus (SVDV: J1 strain). Disinfectant effects were examined by means of the plaque-reduction method. Results showed iodine, chlorine, and aldehyde to be clearly effective against FMDV and SVDV. Phenol and the quaternary ammonium compound, however, were ineffective against FMDV and SVDV. The effects of disinfectant pH on FMDV were observed in several instances.

—Key words : marketed disinfectants, effects of disinfectant pH, *Foot-and-mouth disease virus*.

† Correspondence to : Junsuke SHIRAI (National Institute of Animal Health, National Agricultural Research Organization)
6-20-1 Josui-honcho, Kodaira 187-0022, Japan TEL 042-321-1441 FAX 042-325-5122

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 55, 575 ~ 579 (2002)