

グルタルアルデヒドを主成分とする消毒薬の鳥インフルエンザウイルスに対する不活化効果

迫田義博¹⁾ 遠藤真由美¹⁾ 佐藤由佳¹⁾ 岡松正敏¹⁾ 喜田 宏^{1), 2)†}

1) 北海道大学大学院獣医学研究科 (〒060-0818 札幌市北区北18条西9)

2) 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター (〒001-0020 札幌市北区北20条西10)

(2011年7月12日受付・2011年10月13日受理)

要 約

グルタルアルデヒドを主成分とする消毒薬の鳥インフルエンザウイルスに対する不活化効果を調べた。その結果、グルタルアルデヒドを主成分とする消毒薬は有機物が混入しても高い消毒効果が認められた。しかし、低温下ではその効果は低下した。またウイルスの不活化には、塩化ジデシルジメチルアンモニウムを主成分とする陽イオン系界面活性剤に比べ、作用時間をより長く必要とすることがわかった。以上の結果は、グルタルアルデヒドを主成分とする消毒薬を鳥インフルエンザウイルスに対して用いる場合には、有機物の有無に関わらずその効果が期待できるが、反応温度や反応時間を十分に考慮する必要があることを示している。

——キーワード：鳥インフルエンザウイルス，グルタルアルデヒド，不活化。

----- 日獣会誌 65, 303～305 (2012)

高病原性鳥インフルエンザはH5又はH7亜型の鳥インフルエンザウイルスの感染が原因であり、わが国では家畜伝染病予防法において法定伝染病に指定されている。国内では2004年に79年ぶりに発生して以来、2005、2007、2009、2010、2011年に連続的に発生が認められ、大きな社会問題となっている [1-3]。H5とH7のみならず、H6やH9亜型のウイルスも諸外国では家禽の間で流行している。また最近では、これらのH5高病原性鳥インフルエンザウイルスが野鳥からも分離されている [4]。鳥インフルエンザは家禽の疾病としてだけでなく、人獣共通感染症として公衆衛生の観点からもその対策を確実に実施することが求められている。本病を発生させないためには日々の衛生管理を徹底することが重要である。畜産飼養現場における衛生管理に消毒は重要な役割を果たしている。さまざまな薬剤が消毒薬として市販されており、それぞれの特性を理解した上で効果的に利用する必要がある。本研究では、グルタルアルデヒドを主成分とする消毒薬のインフルエンザウイルス不活化作用の特性を陽イオン系界面活性剤のそれと比較した。

材料及び方法

供試した消毒薬：本試験には2種類の消毒薬を使用した。100ml中にグルタラル (グルタルアルデヒド) 25gを含有する薬剤A (ヘルミン25, 共立製薬㈱, 東京), 100ml中に塩化ジデシルジメチルアンモニウム 10gを含有する薬剤B (クリンエール, 共立製薬㈱, 東京) である。

供試ウイルス：鳥インフルエンザウイルスA/duck/Hokkaido/Vac-1/2004 (H5N1) (Vac-1株) [5]を10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に接種し、35℃で48時間培養後尿液を採取し、ウイルス液とした。ウイルスは50%鶏卵感染価 (EID₅₀) を算出後、試験に用いた。

有機物が消毒効果に及ぼす影響：10^{7.0} EID₅₀のVac-1株のウイルス液0.25mlと鶏糞を含むPBS 0.25mlを混和したものに希釈した消毒薬0.5mlを加えた。25℃でそれぞれ10分間反応後、この溶液を0.1mlずつ2個の10日発育鶏卵に接種した。35℃で48時間培養後、漿尿液中の赤血球凝集 (HA) 価を測定し、2個の卵のいずれもHA価が2未満であった消毒薬の最高希釈倍数を各

† 連絡責任者：喜田 宏 (北海道大学大学院獣医学研究科微生物学教室)

〒060-0818 札幌市北区北18条西9

☎011-706-5207 FAX 011-706-5273

E-mail : kida@vetmed.hokudai.ac.jp

表1 有機物が消毒効果に及ぼす影響

消毒薬	有機物存在下における消毒薬の最大有効希釈倍数 (1:n)			
	有機物なし	0.25% 鶏糞存在下	1.25% 鶏糞存在下	5.00% 鶏糞存在下
A	800	800	800	800
B	3,200	1,600	800	200

表2 反応温度が消毒効果に及ぼす影響

消毒薬	各温度における消毒薬の最大有効希釈倍数 (1:n)		
	25℃	15℃	5℃
A	800	400	200
B	3,200	1,600	800

条件における消毒薬の最大有効希釈倍数とした。

反応温度が消毒効果に及ぼす影響： $10^{7.0}$ EID₅₀ の Vac-1 株のウイルス液 0.25ml と PBS 0.25ml を混和したものに希釈した消毒薬 0.5ml を加えた。5℃, 15℃, 25℃ でそれぞれ 10 分間反応後、上述のとおり発育鶏卵に接種した。HA 価を測定し、それぞれの反応温度における消毒薬の最大有効希釈倍数を求めた。

反応時間が消毒効果に及ぼす影響： 消毒薬 A は 200 倍、消毒薬 B は 800 倍に希釈した。 $10^{7.0}$ EID₅₀ の Vac-1 株のウイルス液 0.25ml と PBS 0.25ml を混和したものに希釈した消毒薬 0.5ml を加えた。25℃ で 1 分、3 分、5 分、10 分で反応後、上述のとおり発育鶏卵に接種し、ウイルスの不活化を確認した。

成 績

有機物が消毒効果に及ぼす影響： 有機物の存在下における消毒薬の効果を調べた (表1)。その結果、消毒薬 A は有機物の存在下でも消毒効果は変わらなかった。消毒薬 B は有機物の存在下ではその効果が顕著に低下した。本結果から、消毒薬 A は消毒薬 B とは異なり、有機物存在下でも高い消毒効果を示すことがわかった。

反応温度が消毒効果に及ぼす影響： 消毒薬の効果に反応温度が影響するか否かを調べた (表2)。その結果、低温下では消毒薬 A も消毒薬 B と同様に消毒効果が低下することがわかった。

反応時間が消毒効果に及ぼす影響： 消毒薬 A 及び B の 25℃ における最大希釈倍数はそれぞれ 800 倍及び 3,200 倍であった (表1)。消毒薬 A の 200 倍及び B の 800 倍希釈が、 $10^{7.0}$ EID₅₀ の Vac-1 株を完全に不活化するのに要する時間を測定した (表3)。200 倍に希釈した消毒薬 A と Vac-1 株を 1 分、3 分、5 分でそれぞれ反応させ、反応液を発育鶏卵に接種したところ、すべての卵からウイルスの増殖が確認された。しかし、消毒薬 A と

表3 反応時間が消毒効果に及ぼす影響

消毒薬	希釈倍数 (1:n)	各反応時間における* ウイルスの不活化			
		1分	3分	5分	10分
A	200	-	-	-	+
B	800	+	+	+	+

* + : 試験に用いた $10^{7.0}$ EID₅₀ のウイルスが検出限界以下になったことを示す。

- : 感染性ウイルスが検出されたことを示す。

10 分反応させた反応液を発育鶏卵に接種するとウイルスの増殖は確認されなかった。800 倍に希釈した消毒薬 B と Vac-1 株を 1 分反応させた反応液を発育鶏卵に接種したところ、ウイルスの増殖はまったく確認されなかった。以上により、200 倍に希釈した消毒薬 A では、ウイルスが完全に不活化されるまで 10 分かかることがわかった。また、800 倍に希釈した消毒薬 B では反応後 1 分でウイルスが完全に不活化された。

考 察

高病原性鳥インフルエンザの防疫に消毒は欠かせない。鳥インフルエンザウイルスの消毒には市販の消毒薬の大半が有効であるが、消毒薬の種類及び使用する環境要因によりその効果は大きく異なる [6, 7]。われわれがこれまでに調べた消毒薬の多くは、有機物の存在下や低温下では鳥インフルエンザウイルスの不活化効果が低下した [6, 7]。そこで今回、グルタルアルデヒドを主成分とする消毒薬 A の鳥インフルエンザウイルスに対する効果を、有機物存在下並びに低温下において評価した。また $10^{7.0}$ EID₅₀ のウイルスを完全に不活化するのに要する時間を測定した。

有機物存在下での消毒効果を評価するため、鶏糞を添加して各消毒薬の効果を調べた結果、消毒薬 B は有機物の濃度に伴って消毒の効果が低下した。消毒薬 B の主成分は塩化ジデシルジメチルアンモニウムであり、他の同様の消毒薬の成績と一致した [6, 7]。一方消毒薬 A は、有機物存在下で消毒効果の低下が認められず、有機物存在下でも高い消毒効果を発揮することが判った。

グルタルアルデヒドを主成分とする消毒薬 A の低温下での効果を調べたところ、対照の消毒薬 B と同様に低温下で消毒効果が低下することが明らかとなった。このことから、グルタルアルデヒドを主成分とする消毒薬を使用する際にもその反応温度に注意を払い、低温下で消毒薬を使用する場合には、用法の範囲内で高濃度の希釈液を調整する必要があることがわかった。

一般に、消毒薬による病原体の不活化には一定の反応時間が必要である。そこで今回試験に用いた消毒薬が $10^{7.0}$ EID₅₀ の鳥インフルエンザウイルスを完全に不活化

するのに要する時間を測定した結果、塩化ジデシルジメチルアンモニウムを主成分とする消毒薬Bは1分の反応時間でウイルスを完全に不活化した。しかし、グルタルアルデヒドを主成分とする消毒薬Aは $10^{7.0}$ EID₅₀のVac-1株が検出限界以下になるまでに10分の時間を要した。このことから、グルタルアルデヒドを主成分とする消毒薬を使用する際には、消毒薬の反応時間を長めに設定する必要があることが分かった。

以上より、グルタルアルデヒドを主成分とする消毒薬Aは塩化ジデシルジメチルアンモニウムを主成分とする消毒薬Bとは異なり、有機物存在下でも高い消毒効果を発揮することがわかった。しかし、低温下においては他の多くの消毒薬と同様にその効果が減弱した。したがって、低温下でウイルスを完全に不活化するためには、十分な反応時間が必要であることが分かった。よって、グルタルアルデヒドを主成分とする消毒薬を鳥インフルエンザウイルスの消毒に用いる際には、これらの特性を十分に理解した上で適切に使用することが重要である。

引用文献

[1] Mase M, Tsukamoto K, Imada T, Imai K, Tanimura N, Nakamura K, Yamamoto Y, Hitomi T, Kira T, Nakai T, Kiso M, Horimoto T, Kawaoka Y, Yamaguchi S : Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the 2003-2004 influenza outbreaks in Japan, *Virology* 332, 167-176 (2005)

[2] Okamatsu M, Saito T, Yamamoto Y, Mase M, Tsuduku S, Nakamura K, Tsukamoto K, Yamaguchi S : Low

pathogenicity H5N2 avian influenza outbreak in Japan during the 2005-2006, *Vet Microbiol* 124, 35-46 (2007)

[3] Uchida Y, Kanehira K, Mase M, Takemae N, Watanabe C, Usui T, Fujimoto Y, Ito T, Igarashi M, Ito K, Takada A, Sakoda Y, Okamatsu M, Yamamoto Y, Nakamura K, Kida H, Hiromoto Y, Tsuda T, Saito T : Genetic characterization and susceptibility on poultry and mammal of H7N6 subtype avian influenza virus isolated in Japan in 2009, *Vet Microbiol* 147, 1-10 (2011)

[4] Sakoda Y, Sugar S, Batchluun D, Erdene-Ochir TO, Okamatsu M, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Tsuda Y, Yamamoto N, Kishida N, Matsuno K, Nakayama E, Kajihara M, Yokoyama A, Takada A, Sodnomdarjaa R, Kida H : Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory, *Virology* 406, 88-94 (2010)

[5] Soda K, Sakoda Y, Isoda N, Kajihara M, Haraguchi Y, Shibuya H, Yoshida H, Sasaki T, Sakamoto R, Saijo K, Hagiwara J, Kida H : Development of vaccine strains of H5 and H7 influenza viruses, *Jpn J Vet Res*, 55, 93-98 (2008)

[6] 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, *日本獣医師会雑誌*, 60, 519-522 (2007)

[7] 迫田義博, 関 令二, 喜田 宏 : 各種消毒薬の鳥インフルエンザウイルスに対する効果試験, *家畜衛生学雑誌*, 32, 67-70 (2007)

Effects of Disinfectant Containing Glutaraldehyde Against Avian Influenza Virus

Yoshihiro SAKODA*, Mayumi ENDO, Yuka SATO, Masatoshi OKAMATSU
and Hiroshi KIDA†

* Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo, 060-0818, Japan

SUMMARY

The inactivation of avian influenza virus using disinfectant including glutaraldehyde was investigated. The disinfectant showed sufficient effect to inactivate avian influenza virus with contamination of fecal materials in the mixture. However, the effectiveness of the disinfectant was limited under conditions with low reaction temperature. In addition, the disinfectant requires a longer reaction time to inactivate avian influenza virus than that of cationic detergent. It was concluded that disinfectant containing glutaraldehyde was effective to inactivate avian influenza viruses under appropriate conditions.

—Key words : avian influenza virus, glutaraldehyde, inactivation.

† Correspondence to : Hiroshi KIDA (Laboratory of Microbiology, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo, 060-0818, Japan

TEL 011-706-5207 FAX 011-706-5273 E-mail : kida@vetmed.hokudai.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 65, 303 ~ 305 (2012)