

豚流行性下痢ウイルスに対する次亜塩素酸水の ウイルス不活化効果

今井邦俊^{1)†} 松田祥子¹⁾ 小川晴子¹⁾ 内海 洋²⁾

1) 帯広畜産大学獣医学研究部門 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

2) (株)アクト (〒080-0010 帯広市大通南16-2-2 アクトビルディング5F)

(2018年5月23日受付・2018年9月3日受理)

要 約

酸性次亜塩素酸水は、医療や食品分野で手指、器具、食材などの洗浄・殺菌目的、農業分野では特定農薬として使用されている。本研究では、次亜塩素酸水のPEDVに対する消毒効果を調べた。PEDVと酸性(pH3.0~3.1)またはアルカリ性(pH11.7~11.9)次亜塩素酸水を1:9の割合で混和し、1分間処理したところ99.9%以上のウイルス不活化率がみられた。特に、酸性次亜塩素酸水は5%豚糞便存在下でも1分間処理で99.9%以上の不活化率を示した。一方、pH2.7の細胞培養液はPEDVを不活化しなかったことから、酸性次亜塩素酸水の効果は溶液の酸性度に依存しないと判断された。次亜塩素酸水は安全性が高く環境負荷も少ないことから、既存の消毒薬に代わり畜産現場の衛生対策に広く使用されることが期待される。——キーワード：次亜塩素酸水、豚流行性下痢ウイルス、ウイルス不活化。

-----日獣会誌 72, 103~106 (2019)

豚流行性下痢 (Porcine Epidemic Diarrhea: PED) は、PEDウイルス (PEDV) の経口感染によって引き起こされる、食欲不振と下痢を主徴とする急性感染症である。2013年10月に、7年ぶりに沖縄県で本病が報告されたが、その後北海道を含む全国的な流行により、かつてない大きな被害が出た。現在でも散発的な発生が認められている。

感染豚の糞便中に含まれるPEDVが感染源であり(糞口感染)、豚間の直接伝播、あるいはウイルスを含む糞便に汚染された器具・器材、作業衣、長靴、車両などを介しての間接伝播が起こる。本病はすべての日齢で発症するが、特に生後1週間以内の哺乳豚では重篤化しやすく、高い死亡率を示す[1]。感染豚から糞便中に排泄されたウイルスは、飲水、スラリー、飼料などの環境中で比較的長期間感染性を保つことから、飼育環境の清浄化は防疫上重要である。したがって、ウイルスの侵入や農場内での伝播を防止するには、洗浄・消毒が必須の対策となる(PEDV Research updates 2013, https://www.aasv.ori/pedv/research/13_215.pdf)。

近年、一般の消毒薬に代わって食塩水や塩酸水などを電気分解して作製される次亜塩素酸水が、医療分野、食

品分野などで手指、器具機材、食材などの洗浄・消毒に使用されている。1996~1997年に強酸性次亜塩素酸水作製装置が厚生省(当時)から医療機器として認可され、作製された強酸性次亜塩素酸水(pH2.7以下)が手指や内視鏡の洗浄消毒に利用されている。2002年には強酸性次亜塩素酸水と微酸性次亜塩素酸水(pH5.0~6.5)、2012年には弱酸性次亜塩素酸水(pH2.7~5.0)が食品添加物(殺菌料)として認可されている。また、2014年に酸性次亜塩素酸水が特定農薬(散布用殺菌剤)として使用が認められている。次亜塩素酸水は殺菌料の一種であり、塩酸または塩化ナトリウム水溶液若しくは塩化カリウム水溶液を電解することによって得られる次亜塩素酸を主成分とする水溶液であると定義されている。

特に酸性次亜塩素酸水は幅広い殺菌スペクトルを示すことから、海外においても農業や食品分野で使用されている[3, 4]。一方、A型インフルエンザウイルス、口蹄疫ウイルス、ヘパドナウイルス、ネコカルシウイルスなどに対するウイルス不活化効果も報告されているが[5-8]、PEDVについては報告がない。今回われわれは、次亜塩素酸水のPEDVに対するウイルス不活化効果を調べたので報告する。

† 連絡責任者：今井邦俊(帯広畜産大学獣医学研究部門基礎獣医学分野)

〒080-8555 帯広市稲田町西2線11 ☎・FAX 0155-49-5892 E-mail: imaiku@obihiro.ac.jp

すべての実験は、室温を 26℃ に設定しているバイオセーフティレベル 2 実験室において実施された。実験に供した Vero 細胞 (KY-5 株) は、農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門から分与を受けた。

PEDV (H26-02 株) は、農林水産省動物医薬品検査所から購入した。本株は、S 遺伝子の解析から北米型として分類されている [9]。実験に供したウイルス液は、既報に従って作製した [9]。供試ウイルスの力価は $10^{5.2}$ TCID₅₀/ml であった。

通常、次亜塩素酸水は二室型電解槽から得られるが、本試験では、三室型電解槽 (日本特許第 3113645, USPATENTO No. 5674365) から得られた次亜塩素酸水 (クリーン・リフレ, アクト株, 北海道) を用いた。三室型電解槽は、二室型電解槽と比較すると残留塩分がほとんど含まれないことから金属腐食が起きにくい特徴を持っている。実験には、pH3.0~3.1 の次亜塩素酸水 (酸性水, 有効塩素濃度 47~48mg/l), pH11.7~11.9 の次亜塩素酸水 (アルカリ水, 有効塩素濃度 1mg/l) を用いた。

実験 1 では、製造後 16 日目の次亜塩素酸水を使用した。PEDV 液と酸性水 (pH3.1) またはアルカリ水 (pH11.9) を 1:9 または 1:1 の割合で混合後、室温で 1 分間放置した。同様に、次亜塩素酸水の代わりに超純水と PEDV 液を混合してウイルス対照とした。放置後、直ちに細胞培養液で混合液を 10 倍階段希釈して Vero 細胞に接種した。4 日間細胞を培養し、ウイルス感染価 (TCID₅₀) を測定した。次亜塩素酸水のウイルス不活化率は以下の式を用いて算出した。

$$(1 - \text{次亜塩素酸水処理後の感染価} / \text{ウイルス対照の感染価}) \times 100(\%)$$

検査試料の感染価がウイルス対照の感染価と比べて 100 倍以上減少した場合 (不活化率 99.0%) を不活化効果ありと判定した (平成 27 年度ノロウイルスの不活化条件に関する調査報告書, 五十君静信ら, 国立医薬品食品衛生研究所: <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000125854.pdf>)。その結果、酸性水、

アルカリ水とも、混合比 1:9 では 1 分間の処理により 1,000 倍以上感染価が減少し、高いウイルス不活化効果 (不活化率 99.9% 以上) を示したが (表 1), 混合比 1:1 では不活化効果がみられなかった。一方、PEDV 液を pH2.7 の細胞培養液と 1:9 の割合で混合した場合、PEDV は不活化されなかった (データ未掲載)。混合液の pH は 3.0 であった。

実験 2 では、製造後 21 日目の次亜塩素酸水を使用した。豚糞便存在下での酸性水 (pH3.0) またはアルカリ水 (pH11.7) の PEDV に対する不活化効果を調べた。SPF 豚の新鮮糞便を 5% に含む PEDV 液と酸性水またはアルカリ水を 1:9 で混合後、室温で 1 または 10 分間放置し濾過滅菌した。その後、実験 1 と同様に濾過サンプルについてウイルス感染価を測定した。また、同時に pH2.7 の細胞培養液の PEDV に対する不活化効果を調べた (10 分間処理)。その結果、酸性水は、5% 糞便の存在下においても 1 分間処理で 99.9% 以上のウイルス不活化率を示したが、アルカリ水は 10 分間の処理においてのみ効果を示した (表 2)。一方、pH2.7 の細胞培養液は PEDV に対して不活化効果を示さなかった (10 分間処理)。

清浄農場への PEDV の侵入は、ウイルス感染豚の導入に加えて、ウイルスを含む糞便に汚染された輸送車両や人の衣類や履物などの媒介物によって起こると考えられている。また、糞便中に排泄されたウイルスは、飼育環境下で長期間感染性が維持されることから、農場内での迅速な伝播が起こる。したがって、PED 対策の重要

表 1 次亜塩素酸水の PEDV に対する不活化効果

次亜塩素酸水 ¹⁾	感染価 (TCID ₅₀ /0.2ml)	不活化率 (%)
酸性水	≤ 10 ^{0.5}	≥ 99.9
アルカリ水	≤ 10 ^{0.5}	≥ 99.9
ウイルス対照 ²⁾	10 ^{3.5}	

1) PEDV と次亜塩素酸水 (pH3.1 と pH11.9) を 1:9 の割合で混合後、室温に 1 分間放置した。

2) 次亜塩素酸水の代わりに超純水と PEDV を混合後、同様に処理した。

表 2 5% 豚糞便存在下での次亜塩素酸水の PEDV 不活化効果と pH の影響

次亜塩素酸水 ¹⁾	pH	感染価 (TCID ₅₀ /0.2ml)		感染価 (TCID ₅₀ /0.2ml)	
		1 分間処理	不活化率 (%)	10 分間処理	不活化率 (%)
酸性水	3.0	≤ 10 ^{0.5}	≥ 99.9	≤ 10 ^{0.5}	≥ 99.9
アルカリ水	11.7	10 ^{2.0}	96.8	10 ^{1.0}	99.6
細胞培養液 ²⁾	2.7	nt ⁴⁾		10 ^{3.0}	68.3
ウイルス対照 ³⁾		10 ^{3.5}		nt	

1) PEDV と次亜塩素酸水を 1:9 の割合で混合後、室温に 1 及び 10 分間放置した。

2) 次亜塩素酸水の代わりに pH2.7 の細胞培養液を PEDV と混合後、同様に処理した。

3) 次亜塩素酸水の代わりに超純水と PEDV を混合後、同様に処理した。

4) nt = 試験せず。

な柱は、徹底的な衛生管理を実施してウイルス侵入を防ぐことと、さらにいったん侵入した場合には農場内での感染環を断ち切り、ウイルスの拡散を防ぐことである [2]。ウイルスの拡散防止には、畜舎の内部、車両、器具・器材、作業衣、長靴などウイルスを含む糞便が付着している可能性があるすべてのものを徹底的に消毒し、ウイルスの排除を図ることが重要である。一般的な消毒薬は PEDV に対して効果を示すが、大量の有機物を含む糞尿などの存在下において消毒効果が減弱されることが知られている (宮崎ら: 豚流行性下痢 (PED), 最新の家畜疾病情報 (II), 日獣会誌, 68, 89-92, 2015)。したがって、高い消毒効果を得るためには、消毒前に有機物の排除と洗浄を実施し、消毒を行うことが非常に重要である。しかし、大量の消毒薬の使用により環境の汚染が危惧される。

今回の試験により、特に酸性水が豚糞便存在下でも 1 分間処理という非常に短い作用時間で PEDV を不活化することが分かった。pH2.7 の細胞培養液による処理では不活化効果がみられなかったことから、酸性水の不活化効果は、単に溶液の酸性度に依存していないことが示唆された。

医学や獣医学分野をはじめ、多くの分野で消毒剤として広く使用されている次亜塩素酸ナトリウムは、その水溶液中の次亜塩素酸 (HClO) 及び次亜塩素酸イオン (ClO^-) の酸化作用により消毒効果を示すが、常温では徐々に自然分解されるなど不安定な物質であることから、安定性を図るために溶液がアルカリ性に保たれている。このため、HClO に比較して活性の微弱な ClO^- が大部分を占めている [10]。人体には有害なため取り扱いに注意が必要であり、酸化力が強いために金属の腐食が起きやすいなどの欠点がある。

一方、酸性次亜塩素酸水の消毒作用は、有効主成分である HClO に起因していることが知られている [11]。有芽胞菌 (枯草菌) に対する殺菌効果を次亜塩素酸ナトリウムと比較した実験では、酸性次亜塩素酸水のみが 3 分間の処理時間で殺菌効果を示した (<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002wy32-att/2r9852000002wybg.pdf>)。このように、次亜塩素酸水の殺菌効果は非常に高いことが示されている。また、種々のウイルスに関して、高い不活化効果が報告されている [5-8]。

本試験においてウイルス液と次亜塩素酸水の混合比が 1:1 の場合には、ウイルス不活化効果を示さなかった。1:9 の混合比で不活化効果が認められたが、ウイルス液に対して何倍量の次亜塩素酸水があれば効果を示すかは検討課題だが、実際の使用では作製装置を用いて大量

の次亜塩素酸水を作って使用することができるので、消毒効果について問題になることはないと思われる。

次亜塩素酸水は人体に対して非常に安全性が高く、使用に際して環境負荷が少ないことから、今後畜産現場においても洗浄及び消毒目的での利用促進が図られるものと思われる。

引用文献

- [1] 恒光 裕: 豚流行性下痢, 動物の感染症, 明石博臣, 大橋和彦, 小沼 操, 菊池直哉, 後藤義孝, 高井伸二, 宝達 勉編, 第3版, 785-788, 近代出版, 東京 (2004)
- [2] Lee C: Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus, *Virology*, 12, 193 (2015)
- [3] Huang YR, Hung YC, Hsu SY, Huang YW, Hwang DF: Application of electrolyzed water in the food industry, *Food Control*, 19, 329-345 (2008)
- [4] Thorn RM, Lee SW, Robinson GM, Greenman J, Reynolds DM: Electrochemically activated solutions: evidence for antimicrobial efficacy and applications in healthcare environments, *Eur J Clin Microbiol*, 31, 641-653 (2012)
- [5] Bui VN, Nguyen KV, Pham NT, Bui AN, Dao TD, Nguyen TT, Nguyen HT, Trinh DQ, Inui K, Uchiumi H, Ogawa H, Imai K: Potential of electrolyzed water for disinfection of foot-and-mouth disease virus, *J Vet Med Sci*, 79, 726-729 (2017)
- [6] Morita C, Sano K, Morimatsu S, Kiura H, Goto T, Kohno T, Hong WU, Miyoshi H, Iwasawa A, Nakamura Y, Tagawa M, Yokosuka O, Saisho H, Maeda T, Katsuo Y: Disinfection potential of electrolyzed solutions containing sodium chloride at low concentrations, *J Virol Methods*, 85, 163-174 (2000)
- [7] Tagawa M, Yamaguchi T, Yokosuka O, Matsutani S, Maeda T, Saisho H: Inactivation of a hepadnavirus by electrolysed acid water, *J Antimicrob Chemother*, 46, 363-368 (2000)
- [8] Tamaki S, Bui VN, Ngo LH, Ogawa H, Imai K: Virucidal effect of acidic electrolyzed water and neutral electrolyzed water on avian influenza viruses, *Arch Virol*, 159, 405-412 (2014)
- [9] Horie M, Kabemura M, Masatani T, Matsuo A, Ozawa M: Isolation and molecular characterization of porcine epidemic diarrhea viruses collected in Japan in 2014, *Arc Virol*, 161, 2189-2195 (2016)
- [10] 小方芳郎, 木村 眞: 次亜ハロゲン酸塩による酸化, 有機合成化学協会誌, 37, 581-594 (1979)
- [11] Nakagawara S, Goto T, Nara M, Ozawa Y, Hotta K, Arata Y: Spectroscopic characterization and the pH dependence of bactericidal activity of the aqueous chlorine solution, *Anal Sci*, 14, 691-698 (1998)

Virucidal Effects of Hypochlorous Acid Water on Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV)

Kunitoshi IMAI^{1)†}, Sachiko MATSUDA¹⁾, Haruko OGAWA¹⁾ and Hiroshi UCHIUMI²⁾

1) *Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Nishi 2-11, Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Japan*

2) *ACT Co., Ltd., ACT Building 5F, 16-2-2 Odoriminami, Obihiro, 080-0010, Japan*

SUMMARY

The effects of hypochlorous acid water on PEDV were examined. When PEDV was incubated with acidic (pH 3.0-3.1) or alkaline (pH 11.7-11.9) hypochlorous acid water at a ratio of 1 : 9 for 1 min, high inactivation rates of hypochlorous acid water ($\geq 99.9\%$) were observed. In particular, acidic hypochlorous acid water inactivated PEDV (inactivation rate: $\geq 99.9\%$) even in the presence of 5% pig fecal matter when incubated for 1 min. Because the cell culture medium (pH 2.7) did not inactivate PEDV, the virucidal effects of acidic hypochlorous acid water did not seem to be attributable to acidity. Hypochlorous acid water has the potential to find widespread use as an alternative to existing disinfectants in stock raising sites, because of its high safety and low environmental footprint.

— Key words : hypochlorous acid water, porcine epidemic diarrhea virus, viral inactivation.

† *Correspondence to : Kunitoshi IMAI (Section of Applied Veterinary Sciences, Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)
Nishi 2-11, Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Japan
TEL · FAX 0155-49-5892 E-mail : imaiku@obihiro.ac.jp*

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 103 ~ 106 (2019)*