

# 優れた殺菌効果をもつオルトジクロロベンゼン・ クレゾール複合製剤の抗鳥インフルエンザ ウイルス活性

藪田淑予<sup>1)</sup> 大槻公一<sup>1),3)</sup> 高桑弘樹<sup>1),2)†</sup> 小松弘樹<sup>4)</sup>

- 1) 京都産業大学鳥インフルエンザ研究センター (〒603-8555 京都市北区上賀茂本山)
- 2) 京都産業大学総合生命科学部 (〒603-8555 京都市北区上賀茂本山)
- 3) 鳥取大学農学部附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター (〒680-8553 鳥取市湖山町南4-101)
- 4) 大阪化成(株) (〒555-0041 大阪市西淀川区中島2-6-11)

(2018年4月17日受付・2018年9月4日受理)

## 要 約

幅広い病原体に対する効果を有し、長年畜舎等の消毒に使用されているオルトジクロロベンゼン・クレゾール複合製剤(動物用タナベゾール, 大阪化成(株), 大阪)は、鳥インフルエンザウイルスに対し顕著な不活化効果を示した。すなわち、100~200倍に希釈した本素材は、室温及び37℃で10分間反応させることにより高い不活化効果を示した。一方、4℃の反応では不活化効果は弱まったが、反応時間を延長することにより効果も高まった。有機物の存在により、不活化効果は若干低下したが、100倍程度希釈した濃度で十分な不活化効果を示した。以上より、本素材は、鳥インフルエンザウイルスに対する不活化剤としても有用であることが明らかになった。本素材は、元来衛生害虫から細菌まで幅広い効果が得られる消毒剤として使用されてきたが、現場の環境を十分に把握して適切な使用方法を用いることにより、抗鳥インフルエンザウイルス効果を念頭に置く、幅広い防疫対策に活用することが期待される。

——キーワード：抗鳥インフルエンザウイルス作用, 消毒剤, 有機物, オルトジクロロベンゼン・クレゾール複合製剤。  
-----日獣会誌 72, 205~209 (2019)

大阪化成(株)によって開発された殺菌消毒剤である有機塩素化合物、オルトジクロロベンゼンとクレゾールとの複合製剤(動物用タナベゾール, 大阪化成(株), 大阪)は、抗鶏コクシジウム効果、殺菌効果、殺虫効果を示すこと等が認められている(動物用医薬品協同組合編 動物用医薬品副作用等情報集 オルトジクロロベンゼン, <http://www.nval.go.jp/vet-cop/sub4/dichlorobenzene.htm>)。1970年に動物用医薬品として使用が認可され、その後半世紀近く、牛舎、豚舎、鶏舎などの畜舎の有用な消毒剤として使用され続けている。本剤は、消毒剤に対して強い抵抗性を示すコクシジウムのオーシストやハエ幼虫あるいはダニに対しても強い殺虫効果を示すのみならず、クレゾールも含まれており抗菌性を示すことから、応用範囲の広いことを特徴とする [1, 2]。

H5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスは、1997年以来、香港をはじめ中国南部の家きん類のみならず、人にも感染して大きな被害を及ぼしながら、アジア、ヨーロッパ、アフリカにまで拡散している [3] (厚生労働省 鳥インフルエンザ(H5N1)発生国及び人での感染症例, <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000162418.pdf>)。現在では、本ウイルスに感染した渡り鳥を含む多くの野鳥によって持ち運ばれ、地球規模で広範に拡散している(農林水産省 世界における家きんの高病原性・低病原性鳥インフルエンザ発生状況, [http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/tori/ai\\_wd.pdf](http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/tori/ai_wd.pdf))。一方、ほかの亜型の鳥インフルエンザウイルスとの遺伝子再集合を起こして、さまざまなNA亜型の多種類のH5亜型ウイルスが世界中に分布することが判明してい

† 連絡責任者(現所属)：高桑弘樹(京都産業大学感染症分子研究センター)

〒603-8555 京都市北区上賀茂本山 ☎・FAX 075-705-2977 E-mail: takakuwa@cc.kyoto-su.ac.jp

る [4]. 高病原性鳥インフルエンザウイルスの防遏は、喫緊の課題になっている。

2013年のはじめに中国東部に出現した H7N9 亜型低病原性鳥インフルエンザウイルスは、毎冬中国国内で人への感染を繰り返してきたが、2017年1月になり鶏に対して高病原性を示す株が出現した [5]. 今後、渡り鳥へこのウイルスの感染が起き、日本を含むアジア諸国に広く拡散する可能性が高まっている。したがって、H5のみならず H7 亜型ウイルスも注目しなければならない。

1970年以降畜舎等の消毒に幅広く使用されているオルトジクロロベンゼンとクレゾールの複合製剤である本剤が、H5 及び H7 亜型鳥インフルエンザウイルスに対する不活化効果を有することを検討した報告に接してこなかった。著者たちは、H5 及び H7 亜型鳥インフルエンザウイルスに対する本剤の不活化効果について検討する必要性を改めて認めた。そこで、H5 及び H7 亜型鳥インフルエンザウイルスを用いて検討を加えた。

#### 材料及び方法

**被験素材：**動物用タナベゾール (500g/415ml) は、オルトジクロロベンゼン (75.0g/100g) とクレゾール (7.0g/100g) の2種類の主成分からなる複合製剤である。本剤は、大阪化成(株)で製造された。通常 30~200 倍希釈で使用される。本試験でも、その希釈倍数を参考にした。

**使用ウイルス：**鳥インフルエンザウイルス A/コハクチョウ/島根/499/1983 (H5N3) 株 [6] を H5 亜型ウイルスとして、A/コハクチョウ/島根/42/1980 (H7N7) 株 [7] を H7 亜型ウイルスとして用いた。

H5N3 株は 1983 年、H7N7 株は 1980 年に島根県に飛来したコハクチョウの糞便から分離した低病原性鳥インフルエンザウイルスである。H5N3 株についてはヒナで累代継代することにより、高病原性を獲得することを確認している [8].

それぞれの株を 10 日齢発育鶏卵の尿膜腔内に接種し、35℃にて 2 日間培養を続行した。その後、尿膜腔液を採取しウイルス液とした。本試験に供したウイルス液のウイルス力価は、50% 発育鶏卵感染価 (EID<sub>50</sub>) を計測することにより算出した [9].

**使用鶏卵：**有精卵を栃木県那須郡の青木種鶏場から導入し、本研究センターで孵卵させ、10 日齢で試験に用いた。

**本剤の抗鳥インフルエンザウイルス活性の検討：**被験液は滅菌蒸留水を用いて 50~800 倍または 1,600 倍まで、2 倍段階希釈によって調製した。ウイルス液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて約 10<sup>8</sup> EID<sub>50</sub>/0.2ml 濃度に調製した。希釈した被験液ごとに、ウイルス液を等量混合した。これらウイルスと本剤を混合した液を、室温

または 37℃ の恒温槽及び 4℃ (氷水) に浸漬し、10 分または 30 分間静置して反応させた。また、4℃ における反応では 60 分間の検討も行った。被験液の代わりに滅菌水とウイルス液を同様に混合して対照とした。

反応後、速やかに反応液を PBS にて 100 倍に希釈した希釈液を、それぞれ 3 個の 10 日齢発育鶏卵の尿膜腔内に 0.2ml ずつ接種し、35℃ にて 2 日間培養した。培養後、尿膜腔液を採取し、0.5% 鶏赤血球浮遊液と反応させ、赤血球の凝集によりウイルス増殖の有無を判定した。

調べた鶏卵 3 個とも、ウイルス増殖陰性の場合を明らかに不活化効果あり (+)、1 ないし 2 個がウイルス増殖陰性の場合をある程度不活化効果あり (±)、3 個ともウイルス増殖陽性の場合を不活化効果なし (-) と判定した。実験は、同じ条件で 2 回ないし 3 回繰り返した。

#### 成 績

**H5 亜型鳥インフルエンザウイルスに対する本剤の不活化効果：**本剤の H5 亜型ウイルスに対する不活化効果について、まず調べた。実験は 2 回実施した。室温 10 分間の反応の試験のみ 3 回行った。

得られた結果を表 1 に示した。被験液を H5 亜型ウイルスと 37℃ で反応させた場合、10 分間の反応でも 400 倍希釈濃度で明らかなウイルス不活化効果を示した。室温で反応させた場合は、200 倍希釈濃度で 10 分間反応させることにより、明らかな不活化効果が認められた。一方、4℃ の低温下で反応させた場合、不活化効果は低下した。すなわち、10 分間の反応では希釈濃度を 50 倍に高めることにより、初めて明らかな不活化効果が認められた。反応温度の高低が不活化効果に影響することが明らかになったが、いずれの反応温度においても、作用時間を長くすることで明確な不活化効果を示すことができた。

**有機物が存在した場合の H5 亜型鳥インフルエンザウイルスに対する不活化効果：**有機物の存在によるウイルス不活化効果に及ぼす影響を調べるため、被験液とウイルス液の混合液に、牛胎仔血清を最終濃度が 5% になるように添加し、H5 亜型鳥インフルエンザウイルスに対する本剤の不活化効果と同様の試験を行った。本試験は 2 回実施した。

得られた結果を表 2 に示した。血清の添加によってウイルス不活化効果は若干低下したが、反応温度を 37℃ または室温に設定した場合、被験液の 100 倍希釈濃度の被験素材を 10 分間反応させることにより、明らかな不活化効果が認められた。また、30 分間の反応では、37℃ 及び室温でも 200 倍希釈濃度で明らかな不活化効果が認められた。4℃ で反応させた場合は不活化効果が

表1 各希釈濃度における H5 亜型ウイルスに対する不活化効果

反応		希釈倍率					
温度	時間	50×	100×	200×	400×	800×	1,600×
37℃	30分	NT	++	++	++	+-	NT
	10分	++	++	++	++	--	--
室温	30分	NT	NT	++	+±	±-	--
	10分	+++	+++	+++	+±-	±--	---
4℃	60分	NT	++	++	±-	--	NT
	30分	++	±±	±-	--	--	NT
	10分	++	+-	--	--	--	NT

NT：試験せず  
 +：明らかな不活化効果， ±：ある程度の不活化効果，  
 -：不活化効果なし

表2 有機物存在下での H5 亜型ウイルスに対する不活化効果

反応		希釈倍率					
温度	時間	50×	100×	200×	400×	800×	1,600×
37℃	30分	NT	++	++	--	--	--
	10分	NT	++	+-	--	--	NT
室温	30分	NT	++	++	--	--	NT
	10分	++	++	+±	--	--	NT
4℃	60分	++	++	--	--	--	NT
	30分	++	--	--	--	--	NT
	10分	++	--	--	--	--	NT

NT：試験せず  
 +：明らかな不活化効果， ±：ある程度の不活化効果，  
 -：不活化効果なし

低下し、10分間の反応では50倍希釈濃度で初めて明らかな不活化効果が認められた。しかし、4℃でも60分間反応させた場合は、100倍希釈濃度で明らかな不活化効果が認められた。いずれの作用温度においても、反応時間を長くすることにより、より強い抗ウイルス作用が認められた。

**H7 亜型鳥インフルエンザウイルスに対する不活化効果：**被験液の H7 亜型ウイルスに対する不活化効果について調べた。H5 亜型ウイルスと同様の条件で試験を3回実施した。

得られた結果を表3に示した。被験液を H7 亜型ウイルスと 37℃で反応させた場合、100倍希釈濃度の被験液を10分間反応させることにより、明らかなウイルス不活化効果が認められた。室温で反応させた場合は、50倍希釈濃度の被験液を10分間反応させることにより、明らかな不活化効果が認められた。また、30分間の反応では、37℃では200倍希釈濃度、室温では100倍希釈濃度及び4℃では50倍希釈濃度で明らかな不活化効果が認められた。さらに、4℃で60分間反応させた場合は、100倍希釈濃度で明らかな不活化効果が認められ

表3 各希釈濃度における H7 亜型ウイルスに対する不活化効果

反応		希釈倍率				
温度	時間	50×	100×	200×	400×	800×
37℃	30分	+++	+++	+++	±--	---
	10分	+++	+++	+±±	---	---
室温	30分	+++	+++	+±±	+---	---
	10分	+++	+±±	±--	---	---
4℃	60分	+++	+++	---	---	---
	30分	+++	±±±	---	---	---
	10分	+±±	---	---	---	---

+：明らかな不活化効果， ±：ある程度の不活化効果，  
 -：不活化効果なし

表4 有機物存在下での H7 亜型ウイルスに対する不活化効果

反応		希釈倍率				
温度	時間	50×	100×	200×	400×	800×
37℃	30分	+++	+++	---	---	---
	10分	+++	+±±	---	---	---
室温	30分	+++	+++	---	---	---
	10分	+++	+±±	±--	---	---
4℃	60分	+++	---	---	---	---
	30分	+++	---	---	---	---
	10分	+++	---	---	---	---

+：明らかな不活化効果， ±：ある程度の不活化効果，  
 -：不活化効果なし

た。H5 亜型ウイルスの試験結果と同様に、反応温度が不活化効果に影響し、特に4℃の低温下では不活化効果は低下した。いずれの温度においても、反応時間を長くすることでウイルス不活化効果がより顕著になった。

**有機物存在下での H7 亜型鳥インフルエンザウイルスに対する不活化効果：**有機物の存在によるウイルス不活化効果に及ぼす影響を調べるために、H5 亜型ウイルスと同様に、被験液とウイルス液との混合液に牛胎仔血清を最終濃度が5%になるように添加して実験を行った。本試験を3回実施した。

得られた結果を表4に示した。血清の添加によりウイルス不活化効果は若干低下したが、50倍希釈濃度の被験液で37℃、室温及び4℃において、10分間反応させることにより、明らかなウイルス不活化効果が認められた。また、30分間反応させた場合には、37℃または室温で100倍希釈濃度の被験液で、明らかな不活化効果が認められた。

考 察

本研究に用いたのは、オルトジクロロベンゼン

(75.0g/100g)とクレゾール(7.0g/100g)との複合製剤であるが、オルトジクロロベンゼンは、卓越した抗シロアリ効果のあることは、以前から知られていた[10]。前述したように、ハエの幼虫にも高い致死率を示し、さらに殺ダニ効果のあることは、半世紀以上前からすでに知られていた。本素材は、オルトジクロロベンゼンと殺菌効果のあることが知られているフェノール系のクレゾールの合剤である。以上の特性を生かし、屋外よりもむしろ鶏舎等、さまざまな畜舎内で効果を示す消毒剤として、長年にわたって使用されている。

一方、通常野外で用いられている範囲の濃度で、鳥インフルエンザウイルスに対しても顕著な不活化効果を示すことが、今回の試験から初めて判明した。感作条件により不活化効果に若干の差異は生じた。しかし、用法・用量に規定されている濃度である踏込み槽：30～100倍、畜舎・鶏舎内及び畜舎、鶏舎の周辺：100～200倍希釈液において、鳥インフルエンザウイルスに対して明らかな効果を示した。このことから、本素材は、鶏舎内のみならず、屋外での鳥インフルエンザ防疫対策の一環として、使用し得ることが明らかになった。

また、有機物の存在により、本素材の不活化効果は若干低下したが、100倍程度希釈しても十分な鳥インフルエンザウイルス不活化効果を示した。このことは、本素材は屋外に比べて、鶏の糞や羽毛等により汚染されている可能性の高い鶏舎内での鳥インフルエンザ対策に、より有効に働くことが期待できる素材であることを示唆している。

一方、ほかの多くの消毒剤同様、室温及び37℃の感作で著明な鳥インフルエンザウイルス不活化効果を示したが、低温の4℃では不活化効果は減じた。表2に示したように、10分間の感作では明らかな効果は認められず、明瞭な効果を発揮するためには、感作時間を60分間まで延長する必要がある。すなわち、本素材の消毒剤としての効果を養鶏場等のフィールドで最大限発揮させるためには、本素材を使用する現場の環境を十分に把握する必要があることが明らかになった。その環境(特に気温)において最も適切であると思われる用法の確立を図る必要性はきわめて高い。

この点に関し、鳥取大学の山口ら(農林水産省「レギュラトリーサイエンス新技術開発事業」の研究成果報告会(平成27年11月5日)の資料「高病原性鳥インフルエンザの野生動物による感染の確認及び消毒方法の開発」[http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/regulatory\\_science/pdf/ai\\_3.pdf](http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/regulatory_science/pdf/ai_3.pdf))は、消毒剤の使用環境が地域や季節により大きく異なることに着目した注目すべき実験を行っている。すなわち、鳥インフルエンザウイルスに対する低温下での各種消毒薬の効果は、室温あるいは37℃の場合に比べると低下するのではないかと予測した。そこで、さまざまな

低温下での検証を実施している。

その結果、山口らは以下に示す興味ある所見を得ている。所定濃度の消毒薬に鶏糞を1%添加した場合、逆性石鹼及び消石灰は、0℃以下での消毒効果を激減させた。さらに、塩素系、ヨウ素系、グルタール製剤は、-5℃以下でそれらの消毒効果は大幅に減ずることを確認した。以上より、ほとんどすべての消毒剤は低温下でその効力が明らかに減ずることが明らかになった。

これまで日本国内で発生した鳥インフルエンザは、晩秋～初春の冬季間にほとんど限定されている。したがって、効果的な鳥インフルエンザ防疫対策を立てるためには、冬季間における低温下での防疫対策を確立する必要がある。しかし、防疫対策の主要な部分を占める低温下における的確な消毒剤の用法について、いまだ詳細には検討されておらず、不安が残されたままになっているのが実情である。

以上より、本素材の抗鳥インフルエンザウイルス効果についても、今後、4℃よりさらに低い温度を設定した条件での消毒効果についても検討を加える必要がある。一方、本素材の幅広い消毒効果を有する特徴を考えると、本素材を極寒期に鳥インフルエンザ対策に使用する場合、気温が非常に低い鶏舎外で使用するよりも、温度が比較的高く厳冬期でも衛生害虫や病原細菌の増殖しやすい鶏舎内で使用するのが望ましいのかもしれない。

近年、海外からの観光客が違法に持ち込んだ未加熱家きん肉等が鳥インフルエンザウイルスに汚染していることが明らかになっている(柴田ら：第159回日本獣医学会、永田：第160回日本獣医学会)。実際に、これらから中国国内を汚染しているH5N6及びH7N9亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスと同じ性状のウイルスが分離されている。

中国では、季節に関係なく年間を通して鳥インフルエンザウイルスが検出されている。すなわち、秋冬の渡り鳥の季節だけでなく、春夏といった温暖期にあっても、国内に鳥インフルエンザウイルスが、観光客等により持ち込まれる可能性は十分にあり、注意が必要である。したがって、年間を通して養鶏場、特に鶏舎内の徹底的な消毒が求められる。このような考え方を基に本素材の計画的な使用を考える必要もある。

最後に、本研究の実施に当たり、協力いただいたDSファーマアニマルヘルス(株)の酒井 実氏、大阪化成(株)の鈴木公雄氏に感謝する。

## 引用文献

- [1] 遠山輝彦, 鈴木 猛: 薬剤によるハエ幼虫駆除に関する研究(第1報)接触毒の効力試験とそれによる諸種薬剤の効力比較, 防虫科学, 19, 115-121 (1954)
- [2] 本間正一: 医薬品の中の異物(特にダニ)の防除に関する研究VI 薬剤の殺ダニ効果, 薬剤学, 27, 192-196

- (1967)
- [ 3 ] Mounts AW, Kwong H, Izurieta HS, Ho Y, Au T, Lee M, Buxton Bridges C, Williams SW, Mak KH, Katz JM, Thompson WW, Cox NJ, Fukuda K : Case-control study of risk factors for avian influenza A (H5N1) disease, Hong Kong, 1997, *J Infect Dis*, 180, 505-508 (1999)
- [ 4 ] Guo H, de Vries E, McBride R, Dekkers J, Peng W, Bouwman KM, Nycholat C, Verheije MH, Paulson JC, van Kuppeveld FJ, de Haan CA : Highly Pathogenic Influenza A (H5Nx) Viruses with Altered H5 Receptor-Binding Specificity, *Emerg Infect Dis*, 23, 220-231 (2017)
- [ 5 ] Su W, Cheng KL, Chu DKW, Zhou J, Mao X, Zhong Z, Song Y, Peiris M, Wu J, Yen HL : Genetic analysis of H7N9 highly pathogenic avian influenza virus in Guangdong, China, 2016-2017, *J Infection*, 76, 93-96 (2018)
- [ 6 ] Otsuki K, Takemoto O, Fujimoto R, Yamazaki K, Kubota T, Hosaki H, Mitani T, Kawaoka Y, Tsubokura M : Isolation of H5 influenza viruses from whistling swans in western Japan in November 1983, *Acta Virol*, 28, 524 (1984)
- [ 7 ] Tsubokura M, Otsuki K, Kawaoka Y, Yanagawa R : Isolation of influenza A viruses from migratory waterfowls in San-in District, Western Japan in 1979-1980, *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B*, 173, 494-500 (1981)
- [ 8 ] Ito T, Goto H, Yamamoto E, Tanaka H, Takeuchi M, Kuwayama M, Kawaoka Y, Otsuki K : Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens, *J Virol*, 75, 4439-4443 (2001)
- [ 9 ] Reed LJ, Muench H : A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *Am J Epidemiol*, 27, 493-497 (1938)
- [ 10 ] Kowal RJ, St George RA : Preliminary results of termite soil-poisoning tests, *J Econ Entomol*, 41, 112-113 (1948)

### Anti-Avian Influenza Virus Properties of Ortho dichlorobenzene Cresol Complex Formulation with Strong Antimicrobial Activity

Toshiyo YABUTA<sup>1)</sup>, Koichi OTSUKI<sup>1),3)</sup>, Hiroki TAKAKUWA<sup>1),2)†</sup>  
and Hiroki KOMATSU<sup>4)</sup>

- 1) *Avian Influenza Research Centre, Kyoto Sangyo University, Motoyama Kamigamo, Kita-ku, Kyoto, 603-8555, Japan*
- 2) *Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, Motoyama Kamigamo, Kita-ku, Kyoto, 603-8555, Japan*
- 3) *Avian Zoonoses Research Center, Tottori University, 4-101 Koyama-cho Minami, Tottori, 680-8553, Japan*
- 4) *Osaka Kasei Co., Ltd., 2-6-11 Nakajima, Nishiyodogawa-ku, Osaka, 555-0041, Japan*

#### SUMMARY

Orthodichlorobenzene cresol complex formulation (trade name: Tanabezole, Osaka Kasei Co., Ltd., Osaka) has been recognized not only for killing larva of flies but also for its antimicrobial and anti-parasitic properties. In this study, we investigated the anti-avian influenza virus properties of this agent in ovo. It showed strong anti-avian influenza virus properties. When this agent was diluted at 1 : 100 to 200 and put into contact with avian influenza virus for 10 minutes at room temperature (37 °C), no surviving virus was detected. Although its anti-viral properties weakened somewhat at 4 °C, this agent showed strong anti-avian influenza virus properties when it was put into contact with the virus for 60 minutes at same temperature. The presence of organic matter in virus fluid did not affect the anti-avian influenza virus properties. It was concluded that this agent is a useful disinfectant in the poultry industry. —Key words : anti-avian influenza virus properties, disinfectant, organic matter, orthodichlorobenzene cresol complex formulation.

† Correspondence to (Present address) : Hiroki TAKAKUWA (Center for Molecular Research in Infectious Diseases, Kyoto Sangyo University)

*Motoyama Kamigamo, Kita-ku, Kyoto, 603-8555, Japan*

*TEL · FAX 075-705-2977 E-mail : takakuwa@cc.kyoto-su.ac.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 72, 205 ~ 209 (2019)