

資料

PED ウイルスの物理化学的性状に関する研究

鈴木 亨、大橋誠一（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門）

Suzuki, T. and Ohashi, S. (2018). Sterilization effect on PED virus.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 71, 17-20.

キーワード：豚流行性下痢ウイルス、物理化学的性状、消毒薬、不活化

はじめに

家畜の伝染性疾病の侵入防止及び発生予防のためには、日頃からの農場における飼養に係る衛生管理の徹底が重要であるとの観点から、平成16年に家畜の所有者の遵守すべき衛生管理の基準（以下、飼養衛生管理基準）が定められた。その後、平成22年の宮崎県における口蹄疫の発生後にとりまとめられた「口蹄疫対策検証委員会報告書」を踏まえ、平成23年に同基準の見直しが行われた。しかしながら、わが国では平成25年10月に豚流行性下痢（以下、PED）が発生し、全国に感染拡大し、甚大な被害をもたらした。この要因を考えた場合、PED 発生農場においては、同基準が十分に効果を発揮していなかったのではないかと推察された。これを受けて、平成26年度飼養衛生管理基準の実効性確保に関する調査事業が立ち上がり、農場における飼養衛生管理に関する実態等を調査し、飼養衛生管理基準の実効性や衛生管理の徹底が生産性に与える影響等を検証することが行われた。本研究はその調査事業の一環として、飼養衛生管理基準の見直しに資する PED ウイルスに関する科学的知見を収集するため、実験室内において、細胞培養感染系を用いて、PED ウイルスに対する不活化条件および消毒薬の有効性について検証した。

主な試験内容

1. PED ウイルスに対する不活化条件

1.1. 有機物の有無条件下における温度変化によるウイルスの不活化について

1.2. 水素イオン濃度 (pH) 変化によるウイルスの不活化について

2. PED ウイルスに対する消毒薬の有効性

2.1. 消毒薬の有効性について

2.1.1. 温度変化による消毒薬効果への影響について

2.1.2. 有機物混入による消毒薬効果への影響について

2.2. 消毒薬の有効最小濃度について

なお、PED ウイルスに対する不活化条件および消毒薬の有効性を検証するにあたって、PED ウイルスは NK94P6Tr(-)株（力価 10^5 TCID₅₀/100 μ l）、培養細胞は Vero KY-5 細胞を用いた。

1. PED ウイルスに対する不活化条件

1.1. 有機物の有無条件下における温度変化によるウイルスの不活化について

PED ウイルスを100 μ l ずつマイクロチューブに分注し、さらに FBS 非添加、2% FBS 添加の両条件で 70 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C に温めたヒートブロックで 1、3、7、10、20、30、40、50 分間処理し、PED ウイルスの不活化を検証した。また同様に、FBS 非添加、2% FBS 添加の両条件で 37 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C (室温)、4 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C で 1、3、5、7、14、21、28、35 日間処理し、PED ウイルスの不活化を検証した。

1.2. pH 変化によるウイルスの不活化について

限外ろ過スピнкаラム100K（株式会社アプロサイエンス）を用いて PED ウイルスを精製し、以下の手順に従って、直接ウイルスと pH 緩衝液（pH 2、4、6、7、7.6、8、9、10、12）を感作させ、PED ウイルスの不活化を検証した。

【手順1】滅菌水500 μ l をスピнкаラムに添加し、14,000g、2分、4 $^{\circ}$ C で遠心し、ろ液は除去した。この予備洗浄作業を2回実施した。

【手順2】PED ウイルス液200 μ l をスピнкаラムに添加し、14,000g、10分、4 $^{\circ}$ C で遠心し、カラム上に PED ウイルスを回収した。

【手順3】pH 緩衝液250 μ l をスピнкаラムに添加し、

5分間一定温度下でPEDウイルスと感作させた後、14,000g、10分、25℃(室温)で遠心し、ろ液を除去した。

【手順4】滅菌水300 μ lをスピнкаラムに添加し、14,000g、5分、4℃で遠心し、ろ液は除去した。この洗浄作業を3回実施した。

【手順5】2% FBS添加細胞培養液200 μ lをスピнкаラムに添加し、10回ピペティングした後にPEDウイルスを回収した。

ウイルス不活化の検証方法

感作後のPEDウイルスを用いてタイトレーションを実施し、培養細胞への感染価によってそれぞれの効果を検証した。ウイルス接種前日に10% FBS添加細胞培養液を用いて 5×10^5 cell/mlに調整した細胞を96wellプレートに100 μ lずつ分注し、37℃、5%CO₂ガス存在下で培養した。ウイルス接種時には2% FBS添加細胞培養液でプレートを洗浄した後、同細胞培養液で調整した感作後のウイルスを10倍階段希釈し、各well 100 μ lずつ接種し、37℃、5%CO₂ガス存在下で1週間培養して、CPE(細胞傷害性)の有無を判定した。10^{0.5}TCID₅₀/100 μ l以下の場合を不活化されたと定めた。

2. PEDウイルスに対する消毒薬の有効性

PEDウイルスに対する消毒薬の感作方法

限外ろ過スピнкаラム100K(株式会社アプロサイエンス)を用いてPEDウイルスを精製し、以下の手順に従って、直接ウイルスと消毒薬を感作させ、それらの効果について検証した。

【手順1】滅菌水500 μ lをスピнкаラムに添加し、14,000g、2分、4℃で遠心し、ろ液は除去した。この予備洗浄作業を2回実施した。

【手順2】PEDウイルス液200 μ lをスピнкаラムに添加し、14,000g、10分、4℃で遠心し、カラム上にPEDウイルスを回収した。

【手順3】消毒薬250 μ lをスピнкаラムに添加し、5分間室温下(25℃)でPEDウイルスと接触させた後、14,000g、10分、25℃で遠心し、ろ液を除去した。

【手順4】滅菌水300 μ lをスピнкаラムに添加し、14,000g、5分、4℃で遠心し、ろ液は除去した。この洗浄作業を3回実施した。

【手順5】2% FBS添加細胞培養液200 μ lをスピнкаラムに添加し、10回ピペティングした後にPED

ウイルスを回収した。

ウイルス不活化の検証方法

ウイルスの不活化は1.2.で述べた方法と同様の方法で検証した。

2.1. 消毒薬の有効性について

市販されている5種類の消毒薬(逆性石鹼剤、塩素系製剤、アルデヒド剤、ヨード系製剤、グルコン酸塩)を用意し、それぞれを常用濃度に希釈し(範囲で示されている場合は、濃い濃度を選択)、上述の手順に従って、PEDウイルスと感作させ、PEDウイルスに対する消毒薬の有効性を検証した。その一方で、消毒薬のスピнкаラムへの残留による細胞毒性の有無を確認するため、上述した【手順2】において、ウイルス液の代わりに細胞培養液を用いて同様に操作し、検証した。

2.1.1. 温度変化による消毒薬効果への影響について

【手順3】において、あらかじめ4℃に冷却しておいた消毒薬とPEDウイルスを氷上で感作させ、その後の遠心操作もすべて4℃で実施し、PEDウイルスに対する温度変化による消毒薬効果への影響を検証した。

2.1.2. 有機物混入による消毒薬効果への影響について

【手順3】において、有効性が確認された消毒薬の中から4種類(逆性石鹼剤、塩素系製剤、アルデヒド剤、ヨード系製剤)を選択し、それら消毒薬に2% FBSを添加した後、PEDウイルスと感作させ、PEDウイルスに対する有機物混入による消毒薬効果への影響を検証した。

2.2. 消毒薬の有効最小濃度について

有効性が確認された消毒薬の中から3種類(逆性石鹼剤、塩素系製剤、アルデヒド剤)を選択し、それぞれ常用濃度の10倍、100倍、1000倍に希釈し、上述の手順に従って、PEDウイルスと感作させ、PEDウイルスに対する消毒薬の効果を検証した。

成績

1. PEDウイルスに対する不活化条件

1.1. 有機物の有無条件下における温度変化によるウイルスの不活化について

表1. 温度変化によるウイルスの不活化

		1分	3分	7分	10分	20分	30分	40分	50分
70°C	FBS -	○	×	×	×	×	×	×	×
	FBS +	○	×	×	×	×	×	×	×
60°C	FBS -	○	×	×	×	×	×	×	×
	FBS +	○	○	×	×	×	×	×	×
50°C	FBS -	○	○	○	○	○	○	○	×
	FBS +	○	○	○	○	○	○	○	×

		1日	3日	5日	7日	14日	21日	28日
37°C	FBS -	×	×	×	×	×	×	×
	FBS +	×	×	×	×	×	×	×
25°C	FBS -	○	×	×	×	×	×	×
	FBS +	○	○	×	×	×	×	×
4°C	FBS -	○	○	○	○	○	○	○
	FBS +	○	○	○	○	○	○	○
-20°C	FBS -	○	○	○	○	○	○	○
	FBS +	○	○	○	○	○	○	○

○：感染性あり、×：感染性なし

70°CではFBS非添加、2%FBS添加の両条件共に3分で不活化され、60°Cでは前者は3分、後者は7分で不活化され、50°Cでは両条件共に50分で不活化された(表1)。また、37°Cでは1日以内に両条件共に不活化され、25°C(室温)では前者は3日、後者は5日で不活化されたが、4°Cおよび-20°Cでは4週間経過しても感染性が保たれていることが明らかとなった。

1.2. pH変化によるウイルスの不活化について

pH12以上ではウイルスの感染性は完全に消失したが、pH2以下では感染性は大きく減弱したものの、完全に消失しなかった(図1)。また、本ウイルスはpH6-10では、比較的安定であることが明らか

となった。

2. PEDウイルスに対する消毒薬の有効性

2.1. 消毒薬の有効性について

5種類の消毒薬について、室温(25°C)下、常用濃度で用いた際には、全ての消毒薬がPEDウイルスの不活化に有効であることが明らかとなった(表2)。なお、消毒薬のスピンカラムへの残留による細胞毒性は確認されなかった。

2.1.1. 温度変化による消毒薬効果への影響について

5種類の消毒薬について、4°C下、常用濃度で用いた際には、逆性石鹼剤およびグルコン酸塩はPEDウイルスの不活化に有効であることが明らか

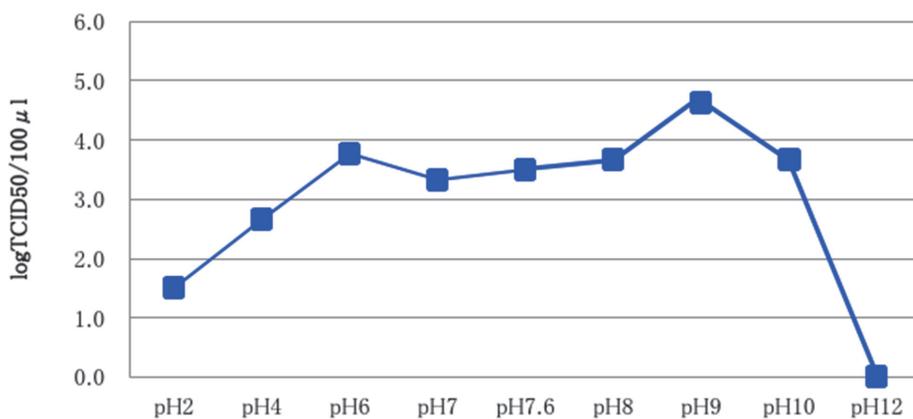


図1. pH変化によるウイルスの不活化

表2. PEDウイルスに対する消毒方法の検討

薬効分類	室温、5分 (常用濃度)	4℃、5分(常 用濃度)	有機物 (2% FBS) 混入 (常用濃度)	室温、5分 (常用濃度 1/10希釈)	室温、5分 (常用濃度 1/100希釈)
逆性石鹼剤	○	○	○	○	×
塩素系製剤	○	×	○	○	×
アルデヒド剤	○	×	○	○	×
ヨード系製剤	○	×	×	-	-
グルコン酸塩	○	○	-	-	-

○:不活化、×:不活化せず、-:未実施

かとなった。しかしながら、塩素系製剤、アルデヒド剤およびヨード系製剤は、PEDウイルスを不活化できなかった。すなわち、それらの有効性が温度により低下することが明らかとなった。

2.1.2. 有機物混入における消毒薬効果への影響について

用いた4種類の消毒薬のうち、2%FBS存在下において、逆性石鹼剤、塩素系製剤、アルデヒド剤はPEDウイルスの不活化に有効であったが、ヨード系製剤はその有効性が低下することが明らかとなった。

2.2. 消毒薬の有効最小濃度について

有効性が確認された消毒薬のうち、3種類の消毒薬について、常用濃度の10倍、100倍、1000倍希釈液を用いて、ウイルスの不活化を検証した結果、10倍希釈液ではそれらの有効性は認められたが、100倍、1000倍希釈液では有効性は認められなかった。

おわりに

PEDウイルスは有機物の有無にほとんど関係なく、高温下(37℃以上)では比較的容易に不活化することが示された。一方、低温下(4℃以下)では、ウイルスは長い期間感染性を保持していることが示された。従って、排泄されたウイルスを含む糞便由来の堆肥等の処理については、深部までしっかりと熱をかけることが重要であることが示唆された。本ウイルスは水素イオン濃度(pH)に対しては幅広く安定的であったため、酸、あるいはアルカリ処理には十分に注意が必要

であると考えられた。各種消毒薬において定められた常用濃度に従って用いた際には、いずれの消毒薬も本ウイルスの不活化に有効であることが明らかとなった。しかしながら、低温条件下(4℃)や有機物混入時(この場合、FBS添加)においてはいくつかの消毒薬において、それらの有効性が低下することが明らかとなった。消毒の基本は、洗浄、消毒、乾燥という工程を遵守することが病原性微生物の感染性を不活化するために有効である。改めて、消毒の際には有機物を出来だけ除去してから消毒を行い、そして十分に乾燥させてから、畜舎等を使用することの重要性が確認された。また、本研究を通じて得られたデータを今後のPED防疫対策の見直し、さらには飼養衛生管理基準の見直しに積極的に活用していただきたい。

謝辞

本内容は平成26年度飼養衛生管理基準の実効性確保に関する調査事業の助成を受けて実施されたものである。また、これらの試験は五嶋祐介先生(岩手県中央家畜保健衛生所)の協力のもと実施いたしました。心より深謝いたします。