

# 消石灰の鳥インフルエンザウイルスに対する消毒効果の検討

島根県家畜病性鑑定室

石倉 洋司

## 1. はじめに

消石灰は安価であり、有機物の存在下でも使用可能なことから畜産現場で頻繁に使われる消毒資材であり、その特性としては強力なアルカリ化作用や脱水作用、脱脂作用が挙げられている<sup>1,8)</sup>。

昨今、高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) の発生が相次ぎ、その防疫対策としての消毒作業において消石灰が広く用いられている。多くの広報誌などは、HPAI ウイルスに対する消石灰の作用機序として「高アルカリによる作用」だとしているが、一方で「pH12、15 分の感作」では鳥インフルエンザウイルス (AIV) は不活化されないことが報告されており<sup>4)</sup>、矛盾する結果となっている。そこで、消毒指導にあたり効果の検討が必要と判断し、消石灰の AIV に対する消毒効果の検討と消毒作用機序の解明を試みた。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 材料

供試ウイルスは、カモ糞便由来 H4N6 亜型株 ( $\log(\text{EID}_{50}/0.1\text{ml}) \div 6.5$ 、以下  $\text{EID}_{50}$  値は  $\log$  表記とする) を含む尿膜腔液 (以下、ウイルス液とする)、消石灰は市販の肥料用消石灰 (65%消石灰)、発育鶏卵は 8~12 日齢を供試した。

### 2-2. 消石灰散布による消毒効果の検討 (図 1)

3 枚の  $\phi 90\text{mm}$  シャーレに濾紙を敷き、そこへウイルス液 1ml を浸透させたのち 1 枚には消石灰 3g、もう 1 枚には実験用試薬  $\text{CaCO}_3$  3g を均一に散布し、残り 1 枚は無処置対照として、それぞれ 30 分間放置した。その後、3 枚のシャーレ内の濾紙と消石灰または  $\text{CaCO}_3$  を 50ml 遠沈管に採取して、それぞれを 9ml の PBS(-) にて懸濁し、3000rpm で 10 分間遠心分離した。この上清を  $0.45\mu\text{m}$  濾過処理したものを発育鶏卵接種材料 (ウイルス液としては  $10^{-1}$  希釈) として 10 倍階段希釈系列を作成し、それぞれを発育鶏卵尿膜腔内に 0.1ml ずつ接種後  $37^\circ\text{C}$  4 日間孵卵し、尿膜腔液の HA 性を確認することで  $\text{EID}_{50}$  値を算出

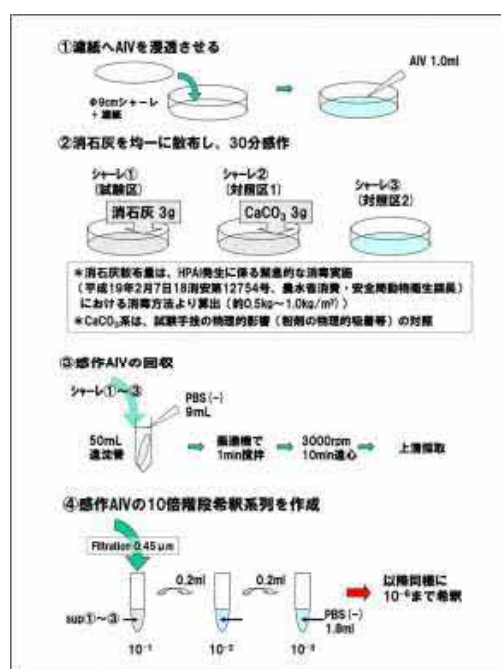


図1. 消石灰散布による消毒効果の検討

した。

### 2-3. 消石灰乳剤上清による消毒効果の検討 (図 2)

蒸留水を用いて 30%(w/v) 消石灰乳剤を作成し、3000rpm で 10 分間遠心分離後の上清 1.8ml に対してウイルス液 0.2ml を加え、30 分間感作させた。この上清感作ウイルス液を 0.45 μm 濾過処理したものを発育鶏卵接種材料 (ウイルス液としては 10<sup>-1</sup> 希釈) として 10 倍階段希釈系列を作成し、EID<sub>50</sub> 値を算出した。同時に、消石灰の代わりに Ca(OH)<sub>2</sub> を用いたもの、蒸留水 1.8ml に対してウイルス液 0.2ml を加えたものについても同様に EID<sub>50</sub> 値を算出した。

また、感作時間を 60 分とした場合、乳剤濃度を 1~50%とした場合、ならびに乳剤上清を 0.10 μm 濾過処理した場合の消毒効果の比較を行った。

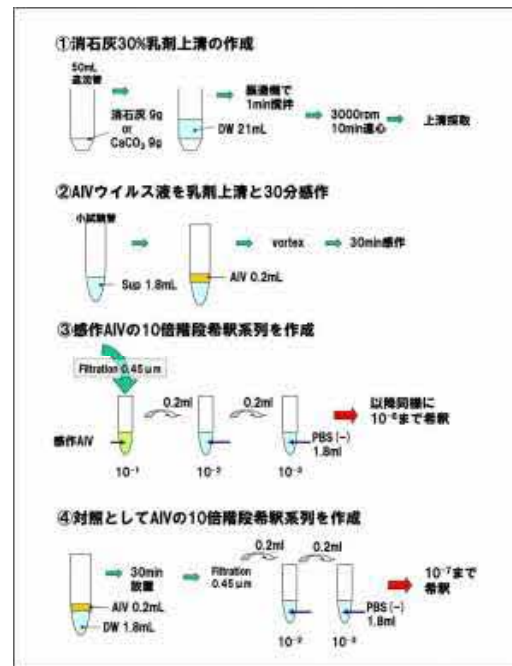


図2. 消石灰乳剤上清による消毒効果の検討

### 2-3. 実験用試薬による AIV 不活化効果の検討

実験用試薬 Ca(OH)<sub>2</sub>、NaOH および KOH について 0.1mol/l 水溶液を作成し、消石灰乳剤上清試験同様に EID<sub>50</sub> 値を算出し、AIV 不活化効果の検討を行った。また、これら 0.1mol/l 水溶液を pH12 に調整した場合の効果の検討も行った。

## 3. 結果

### 3-1. 消石灰散布による消毒効果

結果は表 1 に示すとおり、対照の無処置の EID<sub>50</sub> 値が 6.0、CaCO<sub>3</sub> 処置が 5.0 であったのに対して消石灰は <1.0 であり、消石灰散布による AIV 消毒効果が認められた。

### 3-2. 消石灰乳剤上清による消毒効果

表 2 のとおり、対照の蒸留水の EID<sub>50</sub> 値が 6.0、CaCO<sub>3</sub> 上清が 5.5 であったのに対し、30% 消石灰乳剤上清は 1.5 であり、消石灰乳剤による AIV 消毒効果が認められた。

表1. 消石灰散布による消毒効果

散布物	log (EID <sub>50</sub> /0.1mL)	
消石灰	<1.0*	(試験区)
CaCO <sub>3</sub>	5.0	(対照区 1)
無し	6.0	(対照区 2)

\* <1.0 検出限界以下

表2. 消石灰乳剤上清による消毒効果

感作液	log (EID <sub>50</sub> /0.1mL)	
消石灰	1.5	(試験区)
CaCO <sub>3</sub>	5.5	(対照区 1)
DW	5.5	(対照区 2)

\*pre testとして、Ca(OH)<sub>2</sub> 乳剤上清の 10<sup>-1</sup>~10<sup>-4</sup> 希釈液 0.1ml をそれぞれ接種し、鶏胚発育に影響が無いことを確認済み。

また、今回比較した感作時間および濃度間では pH および消毒効果に差は認められなかった（表 3、4）。乳剤上清を濾過処理した場合は濁度が低下し、未処理区の EID<sub>50</sub> 値が 1.5 であったのに対して濾過処理区では 2.5 と上昇し、消毒効果の低下が見られた（表 5）。

表3. 乳剤感作時間・濃度による消毒効果の比較

消石灰濃度	pH	AIV感作	log (EID <sub>50</sub> /0.1mL)
30%	12.9	30min	1.0
		60min	1.0
50%	12.9	30min	1.5
		60min	1.5
対照区 (AIVO.2mL/DW1.8mL)		30min	5.0
		60min	5.0

\*乳剤攪拌時間（1~30min）においても、差はなし（data not shown）

表4. 乳剤感作濃度による消毒効果

消石灰濃度	pH	log (EID <sub>50</sub> /0.1mL)
1%	12.9	2.0
5%	12.9	2.5
10%	12.9	2.0
30%	12.9	1.5
対象区		6.5

表5. 乳剤上清の濁度と消毒効果

濾過処理	濁度*	log (EID <sub>50</sub> /0.1mL)
non	1.5	1.5
0.10 μm**	<0.5	2.5
対照区		5.5

\*濁度：MacFarland Standard

\*\*乳剤上清を0.10 μm 濾過処理した後にAIVと感作

### 3-3. 実験用試薬による AIV 不活化効果

各実験用試薬の 0.1mol/l 水溶液を作成したところ、Ca(OH)<sub>2</sub> について完全には溶解せず上澄み液を使用した。それぞれのアルカリ水溶液の pH は NaOH では 13.4、KOH では 13.5、Ca(OH)<sub>2</sub> では 13.1 であり、感作後の EID<sub>50</sub> 値は対照の蒸留水が 6.5 であったのに対し、NaOH では 2.5、KOH では <1.0、Ca(OH)<sub>2</sub> では 3.0 であり、これらアルカリ水溶液の AIV 不活化効果が認められた（表 6）。

また、上記 3 水溶液をそれぞれ 12 規定塩酸で pH12 に調整したところ、塩酸の添加量はいずれも体積比 100 分の 1 以下であり（データは示さず）、EID<sub>50</sub> 値は対照の蒸留水が 6.5 であったのに対し、NaOH では 6.5、KOH では 6.0、Ca(OH)<sub>2</sub> では 6.5 であり、AIV 不活化効果は認められなかった（表 7）。

表6. 実験用試薬のウイルス不活化効果①

感作水溶液*	pH	log (EID <sub>50</sub> /0.1mL)
NaOH	13.4	2.5
KOH	13.5	<1.0
Ca(OH) <sub>2</sub>	13.1	3.0
対照区 (DW+AIV)		6.5

\*各実験用試薬の0.1mol/L水溶液

表7. 実験用試薬のウイルス不活化効果②

感作水溶液*	pH	log (EID <sub>50</sub> /0.1mL)
NaOH + HCl	12.0	6.5
KOH + HCl	12.0	6.0
Ca(OH) <sub>2</sub> + HCl	12.0	6.5
対照区 (DW+AIV)		6.5

\*各実験用試薬の0.1mol/L水溶液を12規定塩酸でpH12に調整した水溶液

#### 4. 考察

消石灰の AIV に対する消毒効果に関する報告はなく、本試験により消石灰あるいは消石灰乳剤の 30 分間感作による AIV の不活化が確認され、消毒効果を明らかにすることができた。

消石灰散布試験における散布量は「高病原性鳥インフルエンザの発生に係る緊急的な消毒実施に当たっての留意事項について（平成 19 年 2 月 8 日付け 18 消安第 12754 号農林水産省消費・安全局動物衛生課長通知）」に示されている消毒薬散布量の 0.5～1.0kg/m<sup>2</sup> の下限である 0.5kg/m<sup>2</sup> から算出した。本試験は実験室内で実施したため十分に均一に散布できたが、屋外での散布作業を想定すると当該量以上を散布する必要があると思われる。

消石灰乳剤上清との感作時間を 30 分から 60 分へと長くしても効果に差が見られなかったことから、消石灰の AIV に対する消毒効果は 30 分以下の短時間に生じると考えられた。また、1～50%のいずれの乳剤濃度においても pH は変わらず、消毒効果にも差が見られなかったことから、消毒作用への pH の関与が推察された。

実験用試薬の AIV 不活化効果の検討から、消石灰だけでなく、Na、K、Ca の水酸化物の水溶液においても不活化作用が認められた。このことから AIV に対する不活化作用機序に金属イオンも関与しているのではないかと推察されたが、各アルカリ水溶液を pH12 に調整すると不活化効果は認められなくなった。つまり、「pH12、15 分の感作」で AIV は不活化されないことと一致しており、AIV 不活化には pH>12 の高アルカリであることが必要と示唆された。さらに、群馬県蚕業試験場における「消石灰上澄み液による蚕ウイルス病の消毒」の研究では蚕ウイルス病原を完全に不活化する pH 値は 12.3 以上だった<sup>2)</sup>ことから、当該値付近がウイルスに対する消毒効果の境界である可能性も示唆される。

また、消石灰上清との感作では AIV の感染性の低下は確認されたものの、消石灰散布のように検出限界以下とはならなかったこと、乳剤上清の濾過処理試験から濁度の低下は消毒効果の低下を示したことから、消石灰の固形成分存在下の方がより消毒効果が高いと考えられる。これは石灰の固形成分による吸着効果を示唆していると思われる。消石灰散布時の乾燥効果と併せ、ウイルスに対する消毒効果を増強すると考えられた。

消石灰は有機物によって消毒効果が低減しにくいことが知られており<sup>7)</sup>、強アルカリが消毒作用の主体であるため、弱アルカリ性である家畜ふん尿に汚染された生産現場においても安定した消毒効果が期待できる。久利らは肉用牛、養豚、養鶏の各農場にて 10% 消石灰乳の踏み込み消毒槽内 pH 値の経日変化を調べたところいずれも 10 日間 pH12.5 を維持していたこと<sup>3)</sup>、森下らは石灰乳蹄浴液が 3 日目も pH12.6 を示していたことを確認しており<sup>5)</sup>、消石灰乳は高い消毒効果が長期間持続するものと考えられる。

しかしながら、消石灰上澄み液は細菌に対して消毒効果が無いことが報告<sup>6)</sup>されていること、今回の検討からも消石灰の固形成分存在下の方がより消毒効果が高いと考えられることから、消毒資材として消石灰乳を用いる場合はしっかり懸濁された状態で対象物と接触する必要がある。

消石灰はポジティブリストの規制対象外であり、安価で入手しやすい消毒資材である。今回の検討結果を踏まえ、消毒効果が安定して高く、環境負荷が少ない消石灰の利用を普及・啓発していきたい。

#### 参考資料

- 1) 飯塚三喜:家畜消毒薬の作用機序と適正利用(2), 動薬資材だより, 15, 30-34(1987)
- 2) 伊藤寛:群馬県蚕業試験場研究報告, 6, 6-14(2000)
- 3) 久利俊二:畜産技術, 12, p16-20(2000)
- 4) Lu H, *et al.*:Avian Dis. 47, 1015-1021(2003)
- 5) 森下康ら:平成 18 年度鳥取県畜産技術業績発表会集録(2006)
- 6) 代田丈志:シルク情報, 4(2005)
- 7) 牛山市忠ら:平成 19 年度山梨県家畜保健衛生業績発表会集録, p54-63(2007)
- 8) 渡邊拓一郎ら:平成 18 年度宮崎県畜産関係機関業績発表集録, 113-116(2006)