

鳥インフルエンザ発生予防対策における待ち受け用消毒資材の検討

上羽 智恵美、藪田淑予*、高桑弘樹**

Evaluation of the disinfectant effectiveness of trapping disinfection materials in the prevention of avian influenza outbreaks.

Chiemi Ueba, Toshiyo Yabuta, Hiroki Takakuwa

要 約

高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) の予防対策(待ち受け消毒)として用いられている消石灰は、降雨や大気暴露等の気象条件によりウイルス不活化効果が低減することが知られている。そこで、ウイルス不活化効果が持続する資材としてヨウ素を担持した活性炭(ヨード活性炭)の待ち受け消毒の適否について令和元年に予備調査を行い、降雨条件において、消石灰の効果が2週間であったのに対し、ヨード活性炭では4週間効果が持続した。ヨード活性炭は、消石灰より降雨や乾燥の影響を受けにくく、ウイルス不活化効果が低減しにくかった。

この結果より、活性炭からコストの低い資材を担持素材にした新たな粒状材 A~E を作製した。粒状材 A、B、C は日向土を担持資材としてヨウ素をそれぞれ1%、3%、5%と担持させ、粒状材 D はゼオライトを担持資材としてヨウ素を3%担持させた。粒状材 E は日向土を担持資材としてヨウ素3%担持後、高温下で養生した。各粒状材について実験室内で冬期7日間に2回の降雨を想定した条件下でウイルス不活化効果の調査を行い、消石灰は10日、粒状材 B と E は2週間、C については1か月間効果の持続が確認された。

キーワード: 高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) の予防対策

緒 言

高病原性鳥インフルエンザ (HPAI)の防疫措置には主に消石灰が使用されており¹⁾、予防対策(待ち受け消毒)としても鶏舎周囲への消石灰散布が行われている。しかし消石灰は降雨や大気暴露等の気象条件により消毒効果が低減する。特に降雨とその後の乾燥により、消毒効果は最短で1週間に短縮され²⁾、待ち受け消毒として用いる場合は短期間で追加の散布が必要となる。

そこで消毒効果が持続する資材として、令和元年にヨウ素を活性炭に担持したヨード活性炭を用い、鳥インフルエンザウイルスに対するウイルス不活化効果(以下ウイルス不活化効果)の調査を行った。降雨条件において、消石灰は散布2週間後にウイルス不活化効果を認めなかったが、ヨード活性炭は散布4週間後もウイルス不活化効果が認められたがコスト面に課題が残った。³⁾

本研究では、ヨウ素を待ち受け消毒として使用するために、担持資材費の低減を目指し、高コストな活性炭に代わる担持資材で粒状材を作製(以下粒状材)し、野外環境下の降雨条件において、粒状材のウイルス不活化効果の持続期間を調査

した。

材料及び方法

1. 担持資材の検討

(1) 野外使用における適応性

野外において使用に適した担持資材を検討した。

ア 材料

(ア) 鹿沼土

(イ) 日向土

イ 試験方法

畜産センター鶏舎犬走りのコンクリート床上に各100gを均一に散布し、1週間ごとに材料の流出状況を確認した。

(2) 粒状材の散布量の検討

100 cm²に均一散布できる量を検討した。

ア 材料

(ア) 1.(1)の結果より選定された資材

(イ) ヨード活性炭(径2.4~4.8mm)

(ウ) 粒状消石灰

* 京都産業大学感染症分子研究センター

** 京都産業大学生命科学部先端生命科学科

イ 試験方法

白紙上に 100×100 mm の枠を作製、枠内に各材料を 5, 10, 15, 20, 25g と散布。散布した表面を筆で平らにし、白紙が上部から目視できなくなった状態を均一に散布できた量とした。

(3) ウイルス不活化効果の確認

材料として、1.(1)の結果より選定された資材に、ヨードを 1% 担持させた担持資材（以下粒状材 A）を作製しウイルス不活化効果を調査した。

ア 材料

(ア) 粒状材 A：ヨウ素担持量 1%

(イ) ヨード活性炭：ヨウ素担持量 1%

(径 2.4~4.8mm)

(ウ) 粒状消石灰

イ 判定方法

ウイルス液 0.5ml を 50ml 遠沈管内のサンプル 1g に直接滴下し、4℃、10 分静置して感作させた。10 分後、遠沈管に、レシチン・ポリソルベート 80 加・ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト (SCDLP) 培地 4.5ml を入れ、ボルテックスにて混和し、1,000 rpm で 1 分間遠心分離を行った。

マイクロピペットで両試験区の上澄み 0.1ml を採取し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 10 倍段階希釈を行った。

その希釈液を漿尿膜腔内接種法により 10, または 11 日齢の発育鶏卵に 0.2ml ずつ接種、35℃で 48 時間培養した。

培養後、一夜冷暗室に置いてから、漿尿膜腔液を回収し赤血球凝集反応 (HA) による効果判定を行った。50 % Egg Infectious Dose (以下 EID₅₀) は Reed and Muench 法で算出した。対照のウイルス力価と比較し、3 log₁₀ 以上の差によりウイルス不活化効果ありと判定した。

また、供試ウイルスは鳥インフルエンザウイルス A/whistling swan/Shimane/499/83 (H5N3) 株を用いた。

2. 野外環境下でのウイルス不活化効果の確認

野外環境下で粒状材 A、ヨード活性炭および粒状消石灰のウイルス不活化持続時間を調査

(1) 材料

ア 粒状材 A：ヨウ素担持量 1%

イ ヨード活性炭 (径 2.4~4.8mm)

ウ 粒状消石灰

(2) 試験区分

ア 降雨・降雪あり コンクリート上

イ 降雨・降雪あり 土壌上

ウ 降雨・降雪なし コンクリート上

エ 降雨・降雪なし 土壌上

(3) 試験期間

2020 年 12 月 2 日~2021 年 1 月 13 日

(4) 試験方法

材料をそれぞれコンクリート上もしくは土壌上に散布した。散布場所については、コンクリート上はコンクリート平板 (300×600×60 mm) 上に、土壌上は育苗箱 (280×580×80 mm) に畜産センター農場内の土を入れ、その上に散布した。

散布量は 1.(2)の結果より 250×500 mm に均一に散布できる量とした。

サンプルは 2 週間毎に採材し、50ml 遠沈管に密閉、常温保存。温湿度は温湿度計測装置 (おんどとり, TR-72A)、雨量は簡易雨量計 (貯水型指示雨量計) で 1 日 1 回測定した。

粒状材 A では、ウイルス不活化効果持続期間の指標としての利用を考慮し、設置前と採材後に、コンクリート上粒状材 A にデンプン液を滴下しヨウ素デンプン反応を利用してヨウ素残量の有無を確認するとともに、10 分間溶液に静置後 DPD 法で有効ヨウ素濃度の測定を行った。

(5) 判定方法

ウイルス不活化効果判定を 1 の(3)と同様の方法で実施した。

3. 粒状材 (B~E) のウイルス不活化効果

有効ヨウ素濃度が一定量保持できるよう、粒状材 A からヨウ素担持量、担持資材、担持方法を変更した粒状材 B~E (図 1) を実験室内で環境条件 (温度、降雨) を設定し、ウイルス不活化効果の持続時間の調査を行った。

(1) 材料

粒状材 B：ヨウ素担持量 3%

粒状材 C：ヨウ素担持量 5%

粒状材 D：担持資材を変更 (ゼオライト)

粒状材 E：担持方法変更 (ヨウ素 3% 担持後、高温下で養生)

粒状消石灰



粒状材 B 粒状材 C 粒状材 D 粒状材 E

図 1 供試した粒状材

(2) 試験方法

各サンプルを 10g 散布した 9 cm シャーレを 6 個作成し、温度 4 ~ 13℃ に設定したインキュベーター内に配置した。7 日間に 2 回、蒸留水 15ml をサンプル入りシャーレに入れ 24 時間後蒸留水を回収した（図 2）。実験室内の環境は気象庁 HP より福知山市の 1991 ~ 2020 年の 11 ~ 4 月より最低温度平均 4℃、最高温度平均 13℃、平均降水量 1 日 3 mm を参考にした。

1 週間ごとに各サンプルのシャーレを 1 枚ずつ 6 週間後まで回収し、50ml 遠沈管に各サンプルを入れ密閉してウイルス不活化効果判定日まで常温で保存した。また、各サンプルは 1 時間溶液に浸漬後 DPD 法で有効ヨウ素濃度測定した。

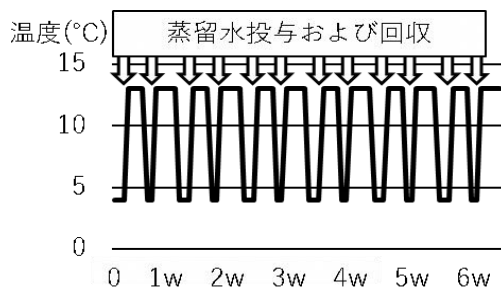


図 2 実験室内の環境条件

(3) 判定方法

ウイルス不活化効果判定を 1 の(3)と同様の方法で実施した。

結果及び考察

1. 担持資材の検討

(1) 野外使用における適応性

鹿沼土は 1 か月で雨などにより粒が崩れ、散布場所から流出し確認できなくなった。一方、日向土は 2 か月後も形状の変化は認められなかった。この結果より、待ち受け消毒は長期間野外に設置することを想定しているため、担持資材を日向土に決定した。

(2) 散布量の検討

粒状材 A（担持資材は日向土）は 20g、ヨード活性炭 15g で均一に散布できた。散布には粒子が大きいほど、量が必要であった（図 3）。

一方、粒状消石灰では粒(2 mm 以上)と粉(2 mm 未満)が混合している部位においては 10g で均一に散布することができたが、粒のみ(2 mm 以上)の部位では 10g で散布することができなかった。

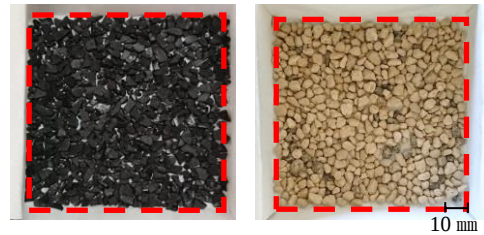


図 3 ヨード活性炭(左)と粒状材 A(右)

2. 野外でのウイルス不活化効果の確認

試験期間中の環境については、温度は 5 ~ 15℃、湿度は 50 ~ 100%、平均して 1 週間に 2 回の降雨や積雪があった（図 4）。

野外環境下 6 週間後のウイルス不活化効果を表 1 に示した。粒状材 A は、降雨降雪無しコンクリート区でウイルス不活化効果を認めた。

降雨積雪有り環境下では、粒状材 A は、6 週間後の時点で、ウイルス不活化効果を認めなかった。消石灰とヨード活性炭はウイルス不活化効果を認めた（表 1）。

コンクリート上粒状材 A のヨウ素残量の有無と有効ヨウ素濃度の結果から、ヨウ素が流出している可能性が考えられた（図 5、表 2）。

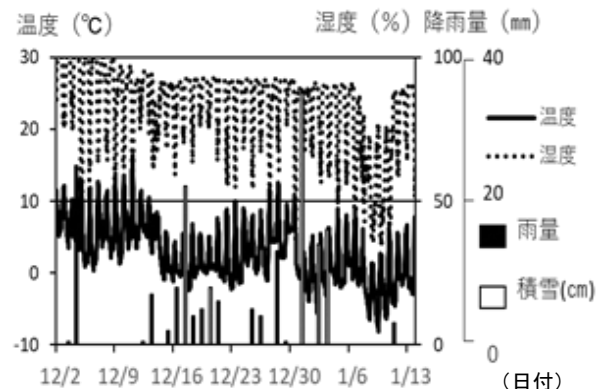


図 4 試験期間中の野外環境調査結果

表 1 野外環境下 6 週間後のウイルス不活化効果 (log₁₀EID₅₀ / 0.2ml)

設置場所	散布地面	粒状材 A	ヨード活性炭	消石灰
降雨降雪無し	コンクリート	2.5 ^{a),b)}	NT ^{c)}	≥ 2.5
	土壌	5.5	4.75	NT
降雨降雪有り	コンクリート	≥ 6.5	NT	3.5
	土壌	≥ 6.5	3.75	NT

a) 残存ウイルス力価 (log₁₀ EID₅₀ / 0.2ml)

b) 対照のウイルス力価 6.75 と比較し効果あり

c) Not Test

設置期間	6 週間		0 日
設置場所	降雨降雪 無し	降雨降雪 有り	
デンプン 液滴下前			
デンプン 液滴下後			

図 5 粒状材 A のヨウ素の残量有無の確認

表 2 粒状材 A の有効ヨウ素濃度 (ppm)

設置期間	6 週間		0 日
設置場所	降雨降雪 無し	降雨降雪 有り	
有効ヨウ素 濃度 (ppm)	758	105	815

3. 粒状材 (B~E) のウイルス不活化効果

粒状材 B と粒状材 E は 2 週間、粒状材 C については 4 週間のウイルス不活化効果が確認された。同環境下で消石灰は 10 日であった (表 3)。

ウイルス不活化効果が確認された有効ヨウ素濃度は、粒状材 B が 1,651 ppm、粒状材 C が 1,808 ppm、粒状材 E が 1,834 ppm であった。

粒状材 D は有効ヨウ素濃度が 2,585ppm ではウイルス不活化効果が確認されたが、粒状材 B,E より高い濃度でもある 2,297 ppm ではウイルス不活化効果が確認されなかった (表 4)。

この違いは、粒状材 D は粒状材 B,C,E と担持資材が異なるためと考えられた。

粒状材 B または C はウイルス不活化効果の結果及び省力的な散布が可能な資材であることから、畜産現場での利用に有望と考えられる。

表 3 粒状材 (B~E) と消石灰の 1 週間ごとのウイルス不活化効果 ($\log_{10}EID_{50} / 0.2ml$)

資材名	設置期間					
	0 日	1 週間	10 日	2 週間	4 週間	6 週間
粒状材 B	NT ^{a)}	≤ 2.75	NT	≤ 1.5	NT	NT
粒状材 C	NT	≤ 1.5	NT	≤ 2.5	≤ 1.75	≥ 5.5
粒状材 D	$2.5^{b), c)}$	4.25	NT	4.25	NT	NT
粒状材 E	NT	≤ 2.5	NT	3.75	NT	NT
消石灰	NT	≤ 1.5	2.75	4.25	NT	NT

a) Not Test

b) 残存ウイルス力価 ($\log_{10}EID_{50} / 0.2ml$)

c) 対照のウイルス力価と比較し効果あり

表 4 粒状材 (B~E) の 1 週間ごとの有効ヨウ素濃度 (ppm)

資材名	設置期間				
	0 日	1 週間	2 週間	4 週間	6 週間
粒状材 B	2,839	2,271	1,651	-	-
粒状材 C	6,333	4,603	3,537	1,808	1,022
粒状材 D	2,585	2,297	1,039	489	-
粒状材 E	2,402	1,974	1,834	-	-

今回開発された粒状材は、消石灰が 10 日でウイルス不活化効果が認められなくなる環境条件下において、粒状材 B は 2 週間、粒状材 C は 4 週間のウイルス不活化効果が確認された。

今後は、粒状材が待ち受け消毒資材に使用できるよう、より生産現場に近い環境へ散布など条件を変更して、ウイルス不活化効果を確認する。

謝辞

本研究を進めるにあたり、開発、改良、有効ヨウ素濃度の測定をしていただきました株式会社ヨードラボと株式会社エーアンドエーマテリアルの皆様、開発にご協力いただきました前株式会社化研会長の蓼沼克嘉氏、ご助言頂きました鳥取大学 大槻公一名誉教授に深謝いたします。

引用及び参考文献

- 1) 高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針令和 2 年 7 月 1 日 農林水産大臣公表
- 2) 鈴木勇摩, 金子和華子. 石灰資材の消毒効果持続期間の検証. 鶏病研報 56 巻 3 号, p117-121.2020
- 3) 上羽 智恵美, 西井真理. 鳥インフルエンザ発生予防対策における消毒剤の検討. 京都府農林水産技術センター畜産センター試験研究報告第 16 号, p37-39.2021.