

令和2-3年度厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の

衛生管理手法の開発のための研究

分担研究報告書

「新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果」

研究代表者 前川純子 国立感染症研究所細菌第一部

研究分担者 黒木俊郎 岡山理科大学獣医学部

研究協力者 森川 茂 岡山理科大学獣医学部

新型コロナウイルス感染症は令和元年に中国で初めて発見され、わが国を含め世界中に感染が拡大した。新型コロナウイルス感染者が公衆浴場を利用する可能性があるため、令和2年度は次亜塩素酸ナトリウムあるいはモノクロラミンによる消毒を想定し、低濃度における塩素系消毒剤の新型コロナウイルスに対する効果をTCID₅₀ (Median Tissue culture Infectious Dose, 50%感染量)より評価した。令和3年度は入浴施設の浴槽水における次亜塩素酸ナトリウムの効果を感染価の低下の程度により実験室レベルで評価したところ、新型コロナウイルスの次亜塩素酸ナトリウムに対する高い感受性が示された。これらの結果から、新型コロナウイルスは次亜塩素酸ナトリウムに高い感受性を示し、入浴施設の浴槽水の消毒に使用される0.4~1.0 mg/Lの濃度により短時間で不活化されることが明らかとなった。モノクロラミンはウイルスに対して次亜塩素酸ナトリウムよりも効果が低いことが知られており、新型コロナウイルスに対しても同様の結果が得られた。一方、温泉を利用する浴槽水では遊離塩素濃度を設定値に安定させることが困難な場合があり、実際の入浴施設の現場において遊離残留塩素濃度の維持が新型コロナウイルス対策において課題であることが推測された。

A. はじめに

新型コロナウイルス感染症が令和元年に発生し、世界的に感染が広がっている。わが国では令和2年に最初の感染者が報告され、その後多数の患者が発生している。当該ウイルスに感染すると高い割合で無症候性感染者が存在することが知られている。また、感染者が発症する前に感染性を有することが報告されている。そのため、無症候性感染

者が入浴施設を利用した場合にウイルスが浴槽水に浮遊することが想定される。公衆浴場を塩素で消毒する場合は遊離残留塩素を0.4~1.0mg/L、モノクロラミンでは3.0mg/Lを保つことが求められており、実際の浴槽水においてこの濃度での新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に対する有効性に関するデータがない。本研究は、公衆浴場の浴槽水に浮遊する新型コロナウイルスに

対する塩素系消毒剤の効果を評価した。

B. 材料と方法

1. ウイルス株

評価には、SARS-CoV-2 ウイルス (AI/I-004/202 株; 国立感染症研究所より分与) と FeCoV (M91-26 株; 国立感染症研究所・前田健部長より分与) を用いた。ウイルスの培養には SARS-CoV-2 ウイルスは Vero E6 細胞を用いて、令和 2 年度は 1% fetal calf serum (FCS) 加 D-MEM 培地 (D-MEM (高グルコース) (L-グルタミン、フェノールレッド不含) 富士フィルム和光純薬) にて、令和 3 年度は fetal calf serum (FCS) 非添加 D-MEM 培地 (D-MEM (高グルコース) (L-グルタミン、フェノールレッド不含) 富士フィルム和光純薬) に L-グルタミンを添加した培地にて、令和 2 年度のみ用いた FeCoV-2 ウイルスは fcwf-4 細胞を用いて 5%FCS 加 D-MEM 培地で 5%CO₂ 下、37°C で CPE が 80% になるまで培養した。ウイルス液は令和 2 年度は培養上清を 3,000 rpm, 10min 遠心して -80°C に保存した。令和 3 年度は培養上清を 3,000 rpm, 10min 遠心し、PD-10 脱塩カラム (Sigma-Aldrich) を用いたゲルろ過により培地に含まれるアミノ酸などの低分子量の成分を取り除いて生理食塩水に置換したのちに -80°C に保存した。

2. 塩素液の調製

次亜塩素酸ナトリウム溶液 (ナカライテスク) を PBS (pH 7.5) で 100 倍に希釈した液を作製し、これを次亜塩素酸ナトリウム液とした。

PBS 50ml に 0.5M 塩化アンモニウム液 243 μ L と 5% 相当の次亜塩素酸ナトリウム

溶液 65 μ L を混合し、これをモノクロラミン液とした。

3. 入浴施設の浴槽水

令和 3 年度に関東、北陸、四国及び九州地区の温泉水を原水として用いている入浴施設の浴槽水を実験に用いた。各試料は浴槽から採取後に冷凍あるいは冷蔵で実験室に搬送し、実験に用いるまで冷凍で保管した。実験時には室温で解凍し、室温にしてから pH を測定した。

4. 実験液の調製

令和 2 年度は 1%FCS 加 D-MEM 培地及び 5%FCS 加 D-MEM 培地を PBS で 100 倍に希釈し、これらの希釈液の遊離残留塩素濃度を 0.1~0.2 mg/L に調整するのに必要な次亜塩素酸ナトリウム液の量を決めることとした。

上記の必要量を決めるために、1%FCS 加 D-MEM 培地あるいは 5%FCS 加 D-MEM 培地の 100 倍希釈液 10ml に次亜塩素酸ナトリウム液あるいはモノクロラミン液を加えた直後に、遊離残留塩素濃度は DPD 法によりアクアブ AQ-201 (柴田科学) を用いて、モノクロラミン液を加えた場合の結合塩素濃度はヨード法によりアクアブ AQ-202 (柴田科学) を用いて測定した。

令和 3 年度は浴槽水の試料 9ml に対してウイルス調製液 1ml を加えた実験液に次亜塩素酸ナトリウム液を加え、所定の遊離残留塩素濃度 (0.4 mg/L 及び 1.0 mg/L) にするのに必要な次亜塩素酸ナトリウム液の量を決めた。ウイルス調製液とは、ウイルス培養に用いた培地を PD-10 脱塩カラムにより培地に含まれるアミノ酸などの低分子量の

成分を取り除いて生理食塩水に置換した液である。遊離残留塩素濃度は DPD 法によりアクアブ AQ-201 (柴田科学) を用いて測定した。

5. TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose, 50%感染量)の測定

令和 2 年度は上記 1 で調製したウイルス液を PBS で 100 倍に希釈し、その 1ml に上記 4 で決定した所定量の次亜塩素酸ナトリウム液を加えて実験時の遊離残留塩素濃度とし、25°Cあるいは 41°Cで 1、5、10 及び 20 分間曝露した。モノクロラミンにおける TCID₅₀ を測定する場合は、結合塩素濃度が 1、3、6mg/L になるように PBS で希釈したモノクロラミン液 1mL に 10µL のウイルス液を加え、1、5 及び 10 分間曝露した。曝露後に直ちに 0.1M チオ硫酸ナトリウムを加えて塩素を中和した。中和後、10 倍量の 1%FCS 加 D-MEM 培地 (SARS-CoV-2) または 5%FCS 加 D-MEM 培地 (FeCoV-2) で 10⁷ まで 10 倍段階希釈し、各希釈段階の液の 40µL を感受性細胞 (SARS-CoV-2 は VeroE6/TMPRSS2 細胞 ; FeCoV-2 は fcwf-4 細胞) を培養した 96 ウェルプレート の 6 ウェルずつ接種し、5%CO₂ 下、37°Cで 4 日間 (SARS-CoV-2) あるいは 2 日間 (FeCoV-2) 培養した。各ウェルの細胞変性を観察し、Reed-Muench 法¹⁾ を用いて TCID₅₀ を計算した。さらに、未処理群と比較した処理群の TCID₅₀ に基づいてウイルスの生存率を求め、100-生存率 (%) を不活化率として算出した。

令和 3 年度は上記 1 で調製したウイルス液 100µL に、上記 4 で決定した所定量の次亜塩素酸ナトリウム液を加えた浴槽水

900µL を加えて実験時の遊離残留塩素濃度とし、25°Cで 5 分間曝露した。曝露後に直ちに 0.1M チオ硫酸ナトリウムを加えて塩素を中和した。中和後、10 倍量の 1%FCS 加 D-MEM 培地 (SARS-CoV-2) で 10⁷ まで 10 倍段階希釈し、各希釈段階の液の 40µL を VeroE6/TMPRSS2 細胞を培養した 96 ウェルプレートの 4 ウェルずつ接種し、5%CO₂ 下、37°Cで 4 日間培養した。各ウェルの細胞変性効果を観察してウイルス増殖を確認し、Reed-Muench 法¹⁾ を用いて TCID₅₀ (Median Tissue culture Infectious Dose, 50%感染量) を計算した。さらに、次亜塩素酸ナトリウム未処理群と比較した処理群の TCID₅₀ に基づいてウイルスの生存率を求め、100-生存率 (%) を不活化率として算出した。

C. 結果及び考察

令和 2 年度に SARS-CoV-2 の次亜塩素酸ナトリウムとモノクロラミンによる消毒の効果を調べたところ、次亜塩素酸ナトリウムの遊離塩素濃度が 0.1mg/L では 20 分後に検出限界未満 (99.99%以上) まで不活化され、0.13mg/L では 1 分で検出限界未満 (99.99%以上) まで不活化された (表 1)。さらに、41°Cでは 0.10mg/L、0.11mg/L で 5 分で検出限界未満 (99.99%以上) まで不活化された (表 2)。FeCoV-2 では、0.16mg/L で 5 分後で検出限界未満 (98.89%以上) まで不活化された (表 3)。FeCoV-2 の方が消毒前の感染力価が低かったため、検出限界未満での不活化率が見かけ上、低く計算される。

SARS-CoV-2 と FeCoV-2 は遊離塩素に感受性が高く、低濃度であっても比較的短

時間で不活化されることが示された。この結果は、SARS-CoV-2 に近縁の SARS-CoV が汚水において 0.4mg/L の遊離残留塩素に 10 分で 100%不活化されたという報告と同様の結果となった²⁾。これは同報告において比較した大腸菌よりも感受性が高かった。

モノクロラミンの SARS-CoV-2 に対する効果は、25°Cにおいて 1mg/L では 10 分後では 75.9%、6mg/L では 10 分後に不活化率は 97.9%であり、次亜塩素酸ナトリウムに比べて不活化率が低かった(表4)。ウイルスはモノクロラミンに対して比較的抵抗性を示すとされており、pH7 の条件下での 3logCt 値はマウスノロウイルスは 26、コクサッキーウイルスは 390-710、アデノウイルスは 190-1,000 と報告されている³⁾。

令和 3 年度に関東、北陸、四国及び九州地区の温泉水を原水として用いている入浴施設の浴槽水 5 検体を実験に用いた。5 検体のうち、3 検体(北陸地区由来 2 検体、九州地区由来 1 検体)は次亜塩素酸ナトリウムを用いて遊離残留塩素濃度を所定の濃度(0.4 mg/L、1.0 mg/L)に設定することができなかった。そのため、実験を行うことができなかった。

関東及び四国地区の入浴施設の浴槽水を用いて次亜塩素酸ナトリウムによる残留塩素の SARS-CoV-2 ウイルスに対する効果を調べたところ、遊離残留塩素濃度が 0.4 mg/L と 1.0 mg/L の場合の不活化率は関東地区の入浴施設の浴槽水では 96.8% (不活化度 $10^{-1.5}$) 及び >99.9%(不活化度 $<10^{-4.7}$; 検出限界未達まで不活化)、四国地区の入浴施設の浴槽水では 99.5%(不活化度 $10^{-2.3}$) 及び >99.9%(不活化度 $<10^{-4.0}$; 検出限界未達まで不活化)であった(表5)。

以上の結果から、公衆浴場の浴槽で維持することとされている遊離残留塩素濃度(0.4~1.0mg/L)であれば、SARS-CoV-2 は短時間に不活化されることが明らかとなった。モノクロラミンは一般的にウイルスに対する効果は遊離塩素よりも低く、SARS-CoV-2 に対しても同様であるとの結果が得られた。

温泉水の泉質によっては遊離残留塩素濃度を所定の濃度に維持することが難しい場合がある。このような場合は浴槽水における遊離残留塩素濃度を所定の濃度に維持する管理ではなく、範囲で管理している。新型コロナウイルスに対しては、浴槽水の遊離残留塩素濃度を 0.4~1.0 mg/L の範囲内で維持されていれば、短時間でウイルスを不活化することができることが今回の解析で明らかとなっている。レジオネラ対策のみならず、新型コロナウイルス対策として遊離残留塩素濃度を適切に維持することが重要である。

D. まとめ

次亜塩素酸ナトリウムとモノクロラミンの実験条件下での新型コロナウイルスに対する消毒効果を調べたところ、0.11mg/L、41°Cでは 5 分後の不活化率が 99.99%以上と、低濃度の遊離塩素濃度であっても新型コロナウイルスが高率に不活化された。

E. 参考文献

1. Reed, L. J., Muench, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg.,27. 493-497, 1938.
2. Wag, X. et al.: Study on the resistance of

- severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. J. Virological Methods, 126, 171-177, 2005.
3. Cromeans, T. L., Kahier, A. M., Hill, V. R.: Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1028-1033, 2010.
- F. 研究発表
該当なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

表1 次亜塩素酸ナトリウム曝露時の SARS-CoV-2 の不活化率 (%) (25°C)

濃度(mg/L)	曝露時間 (分)				
	0	1	5	10	20
0.09	0	99.84	99.94	99.96	99.84
0.10	0	99.98	99.95	99.94	> 99.99
0.13	0	> 99.99	> 99.99	> 99.99	> 99.99

ND: 実施せず

表2 次亜塩素酸ナトリウム曝露時の SARS-CoV-2 の不活化率 (%) (41°C)

濃度(mg/L)	曝露時間 (分)				
	0	1	5	10	20
0.10	0	> 99.99	> 99.99	> 99.99	ND
0.11	0	99.98	> 99.99	> 99.99	ND
0.18	0	> 99.99	> 99.99	> 99.99	ND

ND: 実施せず

表3 次亜塩素酸ナトリウム曝露時の FeCoV-2 の不活化率 (%) (25°C)

濃度(mg/L)	曝露時間 (分)				
	0	1	5	10	20
0.11	0	99.81	99.87	99.87	> 99.89
0.13	0	> 99.89	> 99.87	> 99.87	> 99.89
0.16	0	> 99.87	> 99.89	> 99.89	> 99.89

表4 モノクロラミン曝露時の SARS-CoV-2 の不活化率 (%) (25°C)

濃度(mg/L)	曝露時間 (分)				
	0	1	5	10	20
1	0	82.68	85.21	75.94	ND
3	0	63.95	85.21	79.73	ND
6	0	91.26	90.26	97.85	ND

ND: 実施せず

表5 入浴施設の浴槽水における次亜塩素酸ナトリウムの SARS-Cov-2 への効果

試料	採取地域	pH	遊離残留塩素濃度	
			(mg/L)	不活化率 (%)
1	関東	7.4	0.4	96.8
			1	> 99.9
2	四国	7.0	0.4	99.5
			1	> 99.9
3	北陸	7.4	0.4	ND
			1	ND
4	北陸	6.5	0.4	ND
			1	ND
5	九州	8.7	0.4	ND
			1	ND

ND: 実施せず