

令和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、昨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感染価の低下の程度により評価した。今年度は実際の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。一方で、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世界的に流行し、国内でも多数の患者が発生している。また、当該感染症では高い割合で無症候性感染者が存在することや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、入浴施設を利用する無症候性感染者に由来する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実施の浴槽水を用いて評価した。

#### B. 材料と方法

##### 1. ウイルス株

今回の評価では、SARS-CoV-2 ウイルス (AI/I-004/202 株；国立感染症研究所より分与) を用いた。ウイルスの培養には Vero E6 細胞を用いて 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) 富士フイルム和光純薬) に L-グルタミンを

添加した培地で5%CO<sub>2</sub>下、37°CでCPEが80%になるまで培養した。ウイルス液は培養上清を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。

## 3. 入浴施設の浴槽水

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

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. SARS-CoV-2 の感染価 (TCID<sub>50</sub> (Median Tissue Culture Infectious Dose, 50%感染量)の測定

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 10<sup>7</sup> 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 ウェルプレートに 4 ウェルずつ接種し、5%CO<sub>2</sub> 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<sup>1)</sup>を用いて TCID<sub>50</sub> (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 TCID<sub>50</sub> 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

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  $<10^{-4.7}$ ; 検出限界未満まで不活化)、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  $<10^{-4.0}$ ; 検出限界未満まで不活化) であった (表 1)。

遊離残留塩素濃度が 0.4 mg/L と 1.0 mg/L のいずれの場合でも不活化率は非常に高かった。入浴施設の浴槽水の通常の遊離残留塩素濃度であれば、SARS-CoV-2 は 4 分程度の時間でほとんど不活化されることが示された。

令和 2 年度と令和 3 年度に浴槽水に浮遊する SARS-Cov-2 を想定して次亜塩素酸ナトリウムの効果を検討する実験を行ったが、次に挙げる課題が示された。

1. 少量 (1ml) の試験液を所定の塩素濃度に設定することが難しかった。

実験に使用する試験液の容量が 1ml と非常に少なく、それを 0.4 mg/L といった低濃度に設定することが難しかった。ウイルスが浮遊する試験液の塩素濃度を測定することはできないためにウイルスを含まない試験液を作製し、それを用いて所定の濃度になるように試験液に加える次亜塩素酸ナトリウム溶液の量を定める方法を採用した。

2. ウイルス培養液にアルブミンや血清等が含まれており、有機物質が残留塩素を消費するため、所定の塩素濃度にすることが難しかった。

ウイルス培養液から有機成分を取り除くためにカラム処理を行うことができるが、

この操作によりウイルスの活性が低下することが懸念された。したがって過度の有機成分の除去操作を行うことができなかった。そのためウイルス浮遊液に有機成分が残り、次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えた際に有機成分により塩素が消費されてしまうため、消費分を勘案して次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えて所定の濃度にする必要があった。

3. 塩素濃度に影響を与える化学物質を含む温泉水での消毒効果を評価する場合、所定の塩素濃度にすることが非常に難しかった。

鉄、マンガン、硫化水素などの硫黄成分、有機物質、アンモニウムイオン等が残留塩素を消費してしまう。今回の解析では浴槽水の 5 試料のうち 3 試料は所定の遊離残留塩素濃度にすることができなかったために実験に用いることができなかった。これらの浴槽水の含有成分を確認することはしなかったが、残留塩素を消費してしまう何らかの成分により塩素が消費された可能性があることが推測された。

塩素が消費される泉質の温泉水を原水として用いている場合は、遊離残留塩素濃度を一定に保つことは容易ではないことが推測される。このような入浴施設では常時遊離残留塩素を測定し、塩素剤の注入を調整して濃度を維持しなければならないと思われる。今回の実験では遊離残留塩素濃度を 0.4 mg/L 及び 1.0 mg/L に設定して消毒効果を評価することとしていたが、入浴施設において実際の浴槽水での塩素濃度は 1 ポイントの濃度に設定するのではなく、範囲 (0.4~1.0 mg) で管理していると推測される。そのようなやり方により濃度の管理を

相対的に容易にしていると思われる。

4. 実験の対象とする試験液の性状によってはウイルスの不活化効果を評価することができない場合があった。

ウイルスの不活化効果は、ウイルスを対象の試験液に曝露した後に培養細胞でのウイルスの増殖で判定しているため、試験液に培養細胞の増殖を抑制したり、培養細胞を死滅させる作用があれば消毒剤のウイルスの不活化効果を判定することができなかった。

5. P3 レベル実験室で実験を実施するため、限られた機器材と空間を使って実験を実施することによる困難が伴った。

SARS-CoV-2 ウイルスの取扱いは BSL3 実験室で行うことが決められている。そのため、次亜塩素酸ナトリウムの効果の評価実験も BSL3 実験室の安全キャビネット内で実施しなければならなかった。非常に狭い空間での取扱いとなるため、大きな実験設備を用いることはできず、容量を増やして実験を行うことが困難であるなど、実験

の規模が制限された。

#### D. まとめ

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 SARS-CoV-2 ウイルスに対する効果を検討した。関東と四国の入浴施設の浴槽水において遊離残留塩素濃度を 0.4 mg/L 及び 1.0 mg/L としてウイルスの不活化を検討したところ、短時間に高い率で不活化されることが明らかとなった。

#### 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.

#### 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 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