

令和2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、令和2年に世界中に感染が拡大した。令和2年1月16日にわが国においても初めて報告され、その後全国に感染が拡大した。新型コロナウイルスは感染して発症する2～3日前からウイルスを排出するとされており、感染者が公衆浴場を利用する可能性がある。そこで、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)により評価した。新型コロナウイルスは遊離塩素による消毒に感受性を示し、濃度が0.16mg/Lで25°Cでの1分後の不活化率は99.99%以上となり、0.11mg/L、41°Cでは5分後の不活化率が99.99%以上であった。モノクロラミンは遊離塩素と比較して相対的に効果が低く、6mg/Lでも25°Cで10分後の不活化率は98%であった。公衆浴場の浴槽で維持すべき遊離塩素濃度(0.4～1.0mg/L)であれば、SARS-CoV-2は短時間で不活化される結果が得られた。

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が報告されている。無症候性感染者が入浴施設を利用し、身体に付着したあるいは会話等により飛散した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、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することを目的とした。

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)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 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) 富士フイルム和光純薬) に行い、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。ウイルス液は培養上清を 3,000 rpm, 10min 遠心して-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成し、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. 実験液の調製

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 に調製するのに必要な次亜塩素酸ナトリウム液の量を定めることとした。

上記の必要量を定めるために、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。

4. TCID₅₀ (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を PBS で 100 倍に希釈し、その 1ml に上記 3 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 10 μ L 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 40 μ L 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。

C. 結果及び考察

1%FCS 加 D-MEM 培地及び 5%FCS 加 D-MEM 培地のそれぞれ 10ml に次亜塩素酸ナトリウム液の 100 μ l、105 μ l、110 μ l を加えたところ、遊離残留塩素濃度は 0.09mg/L、

0.10mg/L、0.13mg/L 及び 0.11mg/L、0.13mg/L、0.16mg/L となった。そこで、TCID₅₀ の実験時にウイルス液に対してこの割合で次亜塩素酸ナトリウム液を加えることとした。FCS が添加された状態なので、結合塩素も生じている恐れはあったが、実際の浴槽水は入浴者の落とす垢があることで、同様に結合塩素が生じており、ここでは実際の消毒条件に近いとみなした。

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 (99.9% 不活化に要する濃度 (mg/L) × 時間 (分)) 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⁾。

以上の結果から、公衆浴場の浴槽で維持すべき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。

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.

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

F. 研究発表
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