

【研究報告】

オゾンおよび塩素によるネコカリシウイルスの不活化

高知高専,土居俊房,斎藤博之,中室克彦

日本医療・環境オゾン研究会会報, Vol.18,No.4, 90-95. (2011)

# 研究報告 オゾンおよび塩素によるネコカリシウイルスの不活化

高知高専 土居俊房、秋田県健康環境センター 斎藤博之、摂南大学理工学部 中室克彦

**要旨** ノロウイルスの代替としてネコカリシウイルス (FCV) のオゾンおよび塩素 (次亜塩素酸ナトリウム) による不活化効果について検討した。pH 7、温度 40°C の循環式モデル浴槽水中へエジェクターを用いてオゾンガスを注入した場合、FCV 濃度の減少が接触時間 60 秒で  $3.5\text{-log}$  (99.97%) 以上となる最低オゾンガス注入率は 0.02 mg/L であることが明らかになった。この結果はエジェクターを用いたオゾンガス注入が塩素やオゾン水と比較して浴槽水中のウイルスの殺菌に非常に有効であることを示唆している。

**キーワード:** 循環式浴槽、ノロウイルス、ネコカリシウイルス、オゾン、塩素

## 1. はじめに

ノロウイルス (Norovirus : NV) による食中毒や感染症は毎年冬季を中心に多発し、厚生労働省<sup>1)</sup>によると、ノロウイルス食中毒が大流行した平成 18 年から 19 年の発生件数は 499 件、患者数は 27,616 名であった。その内、患者数が 500 名以上の事例は、6 件 (5,118 名) であり、発生原因はすべての事例においてノロウイルスに感染した調理従事者等が汚染源と推察されている。これまで NV による胃腸炎は冬季のカキなど二枚貝の生食に起因するものが主と考えられてきたが、最近では家庭や共同生活施設などヒト同士の接触する機会が多いところでヒトからヒトへ飛沫感染等直接感染する場合も指摘されている<sup>2)</sup>。また、老人福祉施設でノロウイルスによる集団感染の多発が報告されている。我々は老人福祉施設で直接感染する可能性のある場所として共同浴槽に注目し、浴槽水中のウイルス殺菌が重要であると考えている。

しかし、NV は現在のところ人工的な培養ができないため、その不活化の条件などを実験室で確認することができず、有効な予防や殺菌対策を講じるための科学的根拠が乏しい。

現在、厚生労働省は公衆浴場において遊離塩素濃度 0.2~0.4 mg/L の塩素による衛生管理を推奨している。しかし、ウイルスに対する塩素の殺菌効果は明らかにされていない。また、入浴者から塩素は目にしみる、臭う、アレルギーを引き起こすなどの苦情があり、0.1 mg/L 以上の遊離塩素が使用できない場合もある<sup>3)</sup>。このような場合の殺菌方法として厚生労働省はオゾンと紫外線を推奨している。特にオゾンは殺菌力、即効性などから循環式浴槽の殺菌剤として注目されている。

そこで、ノロウイルスと同じカリシウイルス科に属するネコカリシウイルス (Feline Calici Virus : FCV) がネコ腎臓由来の培養細胞 (CRFK 細胞) 中で増殖可能であることに着目し、本ウイルスを NV の代替ウイルスとして用い、オゾンおよび塩素によるウイルス不活化効果について検討を行った。特にオゾンに関しては循環式浴槽を用いて検討した。

## 2. 実験

### 2.1 供試ウイルス株

FCV は麻布大学から分譲された F9 株 (ワクチン株) を用いた。Eagle's MEM 培地 (ニッスイ) に 5% 仔牛胎児血清、0.15% 炭酸水素ナトリウムを加えた培養液で F9 株を感染させた CRFK 細胞を培養した。得られた培養液を超遠心分離機で濃縮し、蒸留水に再浮遊した。得られた FCV 液はクライオバイアルに分注し、実験で使用するまで -60°C フリーザーに保存した。

### 2.2 塩素による不活化

500mL ねじ口洗浄びんに pH5.8、7.0、8.6、9.5 の 10mM リン酸緩衝液を 500mL 入れ、滅菌した。これを 10、20、30、40°C の恒温水槽中に置き、スターラー (回転速度 200rpm) で攪拌した。そこに  $0.034\sim 1.0 \times 10^7$  copy/mL の FCV 1mL を添加した。次に遊離塩素濃度が 0.2、0.4 mg/L になるように希釈次亜塩素酸ナトリウム水溶液を加え、2、5、10、20、30、40 分後に各々 5mL 採取し試料とした。直ちに 20%-チオ硫酸ナトリウム溶液 50  $\mu$ L を添加し塩素を消滅させた後、FCV 濃度を測定した。

遊離塩素濃度は DPD 法により吸光度計 (HACK, DR2800) を用いて測定した。

### 2.3 オゾン水による不活化

円筒状ガラスフィルター付の 1,000mL ねじ口洗浄びんに 8mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を約 900mL 入れ、恒温槽で 10、25、40°C 一定とし、流量 0.75L/min のオゾンガスを 20 分間以上吹き込み、オゾン水を調製した。溶存オゾン濃度はオゾンカウンター (ZC-300、平沼産業株) を用いて測定した。

300mL 三角フラスコに滅菌した 8mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) と先に調製したオゾン水を添加し溶存オゾン濃度 0~0.5 mg/L の希釈オゾン水 200mL を調製した。速やかにこの希釈オゾン水に  $7.3 \times 10^8$  copy/mL の FCV 液 0.2 mL を添加し 10、25、40°C、30rpm の振とう恒温水槽で 2 分間接触させた。直ちに 2%-チオ硫酸ナトリウム溶液を 0.2mL 添加しオゾンを消滅させた後、FCV 濃度を測定した。

2.4 循環式モデル浴槽実験

実験装置図を Fig.1 に示す。循環水は 8mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を使い、循環式モデル浴槽装置内の全量を 55kg (55.4L)、温度 40°C、循環流量 5L/min 一定 (約 11.1 分で 1 回循環) とした。約 93% 酸素ガスを原料として無声放電式オゾン発生器 (IB-500 型、㈱IBS トレーディング) を用いて 7.9±0.4mg/NL のオゾンガスを調製した。1.2×10<sup>10</sup> copy/mL の FCV 液 5mL をヘッドタンクへ添加し、FCV 濃度を均一にするために装置内の水を 2 回循環した。次にバルブを切り換え、オゾンガスをエジェクターへ送り循環水に溶解した。オゾンガス流量を調節することによりオゾン注入濃度を 0.01 ~ 0.1mg/L の範囲で変化させた。ガス中のオゾン濃度は紫外線吸収式気相オゾンモニター (OZM-8000GNW、オキトロテック(有)) で測定した。また循環液中の溶存オゾン濃度は紫外線吸収式液相オゾンモニター (OZM-7000LP、オキトロテック(有)) で測定した。エジェクターの入口および第 1 反応塔の出口の 2 箇所から約 100mL 試料を採取し、直ちに 2%-チオ硫酸ナトリウム溶液を 0.2mL 添加しオゾン进行を消去した後、FCV 濃度を測定した。

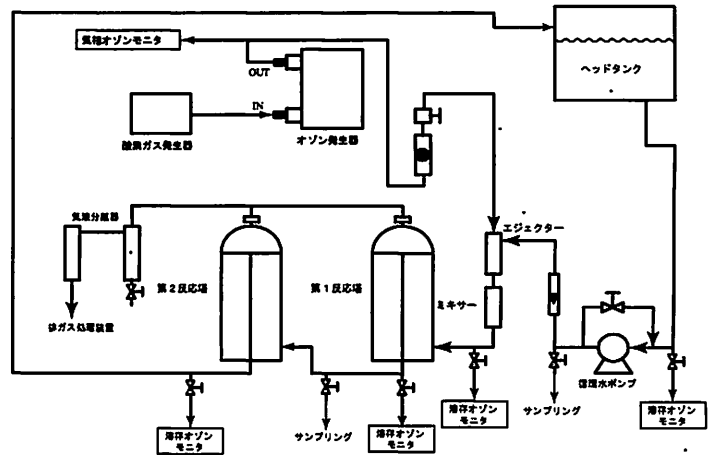


Fig.1 Schematic diagram of the experimental system

2.5 FCV 濃度の測定方法

試料 0.25ml をとり、RNA 抽出試薬 (ISOGEN-LS、㈱ニッポンジーン) を用いて FCV の RNA を抽出し、さらに逆転写反応を行い、cDNA を作製した。FCV 遺伝子量 (コピー数) の測定は森ら<sup>4)</sup> の開発したプライマー・プローブセットを用いてリアルタイム PCR 法により行った。

3. 結果

3.1 塩素による不活化

遊離塩素濃度 0.4 mg/L の次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (pH 7) による 20°C における FCV の生存率に及ぼす接触時間の効果を Fig.2 に示す。接触時間 10 分で FCV 濃度は 3.5-log (99.97%) 減少していた。ここで、検出下限値は 3.8-log (99.98%) であり、接触時間 20 分以降は検出下限であった。Urakami et al.<sup>5)</sup> は遊離塩素濃度 0.3 mg/L、室温 (20~25°C)、接触時間 5 分で FCV 濃度が 4.6-log (99.998%) まで減少したと報告している。彼らの不活化率は本研究の値よりも非常に大きい、これはウイルスの不活化率を細胞感染力から求めているためである。一般に遺伝量から不活化率を求める方法は細胞感染力から求める方法よりも正確である<sup>6)</sup>。

Fig.2 において FCV の生存率の対数、log(N/N<sub>0</sub>) と接触時間の関係が直線で表されることから塩素による FCV の不活化速度は FCV 濃度の一次に比例する擬一次反応と考えられる。したがって、直線の勾配、b [1/min] から次式により不活化速度定数、k<sub>i</sub> [1/s] を求めた。(この実験はバッチ式の条件で実験したのですか)

$$k_i = -b \times \frac{\ln(10)}{60}$$

pH 7、遊離塩素濃度 0.4 mg/L における FCV の不活化に及ぼす温度の効果を Fig.3 に示す。データのバラツキが大きい、Fig.2 と同様に、各温度において FCV の生存率の対数と接触時間の関係がほぼ直線で表された。各温度の直線の勾配から求めた不活化速度定数、k<sub>i</sub> [1/s] と温度の関係を Fig.4 に示す。温度が高くなるに従って不活化速度が大きくなり、40°C の不活化速度は 20°C の値の約 3 倍となっていた。温度が高くなるに従い遊離塩素の分解速度が僅かに大きくなるため、温度が高くなると塩素消費量も僅かに多くなる。

40°C、遊離塩素濃度 0.2 および 0.4 mg/L における不活化速度定数、k<sub>i</sub> [1/s] を、遊離塩素 C<sub>0</sub> [mg/L] で割った値、k<sub>i</sub>/C<sub>0</sub> [s<sup>-1</sup> mg/L<sup>-1</sup>] と pH の関係を Fig.5 に示す。データのバラツキが大きい、興味深い結果である。すなわち、一般にアルカリ性に傾くほど、塩素殺菌の CT 値 (濃度×時間 [mg/L・min]) が大きくなり、殺菌に要する時間が長くなるといわれているが、FCV の場合は酸性で不活化の効果が低く、pH 7~9.5 の範囲はほぼ一定の不活化効果がみられた。Fig.5 の結果から推定した 40°C、pH 7~9.5 における 3-log(99.9%) の殺菌時間は、遊離塩素 0.2 mg/L で 6 分、0.4 mg/L で 3 分、0.6 mg/L で 2 分であった。また、pH 5.8 における 3-log(99.9%) の殺菌時間は、遊離塩素 0.2 mg/L で 11 分、0.4 mg/L で 5 分、0.6 mg/L で 3.5 分であった。

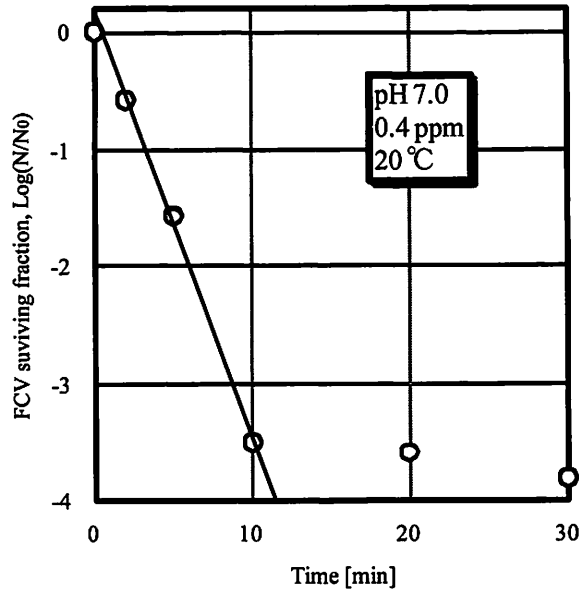


Fig.2 Inactivation curve of FCV with 0.4 mg/L free chlorine at 20°C and pH 7. N is the FCV concentration and  $N_0$  is an initial FCV concentration.  $3.0 \times 10^6$  copy/ml.

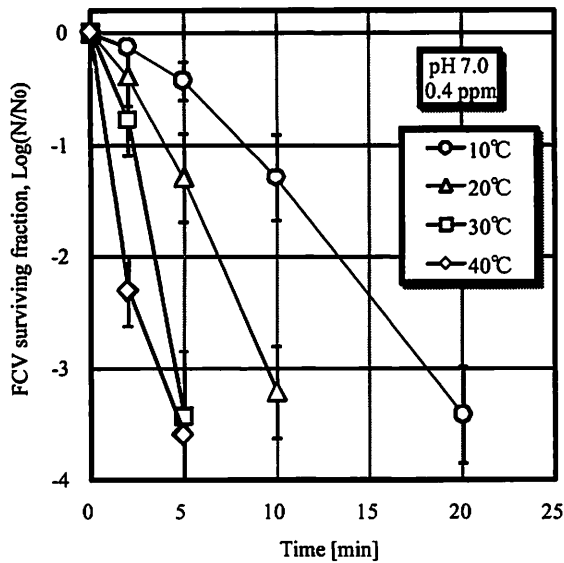


Fig.3 Effects of temperature on the inactivation of FCV with 0.4 mg/L free chlorine at pH 7.  $N_0$  is an initial FCV concentration,  $0.49 - 3.9 \times 10^6$  copy/ml.

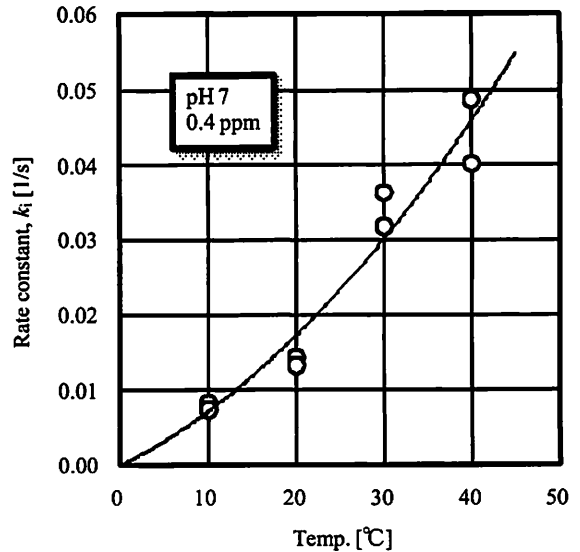


Fig.4 Effects of temperature on the rate constant of the inactivation of FCV with 0.4mg/L free chlorine at pH 7.  $N_0$  is an initial FCV concentration,  $0.49 - 3.9 \times 10^6$  copy/ml.

### 3.2 オゾン水による不活化

オゾン水による FCV の不活化に及ぼす溶存オゾン濃度と温度の効果を Fig.6 に示す。20、40°C のデータのバラツキが大きい、これは温度が高くなるとオゾンの自己分解速度が速くなるため溶存オゾン濃度を正確に測定できないためである。FCV 不活化率は溶存オゾン濃度とともに大きくなり、また温度が高くなるとともに大きくなった。しかし、0.5 mg/L での不活化率は温度にかかわらずほぼ一定値を示し、10°C で 1-log (90%) 以下、40°C で 2-log (99%) 以下であった。Thurston-Enriquez ら<sup>7)</sup> は 5°C、pH 7 で 0.06mg/L のオゾン水に FCV を 5 分間接触させたとき不活化率が 2.8-log (99.8%) であったと報告している。彼らもウイルス

の不活化率を細胞感染力から求めているため本研究の値より大きな値を得たものと考える。

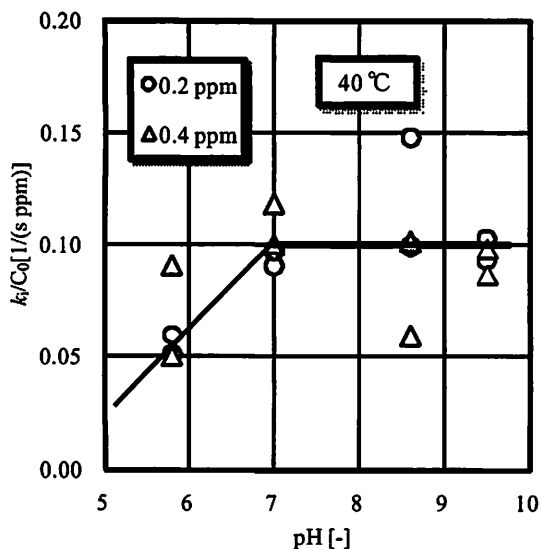


Fig.5 Effects of pH on the rate constant of the inactivation of FCV with 0.2 and 0.4 ppm free chlorine at pH 7.  $N_0$  is an initial

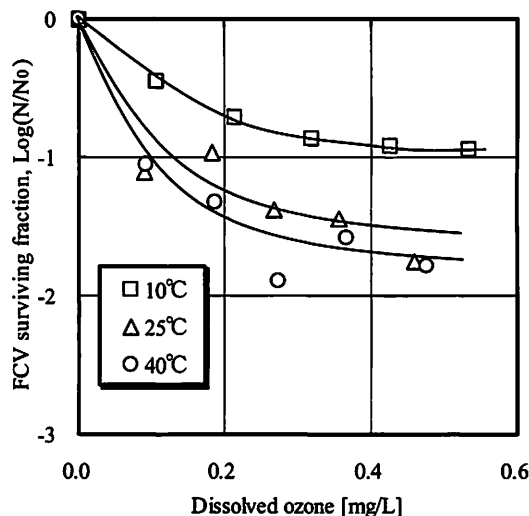


Fig.6 Inactivation curve of FCV with ozonated water at pH 7 for 120 s.  $N_0$  is an initial FCV concentration,  $0.82-1.1 \times 10^6$  copy/ml.

### 3.3 循環式モデル浴槽実験

オゾン注入濃度 0.10 mg/L における循環式モデル浴槽装置内の溶存オゾン濃度の経時変化を Fig.7 に示す。エジェクター出口の溶存オゾン濃度は循環水のターン数とともに増加し 1.5 ターンで一定値となり、オゾン注入率とほぼ同じ値を示していた。第一反応塔出口および第二反応塔出口の溶存オゾン濃度も循環水のターン数とともに増加していた。これはオゾンガス流量が小さいためオゾンガス導入の初期はエジェクター内の流動が不安定であるためと思われる。一方、エジェクター入り口の溶存オゾン濃度は 3 ターンまでほぼゼロであり、1 ターン (11 分) 以内でヘッドタンク内の残留オゾンが消滅していた。

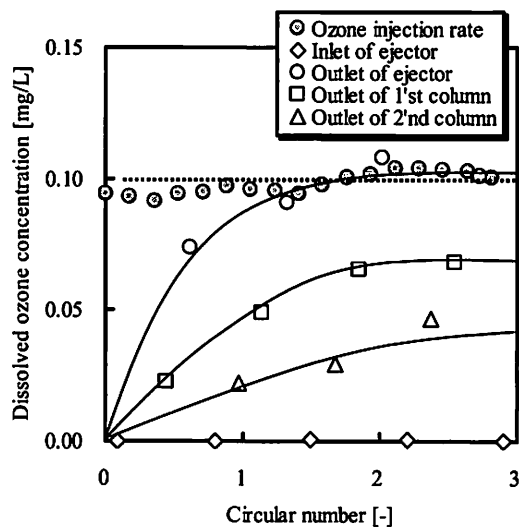


Fig.7 Change of ozone injection rate and dissolved ozone concentration in the model recirculating bath system

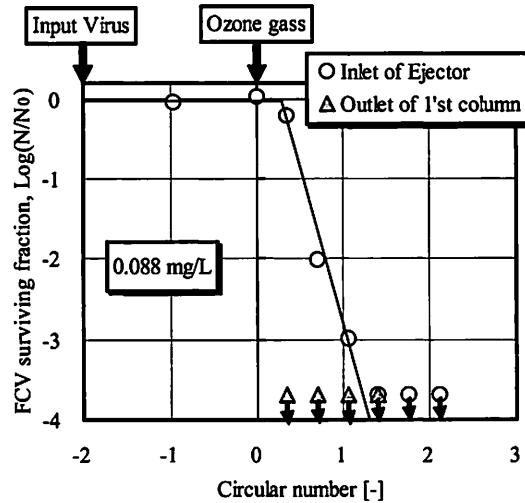


Fig.8 Inactivation curve of FCV in the ozone injection rate of 0.088mg/L. N is the FCV concentration and  $N_0$  is an initial FCV concentration,  $2.3 \times 10^6$  copy/ml. Arrows indicate the detection limits.

オゾン注入濃度 0.088mg/L、初期 FCV 濃度  $2.3 \times 10^6$  copy/ml におけるエジェクター入口と第一反応塔出口の FCV 不活化率の変化を Fig.8 に示す。エジェクター入口の FCV 不活化率は 1 ターンまでほぼ直線的に減少し、約 1.2 ターンで検出下限以下であった。不活化率は 3.7-log (99.98%) 以上で、十分に不活化されていた。また、第一反応塔出口の FCV 濃度はオゾンガス導入直後から検出下限以下であった。

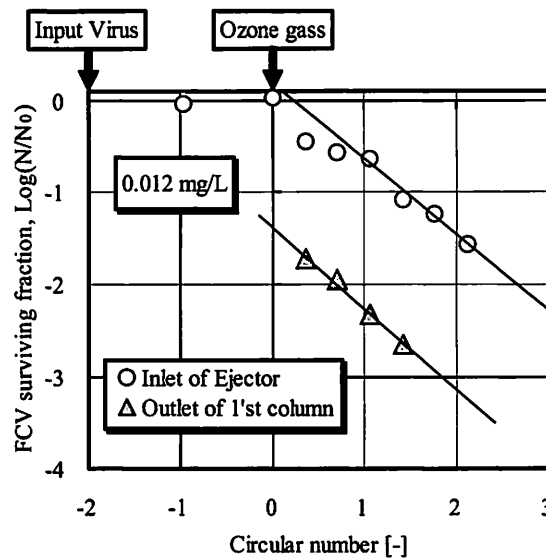


Fig.9 Inactivation curve of FCV in the ozone injection rate of 0.012mg/L. N is the FCV concentration and  $N_0$  is an initial FCV concentration,  $1.6 \times 10^6$  copy/ml.

オゾン注入濃度 0.012 mg/L、初期 FCV 濃度  $1.6 \times 10^6$  copy/ml におけるエジェクター入口と第一反応塔出口の FCV 不活化率の変化を Fig.9 に示す。エジェクター入口の FCV 不活化率はほぼ直線的に減少し、2 ターンで 1.6-log (97.5%) であった。また、第一反応塔出口の FCV 不活化率も直線的に減少し、1.4 ターンで 2.7-log (99.8%) であった。両者の差はエジェクターから第一反応塔出口までの接触時間 60 秒の不活化率を示し、その値は 1.6-log (97.5%) であった。

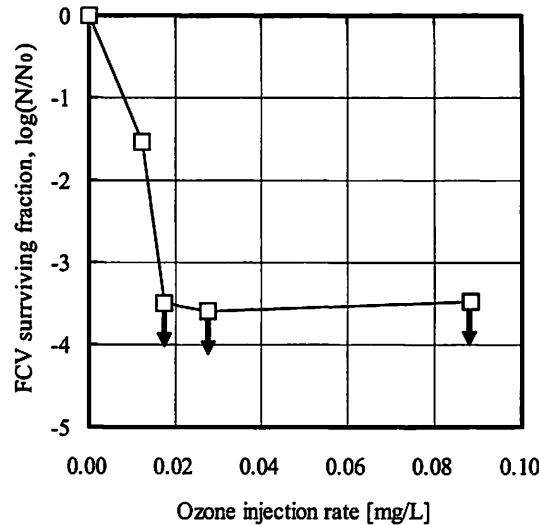


Fig.10 Effect of ozone injection rate on the FCV surviving fraction at 40°C and pH 7 for a contact time of 60 s. N is the FCV concentration and N<sub>0</sub> is an initial FCV concentration, 1.6-2.4×10<sup>6</sup> copy/ml. Arrows indicate the detection limits

エジェクターから第一反応塔までの FCV 不活化率に及ぼすオゾン注入濃度の効果を Fig.10 に示す。FCV 不活化率が接触時間約 60 s で 3.5-log (99.97%) 以上となる最低オゾン注入率は 0.02 mg/L である。この結果は次亜塩素酸ナトリウム水溶液、オゾン水に比べ非常に低濃度で高い不活化を示し、エジェクターによるオゾンガス注入が浴槽水中のウイルスの殺菌に非常に有効であることを示唆している。

#### 4. まとめ

次亜塩素酸ナトリウム水溶液による FCV の不活化速度は温度の上昇とともに大きくなり、また、pH 7 以下では pH の減少とともに小さくなり、pH 7 以上ではほぼ一定値を示した。

エジェクターを用いてオゾンガスを注入する循環式モデル浴槽において、40°C、接触時間約 60s、オゾン注入率 0.02mg/L で FCV 不活化率は 3.5-log (99.97%) 以上であった。この結果は塩素水よりオゾン水の方が非常に低濃度であり、エジェクターによるオゾンガス注入が浴槽水中のウイルスの殺菌に非常に有効であることを示唆している。

#### 5. 参考文献

- 1) 厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会：ノロウイルス食中毒対策について (提言).  
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2007/10/dl/s1012-5a.pdf>
- 2) 厚生労働省：ノロウイルスに関する Q&A.  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/yobou/dl/040204-1.pdf>
- 3) 佐々木英祐 他, 化学療法の領域 20, 615-619 (2004).
- 4) 森功次 他, 感染症学雑誌 80, 496-500 (2006).
- 5) Urakami H. et al., Appl Environ Microbiol 73, 5679-5682 (2007).
- 6) 原田宣男 他, 水環境学会誌 27, 33-40 (2004).
- 7) Thurston-Enriquez J. A. et al., Water Res 39, 3650-3656 (2005).