

新型コロナウイルス対策としてのオゾン水の効果

Effect of ozonated water on the severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

○内藤 博敬^{*,**}、錦 善則^{*,***}、中室克彦^{*,****}

* : 日本医療・環境オゾン学会 環境応用部会/オゾン水研究会,

** : 静岡県立農林環境専門職大学, *** : デノラ・ペルメレック株式会社, **** : 摂南大学名誉教授

論文要旨

オゾンはウイルスなどの微生物を不活化する効果があることが知られており、浄水、食品、医療の分野で幅広く利用されている。これまでに国内外の研究機関から、オゾンによる SARS-CoV-2 の不活化に関する試験データが報告されている。しかし、その結果は一様ではなく、試験条件・評価方法の違いによるものと推察される。本研究では、SARS-CoV-2 に対するオゾン水の効果検証を行うに当たり、オゾン水中のオゾン濃度 (C) と反応時間 (T) との積 (CT) によって評価することの重要性を示す。

Ozone is known to be effective for inactivating microorganisms including viruses, and has been widely applied in the water purification, food and medical fields. Several research institutes have reported test data on the inactivation of SARS-COV2 by ozone. However, the results are not uniform, and it is presumed that the reason is due to differences in test conditions and evaluation methods. The purpose of this study was to verify the effect of ozonated water on SARS-CoV-2 by the product (CT) of ozone concentration(C) in ozonated water and reaction time(T).

キーワード : オゾン水、SARS-CoV-2、ウイルス不活化

1. はじめに

2019年の年末に中国・武漢に端を発した新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、瞬く間に全世界へと拡がり、世界各国で対策が進められ、ワクチン開発も早急になされてきたが、ウイルスも変異を繰り返すなどしてその終息目処は立っていない。SARS-CoV-2 の感染経路は主として飛沫感染と接触を介した経気道および経口感染である。そのため、感染予防対策としてマスク着用と手指衛生の徹底が求められ、汎用される消毒用アルコールの品薄化、利用者の手荒れ、微生物の耐性獲得などの危惧から、2020年に経済産業省の要請を受けた NITE によって、界面活性剤、次亜塩素酸水等のアルコールの代替消毒物資に対して、SARS-CoV-2 に対する有効性評価がなされた。オゾンに対する評価報告はなされていないが、オゾンはその強い酸化力によってウイルスを含む微生物の不活化に著効を示すことが知られており、衛生向上に有用である。また、オゾンは環境負荷も低いことから、浄水分野、食品分野、医療分野など幅広い分野で汎用されている。オゾン水の SARS-CoV-2 不活化に関する報告は、2020年5月以降にいくつかの研究機関から試験データが公表されているが、その効果結果は一様ではない。その理由として、試験条件および評価法の違いが考えられる。オゾン水の効果を正しく評価するためには、CT (mg・min/L) 値による評価法を用いるべきであるが、ウイルス不活化試験においては、培地成分やウイルス懸濁液などの有機物持ち込みによるオゾンの減衰を考慮した、CT 値補正が重要であることを忘れてはならない^{1,2)}。本研究では、オゾン水の SARS-CoV-2 に対する不活化効果を検証することを目的とし、減衰曲線より補正を行ったオゾン曝露量 (CCT 値) を用いてウイルス不活化効果を正確に評価し、先行研究との比較検討を行った。

2. 実験方法

2.1 材料

1) オゾン水

ウイルス不活化試験に用いるオゾン水は、0.5、1.0、3.0 mg/Lとした。これらのオゾン水は、オゾン水生成器 (AQUA Protect O3, 電解方式, 三友商事株式会社) を用いて純水を原料水として生成し、適宜純水で希釈した。オゾン濃度は溶存オゾンモニタ (荏原実業(株)製, EL-600 型: 紫外線吸収式, 0~10.0 mg/L、測定流量 0.1~1.0L/min) を用いて測定した。

2) ウシ胎児血清 (FBS : Fetal Bovine Serum)

ウイルス懸濁液に由来すると想定されるオゾン消費有機物の代替として、培養細胞用培地の添加するウシ胎児血清 (FBS) を用いることとした。FBS は、富士フィルム和光純薬 (株) 製 (Cat.2926546) を用い、FBS 中のタンパク質濃度は、BCA 法 (Takara 社, TaKaRa BCA Protein Assay Kit) により定量し、36 mg/mL を得た。

3) SARS-CoV-2 ウイルス³⁾

SARS-CoV-2 ウイルス株は、国立感染症研究所から分離・提供された SARS-CoV-2 ; 2019-nCoV JPN/TY/WK-521 株を用いた。この SARS-CoV-2 ウイルスを VeroE6 細胞に感染させ、細胞変性効果が確認されるものを回収し、遠心分離した上澄み液を限外濾過した後、リン酸緩衝生理食塩水で 3 回洗浄した。これをウイルス懸濁液とし、-80°C で実験に供するまで凍結保存した。本実験で用いたウイルス懸濁液の感染価は 2.25×10^6 PFU/mL であった。

2.2 SARS-CoV-2 不活化試験を想定したオゾン消費物質共存下における溶存オゾン減衰曲線

0.5、1.0、3.0 mg/L のオゾン水は、それぞれ用時 500 mL を調製した。本実験で用いた SARS-CoV-2 力価 $1 \sim 2 \times 10^6$ PFU/mL のウイルス懸濁液のタンパク質濃度は 0.08 mg/mL であり、不活化試験ではこのウイルス懸濁液 10 μ L に対してオゾン水を 190 μ L 加えることから、試験液中のタンパク質濃度は 4 μ g/mL となることを想定し、これらオゾン水に FBS を 58 μ L 加えて、攪拌しながら経時的に溶存オゾン濃度を溶存オゾンモニタで測定し、減衰曲線を求めた。

2.3 SARS-CoV-2 ウイルスの溶存オゾンによる不活化試験

0.5、1.0、3.0 mg/L に調整したオゾン水 190 μ L とウイルス懸濁液 10 μ L を混合させ、それぞれ 0、10、20、30 秒反応後に、10 mM チオ硫酸ナトリウムを含む培地 800 μ L を加えて反応を停止させた。これをプレートに撒き、プラークアッセイ法によってウイルス感染価を算出した。また、陰性対象には PBS を用い、0 および 30 秒後の変化をみた³⁾。なお、陰性対照 0 sec の感染価 (C₀) は、用いたウイルス懸濁液の 1/20、つまり 1.13×10^5 PFU/mL である。本試験はオゾン水の各濃度と反応時間の組み合わせ毎に 3 回の試験を、BSL3 施設内で行った。

不活化効果は以下の算出式を用いて算出した。

$$\text{不活化効果 (Mv)} = \log (C_t/C_0) - \log (N_t/N_0) = \log C_t / N_t$$

C_t : コントロール t 時間後の感染価

C₀ : コントロール 0 時間後の感染価

N_t : オゾン水 t 時間後の感染価

N₀ : オゾン水 0 時間後の感染価

ウイルスの減少率は対数減少値より以下の式で算出した。

$$\text{減少率[\%]} = (1 - 1/10^{\text{対数減少値}}) \times 100$$

本研究で得られたデータは、Student-T を用いて解析し、有意水準 1% のものを有意差有と判断した。

3. 結果と考察

3. 1 想定オゾン消費物質としてFBS共存下における溶存オゾン減衰曲線

実験結果を図1に示す。0.5、1.0、3.0 mg/L オゾン水の5分以内の減衰が大きかった。Nakamuro らが *Feline calicivirus* あるいは *Influenza virus* に対するオゾン水の不活化効果検証を行った際に、ウイルス培養液あるいは漿尿液を添加して得たオゾンの減衰曲線においても1分以内の減衰の勾配がより急であることを報告している^{1,2)}。本研究の結果は、60秒で1~2割程度の減衰がみられたことから、*Feline calicivirus* の減衰曲線に類似していた。

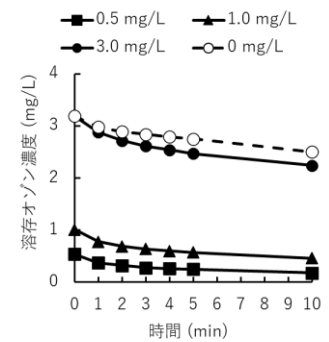


図1 4 µg/mL FBS 共存下における溶存オゾン減衰曲線

3. 2 SARS-CoV-2 に対するオゾン水の不活化効果

SARS-CoV-2 に対するオゾン水の不活化効果を表1と図2に示す。SARS-CoV-2 の感染価は、いずれのオゾン濃度においても経時的に減少し、これにともなって SARS-CoV-2 減少率も低下した。30秒後の反応混合液の感染価は、0.5 mg/L で 5.7×10^2 PFU/mL (減少率 99.484%)、1.0 mg/L で 4.84×10^2 PFU/mL (減少率 99.560%)、3.0 mg/L では 5×10 PFU/mL (減少率 99.954%) を示した。

また、SARS-CoV-2 ウイルスの代替物としてのオゾン消費物質 FBS 共存下における 0.5、1.0、3.0 mg/L オゾン水の経時的な減衰曲線 (図2) を用いて、補正したオゾン水の CCT (Corrected Concentration·Time) 値 (mg·min/L) と、補正前つまりオゾン水の初期溶存オゾン濃度と接触反応時間の積である ICT (Initial Concentration·Time) 値 (mg·min/L) を、表1に加えた。0.5、1.0、3.0 mg/L オゾン水をウイルス懸濁液と 10、20、30 秒接触させた際の CCT 値と ICT 値を比較すると、ICT 値の方が 2~6% 小さい数字ではあった。これは、ウイルス懸濁液中に培地成分などオゾンの不活化に寄与する消費物質の持ち込みがほとんど含まれないことを意味しており、懸濁液の限外濾過およびリン酸緩衝生理食塩水洗浄による前処理の有用性が示唆された。反対に、CCT 値と ICT 値を比較した場合にその差が大きくなれば、検体中にオゾン消費物質の持ち込みが多いことを意味し、ICT 値ではオゾン水の正しい評価を行うことができないことを意味している。

表1 SARS-CoV-2 に対するオゾン水の不活化効果

オゾン水		10 秒	20 秒	30 秒
0.5 mg/L	不活化効果(Mv)	2.01	2	2.29
	減少率	99.02%	99.00%	99.48%
	ICT 値 (mg·min/L)	0.08	0.17	0.25
	CCT 値 (mg·min/L)	0.077	0.166	0.234
1.0 mg/L	不活化効果(Mv)	2.05	2.36	2.36
	減少率	99.11%	99.56%	99.56%
	ICT 値 (mg·min/L)	0.17	0.33	0.5
	CCT 値 (mg·min/L)	0.167	0.322	0.473
3.0 mg/L	不活化効果(Mv)	2.31	3.31	3.34
	減少率	99.52%	99.95%	99.95%
	ICT 値 (mg·min/L)	0.5	1	1.5
	CCT 値 (mg·min/L)	0.497	0.97	1.457

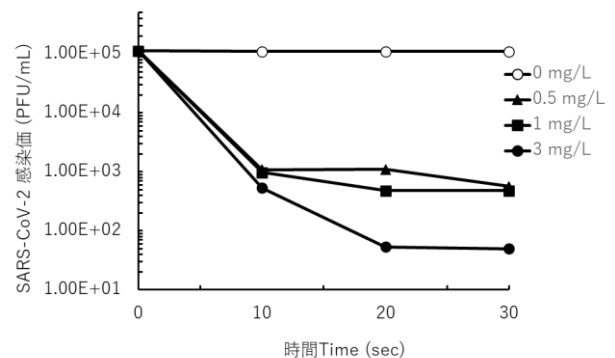


図2 SARS-CoV-2 に対するオゾン水の不活化効果

3. 3 SARS-CoV-2 に対するオゾン水の不活化に関する先行研究との比較検証

図3に、本研究結果およびこれまでに報告された SARS-CoV-2 に対するオゾン水の不活化効果を、ICT 値および CCT 値に整理して示した。本研究においてオゾン水の減衰曲線による補正なしの ICT 値を (●) で、補正した CCT 値を (○) で示した。これに、文献等から得られた SARS-CoV-2 に対するオゾン水の ICT 値として、文献4 (■)⁴⁾、文献5 (▼)⁵⁾、文献6 (◆)⁶⁾ および文献7 (▲)⁷⁾ をそれぞれ加え

た。文献4は本研究と同じ試験研究機関で行われた結果であり、本研究によって再現性が得られている。また、実線で囲んだ文献5、文献6とも、SARS-CoV-2に対するオゾン水の不活化効果はほぼ一致していることがわかる。破線で囲んだ文献7のみ他の結果と大きく異なっているが、これについて著者らは培地成分に起因するオゾン水の減衰を考慮する必要があると論述しており、本研究によってオゾン水の効果検証では、減衰曲線による補正を加えた CCT 値での評価の重要性が示された。

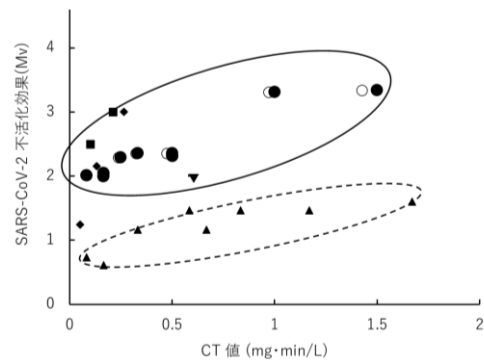


図3 SARS-CoV-2不活化効果の既報との比較

4. まとめ

本研究においてもオゾン水の SARS-CoV-2 に対する不活化効果が認められた。本研究における SARS-CoV-2 不活化試験では、反応溶液中溶存オゾン減衰曲線による補正が定量的な CCT 値を評価するために重要であることを示した。また、ウイルス不活化試験においては、前処理によってウイルス懸濁液に由来するオゾン消費物質の適切な除去が可能であることも示唆された。これらのことから、オゾン水によって SARS-CoV-2 を 99.95%不活化させるのに必要な CCT 値は、0.97 mg·min/L であることを明らかとした。

5. 謝辞

本研究を行うにあたり、SARS-CoV-2 に対するオゾン水の不活化効果実証を請け負っていただいた、奈良県立医科大学微生物感染症学講座・矢野寿一教授、中野竜一准教授および研究室スタッフの皆様に感謝いたします。また本研究は、日本医療・環境オゾン学会、日本オゾン協会、日本医療・環境オゾン学会 環境応用部会/オゾン水研究会の御協力の元、日本医療・環境オゾン学会および日本オゾン協会の法人会員、個人会員の有志の寄付を受けて奈良県立医科大学受託研究費に充当いたしました。御協力頂いた皆様に深謝いたします。

6. 参考文献

1. Yamazaki K. and K. Nakamuro, 2012. "Inactivation of Norovirus by Low Level Dissolved Ozone." *Bokin Bobai*, 40(4):199-204 (in Japanese).
2. Nakamuro, K., H. Nakada, K. Ichikawa, N. Kosaka and K. Yamazaki. 2012. "Inactivation of 2012, Pandemic Influenza Virus by Low Level Dissolved Ozone." *Bokin Bobai*, 40(8):485-491 (in Japanese).
3. Yano H., R. Nakano, Y. Suzuki, A. Nakano, K. Kasahara, and H. Hosoi, 2020. "Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by gaseous ozone treatment." *J Hosp Infect.* 106(4) 837–838.
4. Maxell Holdings, Ltd., "Confirmation of the novel coronavirus (SARS-CoV-2) inactivation effect of low concentration ozone water generated by Maxell's ozone water generator." Implementation of a cooperative investigation with Nara Medical University, released October 15, 2020.
5. Martins B. R, Italo A. Castro, Marjorie Pontelli, Juliano P. Souza, Thais M. Lima, Stella Rezende Melo, 2021. "SARS-CoV-2 Inactivation by Ozonated Water: A Preliminary Alternative for Environmental Disinfection." *Ozone: Science & Engineering*, 43: 108-111.
6. Murata T, S Komoto, S Iwahori, J Sasaki, H Nisitsuji, T Hasebe, K Hoshinaga and Y Yuzawa, 2020. "Reduction of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 infectivity by admissible concentration of ozone gas and water." *Microbiology and Immunology*, 65(1):10-16.
7. Inagakia H, A Saito, P E Sudaryatm, H Sugiyama, T Okabayashi, S Fujimot. 2021. "Rapid inactivation of SARS-CoV-2 with ozone water." *Ozone : Science & Engineering*, 43(3): 208-212.