

# 水相および気相における SARS-CoV-2 のオゾンによる不活性化機構

## Inactivation Mechanism of SARS-CoV-2 by Ozone in Aqueous and Gas Phases

○錦 善則<sup>\*\*</sup>、今津 龍也<sup>\*\*\*</sup>、中室克彦<sup>\*\*\*\*</sup>、内藤博敬<sup>\*\*\*\*\*</sup>、青木幸一<sup>\*\*\*\*\*</sup>

\*：日本医療・環境オゾン学会 環境応用部会／オゾン水研究会、\*\*：デノラ・ペルメレック株式会社、

\*\*\*：マクセル株式会社、\*\*\*\*：摂南大学名誉教授、\*\*\*\*\*：静岡県立農林環境専門職大学、\*\*\*\*\*：福井大学名誉教授

### 論文要旨

オゾンが拡散によって微小球状のウイルスに運ばれウイルスを不活化するという拡散モデルを用いて、ウイルスの不活化に必要なオゾンの拡散量を算定したところ、水溶液中での不活化には、ウイルス 1 ビリオン (virion:粒子) あたり  $5 \times 10^{10}$  から  $5 \times 10^{11}$  個のオゾン分子が必要であるのに対し、気相中での不活化には  $10^{14}$  から  $10^{15}$  個のオゾン分子が必要であることがわかった。気相での 200 から 20,000 分の 1 という効率の低さの原因は、オゾンとオゾンにより生成したラジカルが反応、消滅することに起因すると考えられる。

We analyzed the reaction rate using a diffusional reaction model, in which ozone is carried by micro spherical viruses to inactivate the target viruses. Using this model, we found that inactivation in the gas phase requires  $10^{14}$  to  $10^{15}$  ozone molecules per virus virion, while the inactivation in an aqueous solution requires  $5 \times 10^{10}$  to  $5 \times 10^{11}$  ozone molecules. This implies that the efficiency in the gas phase is 200 - 20,000 times lower than that in the aqueous phase is explained by the reaction and disappearance of radicals generated by ozone with ozone in the gas phase.

キーワード：コロナウイルスの不活化、液相・気相での物質移動、ラジカル生成機構

### 1. はじめに

COVID-19という感染症を引き起こすSARS-CoV-2は、アルコール類、オゾン、塩素などの酸化剤、フェノール誘導体、第4級アンモニウムなどの化学消毒剤を用いて殺菌されているが<sup>1)</sup>、オゾンによる同ウイルスに対する優れた不活化効果も確認されている。本報告では、水相と気相でのオゾンによるCoV-2不活化速度を測定し、文献で報告されている $ct$  (濃度×時間) 値とも比較し、顕著な差異の原因を検討した。

### 2. 実験

不活化試験に用いた 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 株である<sup>2)</sup>。以下に示す試験は、奈良県立医大内のバイオセーフティーレベル 3 (BSL3) の実験室で実施され、結果は既に報告した<sup>3,4)</sup>。プラーク法により算定された感染価から、不活化効果  $M_v$  は以下で与えられる。

$$M_v = \log C_t / N_t \quad (1)$$

ここで、 $C_t$  : コントロール  $t$  時間後の感染価、 $N_t$  : オゾン  $t$  時間後の感染価である。

#### 2. 1 オゾン水試験

オゾン水生成器 (マクセル社製 *MXZW-WM100J*、放電方式) を用いて、濃度が約 0.2 mg/L (4.2  $\mu$ M) のオゾン水 (水道水原料) を生成した。試験は室温 23°C $\pm$ 5°Cで実施した。オゾン水 190  $\mu$ L とウイルス液 10

μL を混合し 30 秒および 60 秒まで反応させたところ、 $1.49 \times 10^6$  PFU/mL であったウイルス量が、30 秒後に  $2.75 \times 10^3$  PFU/mL、60 秒後には検出限界値以下の  $2.00 \times 10^2$  PFU/mL 以下まで減少した。このときのウイルスの減少率はそれぞれ 99.79% および 99.98% であり、対応する  $ct$  (mg·min/L) は 0.1 および 0.2 であった。2 つのデータを内挿して 3 log の不活化を達成する  $ct$  は 0.13 と算定した。演者らの関連論文<sup>9)</sup>では、同ウイルスのオゾン水不活化結果を他の報告論文結果も含めて検討しており、これらのデータを踏まえて、以下の解析におけるオゾン水の  $ct$  範囲は 0.1 - 1.0 を用いることとした。

## 2. 2 オゾンガス試験

オゾンガス発生器 (マクセル社製 *MXAP-AE270*) をボックス内に設置し、濃度を 0.05 ppmv となるように制御した。試験中の容器内環境は  $23 \pm 5^\circ\text{C}$  および湿度  $60 \pm 5\%$  の範囲とした。濃度  $5.25 \times 10^6$  PFU/mL のウイルス懸濁液 20 μL を内径 52 mm φ のシャーレ内に展開し、一定時間静置し乾燥させたものを試験片とし、ボックス内に所定時間 (12 時間から 24 時間) 静置してオゾンに曝露させたところ、 $5.25 \times 10^6$  PFU/mL であった新型コロナウイルス量が、12、16 および 24 時間後には検出限界値以下の  $1.00 \times 10^2$  PFU/mL 以下まで減少した。このときのウイルスの減少率はいずれも 99.9% 以上であった。検出限界値以下のデータとゼロ点とを内挿して、3 log の不活化を達成する  $ct$  (ppmv·min) は 35 と算定した。図 1 に、本結果および他の報告論文<sup>20)</sup>のオゾンガスによる不活化特性を示したが、試験方法による  $ct$  値の違いが確認された。同等手法に基づいて報告されている論文データからは、3 log の不活化を達成する  $ct$  として 282 が算定された。これらのデータを踏まえて、以下の解析におけるオゾンガスの  $ct$  範囲は 30 - 300 を用いることとした。

## 3. 結果と考察

3 log の不活性化のための  $ct$  値をモル単位に換算すると、水相では 0.125 - 1.25 mM s、気相では 0.073 - 0.733 mM s に相当し、同程度の値となることが示唆された。

### 3. 1 オゾン水

ウイルスの表面で酸化によりオゾンが消費されると、表面付近の溶液中の溶存オゾン濃度が減少し、溶液バルクからの拡散により不足分を補う。オゾンとの反応速度は非常に速く、オゾンの拡散が律速段階であると想定される。 $t$  における拡散層の厚さは、水中のオゾンの拡散係数  $D_w$  に対して  $(D_w t)^{1/2}$  で与えられる。一方、1 つのウイルスが占める溶液の平均体積は  $200 \text{ mm}^3 / 1.5 \times 10^3 = (0.51 \text{ mm})^3$  である。半径  $0.25 (= 0.51/2) \text{ mm}$  は、 $t = 30$  秒、 $D_w = 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  の場合の  $(D_w t)^{1/2} = 0.17 \text{ mm}$  よりも大きい。したがって、ウイルス周辺でのオゾンの拡散は、他のウイルスとは独立していると考えられる。図 2(A) に示すように、ウイルスの球体表面でオゾンが独立して消費されるということは、球体座標系では定常状態で拡散が起きていることを示している。拡散による速度  $M$  (mol/s) は次のように与えられる<sup>7)</sup>。

$$M = 4\pi c D_w r v \quad (2)$$

ここで、 $r$  はウイルスの半径、 $c$  はオゾンのバルク濃度である。Fig.1(A) は球形のウイルスに到達するオゾ

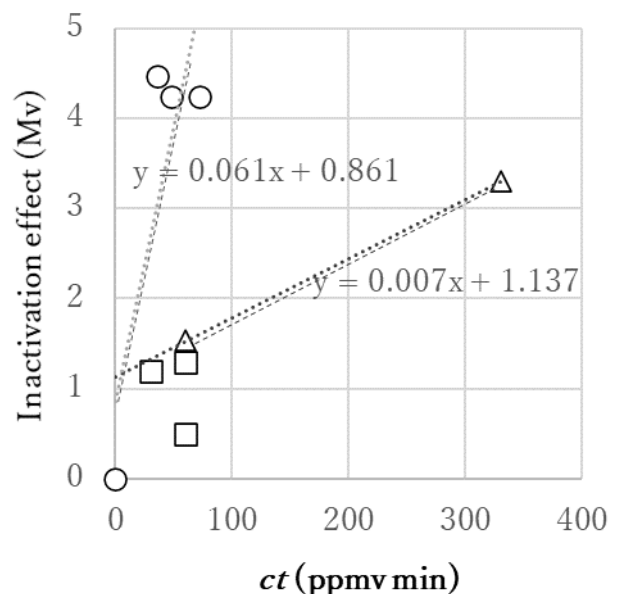


Figure 1. オゾンガスによる SARS-CoV-2 の Mv 減衰挙動 (○:文献 3、△:文献 2、□:文献 6)

ンの挙動を示すモデルであるが、 $ct = 0.125 - 1.25 \text{ mM s}$  でウイルスが不活化されるまでに、 $4\pi cD_{wrot} = 8 \times 10^{-14} - 8 \times 10^{-13} \text{ mol} = 4.7 \times 10^{10} - 4.7 \times 10^{11}$  個が到達すると算定された。

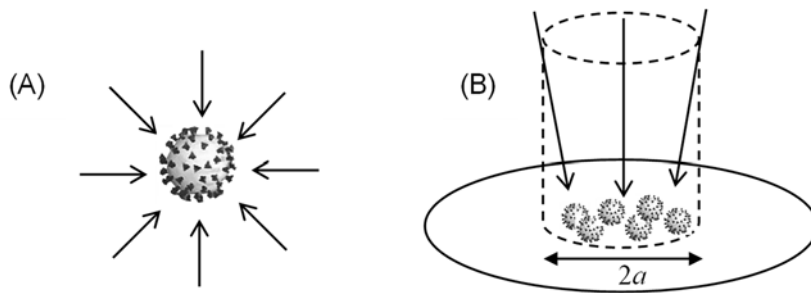


Figure 2. SARS-CoV-2 へのオゾン拡散モデル(A)水相試験における微小球体拡散および(B)気相試験における円筒拡散

### 3. 2 オゾンガス

内径 52 mmφ シャーレ上のウイルス展開面積 (21.2 cm<sup>2</sup>) は、各ウイルスの表面積の和の面積 (1×10<sup>5</sup> PFU×4πr<sup>2</sup>=3.1×10<sup>5</sup> cm<sup>2</sup>) の 6.8×10<sup>5</sup> 倍になる。隣り合うウイルスの平均距離は 90 μm となり、ウイルスの直径である 2r<sub>v</sub> (0.1 μm) よりもはるかに大きくなる。しかしながら、気相中のオゾンの拡散係数  $D_g = 2 \times 10^2 \text{ cm}^2/\text{s}$  に対して、10 秒後の拡散層の厚さは 4.5 mm、100 秒後の拡散層の厚さは 14 mm となり、1つのウイルスの周りの拡散層は重なっていることになる。この重なり合った層を 1つの拡散層とみなし、図 2(B)に示すように、乾燥したウイルスの集合体に向かって拡散が起こるようになる。集合体を半径  $a$  (=26 mm) の円盤と仮定し、オゾンの拡散を円盤に向かっての定常的な円筒形の拡散とみなすと、拡散による速度  $M$  は次のように与えられる<sup>8)</sup>。

$$M = 4cD_g a \quad (3)$$

$ct$  (30・300 ppmv・min) = 0.073・0.733 mM s を式 (3) に挿入すると、 $4cD_g at = 1.6 \times 10^{-5} - 1.6 \times 10^{-4} \text{ mol} = 9.4 \times 10^{18} - 9.4 \times 10^{19}$  個となり、1つのウイルスに対しては  $8.7 \times 10^{13} - 8.7 \times 10^{14}$  個の非常に多くのオゾン分子がウイルスまで到達しうることが算定された。しかしながら、水相における到達分子数  $4.7 \times 10^{10} - 4.7 \times 10^{11}$  個に比較して 200・20,000 倍も大きいにも関わらず、気相で同程度の  $ct$  しか得られないことは、拡散モデル以外の反応機構の寄与を考慮する必要性のあることを示唆した。

そのために、水相ではオゾンと水から生成するラジカルによる不活化プロセスがウイルス近傍で容易に進行する一方、気相では生成するラジカルが拡散し到達すべきオゾンを分解し、大部分のオゾンがウイルスと離れた領域で消失する機構モデルを提案した。オゾン、ラジカルとウイルスの距離に対するそれぞれの濃度分布の解析した結果を図 3 に示したが、このモデルにより効率の違いを半定量的に説明できる。

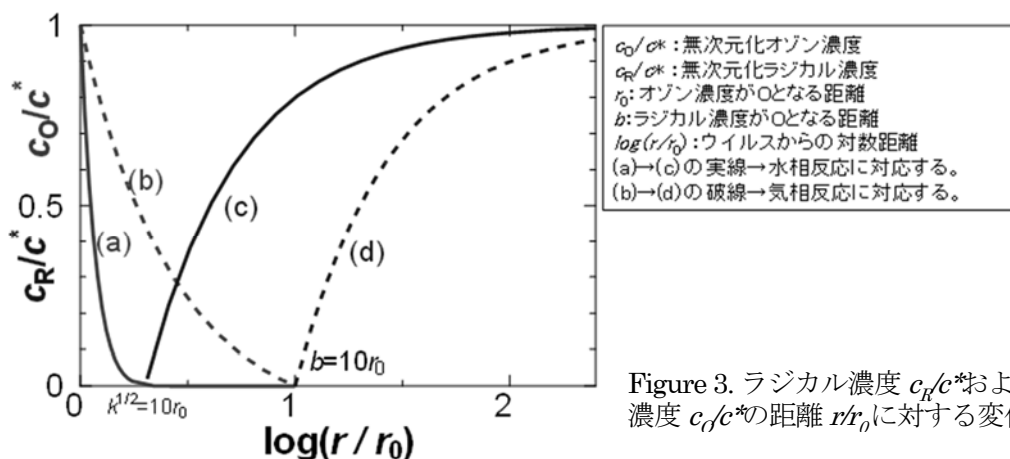


Figure 3. ラジカル濃度  $c_R/c^*$  およびオゾン濃度  $c_O/c^*$  の距離  $r/r_0$  に対する変化の模式図

#### 4. 謝辞

本研究を行うにあたり、SARS-CoV-2に対するオゾンの不活化効果の実証を行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する。本研究の一部は、日本医療・環境オゾン学会 環境応用部会/オゾン水研究会の支援を受けて行われた。ここに謝意を表す。

#### 5. 参考文献

1. Al-Sayah H. M. 2020. "Chemical disinfectants of COVID-19: an overview." *J. Water Health*, 18(5): 843-848.
2. Yano, K., R. Nakano, Y. Suzuki, A. Nakano, K. Kasahara, H. Hosoi. 2020. "Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by gaseous ozone treatment." *J. Hosp. Infect.*, 106: 837-838. doi.org/10.1016/j.jhin.2020.10.004
3. Maxell Holdings, Ltd. 2020. "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." News Release October 15.
4. Maxell Holdings, Ltd. 2020. "Confirmation of the coronavirus (SARS-CoV-2) inactivation effect of low concentration ozone gas generated by Maxell's ozone generator. Implementation of second cooperative investigation with Nara Medical University." News Release October 27.
5. Nakamuro K., Naitou H., Nishiki Y., Nakata H., Kanai M., and Hirotsuji J. 2022. "Quantitative evaluation of the inactivation effect of ozonated water on SARS-CoV-2 based on corrected CT values", *Ozone, Science & Engineering*, 44 (2):1-9
6. Murata T., S. Komoto, S. Iwahori, J. Sasaki, H. Nisitsuji, T. Hasebe, K. Hoshinaga, Y. Yuzawa. 2021. "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. Crank, J. 1975. "The Mathematics of Diffusion." Clarendon Press, Oxford 2<sup>nd</sup> Ed., 89.
8. Saito, Y. 1968. "A theoretical study on the diffusion current at the stationary electrodes of circular and narrow band types." *Rev. Polarogr.*, 15: 177-187.