

【ノート】

低濃度オゾン水による新型インフルエンザウイルスの不活化効果の評価法

中室 克彦^{1*}, 中田 英夫², 市川 和寛²,
小阪 教由³, 山崎 謙治⁴

Inactivation of the 2009 Pandemic Influenza Virus
by Low-Level Dissolved Ozone

Katsuhiko NAKAMURO^{1*}, Hideo NAKADA², Kazuhiro ICHIKAWA²,
Noriyoshi KOSAKA³ and Kenji YAMAZAKI⁴

¹ Faculty of Science and Engineering, Setsunan University,
17-8 Ikeda-Nakamachi, Neyagawa, Osaka 572-8508, Japan

² Ebara Jitsugyo Co., Ltd. 7-14-1, Ginza, Chiyoda-ku, Tokyo 104-8174, Japan

³ Hamanetsu Corporation, 2-11-5, Shinyohohama, Kouhoku-ku, Yokohama 222-0033, Japan

⁴ Department of Virus Research, Osaka Prefectural Institute of Public Health,
1-3-69, Nahamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

We investigated the inactivation efficacy of low-level dissolved ozone against the A type virus and 2009 pandemic influenza virus, and the effect of ozonated choliallantoic fluid on the inactivation efficacy against these viruses.

A type influenza virus was inactivated to 5 log₁₀ within 10 seconds of exposure to the initial dissolved ozone concentration of 0.35mg/l. The 2009 Pandemic influenza virus was inactivated to the 3 log₁₀ level by 0.76mg/l dissolved ozone water within 10 seconds of exposure. The by-product of choliallantoic fluid and dissolved ozone showed no inactivation effect against these viruses. It was considered that the inactivation of these viruses were simply and rapidly evaluated by our procedure.

(Accepted 24 April 2012)

Key words : Seasonal Influenza-virus (季節性 (A型) インフルエンザウイルス)/2009 Pandemic Influenza-virus (新型インフルエンザウイルス)/Low-level dissolved ozone (低濃度オゾン水)/Inactivation efficacy (不活化効果).

1. 目的

オゾンは非常に強い酸化作用があり、ウイルスや原虫を含む種々の微生物に対する有効な消毒効果を持ち^{1,2)}、多くの国で飲料水の殺菌に用いられている²⁾。オゾンによるウイルス不活化効果が

初めて報告されたのは1953年のことであり³⁾、インフルエンザウイルスを用いて行われたものであった。しかし、インフルエンザウイルスは飛沫による感染が主たる経路であり、糞便中に排泄されることもないことから、水中のインフルエンザウイルスはほとんど存在しないか、または問題とはさ

¹ 摂南大学理工学部 〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町17番8号 ☎072-839-8084

² 荏原実業㈱計測器・医療本部 〒104-8174 東京都中央区銀座7-14-1

³ ㈱ハマネツ オゾン営業部 〒222-0033 神奈川県横浜市港北区新横浜2-11-5 川浅ビル5F

⁴ 大阪府立公衆衛生研究所感染症部 〒537-0025 大阪市東成区中道1丁目3番69号

0385-5201/2012/0810-0485 \$02.00/0© 2012 Soc. Antibact. Antifung. Agents, Jpn.

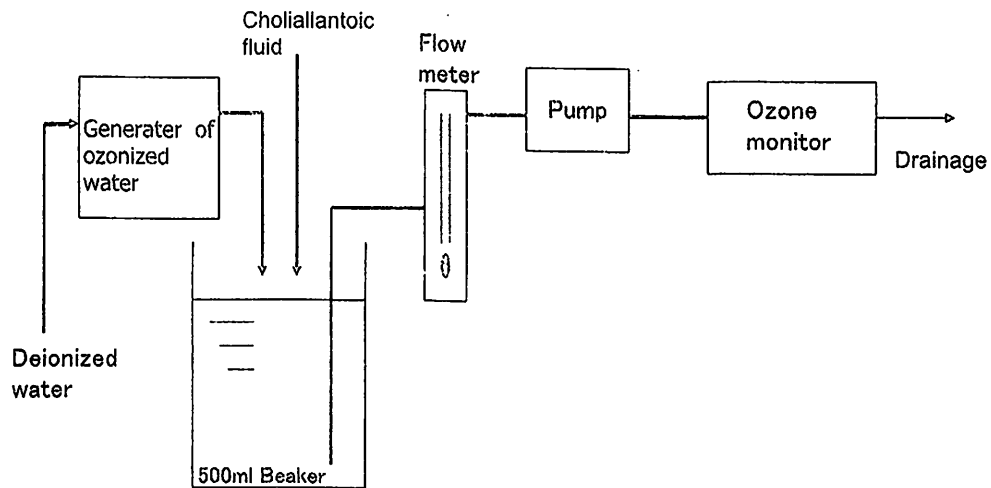


Fig.1. Flow of the ozone decay experiment

れてこなかった。だが、2009年にメキシコで新型（2009-Pandemic）インフルエンザが出現し⁵⁾、5月には神戸市、大阪府の中学・高校生の間で新型インフルエンザウイルスが鼻腔ぬぐい液から検出され⁵⁾、一大パニックを引き起こした。国内の新型インフルエンザウイルス感染者の10~20%が下痢症状を示し⁵⁾、さらにヒトの糞便⁶⁾および下水流入水中から新型インフルエンザウイルス検出例が報告された⁷⁾。そのため、新型インフルエンザウイルスはヒトに対して水系感染する可能性を示唆することが考えられ、改めてインフルエンザウイルスの水系感染が公衆衛生上注目されるようになった^{6,7)}。

ところで、オゾンは強力な酸化力を有するため、様々な物質と容易に反応するとともに、自己分解による減衰も想定される。そのため、オゾンによる微生物やウイルスに対する殺菌・不活化を検討する場合には、オゾンの初期濃度と接触時間だけでなく、実際に対象ウイルスと接触しているオゾン濃度の経時変化を把握しておく必要がある。特にウイルスに対する不活化効果を正確に評価するには、ウイルス液中に共存するタンパク質をはじめとする有機物質がオゾンを消費することが考えられるため、ウイルスの増殖に用いるしょう尿液によるオゾン消費を把握することが必要である。

本研究においては、繁用されている低濃度オゾ

ン水のA型および新型インフルエンザウイルスに対する不活化効果を簡便にかつ、正確で迅速に評価するために、ウイルス液に含まれるしょう尿液がオゾン濃度に与える影響について検討するとともに、低濃度オゾン水によるA型および新型インフルエンザウイルスに対する不活化効果について検討を行った結果を報告する。

2. 試験方法

2.1. しょう尿液によるオゾン消費実験

オゾン水は精製水を原料水とし、電解式オゾン水生成器（荏原実業㈱製）により生成した。生成したオゾン水（水温24℃）は、500ml ビーカーに標線以上になるよう採取し、溶存オゾン濃度は紫外線吸収式オゾンモニタ（型式：EG/EL-550, 荏原実業㈱製）に通水しながら500ml になった時点で溶存オゾン濃度を測定し初期濃度とした。水量が500ml になった時点で速やかに14~15日卵の受精鶏卵のしょう尿液¹⁾を注入し攪拌後、溶存オゾン濃度の経時変化を測定した。ここで用いたオゾン消費実験フローを Fig.1 に示した。

溶存オゾン濃度測定に用いる紫外線吸収式オゾンモニタは、オゾン以外に紫外線領域に吸収を持つ物質が共存する場合には、オゾン以外の吸収分を補正值として差し引く必要がある。そこで本実

験では、原料水である精製水に実際にウイルス培養で使用するしょう尿液を一定量添加した水を対照水とし、このときの読みとり値を記録し、実測値からこの対照水の値を差し引いて溶存オゾン濃度を算出した。

1) 溶存オゾン濃度の減衰曲線

溶存オゾン初期濃度 1 mg/ml および 3 mg/l のオゾン水500ml に対してしょう尿液0.5ml をそれぞれ添加し、オゾンモニタで溶存オゾン濃度の経時変化を測定した。

2) しょう尿液の添加時の溶存オゾン濃度の減衰曲線

溶存オゾン初期濃度3.6mg/l のオゾン水500ml に対し、しょう尿液の混合比を 1 : 1000 および 1 : 100 とするため、注入するしょう尿液を 0.5 ml および 5 ml 添加し、しょう尿液の添加時の溶存オゾン濃度の減衰曲線を測定した。

2.2. 使用ウイルス

1) A型(季節性)インフルエンザウイルス(H1N1, New Caledonia) : 国立感染症研究所より分与されたものを用いた。

2) 新型インフルエンザウイルス(H1pdm09, A/Osaka/2042) : 大阪府立公衆衛生研究所で分離した株を用いた。

2.3. ウイルス液の調製⁹⁾

11~12日卵の受精鶏卵のしょう尿膜内にウイルス液0.1ml を接種し、36°Cで3日間増殖させた後、しょう尿液を採取し、これをウイルス液として用いた。

2.4. 低濃度オゾン水によるインフルエンザウイルスの不活化試験

A型インフルエンザウイルスおよび新型インフルエンザウイルスの両ウイルスは孵化鶏卵で増殖させ、そのしょう尿液を用いた。ウイルス液とオゾン水の混合比については、1 : 1000 および 1 : 100 の混合比に関する予備実験の結果から 1 : 1000 とした。

1) 低濃度オゾン水によるウイルス不活化試験

オゾン水は蒸留水(和光純薬製 pH 6.1)を

原水とし電解式オゾン水生成器を用いて生成した。オゾン水を蒸留水で5~50倍程度希釈し、1lのビーカーに入れ、マグネチックスターラーで攪拌を行い、オゾンモニタ(型式EG/EL-550(荏原実業(株)製)に通水(100ml/分)しながら溶存オゾン濃度を室温で測定した。オゾン水600mlをビーカーに入れ、スターラーで攪拌しながら、オゾン初期濃度を測定した。オゾン水が500mlになった時点で各ウイルス液0.5mlを加え攪拌し、10, 30秒, 1分ごとに反応液2mlを取り、1Nチオ硫酸ナトリウム水溶液0.2mlを加えた試験管に入れオゾンを消去した。その後、イーグル液を用いて10倍階段希釈を行い、感染価の測定を行った。ウイルスの対照として蒸留水500mlに各ウイルス液0.5mlを加え攪拌し、1分後に反応液2mlを取り、イーグル液で10倍階段希釈を行い、感染価の測定を行った。また、この時吸光度のゼロ点補正のためにバックグラウンドの吸光度を測定した。

2) オゾン反応生成物によるウイルス不活化試験

試験は室温において行った。0.99mg/lオゾン水500mlをビーカーに入れ、供試ウイルス液0.5mlを加え攪拌し30秒間放置した(残存オゾン量0.42mg/l)後、1Nチオ硫酸ナトリウム水溶液10mlを加えオゾンを消去した。その後、供試ウイルス液0.5mlをさらに加え、1分間放置した。この反応液にイーグル液を加えて10倍階段希釈を行い、感染価の測定を行った。ウイルス対照として蒸留水500mlに供試ウイルス液0.5mlを加え攪拌し、1分間放置した。同様に反応液をイーグル液で10倍階段希釈を行い、感染価の測定を行った。

3) 感染価の測定

感染価の測定はマイクロ法⁹⁾を用いて行った。すなわち、MDCK細胞を増殖させた96穴のマイクロプレートを用意し、このプレートの培地を捨て、ついで、オゾン・ウイルス混合液を原液として、 10^{-5} まで10倍階段希釈したウイルス反応液0.05mlずつ各希釈あて20ウェルに入れた。次に、34°Cで1時間吸着させた後、イーグル液0.1mlで細胞を洗浄し、維持培地(トリプシンを加えたイーグル液)を加え、34°Cで5~7日間

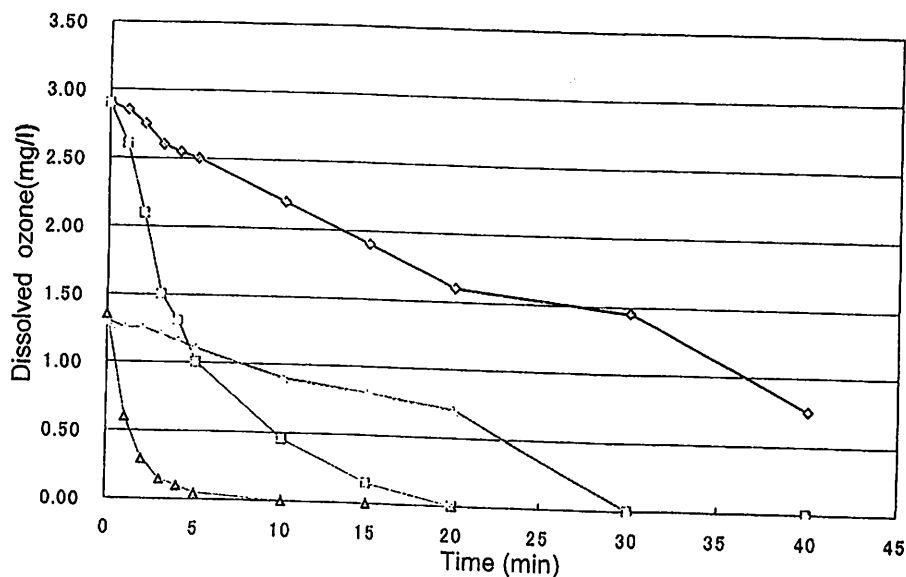


Fig. 2. Time course of ozone decay in the presence of choriallantoic fluid

◇ : 2.9 O₃ mg/l. □ : 2.9 O₃ mg/l + choriallantoic fluid,
 △ : 1.3 O₃ mg/l. ▽ : 1.3 O₃ mg/l + choriallantoic fluid

静置後、細胞変性の出現を指標として Behrens-Kalber 法により⁹⁾ウイルス感染価 (TCID₅₀/50 μl) を求めた。

3. 試験結果

3.1. 溶存オゾン濃度の減衰曲線に及ぼすしょう尿添加の影響

溶存オゾン初期濃度 1 mg/l および 3 mg/l のオゾン水 500 ml に対してしょう尿の無添加及び添加 (0.5 ml) 時における溶存オゾン濃度の経時変化を測定し、それぞれの溶存オゾン減衰曲線を Fig. 2 に示した。しょう尿を添加しない時には、いずれの濃度においても半減期が約 20 分であったが、しょう尿が共存すると、有機物が存在しないオゾン水と比較してオゾンの残存率は、初期濃度 1 mg/l および 3 mg/l ではいずれも減衰が速く、それぞれ 5 分あるいは 20 分後には 0 mg/l となった。これらの事実からしょう尿が共存することによって、溶存オゾンの初期濃度が低いほど短時間でオゾンの残存濃度が低下することが明確になった。しかし、溶存オゾン初期濃度 3.6 mg/l のオゾン水 500 ml に対し、注入するし

う尿量を 5 ml で行い、混合比を 1 : 1000 から 1 : 100 に変更した結果、しょう尿、注入後 20 秒以内に急激な濃度変化を示しオゾン濃度が 0 mg/l となった。

以上の結果から、インフルエンザウイルスを使用した本実験では残留するオゾンの不活化効果を検討するために適切と考えられるしょう尿とオゾン水の混合比をオゾン減衰の緩やかな 1 : 1000 として試験を実施することとした。

オゾン水の減衰を測定する場合には、溶存オゾン初期濃度、共存物質の量と溶存オゾンとの反応性、水温、pH 等を考慮し、予備的な試験を行い、ウイルスなどの対象物と反応する溶存オゾン量を把握しておくことが必要であることが考えられた。

3.2. 低濃度オゾン水のインフルエンザウイルスに対する不活化

低濃度オゾン水によるウイルス不活化実験結果を Table 1, 2 に示す。A 型インフルエンザウイルスは初期濃度 0.9 mg/l から 0.46 mg/l に減衰する 10 秒以内の間に検出限界以下 (5 log₁₀ 以下) まで減少した。また、オゾン初期濃度が 0.35 mg/l から 0.1 mg/l に減衰する 10 秒以内の間に 5

Table 1. Inactivating effects of dissolved ozone against A type influenza virus

	Time (sec)	Dissolved ozone (mg/l)	Tissue culture infectious dose (TCID ₅₀ /ml)	Rate of decline (%)
Run 1	0	0.9	2.0E+05	
	10	0.46	3.0E+01	99.9998
	30	0.4	3.0E+01	99.9998
	60	N.D	N.D	99.9999
Run 2	0	0.35	2.0E+05	
	10	0.1	1.0E+00	99.9995
	30	0.1	1.0E+00	99.9995
	60	0.1	1.0E+00	99.9995

Table 2. Inactivating effects of dissolved ozone against the 2009 pandemic influenza virus

	Time (sec)	Dissolved ozone (mg/l)	Tissue culture infectious dose (TCID ₅₀ /ml)	Rate of decline (%)
Run 1	0	1	3.2E+03	
	10	0.66	3.0E+01	99.99
	30	0.56	3.0E+01	99.99
	60	N.D	N.D	99.9999
Run 2	0	0.76	3.2E+03	
	10	0.39	0.0E+00	99.99
	30	0.35	0.0E+00	99.99
	60	N.D	N.D	99.9999
Run 3	0	0.34	3.2E+03	
	10	0.22	1.0E+03	68.7
	30	0.22	5.0E+02	84.3
	60	0.29	5.0E+02	84.3

Table 3. Inactivating effects of dissolved ozone against the 2009 pandemic influenza virus (Tissue culture infectious dose (TCID₅₀/ml))

Virus	Ozonated choliallantoic fluid	Distilled water
Seasonal (A type) influenza virus	1.3E+04	1.6E+04
2009 Pandemic influenza virus	4.0E+03	2.0E+03

log₁₀に減少したが、1分後においても完全には不活化されなかった。新型インフルエンザウイルスはオゾン初期濃度が1.0mg/lから0.66mg/lに減衰する10秒以内の間およびオゾン初期濃度が0.76mg/lから0.39mg/lに減衰する10秒以内の間に検出限界以下(3 log₁₀以下)まで減少した。またオゾン初期濃度0.34mg/lから0.22mg/lに減衰する30秒以内の間に1 log₁₀減少したが、さらに1分後においてもそれ以上不活化は示されなかった。

溶存オゾンとしょう尿液中有機物成分との反応生成物がインフルエンザウイルスの不活化に影響

を及ぼすか否かを検討するために、オゾン反応生成物によるウイルス不活化実験を行った結果を表3に示した。A型インフルエンザウイルス、新型インフルエンザウイルスともに、1 mg/mlの溶存オゾンと蛋白質との反応により生成されることが考えられるオゾン反応生成物による影響は認められなかった。

4. 考察

低濃度オゾン水によるウイルス不活化は様々なウイルスを用いて評価されているが、大半は糞便

中に排泄されるウイルスを対象としておりインフルエンザウイルスについての評価はほとんどなされていない。アデノウイルス40型はウイルス感染価を $4 \log_{10}$ 減少させるオゾンの CT 値は 0.07 mg/l/min であり、 $5 \log_{10}$ 減少させる CT 値は 0.6 mg/l/min であった⁹⁾と報告されている。A型肝炎ウイルスは $5 \log_{10}$ 減少させるのに 1 mg/l オゾン水、1分以内の曝露が必要であることが報告されている¹⁰⁾。オゾン水による不活化効果はいずれも初期濃度が、ロタウイルスでは 0.25 mg/l ¹¹⁾、ポリオウイルス1型では 0.13 mg/l であり¹²⁾、いずれも速やかに不活化されている。新型インフルエンザウイルスは、 0.5 mg/l および 1 mg/l のオゾン水を10分間曝露することによって不活化効果のあること¹³⁾が報告されている。

本研究では比較的低濃度のオゾン水を用いた。A型インフルエンザウイルスについては、初期オゾン濃度 0.9 mg/l で10秒後（10秒後のオゾン濃度： 0.46 mg/l ）には完全に不活化された。初期オゾン濃度 0.35 mg/l では10秒後（10秒後のオゾン濃度： 0.1 mg/l ）には、およそ $1/100,000$ に低下したが、60秒後でも完全には不活化されないことを示した。新型インフルエンザウイルスは、初期オゾン濃度 0.76 mg/l で10秒後（10秒後のオゾン濃度： 0.39 mg/l ）には完全に不活化され、また、初期オゾン濃度 $0.47 \sim 0.34 \text{ mg/l}$ では10秒後（10秒後のオゾン濃度： $0.22 \sim 0 \text{ mg/l}$ ）に、およそ $1/10 \sim 1/1,000$ に減少したが、60秒後でも完全には不活化されないことが認められた。

本研究に用いたウイルスにはふ化鶏卵のしょう尿成分としておよそ10%のタンパク質が含まれている（最終タンパク質濃度0.01%）ことから、これがオゾンを速やかに消費し、Fig.2に示すように、特に溶存オゾン初期濃度が低いほどオゾン減衰率が高いことから、低濃度オゾン水を用いる場合には実験の再現性に影響することが考えられた。ウイルス液に汚染物としてタンパク成分を加えて行う不活化試験のガイドライン¹⁴⁾も報告されており、また現実の応用では純水を用いることはあり得ないので、しょう尿液を含む本実験条件は、オゾン消費は認められるが、ウイルス不活化成分を生成しないことから、より現実的であると

考えられた。本研究のように0.01%程度のタンパク質を含む溶液中において溶存オゾン初期濃度 0.5 mg/l 以下では新型インフルエンザウイルスは完全には不活化されないが、溶存オゾン初期濃度 0.8 mg/l 以上あれば10秒以内に不活化されることが考えられた。また、オゾンの不活化効果は新型インフルエンザウイルスに対して、A型インフルエンザウイルスよりやや耐性を示す傾向を認めた。これら耐性の違いを示す理由は明らかではない。

糞便⁹⁾あるいは下水¹¹⁾からインフルエンザウイルスが検出された報告から、水道水への汚染の可能性が考えられるため、エアロゾルの経気道吸入によって感染するレジオネラ症¹⁵⁾と同様にインフルエンザの経気道感染が全く起こらないとは言いきれない。しかし、水道経由の水系感染の可能性は、水道の浄水過程に導入されているオゾン処理（ 1 mg/l 、 $10 \sim 20$ 分処理）で十分不活化出来ているものとする。

インフルエンザウイルスによる接触感染や飛沫核感染を防止するためには、オゾン水による手洗い^{16,17)}やオゾン水によるうがい^{18,19)}を励行すれば、インフルエンザの予防に繋がるのが考えられる。低濃度オゾン水の手洗いおよびうがいの利用は公衆衛生学的に意義あるものとする。

また、オゾン消費を示すしょう尿液を除去せずに行った今回の方法によって、オゾン水のインフルエンザ不活化効果を簡便、迅速に評価しうることを認めた。

謝辞

本研究は、日本医療・環境オゾン研究会オゾン水研究会会員企業（株）IHI シバウラ、（株）アイ電子工業、エコデザイン（株）、荏原実業（株）、京浜産業（株）、三洋アクア（株）、神鋼テクノ（株）、（株）トーア電子、（株）ハマネツ、ベルメレック電極（株）の委託研究費によって実施した。ここに謝意を表する。

引用文献

- 1) Sobsey MD. : Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Wat. Sci. Technol.*, 21 : 179-195,

- 1989.
- 2) Arbuckle TE, Hrudey SE, Krasner SW, Nuckols JR, Richardson SD, Singer P, Mendola P, Dodds L, Weisel C, Ashley DL, Froese KL, Pegram RA, Schultz IR, Reif J, Bachand AM, Benoit FM, Lynberg M, Poole C, Waller K. : Assessing exposure in epidemiologic studies to disinfection by-products in drinking water : report from an international workshop. *Environ Health Perspect*, 110 Suppl 1 : 53-60, 2002.
 - 3) Smorodintseva OA : Experimental data on application of chloridation of air in influenza. *Tr Akad Med Nauk Sssr Mosc Inst Grudn Khir*, 28 : 231-241, 1953.
 - 4) Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM. : Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*, 360 : 2605-2615, 2009.
 - 5) 感染症情報センターまとめ.
 - 6) 後藤則子 : 便および髄液検体からのインフルエンザウイルス AH1pdm の分離および抗原検出, *感染症学雑誌*, 86 (1) 34-37 (2012).
 - 7) 藤原隆司, 小宮義人, 小越真佐司 : 下水中における新型インフルエンザウイルスの存在状況調査, 第44回水環境学会年会講演集, 福岡, 2010.
 - 8) 国立予防衛生研究所学友会編, ウイルス実験学総論, p113-129, p260-274, p479-481, 丸善株式会社 (1981).
 - 9) Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Gerba CP. : Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Res*. 39 : 3650-3656. 2005.
 - 10) Vaughn JM, Chen YS, Novotny JF, Strout D. : Effects of ozone treatment on the infectivity of hepatitis A virus. *Can J Microbiol*, 36 : 557-560, 1990.
 - 11) Vaughn JM, Chen YS, Lindburg K, Morales D. : Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. *Appl Environ Microbiol*, 53 : 2218-2221, 1987.
 - 12) Herbold K, Flehmig B, Botzenhart K. : Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicator organisms. *Appl Environ Microbiol*, 55 : 2949-2953, 1989.
 - 13) Lénès D, Deboosere N, Ménard-Szczebara F, Jossent J, Alexandre V, Machinal C, Vialette M. : Assessment of the removal and inactivation of influenza viruses H5N1 and H1N1 by drinking water treatment. *Water Res*, 44 : 2473-2486, 2010.
 - 14) Rabenan, F. H., Rapp, I. and Steinmann, J., Can vaccinia virus be replaced by MVA virus for testing virucidal activity of chemical disinfectants?, *BMC Infectious Diseases*, 10, 185-192 (2010).
 - 15) 杉山順一, レジオネラ症のリスクマネジメント, *防菌防微*, 38 (3) 181-188 (2010).
 - 16) 赤堀幸男, 村上篤司, 星 昭二, 森 啓, オゾン水の殺菌効果と院内感染予防への応用, *日集中医誌*, 7, 3-10 (2000).
 - 17) 佐野 正, 植田昭仁, 荒川 武, 村上吉男, 岩田厚司, NICU の手洗いにおけるオゾン水の有効性, *日本未熟児新生児学会雑誌*, 9 (3), 136.
 - 18) Satomura K, Kitamura T, Kawamura T, Shimbo T, Watanabe M, Kamei M, Takano Y, Tamakoshi A, Prevention of upper respiratory tract infections by gargling: a randomized trial. *Am J Prev Med.*, 29 (4) : 302-7 (2005).
 - 19) 鉄見雅弘, 長田 武, 中室克彦, 市川和寛, オゾン水によるうがいに関する基礎的研究, *日本医療・環境オゾン研究会第17回研究講演会要旨集*, p14-21 (2012).