

## インフルエンザウィルスのオゾンガスによる不活化

## Inactivation of Influenza Virus by Ozone Gas

田 中 浩 技術開発本部総合開発センター化学システム開発部 技術士(上下水道部門)  
 櫻 井 美 栄 技術開発本部総合開発センター化学システム開発部 主査 博士(工学)  
 石 井 浩 介 技術開発本部総合開発センター化学システム開発部 主査 博士(理学)  
 松 澤 克 明 技術開発本部総合開発センター化学システム開発部 課長 博士(工学)

オゾンガスを利用して、室内の壁や床に付着・乾燥したインフルエンザウィルスを不活化する場合の有効性を検証するため、プラスチックおよびガラス担体にウィルスを付着・固定し、オゾンガス曝露試験を行った。オゾンガス濃度 10 ppm では 3.5 時間で 99.99% 以上、20 ppm では 2.5 時間で 99.999% 不活化できることが確認された。一方、オゾンガスに曝露させなかった場合は、10 時間経過後も高い感染力価を保っていた。以上の結果から、オゾンガス曝露がインフルエンザウィルス不活化に有効であることが示された。

More than 99.99% of influenza A virus particles attached to a plastic carrier were inactivated by exposure to 10 ppm (V/V) - ozone gas for 210 min at 23 to 29°C and a relative humidity of 64 to 65%. When the virus was exposed to 20 ppm (V/V) - ozone gas for 150 min, more than 99.999% was inactivated. In contrast, the virus remained active after 10 hours under similar conditions without ozone gas. These data suggest that office disinfection against influenza viruses might be accomplished by ozone gas fumigation during night-time hours.

## 1. 緒 言

近年、毒性の強い鳥インフルエンザの人への感染が確認され、2009 年は豚由来の新型インフルエンザが世界的に流行するなど、病原性の高いインフルエンザウィルスによるパンデミックが懸念されている。その感染予防のため、さまざまなウィルス不活化(感染力の消失)方法が研究されている。そのなかでもオゾンガスによる不活化は最も有望な方法の一つである。

オゾンガスの有効性は多くの文献で立証されている。神力らは、1 400 ppm のオゾンガスを用いて殺菌試験を行い、*Bacillus* 属細菌の孢子不活化に効果があったと報告している<sup>(1)</sup>。中村らはオゾンガス濃度を 5 ~ 400 ppm まで変化させ、MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)、大腸菌、緑膿菌、結核菌、クロコウジカビの不活化を行っている<sup>(2)</sup>。ウィルスについては、Murray らはオゾン濃度 800 ~ 1 500 ppm の条件でインフルエンザウィルスのほか、ヘルペスウィルス、ワクシニアウィルス、アデノウィルス、水疱性口内炎ウィルスを不活化し、そのメカニズムからオゾンが広範囲のウィルスに有効であることを示している<sup>(3)</sup>。

これらの研究例では数百 ppm 程度またはそれ以上の濃度のオゾンガスを用いることが多いが、長時間オゾンガス

に曝<sup>さら</sup>されると劣化する材質があるので、高濃度オゾンガスの適用には注意が必要である。

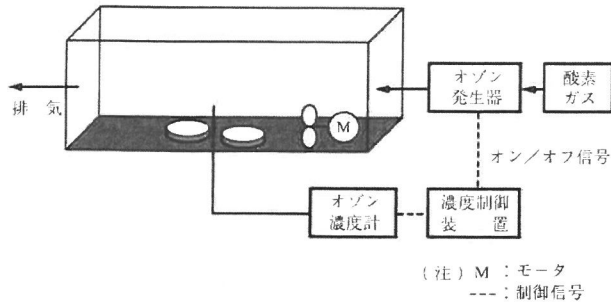
インフルエンザ予防のためには、各感染経路に適した対応が必要となる。インフルエンザの感染経路の一つに、くしゃみなどの飛沫に含まれるウィルスによって感染する飛沫感染があり、飛沫の飛散を防ぐためにマスク着用などが推奨されている<sup>(4)</sup>。一方で手や物質に付着したウィルスから感染する接触感染については、ウィルスが空気中に飛散しにくいので空気清浄機によるろ過や室外への排除が困難であることに加え、24 時間経過した付着インフルエンザウィルスに感染力が確認された例もあり<sup>(5)</sup>、効果的な感染抑制対策が求められている。

そこで、本研究ではオフィスなどの居住空間が無人となっている夜間などの時間帯を利用して、数十 ppm 程度の低濃度オゾンガスを使って燻蒸することを想定し、担体に付着・固定したインフルエンザウィルスのオゾンガス曝露試験を行い、その有効性を検証した。

## 2. 試験方法

## 2.1 試験装置

オゾンを一定の濃度に保つため、第 1 図のような試験装置を用いた。透明な塩化ビニル板で外部から仕切られた容積 160 l の装置内に、オゾン発生器を通過した酸素ガス



第1図 装置の概略図  
Fig. 1 Schematic of test apparatus

を 4 l/min の一定流量で導入した。装置内は、内部に設置したファンを常時回転させて攪拌し、つねに均質な状態となるようにした。装置内のオゾン濃度は、オゾン濃度計で測定し、オゾン発生器のオン/オフ制御によって、装置内のオゾン濃度を一定に保持した。

## 2.2 試験条件

実際のインフルエンザウィルスの不活化は一般的な居住環境下で実施されることが想定されるため、室温 23 ~ 29°C、相対湿度 64 ~ 65% の条件で試験を実施した。オゾン濃度は、10 ppm および 20 ppm の 2 条件とした。インフルエンザウィルスがオゾン曝露と関係なく感染力を失う可能性を考慮し、オゾン発生器を作動させずに酸素ガスのみを使った同様の試験も併せて実施した。

## 2.3 ウィルスの操作

各担体の上に既知の感染力をもつインフルエンザウィルス A/PR/8/34 (H1N1) の溶液を 0.1 ml 滴下し、マイクロピペット用チップを用いて担体全面にウィルス液を広げた後、20 分程度放置して乾燥・固定した。第2図にインフルエンザウィルスを付着・固定した様子を示す。インフルエンザウィルス付着担体として、プラスチック (φ60 mm, ポリスチレン) およびガラス (φ60 mm) 製のシャーレをそれぞれ使用した。



第2図 インフルエンザウィルスを付着・固定した様子  
Fig. 2 Immobilization of virus particles

複数個のインフルエンザウィルス付着担体をオゾン濃度一定で制御された装置内に静置し、試験を開始した。試験開始から所定の時間経過後、インフルエンザウィルス付着担体を一つずつ取り出して、直ちに滅菌水で表面を洗い流してウィルスを回収した。この回収液について感染力価を定量した。

## 2.4 感染力価の測定

インフルエンザウィルス感染力価の測定は、10 倍ずつ段階希釈したウィルス液を MDCK 細胞 (Madin-Darby Canine Kidney cell: イヌ腎臓由来上皮細胞) に感染させ、それらを複数の培養瓶で培養後、顕微鏡で細胞変性効果を観察することによって行った。感染力価は、Reed-Muench 法<sup>(6),(7)</sup>を用いて TCID<sub>50</sub> (培養瓶の半数に細胞変性効果が現れるときのウィルス稀釈倍数) の値として表した。

## 3. 結果と考察

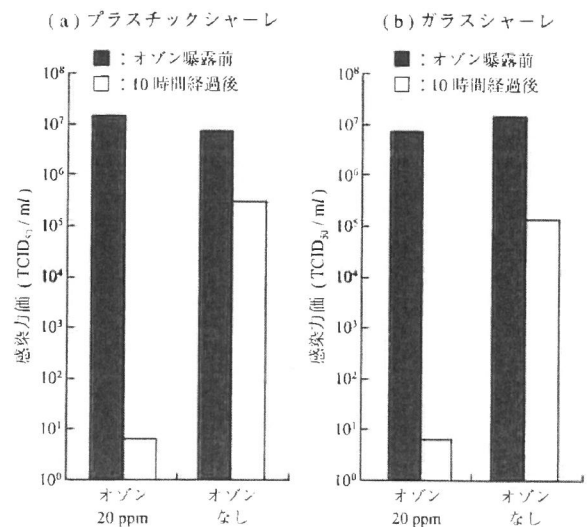
### 3.1 オゾン 10 時間曝露による感染力価の変化

まず、オゾン濃度 20 ppm または 0 ppm で 10 時間曝露する試験を実施した。プラスチックシャーレ、ガラスシャーレを使用した場合のインフルエンザウィルス不活化効果を第3図に示す。乾燥状態のウィルスは、シャーレの材質によらず 99.9999% 以上不活化されていることが分かる。

一方、オゾンなしの場合は 10 時間経過後においても 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml 以上の感染力価を保っていた。

### 3.2 オゾン濃度および曝露時間の影響

プラスチックシャーレをインフルエンザウィルス付着担体として、オゾン濃度を変化させたときの感染力価の経



第3図 担体に付着・乾燥させたインフルエンザウィルスの不活化  
Fig. 3 Inactivation of influenza virus attached to carrier surfaces

時変化を第4図に示す。オゾンガスによって、特に不活化の初期段階における感染力価の対数的な減少が確認された。

オゾン濃度 20 ppm の場合は、初期の感染力価  $1.4 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml であったが、150 分後には  $6.3 \times 10^0$  TCID<sub>50</sub>/ml となり、99.999%減少した。10 ppm の場合は、初期の感染力価  $2.0 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml で、210 分後には  $7.2 \times 10^1$  TCID<sub>50</sub>/ml となり、99.996%の減少と、いずれも 99.99%以上のインフルエンザウイルスが不活化された。

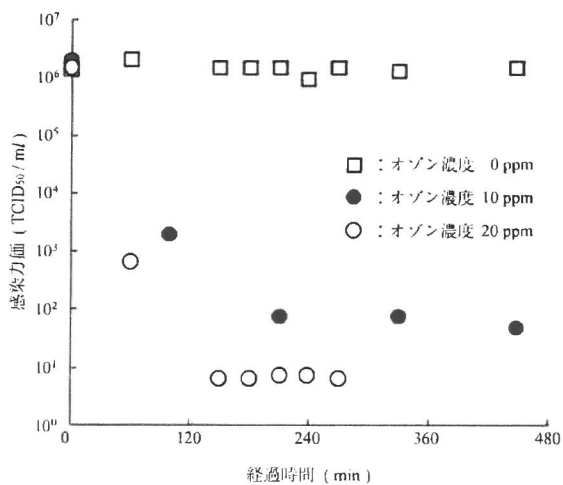
低濃度オゾンガスを数時間放出することによって、インフルエンザウイルスの感染力を大幅に低減できることが示された。

### 3.3 CT 値と不活化効果の関係

オゾンによる微生物やウイルスの不活化効果は、一般に CT 値 (Concentration-Time Value) で評価される<sup>(8)</sup>。CT 値とは、不活化に効果のある物質の濃度と曝露時間の積であり、これが一定であれば、不活化効果は同じであるという考えに基づく指標である。第4図の結果のうち、感染力価の変化が見られる時間帯における感染力価と CT 値との関係を第5図に示す。

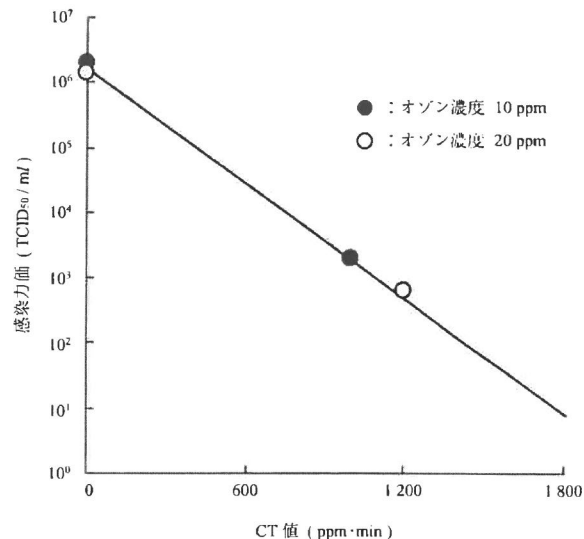
オゾンガス濃度 20 ppm の場合における経過時間 60 分までの感染力価と、濃度 10 ppm における 100 分までの感染力価は、同一線上に並んだ。すなわち、オゾンによるインフルエンザウイルス不活化の評価において、CT 値の指標が使用できる可能性が示唆された。

以上の試験結果から、オゾンガスを使うことでプラス



第4図 オゾン濃度を変化させたときのインフルエンザウイルス感染力価の経時変化

Fig. 4 Time course of influenza virus inactivation at different concentrations of ozone gas



第5図 インフルエンザウイルスの感染力価とオゾンガス曝露における CT 値の関係

Fig. 5 Relationship between inactivation efficiency and CT value of ozone gas

チックおよびガラスに付着したインフルエンザウイルスが大幅に不活化されることが明らかとなった。

## 4. 結 言

比較的低濃度のオゾンガスを利用して、室内の壁や床に付着・乾燥したインフルエンザウイルスを不活化する場合の有効性を検証するため、プラスチックおよびガラス担体にウイルスを付着・固定し、容積 160 l の装置内においてオゾンガス曝露試験を行った。オゾン濃度一定でインフルエンザウイルスの感染力価の低減効果を定量した結果、以下のことが明らかとなった。

- (1) オゾンガスの濃度が 0 ppm の条件において、担体に付着・乾燥したインフルエンザウイルスは 10 時間経過後においても高い感染力価を保持していた。
- (2) オゾン濃度 10 ~ 20 ppm の条件において、インフルエンザウイルスの感染力は時間の経過とともに対数的に減少した。オゾンガス濃度 20 ppm の条件で、2.5 時間燻蒸したとき、インフルエンザウイルスは 99.999%不活化された。また、オゾンガス濃度 10 ppm の場合は、3.5 時間の燻蒸で 99.99%以上不活化された。
- (3) オゾンガスによるインフルエンザウイルスの不活化効果の指標として、CT 値が適用可能であることが示唆された。

— 謝 辞 —

本試験の実施に当たり、財団法人北里環境科学センターの梶岡実雄博士、野島康弘博士に支援頂きました。ここに記し、深く感謝の意を表します。

参 考 文 献

- (1) 神力就子, 石崎紘三, 横田祐司, 池畑 昭 : ガス状オゾンによる *Bacillus* 属細菌胞子の殺菌 北海道工業開発試験所報告 第40号 1986年3月 pp. 69 - 75
- (2) 中村八寿雄, 高木博司, 釜瀬幸広, 橋本光洋, 榛葉紀久雄 : オゾンガスによる消毒効果とリネン材への適用検討 日本環境感染学会誌 第23巻第4号 2008年10月 pp. 273 - 279
- (3) B. K. Murray, S. Ohmine, D. P. Tomer, K. J. Jensen, F. B. Johnson, J. J. Kirsli, R. A. Robison and K. L. O'Neill : Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species Journal of Virological Methods Vol. 153 (2008) pp. 74 - 77
- (4) 厚生労働省 : 新型インフルエンザ対策本部基本的対処方針 2009年5月22日
- (5) B. Bean, B. M. Moore, B. Sterner, L. R. Peterson, D. N. Gerding and H. H. Balfour Jr. : Survival of influenza viruses on environmental surfaces The Journal of Infectious Diseases Vol. 146 No. 1 (1982) pp. 47 - 51
- (6) L. J. Reed and H. Muench : A simple method of estimating fifty per cent endpoints Journal of Hygiene Vol. 27 No. 3 (1938) pp. 493 - 497
- (7) 高田賢蔵編集 : 医科ウイルス学 改訂第3版 2009年 p. 180
- (8) B. S. Oh, H. Y. Jang, Y. J. Jung and J. W. Kang : Microfiltration of MS2 bacteriophage : Effect of ozone on membrane fouling Journal of Membrane Science Vol. 306 (2007) pp. 244 - 252