

超微細高密度オゾン水による殺ウイルス効果試験

白井淳資^{1, 2)†}松村栄治³⁾萩原信子³⁾

1) (独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所海外病研究施設

(〒187-0022 小平市上水本町6-20-1)

2) 東京農工大学大学院共生科学技術院農学部 (〒183-8509 府中市幸町3-5-8)

3) (株)ネイチャーズ (〒154-0011 世田谷区上馬3-18-11-305)

(2007年2月22日受付・2007年6月27日受理)

要 約

超微細高密度オゾン水を用いて、エンベロープを有する4種類のウイルスおよび口蹄疫ウイルス (FMDV) と豚水疱病ウイルス (SVDV) に対する殺ウイルス効果を調べた。本オゾン水は完全な効果を示すために最低100ml (4mg/l) を要したが、混合直後に殺ウイルス効果を示した。エンベロープを有するウイルスおよびFMDVに対しては1mg/lのオゾン濃度で効果を示したが、SVDVに対しては3mg/lを要し、有機物を混入した材料ではさらに1mg/l高い濃度4mg/lが必要であった。生成後室温に開栓状態で放置したオゾン水はエンベロープを有するウイルスおよびFMDVに対し生成60分後でも効果を示したが、SVDVには効果が減弱した。このように本オゾン水は低濃度で即効性があるので、ウイルスの消毒に有効に利用できると思われる。——キーワード：家畜ウイルス、消毒、超微細高密度オゾン水。

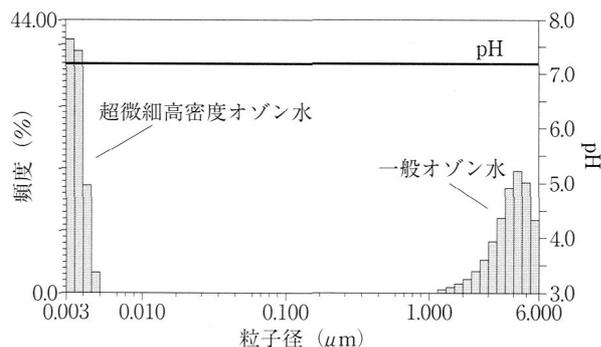
日獣会誌 61, 233～239 (2008)

口蹄疫 (FMD) や高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) 等の重要家畜伝染病の発生・蔓延は、食の安全に対する社会的不安を起し国内の消費を低迷させ、わが国の畜産業に大打撃を与えかねない大変な脅威である。FMDやHPAI等の国内浸入防止は検疫により厳重に監視されているが、浸入した場合は早期発見と早期対応によって被害を最小限に止めなければならない。しかし、発生当初からこれらの疾病を特定することは難しく、ある程度蔓延した時点で発見される場合が多い。したがって、個々の畜舎の衛生管理を常に徹底し、また家畜の集まる家畜市場や食肉・食鳥処理場等での徹底した衛生管理はこれら疾病の蔓延を防止する重要な手段である。そのためには、病原体の浸入防止や殺菌のための徹底した消毒作業が必須となる。しかし、一般の消毒薬を用いた消毒作業の繰り返しは、作業者に多大な労力を課し、また健康に悪影響を及ぼすとともに、多量の消毒薬を使用することによる環境汚染等の問題がある。しかしこれらを解決する技術は開発されていない [1]。オゾン水はオゾン (O₃) が溶け込んだもので、強い酸化力により各種細菌、ウイルスおよび原虫に対し効果を示すとされており、また分解が早く水と酸素になるので環境への汚染もない [2, 3]。そこで、オゾン水生成装置を畜産現場や家畜市

場、食肉・食鳥処理場に設置し、オゾン水を日常の水洗感覚で使用すれば衛生管理を簡便に行うことができる。この作業は労力も少なく作業員への危険性もないものと考えられる。また、オゾン水は短時間のうちに水に戻るため環境汚染がなく、徹底した消毒作業が可能となる。しかし、従来のオゾン水と称されるものは電解法もしくは気液混合法により生成されている。電解法は水に電解補助剤である食塩や塩化カリウムを加えて、電流を流し化学反応によりオゾン水を生成する方法である。しかし実際生成される水は次亜塩素酸ソーダを含むpHが2.2～2.7の強酸性水であり、ある程度の殺菌力は有するものの、安全性と金属への腐食性および残留の面では問題がある [4, 5]。気液混合法は溶存オゾン濃度が最高4mg/l程度で、オゾンガスが十分に水に溶け込まないため、すぐ水に復帰してしまい、効力が低いか皆無である [4]。われわれは磁力によりオゾンのできるかぎり微細な気泡に分散し、繰り返し注入する超微細気液濃縮混合法を開発し、超微細高密度のオゾン水を得られるようにした (特許第3850027号：家畜消毒方法および家畜消毒装置)。このオゾン水のpHは中性を示し純度が高く15mg/lの高濃度のオゾン水を1時間以内に1t以上生成することが可能な技術である。このオゾン水は図1に示

† 連絡責任者：白井淳資 (東京農工大学大学院農学部獣医学科獣医伝染病学講座)

〒183-8509 府中市幸町3-5-8 ☎ FAX 042-367-5780 E-mail : jshirai@cc.tuat.ac.jp



溶存オゾンガス気泡粒径分布 計測：動的光散乱光度計

図1 超微細高密度オゾン水の性状：本実験に使用された超微細高密度オゾン水は一般に市販されているオゾン水生成装置から生成されたオゾン水に比べ、直径約50nm以下の遙かに微細なオゾンガス粒子が水に溶け込んだものである。

すとおりに一般に生成されたオゾン水に比べ溶存オゾンガスの粒径が直径50nm以下である。この超微細高密度オゾン水を用いて数種類の家畜ウイルスに対し、どの程度の消毒効果を示すのかを調べたので報告する。

材料および方法

ウイルス：実験に、エンベロープのない小型球形ウイルスとして、FMDウイルス (FMDV) Asia1型 Shamir株 [6] およびO型 O/JPN/2000株 [7]、消毒薬等に対して強い抵抗性を示す豚水疱病ウイルス (SVDV) J1株 [7] を、またエンベロープを有するウイルスとして豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) h株 [8]、水胞性口炎ウイルス (VSV) New Jersey株 [9]、オーエスキー病ウイルス (ADV) 山形株 [10] および豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) EDRD株 [11] および Lelystad株 [12] を用いた。PRRSV以外のウイルスは豚腎由来細胞株SK-L [7] で継代されたものを、PRRSVはアカゲザル腎由来細胞株MARK145 [13] で継代されたものを用いた。

適正オゾン水量調整試験：超微細高密度オゾン水生成装置 (ネイチャーズシステム NSNI 2002 および NSN120003, ネイチャーズ株, 東京) を用いてオゾン水を生成した。実験に使用するオゾン水量を決定するために、オゾン濃度を7mg/lに設定したオゾン水1l, 500ml, 100ml および40mlと、SVDV, TGEV, VSV およびADVを0.5ml混合し、室温で15分間反応させた後、混合液中のウイルスをただちに10%血清を含む培地で10倍階段希釈を行い感染価を測定した。対照として、100mlの滅菌蒸留水と0.5mlのSVDV, TGEV, VSV およびADVを混合したもの、40mlの滅菌蒸留水と0.5mlのSVDV およびADVを混合したものをそれぞれ15分間室温に置き、混合液中の感染価を試験群と同

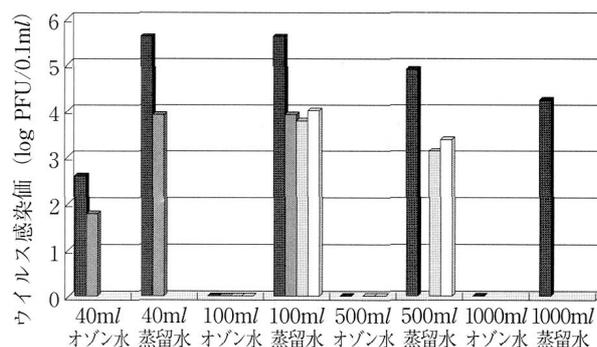


図2 オゾン水の実験使用量と各種ウイルスに対する効果

実験に使用するオゾン水の量を決定するために行ったもので、オゾン濃度は7mg/lとした。■ SVDV：豚水疱病ウイルス、■ ADV：オーエスキー病ウイルス、■ TGEV：豚伝染性胃腸炎ウイルス、□ VSV：水胞性口炎ウイルス

様に測定した。

オゾン水効果時間測定試験：オゾン水が殺ウイルス効果を示す時間を調べるために、オゾン濃度を7mg/lに設定し、オゾン水100mlとVSV 0.5mlを混合し、混合直後、10秒後、30秒後、1分後、5分後および10分後に、10%血清を含む培地でただちに希釈を行い、オゾンの効果を止め、それぞれのウイルス感染価を測定した。対照として滅菌蒸留水100mlに0.5mlのウイルス液を混合し10分後に同様に感染価を測定した。

有効オゾン濃度測定試験：オゾン濃度と殺ウイルス効果の関係性を調べるために、濃度を1, 2, 3および4mg/lに設定したオゾン水100mlとウイルス液0.5mlを混合し、そのウイルス感染価を測定した。ウイルスはTGEV, VSV およびSVDVについては血清を含まないものと10%血清を含む材料を、PRRSVについては8%および24%血清を含む材料を、FMDVは2%血清を含む2株のウイルスを使用した。ウイルス感染価は混合直後と10秒後のオゾン水100ml中のウイルス混合液を10%血清を含む培地でただちに希釈し、オゾンの効果を止めて感染価を測定した。対照としてすべての実験において100mlの滅菌蒸留水に0.5mlのウイルス液を混合し15分後に、混合液中の感染価を測定した。

生成後一定時間放置したオゾン水の殺ウイルス効果：濃度5mg/lに設定したオゾン水に生成直後、30分後、60分後および120分後に0.5mlのウイルス液を混合し、その直後にウイルス感染価を測定した。この試験ではTGEV, VSV およびSVDVは血清を含まないものと10%血清を含む材料として行い、FMDVは2%血清を含む2株のウイルスについて行った。対照として100mlの滅菌蒸留水に0.5mlのウイルス液を混合し、120分後に混合液中の感染価を測定した。

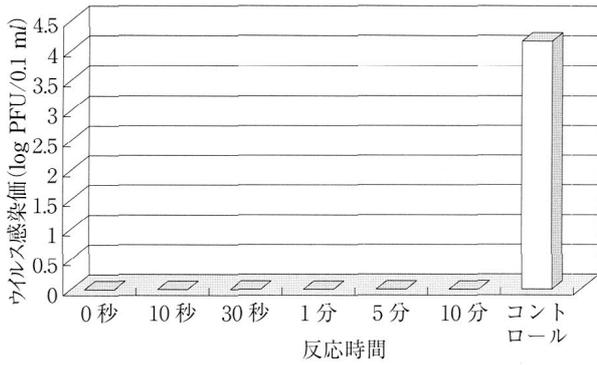


図3 オゾン水のVSVに対する作用時間
 オゾン濃度7mg/lのオゾン水100mlと0.5mlのウイルス材料を混合し経時的にウイルス感染価を測定した。

成 績

適正オゾン水量調整試験：実験に使用するオゾン水量を決定するために行った本試験結果を図2に示す。オゾン濃度を7mg/lに設定したさまざまな量のオゾン水と0.5mlの各種ウイルスと混合し、それらのウイルス感染価を調べた結果、オゾン水量を1l～100mlまでは、試験に用いた4種類のウイルスすべてに対し効果を示した。しかしオゾン水量を40mlにしたところ、SVDVおよびADVでオゾン水は殺ウイルス効果を示さず混合液中にウイルス感染価が認められた。この結果から、以後の試験にはオゾン水量を100mlとし、0.5mlのウイルス液と反応させることとした。

オゾン水効果時間測定試験：オゾン水が殺ウイルス効果を示すまでの時間を調べたところ、オゾン水と混合直後(0秒)ですでに効果を示した(図3)。この結果から以後の試験はウイルス液と混合直後および10秒後のサンプルのウイルス感染価を測定することとした。

有効オゾン濃度測定試験：オゾン水中のオゾン濃度と殺ウイルス効果の関係を調べた結果を図4に示す。エンベロープを有するTGEVに対してオゾン水は1mg/lでも効果を示したが、10%子牛血清を含むウイルス材料に対しては2mg/l濃度が有効であると思われた。エンベロープを有するVSVの場合も同様の結果を示した。エンベロープを有しないSVDVではオゾン水のオゾン濃度が最低2mg/l必要で、完全な殺ウイルス作用は血清を含まないウイルス材料でも3mg/lの濃度が必要であった。10%子牛血清を含む材料では3mg/lの濃度でも感染性が残存し、完全な殺ウイルス効果を得るには4mg/lのオゾン濃度が必要であった。FMDVは2種類の株を用いて2%の子牛血清を含む材料で行ったが、オゾン水は1mg/lの濃度でも両株のウイルスに対して効果を示した。2種類のPRRSVを用いた場合、培地に8%および24%子牛血清を含んでいるにもかかわらず、エンベロープを有するウイルスの結果と同様に2mg/l

と低いオゾン濃度で完全な殺ウイルス効果が得られた。

生成後放置したオゾン水の殺ウイルス効果：オゾン濃度5mg/lに設定し生成後室温に開栓状態で放置したオゾン水にウイルス材料を混合し、その殺ウイルス作用を調べた結果を図5に示す。60分放置後のオゾン水でもエンベロープを有するTGEVの場合は血清を含まないウイルス材料の場合感染性は完全に消失し、10%子牛血清を含む材料でも1/1,000以下に低下した。同じエンベロープを有するVSVの場合も同様の結果を示した。FMDVの試験では60分放置後のオゾン水が2株のFMDVに対し明らかな効果を示した。しかしFMDVと同じエンベロープを有しないSVDVでは血清を含まないウイルス材料でも60分放置後のオゾン水により感染価は1/10,000までは低下したが、完全な殺ウイルス効果は示さなかった。10%子牛血清を含むSVDVの材料では30分放置後のオゾン水で感染価が約1/10,000に低下したが、完全な殺ウイルス効果は得られなかった。

考 察

オゾン水は強い酸化力を示すオゾンの微細な気泡が溶け込んだものである。今回実験に使用した超微細高密度オゾン水は図1に示すように気泡の粒径が50nm以下の超微細粒子で、今までオゾン水として使用されていたものとはオゾン気泡の粒径がかなり小さい。オゾンによる各種病原体に対する消毒試験は今までも行われており、各種細菌に対する効果はもちろんのこと [2, 3]、人免疫不全ウイルス [14]、猿および人のロタウイルス [15]、ノロウイルス [16]、ポリオウイルスおよびA型肝炎ウイルス [17, 18]、ベネズエラ馬脳炎ウイルス [19]、アデノウイルスおよび猫カリシウイルス [20]、およびインフルエンザウイルス [21] 等に効果を示すことが報告されている。しかし、各実験におけるオゾンの有効濃度は実験ごとに大きく異なっており [14-21]、実際の程度のオゾン濃度で、殺ウイルス効果を示し消毒が可能か明らかにされていない。従来の実験では今回用いたような超微細なオゾンガス気泡の溶け込んだ超微細高密度オゾン水を用いた実験ではなく、またオゾン濃度の測定法もまちまちであったため正しい評価ができなかったと思われる。今回の実験に用いたオゾン水生成装置には紫外線吸光法によるオゾン濃度測定器(EL-500型溶存オゾンモニター：ネイチャーズ(株)、東京)が装着されており、本機によって安定したオゾン濃度の測定が行われたと考えている。ただし、生成したオゾン水中のオゾン濃度を測定することは、オゾン水中に測定器を入れたり、オゾン水を他の容器に移すだけでオゾン濃度が著しく低下してしまい真のオゾン濃度測定が困難だったため、生成したオゾン水中のオゾン濃度を測定する実験の結果を示すことはできなかった。オゾン水がどのような殺ウイ

超微細高密度オゾン水による殺ウイルス効果試験

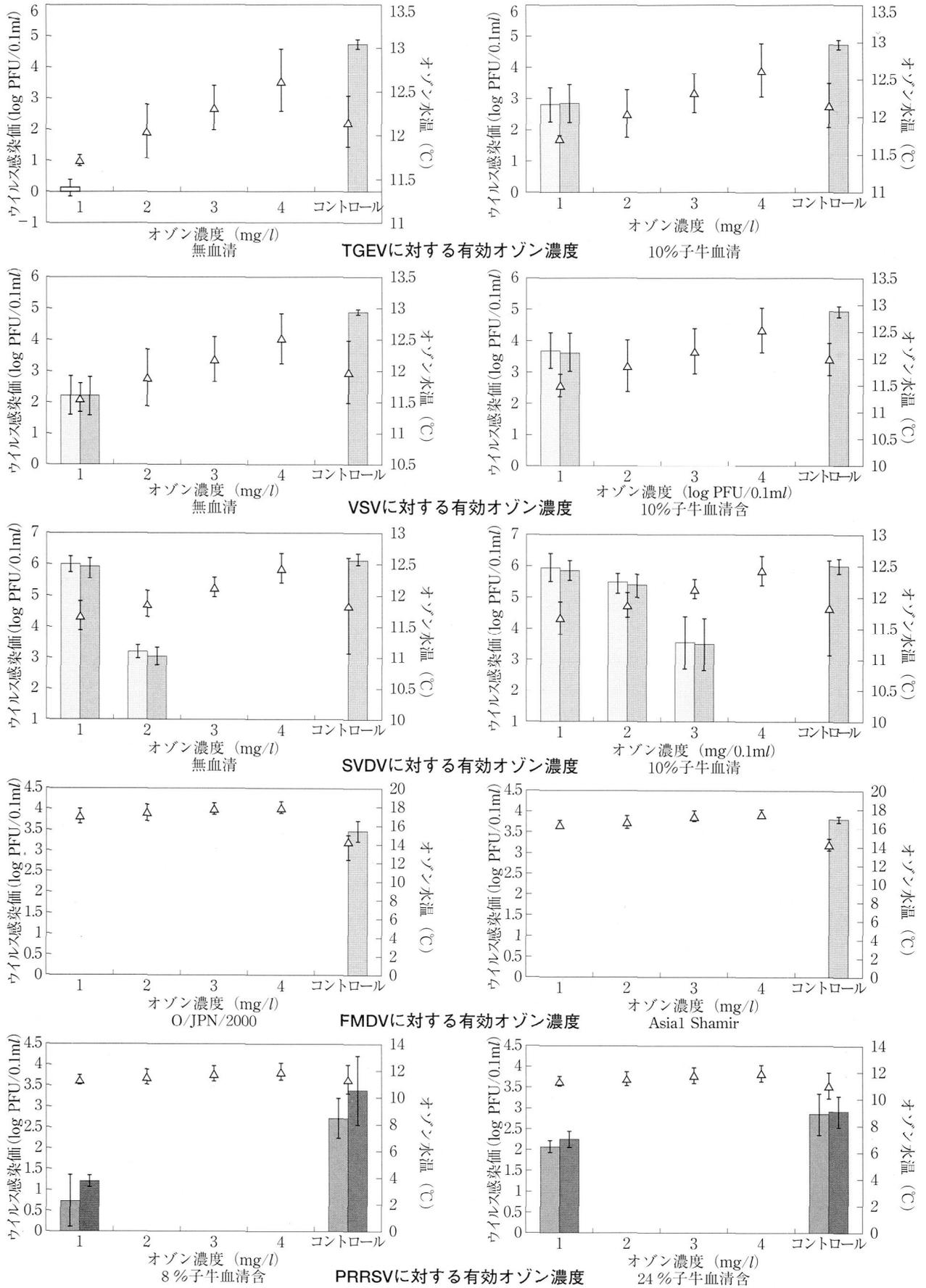


図4 各種ウイルスに対するオゾン水の有効濃度. オゾン水の量は100mlとし、ウイルス材料は0.5mlとした.

□ 0秒 ■ 10秒 △ 水温 (°C) ■ EDRD ■ LV

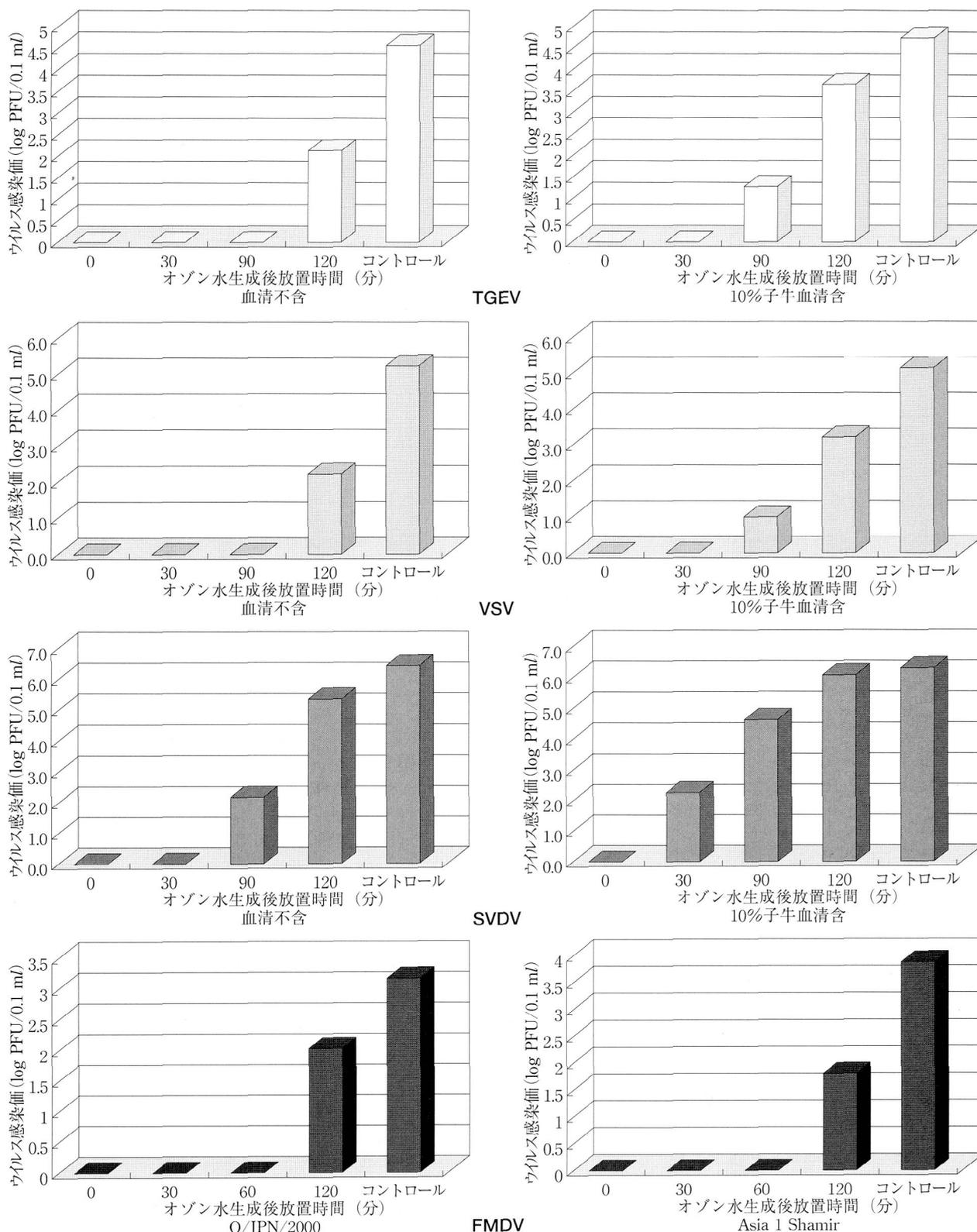


図5 オゾン水生成後放置時間の長さや殺ウイルス作用の関係オゾン濃度5mg/lに調整した100mlのオゾン水を開栓した状態で、室温(約20℃)に放置し、各時間経過後0.5mlのウイルス液を加え、攪拌してただちにウイルス感染価を測定した。

ルス作用機序を示すかについて、文献的にはウイルス核酸の破壊およびウイルス蛋白のポリペプチド鎖の変性によるものであるといわれている [2]。このことから、オゾン水がウイルスを完全に不活化する能力を有すること

は明白である。しかし今回の実験成績から、オゾン水は一般に用いられている消毒薬のように極少量で効果を示すもの [1] ではなく、効果を調べるには最低でも100mlの用量を要した。また、オゾン水の完全な殺ウイ

ルス作用を示すオゾン有効濃度の試験結果から、有機物を含む材料では有機物を含まない材料に比してさらに1mg/l高い濃度つまり4mg/lを必要とした。オゾン水は有機物の影響を受けやすく [3], 使用に関してはこのことを良く考慮して消毒を行うことが重要である。このようにオゾン水は一般の消毒薬と異なり、多くの水量が必要なこと、また有機物や容器の影響等も簡単に受けやすく、単純に液量中のオゾン濃度を換算した力価が殺ウイルス作用に結びつくものではない。しかし、超微細高密度オゾン水は生成後の安定性が高く、即効性があるため、水洗感覚で使用すれば効果的であることが推察された。超微細高密度オゾン水は強い殺ウイルス効果を示し、残留はなく安全で、また脱臭効果も強い [2, 3], 水洗を兼ねた畜舎の消毒にはとても有効な衛生対策手段であると思われる。ただし、今回実験で示したようにオゾン水が一般消毒薬とまったく性質が異なるものであることを考慮し使用することが望まれる。

引用文献

- [1] King LJ : History and future perspectives of the use of disinfectants in animal health. *Rev Sci Tech Off Int Epz*, 14, 41-46 (1995)
- [2] Kim JG, Yousef AE, Dave S : Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods : A review, *J Food Protect*, 62, 1071-1087 (1999)
- [3] Kim JG, Yousef AE, Khadre MA : Ozone and its current and future application in the food industry, *Adv Food Nutr Res*, 45, 168-216 (2003)
- [4] 杉光英俊 : オゾン発生装置, オゾンの基礎と応用, 109-136, 光琳, 東京 (2004)
- [5] 松尾昌樹 : 電解水の概要, 電解水の基礎と利用技術, 1-8, 技報堂出版, 東京 (2000)
- [6] Moss A, Haas B : Comparison of the plaque test and reverse transcription nested PCR for the detection of FMDV in nasal swabs and probang samples, *J Virol Methods*, 80, 59-67 (1999)
- [7] 白井淳資 : 口蹄疫ウイルスに対する市販消毒薬の効果, *日獣会誌*, 55, 575-579 (2002)
- [8] Honda E, Takahashi H, Okazaki K, Minetoma T, Kumagai T : The multiplication of transmissible gastroenteritis virus in several cell lines originated from porcine kidney and effects of trypsin on the growth of the viruses, *Jpn J Vet Sci*, 52, 217-224 (1990)
- [9] Shirai J, Kanno T, Tsuchiya Y, Mitsubayashi S, Seki R : Effects of chlorine, iodine, and quaternary ammonium compound disinfectants on several exotic disease viruses, *J Vet Med Sci*, 62, 85-92 (2000)
- [10] Yamada S, Nishimori T, Shimizu M : Characterization of pseudorabies viruses recently isolated in Japan by restriction endonuclease assay, *J Vet Med Sci*, 54, 541-549 (1992)
- [11] Murakami Y, Kato A, Tsuda T, Morozumi T, Sugimura T : Isolation and serological characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses from pigs with reproductive and respiratory disorders in Japan, *J Vet Med Sci*, 56, 891-894 (1994)
- [12] Pol JMA, Van Dijk JE, Wensvoort G, Terpstra C, Ter Laak EA, Bloemraad M, De Kluyver EP, Kragten C : Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym : porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)), *Vet Quart*, 13, 137-143 (1991)
- [13] Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, Frey ML : Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line, *Arch Virol*, 133, 477-483 (1993)
- [14] Wells KH, Latino J, Gavalchin J, Poiesz BJ : Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by ozone in vitro, *Blood*, 78, 1882-1890 (1991)
- [15] Vaughn JM, Chen YS, Lindburg K, Morales D : Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone, *Appl Environ Microbiol*, 53, 2218-2221 (1987)
- [16] Shin GA, Sobsey MD : Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water, *Appl Environ Microbiol*, 69, 3975-3978 (2003)
- [17] Emerson MA, Sproul OJ, Buck CE : Ozone inactivation of cell-associated viruses, *Appl Environ Microbiol*, 43, 603-608 (1982)
- [18] 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)
- [19] Akey DH, Walton TE : Liquid-phase study of ozone inactivation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus, *Appl Environ Microbiol*, 50, 882-886 (1985)
- [20] Thurston-Enriquez JA, Hass CN, Jacangelo J, Gerba CP : Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone, *Water Res*, 39, 3650-3656 (2005)
- [21] Wolcott JA, Zee YC, Osebold JW : Exposure to ozone reduces influenza disease severity and alters distribution of influenza viral antigens in murine, *Appl Environ Microbiol*, 44, 723-731 (1982)

Experimental Study of Disinfection for Animal Disease Viruses
Using Nano Pico Ozone Water

Junsuke SHIRAI*[†], Eiji MATSUMURA and Nobuko HAGIWARA

* Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, 183-8509, Japan

SUMMARY

Disinfection against four enveloped animal disease viruses and two non-enveloped viruses (foot-and-mouth disease virus (FMDV) and swine vesicular disease virus (SVDV)) using nano pico ozone water was studied. A clear disinfecting effect of this ozone water was observed with more than 100 ml in volume (4 mg/l), but the effect was observed immediately after mixing. The effective concentration against enveloped viruses and FMDV was 1 mg/l, but more than 3 mg/l was required for SVDV. The disinfecting effect of ozone water was influenced by organism contamination, but the disinfecting effect was continued 60 min after generation against enveloped viruses and FMDV. Nano pico ozone water could be used for disinfection against animal disease viruses, because of its effectiveness at low concentrations and immediate effect.

— Key words : Animal disease virus, disinfection, nano pico ozone water.

† Correspondence to : Junsuke SHIRAI (Laboratory of Epizootiology, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)
3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, 183-8509, Japan
TEL · FAX 042-367-5780 E-mail : jshirai@cc.tuat.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 61, 233 ~ 239 (2008)

日本獣医公衆衛生学会誌編集委員会委員

【編集委員】

◎山本 茂貴 (国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部長)
○高島 郁夫 (北海道大学大学院獣医学研究科教授)
金内 長司 (麻布大学名誉教授)
高島 浩介 (東京農業大学客員教授)
津田 修治 (岩手大学農学部教授)
明石 博臣 (東京大学大学院農学生命科学研究科教授)
今井 壯一 (日本獣医生命科学大学獣医学部教授)

梅村 孝司 (北海道大学大学院獣医学研究科教授)
月瀬 東 (日本大学生物資源科学部教授)
中市 統三 (山口大学農学部教授)
中澤 宗生 (動物衛生研究所疫学研究チーム長)
(◎委員長, ○副委員長)

編集発行人 日本獣医公衆衛生学会
会長 熊谷 進

『* 投稿を希望される方は、学会誌投稿規程 (第60巻第12号885頁) 及び三学会誌投稿の手引き (本誌242頁) をご参照ください』