

オゾン水効果の検証

目次

- ◆ オゾン水の各種病原微生物に対する殺菌効果の検討 2p～9p
- ◆ オゾン水によるウイルスの不活化効果の検討 10p～14p

平成28年 2月 4日

オゾン水の各種病原微生物に対する殺菌効果の検討

相模原市南区北里1-151-1
北里大学医学部皮膚科学
北里大学大学院医療系研究科皮膚科学
藤村響男

研究テーマ: オゾン水の各種病原微生物に対する殺菌効果の検討

試験実施責任者: 北里大学医学部皮膚科学、北里大学大学院医療系研究科環境皮膚科学、講師、藤村響男

試験実施施設: 北里大学医学部、病態・診療系内バイオセーフティレベル2実験施設

試験方法: 大腸菌および黄色ブドウ球菌はコロンビア寒天培地を用いて、サルモネラ菌はBHI寒天培地を用いて夫々37°Cで16時間培養した。アクネ菌は、ガム寒天培地で4日間嫌気培養、緑膿菌、エンテロコッカスおよびセラチアはHI寒天培地、赤痢菌はSS寒天培地、腸炎ビブリオ菌はESビブリオ寒天培地で夫々18時間好気培養した。リステリア菌は、HI寒天培地で48時間、エルシニア菌はSS寒天培地で30°C3日間培養した。ムータンス菌は、MS培地を用いて37°Cで48時間嫌気培養し、カンピロバクター菌はCCDA培地を用いて37°C2日間好気培養した。白癬菌は、BHI寒天培地に置いたナイトロセルロースペーパー上に接種し、30°Cで14日間培養した。

カンピロバクターと白癬菌を除く各菌は、PBSにて 1×10^8 cfu/mlに調整し、調整した各菌液0.1mlを9.9mlのオゾン水(ウォーターエージェンシー社製オゾン水生成器にて生成されたオゾン水濃度1.0mg/l 水温18~23°C)またはPBSに加え5秒間反応させた。(最終濃度: 1×10^5 cfu/ml)。カンピロバクターはPBSにて 2×10^5 cfu/mlに調整し、調整した各菌液0.1mlを9.9mlのオゾン水(ウォーターエージェンシー社製オゾン水生成器にて生成されたオゾン水濃度1.0mg/l水温18~23°C)またはPBSに加えて反応させた。(最終濃度: 1×10^4 cfu/ml)。

白癬菌は、PBSにて 5×10^6 cfu/mlおよび 5×10^5 cfu/mlに調整し、調整した各菌液0.1mlを9.9mlのオゾン水(ウォーターエージェンシー社製オゾン水生成器にて生成されたオゾン水濃度1.0mg/l水温18~23°C)またはPBSに加え5秒間反応させた(最終濃度: 1×10^4 cfu/mlおよび 1×10^3 cfu/ml)。

反応後PBSを用いて10段階希釈の後、各希釈液0.1mlを夫々の培地に塗布し、夫々に適した時間・温度で培養し、菌数を数えた。

使用菌株: *Escherichia coli* ATCC25922 (大腸菌)
Escherichia coli O-111 (病原大腸菌)
Staphylococcus aureus ATCC25923 (黄色ブドウ球菌)
Salmonella typhimurium (サルモネラ菌)
Propionibacterium acnes (アクネ菌)
Sigella flexneri (赤痢菌)
Vibrio Parahaemolyticus (腸炎ビブリオ菌)
Listeria monocytogenes EGD (リステリア菌)
Pseudomonas aeruginosa (緑膿菌)
Enterococcus faecalis (エンテロコッカス)
Staphylococcus epidermidis (表皮ブドウ球菌)
Serratia marcescens (セラチア菌)
Yersinia enterocolitica (エルシニア菌)
Campylobacter jejuni (カンピロバクター菌)
Streptococcus mutans (ムータンス菌)
Trichophyton rubrum (白癬菌)

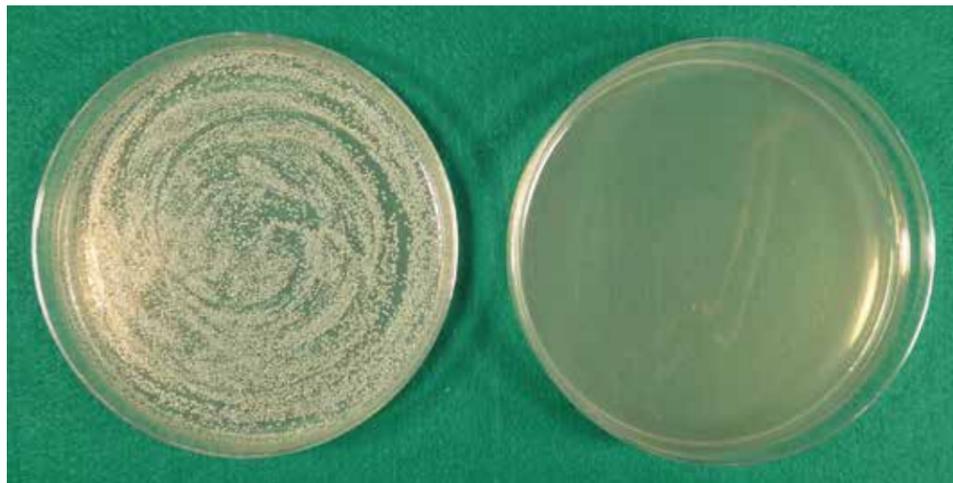
試験結果:

Escherichia coli ATCC25922 (大腸菌) 上
Escherichia coli O-111 (病原大腸菌) 下



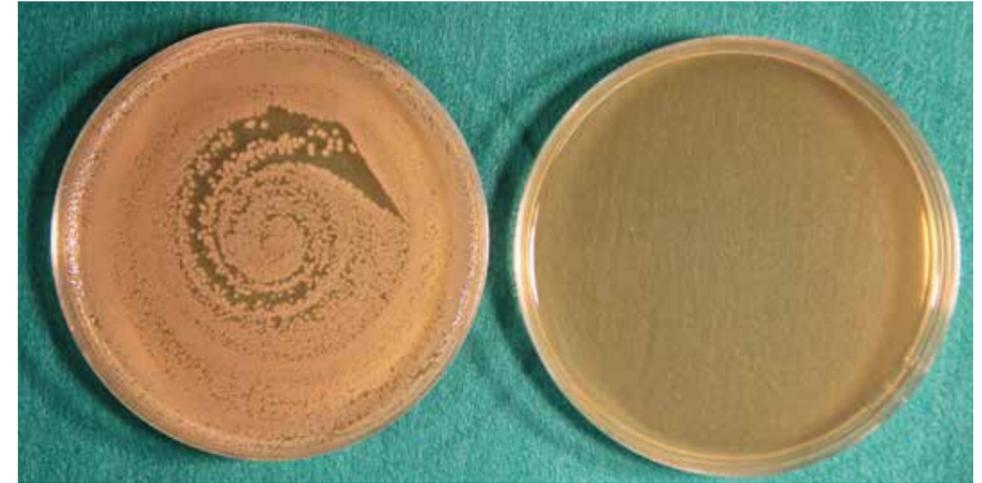
オゾン水

Staphylococcus aureus ATCC25923 (黄色ブドウ球菌)



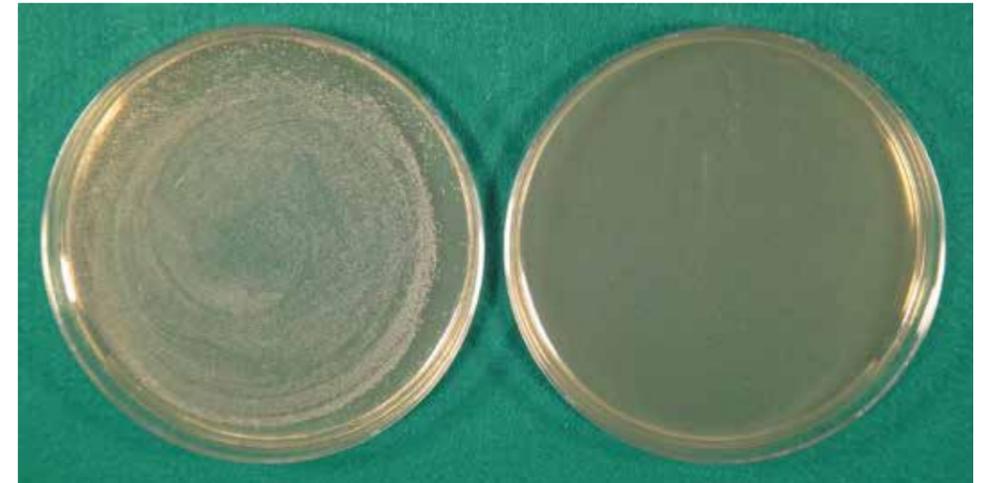
オゾン水

Salmonella typhimurium (サルモネラ菌)



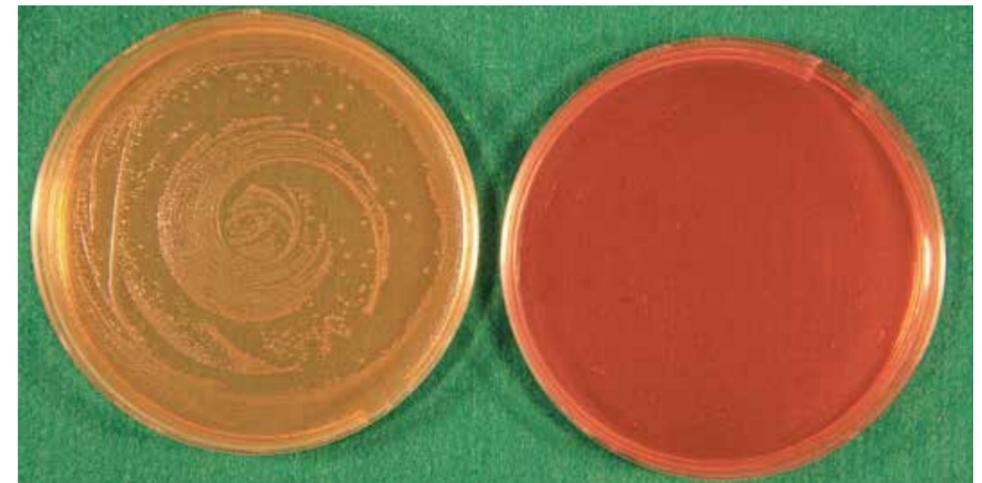
オゾン水

Propionibacterium acnes (アクネ菌)



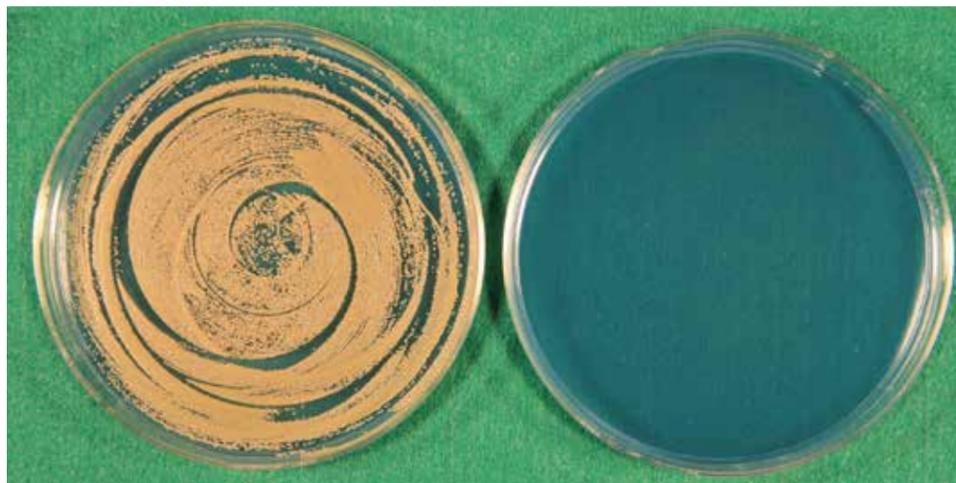
オゾン水

Sigella flexneri (赤痢菌)



オゾン水

Vibrio Parahaemolyticus (腸炎ビブリオ菌)



オゾン水

Listeria monocytogenes EGD (リステリア菌)



オゾン水

Pseudomonas aeruginosa (緑膿菌)



オゾン水

Enterococcus faecalis (エンテロコッカス)



オゾン水

Serratia marcescens (セラチア菌)



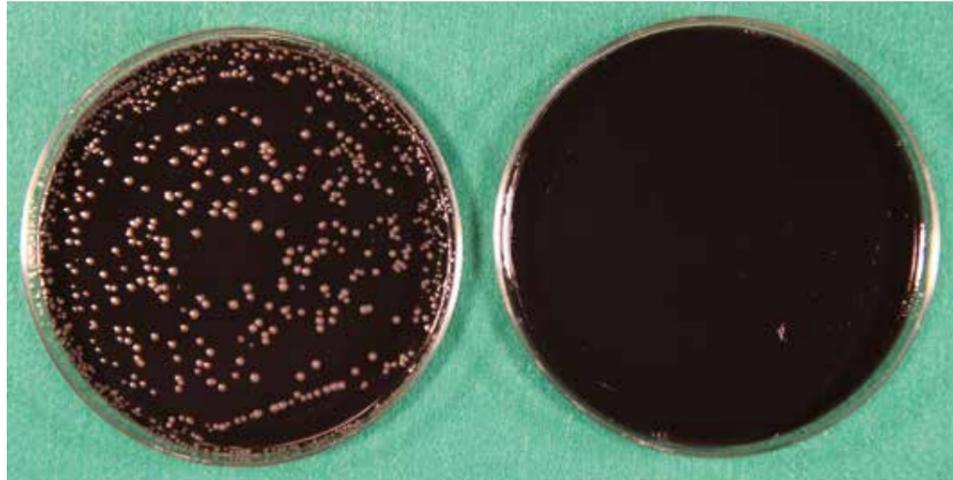
オゾン水

Yersinia enterocolitica (エルシニア菌)



オゾン水

Campylobacter jejuni (カンピロバクター菌)



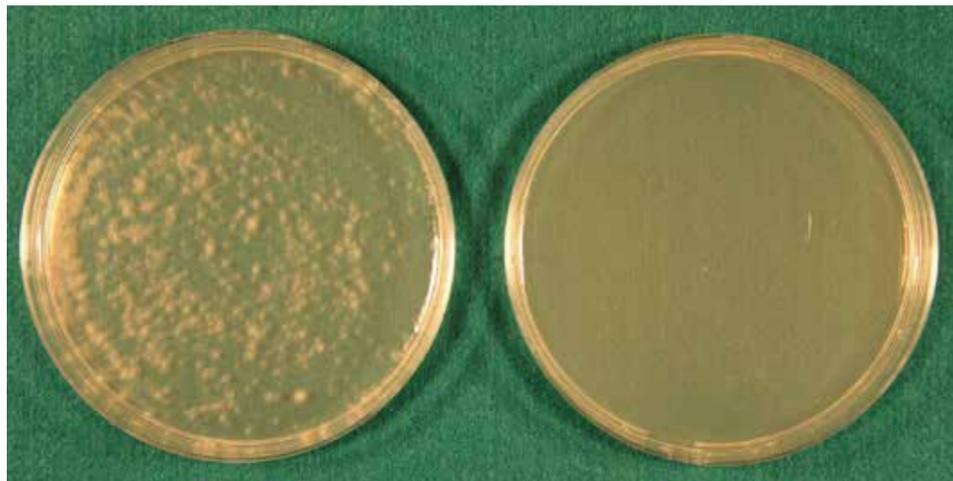
オゾン水

Streptococcus mutans (ミュータンス菌)



オゾン水

Trichophyton rubrum (白癬菌)



オゾン水

接触時間5秒で殺菌できることが確定した菌

Escherichia coli ATCC25922 (大腸菌)
Escherichia coli O-111 (病原大腸菌)
Staphylococcus aureus ATCC25923 (黄色ブドウ球菌)
Salmonella typhimurium (サルモネラ菌)
Propionibacterium acnes (アクネ菌)
Sigella flexneri (赤痢菌)
Vibrio Parahaemolyticus (腸炎ビブリオ菌)
Listeria monocytogenes EGD (リステリア菌)
Pseudomonas aeruginosa (緑膿菌)
Enterococcus faecalis (エンテロコッカス)
Staphylococcus epidermidis (表皮ブドウ球菌)
Serratia marcescens (セラチア菌)
Yersinia enterocolitica (エルシニア菌)
Campylobacter jejuni (カンピロバクター菌)
Streptococcus mutans (ミュータンス菌)
Trichophyton rubrum (白癬菌)

【考察】

対象微生物を、aグループ:腸管由来菌、bグループ:皮膚由来菌、cグループ:消毒薬や抗生物質に抵抗性の難治性感染症原因菌に分類し、夫々代表的な菌種について検討している。

グループaとして、大腸菌、サルモネラ、エンテロコッカス等に対する殺菌効果を検討した。大腸菌、O-111を含む病原大腸菌、サルモネラ、およびエンテロコッカスに対しては、 10^6 /mlの濃度で5秒間の接触で殺菌できることが確認できた。グループaは、褥瘡ケアへの応用を想定しているが、これらのグループに含まれる菌は感染型食中毒菌でもあるため、食品関連施設にも応用可能である。食中毒関連の追加項目として腸炎ビブリオ、赤痢菌およびリステリア菌に対する殺菌効果を検討し、腸炎ビブリオ、赤痢菌およびリステリア菌に対しても 10^6 /mlの濃度で5秒間の接触で殺菌できることを確認した。カンピロバクターに対する殺菌効果も認められているが、現在継続検討中である。

グループbとして、表皮ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌、アクネ桿菌、白癬菌およびトリコフィトン・トズランス(所謂、新型水虫菌)等に対する殺菌効果を検討した。表皮ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌、アクネ桿菌、に対しては、 10^6 /mlの濃度で5秒間の接触で殺菌できることが確認できた。白癬菌およびトリコフィトン・トズランス(所謂、新型水虫菌)に関しても最終濃度で 1×10^3 cfu/mlまでの殺菌活性は認められているが、継続検討中である。追加項目として緑膿菌に対する殺菌効果を検討し、 10^6 /mlの濃度で5秒間の接触で殺菌できることを確認した。グループbは褥瘡ケア、糖尿病のフットケア、皮膚感染症の予防を想定しており、病院、老人ホーム、介護施設、プールおよび体育館等の施設ならびに一般家庭で応用可能である。

グループcとして、非結核性抗酸菌(*Mycobacterium chelonae*)に対する殺菌効果を検討中である。*Mycobacterium chelonae* に対する弱い殺菌活性は認められているが、継続検討中である。現在追加項目として*Mycobacterium marinum* に対する殺菌効果を検討中である。グループcは、治療への応用を想定している。

その他院内感染関連菌として、セラチア菌に対する殺菌効果を検討中である。通常のセラチア菌に対する殺菌効果を確認し、消毒薬耐性の院内感染由来のセラチア菌に対する効果を確認中である。

平成25年4月3日

第2回報告書

オゾン水によるウイルスの不活化効果の検討

相模原市南区北里1-15-1
北里大学理学部生体防御学講座
滝本博明 

第2回報告の目的

この度、株式会社ウォーターエージェンシーから提供されたオゾン水生成器についてのインフルエンザウイルスおよびネコカリシウイルスに対する不活化検証を3回行い、不活化についての結果が確定したので報告に至った。

材料および方法

ウイルス：インフルエンザウイルスA/PR/8/34 (H1N1)は、イヌ腎細胞 (MDCK) で増殖させたウイルスを使用した。ノロウイルスの代替ウイルスであるネコカリシウイルスF9株 (FCV) は、ネコ腎細胞 (CrFK) で増殖させたウイルスを使用した。

オゾン水処理：ウイルス液 (0.1 ml) に「ウォーターエージェンシー社製オゾン水生成器」にて生成されたオゾン水 (オゾン濃度 0.9 mg/l、水温18度、遊離残留塩素濃度0.3 mg/l) または滅菌精製水を9.9 ml加えた後一定時間静置した。その後、10 mlの混合液から0.9 mlを取り出し0.1 Nチオ硫酸ナトリウムを0.1 ml加えた。

インフルエンザウイルスの定量：MDCKは10%ウシ胎児血清添加イーグルMEMに懸濁し、96穴平底プレートに播種し、一晚培養した。イーグルMEMで細胞を洗浄後、イーグルMEMで10倍段階希釈したウイルス液を0.05 mlずつ細胞に接種し、35度で1時間吸着した。各穴にイーグルMEM (0.003% DEAE-dextranおよび0.006 mg/ml acetyl trypsin添加) を0.05 mlずつ添加し、35度で5日間培養した。培養終了後、ホルマリン固定しアミドブラックで染色し細胞変性効果 (CPE) を観察した。ウイルス感染価 (TCID₅₀) は、Reed & Muenchの方法で計算した。

FCVの定量：CrFKは10%ウシ胎児血清添加イーグルMEMに懸濁し、96穴平底プレートに播種し、一晚培養した。イーグルMEMで細胞を洗浄後、イーグルMEMで10倍段階希釈したウイルス液を0.05 mlずつ細胞に接種し、37度で1時間吸着した。各穴に4%ウシ胎児血清添加イーグルMEMを0.05 mlずつ添加し、37度で5日間培養した。培養終了後、ホルマリン固定しアミドブラックで染色し細胞変性効果 (CPE) を観察した。ウイルス感染価 (TCID₅₀) は、Reed & Muenchの方法で計算した。

注記

ウイルス感染によって生じる培養細胞の変化を指標にしてウイルス感染価を定量することが出来る。一般的に用いられる方法は、細胞変性効果 cytopathic effect (CPE) の観察による方法とプラーク数算定による方法である。CPEを指標としたウイルス感染価の定量法は、ウイルスの50%組織培養感染 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀)で表される。TCID₅₀算定によるウイルス感染価の測定は、プラーク法より簡便であり、一般的な方法として用いられているため、現実的な検証方法と考え、当定量法を採用した。

結果

インフルエンザウイルスに対するオゾン水の不活化作用は、30秒間のオゾン水処理によりウイルス価が99.93%減少した。オゾン水を1分間処理すると99.94%減少し、オゾン水を2分間処理することにより99.96%減少した（表1、図1および2）。

FCVに対するオゾン水の不活化作用は、30秒間のオゾン水処理によりウイルス価が99.75%減少した。オゾン水を1分間処理すると99.85%減少し、オゾン水を2分間処理することにより99.93%減少した（表2、図3および4）。

今後

今回は、ウイルス感染価の測定としてTCID₅₀を用いたが、今後はより正確なウイルス感染価の定量方法であるプラーク法も採用して、オゾン水によるウイルス不活化効果の検証を行う。また、機器提供先である株式会社ウォーターエージェンシーと協議し、様々な検証を続けていく。

注記

プラーク法：ウイルスを単層培養細胞に接種し、寒天やメチルセルロースなどを添加してゲル状にした細胞維持用培地を重層して培養を続けると、ウイルスの感染の広がりが、最初に感染した細胞に接触する細胞に制限される。限局して形成された感染細胞の小地区をプラークという。この方法により生じたプラーク数を算定することによりウイルス感染価の定量が可能であり、プラーク形成単位 (PFU) として表す。プラーク法は、CPEを指標とした定量法より、煩雑であるが、より正確なウイルス感染価を算定することが出来る。

表1 オゾン水によるインフルエンザウイルス不活化作用

処理	時間	TCID ₅₀ /ml			抑制率 (%)
		実験1	実験2	実験3	
精製水		2.0 x 10 ⁸	9.3 x 10 ⁷	2.0 x 10 ⁸	
オゾン水	30秒	9.3 x 10 ⁴	6.3 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁵	99.93
	1分	9.3 x 10 ⁴	4.3 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁵	99.94
	2分	6.3 x 10 ⁴	4.3 x 10 ⁴	9.3 x 10 ⁴	99.96

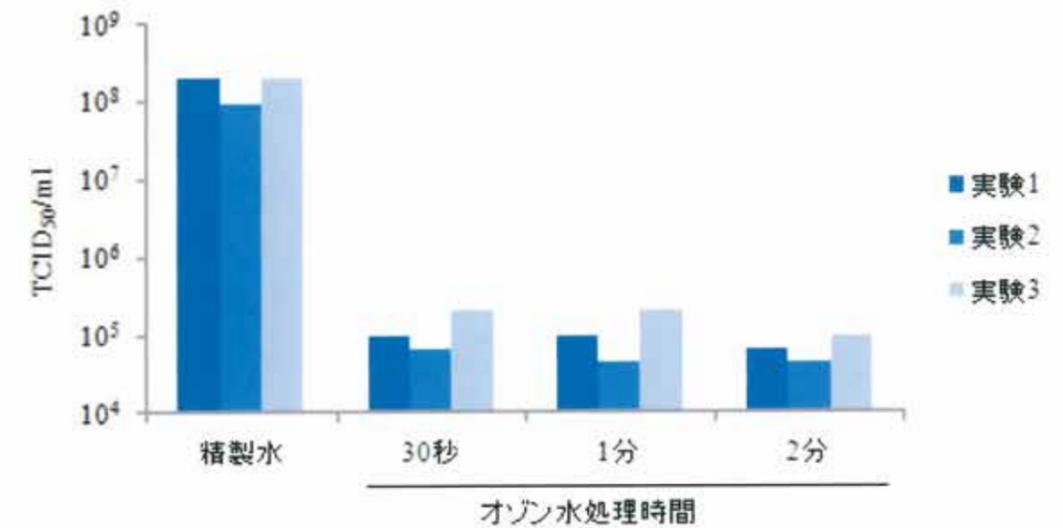


図1 オゾン水によるインフルエンザウイルス不活化作用

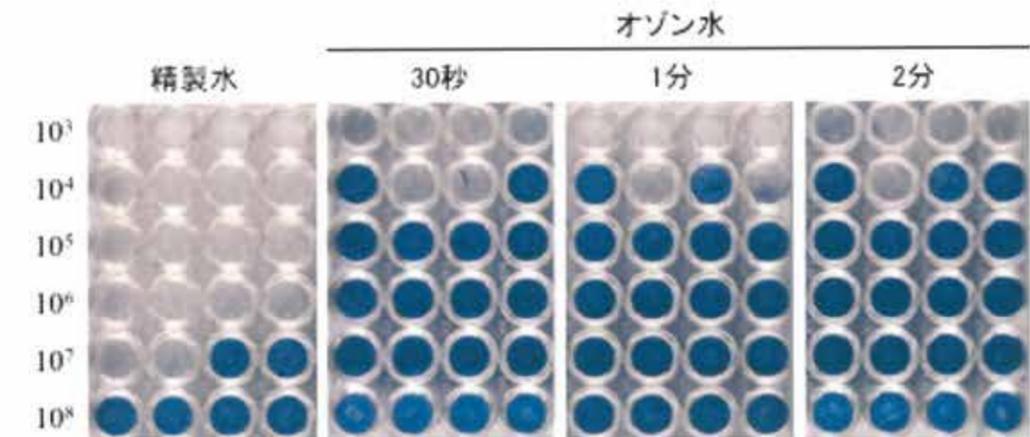


図2 オゾン水によるインフルエンザウイルス不活化作用

表2 オゾン水によるFCV不活化作用

処理	時間	TCID ₅₀ /ml			抑制率 (%)
		実験1	実験2	実験3	
精製水		6.3 x 10 ⁸	9.3 x 10 ⁷	9.3 x 10 ⁷	
オゾン水	30秒	4.3 x 10 ⁵	2.0 x 10 ⁵	4.3 x 10 ⁵	99.75
	1分	2.0 x 10 ⁵	2.0 x 10 ⁵	2.0 x 10 ⁵	99.85
	2分	2.0 x 10 ⁵	9.3 x 10 ⁴	6.3 x 10 ⁴	99.93

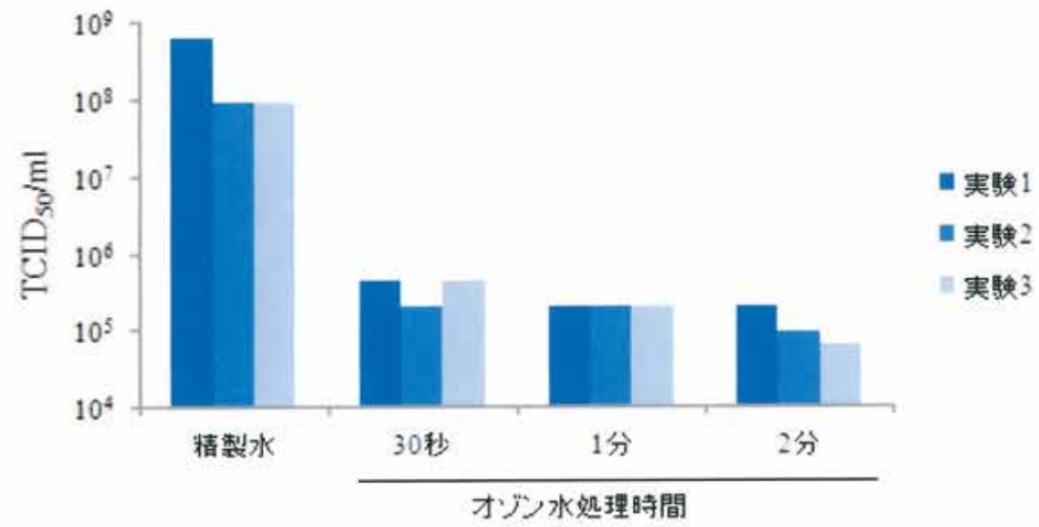


図3 オゾン水によるFCV不活化作用

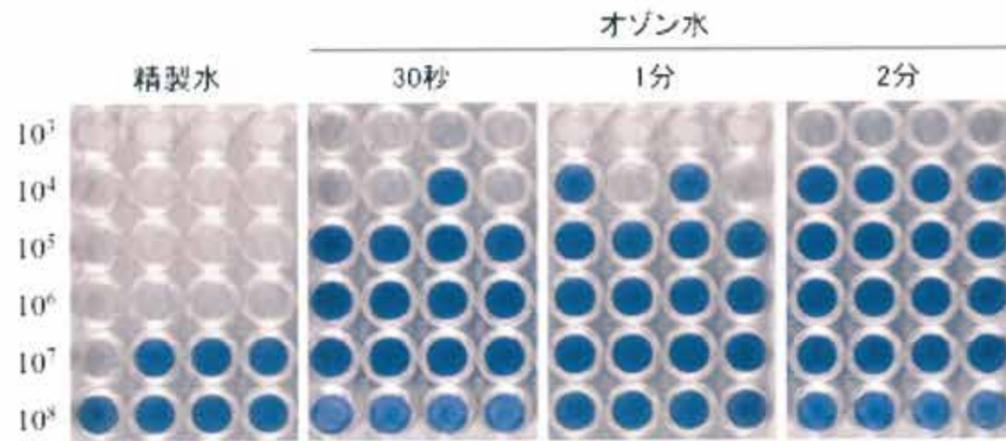


図4 オゾン水によるFCV不活化作用