

# 低濃度オゾンガスによる各種殺菌に対する殺菌能力

---

はじめに 低濃度オゾンガスによる一般細菌の殺菌効果を確認した

- 試験菌株：大腸菌 : Escherichia coli IAM1239
- 黄色ブドウ球菌 : Staphylococcus aureus N20 (消毒剤耐性株)
- : Staphylococcus aureus RN2677
- 化膿レンサ球菌 : Streptococcus pyogenes IID689(S8)

- 使用培地： ・ブレインハートインフュージョン (BHI) 液体培地 (日水製薬)
- ・ブレインハートインフュージョン寒天培地 (日水製薬)

- 試験方法： 調整した試験菌液を約  $10^5 \sim 10^6$  cells となるように 1.5% 寒天平板に塗抹し、オゾンガス殺菌装置内で 1ppm のオゾン濃度で 1 時間処理した。各平板上に約 50°C に保温した寒天培地 20ml を積層し培養した。生菌数測定用培地として一般細菌には BHI 寒天培地を用いた。

- 試験結果 オゾンガスによる一般細菌に対する殺菌効果

菌 株	未処理の菌数 (CFU/シャーレ)	オゾン処理後の菌数 (CFU/シャーレ)	殺菌効果 (%)	オゾン処理条件
E.coli IAM1239	$1 \times 10^6$	72	99.99	オゾン濃度 1ppm 処理時間 60 分
S.aureus N20	$5 \times 10^8$	57	99.98	
S.aureus RN2677	$5 \times 10^6$	45	99.99	
S.pyogenes IID689(S8)	$3 \times 10^5$	0	100	

※検査機関 昭和薬科大学 微生物研究室

## オゾン発生器 (OZM-1250F) の除菌効果について

---

オゾンの殺菌効果は、オゾン濃度 (c) とオゾン処理時間 (t) を掛け算したものによって評価できるとされている。

この値はct値と呼ばれ、次のように求められる。

$$\text{ct値 (ppm}\cdot\text{min)} = \text{オゾン濃度 (ppm)} \times \text{処理時間 (min)}$$

### オゾン発生器 (OZM-1250F) のct値 60 m<sup>3</sup> (24~25 m<sup>3</sup>) の室内

処理時間 (min)	オゾン濃度 (ppm)	c t 値 (ppm・min)
10	3.0	30
15	4.0	60
20	5.0	100

別紙 (昭和薬科大学 微生物研究所) の低濃度オゾンガスによる各種細菌及びウイルスに対する殺菌能力のデータのct値は60ppm・minである。

(オゾン処理条件でオゾン濃度1ppm処理時間60分である)

これは、ct値が60ppm・min以上であれば、別紙細菌及びウイルスの99.99%殺菌できることを意味する。

よってオゾン発生器 OZM-1250F の室内 60 m<sup>3</sup> 15 分間でのct値は、60ppm・min以上であることから、十分殺菌が可能と推測できる。

注意 : ①オゾン発生装置の効果は室内状況、汚れや湿度により大きく左右されます。

②ct値の濃度推移は別紙濃度テスト平成18年5月5日東京美容外科データを参考とする。

## 細菌・ウイルスの耐性について

オゾンの殺菌効果はオゾン濃度×発生時間(処理時間)の積で決まります。

別紙「スペースクリン TM38SCの殺菌効果について」

「低濃度オゾンガスによる各種細菌に対する殺菌能力」

を参照下さい。

救急車両でオゾン発生器TM-38SCを使用した場合、平均オゾン濃度は4~6ppmになります。  
処理時間が20・40・60分に設定可能ですので、

80~360ppm・minがオゾン発生器TM-38SCオゾンガスの殺菌力に相当します。

別紙の参考資料により、細菌ごとの殺菌に必要なオゾンガス数値は

60ppm・minで、99.98~100%の効果が得られます。

以上のことから、

一般細菌(黄色ブドウ球菌・MRSA・化膿レンサ球菌・大腸菌)の殺菌が可能です。

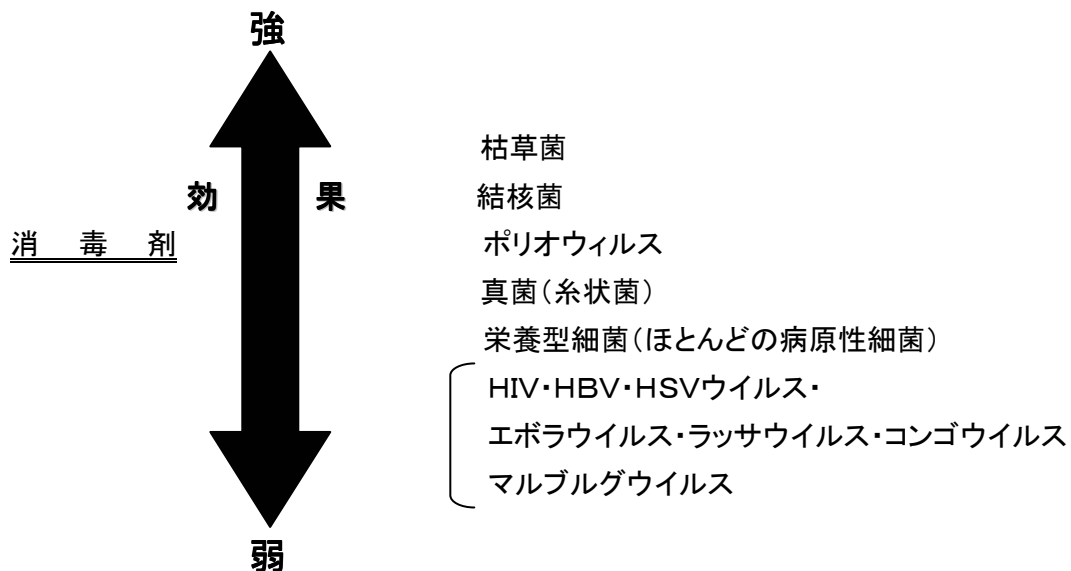
緑膿菌なども上記の菌が殺菌可能から類推して殺菌が可能といえます。

コレラ・パラチフス・腸チフス・細菌性赤痢は大腸菌と同レベル耐性で殺菌が可能です。

結核菌については比較的、酸化に強い性質を持っているため、処理時間60分をお薦めします。

ウイルスの耐性については

消毒剤についての細菌・ウイルスの耐性が下記のように分類されています。



ほとんどのウイルスはオゾンに対する耐性は一般細菌レベルであるが、ウイルスの中で経口感染するウイルス(例、パルボウイルス:犬猫などの動物について)はポリオウイルスと同程度の強い耐性を持つが、不活化は可能と考えます。

080522

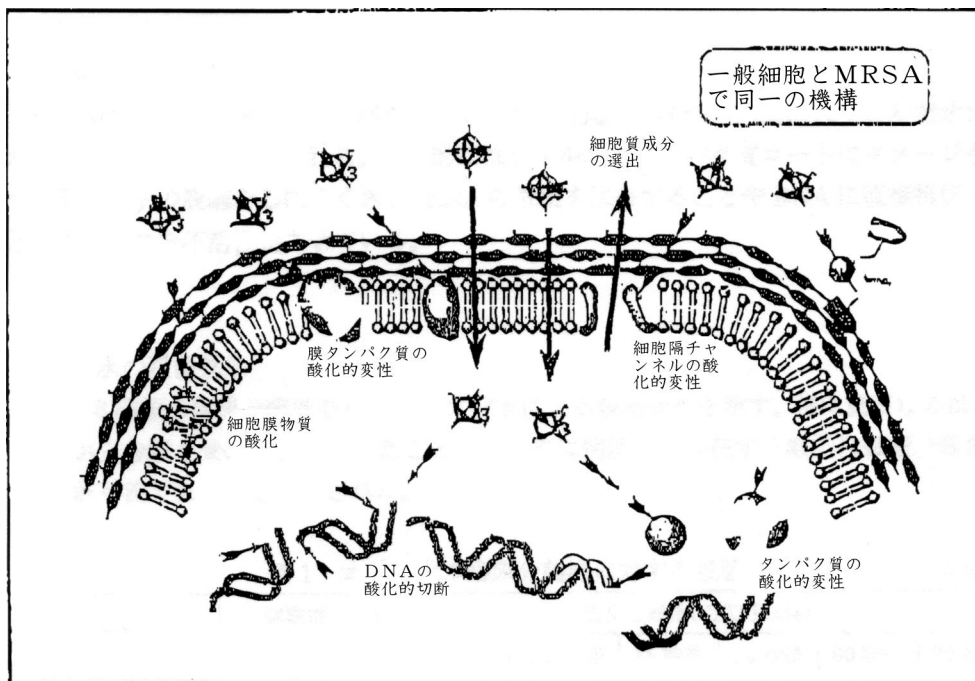
作成日	2008年05月22日
改定日	—
版数	01.版

## オゾン水による殺菌・ウイルス不活性化

1. オゾンによる殺菌機構

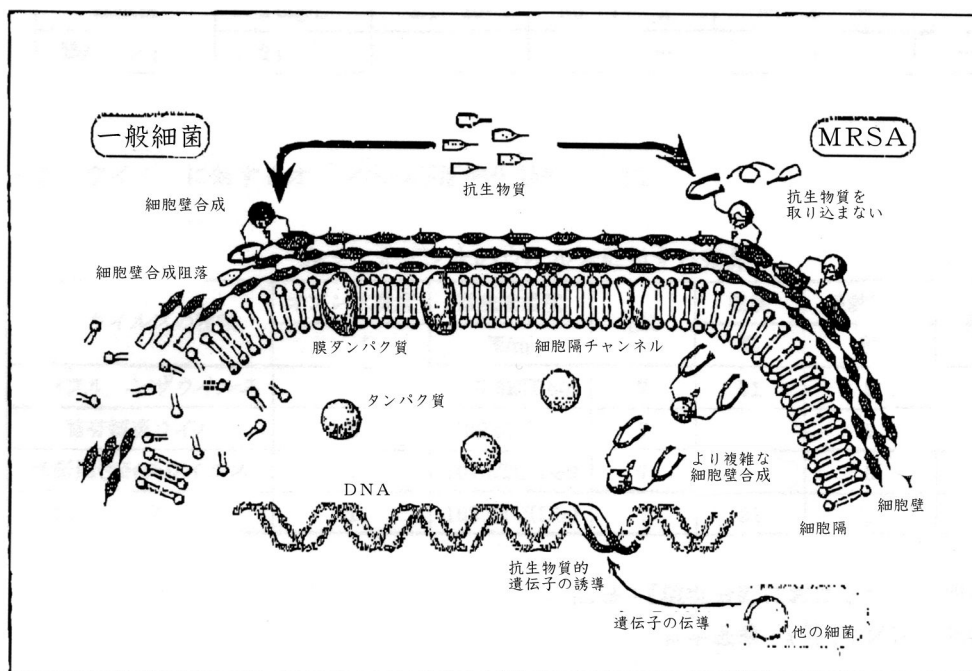
オゾンは、図1-1に示すように細菌を構造的に破壊し、死滅に至らすと考えられている。

図1-1 オゾンによる構造的破壊



参考までに薬剤の場合は、図1-2に示すように細菌の機能を破壊しているが一部の細菌は、薬剤を取り込まない機能を獲得している。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌などが有名である。

図1-2 抗生物質による機能的破壊



オゾン殺菌機構は、マルチポイントの攻撃であり、しかも過剰に投じられたオゾンは死んでしまった菌体を破壊しつづけ、最後には遺伝子も破壊する。

オゾンに耐性を持つ細菌が出現しにくい理由と考えられる。

## 2. オゾンによるウイルス不活性化機構

ウイルスの不活性化は、タンパク質とオゾンの反応、ウイルス内部に入りこんだオゾンと核酸の反応によるものと考えられる。具体的にはウイルスのタンパク質コートにダメージを与えタンパク質コートの脱離をしにくくさせ、RNAの放出を阻害することやRNAに直接損傷を与えることでウイルスを不活性化させている。

## 3. オゾン水の殺菌効果

3-1 8種類の臨床分離株を用いたオゾン水による殺菌効果を示す。特に重要なのは、臨床現場から分離させた細菌を用いたことで、実際に病院内に存在する感染性細菌を殺菌することが可能であることが示された。

表1 オゾン水の臨床分離株に対する殺菌効果

—:不検出

試験菌	試験液 オゾン水濃度	残存生菌数(CFU/Plate)					
		コントロール	5秒後	15秒後	30秒後	60秒後	90秒後
黄色ブドウ球菌	2mg/L	$6.0 \times 10^8$	1	1	—	—	—
MRSA	2mg/L	$6.0 \times 10^5$	8	8	—	—	—
大腸菌	2mg/L	$3.0 \times 10^8$	—	—	—	—	—
O-157	2mg/L	$2.5 \times 10^4$	—	—	—	—	—
サルモネラ菌	2mg/L	$6.0 \times 10^2$	30	3	—	—	—
セラチア菌	2mg/L	$5.0 \times 10^6$	7	—	—	—	—
緑膿菌	2mg/L	$2.1 \times 10^3$	80	2	—	—	—
腸炎ビブリオ	2mg/L	$6.0 \times 10^3$	—	—	—	—	—

3-2 ウイルスに対するオゾン水の不活性化効果を示す。

表2 オゾン水のウイルスに対する効果

—:不検出

ウイルスの種類	オゾン水濃度	微生物濃度	pH	温度	接触時間	残存
	mg/L	個/ml		°C	秒	
インフルエンザウイルス	1	105.3EID50	7	21	5	—
鶏脳骨髄炎ウイルス	1	102.5EID50	7	21	6	—
犬伝染性肝炎ウイルス	1	101.5TCID60	7	21	5	—
犬パルボウイルス	1	102.5TCID50	7	21	6	—

引用図書:『環境分野におけるオゾン利用の実際』

日本医療・環境オゾン研究会

## 第1部 技術概論

パク質へ作用する可能性もあるとしているが、オゾンの作用機構として細胞質膜の破壊から溶菌をおこすという従来の見解に対して、オゾンのターゲットは染色体DNAで、その損傷が大腸菌死滅の要因の一つであろうと述べている。

いずれにしても、オゾンによる殺菌機構は細菌細胞の表層部から次第に内部のオルガネラに障害を及ぼすことは多くの研究から明らかであるが、Sibony<sup>21)</sup>の報告にもあるように、細胞壁あるいは細胞質膜のタンパク質がオゾンで酸化され、次いで膜内や細胞質内の重要な酵素の失活がおこり、さらに核酸(RNA, DNA)の破壊へと進行するものと考えられる。

### 3. ウイルス粒子の構造とオゾンによる不活化作用

ウイルス(virus)は極めて微小な非細胞性生物群で、一つのウイルス粒子をビリオン(virion)と称している。ウイルスの種類は多く、寄生する対象によって動物ウイルス、植物ウイルスおよび細菌ウイルス(バクテリオ・ファージ:bacteriophage)に大別されている。大きさは大体 300nm(タバコモザイクウイルスや牛痘ウイルス)から 10nm(黄熱ウイルス)の範囲にあり、リケッチア(rickettia)やクラミジア(chlamydia)など最小細菌類とタンパク質など生体高分子物質との中間に位置する偏性病原体である。一方、ウイルスよりさらに小さいウイロイド(viroid)も実在する。ウイルスの形態は煉瓦状(牛痘ウイルス)、桿状または円筒状(タバコモザイクウイルス)、球状または楕円球状(アデノウイルス)、弾丸状(魚類ウイルス:伝染性造血器壊死症ウイルス)やバクテリオ・ファージのように、六角形の頭部、円筒状の鞘部、尾部と細かい線維からなるウイルスまで多様である。

一般にウイルス粒子はキャプシド(capsid)と呼ばれるタンパク質からなる外殻(coat)をもっているが、これはこれはキャプソマー(capsomere)と呼ばれる基本的なタンパク質の構造単位の集合体であって、ウイルス粒子の微細な構造はこのキャプソマーの規則正しい配列型式によって一定の形態をとっている。このキャプソマーの形は煉瓦状や桿状ウイルスではらせん状(タバコモザイク、インフルエンザ、牛痘ウイルスなど)、球状ウイルスでは正二十面体様(アデノ、ヘルペス、レオ、ポリオウイルス、大腸菌  $\phi$ X-174 ファージなど)で、六角形とらせん状の複合型は大腸菌 T 偶数系ファージや  $\phi$ -80 ファージがある。ウイルス粒子のタンパク質コートの内側は、DNA か RNA のいずれかの核酸からなる芯(core)である。これらのウイルスの形態と構造を図-5~7に示す。

一般にウイルス核酸は2本鎖 DNA または1本鎖 RNA であるが、 $\phi$ X-174 ファージでは1本鎖の環状 DNA で、 $\phi$ -80 や ファージでは直鎖状 DNA である。また、レオウイルスとイネ萎縮病ウイルスでは複鎖または複系 RNA である。ウイルスはこのように核酸の種類によって DNA ウイルスと RNA ウイルスに分けられている。そのほかウイルスによっては、キャプシドの外側にリポ多糖



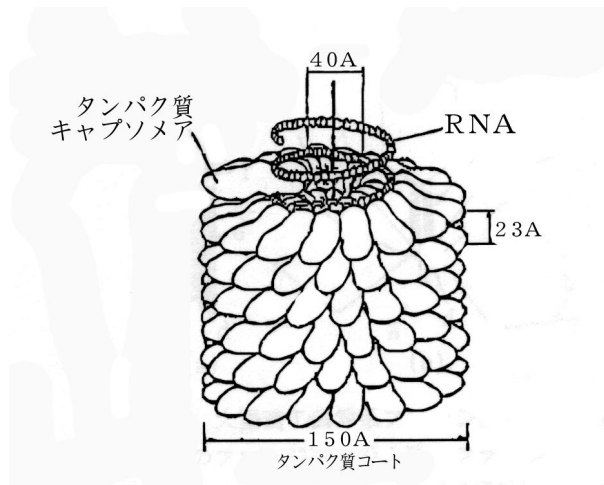


図-5 タバコモザイクウイルスの構造模型(一部改変)  
 [R.Y.Stanier, E.A.Adelberg, J.L.Ingraham and M.L.Wheelis:  
 “Introduction to the Microbial World”, 訳書“微生物学入門”,  
 高橋甫他共訳, p.136, 培風館(1980).]

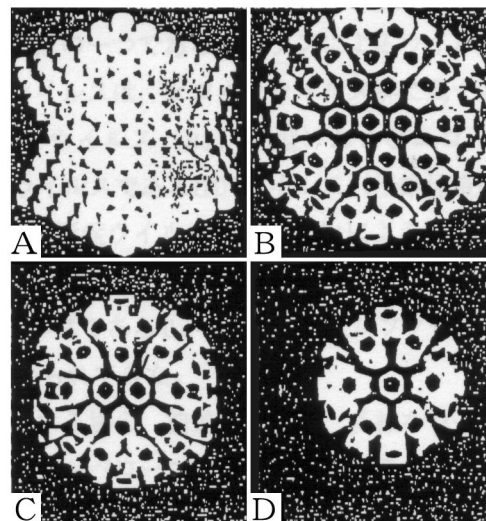


図-6 正二十面体ウイルスの構造模型

- A: アデノウイルス      B: ヘルペスウイルス  
 C: カブラ菱縮病ウイルス      D: ポリオーマウイルス

[渡辺格, 東昇, 野島徳吉, 川喜田愛郎編“ウイルス”, p.11, 共立出版(1966)]

やりポタンパク質からなるエンベロープ(envelope)と呼ばれる外皮をもっている。エンベロープはウイルス粒子を保護すると同時に、赤血球凝集活性があり、宿主細胞への侵入に役立っていると考えられている。また、基本的にウイルスは細菌その他の細胞性生物に共通のタンパク質合成やエネルギー代謝を営む器官を欠き、これらはもっぱら宿主細胞に依存し、構造的には遺伝情報の担い手であるDNAあるいはRNAをコアにしてその外部はタンパク質(大型ウイルスではリポ多糖)で覆われた、生物としては最も単純な形態をとっている。

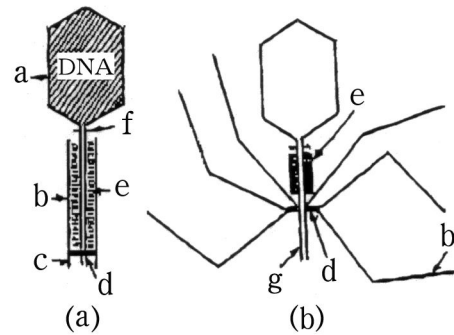


図-7 大腸菌 T 偶数系ファージの構造模式図

(a):核酸放出後のファージ (b):正常ファージ

a:head(頭) b:fiber(線維) c:tail pin(尾針) d:plate(平板)

e:sheath(鞘) f:collar(くび輪) g:tail core(尾芯)

〔渡辺格, 東昇, 野島徳吉, 川喜田愛郎編“ウイルス”, p.20, 共立出版(1966)〕

このようなウイルスに対してオゾンは塩素より低濃度で不活化することが知られ、おのことはオゾン処理法の利点の一つである。オゾンによるウイルスの不活化作用の対象として最も多く用いられたウイルスはピコルナウイルス群に属するポリオウイルス(1, 2, 3型), コクサッキーウイルス(B3, B5型)およびエコーウイルス(1型)である。また、サケ科魚類のウイルスであるIHNウイルス(伝染性造血器壊死症ウイルス)とIPNウイルス(伝染性腭臓壊死症ウイルス)もオゾンによる不活化作用の対象とされた。これらのウイルスのコアはいずれもRNAである。そのほか、RNAウイルスの一種である大腸菌 $f_2$ ファージやDNAウイルスである $T_1$ ,  $T_7$ ,  $\phi X-174$ ファージもオゾンによる不活化作用や作用機構の研究に用いられてきた。

オゾンがウイルスに作用する場合、前述のように、多様なウイルスの形態によって不活化効果に差異が生ずるが、エンベロープは特定のウイルスのみに存在し、細胞への吸着、侵入などに役立ち、ウイルスの増殖にとって直接的な機能はないと考えられるところから、オゾンはウイルスに共通の構造であるカプシドタンパク質やコアを形成するDNAあるいはRNAに損傷を与えることによって、ウイルスの増殖を不能にすると考えられる。

#### 4. ウイルスに対する不活化機構

ウイルスのコアを形成するDNAまたはRNAにはウイルスの増殖にとって必須の遺伝情報が組み込まれ、カプシドタンパク質はコア核酸を保護し、ビリオンの形態を維持する外殻(コート)であるから、オゾンによるウイルスの不活化機構は①カプシドタンパク質(コートタンパク質)への障害作用, ②コアDNAまたはRNAへの障害作用, ③カプシドタンパク質とコア核酸の両者に関連した障害作用のいずれかと考えられる。

## 第8章 殺菌・脱臭

Perrich によるとポリオウイルスの不活化直線がオゾンの低濃度において原点を通ることから、オゾンはウイルスのある特定の部位に障害を及ぼすと推定された。Sibony<sup>21)</sup>はウイルスのカプシドタンパク質に作用すると述べ、Riesser ら<sup>22)</sup>もポリオウイルス 1, 2 型ではタンパク質コートの損傷がウイルスを不活化する原因であるとしている。

これに対して、DeMik と DeGroor<sup>23)</sup>はオゾン、シクロヘキセンまたはオゾン化シクロヘキセンを含有した空気中で、エアロゾル化させたバクテリオ・ファージ  $\phi$ X-174 の不活化機構を 22P でラベルしたファージを用いて検討したところ、清浄またはシクロヘキセンを含有した空気中でファージが不活化され、そのファージから抽出された DNA は生物活性(感染症)を保有し、オゾンでは主としてファージのタンパク質コートの損傷がおこり、オゾン化したシクロヘキセンではタンパク質コートとコア DNA の両方に損傷が認められたと述べている。また、ショ糖密度勾配法で検討したところ、エアロゾル化した不活化ファージでは破壊されない DNA が遊離されたのに対して、オゾン化したシクロヘキセンで不活化したファージの DNA は破壊されたことが認められたという。Gould と Haas<sup>24)</sup>もオゾンがポリオウイルス 1 型の沈降特性と核酸へ影響することに基づいて、ウイルスの不活化は核酸の損傷によるとする考え方を支持している。

これに関連して、Sproul ら<sup>25)</sup>は T<sub>4</sub> ファージを用いて検討し、オゾンによってタンパク質コートが破壊される結果、DNA が放出されることに不活化の原因があるとしている。Kim ら<sup>26)</sup>は <sup>3</sup>H-ウリジンでラベルした f<sub>2</sub> ファージと、その RNA を用いて検討したところ、宿主細菌へのファージの吸着はブラック形成単位の減少と同様にオゾンによって減衰し、電子顕微鏡によってファージコートがオゾンで多数のタンパク質のサブユニットに分析されたことが観察されたという。また、宿主細菌の線毛へのファージの特異的吸着(感染力)はファージピリオンの破損の程度が強いほど低下したことも認められている。さらに、ファージコートに含まれた RNA は裸の RNA より強くオゾンによって不活化されたことから、オゾンはキャプシドのタンパク質をサブユニットにまで破壊して、RNA の遊離や宿主細菌の線毛への吸着の中断などをおこすのであろうと述べている。

一方、Roy ら<sup>27)</sup>によると、オゾンはポリオウイルス 1 型のタンパク質コート中に存在する 4 つのポリペプチドのうち、2 つのポリペプチドを変化させたが、宿主細胞へのウイルスの吸着(感染性)に影響する程度のタンパク質コートへの障害は見られず、沈降分析の結果、オゾン処理後のウイルス RNA が損傷を受けたことから、ウイルス核酸への障害作用がオゾンによる不活化の主な原因であろうと述べている。

以上のような研究のほかに、ウイルスのタンパク質コートと核酸とを関連づけた研究として、Shinriki らによるタバコモザイクウイルス(TMV)を材料とした、オゾンによる不活化機構についての一連の報告がある。それらによると、まず、裸の TMV-RNA の塩基のうち、グアニンが最初にオゾンで破壊されることが認められ<sup>28)</sup>次いで TMV のタンパク質コートのサブユニットを形成しているトリプトファン、チロシンおよびシステインがオゾンによって破壊されることを報告した<sup>7)28)</sup>。

## 第1部 技術概論

最近 Shinriki ら<sup>30)</sup>によって、<sup>3</sup>Hラベル-TMVを用いて、アガロースゲルとポリアクリルアミドゲル電気泳動によってオゾンの影響が検討された結果、オゾン処理によってTMVから抽出されたRNAの量が減少し、ウイルス感染力の消失とRNA回収率の低下との間に相関性が認められた。また、TMVが感染力を消失した時、コートタンパク質中のトリプトファンとチロシンも分解され、さらにコートタンパク質のサブユニットが凝集し<sup>3</sup>Hラベル-RNAと交差結合(cross-link)していることが示された。

一方、TMVの微細構造については、すでにBloemerら<sup>31)</sup>によって、詳細なX線回折による分析からTMV-RNAはタンパク質コート中のアルギニンと結合しており、タンパク質中に埋め込まれて一層の円盤状となり、ピリオンはらせん状の円筒型をとっていることが判明している。神力ら<sup>7)</sup>によると、このTMV-RNAの構造に基づいて、オゾンがタンパク質コートの外側から侵入して外側に存在するトリプトファン、チロシン、システインが分解されたものと推定された。また、トリプトファンの損傷が50%であり、一方、オゾンがタンパク質コートを突き抜けてRNAを損傷することは考えられないというMafusら<sup>32)</sup>の報告や、TMVピリオンはRNAの5'-末端にグアニンが結合して中空になっておりこの部分が最も早くオゾンによって損傷を受けやすいこと、TMVがタバコ葉体細胞へ感染する時、タンパク質コートを脱いでRNAのみが細胞内へ入ることなどを考え合わせて、ピリオンの中空部から侵入したオゾンによって損傷を受けたRNAがコートタンパク質(アミノ基)と交差結合する結果、ウイルスの脱コート(uncoating)が不能になることがTMV不活化の原因であろうと述べている<sup>29)30)</sup>。

以上のように、現在、オゾンによるウイルスの不活化機構はカプシド(コート)タンパク質への障害を主な作用とする見解と、ウイルスのコア核酸への障害を主な作用とする見解があるが、ShinrikiらによるTMVを用いた研究ではオゾンがカプシドタンパク質と中空状ピリオンの内側に存在するRNAの末端とに作用し、両者が交差結合することによってウイルスを不活化させるという新しい不活化機構を提唱したもので、ウイルスの特異的な形態によってオゾンの不活化機構が異なることを示唆している。

## おわりに

Ohlmulerによって、初めて病原細菌に対するオゾンの殺菌性が認められて以来、ちょうど100年になる。その間、欧米やわが国でオゾンの殺菌効果が検討され、塩素に勝る有用性から広範囲の応用面が期待されている。

オゾンの殺菌作用は基本的には脱臭・脱色作用と同様に、有機物に対する強力な酸化作用が原因であるが、殺菌作用の場合は微生物を構成している高分子生体成分で、しかも、その微生物の発育・増殖にとって必須の構成成分がオゾンによって障害されることに原因

微生物に対するオゾンの殺菌効果

微生物の種類	水中オゾン濃度 (ppm)	生物濃度 (個/ml)	接触時間 (秒)	致死率 (%)
大腸菌	0.96	10 <sup>3</sup> sells	5	100
ブドウ球菌	1.08	10 <sup>3</sup> sells	5	100
緑膿菌	1.01	10 <sup>6</sup> sells	5	100
クロストリジウム・パーフリンゲンス	0.96	10 <sup>3</sup> sells	5	100
インフルエンザウイルス	0.96	10 <sup>5.3</sup> EID50	5	100
鶏脳脊髄炎ウイルス	0.72	10 <sup>2.9</sup> EID50	5	100
鶏コクシジウム	1.92	約3 × 10 <sup>3</sup> sells	30	100
カビ	0.3~0.5	10 <sup>5</sup> sells	19	99.9
枯草菌	0.3~0.5	10 <sup>5</sup> sells	30	99.9

(厚生省予防衛生研究所データより抜粋)