

エビデンスから考察するオゾン消毒法

～新型コロナウイルス 変異株への不活化実験～
～新型コロナウイルスの生存期間をオゾン消毒で短縮する～

はじめに：

新型コロナウイルス（SARS-Cov-2）の変異株（アルファ株～デルタ株まで）に対する【低濃度オゾンによる不活化効果】を奈良県立医科大学の研究チームが確認しました

プレスリリース発表（奈良県立医科大学へのリンク）

→<https://www.narmed-u.ac.jp/university/kenkyu-sangakukan/oshirase/r3nendo/ozone.html>

奈良県立医科大学とMBT コンソーシアム（株式会社タムラテコ（以下、当社）も参画）、MBT 微生物学研究所株式会社の研究グループは、有人環境下での空間濃度の基準値とされている 0.05ppm、0.1ppm の濃度のオゾンガス曝露において、新型コロナウイルスの

**アルファ株、
ベータ株、
ガンマ株、
そしてデルタ株の不活化を確認しました。**

また、高湿度条件下では不活化の速度が速まることも確認され、オゾンの実用性を学問的に示しました。
「さらに、当社では、オミクロン株に対しても同じ環境下での試験を依頼しており、これまでの結果からオミクロン株においても同様の効果を期待しています。」

実験に至った背景

当社は、2003年の設立以来、一貫してオゾン・紫外線を利用した衛生対策機器・水処理機器等を製造しており、2008年に総務省消防庁より告示・導入された救急隊員（救急車）向けのオゾン感染対策機器導入（※平成20年9月2日付け一般競争入札告示：新型コロナウイルス感染防護資材及びオゾン発生器一式の導入）を皮切りに、鳥インフルエンザウイルス（H5N1）、ノロウイルス、H37RV /BCG結核菌、MRSA、MSSA、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌、クロコウジカビ、その他多数の菌・ウイルス・化学物質などのオゾンによる分解・不活などを第三者機関にて実証してまいりました。

試験方法：

密閉ボックスにウイルス付着の試片を室温 20-25℃ の条件で静置し、オゾン発生器から発生するオゾンを5時間／10時間／20時間曝露させた。

曝露するオゾンの濃度と湿度は0.05ppm/湿度80%と50%、0.1ppm /湿度50%と80%である。

オゾン曝露を行ったウイルス：

- 1：野生株、
- 2：アルファ株（英国変異株）、
- 3：ベータ株（南アフリカ変異株）、
- 4：ガンマ株（ブラジル変異株）、
- 5：デルタ株（インド変異株）

実験に至った過程：

2019年より猛威を振るう新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）へのオゾンによる不活化実験は過去に当社からの機材提供にて行われております。

- 1：[2020年5月14日に奈良県立医科大学とMBTコンソーシアムより1ppm/6ppmのオゾンにて実証。](#)
- 2：[2020年8月26日に藤田医科大学にて人体に安全な0.1ppmのオゾンにより実証し公開。](#)

共に、医学誌に査読完了した論文が公開されています。

[\[Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 \(SARS-CoV-2\) by gaseous ozone treatment\]](#)

[\[Reduction of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 infectivity by admissible concentration of ozone gas and water\]](#)。

今回の実験において、0.1ppmの低濃度オゾン（人体に影響が少ない※日本産業衛生学会による許容濃度）によって、従来株から変異が続く新型コロナウイルスに対しての不活化効果を確認することであり、何も行わない自然元減衰状態（コントロール）と低濃度オゾンに一定時間曝露とを比較することで不活化の条件について明らかにすることができました。

尚、本実証は実売されている実機を用い、試験用閉鎖空間にて試験が行われており、実使用環境での効果を示すものではありません。

また、当社は厚生労働省が提唱する新型コロナウイルス感染対策（換気／手洗い・うがい／ソーシャルディスタンス、そしてワクチン接種）を転換する等の意向は一切なく、補助的に使用する為の機器として設計されています。

オゾン濃度の基準：なぜ0.1ppm/0.05ppmなのか？～日本と米国の基準の違い



今回の実験で検証したオゾン濃度が0.1ppm/0.05ppmは何を根拠に設定されているのでしょうか？

オゾンは元々人が生活する大気中にも微量に存在しており、雷や太陽光線の紫外線などによって微量のオゾンが発生します。

森林や海岸線などでは低濃度オゾンが観測されており、例えるなら室内で森林の爽やかさを再現するイメージをお持ちいただければ幸いです。

- ▶試験品 : オゾン発生器 (オゾン濃度 0.05 ppm, 0.1 ppm)
- ▶試験ウイルス : 新型コロナウイルス [SARS-CoV-2 デルタ株TY11-927]



新型コロナウイルスをVeroE6細胞に感染させ、細胞変性効果が確認されたものを回収し、-80℃のフリーザーに凍結保存した。凍結融解を2回繰り返し、上清を限外濾過膜で濃縮・精製した。これを試験ウイルス液とし、試験まで-80℃のフリーザーに凍結保存した。

なお全試験は、奈良県立医科大学のバイオセーフティレベル3(BSL3)の実験施設において、適切な病原体封じ込め措置のもとに行なった。

- ▶結果 : 試験結果を図1と表2~6に示した。
 1.5×10^6 PFU/sampleの新型コロナウイルス(デルタ株)を試験品にて発生させたオゾンガスに曝露させると時間経過と共に感染価は減少した。湿度55%の場合、オゾン濃度0.05ppmでは20時間後に検出限界である $<1.0 \times 10^0$ PFU/sample(減少率>99.987%)に、0.1 ppmでは10時間後に 2.5×10^0 PFU/sample(減少率99.990%)に感染価は減少した。湿度80%の場合、オゾン濃度0.05ppmおよび0.1ppmでは、それぞれ10時間後、5時間後に検出限界である 1.0×10^0 PFU/sample(減少率>99.996%および>99.998%)に感染価は減少した。

[表1] 試験品と試験条件

| 試験品 | 湿度 | 作用時間 | | | |
|----------------------|-----|------|------|-------|-------|
| | | 0時間後 | 5時間後 | 10時間後 | 20時間後 |
| コントロール | | | ○ | ○ | ○ |
| オゾン発生器(オゾン濃度0.05ppm) | 55% | ○ | | ○ | ○ |
| オゾン発生器(オゾン濃度0.1ppm) | | | ○ | ○ | |
| オゾン発生器(オゾン濃度0.05ppm) | 80% | | | ○ | ○ |
| オゾン発生器(オゾン濃度0.1ppm) | | | ○ | ○ | |

○ 測定12ポイント×実施2回

不活化効果は以下のように算出した。

$$\text{不活化効果 (Mv)} = \log(C_t/C_0) - \log(N_t/N_0) = \log C_t/N_t$$

Ct: コントロールt時間後の感染価

C0: コントロール0時間後の感染価

Nt: 試験品t時間後の感染価

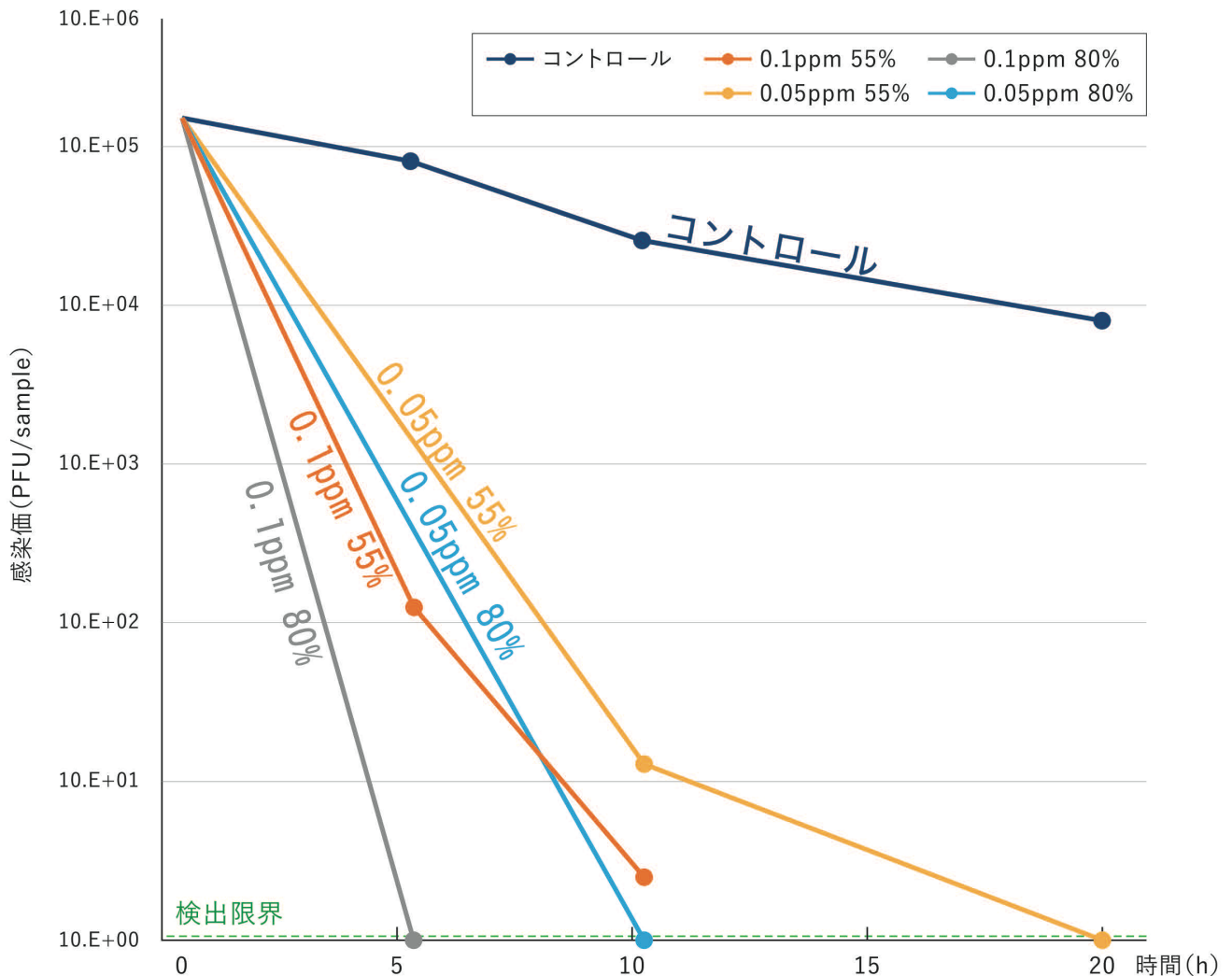
N0: 試験品0時間後の感染価

減少率は対数減少値より次の通り算出した。

$$\text{減少率} = (1 - 1/10^{\text{対数減少値}}) \times 100\%$$

デルタ株

[図1] ウイルス感染価の推移



○ 試験内容と結果

- ▶ 試験品 : オゾン発生器 (オゾン濃度 0.05 ppm, 0.1 ppm)
- ▶ 試験方法 : ◦ウイルス液をシャーレに20μl附着させ、一定時間静置して乾燥させた。
◦密閉ボックスにウイルス附着の試験片を室温(20-25°C)の条件で静置し、オゾン発生器から発生するオゾンを[表1]の通り一定時間暴露させた。
◦作用時間後にチオ硫酸ナトリウム入りSCDLP培地を2ml試験片に滴下させ、セルスクレーパーを用いてウイルスを回収した。
◦回収液を用いてVero E6細胞に感染させ、ウイルス感染価(PFU/sample)をブランク法にて測定した。
◦3日培養後に細胞を観察し、ウイルス感染価ならびにウイルスの不活化効果を算出した。

[表1] 試験品に対する作用時間

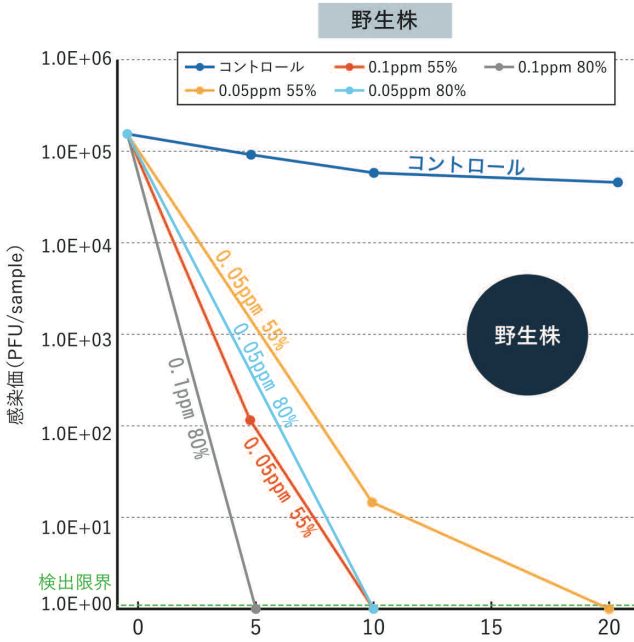
| 試験品 | 湿度 | 作用時間 | | | |
|------------------------|-----|------|------|-------|-------|
| | | 0時間後 | 5時間後 | 10時間後 | 20時間後 |
| コントロール | 55% | | ○ | ○ | ○ |
| オゾン発生器(オゾン濃度 0.1 ppm) | | | | ○ | ○ |
| オゾン発生器(オゾン濃度 0.05 ppm) | | ○ | ○ | ○ | |
| オゾン発生器(オゾン濃度 0.1 ppm) | | | | ○ | ○ |
| オゾン発生器(オゾン濃度 0.05 ppm) | | ○ | ○ | ○ | |

不活化効果は以下のように算出した。
 不活化効果 (Mv) = $\log(Ct/C_0) - \log(Nt/N_0)$
 = $\log Ct/Nt$
 Ct: コントロールt時間後の感染価
 C0: コントロール0時間後の感染価
 Nt: 試験品t時間後の感染価
 N0: 試験品0時間後の感染価

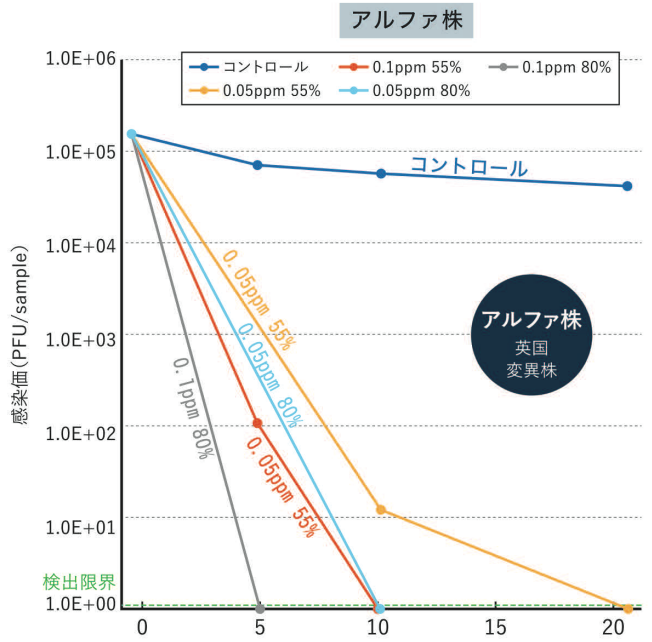
減少率は対数減少値より次の通り算出した。
 減少率 = $(1 - 1/10^{Mv}) \times 100\%$

○ 測定12ポイント×実施2回

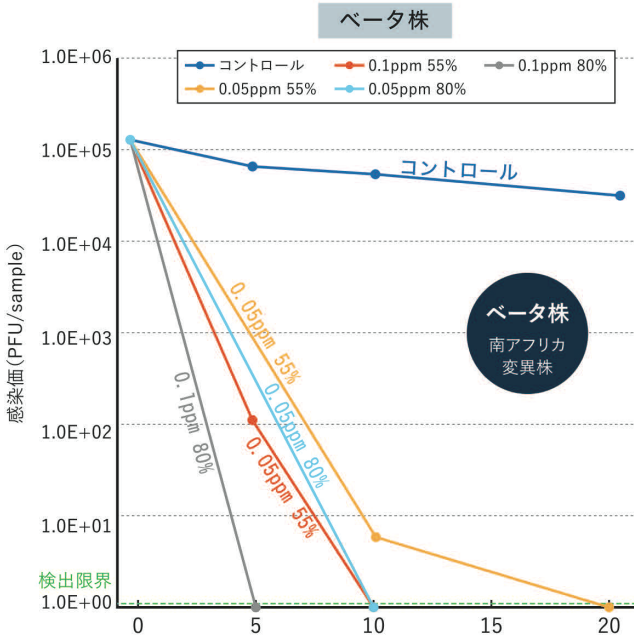
[図1] 野生株の感染価推移 (PFU/sample)



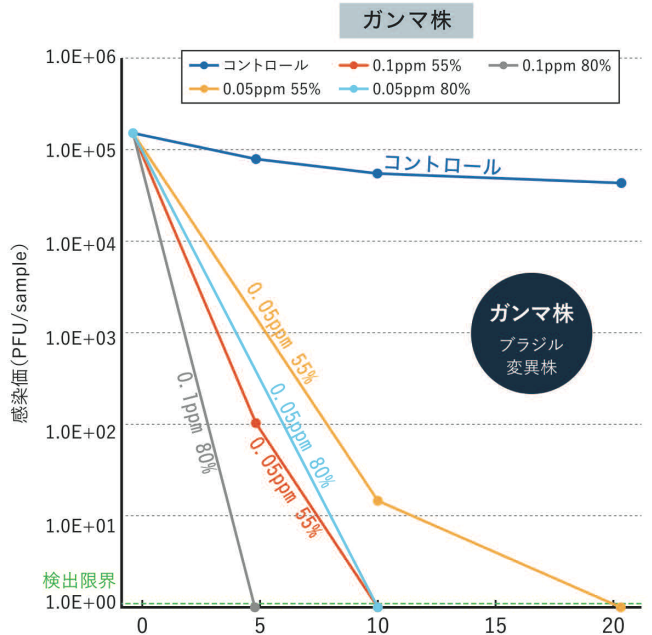
[図2] アルファ株(英国変異株)の感染価推移 (PFU/sample)



[図3] ベータ株(南アフリカ変異株)の感染価推移 (PFU/sample)



[図4] ガンマ株(ブラジル変異株)の感染価推移 (PFU/sample)



(補足資料) オゾンの安全基準・レギュレーションについて

オゾンの人体への基準(日本と米国)、各種団体の内規、また発がん性への安全性や、皮膚への刺激性(マウスによる研究)など、公的に使用されている基準を記載します。

弊社だけではなく、オゾン発生機もしくは副次的にオゾンが発生する機器を取り扱う企業は、こうした基準を順守し、お客様の安全の確保に努めています。

作業環境基準 日本産業衛生学会

許容濃度: 0.1 ppm (0.2mg/m³) 1963年

労働者が1日8時間、週40時間程度、肉体的に激しくない労働強度で有害物質に曝露される場合に、当該有害物質の平均曝露濃度がこの数値以下であれば、ほとんどすべての労働者に健康上の悪い影響がみられないと判断される濃度

室内環境基準 アメリカ合衆国 食料医薬品局 (FDA)

最大許容濃度: 0.05 ppm (24時間) 1992年

日本空気清浄協会 1967年

オゾンが発生する器具による室内ガスの許容濃度 (設計基準※暫定) 最高0.1 ppm 平均0.05 ppm

業務用オゾン利用に関する安全管理基準 (平成17年3月)

業務用オゾン発生設備が収納されている室のオゾンの濃度が0.1 ppmを超えた場合、警報を発する手段を講じること。

| オゾンに関する日本国内法規・基準など | | |
|--------------------|---------------------------|-------------------|
| 労働安全衛生法: | 名称を通知すべき有害物 | |
| 食品への基準: | 食品衛生法既存添加物名簿2条4項59番製造用剤 | 食品添加物として安全性に問題はない |
| IARC 発がん性評価 | A4 (ヒトに対する発がん性の評価が出来ない物質) | 人に対する発がん性はない |

オゾン曝露における肺および皮膚コラーゲンへの影響

0.2~1.7 ppmのオゾンを経験したマウスの肺では、オゾンの影響の指標として用いられる還元型グルタチオン量は濃度に比例して増加したが、コラーゲン量は変化しなかった。

マウスの肺コラーゲン量の有意な増加は1.0 ppmのオゾンを経験して起こり、増加したコラーゲンは曝露終了後、還元型グルタチオンより緩やかに減少した。

1.0 ppmのオゾンを経験したラットの皮膚コラーゲンは、その溶解性及び量に変化は見られなかった。

(世界初)オゾンによる新型コロナウイルス不活化を確認 (世界初)オゾンによる新型コロナウイルス不活化の条件を明らかにした。



一般社団法人
MBTコンソーシアム

Journal of Hospital Infection 106 (2020) 837–838



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Hospital Infection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhin



Letter to the Editor

Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by gaseous ozone treatment



placed in a 50-mL tube containing 5 mL Dulbecco's modified Eagle's medium D-MEM (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan), and the solution containing a plate was mixed for 1 min on a vortex mixer to dislodge any attached virus. The virus titre of SARS-CoV-2 was determined by using the plaque technique on confluent layers of VeroE6/TMPRSS2 cell cultures grown in 12-well culture plates as described previously [6]. This study was conducted in a BSL-3 laboratory at Nara Medical University.

The plaque assay before exposure of ozone was 1.7×10^7 pfu/mL. The titre after exposure of 1.0 ppm ozone at 60 min was 1.7×10^4 compared with 5.8×10^5 pfu/mL for the control. After exposure to 6.0 ppm ozone at 55 min, the titre was less than or equal to 1.0×10^3 pfu/mL, compared with 2.0×10^6 pfu/mL for the control. The titre decreased significantly following exposure to ozone, suggesting that ozone inactivated SARS-CoV-2.

Studies of disinfection with surrogate viruses used ozone concentrations in the range of 10–20 ppm for shorter periods [2,3]. Using higher ozone concentrations for shorter periods may make the process more logistically feasible in busy hospitals where short room turnaround times are required. However, as it is acknowledged that high concentrations can damage equipment and items, the use of lower concentrations may be desirable in some situations. The low-concentration device we used would be better suited for use at night when there are no patients.

The transmission routes of SARS-CoV-2 include droplet transmission, including cough, sneeze, and droplet inhalation transmission. In addition, SARS-CoV-2 may spread by contact transmission and be acquired in numerous indoor public spaces, including hospitals. The surface environment in patient's room may be frequently contaminated [7,8], and contact with these contaminated surfaces may result in hand contamination of healthcare personnel that may be transferred to patients. Therefore, there is a need to develop methods of disinfection. Ozone gas can reach every corner of the environment, including sites that might prove difficult to gain access to with conventional liquids and manual cleaning procedures. In addition, ozone gas is very easy to manufacture as it is produced by electrolysis and does not require replenishment of raw materials.

Recently, Blanchard *et al.* reported ozone-disinfected influenza A virus and respiratory syncytial virus that would serve as a reasonable surrogate for SARS-CoV-2 [2]. These results suggested that ozone has an effect on SARS-CoV-2, as we have demonstrated in this study. To our knowledge, this is the first report about the inactivation of SARS-CoV-2 by ozone,

Sir,

Infection with severe acute respiratory coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the causative agent of COVID-19, has become a worldwide pandemic [1]. The symptoms of COVID-19 vary widely from asymptomatic disease to pneumonia, and COVID-19 is capable of causing life-threatening complications such as acute respiratory distress syndrome, multisystem organ failure, and ultimately death. Older patients and those with pre-existing respiratory or cardiovascular conditions appear to be at the greatest risk for severe complications.

Ozone gas is effective against the majority of microorganisms tested by numerous research groups, and relatively low concentrations of ozone and short contact time are sufficient to inactivate bacteria, fungus, parasites, and viruses [2–5]. Because of this, ozone should be considered for adoption as an effective weapon in the global fight against COVID-19. In this study, we evaluated the efficacy of ozone gas for inactivation of SARS-CoV-2.

We used the SARS-CoV-2 (JPN/TY/WK-521) strain, which was isolated and provided by the National Institute of Infectious Diseases, Japan. The SARS-CoV-2 culture was performed using VeroE6/TMPRSS2 cells (JCRB1819). Virus culture broths were harvested by two cycles of freezing and thawing and clarified by centrifugation at 10,000 g for 15 min at 4°C. We subjected the supernatant to ultrafiltration (Amicon Ultra-15; Merck Millipore Ltd., IRL), followed by three washing steps with phosphate-buffered saline. A sample (50 µL; 8.5×10^5 pfu) of viral suspension was deposited on a 3-cm² area of stainless-steel plates. The plates were allowed to dry before exposure to ozone gas and were exposed to ozone immediately after drying. The plates were placed in an ozone-proof airtight acrylic box (height: 23 cm, depth: 30 cm, width: 40 cm) with the device generating ozone gas (TM-040Z; Tamura TECO Ltd., Japan) and were 15 cm away from the device. The plates were then exposed at a concentration of 1.0 ppm ozone for 60 min (Concentration-Time (CT) Value 60) and 6.0 ppm of ozone at 55 min (CT value 330) at temperature 25°C and relative humidity of 60–80%. In each experiment, plates placed for 60 or 55 min without ozone exposure were used as controls. Each plate was

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.10.004>

0195-6701/© 2020 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.



The future with ozone for One Health



Takayuki Murata ORCID iD: 0000-0001-7228-0839

Satoshi Komoto ORCID iD: 0000-0003-2810-8163

Reduction of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 Infectivity by Admissible Concentration of Ozone Gas and Water

Takayuki Murata^{1*}, Satoshi Komoto¹, Satoko Iwahori¹, Jun Sasaki¹, Hironori Nishitsuji¹, Terumitsu Hasebe², Kiyotaka Hoshinaga³, Yukio Yuzawa⁴

¹*Department of Virology and Parasitology, Fujita Health University School of Medicine*

²*Department of Radiology, Tokai University Hachioji Hospital, Tokai University School of Medicine*

³*Department of Urology, Fujita Health University School of Medicine*

⁴*Department of Nephrology, Fujita Health University School of Medicine*

Correspondence: tmurata@fujita-hu.ac.jp (T. M.)

Abstract

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is causing the global coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. Because complete elimination of SARS-CoV-2 appears difficult, decreasing the risk of transmission is important. Treatment with 0.1 and 0.05 ppm ozone gas for 10 and 20 h, respectively, decreased SARS-CoV-2 infectivity by about 95%. The magnitude of the effect was dependent on humidity. Treatment with 1 and 2 mg/L ozone water for 10 s reduced SARS-CoV-2 infectivity by about 2 and 3 logs, respectively. Our results suggest that low-dose ozone, in the form of gas and water, is effective against SARS-CoV-2.

Keywords: Humidity, ozone gas, ozone water, SARS-CoV-2, TCID50

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/1348-0421.12861.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article