

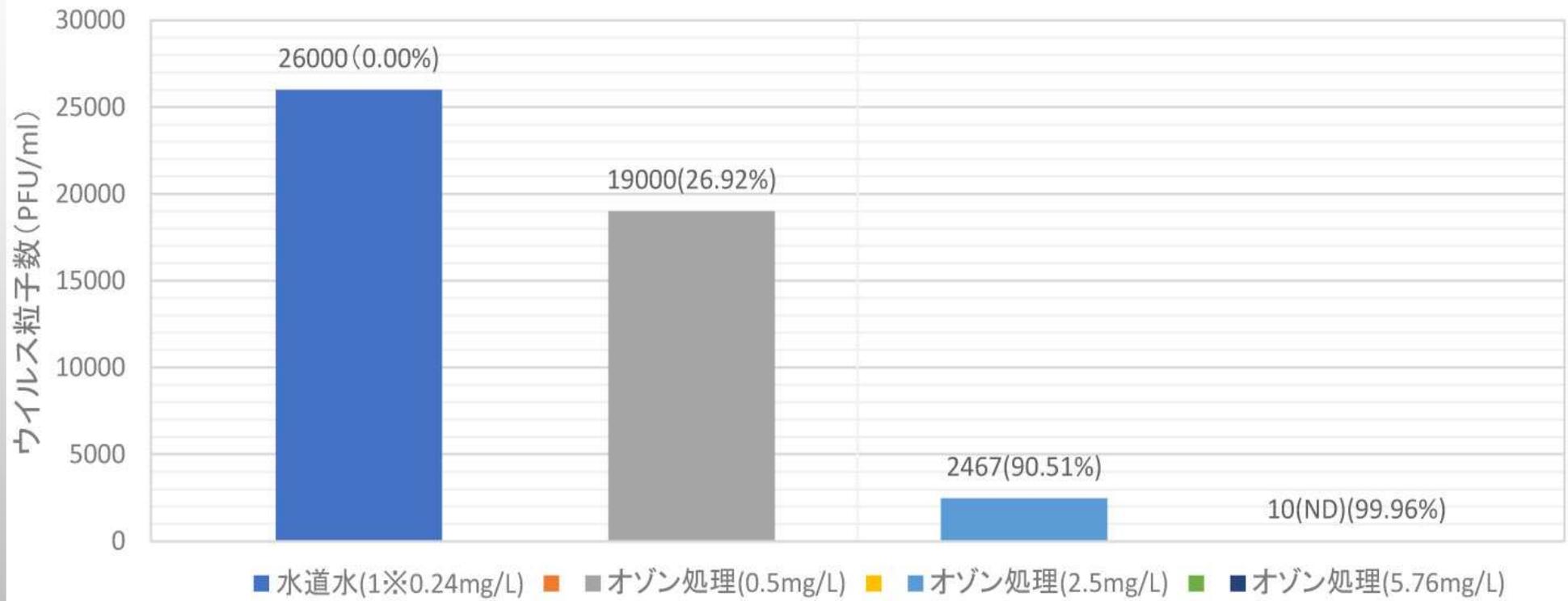
# (1) 高濃度オゾン水の必要性

インフルエンザウイルスを用いて、オゾン水濃度0.5ppmと2.5ppmにてウイルス不活性化試験を実施したところ、オゾン水濃度0.5ppmでは未処理の水道水と比べて、ウイルス力価に統計的な有意差はありませんでした。また、一般的にウイルス不活性化に対して効果があると称されるオゾン水濃度2.5ppmでも、ウイルス不活性化は確認されましたが、検出限界以下まで減少することはありませんでした。しかし、オゾン水濃度5ppm以上であれば、ウイルスは検出限界以下まで減少させることが確認されました。

試験機関：京都大学ウイルス・再生医科学研究所野田教授グループ  
使用したウイルス株：A/California/04/2009 (H1N1)  
(A型インフルエンザウイルス)

	感染性ウイルス粒子数(平均)/ml
水道水(1※0.24mg/L)	26000
オゾン処理※(0.5mg/L)	19000
オゾン処理※(2.5mg/L)	2467
オゾン処理※(5.76mg/L)	10(検出限界以下)
1※ 水道水残留塩素のオゾン重量換算濃度を示す	
※反応時間10分	
* ( )内はオゾン濃度を示す	

## A型インフルエンザ感染性ウイルス粒子数



オゾン水はマルナカミナノスにて生成

## (2)「ミナノス」を使用した試験結果

### ①新型コロナウイルスによる不活性化試験 (「ミナノス」で生成したオゾン水を滴下)

試験機関：京都大学ウイルス・再生医科学研究所野田教授グループ

使用したウイルス株：SARS-CoV-2/Hu/ DP/ Kng/19-027 (新型コロナウイルス)

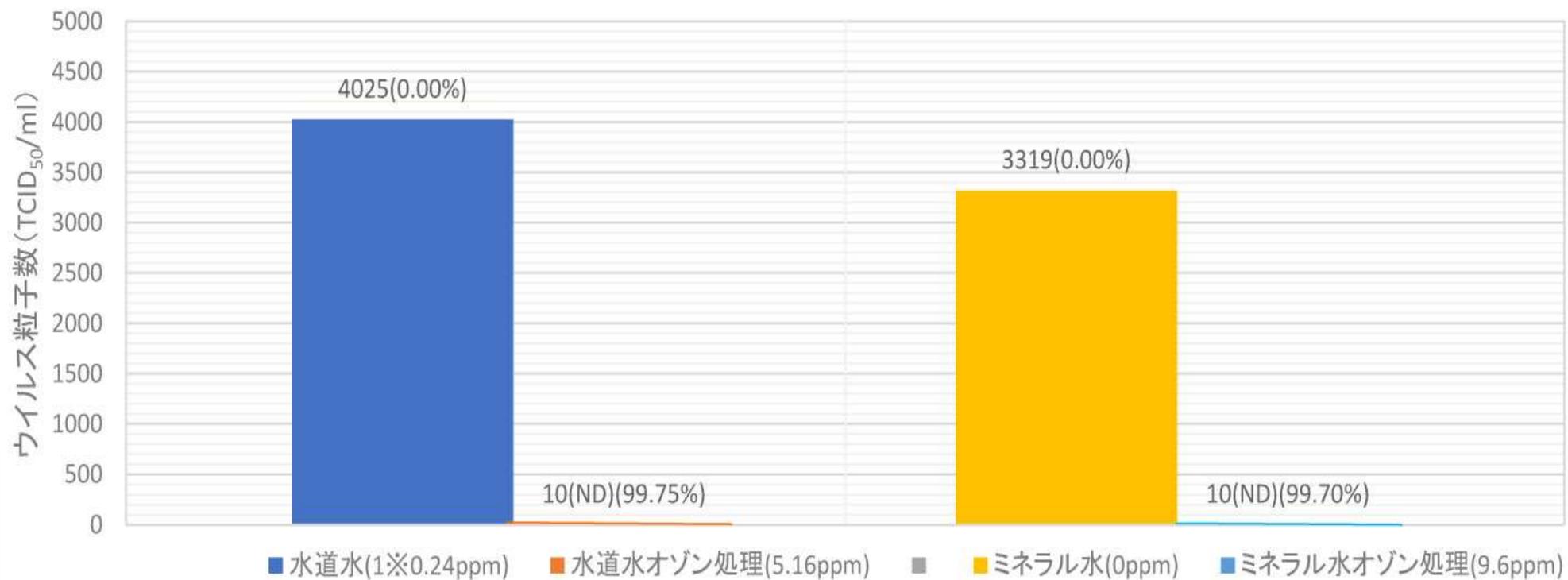
新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に対するミナノスのオゾン水との接触わずか10分で感染価が検出限界以下となり (ウイルス不活性化率99%以上)、高い効果が確認されました。

また、再現試験 (2回目) も行い、同様の結果が得られました。

今回、水道水とミネラル水で試験した結果、ミネラル成分が多く含まれるミネラル水のほうがオゾン水濃度が高くなり、水道水に含まれる塩素成分がオゾン濃度を下げている結果となりました。なお、水道水に含まれる塩素成分ではウイルス不活性化効果に差が無くオゾン水の効果がいかに高いかが確認できました。

	感染性ウイルス粒子数(平均)/ml
水道水(1※0.24ppm)	4025
水道水オゾン処理※(5.16ppm)	10(検出限界以下)
ミネラル水※(0ppm)	3319
ミネラル水オゾン処理※(9.6ppm)	10(検出限界以下)
1※ 水道水残留塩素のオゾン重量換算濃度を示す。 ※反応時間10分 NDは計測限界数10個として計算する。 * ()内はオゾン濃度を示す	

## 新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)ウイルス粒子数



オゾン水はマルナカミナノスにて生成

## ②A型インフルエンザウイルスによる不活性化試験 (「ミナノス」で生成したオゾン水を滴下)

試験機関：京都大学ウイルス・再生医科学研究所野田教授グループ

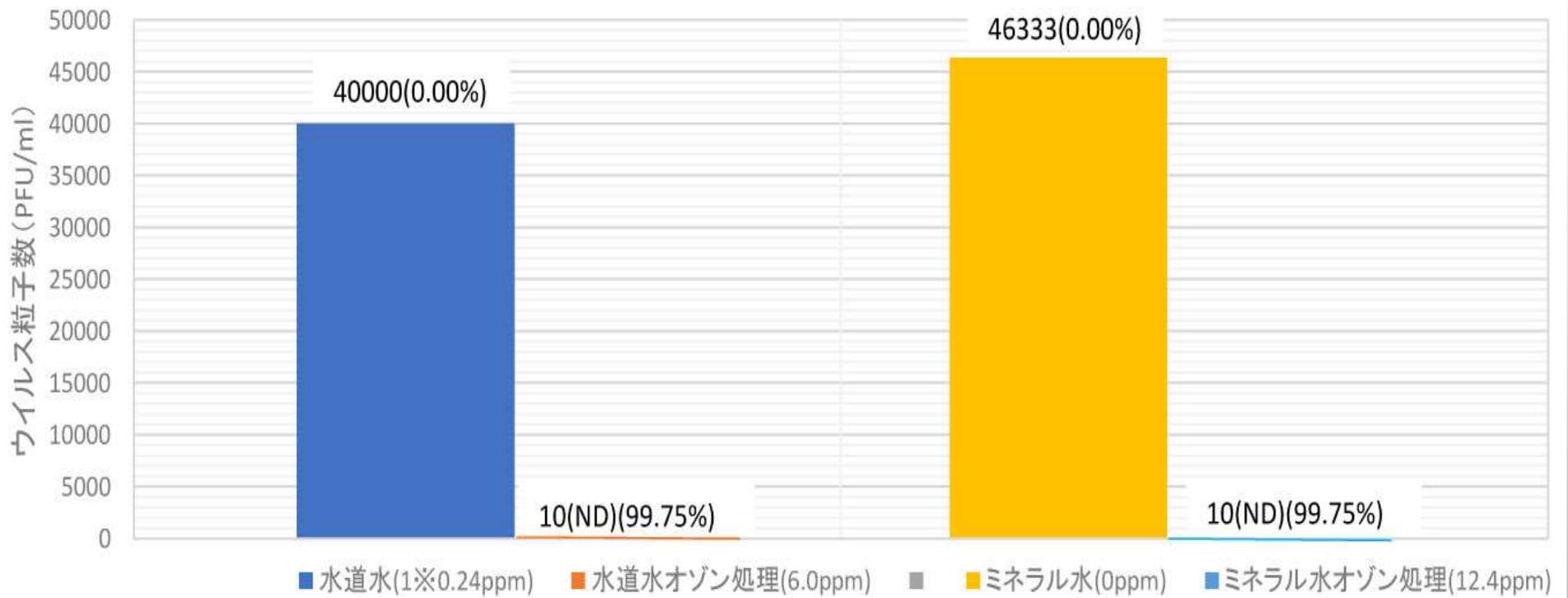
使用したウイルス株：A/California/04/2009 (H1N1)

(A型インフルエンザウイルス)

新型コロナウイルスと同様にA型インフルエンザウイルスについても不活性化試験を実施したところ、同様に10分で感染価が検出限界以下となり（ウイルス不活性化率99%以上）、高い効果が確認されました。

	感染性ウイルス粒子数(平均)/ml
水道水(1※0.24ppm)	40000
水道水オゾン処理※(6.0ppm)	10(検出限界以下)
ミネラル水※(0ppm)	46333
ミネラル水オゾン処理※(12.4ppm)	10(検出限界以下)
1※ 水道水残留塩素のオゾン重量換算濃度を示す。 NDは計測限界数10個として計算する。	
※反応時間(min)10分	
* ()内はオゾン濃度を示す	

## A型インフルエンザウイルス粒子数



オゾン水はマルナカミナノスにて生成

## オゾン水のウイルス不活化効果の検証

2021年9月15日  
京都大学ウイルス・再生医科学研究所  
微細構造ウイルス学分野・教授  
野田岳志

野田岳志

### 1) オゾン水によるウイルス不活化効果の検証

#### 1. 目的

オゾン処理をした水道水およびミネラル水がインフルエンザウイルスおよび新型コロナウイルスに対してウイルス不活化効果があるか検証する。

#### 2. 材料と方法

##### 使用したウイルス株

- ・インフルエンザウイルス：A/California/04/09 (H1N1) (ストック力価： $2 \times 10^8$  PFU/ml)
- ・新型コロナウイルス：SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-027 (ストック力価： $4 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml)
- ・5%BSA/MEM 培地 (インフルエンザウイルス)
- ・5%FCS/DMEM (新型コロナウイルス)

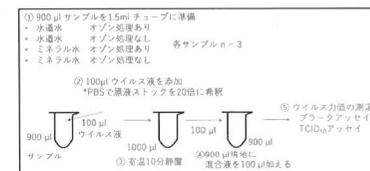
##### ウイルス力価の測定法

- ・インフルエンザウイルス：MDCK 細胞 (24well plate) を用いたブラークアッセイ法 (検出限界：10 PFU/ml)
- ・新型コロナウイルス：VeroE6/TMPRSS2 細胞 (96 well plate) を用いた TCID<sub>50</sub>法 (検出限界：10 TCID<sub>50</sub>/ml)

##### 検定方法

- ・対応のない t 検定

##### 方法の概要図



##### 方法手順

- ・各サンプルを調整、滴定する
- ・各サンプル 900 μl を 1.5 ml チューブに用意する (n=3)
- ・ウイルス原液ストックを PBS で 20 倍希釈して、ウイルス液を調整する
- ・各サンプルチューブにウイルス液 100 μl を添加し、その後ゼベティングする
- ・室温で 10 分静置する
- ・培地 900 μl に混合液 100 μl を加えて、オゾン反応を停止させる
- ・ウイルス力価の測定のため、ブラークアッセイまたは TCID<sub>50</sub>法を行う

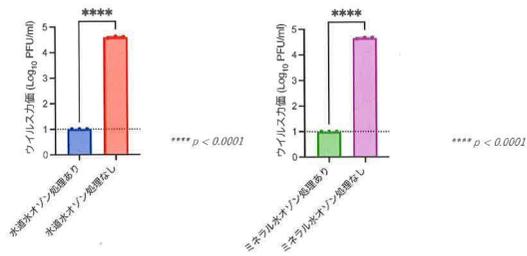
### 3. 結果

#### ■ インフルエンザウイルス（実施日：2021年5月28日）

		2021/5/28	
		オゾン濃度 (mg/L)	
水道水	オゾン処理あり	5.52	
水道水	オゾン処理なし	0.24	
ミネラル水	オゾン処理あり	12	
ミネラル水	オゾン処理なし	0	

	水道水		ミネラル水		PFU/ml
	オゾン処理あり	オゾン処理なし	オゾン処理あり	オゾン処理なし	
n1	10	41000	10	48000	
n2	10	37000	10	43000	
n3	10	42000	10	48000	
平均値(±SD)	10(±0)	40000(±2646)	10(±0)	46333(±2887)	

\* 検出限界は検出限界値 10 とする

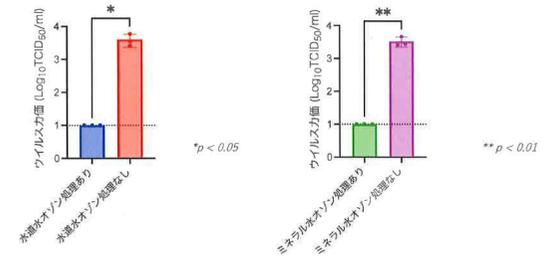


#### ■ 新型コロナウイルス（実施日：2021年6月7日）

		2021/6/7	
		オゾン濃度 (mg/L)	
水道水	オゾン処理あり	5.52	
水道水	オゾン処理なし	0.24	
ミネラル水	オゾン処理あり	10.8	
ミネラル水	オゾン処理なし	0	

	水道水		ミネラル水		TCID <sub>50</sub> /ml
	オゾン処理あり	オゾン処理なし	オゾン処理あり	オゾン処理なし	
n1	10	3548	10	2560	
n2	10	2560	10	2816	
n3	10	5967	10	4580	
平均値(±SD)	10(±0)	4025(±1752)	10(±0)	3318(±1100)	

\* 検出限界は検出限界値 10 とする



#### 小括

- ・インフルエンザウイルスおよび新型コロナウイルスに対して、約 5mg/L のオゾン水は 10 分間の処理でこれらのウイルスを 99% 以上不活化した。
- ・水道水およびミネラルウォーターから生成したオゾン水は、それぞれ同等のウイルス不活化効果を示した。
- ・水道水およびミネラルウォーターで処理した場合、どちらも同程度のウイルス力価を示したことから、水道水に含まれる塩素等が抗ウイルス活性に大きく寄与したわけではない。

## 2) ウイルス不活化に必要なオゾン濃度の検証

### 1. 目的

上記の検証では、約 5mg/L のオゾン濃度で不活化効果が示された。本検証ではインフルエンザウイルスを用いて、低濃度条件 (0.5mg/L, 2.5 mg/L) におけるウイルス不活化効果を検証する。

### 2. 材料と方法

#### 使用したウイルス株

・インフルエンザウイルス：A/California/04/09 (H1N1) (ストック力価： $2 \times 10^8$  PFU/ml) 培地 (オゾン反応停止用)

・5%BSA/MEM 培地 (インフルエンザウイルス)

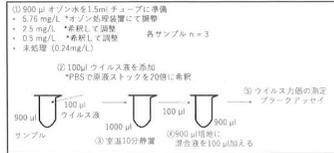
#### ウイルス力価の測定法

・インフルエンザウイルス：MDCK 細胞 (24well plate) を用いたブランクアッセイ法 (検出限界：10 PFU/ml)

#### 検定方法

・Dunnett 検定

#### 方法の概要図



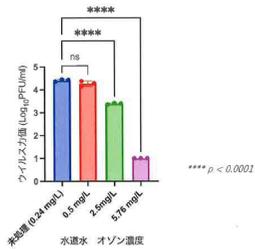
#### 方法手順

- ・ 水道水のオゾン水を調整する
- ・ 0.5, 2.5 mg/L のオゾン処理した水道水を調整する
- ・ 各サンプル 900 µl を 1.5 ml チューブに用意する (n=3)
- ・ ウイルス原液ストックを PBS で 20 倍希釈して、ウイルス液を調整する
- ・ 各サンプルチューブにウイルス液 100 µl を添加し、その後ピペティングする
- ・ 室温で 10 分静置する
- ・ 培地 900 µl に混合液 100 µl を加えて、オゾン反応を停止させる
- ・ ウイルス力価の測定のため、ブランクアッセイ法を行う

## 3. 結果

	未処理 (0.24 mg/L)	0.5 mg/L	2.5mg/L	5.76 mg/L	
n1	23000	14000	2300	10	
n2	27000	19000	2500	10	
n3	28000	24000	2600	10	
平均値(±SD)	26000(±2646)	19000(±5000)	2467(±153)	10(±0)	PFU/ml

\* 検出限界は検出限界値 10 とする



### 4. 小括

2.5mg/L オゾン水ではインフルエンザウイルスに対する不活化効果が認められたものの限定的だった。0.5mg/L オゾン水ではウイルスの不活化効果はほとんど認められなかった。

### 3) 結論

5mg/L オゾン水で 10 分間処理することでインフルエンザウイルスおよび新型コロナウイルスが不活化されることが確認された

5mg/L オゾン水がこれらウイルスを不活化するために要する時間については、今後の検討が必要である。

野田岳志 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所 微生物構造ウイルス学分野 教授)

## 4) 備考

### オゾン水によるウイルス不活化効果の検証の再現実験データ

- ・ インフルエンザウイルス (実施日：2021年5月7日)

		2021/5/7	
		オゾン濃度 (mg/L)	
水道水	オゾン処理あり	6	
水道水	オゾン処理なし	0.24	
ミネラル水	オゾン処理あり	12.4	
ミネラル水	オゾン処理なし	0	

	水道水 オゾン処理あり	水道水 オゾン処理なし	ミネラル水 オゾン処理あり	ミネラル水 オゾン処理なし	
n1	10	25000	10	41000	
n2	10	30000	10	38000	
n3	10	26000	10	44000	
平均値(±SD)	10(±0)	27000(±2646)	10(±0)	41000(±3000)	PFU/ml

\* 検出限界は検出限界値 10 とする

- ・ 新型コロナウイルス (実施日：2021年6月15日)

		2021/6/15	
		オゾン濃度 (mg/L)	
水道水	オゾン処理あり	5.16	
水道水	オゾン処理なし	0.24	
ミネラル水	オゾン処理あり	9.6	
ミネラル水	オゾン処理なし	0	

	水道水 オゾン処理あり	水道水 オゾン処理なし	ミネラル水 オゾン処理あり	ミネラル水 オゾン処理なし	
n1	10	4368	10	1774	
n2	10	3548	10	3548	
n3	10	7096	10	3548	
平均値(±SD)	10(±0)	5004(±1858)	10(±0)	2957(±1024)	TCID <sub>50</sub> /ml

\* 検出限界は検出限界値 10 とする

### ③豚コロナウイルスによる不活性化試験

(ミナノス本機を1 m<sup>3</sup>の試験箱に入れ、ミストを散布し、ウイルス検体に対するウイルス不活性化を確認)

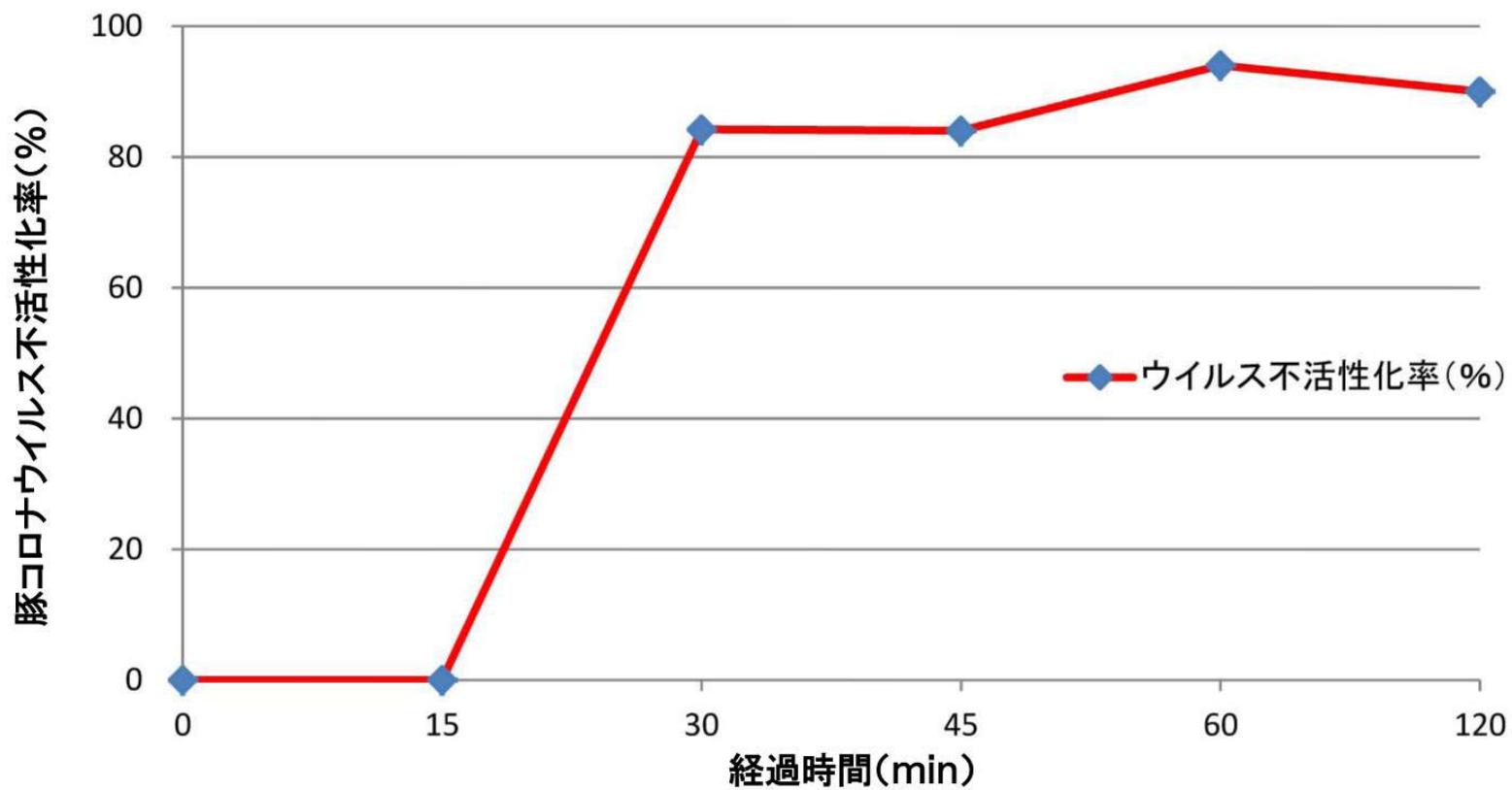
試験結果：「ミナノス」の効果は、60分後以後に90%以上のウイルス不活性化効果を得ることが出来た。

試験機関：株式会社 食衛生研究

使用したウイルス株：豚コロナウイルス

経過時間 (min)	0	15	30	45	60	120
ウイルス不活性化率 (%)	0.0	0.0	84.2	84	93.7	90.0

## 豚コロナウイルス不活性化率(%)



オゾンミストはマルナカミナノスにて生成

噴霧ナノバブルミストによるウイルスに対する不活化効果試験 (1m<sup>3</sup>)

—試験報告書—  
試験番号：207737N

株式会社 食環境衛生研究所  
  
群馬県前橋市荒口町 561-21  
Tel027-230-3411  
Fax027-230-3412

1. 試験表題  
噴霧ナノバブルミストによるウイルスに対する不活化効果試験 (1m<sup>3</sup>)
2. 試験番号  
207737N
3. 目的  
1m<sup>3</sup>空間において、豚コロナウイルス (PEDV) に対して試験資材を稼働した時のウイルス不活化効果を確認するために実施した。
4. 試験管理組織  
試験依頼者の名称及び所在地  
名称 株式会社 マルナカ  
所在地 〒601-8307 京都府京都市南区吉祥院向田西町 11  
  
実施機関の名称、所在地及びその長の氏名  
名称 株式会社 食環境衛生研究所  
所在地 群馬県前橋市荒口町 561-21  
氏名 代表取締役 久保 一弘  
  
試験実施責任者の氏名  
鈴木 達也  
  
試験担当者の氏名  
遠藤 昇里
5. 試験期間  
2021年7月6日～2021年7月14日
6. 試験資材  
オゾンミスト発生装置「マルナカミナノス MNS1」
7. 供試微生物  
PED ウイルス：Porcine epidemic diarrhea virus P-5V 株  
※豚感染性のコロナウイルス  
培養細胞：vero 細胞 (アフリカモドリザルの腎臓上皮由来株化細胞)

## 8. 区の設定

区	条件	測定時点 (開始時の他5時点)
対照区 1	無処理 (チャンバー内)	0分(開始時)、15分、30分、45分、60分、120分
対照区 2	ミネラルウォーター噴霧 (チャンバー内)	0分(開始時)、15分、30分、45分、60分、120分
試験区	試験資材稼働 (チャンバー内)	0分(開始時)、15分、30分、45分、60分、120分

## 9. 試験方法

「ウイルス実験学 総論 改訂二版 丸善株式会社 ウイルス中和試験法」を参考として実施した。

## 10. 試験手順

対照区 1:

- ① 試験室内に試験用チャンバー (1m<sup>3</sup>) を配置した。
- ② 供試ウイルス液を、6枚のシャーレに1mLずつウイルス液を分注した。
- ③ 試験用チャンバーにシャーレを設置した後、直ちに1枚を回収し、0分のウイルス価とした。
- ④ 所定時間後にシャーレをそれぞれ回収し、ウイルス価を測定した。

対照区 2:

- ① 試験室内に試験用チャンバー (1m<sup>3</sup>) を配置した。
- ② 供試ウイルス液を、6枚のシャーレに1mLずつウイルス液を分注した。
- ③ 試験用チャンバーにシャーレを設置した後、直ちに1枚を回収し、0分のウイルス価とした。
- ④ ネブライザー (オムロンヘルスケア㈱、NE-C28) によりミネラルウォーターの噴霧を開始し、所定時間後にシャーレをそれぞれ回収し、ウイルス価を測定した。なお、試験中はミネラルウォーターを噴霧し続けた。

試験区:

- ① 試験室内に試験用チャンバー (1m<sup>3</sup>) を配置した。
- ② 供試ウイルス液を、6枚のシャーレに1mLずつウイルス液を分注した。
- ③ 試験用チャンバーにシャーレを設置した後 (写真1)、直ちに1枚を回収し、0分のウイルス価とした。

- ④ 試験資材を稼働させ、所定時間後にシャーレをそれぞれ回収し、ウイルス価を測定した。なお、試験中は試験資材を稼働し続けた。

写真 1

細胞接種:

回収したウイルス液をそれぞれ 10 倍段階希釈し、96well プレートに培養した細胞に 100μL ずつ接種した。

判定は、37℃、炭酸ガス培養 (5%) で 5 日間培養した後、培養細胞を顕微鏡観察し、培養細胞に現れる CPE (細胞変性) をもってウイルス増殖の有無を確認し、ウイルス回収液におけるウイルス感染価を算出した。

## 11. 結果

PED ウイルスに対する試験結果を下記に示した。

表 1 PED ウイルス感染価(log[TCID<sub>50</sub>/mL])

区	試験開始時	15分後	30分後	45分後	60分後	120分後
対照区 1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	5.9
対照区 2	6.1	6.1	6.1	5.7	5.3	5.1
試験区	6.1	6.1	5.3	5.3	4.9	4.9

表 2 各対照区と比較した減少率

減少率 (%)	試験開始時	15分後	30分後	45分後	60分後	120分後
減少率 (対照区 1 との比較)	0.0	0.0	84.2	84.2	93.7	90.0
減少率 (対照区 2 との比較)	0.0	0.0	84.2	60.2	60.2	36.9

## 12. 考察

今回、試験資材の稼働による、1m<sup>3</sup>空間におけるウイルスに対する不活化効果試験を、豚コロナウイルスである PED ウイルスを用いて実施した。

その結果、試験資材噴霧 60 分以後に無処理区（対照区 1）と比べ >90% のウイルス感染価の減少がみられた。

【試験実施中の写真】



ウイルス液

試験資材

#### ④大腸菌による不活性化試験

(ミナノス本機により約40㎡の部屋でオゾン水ミストを散布し、菌検体に対する菌不活性化を確認)

試験結果：80分で約40平米の部屋の大腸菌がほぼ不活性化する効果を得た。

試験機関：京都府中小企業技術センター

使用した菌：大腸菌

成績書

No. 20211308-001

令和3年4月26日

株式会社 マルナカ 様

京都府中小企業技術センター 所長



令和3年4月21日付けで依頼の試験結果は、次のとおりです。

試験名 オゾン発生装置 大腸菌殺菌試験 試料

試験結果 微生物試験 培養

サンプル No.	死滅率 (%)	
	40min	80min
2 m	52	96
3.5 m	92	96
4.5 m	97	97
5.5 m	93	99

【試験方法】  
LB液体培地で培養した大腸菌(IFO 3301)を約100cfu/枚になる様にメンブレンフィルターでろ過し、大腸菌を接種した接室ターナルを40分又は80分間オゾン発生装置を稼働させ、大腸菌を接種した接室ターナルを標準寒天培地で培養し、大腸菌の死滅率を求めた。

試験者

