

「オゾンによるネコカリシウイルスの不活化」(第4報) ～オゾン殺菌装置によるネコカリシウイルスの不活化～

(高知高専・物質工学科) 土居 俊房

1. はじめに

昨年12月老人福祉施設や介護施設、病院などでノロウイルスによる胃腸炎が全国的に大流行した。この胃腸炎の代表的なものは生ガキによる食中毒であり、生ガキの中腸腺に蓄積されたノロウイルスがヒトの小腸で増殖して急性胃腸炎を引き起こす。ノロウイルスによる急性胃腸炎は食品によるほか、水を介する場合、さらにヒト-ヒトで伝播することが明らかになってきた。老人福祉施設や介護施設、病院におけるヒトからヒトへの2次感染の経路は、感染者が調理した食事や感染者の汚物などからの直接感染と、風呂、トイレなどの共同の施設が媒体となることが考えられる。

また、従来から使用されてきた塩素は、ノロウイルスの殺菌の場合、高濃度でないと効果がないことが知られている。現在、オゾン殺菌や紫外線殺菌が注目されているが、ノロウイルスの培養系が確立されておらず、その不活化の条件など不明な点が多い。

そこで、本研究ではノロウイルスと同じカリシウイルス科に属するネコカリシウイルスが培養可能であることに着目し、循環式浴槽水におけるオゾン水およびオゾン殺菌装置によるネコカリシウイルスの不活化に及ぼす溶存オゾン濃度、接触時間、CT値(溶存オゾン濃度×接触時間)、pH、有機物濃度の影響を明らかにする。また、ノロウイルス不活化を目的とした循環式浴槽用オゾン殺菌装置の開発・設計を行う。

2. 実験

(1) ネコカリシウイルス

予めネコ肝臓細胞を Eagle's MEM 培地(ニッスイ)に5%子牛胎児血清, 0.15%重曹(炭酸水素ナトリウム)を加えた培養液 200mL で培養し、これにネコカリシウイルス(以下、FCV という)を加え、ネコカリシウイルスを増殖させた。

増殖させたウイルスを以下の方法により精製、濃縮した。

ウイルス培養液 200mL を 10,000rpm で 20 分間遠心分離を行い、懸濁物質を除去した。

上澄みを 30% しょ糖に重層し、45,000rpm で 4 時間遠心分離を行い、ウイルスを沈殿させた。

上澄みとしょ糖を除去し、下層を滅菌蒸留水 200mL に浮遊させた。

再度、45,000rpm で 4 時間遠心分離を行い、上澄みを除去後、ウイルスを含む下層を滅菌蒸留水 20mL に再浮遊させた。ウイルス濃度は 1.204×10^{10} copy/mL であった。

上記のサンプルを 1mL ずつに小分けし、-80 で凍結保存した。

(2) 実験方法

Fig.1 にオゾン殺菌装置のフロー図を示す。また Table 1 にオゾン殺菌装置の運転条件を示す。

実験装置に 7.9mM-リン酸緩衝液(pH 7.0) 55kg を入れ、流量 5.0 L/min(循環時間: 11 分)で循環した。循環水の温度はエジェクタ出口に熱伝対を設け、ヘッドタンクに設置したヒータにより 40℃ 一定に保った。ウイルス 5mL をヘッドタンクから投入し、酸素ガスを 0.171 NL/min の流量で注入しながら 3 回循環させた。その後、オゾン発生器の電源を入れ、オゾンガスを 0.171 NL/min の流量で注入した。タンク出口より循環水 100mL を採取し、5wt% チオ硫酸ナトリウム溶液 0.2mL を加えてオゾンを不活化後、-20℃ 冷蔵庫に保存した。

ガス中のオゾン濃度を気相 UV 吸収式オゾンモニタを用いて測定した。またタンク出口とエジェクタ出口の循環水中の溶存オゾン濃度を液相 UV 吸収式オゾンモニタで測定した。

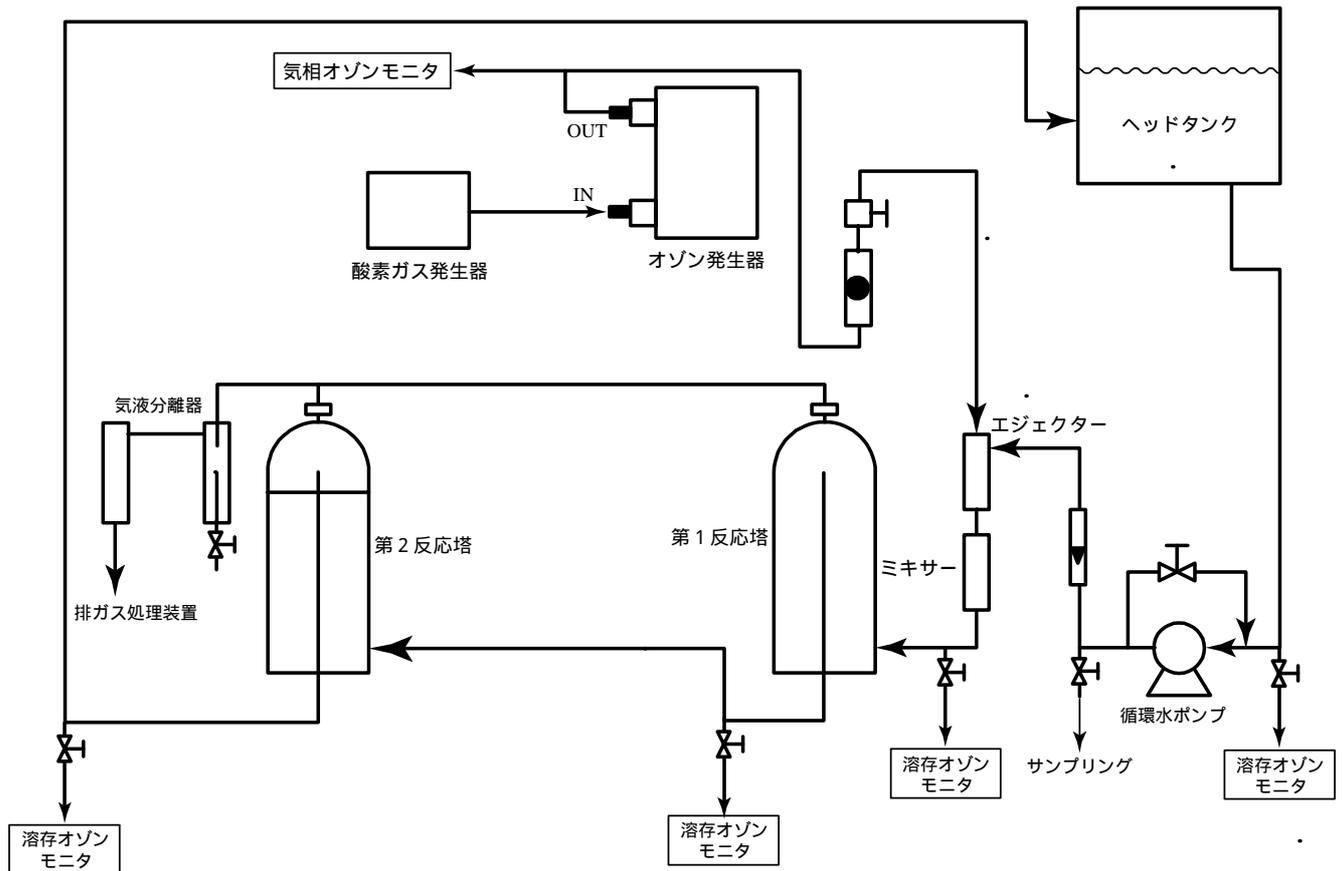


Fig.1 Schematic diagram of the experimental system

Table 1 Conditions of the experimental system

温度： 40	平均オゾンガス濃度： 11.47 ± 0.49 mg/NL
pH： 7.0	オゾンガス流量： 0.171 NL/min
循環水： 55 kg (55.4L)	オゾンガス注入率： 0.392 mg/L-Water
循環水流量： 5.0 L/min	ウイルス濃度： 1.1×10^6 copy/ml
循環時間： 11.1 min	

(3) ウイルス濃度測定方法

サンプル 0.25ml を取り，RNA を抽出を行い，最終的に 50 μ L とした。この RNA 液 8.5 μ L を取り，逆転写反応を行い DNA へ置き換えた。この DNA 液を 5 μ l 取り，リアルタイム PCR によりウイルスの定量を行った。このときの検出限界は 500 copy/mL である。

3. 結果

Fig.2 に気相中のオゾン濃度の経時変化を示す。オゾン濃度はオゾン発生器の電源を入れてから 90 秒でほぼ一定値となり，平均値は 11.47 ± 0.49 mg/NL である。

Fig.3 にタンク出口およびエジェクタ出口の溶存オゾン濃度の経時変化を示す。タンク出口の溶存濃度は循環数 3 回まではほぼゼロであるが，その後徐々に増加し，循環数 5 回で一定値 0.07mg/L を示している。一方，エジェクタ出口の溶存オゾン濃度は循環数 0.5 回まで急激に増加し，その後は徐々に増加し，循環数 5 回で一定値 0.46mg/L を示している。

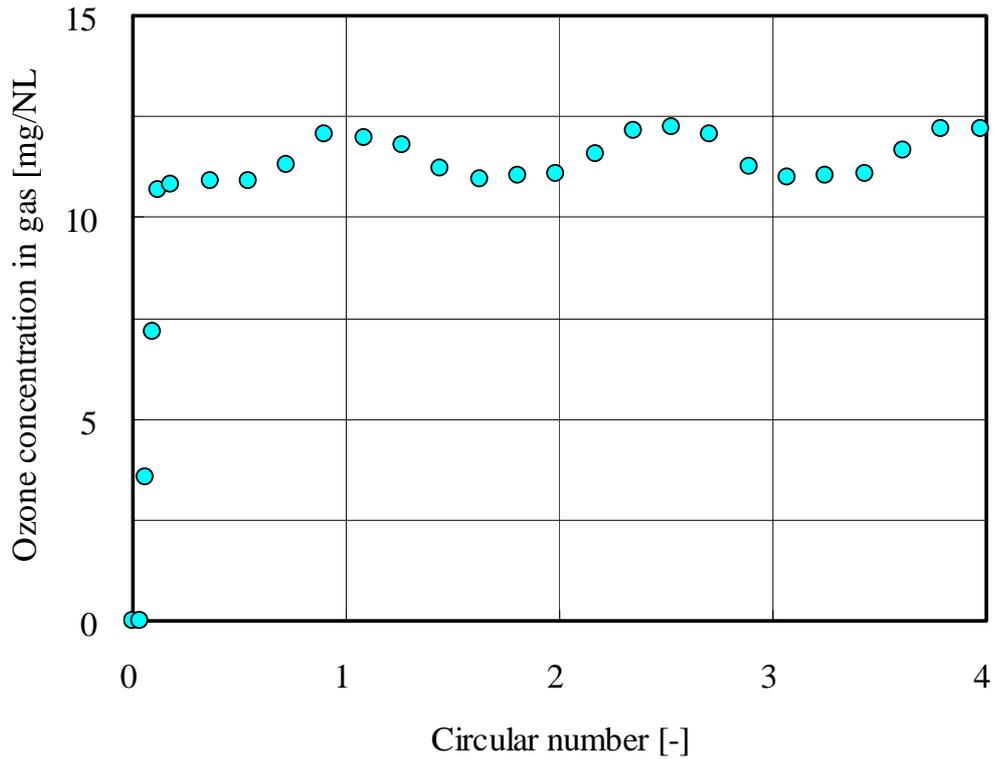


Fig.2 Time course of ozone concentration in gas.

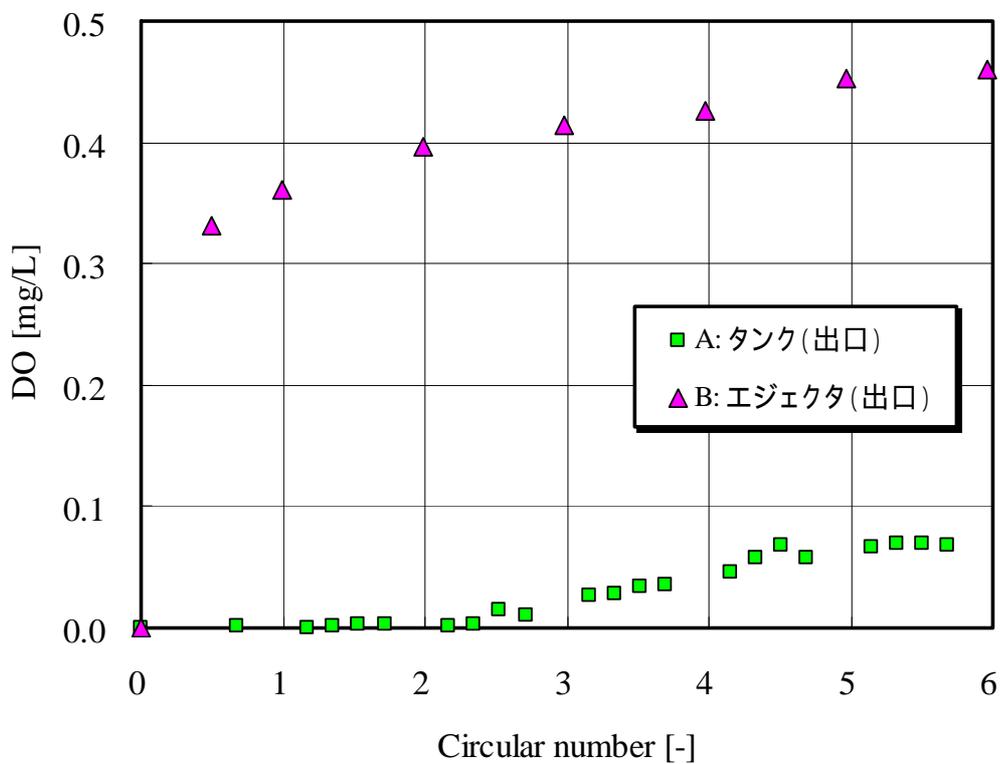


Fig.3 Time course of dissolved ozone concentration.

Fig.4 に気相および液相のオゾン濃度から求めたオゾン注入率（循環水 1L 当たりのオゾン供給量または吸収量）の比較を示す。両者の値はほぼ一致し，その平均値は 0.39 mg/L-water である。両者の値がほぼ一致していることからオゾンの吸収率は 100%である。

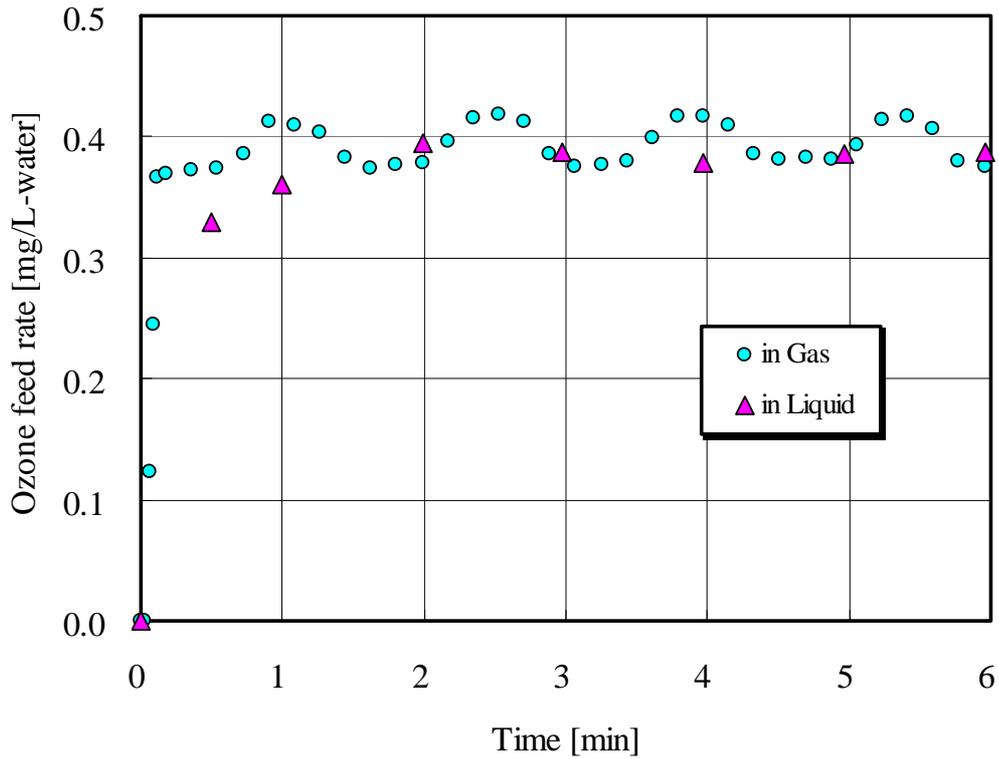


Fig.4 Comparison of ozone feed rate in gas and liquid.

Fig.5 にネコカリシウイルスの生存率を示す。酸素ガス注入により生存率は 40%まで低下し，不活化率は 60%である。酸素ガスのみでは不活化率はそれ以上，上昇しない。オゾンガス注入により生存率は循環数 1 回で 1/1000 まで低下し，不活化率は 99.9%以上である。この値は検出下限値である。

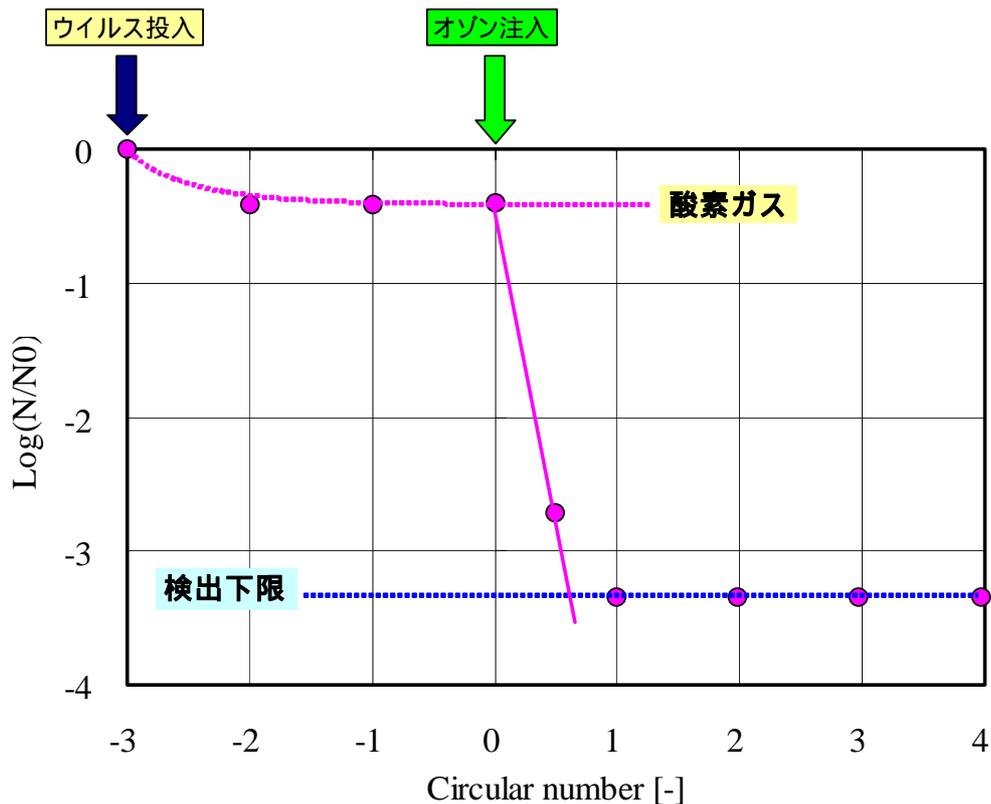


Fig.5 Time course of Ozone inactivation of FCV

4 . 結 論

オゾン殺菌装置によるネコカリシウイルスの不活化は 40 ， pH 7.0 ， オゾン注入率 0.39 mg/L-water の条件において循環数 1 回で 99.9% 以上であることが分かった。

以上