

消毒の指標として視覚的にオゾン曝露量を示す 感度可変インジケータの作製

石渡 俊二¹⁾, 橋本 貴子¹⁾²⁾, 井上 知美¹⁾, 小竹 武¹⁾

¹⁾近畿大学薬学部臨床薬学部門医療薬剤学分野

²⁾堺市立総合医療センター

(2020年12月28日受付)

要旨：【目的】新型コロナウイルス感染症の感染拡大によって、世界的規模でマスクの需要が急激に増え供給不足が続いてきた。このような状況を踏まえて、2020年4月に厚生労働省新型コロナウイルス感染症対策推進本部からマスクの再使用に関する通知が発出され、多くの医療機関において簡単な消毒の後にまたは未消毒のままマスクが再使用されていた。

これまでもオゾンガスを用いた消毒は試みられており、新型コロナウイルスに対してオゾンガスが有効であることが報告されたために期待が高まっている。しかし、オゾン曝露量を担保するためには、機器本体とは独立して視覚的に確認できるインジケータが併用されることが望ましい。そこで、通常の実験室レベルで容易に調整可能で、オゾン曝露量を視覚的に示す感度可変インジケータの作製を行った。

【方法】プロモフェノールブルー液 (BPB) をポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に滴下して乾燥させた後、オゾンガスを曝露した。亜硫酸ナトリウムを添加することによって、色調変化の感度を調節した。

【結果】オゾン曝露量であるCT (曝露濃度と時間の積) 値50までの範囲で、曝露量に依存してBPBインジケータの退色が進行した。添加するチオ硫酸ナトリウム濃度を変化させることによって、BPBインジケータのオゾンに対する感度を制御することができた。

【結論】病原微生物に対する奏功CT値に合わせて感度を変化させることができるオゾン曝露量インジケータを容易に作製する方法を確立した。感染拡大によってオンサイトで緊急避難的に消毒を行わなければならない時などに、本研究の成果が役立つものと思われる。

(日職災医誌, 69:174-179, 2021)

—キーワード—

感染症, オゾン, 消毒

緒 言

新型コロナウイルス感染症 (coronavirus disease 2019; COVID-19) は世界規模で拡大しており、本論文執筆時点において (2020年12月)、我が国の新型コロナウイルスの累計感染者数および累計死亡者数はそれぞれ約20万人および約2,800人、全世界では約7,700万人および約170万人となっている¹⁾。本感染症に対するマスクの効果に対する見解は分かっていたが、現在までに感染拡大の防止に対してマスクの着用が有効であることが分かってきた²⁾。このため、世界的規模でマスクの需要が急激に増え、供給が不足していた。

このような状況を踏まえて、2020年4月14日に厚生

労働省新型コロナウイルス感染症対策推進本部から、「サージカルマスク、長袖ガウン、ゴーグル及びフェースシールドの例外的取扱いについて」が発出された³⁾。本文中では、サージカルマスクおよび長袖ガウンは継続使用を検討すること、ゴーグルおよびフェースシールドは適切な洗浄および消毒を行い、再利用を検討することとされている。

マスクなどを再使用する前に、小箱などの閉鎖空間内においてマスクを化学物質処理する方法が検討されてきた。オゾンガスは強い酸化力を有し、容易に産生および分解することができることから、再利用前の処理方法として期待されている。これまでにオゾンガスが細菌やウイルスに対して有効であることが報告されてきたが⁴⁾、新

型コロナウイルスに対する効果は不明であった。しかし、最近、矢野らによって閉鎖空間内でオゾンガスが新型コロナウイルスを失活させることが報告された⁵⁾。また、オゾンガスの複数回曝露によって、マスクのフィルター効率などが影響を受けないことが Dennis らによって報告されており、不足しているマスクなどをオゾンガスによって再使用可能にする道が開けてきた⁶⁾。

消毒や滅菌などのプロセスにおいて、万一、機器の不具合が起こると殺滅が不十分となって大きな事故につながる恐れがあり、絶対に避けなければならない。このため、例えば乾熱滅菌やオートクレーブでは予定されたプロセスが完全に終了したことを確認するため、機器本体のプログラムだけでなく、色調変化などによって視覚的に示すテープなど機器本体とは独立したインジケータが併用される。そこで、我々は、通常の実験室レベルで容易に調製可能であり、不足しているマスクなどをオゾン曝露量インジケータを開発したので以下に詳述する。

試 薬

実験の部

プロモフェノールブルー (bromophenol blue ; BPB) およびチオ硫酸ナトリウムは富士フィルム和光純薬社 (大阪) から購入した。polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は Millipore 製 (Burlington) の親水性メンブレン (ポアサイズ 5.0 μ m) を、ろ紙はアドバンテック社製 (東京) の定性濾紙 No.2 を、それぞれ使用した。

オゾンインジケータ

BPB インジケータの調製は以下のように行った。BPB を最終濃度が 0.02% となるように 25mM リン酸緩衝液 (pH6.8) に溶解した (BPB 液)。この液を PVDF 膜に滴下、乾燥した。チオ硫酸は指定の濃度になるように BPB 液に溶解した。

オゾンの曝露

BPB インジケータのオゾンの曝露には、既に報告した抗がん剤分解用のハンドメイドのオゾン曝露装置を使用した。⁶⁾すなわち、塩化ビニル製の曝露槽 (650 \times 400 \times 450mm) にオゾン発生器であるハンディクリーンとオゾンセンサー OZMG-05DA-18 (いずれもタムラテコ社、大阪) を入れ、5 または 30ppm のオゾン濃度になるように制御した。湿度は湿度センサー ES2-HB (オムロン社、京都) と超音波加湿器によって制御し、特に記述がない限り 70% に設定した。温度は室内用エアコンで制御し、20~25 $^{\circ}$ C の範囲で実験を行った。オゾン曝露量は、オゾン濃度 (ppm) と曝露時間 (分) の積を CT (concentration-time) 値として表した。

画像の解析

BPB インジケータをろ紙上に置き、蛍光灯照明下に

デジタルカメラで撮影した。画像には National Institute of Health (Bethesda) 製の解析ソフト Image J 1.52v を用いた。BPB インジケータの色調とコントロールであるろ紙の色調を解析し、両者の差をデータとして表示した。各群のデータは、それぞれ 3 個の実験値の平均および標準偏差として示した。

結 果

実験の部で述べた方法で調製した BPB インジケータにオゾン曝露した。オゾン曝露量 CT 値 50 までの範囲で、オゾン曝露量に依存して BPB インジケータの退色が進行した (図 1 (A))。画像解析ソフトで解析した場合も視覚とほぼ同様な結果であり、画像解析値が 10 以下になると BPB の青色を認識しづらかった (図 1 (B))。また、CT 値 50 で以上では青色が退色し、その後は変化が認められなかった (図 2)。

次にオゾンによる BPB インジケータの退色に対する、湿度の効果を検討した (図 3)。オゾン曝露槽内の湿度を 50% あるいは 90% に変化させたところ、いずれの湿度条件下においても湿度 70% の場合と同様に CT 値 50 で青色が退色し、その後は変化が認められなかった。

最後により高いオゾン曝露量に対して BPB インジケータが機能できるか検討した (図 4A, 4B)。BPB インジケータへのチオ硫酸ナトリウムの添加濃度が増加するに従って、オゾンによる脱色は抑制された。BPB インジケータの画像解析値が 10 以下になったのは、チオ硫酸ナトリウム濃度 3% では CT 値 200、5% では 300、7% では 400 であった。

考 察

消毒や滅菌に使用するインジケータは、プロセス前後で色調の変化が明瞭なこと、結果が安定していること、使用前または後に処理などの必要がなく汎用性があること、などの条件を備えていることが望ましい。さらに、2003 年に SARS が流行した際にもマスク不足は発生し、新型インフルエンザの流行も危惧されることから、このような新たな感染症による脅威は今回の COVID-19 以降も続くことが予想される。このため、インジケータの感度は感染原因菌やウイルスの感受性に対応して容易に変化させられることが望ましい。

これまでに、オゾンガスの曝露量を視覚的に示すインジケータとして、ヨウ化カリウムでんぷん紙やアントラキノン系化合物を用いたものが報告されている^{7)~9)}。我々は、まず容易に入手可能なヨウ化カリウムでんぷん紙を検討したが、オゾン曝露を行うと一旦着色した後、さらに曝露を続けると脱色してもとの白色に戻るため、インジケータとしてのさらなる検討を断念した。一方、アントラキノン系化合物を利用したインジケータでは、その化合物に固有の特定の感度に固定された (デー

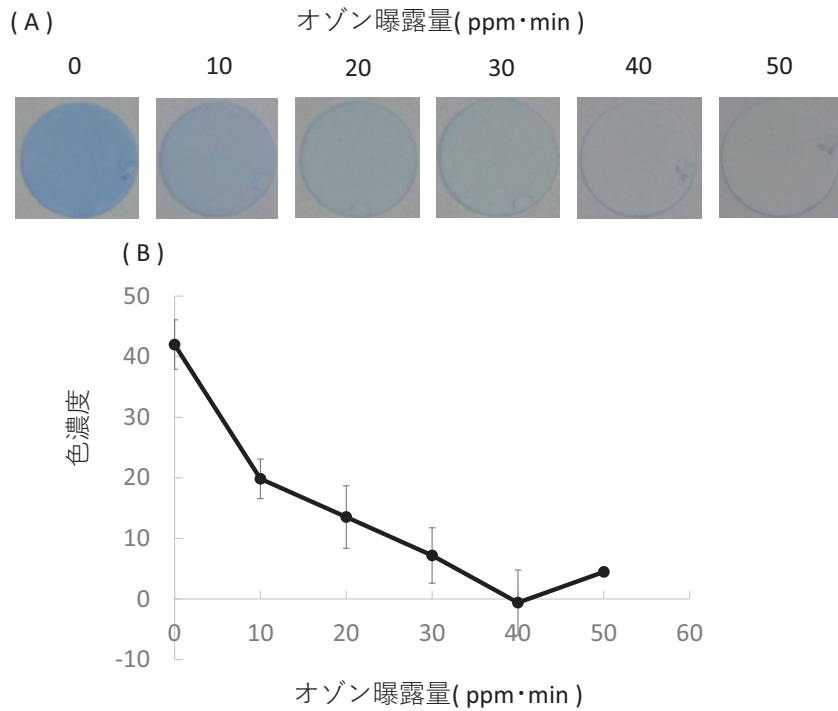


図1 低曝露量オゾンによるBPBインジケータの退色 (A) インジケータ画像 (B) 画像解析結果

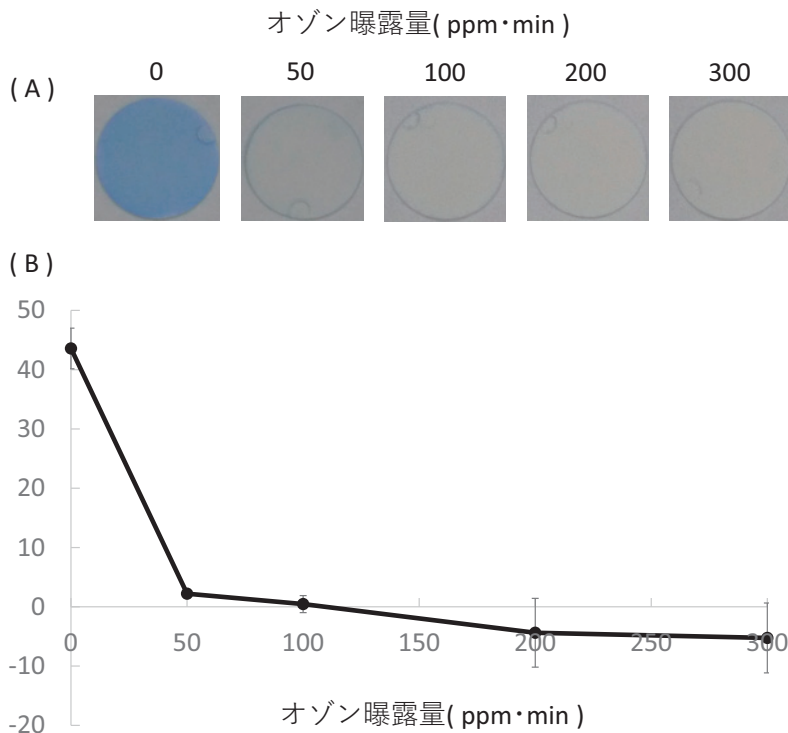


図2 高曝露量オゾンによるBPBインジケータの退色 (A) インジケータ画像 (B) 画像解析結果

タ不掲載).

最近, 矢野らによって, 新型コロナウイルスに対してCT値60までオゾンガスを曝露するとウイルス活性は1/10~1/100まで, CT値330では1/1,000~1/10,000ま

で減弱することが報告された⁵⁾. また, これまでにHudsonらは, オゾンガスに対するヘルペスウイルスやインフルエンザウイルスの感受性を検討し, CT値100以下で失活することを報告している¹⁰⁾. これらの報告をもと

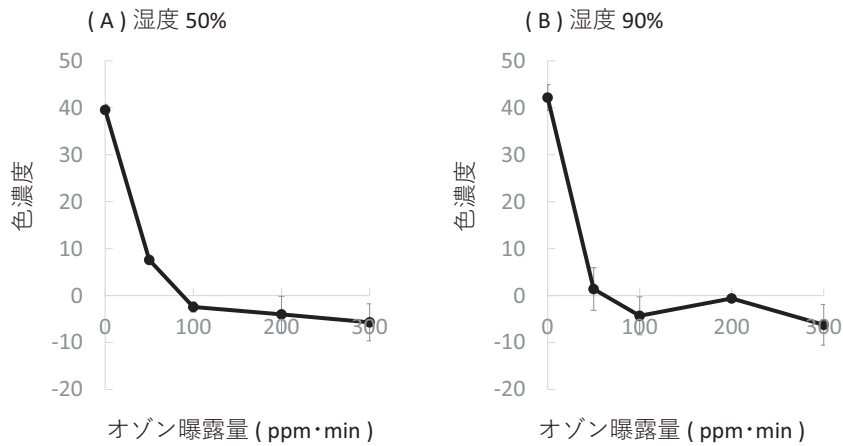


図3 オゾン曝露によるBPBインジケータの退色に対する湿度の効果
(A) 湿度50% (B) 湿度90%

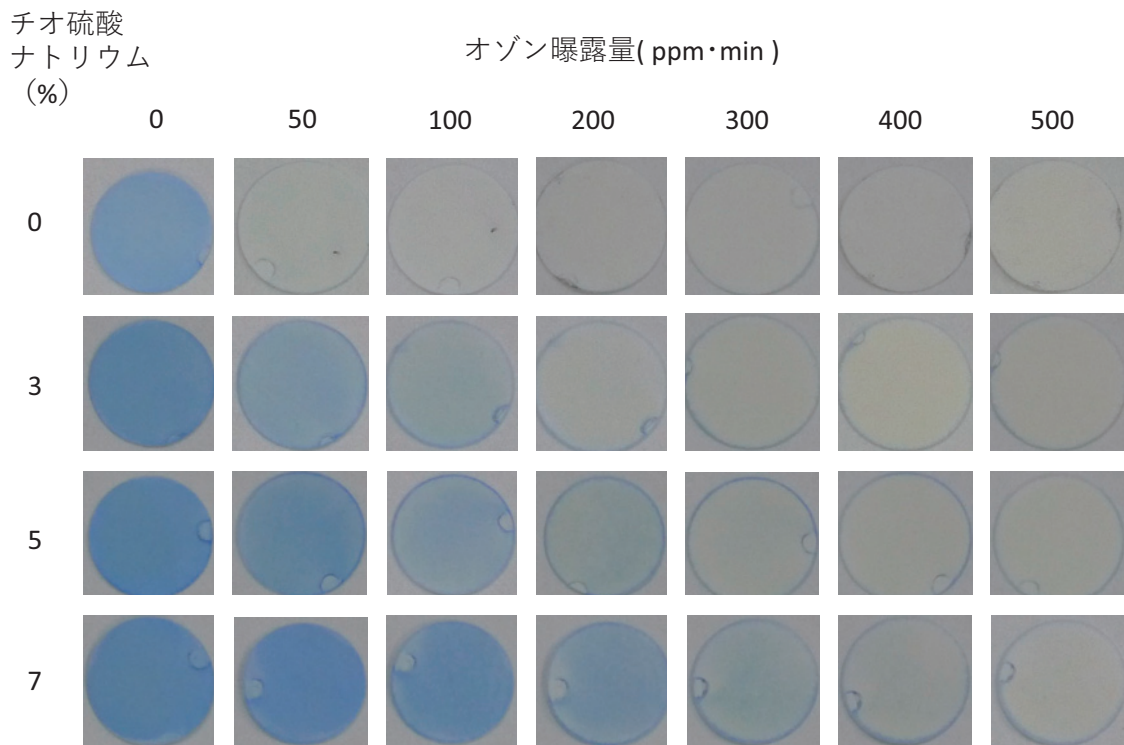


図4A オゾン曝露によるBPBインジケータの退色に対するチオ硫酸ナトリウムの効果 (画像)

に、本件研究では、オゾンインジケータの感度を50～500ppmまでの範囲で検討した。我々が調製したBPBインジケータはCT値50まで曝露量に依存して脱色が進行し、さらにオゾンガスを曝露してもメンブレンに変化は認められなかった。さらに、還元性を持つチオ硫酸ナトリウムをBPBインジケータ調製時に添加することによって、オゾンによってBPBが脱色する曝露量をCT値50から400の範囲で多段階に調整することができた。今後、新たに感染症の爆発的な感染拡大が起こった場合にも、原因微生物に対するオゾンの奏功CT値が明らかになれば、その奏功CT値に合わせてBPBインジケータの感度を任意に調製することが可能である。

最後に、2020年5月頃に本邦の多くの医療施設で経験されたようなマスク等の不足が再び起こり、本インジケータを指標として小箱中でマスクのオゾン曝露を行う場合の問題点について考察する。オゾンガスの活性は湿度に依存し、湿度が高い方が分解活性が高いことが報告されている¹¹⁾¹²⁾。一方、鍵らは、本邦の病院施設における空気環境は季節によって変化し、湿度40%以下から70%以上までの広範囲であったことを報告している¹³⁾。今回の検討において、湿度50～90%の範囲ではCT値50までにインジケータが脱色することを確認しているが、極端に低い湿度条件下での使用には注意が必要と思われる。次に、オゾンガスに対するマスクの耐久性につ

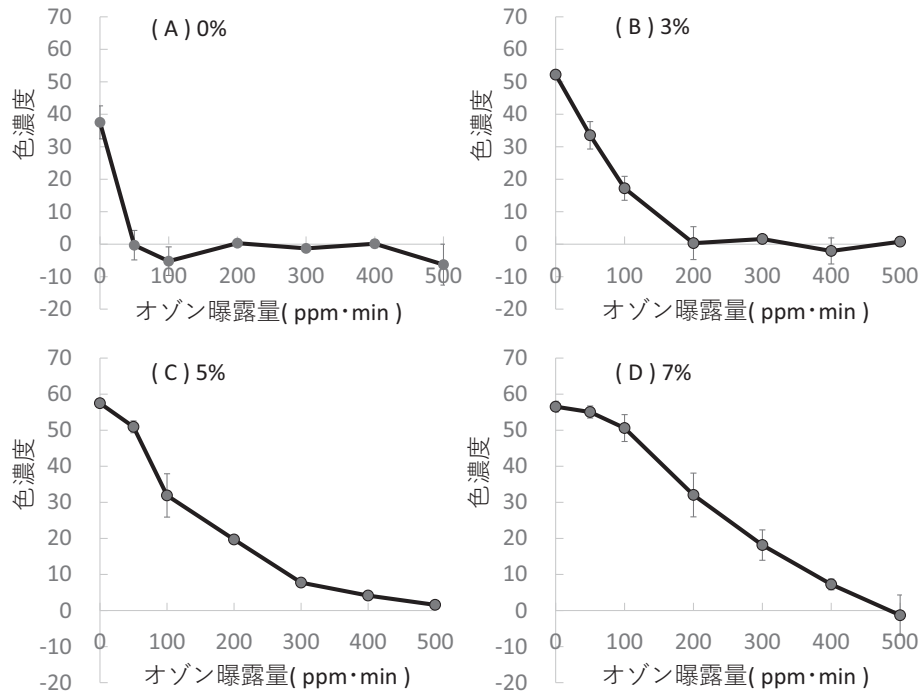


図4B オゾンによるBPBインジケータの退色に対するチオ硫酸ナトリウムの効果(解析)
 (A) チオ硫酸ナトリウム濃度 0% (B) チオ硫酸ナトリウム濃度 3% (C) チオ硫酸ナトリウム濃度 5% (D) チオ硫酸ナトリウム濃度 7%

いても危惧される。しかし、Dennisらは、ポリプロピレン製マスクに対してオゾンガスを長時間曝露し、フィルター効率と物理的強度の有意な変化が認められなかったことを報告している⁶⁾。また、ガスは一般的に漏れやすいため、小箱中のオゾン濃度が奏功濃度に達しない可能性についても考えられる。実際に小箱を用いてオゾン曝露装置を作った場合、オゾン濃度が上がりにくい場合があることが報告されている¹⁴⁾。従って、適切なオゾン曝露量を担保するためにオゾン曝露量インジケータは必要であり、本インジケータを小箱内で使うことによってさらに信頼性が高まるものと思われる。

本研究の成果が、感染症の拡大を防止するための一助となれば幸いである。

[COI開示] 石渡俊二が株式会社タムラテコから研究費を受領

文 献

- 1) Johns Hopkins University: COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>, (accessed 2020-11-16).
- 2) 日本環境感染学会：「医療機関における新型コロナウイルス感染症への対応ガイド 第3版」の公開について。 http://www.kankyokansen.org/modules/news/index.php?content_id=355, (参照 2020-11-16).
- 3) 厚生労働省：サージカルマスク、長袖ガウン、ゴーグル及びフェースシールドの例外的取扱いについて。 <https://www.mhlw.go.jp/content/000622132.pdf#search=%E3%82%B5%E3%83%BC%E3%82%B8%E3%82%AB%E3%83%A>
- 4) Tseng C, Li C: Inactivation of surface viruses by gaseous ozone. *J Environ Health* 70: 56—62, 2008.
- 5) Yano H, Nakano R, Suzuki Y, et al: Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by gaseous ozone treatment. *J Hosp Infect* (in press). <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.10.004>.
- 6) Dennis R, Pourdeyhimi B, Cashion A, et al: Durability of disposable N95 mask material when exposed to improvised ozone gas disinfection. *J Sci Med* 2: 2020.
- 7) Thorp CE: *Ind Eng Chem Anal Ed* 12: 209, 1940.
- 8) 尾松武志, 井上 浩：日本国特許 3856411. 2006.
- 9) 尾松武志：日本国特許 4526105. 2010.
- 10) Hudson JB, Sharma M, Vimalanathan S: Development of a Practical Method for Using Ozone Gas as a Virus Decontaminating Agent. *Ozone: Sci Eng* 31: 216, 2009.
- 11) Tsukamoto T, Ishiwata S, Kajimoto A, et al: Application of ozone gas for decontamination of nucleoside anticancer drugs. *J Pharm Health Care Sci* 2 Article No. 26: 2016.
- 12) Choraku T, Ishiwata S, Kitano R, et al: Decomposition of anthracycline anticancer drugs by ozone gas as a decontaminant. *J Med Hyg Use Ozone* 25: 90—97, 2018.
- 13) 鍵 直樹, 柳 宇, 池田耕一, 他：病院施設における室

内環境の衛生管理に関する研究 第1報. 空気調和・衛生工学会論文集 137: 39-46, 2008.

- 14) Dennis R, Cashion A, Emanuel S, Hubbard D: Ozone Gas: Scientific Justification and Practical Guidelines for Improved Disinfection using Consumer-Grade Ozone Generators and Plastic Storage Boxes. *J Sci Med* 2: 2020.

別刷請求先 〒577-8502 大阪府東大阪市小若江 3-4-1
近畿大学薬学部臨床薬学部門医療薬剤学分野
小竹 武

Reprint request:

Takeshi Kotake
Division of Medical Pharmaceutics & Therapeutics, Faculty of Pharmacy, Kindai University, 3-4-1, Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka, 577-8502, Japan

Development of the Visible Indicator with Variable Sensitivities for Ozone Exposure in Disinfection

Shunji Ishiwata¹⁾, Kiko Hashimoto¹⁾²⁾, Tomomi Inoue¹⁾ and Takeshi Kotake¹⁾

¹⁾Division of Medical Pharmaceutics and Therapeutics, Faculty of Pharmacy, Kindai University

²⁾Department of Pharmacy, Sakai City Medical Center

【Objectives】 The coronavirus disease 2019 outbreak has continued to spread leading to collapse of health-care systems in several countries. The rapid, global spread of the coronavirus has resulted in shortage of personal protective equipment (PPE), such as surgical mask. Hence, the re-use of PPE after appropriate disinfection is encouraged in a clinical setting, as an exception. A recent report showed that ozone gas can deactivate the coronavirus. Therefore, we developed a visible indicator that would show the end of the ozone gas disinfection process.

【Methods】 Polyvinylidene difluoride membrane was immersed with bromophenol blue (BPB) solution and dried. The color of BPB on the membrane disappeared as exposure of ozone gas proceeded. Sodium thiosulfate was added to BPB solution to shift the sensitivity of the indicator.

【Results】 The sensitivity of the indicator was adjustable between 50 and 400 in concentration-time (CT) values, which indicates the product of ozone concentration and the contact time required for virus deactivation. The indicator can be prepared even in laboratories having basic equipment.

【Conclusion】 We established the preparation method of the ozone indicator which was adjustable to desired CT value. The indicator will contribute to the on-site disinfection process in emergency caused by pandemic.

(JJOMT, 69: 174-179, 2021)

—Key words—

infection, ozone, disinfection