

【研究報告】

オゾン水の安全性評価に関する研究

藤井隆也,鈴木功,江副創,坂崎文俊,奥野智史,上野仁,中室克彦

日本医療・環境オゾン研究会会報, Vol.14, No.1, 3-8. (2007)

# 研究報告

## オゾン水の安全性評価に関する研究

藤井隆也<sup>1</sup>、鈴木功<sup>1</sup>、江副 創<sup>2</sup>、坂崎文俊<sup>2</sup>、奥野智史<sup>2</sup>、上野仁<sup>2</sup>、中室克彦<sup>2</sup>

<sup>1</sup>トヨタ車体株式会社 新規事業部、<sup>2</sup>摂南大学薬学部

**要旨** オゾンガスの毒性に関しては多くの報告があるが、オゾン水の毒性に関する報告はほとんど認められない。今回濃度1.2mg/Lのオゾン水の安全性を評価する目的で、マウスを用いた反復経口投与毒性試験、ハムスターを用いた口腔粘膜刺激性試験および培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験を行い、亜急性毒性、粘膜刺激性および細胞毒性について検討した。その結果、7日間連続経口投与試験において異常は認められなかった。ハムスターを用いた口腔粘膜刺激性試験において、肉眼的所見はオゾン水<水道水<次亜塩素酸ナトリウムの順に刺激性が強いことを示した。しかし、病理組織学的所見は水道水と有意な差は認められなかった。培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験では、低濃度オゾン水においてもわずかに細胞毒性を示す可能性が認められた。

**キーワード**：低濃度オゾン水、安全性、反復経口毒性、口腔粘膜刺激性、細胞毒性

### 1. 目的

オゾンガスの毒性に関しては多くの報告がなされている<sup>1)2)</sup>。しかし、オゾン水による急性、亜急性毒性の報告<sup>3)</sup>およびオゾン水の口腔粘膜<sup>4)</sup>や歯根膜細胞<sup>5)</sup>などに対する検討以外はほとんど認められない。そのため、低濃度オゾン水の安全性を評価する目的でマウスを用いた反復経口投与毒性試験、ハムスターを用いた口腔粘膜刺激性試験および培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験を行い、亜急性毒性、粘膜刺激性および細胞毒性について検討した結果を報告する。

### 2. 実験方法

#### 1) マウスを用いた反復経口投与毒性試験

##### (1) オゾン水

オゾン水生成装置(トヨタ車体株式会社製)によりオゾン濃度 1.2mg/L のオゾン水を用いた。

##### (2) 投与実験

ICR系雄雌マウス(4週齢、日本エスエルシー(株))を試験群および対照群において1群10匹用いた。試験群には使用直前に生成したオゾン水、対照群には水道水あるいは100mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液を1匹当たり1mL、マウスに7日間連続して胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

##### 2) ハムスターを用いた口腔粘膜刺激性試験

雄性シリアンハムスター(5週齢、日本エスエルシー(株))をエーテルで基礎麻酔した後、ペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し、全身麻酔した。頬袋粘膜を傷つけないように慎重に引き出し、粘膜に炎症などの異常がないことを肉眼的に確認した後、頬袋を元に戻す時、19匹全ての試験動物の片側頬袋にオゾン水を0.5mLずつ頬袋内に入れ曝露した。また、これら19匹のハムスターのうち12匹に反対側頬袋に水道水、残る7匹の反対側には100mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液を0.5mLずつを同様に入れ、曝露した。曝露時間は30分とした。曝露終了後、各試験液を除去し頬袋内を生理食塩水で十分洗浄した後、肉眼的観察を行った。5日間この頬袋に対する曝露操作を24時間ごとに実施した。また、最終曝露終了4時間後にエーテル麻酔下で動物を放血致死させ、頬袋を摘出した。頬袋を肉眼的に観察した後、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。この組織を常法に従いパラフィン包埋し、薄切後ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色を行った。作製した標本は光学顕微鏡を用いて病理組織学的に観察した。

##### 3) 培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験

##### (1) 試験液の調製

① 直接曝露法：生成した1.2mg/Lオゾン水を精製水で、10倍希釈したものを試験原液とした。これをさらに精製水で20倍、40倍希釈して30、60および120μg/Lの3濃度段階の試験液を調製した。また、陰性対照試験液としては精製水を用い、無処理試験液としてはMO5培地を用いた。

② 培養液混合法：MO5培地およびオゾン水生成装置(トヨタ車体株式会社製)により生成したオゾン濃度

1.2mg/Lオゾン水を用いた。MO5培地を1.2mg/Lオゾン水で等量混合して2倍希釈したものを試験原液とした。これをさらにMO5培地で4倍、8倍、16倍に希釈して計150、75、32.5µg/Lの3つの濃度段階の検体試験液を調製した。また、無処理試験液としてはMO5培地を用いた。

## (2) 試験操作

単層に増殖したV79細胞をトリプシン処理によって剥離し、MO5培地を用いて100個/mLの細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液を組織培養用プレートの各ウエルに0.5mLずつ播種し、37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で6時間培養後、以下の方法で試験を実施した。培養後、細胞がウエルの底面に接着していることを確認してから培地を除き、各濃度のオゾン水試験液、陰性対照試験液および無処理試験液を各々4個のウエルに0.5mLずつ加え、37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で30分間培養した。培養後、全てのウエルを新しい培養液に交換し、37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で6日間培養した。培養終了後、各ウエルを10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で30分間固定し、0.1%メチレンブルー溶液で15分間染色して、細胞数50個以上のコロニーを顕微鏡下で計数した。なお、本試験は2回行った。

## 3. 試験結果ならびに考察

### 1) マウスを用いた反復経口投与毒性試験

1.2mg/Lオゾン水を用い5日間の反復経口投与毒性試験を行ったところ、雌雄ともに試験期間中に死亡例は認められなかった。また、一般症状については、雌雄とも異常は認められなかった。体重変化は表1に示すごとく、最終投与日翌日の体重測定では、雌雄ともに各群間で体重増加に差は認められなかった。

表1 マウス反復経口投与毒性試験における体重変化

| 投与群   |     | 初回投与日前日      | 最終投与日翌日      |
|-------|-----|--------------|--------------|
| 雄性マウス | 対照群 | 29.0±0.7(10) | 32.8±1.0(10) |
|       | 試験群 | 28.9±0.6(10) | 32.8±1.2(10) |
| 雌性マウス | 対照群 | 24.2±1.3(10) | 26.6±1.3(10) |
|       | 試験群 | 24.0±1.2(10) | 26.2±1.0(10) |

体重は平均値±標準偏差で表した(単位:g)。( )内は動物数を示す。

試験期間終了時の剖検所見については、雌雄マウスの主要臓器に異常は認められなかった。これらの検討結果から、マウスに反復経口投与した場合、いずれの雌雄マウスにも異常および死亡は認められず、剖検時における各臓器に対する異常は認められなかった。したがって、1.2mg/Lオゾン水は本試験条件下においてマウスに異常および死亡を引き起こさないことが明らかになった。

### 2) ハムスターを用いた口腔粘膜刺激性試験

#### (1) 肉眼的観察所見

ハムスターを用いた1.2mg/Lオゾン水、水道水、100mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液を頬袋粘膜に曝露することによって口腔粘膜刺激性試験を行った。その結果、曝露期間中いずれの試験液を曝露した頬袋粘膜にお

表2 口腔粘膜刺激性試験における肉眼的観察所見で得られた血管拡張の発生割合

| 試料              | 1日目         |             | 2日目            |               | 3日目            |                | 4日目           |               | 5日目           |               |             |
|-----------------|-------------|-------------|----------------|---------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------|
|                 | 前           | 直後          | 前              | 直後            | 前              | 直後             | 前             | 直後            | 前             | 直後            | 直後4時間       |
|                 | (%)         | (%)         | (%)            | (%)           | (%)            | (%)            | (%)           | (%)           | (%)           | (%)           | (%)         |
| オゾン水<br>(n=19)  | 0/19<br>(0) | 0/19<br>(0) | 0/19<br>(0)    | 1/19<br>(5.3) | 3/19<br>(15.8) | 0/19<br>(0)    | 0/19<br>(0)   | 0/19<br>(0)   | 0/19<br>(0)   | 0/19<br>(0)   | 0/19<br>(0) |
| 水道水<br>(n=12)   | 0/12<br>(0) | 0/12<br>(0) | 2/12<br>(16.7) | 1/12<br>(8.3) | 3/12<br>(25.0) | 2/12<br>(16.7) | 1/12<br>(8.3) | 0/12<br>(0)   | 0/12<br>(0)   | 0/12<br>(0)   | 0/12<br>(0) |
| 次亜塩素酸ナトリウム(n=7) | 0/7<br>(0)  | 0/7<br>(0)  | 1/7<br>(14.3)  | 2/7<br>(28.6) | 5/7<br>(71.4)  | 3/7<br>(42.9)  | 2/7<br>(28.6) | 3/7<br>(42.9) | 1/7<br>(14.3) | 2/7<br>(28.6) | 0/7<br>(0)  |

前：曝露前、直後：曝露直後、( )内は発生率%

いても、散発的にわずかな血管拡張が認められたが、最終曝露終了4時間後の剖検時には肉眼的異常は認められなかった。ただし、散発的に認められた血管拡張についてオゾン水、水道水および100mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液の5日間の1日から5日目の各日の曝露前後のその発生割合を表2に示す。

これらの結果から、血管拡張の発生はいずれの試料も、2～3日目の曝露前後で高くなる傾向を示した。この血管拡張発生の傾向はオゾン水<水道水<100mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液の順に強くなることを示した。また、本試験は粘膜刺激性を把握することが目的であるため、5日間の毎日の各試料曝露直後の影響を解析した結果を図1に示す。

これらの結果、5日間の試料曝露直後の血管拡張の発生割合は、1.2mg/Lオゾン水において2日目に5%発生する以外は、血管拡張は認められなかった。しかし、水道水では2日目、3日目にそれぞれ8および17%の発生を示した。さらに、100mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液は2～4日目まで発生割合が増大し、3、4日目に43%の高い発生率を示し、5日目にやや減少した。

これらの結果から、ハムスターに対する粘膜刺激性は、1.2mg/Lオゾン水ではほとんど認められないが、これとは反対に、水道水ではわずかに、また、100mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液では高頻度にハムスターの頬袋粘膜に血管拡張が認められた。

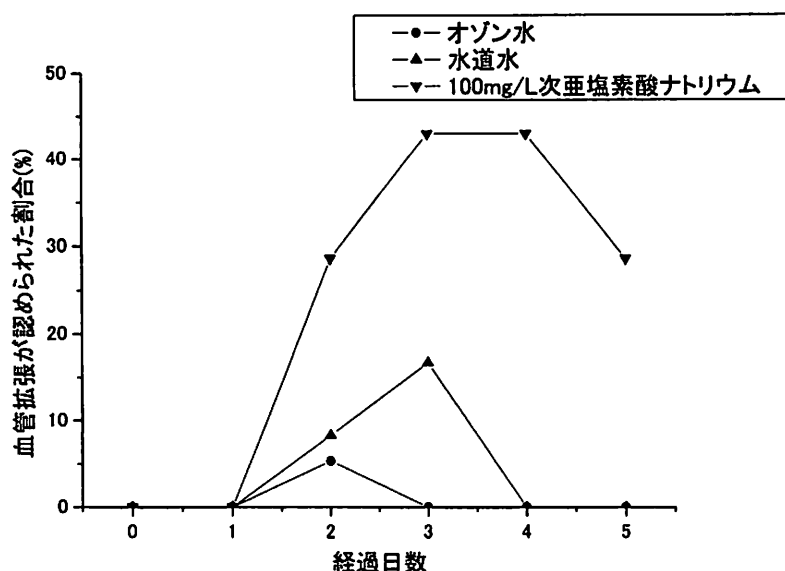


図1 各試料の曝露直後のハムスターの頬袋粘膜血管拡張の発生割合

## (2) 病理組織学的観察

1.2mg/Lオゾン水、水道水および100mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液を頬袋に曝露した時の病理組織学的観察結果を表3に示す。

表3 口腔粘膜刺激性試験における病理組織学的観察所見

| 適用試料                    | 粘膜上皮の反応       |                 | 粘膜下組織の反応       |             |
|-------------------------|---------------|-----------------|----------------|-------------|
|                         | 潰瘍の形成         | 基底細胞の配列の乱れ      | 炎症性細胞の浸潤       | 血管の拡張       |
|                         | (%)           | (%)             | (%)            | (%)         |
| オゾン水<br>(n=19)          | 0/19<br>(0)   | 10/19<br>(52.6) | 4/19<br>(21.1) | 0/19<br>(0) |
| 水道水<br>(n=12)           | 0/12<br>(0)   | 6/12<br>(50.0)  | 2/12<br>(16.7) | 0/12<br>(0) |
| 次亜塩素酸ナ<br>トリウム<br>(n=7) | 1/7<br>(14.3) | 5/7<br>(71.4)   | 2/7<br>(28.6)  | 0/7<br>(0)  |

これらの結果から、1.2mg/Lオゾン水を曝露したハムスター頬袋粘膜では、粘膜上皮の反応として基底細胞層の配列の乱れが19例中10例(52.6%)、潰瘍の形成は19例中0例、また、粘膜下組織の反応として炎症性細胞の浸潤が19例中4例(21.1%)、血管の拡張が19例中0例であった。

水道水を曝露した頬袋粘膜においても、オゾン水を曝露した頬袋粘膜とほぼ同様の所見が得られた。すなわち、基底細胞層の配列の乱れが12例中6例(50.0%)、炎症性細胞の浸潤が12例中2例(16.7%)に認められた。

100mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液を曝露した頬袋粘膜においては、基底細胞層の配列の乱れが7例中5例(71.4%)、炎症性細胞の浸潤が7例中2例(28.6%)に認められた。これらの発生率は、1.2mg/Lオゾン水あるいは水道水を曝露した頬袋粘膜の発生率よりもやや高頻度に発生することが認められた。

さらに、本試験が粘膜刺激性試験であるため、曝露直後の影響を解析した結果を図2に示す。

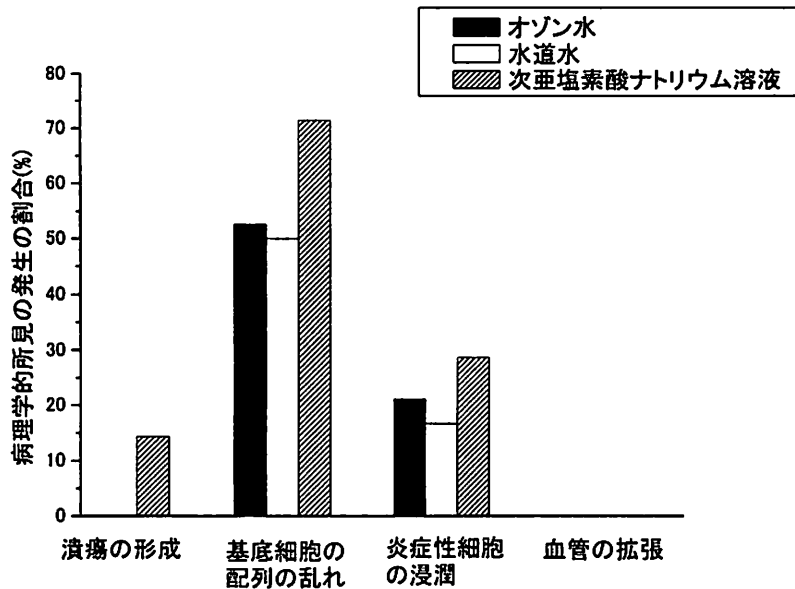


図2 各試料の病理組織学的観察所見の発生の割合

これらの結果から、100mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液による基底細胞層の配列の乱れおよび炎症性細胞の浸潤の発生は、1.2mg/Lオゾン水および水道水によるこれらの発生より高いことが認められた。すなわち、100mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液は、1.2mg/Lオゾン水や水道水に比べてハムスター頬袋粘膜に対して弱い粘膜刺激性を有することが示唆された。したがって、1.2mg/Lオゾン水がハムスター頬袋粘膜に及ぼす影響は水道水と同程度であり、粘膜細胞刺激性のないことが考えられた。小澤ら<sup>4)</sup>は4mg/Lオゾン水を用いて口腔粘膜細胞に対する為害作用を研究し、粘膜細胞刺激性のない同様の結果を示している。また、Ebensberger U.ら<sup>5)</sup>も歯根膜細胞に対し、うがいを行う条件2.5~3.5mg/Lオゾン水を2分曝露し、悪い作用のないことを示している。このようにオゾン濃度が1.2~4mg/Lの範囲であれば粘膜細胞刺激性のないことが推定された。

表4 オゾン水のコロニー形成阻害試験液の結果 (直接曝露法)

| 濃度(μg/L)                   | コロニー数/ウエル |    |    |    | 平均 | コロニー形成率 (%)<br>(陰性対照=100) | IC50 (%) |
|----------------------------|-----------|----|----|----|----|---------------------------|----------|
| 試験-1                       | 30        | 26 | 38 | 34 | 46 | 36.0                      | 114.3    |
|                            | 60        | 21 | 35 | 23 | 38 | 29.3                      | 93.0     |
|                            | 120       | 10 | 27 | 36 | 38 | 27.8                      | 88.3     |
| 試験-2                       | 30        | 24 | 37 | 48 | 39 | 37.0                      | 117.5    |
|                            | 60        | 17 | 35 | 40 | 35 | 31.8                      | 101.0    |
|                            | 120       | 14 | 35 | 29 | 27 | 26.3                      | 83.5     |
| 陰性対照(水)<br>無処理(MO 5<br>培地) |           | 22 | 27 | 45 | 32 | 31.5                      | 100.0    |
|                            |           | 46 | 55 | 51 | 45 | 49.5                      | —        |

### 3) 培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験

オゾン水を直接曝露した時の V79 細胞に対するコロニー形成阻害試験の結果を表 4 に示す。120  $\mu\text{g/L}$  オゾン水で、コロニー形成率 85% 程度であることから、阻害は僅かであった。そこでオゾンが用量依存的にコロニー形成阻害を起こすか否かをみるために、オゾン濃度とコロニー形成率との関係を検討した(図 3)。その結果、30~120  $\mu\text{g/L}$  のオゾン濃度において用量依存的にコロニー形成率の弱い減少が認められた。

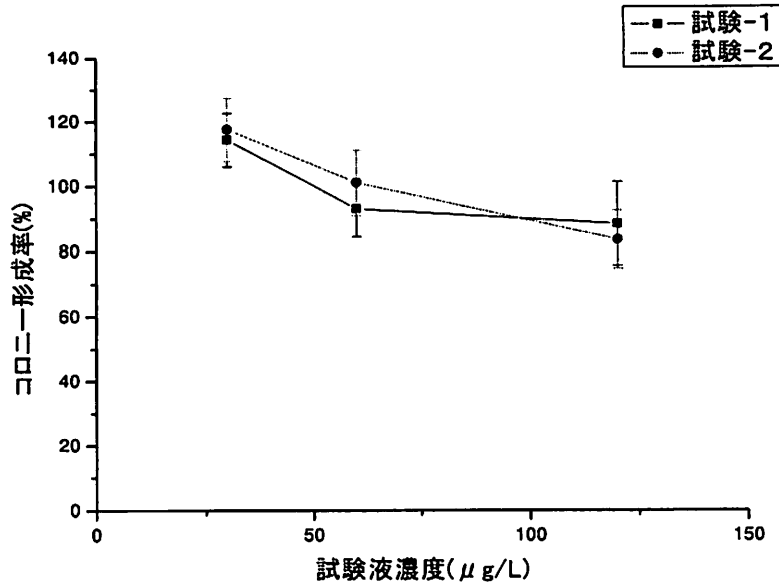


図 3 オゾン水試験液濃度とコロニー形成率の関係 (直接曝露法)

一方、オゾン水の希釈を培養液混合法で検討した。オゾン水に対するコロニー形成率を表 5 と図 4 に示す。培養液混合法では、無処理 (MO 5 培地) の対照のコロニー形成率 100% に比べて、オゾン処理濃度が、50、150、300  $\mu\text{g/L}$  において、いずれも 91~100% のコロニー形成率を示した。このことから、培養液混合法においては、オゾン水の V79 細胞に対してコロニー形成阻害を示さなかった。コロニー形成阻害が低い理由としては、オゾン水の希釈に培地を用いたためオゾンが培地によって消費されたためであることが考えられた。

以上の直接曝露法および培養液混合法による検討結果から、オゾン水の V79 細胞に対するコロニー形成阻害はオゾン水濃度が 120  $\mu\text{g/L}$  において約 20% 阻害することが認められた。この事実は、オゾン水が直接細胞に接触した場合は、弱い細胞毒性を示す可能性を示唆したものとする。

表 5 オゾン水のコロニー形成阻害試験の結果 (培養液混合法)

| 濃度 ( $\mu\text{g/L}$ ) | コロニー数/ウエル   | 平均          | コロニー形成率 (%)<br>(無処理=100) |       |
|------------------------|-------------|-------------|--------------------------|-------|
| 試験-1                   | 50          | 49 56 48 52 | 51.3                     | 100.0 |
|                        | 150         | 47 60 49 49 | 51.3                     | 100.0 |
|                        | 300         | 40 52 54 51 | 49.3                     | 96.1  |
| 試験-2                   | 50          | 54 44 45 44 | 46.8                     | 91.2  |
|                        | 150         | 52 50 48 54 | 51.0                     | 99.4  |
|                        | 300         | 45 44 44 57 | 47.5                     | 92.6  |
| 無処理(MO 5 培地)           | 56 49 52 48 | 51.3        | 100.0                    |       |

### 4. まとめ

オゾン水についてマウスを用いた反復経口投与毒性試験、ハムスターを用いた口腔粘膜刺激性試験および培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験を行い、以下の結果が得られた。

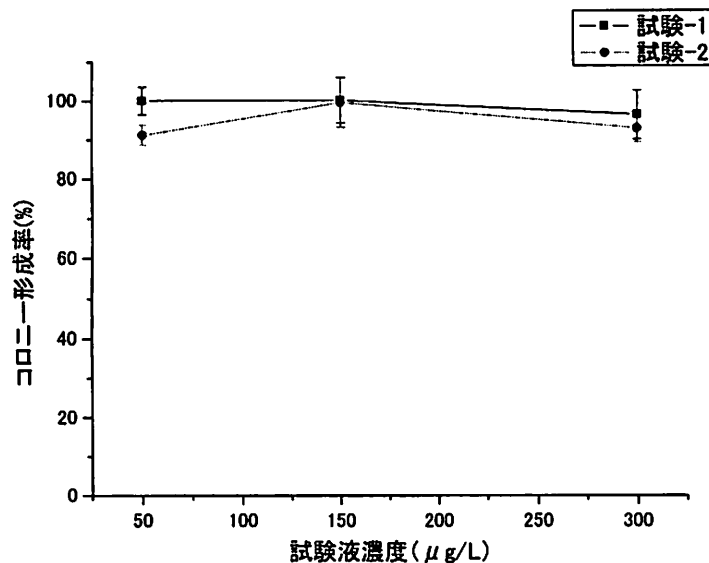


図4 オゾン水試験液濃度とコロニー形成率の関係 (培養液混合法)

- 1) 雌雄マウスにオゾン水を7日間連続経口投与した結果、いずれの試験動物にも異常および死亡は見られず、剖検時にも異常は認められなかった。
- 2) ハムスターを用いた口腔粘膜刺激性試験において、1.2mg/Lオゾン水、水道水および100mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液を1日1回30分間、5日間連続して適用した。その結果、肉眼的所見はオゾン水<水道水<次亜塩素酸ナトリウムの順に刺激性の強いことを示した。また、病理組織学的には散発的に角質層や上皮の肥厚、粘膜上皮では基底細胞層の配列の乱れや粘膜下層では炎症性細胞の浸潤が見られた。これらの結果から、100mg/L次亜塩素酸ナトリウム溶液による基底細胞層の配列の乱れおよび炎症性細胞の浸潤の発生は、1.2mg/Lオゾン水および水道水によるこれらの発生より高いことが認められた。したがって、1.2mg/Lオゾン水がハムスター頬袋粘膜に及ぼす影響は水道水と同程度で影響のないことが考えられた。
- 3) V79細胞を用いてコロニー形成阻害試験 (直接曝露法および培養液混合法) を行った結果、直接曝露法では、120 μg/Lの濃度でわずかにコロニー形成が抑制された。このことから、低濃度オゾン水においてもわずかに細胞毒性のあることが考えられた。

## 5. 引用文献

- 1) オゾンハンドブック (2004) 日本オゾン協会編、pp.119-132、サンユースタッフ、横浜。
- 2) 光化学オキシダント評価作業小委員会 (1996) 報告-光化学オキシダントの健康影響について、健康影響評価検討会光化学オキシダント評価作業小委員会、pp. 1-201。
- 3) 星 昭二、桜井 護、北川 敏、森 啓 (1995) オゾン水による急性・亜急性実験、静済医誌、12 (1)、89-95。
- 4) 小澤 学、藤田元規、杉浦石根、伊藤幸司、久保勝俊、前田初彦、塩田剛太郎、亀山洋一郎 (2003) オゾン水の口腔内投与による口腔粘膜上皮に対する為害作用の研究、愛院大歯誌、41 (2)、245-249。
- 5) Ebensberger, U., Pohl, Y. and Filippi, A. (2004) PCNA-expression of cementoblasts and fibroblasts on the root surface after extraoral rinsing for decontamination, Dental Traumatology, 18, 262-266。