

【解説】

オゾン水の手洗いへの利用

江本明貴子, 帯金静, 中室克彦

日本医療・環境オゾン研究会会報, Vol.14, No.2, 32-36. (2007)

この症例では、フリーラジカル自動分析装置 (FRAS4) を用いてオゾン投与前後の活性酸素量、抗酸化力を測定している。結果はオゾン投与前後の比較で、活性酸素量は459から431 (U.CARP) に、抗酸化力は 2339 mM から 2181 mMに減少した。オゾン投与後に抗酸化力が低下したことの説明として、一般的にはオゾン投与後に一時的に活性酸素が増えビタミンCの濃度が減少するという *in vitro* の実験結果が引用された。

フロアから「血液中ビタミンCに対するオゾン曝露の影響」の資料は、実験系から考えて、今回の結果の説明にはそぐわない旨の指摘がなされた。またフロアからの質問で、活性酸素量測定の指標に関して、測定している対象、再現性、ヒトにとっての適量の範囲等について等が問われた。測定機器の選択にも関連することであるが、抗酸化力や、全ての活性酸素種を定量的に測定する方法が、未だ開発されていない (世界的に?) ために、比較検討に困難が生じると感じられた。結果を論じるには統計処理が必要である。

(杉原医院 杉原伸夫)

寄稿

オゾン水の手洗いへの利用

摂南大学薬学部 江本明貴子、帯金 静、中室克彦

1. はじめに

現在、オゾン水は無声放電や浴面放電方式、UVや電気分解方式など種々のオゾン水生成器によって、0.05～20 mg/Lの濃度レベルで生成されている。オゾン水の酸化力は一般に7つの有効作用を示す。すなわち、殺菌、治療、脱臭、脱色、分解、漂白および表面処理作用である。これらの有効作用を利用してオゾンは食品の消毒、医療器具の殺菌、手洗い、眼科領域における手術前の洗眼や歯科領域での口腔内殺菌等に利用されている。今回はオゾン水が利用されているもののうち特に手洗いについて焦点をあて、その利用の実態と有効性に関する基礎的知見について述べる。

手洗いが重要視されている場所としては生鮮食料品を扱う現場や医療現場などがある。1996年、病原性大腸菌O-157による食中毒事例が発生し食堂、厨房関係者の手洗い、器材の洗浄など消毒の必要性が再認識された。一方、近年病院内におけるMRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)の感染が社会問題となり、各病院において、その問題解決への取り組みが積極的に行われており、医療従事者の手洗いの励行と使用器具の消毒の徹底が解決策の1つとして注目されている。このように、食中毒の感染防止のための手洗い方法や医療現場における院内感染防止のための手洗い方法としてのオゾン水による手洗いの効果についていくつかの研究がなされている。オゾン水は低濃度で強力な消毒、殺菌作用があり、人や環境への影響が少なく、手洗いに適しているという報告がある。以下に手洗いにおけるオゾン水の基礎的検討ならびに現場における実際の手洗いの効果について述べる。

2. 手洗いにおける基礎的研究

オゾン水は種々の有効作用をもつが、ここでは病院内などにおける手洗いと関連性があると考えられる代表的な細菌に対する殺菌作用について述べる。

赤堀ら¹⁾はオゾン水を用いた場合、短時間で手指消毒が可能か否かを種々の細菌を用いて検討した。*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus* 4種の菌に対していずれもオゾン水濃度4 mg/Lで30秒間曝露させた結果、全ての菌種に対して完全な殺菌効果を示した。また、MRSA、VRE (Vancomycin-resistant Enterococci; バンコマイシン耐性腸球菌)については、4 mg/Lオゾン水を用いて殺菌効果を経時的に測定した。MRSAに対して瞬時的に殺菌効果を示し、5秒程度の極めて短時間で有効なことが判明した。VREでは腸球菌由来、VCM (Vancomycin; バンコマイシン) 耐性の有無、耐性遺伝子の有無などに関わらず殺菌時間が5秒で完全な殺菌効果を示した。また、MRSAに対する殺菌効果が最も優れているとされているポピドンヨード系消毒剤よりもオゾン水の方が強力な殺菌効果を有することがわかった。

山吉ら²⁾によると、1 mg/Lから8 mg/Lのオゾン水を用いてMRSA-1、MSSA (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*)、グラム陰性桿菌の比較対象菌として*Escherichia coli* IFO13168、*Pseudomonas aeruginosa* IFO13295を

用いてMRSAに対する殺菌効果を検証した。殺菌効果は5秒以降あまり効果がなかったため5秒値の殺菌効果を示すと、*Escherichia coli*では、それぞれ1 mg/Lオゾン水で99%、2 mg/Lオゾン水で99.9%、3 mg/Lオゾン水で99.999%の殺菌効果を認めた。*Pseudomonas aeruginosa*では、それぞれ1 mg/Lオゾン水で99.9%、2 mg/Lオゾン水で99.99%減少、3 mg/Lオゾン水では1分曝露で減菌効果が認められた。MRSAではそれぞれ6 mg/Lオゾン水で99.9~99.99%、7 mg/Lオゾン水で99.999%、8 mg/Lオゾン水で99.9999%の殺菌が可能であった。5秒以上反応させても殺菌効果があまり増大しない原因として、オゾン水は塩素のような残存効果がないことと、瞬時の殺菌性が高いことに起因する。よって濃度の違いによる殺菌効果を示すには5秒値が適当である。このことより曝露時間5秒の殺菌効果の値から、99%殺菌するために必要なオゾン濃度を算出すると、*Escherichia coli*は0.82mg/L、*Pseudomonas aeruginosa*は1.18 mg/L、MSSAは2.00 mg/L、MRSA-1は3.05 mg/Lであった。すなわち、MRSAは99%殺菌効果を得るためには*Pseudomonas aeruginosa*の約4倍、*Escherichia coli*の約2.6倍、MSSAの約1.5倍のオゾン水濃度を必要とすることが分かった。MRSAは他の菌に比べ抵抗性が高いために、MRSAの消毒効果を有する3 mg/L以上のオゾン水を用いて消毒する必要があることが判明した。

横見ら³⁾の実験では、試験菌液0.2ml、20℃で保温し、オゾン水濃度1mg/L、4mg/Lを20mlずつ添加し、曝露時間を10、20、30秒にしたときの殺菌効果を調べた。*Escherichia coli* IFO3301は初発菌数 3.0×10^5 CFU/mLに対して、1 mg/Lオゾン水で30秒、4 mg/Lオゾン水は10秒で殺菌効果を示した。*Pseudomonas aeruginosa* IFO3445は初発菌数 3.4×10^4 CFU/mLに対して1 mg/Lオゾン水で10秒、4 mg/Lオゾン水でも10秒で殺菌が可能であった。*Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA)は初発菌数 6.4×10^4 CFU/mLに対して1mg/Lオゾン水で30秒、4 mg/Lオゾン水では10秒で殺菌され、*Staphylococcus epidermidis* IFO 12993は初発菌数 3.4×10^4 CFU/mLに対して1 mg/Lオゾン水で30秒、4 mg/Lオゾン水の場合は10秒で殺菌が可能であることを示している(表1)。

表1 各種浮遊菌に対するオゾン水による殺菌効果

	作用時間	初発菌数	オゾン水	
			1mg/L	4mg/L
<i>Escherichia Coli</i> IFO 3301	10 秒	3.0×10^5	2	0
	20 秒		3	0
	30 秒		0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	10 秒	3.4×10^4	0	0
	20 秒		0	0
	30 秒		0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300(MRSA)	10 秒	6.4×10^4	8.7×10^2	0
	20 秒		55	0
	30 秒		0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> IFO 12993	10 秒	3.4×10^4	3.2×10	0
	20 秒		2.6×10	0
	30 秒		0	0

このように、1 mg/Lオゾン水に対する殺菌効果は、MRSAを除いて作用時間10秒、20秒、30秒の曝露時間の違いによって大きな差はないが、1 mg/Lオゾン水のMRSAに対する殺菌効果は、10秒から30秒にかけて殺菌効果が強くなっており、作用時間が影響していることがわかる。これらの事実から、オゾン水はオゾンが菌と接触することによって作用し細胞壁を破壊するため、瞬時に殺菌効果を示すが、完全に殺菌されずに残留した菌に対しては、二次的な殺菌作用によっても殺菌されることが考えられる。

また同様に1 mg/Lおよび4 mg/Lオゾン水を用いた場合、単純ヘルペスウイルス、コクサッキーB5型ウイルス、エコー7型ウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルスなどのウイルスの殺菌効果を検討し、ウイルス感染価(TCID₅₀)でその効果を示した(表2)³⁾。ウイルス感染価(TCID₅₀)は段階的に希釈し

た試験管にウイルスを培養し、この試験管の50%の細胞に細胞変性効果を起こすウイルス量であり、 10^3 TCID₅₀以上の減少が不活化に有効と判断される。アデノウイルス以外で4 mg/Lオゾン水を20秒間曝露することによって不活化効果が確認された。アデノウイルスは用いたウイルス価が小さかったために効果が確認されていないが、用いたウイルスのウイルス価が高ければ、不活化効果を示すと考えられる。

表2 オゾン水の各種ウイルスに対する不活化効果 (TCID₅₀)

	単純ヘルペス ウイルス		コクサッキー B5 型 ウイルス		エコー7 型 ウイルス		インフルエンザ ウイルス		アデノウイルス	
	作用時間	作用時間	作用時間	作用時間	作用時間	作用時間	作用時間	作用時間	作用時間	作用時間
	20 秒	30 秒	20 秒	30 秒	20 秒	30 秒	20 秒	30 秒	20 秒	30 秒
オゾン水 4mg/L	$10^{<2.5}$	$10^{<2.5}$	$10^{3.2}$	$10^{<2.5}$	$10^{3.2}$	$10^{<2.5}$	$10^{<2.5}$	$10^{<2.5}$	$10^{<2.5}$	$10^{<2.5}$
オゾン水 1mg/L	$10^{4.8}$	$10^{4.5}$	$10^{6.2}$	$10^{5.5}$	$10^{5.5}$	$10^{5.5}$	$10^{5.5}$	$10^{5.5}$	$10^{<2.5}$	$10^{<2.5}$
水道水	$10^{5.8}$	$10^{5.8}$	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$	$10^{7.2}$	$10^{7.5}$	$10^{7.2}$	$10^{6.5}$	$10^{3.5}$	$10^{3.5}$
滅菌水	$10^{5.8}$	$10^{5.8}$	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$	$10^{3.5}$	$10^{3.5}$

以上の検討結果から考察すると、一般的な細菌を殺菌するためには、病院などの現場においては1 mg/L オゾン水を用いた30秒間の手洗いが必要であり、ウイルスの不活化も必要とする現場においては、4 mg/L オゾン水を用い、30秒間手洗いをする必要のあることが明らかになった。

次に二次汚染の防止に関する検討において、*Staphylococcus aureus* の培養液を試験者の手のひらに、手もみしながら強制的に塗布し、5分間乾燥させた後、オゾン水手洗い機で一連の手洗いを行い、その後菌数を測定した³⁾。またオゾン水で手洗いをした後の排水中と水道水で洗浄後の排水中の菌数を比較検討し、排水中の菌による二次汚染についても検討されている。その結果、排水中の菌数は水道水で 10^4 個、オゾン水では 10^1 個の残存しか示さず、オゾン水による明らかな殺菌効果が確認された。このように二次汚染の可能性のある排水中の残存菌数は水道水に比べオゾン水の方がはるかに少ない傾向が認められた。

以上の結果を総合的に考えると、4 mg/Lオゾン水で、30秒間の手洗いによって院内感染の原因菌やウイルスなどが不活化されることが考えられた。さらに、オゾン水が接触しやすいように予洗浄をする必要があり、手指洗浄の仕方による差も考えられるため、完全な洗浄方法を含めた教育の重要性が指摘された。また、共存汚染物質によっては著しくオゾン水の消毒殺菌効果が減衰するため、使用上の注意が必要であるが、これらの報告においてオゾン水は他の消毒剤と同等の殺菌効果を示し、排水中の二次汚染の防止についても有効であり、医療現場における手指の洗浄剤として極めて有用であることが確認された。

3. 集中治療室における手洗いへのオゾン水の応用

佐野ら⁴⁾はNICU (neonatal intensive care unit; 新生児集中治療室) に従事する医師および看護婦 26名を対象にしてオゾン水式手洗い装置の手指による消毒効果をイソジンおよびラビネット液 (塩化ベンザルコニウム・エタノール・ラビング) と比較検討した。右手指をグローブ形培地に直接スタンプしたものを培養し、増殖したコロニー数を菌の生残率 [(手洗い後のコロニー数/手洗い前コロニー数)×100] として表した。ここで用いられたオゾン水式手洗い装置は以下の3つの行程で行われた。①予洗浄(高級脂肪酸アミドスルホン酸エステルなどを含む合成洗剤使用)、②滅菌水での洗浄、③4 mg/Lオゾン水を用いた洗浄行程である。検討結果から菌の生残率がラビネット群 (26.8%)、イソジン/ブラシ群 (15.2%)、オゾン水群 (7.5%) の順に減少した。これらのことから、オゾン水が最も殺菌効果を有することを示した。この事実は、オゾン水は基礎的な研究だけでなく臨床的にも効果があることが示された。

手洗い消毒用のオゾン水式手洗い装置をICUに導入した場合、推奨されている使用時の標準設定が予洗浄

30秒後にオゾン水洗浄30秒の条件における1分手洗いとしている。集中治療室では日常業務中に頻回行う必要があり、多忙な業務の中では困難であった。そのため松尾ら⁵⁾は、界面活性剤を使用して汚れを除去し、30秒間洗い流す予洗浄をなくし、オゾン水による洗浄時間を15秒間に短縮したときの殺菌効果を検討した。病院内の集中治療部の看護婦16名を対象として実験を行った。オゾン濃度4 mg/L、手洗い時間15秒、水量500mL/分に設定して、勤務開始時のみ界面活性剤を使用して30秒間の予洗浄を行い、その後15秒間オゾン水で手洗いをを行うこととし、業務を行いながら適宜オゾン水のみで15秒間の手洗いを行った。①勤務開始時と②30分③1時間および、④1時間30分後の4回、手洗い前後の手指の生残菌数をパームスタンプ法で測定した。14名の被験者では手洗い後の生残菌数が、30以下となり、オゾン水による手洗いは良好な効果を示した。勤務開始30分後が最も菌数が少なかった。殺菌率は、①勤務開始で生残菌数0が4例で平均生残率は12%であった。②勤務開始30分後で生残菌数0が6例で平均生残率は6%で最も殺菌効果高く、③勤務開始1時間後で生残菌数0が4例で平均生残率は11%、④勤務開始1時間30分後で生残菌数0が2例で平均生残率は13%であった。殺菌率は勤務開始1時間、1時間30分後はともに約90%となり時間とともに低下した。勤務開始時は、予洗浄剤による皮脂や汚れが落ちオゾン水と接触しやすい状況になり、殺菌効果が強く現れたが、時間とともに皮脂や汚れが生じオゾン水と菌が接触しにくくなり殺菌効果の低下を招いたと考えられる。勤務開始30分後よりも勤務開始時の方が殺菌率100%の例が多いということからも、殺菌率に影響する因子として手洗いの技術や皮脂などの個人差によるものが大きいことが考えられる。30分以後殺菌率が低下しているので、手洗いの仕方、皮脂などの個人差を考慮すると少なくとも30分に一回は予洗浄が必要であることを示した。

NICU業務では1回の勤務における平均手洗い回数は50回を超える。そのため、NICUにおける消毒剤の頻回手洗いにより、手荒れを生じることが多く感染症予防の面からも何らかの対応が必要となっている。赤堀ら⁷⁾においてもオゾン水の利用は手指皮膚の刺激や、悪影響も認められていないという報告がある。しかしそれを客観的に示すデータは少ない。中村ら⁶⁾によると、今回、NICU勤務の看護婦24名を対象にオゾン水、グルコン酸クロルヘキシジン、ポピドンヨードの三種の手洗い方法にわけ、3日間連続、指定された方法で洗浄し、手荒れの比較を行った。その指標として表皮角質層の傷害を経皮的水分損失量(transdermal water loss; TEWL)として測定した。このTEWLの増減によって手荒れの程度を測定した。手洗い方法として、オゾン水を用いた場合では、4 mg/Lオゾン水の流水に15秒間、両手を均一に浸し、もみ洗した。他の2つの消毒剤であるグルコン酸クロルヘキシジンとポピドンヨードを用いた場合は、15秒間均一に塗布し、すり込んだ後、滅菌水により十分洗浄を行った。なお、NICU入室時に皮膚に付着したタンパク質や脂質を予め落とすために、オゾン水群は設置してある予洗浄液[添加界面活性剤(N-ヤシ油脂脂肪酸アシル-DLアラニントリエタノールアミンなどを含む)]で予備洗浄を、他の二群は該当する同じ消毒剤で十分な予備洗浄を行った。被験者はあらかじめ約10分間休憩した後にTEWLを左右両手について測定し、平均値を記録した。測定期間中は保湿を目的としたスキンケアの使用を禁止している。その結果、実験者はオゾン群7名、グルコン酸クロルヘキシジン群5名、ポピドンヨード群5名となった。検査前と三日後の検査終了時のTEWL値を比較すると、オゾン水群では有意($p < 0.05$)な差はなかった。しかし、他の二群ではオゾン水と比べて顕著にTEWLが増加した。オゾン水を用いた手荒れに関する検討結果から、オゾン水は手荒れを起し難いことから、オゾン水による洗浄は手指皮膚に刺激や悪影響を与えない良好な手洗い方法であることが判明した。このようにオゾン水の洗浄は頻回手洗いにおいて、手荒れの面から優れており、殺菌力も他の消毒剤と同等の効果を示している。

病院などにおいて手洗いにオゾン水を用いる場合、使用方法として、まず予洗浄を行い、4 mg/Lオゾン水による30秒手洗いが推奨できる。なお、手洗いを頻回行う場合には30分毎の予洗浄と適宜4 mg/Lオゾン水洗浄で十分効果を示すことも認めた。またオゾン水による手洗いは、手荒れ予防効果が期待できるため、手荒れをしやすい人にも優しことが判明した。結論としては、オゾン水による手指の洗浄は殺菌効果も高く、手荒れも防止する画期的な方法であるといえる。

引用文献

- 1) 赤堀幸男、村上篤司、星昭二、森 啓 (2000) オゾン水の殺菌効果と院内感染予防への応用、日集中医誌 2000 (7)、3-10.
- 2) 山吉孝雄 (1994) 多剤耐性菌に対するオゾン溶液の瞬時殺菌効果と医療への応用、J. Antibact. Antifung.

- 3) 横見哲介、島田豊、竹田至、松本みどり (1996) オゾン水手洗い機の医療衛生分野での評価、第5回日本オゾン協会研究講演会講演集、pp.122-124.
- 4) 佐野正、植田昭仁、荒川武、村上吉男、岩田厚司 (1997) NICUの手洗いにおけるオゾン水の有効性、日本未熟新生児学会雑誌、9 (3)、136.
- 5) 松尾美佳、吉原いづみ、鈴木裕子、飯田芳子、土井松幸 (2001) オゾン水での手洗いの検討、ICUとCCU、25 (2)、137-140.
- 6) 中村利彦、板橋家頭夫、小川雄之亮 (2000) NICUの手洗いにおけるオゾン水の有効性、日本未熟新生児学会雑誌、12 (2)、43.

基礎解説一免疫 30

ウイルスが教えたT細胞の秘密

武庫川女子大学薬学部 扇間昌規

免疫学の新しい舞台で蘇ったマクロファージは、抗原物質で免疫された動物体内でB細胞とT細胞と協力して特異抗体の産生に無くてはならない。マクロファージの役割の話は、もう少し先にして、いくつかの復習をしながら、まずはT細胞の謎に迫ることにしたい。

これまでの動物実験から分かったことは、遺伝的背景が異なる動物間に移植された皮膚は必ず排除され脱落する。拒絶反応と呼ばれるこの現象は免疫反応であること(本解説第24回)。免疫反応には(体)液性免疫と細胞性免疫の2形態があり、液性免疫能は種を越えて有効であるが、細胞性免疫能の方は同種の個体間の壁さえ越えられないこと(本解説第25回)。時空を越えて存在する遺伝的背景が同一の個体、すなわち純系動物が樹立されて以降、生体内で営まれる免疫応答に関与する各細胞の分担と協力が明確になった。しかし抗原特異的な抗体の産生に参加しているヘルパーT細胞は抗原とは反応できないこと(本解説第27回)。にもかかわらず、ハプテン・キャリアー系で詳しく調べると、ヘルパーT細胞はキャリアーの方を認識していること(本解説第28回)などである。T細胞の謎が絞られてきた。

いくつかの純系動物間で、条件をそろえて同一抗原で同じ手順で免疫しても、抗体の産生量が、系統間で大きく異なることに注目したのはベナセラフ(Benacerraf)であった。彼はハプテン・キャリアー系を巧みに利用して、免疫応答性は特定の遺伝子によって支配されていることを示した(当初は免疫応答 Immun response; Ir 遺伝子と呼ばれた)。同じ頃、同じ米国内の別の研究所では、純系マウスを樹立したスネル(Snell)が、異なる純系マウス間の皮膚の移植実験から、免疫遺伝学を研究し、組織適合抗原(histocompatibility antigen)系を発見していた。移植された組織が、宿主により受ける拒絶反応の強さや速さにより、組織適合抗原は主要(major)と副(minor)に分けられた。その後主要組織適合抗原をコードしている遺伝子は複数の遺伝子複合体より成っている(Major Histocompatibility Complex; MHC)ことが分かっただけではなく、この遺伝子は実はベナセラフのつけたIr遺伝子そのものであることが判明した。ヒトのMHCはHLA(Human Leukocyte Antigen)と呼ぶが、HLAを発見したフランスのドーセ(Dausset)はベナセラフ、スネルと共に1980年のノーベル医学生理学賞に輝いた。MHC遺伝子にコードされるタンパク質は、細胞膜表面に発現して、免疫応答の標的になるのでMHC抗原とも言う。MHC抗原はクラスI抗原とクラスII抗原に分類されるが、いずれ詳しく説明される。

既に細胞膜に発現している別のタンパク質よりT細胞であることを判定できるようになって間もなく、T細胞の働きが抗体産生のヘルパー作用であることが明らかになったのは大発見であった。しかし他方では、これまでどういう細胞か不明であったものがT細胞であると判明し、混乱を生じさせることも起こった。ウイルス性肝炎の病理組織で、ウイルスに侵された肝細胞の周りにわんさと集まっているのがT細胞ということが判明したからである。ウイルスに対する抗体を産生するためにヘルパーT細胞が寄り集まったのだろうか。そんなことはあり得ない。これは全く別のT細胞の存在形態であった。ウイルスに感染した生体が免疫応答で対処するのは抗ウイルス抗体がウイルス粒子を捕縛し排除する形式が予想されていたからである。