

# 作業環境許容濃度オゾンが肺疾患病態に与える悪影響

－疾患モデルマウスによる評価－

富田 賢吾 大平 智春 福山 朋季

(技術研究所) (麻布大学獣医学部) (麻布大学獣医学部)

## Adverse Effect of Occupational Permissible Ozone Levels on Lung Disease Pathology

－Evaluation Using Disease Model Mice－

Kengo Tomita, Chiharu Ohira and Tomoki Fukuyama

オゾンは、強力な酸化作用を利用して感染症予防や消毒、消臭に広く活用されている。作業環境では8時間の許容濃度として0.1 ppmが設定されているが、この基準は健常者を対象としており、呼吸器疾患患者に同じ濃度が安全かどうかは明確ではない。本研究では、急性肺傷害およびアレルギー性喘息モデルマウスを用いて、0.1 ppmのオゾン曝露が呼吸機能と免疫応答に与える影響を検討した。結果として、0.1 ppmのオゾン曝露は急性肺傷害および喘息モデルマウスにおいてSpO<sub>2</sub>の低下と肺組織の炎症増悪を引き起こし、呼吸器疾患患者にはオゾン曝露に対する慎重な対策が求められることが示唆された。

Ozone, widely used for disinfection, deodorization, and infection control due to its strong oxidative properties, is regulated at an occupational exposure limit of 0.1 ppm over 8 hours. However, this limit is based on effects in healthy individuals, and it remains unclear if the same concentration is safe for individuals with respiratory diseases. This study assessed the effects of 0.1 ppm ozone exposure on respiratory function and immune response in murine models of acute lung injury and allergic asthma. The results suggest that 0.1 ppm ozone exposure leads to decreased SpO<sub>2</sub> levels and exacerbates lung inflammation in both disease models, indicating the need for cautious ozone exposure measures for patients with respiratory diseases.

### 1. はじめに

2020年初頭から世界中で拡大した新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は、感染予防や消毒対策に対する意識を高め、医療機関や公共施設に限らず、一般家庭でも様々な消毒手段が導入されるきっかけとなった。感染症対策の一環として、アルコール消毒や次亜塩素酸ナトリウムなど従来の方法とともに、オゾンガスの利用が注目され、学校、病院、介護施設、さらにはカラオケボックス等の娯楽施設にもオゾン発生装置が導入されてきた。

オゾンは強力な酸化作用を持ち、細菌やウイルスを不活化する効果があるため、接触感染リスクを減少させる手段として、COVID-19に対してもその不活化効果が報告されている<sup>1)</sup>。ただし、オゾンによる消毒効果が十分に発揮されるためには曝露時間が重要であり、空気中のウイルスに直接作用して「空間除菌」を行うことは難しいとされ

ている<sup>2)</sup>。しかし、その効果が過度に強調されることで、必要以上に多量のオゾンが噴霧される懸念がある。また、オゾンは酸化力が強く、適切な濃度管理が行われない場合には呼吸器症状を引き起こすリスクがある。具体的には、0.1 ppmを超える曝露が続くと、頭痛や目・喉の痛みが生じ、さらに高濃度では肺機能障害(肺水腫)を引き起こ

オゾン濃度 (ppm)	症状
0.01-0.02	多少の臭気を覚える。
0.1	明らかな臭気があり、鼻やのどに刺激を感じる。
0.2-0.5	3-6時間曝露で視覚が低下する。
0.5	明らかに上部気道に刺激を感じる。
1-2	2時間曝露で頭痛、胸部痛、上部気道の渇きと咳が起こり、曝露を繰り返せば慢性中毒にかかる。
5-10	脈拍増加、体痛、麻酔症状が現れ、曝露が続けば肺水腫を招く。
15-20	小動物は2時間以内に死亡する。
50	人間は1時間で生命危機となる。

図-1 オゾン曝露濃度と生理作用

す(図-1)。このため、日本を含む主要国では作業環境におけるオゾンの許容濃度を 0.1 ppm に設定しているが、この基準は健康な人を対象にしたものであり、呼吸器疾患を有する人々への影響は明らかにされていない。

急性肺傷害(Acute Lung Injury: ALI)は、ウイルス感染を含む様々な原因で発症する肺の急性損傷であり、酸素飽和度の低下や呼吸機能の低下を特徴とする病態である。COVID-19 やインフルエンザなどのウイルス感染による肺炎は ALI の主な原因のひとつであり、COVID-19 では ALI や、重症化した急性呼吸窮迫症候群(ARDS)の発症リスクが高いことが報告されている。また、ALI の進行にはウイルス感染が引き金となる免疫反応の異常が関与しており、感染が患者の症状を一層悪化させることが懸念されている。近年では、高濃度オゾンの曝露が小児喘息や微小粒子状物質(PM2.5)による肺機能障害リスクを高める事も報告されており、オゾンガスによる健康影響に注目が集まっている<sup>3)-5)</sup>。

さらに、アトピー性皮膚炎や喘息といったアレルギー性疾患もオゾン曝露の影響を受けやすい疾患群と考えられる。これらの疾患はアレルギー性炎症を伴い、特に喘息では気道の狭窄や過敏反応が特徴的である。アレルギー性疾患の発症や悪化には生活環境が大きく関与しており、例えば室内の温度や湿度、大気中の揮発性有機化合物(VOC)、オゾンがリスク因子として挙げられている。こうしたリスク因子の規制が求められる中、大気中に多く含まれるオゾンについてもさらなる研究が必要とされている。

本研究では、急性肺傷害(ALI)モデルマウスおよびダニアレルゲン(*Dermatophagoides farinae*)による喘息モデルマウスを用い、0.1 ppm のオゾン曝露が呼吸機能および免疫応答に与える影響を評価した。特に、肺機能の指標である経皮的酸素飽和度(SpO<sub>2</sub>)、アレルギー反応の指標である血清 IgE レベル、および肺組織における炎症性サイトカインの発現を中心に評価し、オゾン曝露が呼吸器疾患に与える影響を検証した。

## 2. 方法

### 2.1 動物および飼育条件

雌性 BALB/c 系 SPF (Specific Pathogen-Free) マウス(日本 SLC 株式会社)の 8 週齢を用いた。BALB/c マウスはアレルギー性喘息モデルおよび

ALI モデルの作製に汎用されている動物種であり、これまでも使用実績が多い<sup>6),7)</sup>。動物は、温度 22 ± 2°C、湿度 50 ± 20%、換気回数 10 回以上/時間、照明時間 12 時間/日(午前 7 時点灯、午後 7 時消灯)に制御された動物飼育室内で飼育を行った。1 ケージに収容する動物数は 8 匹以下とし、飲料水およびげっ歯類用固形餌はそれぞれ自由に摂取させた。また、当該研究は麻布大学動物実験倫理委員会の承認(承認番号: 20.0313-5)に基づき実験を実施した。

### 2.2 オゾンガスの吸入曝露

オゾン曝露群のマウスは組織サンプリング前の 5 日間連続してオゾンガスに曝露させた。オゾンガスは紫外線光源で生成し(図-2A)、活性炭ケミカルフィルタで処理した清浄空気を用いて、0.01、0.03、および 0.1 ppm の 3 濃度に希釈・調整した。コントロール群は、オゾン曝露群と同じ方法でケミカルフィルタ処理をした清浄空気のみを曝露した。曝露チャンバー内のオゾン濃度、温度、および湿度は実験全体中モニタリングをし、温度と湿度は動物室と同一条件であった。曝露チャンバー内のオゾン濃度は、設定した濃度に維持されていた(図-2B)。

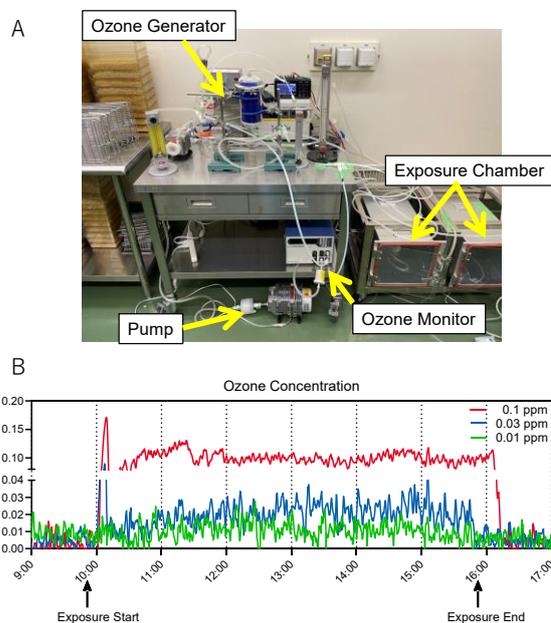


図-2 オゾンガス曝露装置とオゾン曝露濃度

### 2.3 ALI モデルマウスの作製

COVID-19 を含めた呼吸器感染症は、ALI や急性呼吸窮迫症候群(Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS)を引き起こし、重症化して死

に至る場合も多い。本実験ではリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) を、実験終了の 48 時間前に 25  $\mu$ L (25  $\mu$ g) をイソフルラン吸入麻酔下で点鼻投与し、ALI モデルを作製した。実験終了時に動物を安楽死させ、血液および組織を採取した。

## 2.4 喘息モデルマウスの作製

アレルギー性喘息の原因となるダニ抗原抽出物 (Dermatophagoides farinae, ITEA 株式会社) をマウスに点鼻投与して喘息モデルを作製した。初回から 3 週間にわたり週 1 回、ダニ抗原 25  $\mu$ L (25  $\mu$ g) をイソフルラン麻酔下で点鼻投与し免疫感作を行った。最終感作 1 週間後にリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline: PBS) で希釈したダニ抗原 25  $\mu$ L (5  $\mu$ g) を 3 日間連続投与し、免疫反応を惹起した。実験終了時に動物を安楽死させて必要な血液および組織を採取し解析をおこなった。

## 2.5 経皮的酸素飽和度 (SpO<sub>2</sub>) の測定

肺機能検査は実験小動物用パルスオキシメーター (MouseOx®PLUS, STARR Life Sciences Corp) を用いて実施した。マウス頸部を前日に除毛し、覚醒下でマウスを保定した状態で、SpO<sub>2</sub> および心拍数をモニタリングした。

## 2.6 肺組織の組織病理学的評価

肺の右上葉の一部を 10%ホルマリン溶液で固定し、パラフィンに包埋してヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を作製した。肺胞への炎症性細胞浸潤、浮腫、肺胞線維症および血管周囲炎症を評価するために、組織病理学的評価を行い、0 (正常範囲内)、1 (軽度)、2 (中等度)、3 (重度) でグレード分類し、病変の総スコアは統計的に評価した。

## 2.7 血清総 IgE の測定

血清サンプル中の総 IgE 濃度は、酵素結合免疫吸着測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) 測定キット (BD Opt IgE ELISA set、日本 BD 株式会社) により測定した。光学濃度はマイクロプレートリーダー (iMark マイクロプレートリーダー、バイオラッドラボラトリーズ株式会社) で測定した。

## 2.8 気管支肺胞洗浄液解析

気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar Lavage Fluid: BALF) は気管にカニューレを挿入し、1 mL の 0.1% ウシ血清アルブミン含有 PBS で肺を 3 回洗浄して収集し、肺胞洗浄液を得た。上清中の IL-1 $\beta$ 、RANTES 量は ELISA 法により測定した。細胞沈査の総生細胞数は CellDrop Cell Counting system (DeNovix Inc.) で測定し、フローサイトメーター (BD FACSAria III cell sorter、BD バイオサイエンス) にて好酸球、好中球、マクロファージの割合を測定した。

## 2.9 統計解析

統計学解析は GraphPad Prism 9 を用いて行い、データは平均±標準誤差 (SEM) で表す。病理学的所見の発生率の評価には、Fisher の直接確率検定を使用した。その他の結果は Welch の t 検定で解析し、統計学的有意差の有無を危険率 5%、1%、0.1% および 0.01% の水準で解析した。

## 3. 結果

### 3.1 オゾン曝露による肺機能の影響

作業環境許容濃度 (0.1 ppm) のオゾン曝露が ALI および喘息症状に影響を与えるかどうかを評

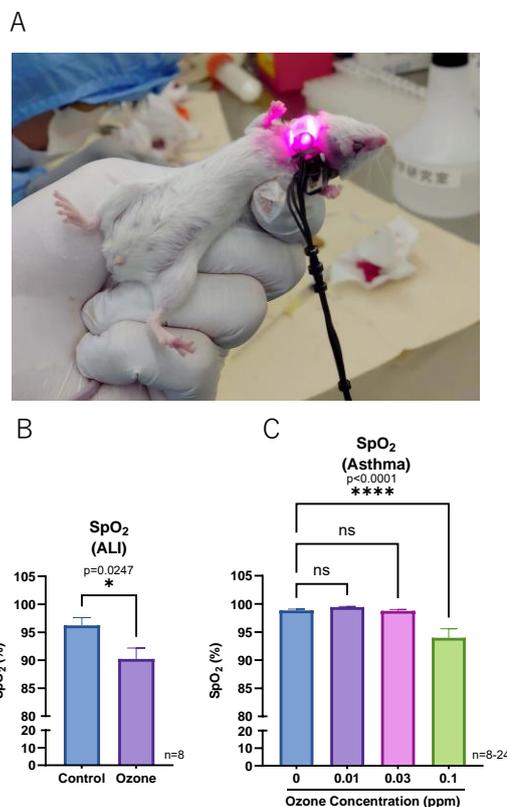


図-3 パルスオキシメーターと SpO<sub>2</sub> 測定

価するため、最終オゾン曝露終了直後にパルスオキシメーターを用いて覚醒下で SpO<sub>2</sub> を測定した(図-3A)。ALI モデルマウスでは、SpO<sub>2</sub> がオゾン曝露群では、コントロール群と比較して有意に減少した(図-3B)。

喘息モデルマウスもALIモデルマウスと同様に0.1 ppm オゾンガス曝露は、コントロール群と比較し、SpO<sub>2</sub> を有意に減少させたが、より低濃度の0.03 ppm および0.01 ppm においてはSpO<sub>2</sub> の有意な減少は認められなかった(図-3C)。

### 3.2 肺の病理組織学的解析

オゾン曝露によりALI及び喘息を発症したモデルマウスの肺機能が低下したことから次に肺組織の病理組織学的解析を実施した。ALIモデルマウスでは、コントロール群と比較してオゾン曝露群は肺肺炎症および肺胞壊死を悪化させ、肺胞壁の肥厚を引き起こした。喘息モデルマウスでも同様にコントロール群と比べてオゾン曝露群の症状が悪化した(図-4A)。組織病理学的評価による病変の総スコアはALIモデルマウスおよび喘息モデルマウスのどちらの場合もオゾン曝露群がコントロール群と比べて有意にスコアが増加した(図-4B)。

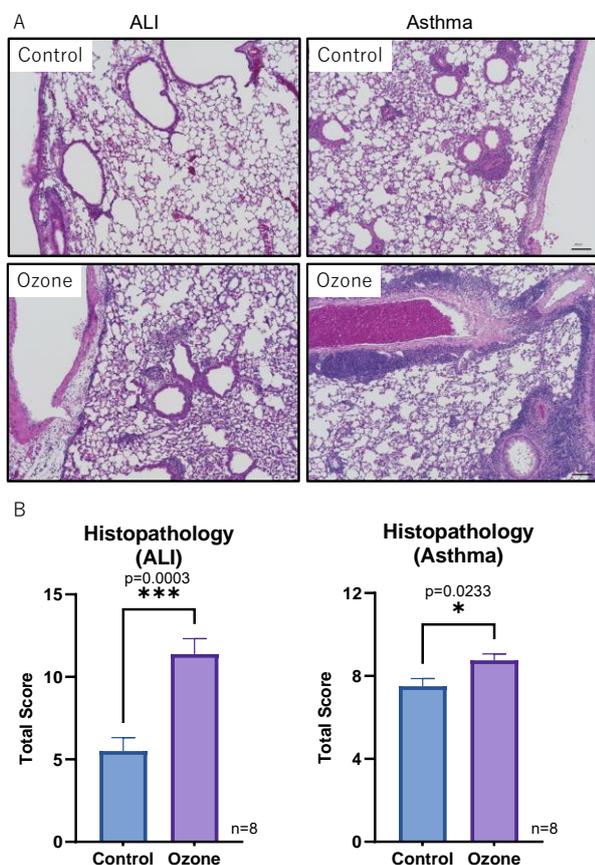


図-4 肺の組織学的解析

### 3.3 血清中総 IgE 量の測定

オゾン曝露が抗体産生への影響を評価するため、血清中の総 IgE 量を定量した。ALIモデルマウスでは、モデル作成による IgE 量の増加は認められなかったが、オゾン曝露によりコントロール群と比較して有意な IgE 量の増加が認められた(図-5A)。喘息モデルマウスでは喘息モデル作成に伴う IgE 量の増加が認められた。0.1 ppm オゾンガス曝露によって血清中の IgE 量が 0 ppm と比較して有意に増加したが、低濃度では影響は認められなかった(図-6A)。

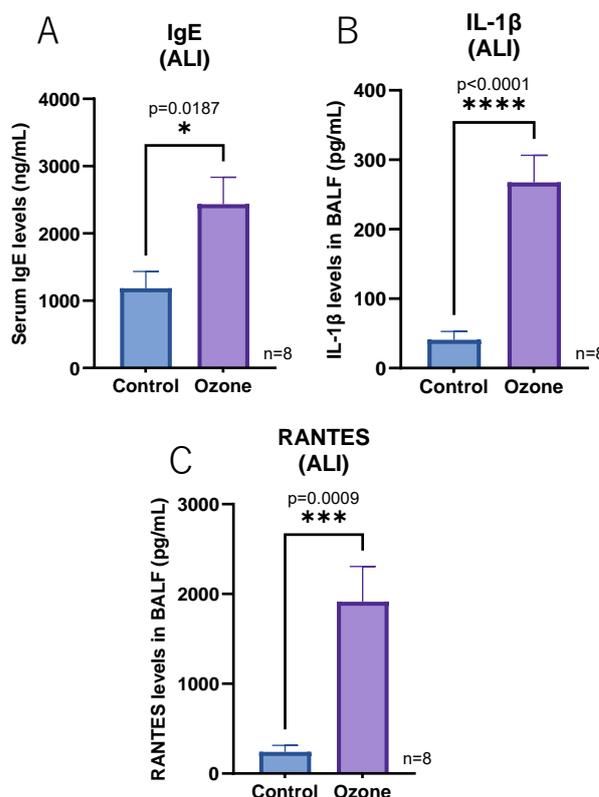


図-5 ALIにおけるIgE量及び炎症・免疫解析

### 3.4 肺胞洗浄液の解析

ALIモデルでは、肺胞洗浄液中のIL-1β(図-5B)およびRANTES(図-5C)はオゾン曝露によりコントロール群と比較して統計学的に有意に増加した。喘息モデルでも0 ppmと比較して0.1 ppmオゾン曝露による肺胞洗浄液中のIL-1β(図-6B)および好中球の細胞数(図-6C)には有意な増加が認められたが、より低濃度の0.03 ppm、0.01 ppmオゾンガス曝露では影響は認められなかった。

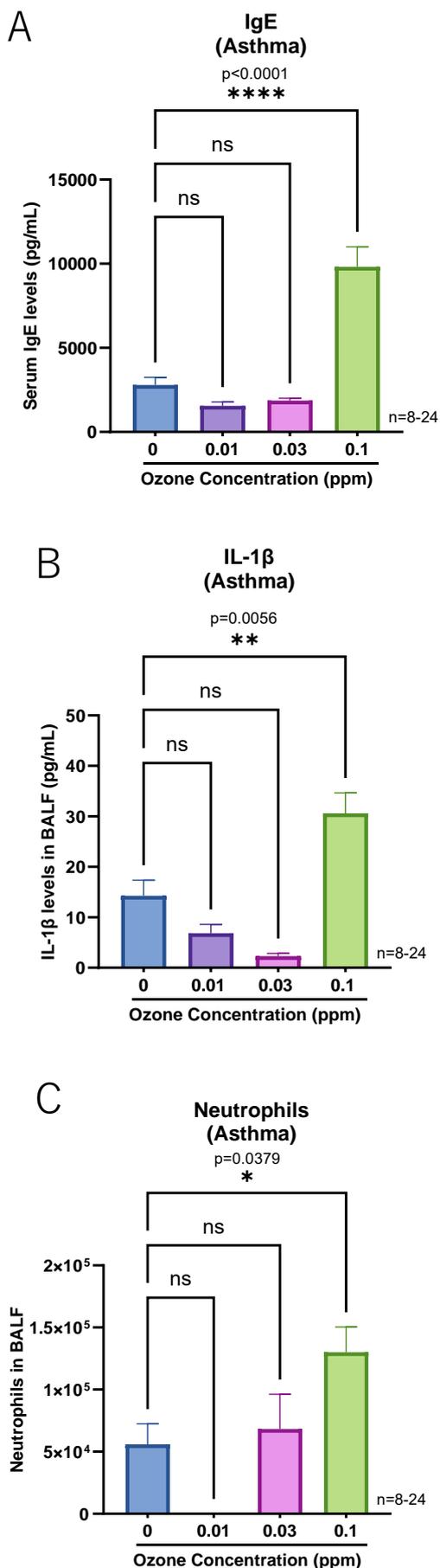


図-6 喘息における IgE 量及び炎症・免疫解析

#### 4. 考察

本研究では、作業環境許容濃度である 0.1 ppm のオゾン曝露が、呼吸器疾患を有するモデルマウスに与える影響を評価した。特に、急性肺傷害 (ALI)モデルおよび喘息モデルマウスを用い、オゾン曝露による呼吸機能や免疫応答の変化を詳細に調査した。この研究の背景には、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)の感染対策として医療施設や公共施設でオゾン発生装置の使用が増加していた一方で、オゾンが持つ酸化力の強さにより呼吸器に悪影響を及ぼすリスクが懸念されていた点がある。オゾンは細菌やウイルスを不活化する効果があるものの、その効果を得るには一定の曝露時間が必要であり、空間除菌を目的とした使用において過剰な濃度で噴霧される可能性があるため、慎重な評価が求められる。特に 0.1 ppm の許容濃度が健康な人を基準に設定されているため、基礎疾患を有する個体に対しても同じ安全基準が適用できるかどうかは不明な点が多い。本研究は、この疑問に答えるため、低濃度のオゾン曝露の影響を多角的に検証することを目的とした。

急性肺傷害 (ALI)モデルでは、リポ多糖 (LPS)を点鼻投与して炎症を誘発させ、肺傷害を再現した。また、アレルギー性喘息モデルではダニ抗原 (*Dermatophagoides farinae*)を用いて免疫感作を行い、喘息様症状を呈するモデルを作製した。これらのモデルを用いることで、0.1 ppm のオゾン曝露が病態に与える影響を評価した。喘息のオゾン曝露群では、0.01 ppm、0.03 ppm、および 0.1 ppm の 3 つの濃度でのオゾン曝露も実施した。曝露後の経皮的酸素飽和度 (SpO<sub>2</sub>)や肺の病理組織学的変化、血清中の IgE 濃度、肺胞洗浄液中の炎症関連因子を指標として使用した。これにより、許容濃度とされる 0.1 ppm のオゾンが、呼吸機能および免疫応答に及ぼす影響についての知見を得ることができた。

ALI モデルおよび喘息モデルのいずれにおいても、0.1 ppm のオゾン曝露は、コントロール群に比べて経皮的酸素飽和度 (SpO<sub>2</sub>)の低下を引き起こし、肺の酸素交換機能に悪影響を与えることが示された。この結果は、特に呼吸機能が低下している患者において、オゾン曝露がさらなる機能低下を引き起こすリスクを示唆している。また、肺組織の病理組織学的解析では、ALI および喘息モデルにおいて肺胞や気道周囲の炎症性細胞の浸潤および肺胞壁の肥厚が観察された。HE 染色によ

り、ALI モデルおよび喘息モデルのいずれもオゾン曝露により病理学的スコアが増加し、炎症および組織損傷を悪化させることが明らかになった。このような変化は、基礎疾患を持つ個体において、オゾン曝露が組織損傷や炎症を増悪させるリスクを示唆するものである。

免疫応答については、ALI モデルマウスおよび喘息モデルマウスのいずれにおいても顕著な変化が認められた。0.1 ppm のオゾン曝露により血清中の IgE 量が増加し、肺胞洗浄液中では炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ が増加した。また、ALI モデルマウスでは好中球の走化因子として機能する RANTES の濃度が増加し、喘息モデルマウスでは好中球数の直接的な増加が観察された。これらの免疫学的変化は、Th2 免疫応答の活性化を示しており、喘息においてはオゾン曝露がアレルギー症状を悪化させる可能性を示唆している。また、これまで筆者らが報告した結果では、ALI モデルにおいてオゾン曝露が炎症反応の指標である MCP-1 およびその受容体 CCR2 の増加に影響することが示され、ALI に対するオゾン曝露のリスクが裏付けられた<sup>8)</sup>。さらに喘息モデルでは、オゾン曝露がヘルパーT 細胞数の増加に加え、アレルギー性炎症を引き起こす主要なサイトカインである IL-4、好酸球の分化と活性化に関与する IL-5、および気道過敏性や粘液分泌を促進する IL-13 の過剰発現を引き起こしており、病理学的解析で観察された肺組織の炎症像の悪化を支持する結果を報告している。さらに、同一研究において、オゾン曝露の影響が一定程度可逆的であることも確認しており<sup>9)</sup>、曝露後の適切な換気や空気環境整備の重要性が示唆されている。

本研究の結果から、0.1 ppm のオゾン曝露が健康な個体においては許容される濃度である一方、呼吸器疾患を持つ個体に対しては同じ濃度が必ずしも安全ではないことが示された。0.1 ppm のオゾン曝露は、特に ALI および喘息モデルマウスにおいて、呼吸機能の低下や免疫系の過剰応答を引き起こし、病態を悪化させる可能性が高い。したがって、医療施設や公共施設でのオゾン発生装置の使用に際しては、適切な曝露濃度の管理と換気システムの整備が重要である可能性がある。ただし、本研究は動物モデルで行われたため、ヒトへの直接適応には限界がある。今後は、実際の臨床環境での研究をすすめ、呼吸器疾患患者にとって安全な空気環境基準の確立を目指す必要がある。

#### <参考文献>

- 1) Tizaoui C, Stanton R, Statkute E, Rubina A, Lester-Card E, Lewis A, Holliman P, Worsley D: "Ozone for SARS-CoV-2 Inactivation on Surfaces and in Liquid Cell Culture Media.", *Journal of Hazardous Materials*, Vol.428, p.128251, 2022
- 2) Rutala W, Weber D: "Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008." *Infection Control and Hospital Epidemiology*, Vol.18, pp.240–264, 2008
- 3) Harkema JR, Wagner JG: "Innate Lymphoid Cell-Dependent Airway Epithelial and Inflammatory Responses to Inhaled Ozone: A New Paradigm in Pathogenesis.", *Toxicologic pathology*, Vol.47, No.8, pp. 993–1003, 2019
- 4) Ko FW, Tam W, Wong TW, Chan DP, Tung AH, Lai CK, Hui DS: "Temporal relationship between air pollutants and hospital admissions for chronic obstructive pulmonary disease in Hong Kong." *Thorax*, Vol.62, No.9, pp.780–785, 2007
- 5) Thurston GD, Lippmann M, Scott MB, Fine JM: "Summertime haze air pollution and children with asthma.", *Am J Respir Crit Care Med*, Vol.155, No.2, pp.654–660, 1997
- 6) Tajiki-Nishino R, Makino E, Watanabe Y, Tajima H, Ishimota M, Fukuyama T: "Oral administration of bisphenol A directly exacerbates allergic airway inflammation but not allergic skin inflammation in mice.", *Toxicol Sci*, Vol.165, No.2, pp.314–321, 2018
- 7) Ookawara T, Aihara R, Morimoto A, Iwashita N, Kurata K, Takagi Y, Miyasaka A, Kushiro M, Miyake S, Fukuyama T: "Acute and subacute oral toxicity of deoxynivalenol exposure in a *Dermatophagoides farinae*-induced Murine asthma model.", *Toxicol Sci*, Vol.179, No.2, pp. 229–240, 2021
- 8) Tomita K, Okawara T, Ohira C, Morimoto A, Aihara R, Kurihara T, Fukuyama T: "An Acceptable Concentration (0.1 ppm) of Ozone Exposure Exacerbates Lung Injury in a Mouse Model.", *Am J Respir Cell Mol Biol*, Vol.65, No.6, pp.674–676, 2021
- 9) Ohira C, Tomita K, Kaneki M, Iwashita N, Takagi Y, Kurihara T, Nagane M, Kamiie J, Fukuyama T: "Effects of low concentrations of ozone gas exposure on percutaneous oxygen saturation and inflammatory responses in a mouse model of *Dermatophagoides farinae*-induced asthma.", *Arch Toxicol*, Vol.97, No.12, pp.3151–3162, 2023