

## 文献抄録

## オゾンの生物学的影響に関する研究 第5報

## 自家血液療法を行ったヒトにおける免疫学的指標と耐性の検討

Studies on the Biological Effects of Ozone: 5.

Evaluation of immunological parameters and tolerability in normal volunteers receiving ambulatory autohaemotherapy

V. Bocci<sup>1</sup>, E. Luzzi<sup>1</sup>, F. Corradeschi<sup>2</sup>, L. Paulesu<sup>2</sup>

Biotherapy 7: 83-90 (1994)

(Institute of General Physiology, <sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, <sup>2</sup>Faculty of Biological Sciences, University of Siena, Siena, Italy)

摂南大学薬学部 中室克彦、坂崎文俊

**要旨** 血液を体外で穏やかに処理する自家血液療法は、ウイルス病や悪性新生物の治療に効果があるといわれている。既に示されているようにオゾンはサイトカイン類の穏やかな誘導剤として機能するため、著者らは正常なウサギとヒトとを用いて単回、および反復投与を行った自家血液オゾン療法において血漿中のサイトカイン濃度、およびMxタンパク質やネオプテリン、 $\beta$ 2-ミクログロブリン、その他の急性期タンパク質などの炎症時における免疫指標について検討を行った。

**キーワード**：オゾン、自家血液療法、サイトカイン、Mxタンパク質

**背景**： 現在のところ、いくつかのアプローチがウイルス・新生物・手術や細胞障害性の処置・放射線照射・遺伝的障害・加齢による免疫機能の低下した状態を賦活させるために行われている。最初のアプローチは薬理学的用量のサイトカインを自己活性化した細胞とともに、あるいはなしで投与するものであるが、治療効果は穏やかで、わずかな種類の癌にしか効果がない。2番目のアプローチは遺伝子の組み込み、すなわちTNF $\alpha$ やIL-2などの遺伝子をリンパ球やがん細胞に組み込むことである。3番目のアプローチはサイトカインを体内で産生させることを狙うもので、サイトカイン誘導剤としてBCGや他の細菌成分、ムラミルペプチド、LPS、ポリヌクレオチド、不適合二重鎖RNAなどを投与する。しかし、理想的な誘導剤、すなわち無害で、免疫過敏反応を起こさず、免疫を衰えさせず、安価で効果的なものは未だ利用可能になっていない。これらの化合物はサイトカイン誘導剤として効果的であると同時に副作用を引き起こし、病状の改善することもまれである。これらのアプローチの中で、最近30年間の間に中央ヨーロッパを中心として自家血液をオゾンに曝露して患者に再注入することによりウイルス疾患や新生物に効果のあることが報告されている。しかし、この方法は経験的な方法で適切な制御なしに行われてきた。1988年に我々はこの研究に着手し、オゾンは静ウイルス的・細胞障害的のみに機能するのではなく、末梢血単核球、すなわちリンパ球や単球の膜成分の酸化が引き金となって引き続いてサイトカイン類の放出が活性化されるという仮説を提唱した。この仮説は何種かの酸化剤がIFN- $\gamma$ の生産を誘導するという過去の知見によって支持された。引き続き行われた研究によってオゾンはその不安定性のために秒単位で機能し、そして消滅することによって役立つ誘導剤であるという結果が得られた。オゾンは諸刃の剣であるということが現実となるにつれて、この高度の反応性に富んだガスが赤血球の代謝を向上させ、免疫系の反応形を活性化させ、かつ細胞障害は無視できる程度であるという意味において有効であるために正当な使用法が重要であるということが明らかとなった。全血中の末梢血単核球が体外でオゾンによって刺激されるので、血液の再注入においてこれらの細胞がサイトカインの循環量を修飾するのがあるいは典型的な免疫指標や副作用の量を修飾するのかどうかは未知である。

**結果と考察**：

**ウサギでの実験** 抗ウイルス活性やTNF- $\alpha$ は特異的なイムノアッセイが使えないので、それらの機能によってアッセイした。30mlの血液で自家血液療法を行ったとき、22~42 $\mu$ g/mlオゾン濃度では修飾は観察されなかった。しかし、54 $\mu$ g/mlのオゾン濃度で60mlの血液で1時間処理を繰り返したところ(60mlは全血液量の30%に相当する)、抗ウイルス活性とTNF- $\alpha$ 量の両方に急激な変化がみられた。しかしながらこれらの修飾は小さくて一過性であり、6時間以内にほとんど元に戻った。一日を通して体温を測定したところ、2匹のうち1匹において小さな変

化が見られた。これは一過性に体熱を上昇させるサイトカインが循環系に存在していたことを示唆する。ウサギはその後30日間健康であった。

**ヒトでの実験** ヘパリン処理したヒトの血液をオゾン化(オゾン54 $\mu$ g/ml血液)の前と後とに培養するとオゾンは試験した全てのサイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、TNF $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$ 、GM-CSF) について放出量の小さな増大が見られた。

一方、CPD(クエン酸リン酸デキストロース)で処理して同様にオゾン化した血液では全体のサイトカインの5分の1しか産生しなかった。これらの結果より、自家血液療法における血液の刺激は正確に行わなければならないという我々の過去の知見が確認された。ヘパリン処理した血液の再注入直前における溶血率は1.6~3.0%の範囲であった。ヒトの血液において再注入した血液は全体の5%であり、ウサギの実験と比較することはできない。このことが恐らく24時間でサイトカインを測定しても検出できない原因と考えられる。体温については通常の24時間周期しか観察されなかった。一人が2,3日の間気分が良くなって多幸症になったことを除けば、主観的および客観的な副作用は認められていない。

インターフェロンの刺激によって産生が誘導され抗ウイルス活性を示すMxタンパク質の血中濃度は、図1に示すごとく72時間で最大値になりその後減少した。血液に空気を吹き込んで行ったコントロール実験においては、Mxタンパク質の上昇は認められなかった。同じボランティアに5回処置し、20日間のMxタンパク質の濃度を調べた結果、いずれの処置においてもMxタンパク質濃度は48~72時間後に最大になった。IFN $\alpha$ やIFN $\beta$ を注射したときにMxタンパク質の濃度が最大になるのは24時間後であることから、自家血液療法においては末梢血単核球が様々な臓器に移動してインターフェロンを分泌するまでに1~2日かかるものと考えられる。対照的にネオプテリンと $\beta$ 2ミクログロブリンの濃度は正常値の状態のままで変化しなかった。オロソムコイド、C反応性タンパク質、およびハプトグロビンなどの炎症の急性期タンパク質も一定値のままであった。このことは自家血液療法におけるオゾン刺激が穏やかなものであることに起因すると考えられる。

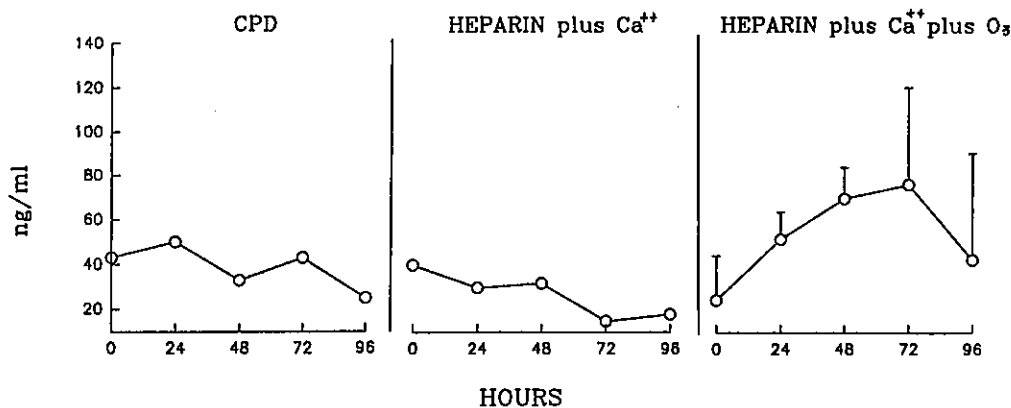


図1 1回自家血液療法後のヒト血液中Mxタンパク質の経時的挙動 (オゾン 54 $\mu$ g/ml血液で処理)

#### 用語の説明

**Mxタンパク質**： インターフェロンの刺激によって産生が誘導され抗ウイルス活性を示す血清中タンパク質

**オロソムコイド**： 血清中の糖タンパク質画分より、単一の糖タンパク質として分離されたもの。血清中の濃度は、がん、炎症などの病的状態で増加する。

**C反応性タンパク質 (CRP)**： 肺炎球菌の莢膜のC多糖体と反応する血清中 $\beta$ -グロブリン。組織破壊を伴うような炎症性疾患の時に増量する急性期反応性物質の一種である。

**ハプトグロビン**： 血清 $\alpha$ 2-グロブリンの画分。ヘモグロビンと特異的親和性を持ち種々の疾患で変動がみられ、肝障害や溶血性貧血の患者では低値を示し、炎症性疾患では高値を示す。

アで客死したことを悼んで造られた純日本庭園の新渡戸記念公園、1916年に開園したカナダの大学では最古の植物園などが有名です。また、広大な Regional Park が外周を取り囲み、キャンパス内でも、多くのリスや鳥が教職員、学生たちと共生しております。

学部構成は医学、歯学、薬学をはじめ、農学、森林学などの自然科学や人文科学、教育学など23学部におよび、これらの学部で学ぶ正規の学生数は約4万人、教職員、海外からの留学生、研修生、卒業後研修生など、すべてを合わせると最大8万人に達すると言われております。この人口はバンクーバー市の約1割に当たり、この地方最大の人口集合地でもあり、バス (Translink) の発着の中心にもなっております。日本人の若い人にもたいへん親しまれており、夏休み期間ともなると、UBCのESLで英語の勉強をする日本の若い女学生で溢れかえり、まるで、日本の女子大に在るような錯覚に陥るほどです。

### The Faculty of Dentistry

UBCの歯学部は定員40名で、入学するためには、Faculty of Arts あるいは Faculty of Sciences を卒業するとともに在学中に指定された講義の単位を修得することが必要です。その上で在学中の成績考査、適性試験、面接などを経て、歯学部入学が許可されます。大学院や社会に出てから入学する学生も多く、歯学部1年生の平均年齢は26歳と高く、日本ではすでに社会の第一線で活躍している年齢です。

UBCにおける私の指導教授は Dr. Donald M. Brunette で、Cell Biology の主催者であり副学部長も兼ねておりました。毎日大変忙しい方ですが、毎週金曜日の午前中に研究報告会を行い、全員にその週の研究経過と結果、そして次の予定を聞き、すべて自分のノートに記載し、1人1人に適切なアドバイスを与えておりました。彼の研究室では、歯科インプラントの表面形態 (Micro design) が細胞や組織の動態に何らかの影響を及ぼすことから、シリコンウエハー上に様々な溝や形態を Photo-etching し、その表面に純チタンをコーティングしてこれを培養基材とし、細胞の動きを形態学的に研究しております。私の仕事は様々な表面形態を持つインプラント体をレジンで複製し、その表面に純チタンコーティングしてラットの頭部に埋入して、インプラントの表面における組織動態を検討することでした。オゾンとは直接関係のない研究分野ですが、歯科インプラントの大きな問題の一つである感染に対して、オゾン水をぜひとも利用したいと考えておりますので、皆様にもご協力をお願いしたいと思います。

## 文献抄録

### オゾンの生物学的影響に関する研究 第6報

#### オゾン処理後のヒト血液による形質転換成長因子(TGF)-1の産生

Studies on the Biological Effects of Ozone: 6.

Production of transforming growth factor 1 by human blood after ozone treatment.

V. Bocci, E. Luzzi, E. Corradeschi, S. Silvestri

Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, Vol.8, No.4, pp.108-112 (1994)

(Institute of General Physiology and Nutritional Sciences, Siena, Italy)

摂南大学薬学部 中室克彦、坂崎文俊

**要旨** 正常ボランティアのヒトの全血液を 22-156  $\mu\text{g/ml}$  の濃度のオゾンに曝露した後、培養8時間までにおいて形質転換成長因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) の有意な放出があった。TGF- $\beta$ 1 に比べ TGF- $\beta$ 2 の産生はオゾンの濃度によって影響を受けなかった。ヘパリンと 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  の存在下では血液は著者らのこれまでの研究と矛盾なく、腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の産生と遊離ヘモグロビンは低い正常域の放出をした。これらのデータは、血液をオゾンで処理した後に再注入する自家血液療法が、免疫調節的な効果を達成するための貴重な治療アプローチを示し得るということを支持している。

**キーワード**：オゾン処理、ヒト血液、形質転換成長因子 (TGF- $\beta$ 1)、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ )