

実験方法

血液：血液はシエナ大学血液銀行にて22～63歳の健康な男性から採取し、抗凝固剤には30 U/mL カルシヘパリン (Calciheparin) を用い、1時間以内に実験に共した。血液を約5 mLづつ4つに分取し、一つは無処理、残りは医療用酸素、オゾン濃度40 µg/mLおよび80 µg/mLのオゾン/酸素混合気体の曝露に用いられた。血液と同じ容量の試料気体を注射筒に入れ、縦方向に毎分80回転の速さで回転させることにより、泡を立てずに効率よく混合した。1分後、血液を取り出し、以下の測定用試料とした。

生化学的検査：TAS、PTG、TBARS、溶血の測定は、いずれも既存の論文に従って操作した。

サイトカインの定量：試料にグルコース溶液を加えてグルコースの最終濃度を8～9 mMに調節した後、5% CO₂条件下で8時間培養した。培養後遠心分離し、得られた血漿を-70℃で保存した。サイトカインの測定には市販のキット (Cytoscreen immunoassay kits (Biosource Intern.)) を用いた。

結果

オゾン/酸素混合気体曝露後、1分以内に全抗酸化状態(TAS)の減少は最小限に抑えられた。全血液中のTASは速やかに回復したが、血漿中のTASは回復しなかった。これはオゾンの作用によって血漿では過酸化水素が生成するためであり、また、全血液中においてはほとんど生成しなかったという過去の結果と一致する。

TASとタンパク質チオール基 (PTG)はオゾンの曝露により減少したが、最高用量 (血液1gあたり80 µg O₃/mL)においても、それぞれ20%および25%の減少を認めるにすぎなかった。逆に、血漿中過酸化脂質の指標であるTBARSおよびヘモグロビンは増大した。しかし、ヘモグロビンはわずかであった。オゾン化した血液を培養するとIL-8の産生が誘導された。これに対し、IFN-γとIL-4はほとんど産生されなかった。

考察

オゾン療法においては、処離に使用するオゾン濃度を正確に把握しなければならない。これは最新のオゾン発生器であれば可能である。オゾンは少なすぎると効果が無く、多すぎると毒性が発現するため、血液中TASやPTGをモニターすることがよい。これまでの結果ではヒトの血液に対するオゾンの処理の許容濃度範囲は、血液1gあたり30～80 µg O₃/mLであった。

オゾンの一過性の曝露によってIL-8の産生が誘導された。おそらく細胞内外において過酸化水素が生成し、これが細胞内NF-κBが酸化的に活性化されることによってIL-8が誘導産生されることが考えられる。IL-8は白血球を循環系から組織へ誘導する重要なサイトカインとして知られている。オゾンがヒトの気管支で作用すれば、IL-8により炎症性細胞が気道内腔に誘導されて有害となり、一方、オゾン化した血液を患者に再注入することは慢性ウイルス患者にとって有効な免疫賦活剤となる。オゾンが体内においてもIL-8の産生を誘導するかは現在のところ不明である。自家血液オゾン療法は副作用を起こしていない。また、今回の実験で、溶血が無視できるほどしか起こらなかったことは重要である。

オゾン療法は経験的な相補療法であり、今回の実験によって、オゾン療法が信頼に足る効果的な処置となり得ることを示した。

用語解説 IL-8：感染や組織損傷によって誘導されるサイトカインの一種。血管内の白血球を病巣に呼び寄せ、活性化させる。炎症が慢性化してIL-8が無制限に産生されれば、白血球が大量に集合して周辺組織が破壊される。

文献抄録

オゾンの生物学的影響に関する研究：第11報

ヒト内皮細胞からの因子の放出

Studies on the Biological Effects of Ozone: 11.

Release of factors from human endothelial cells

Giuseppe Valacchi and Velio Bocci

Mediators of Inflammation, 9 (6), 271-276 (2000)

Institute of General Physiology, University of Siena, Italy

相模女子大学 伊藤順子

要旨 ヒト内皮細胞 (Human endothelial cells) にオゾン曝露した血清を加え培養するとNitrite (亜硝酸塩) が産生される。Nitriteは直ちに一酸化窒素 (NO) に変化する。アテローム性動脈硬化症の治療にオゾン療法が有効であるのは、一酸化窒素が血管拡張作用を持ち、動脈の血圧を低下させる働きがあるためである。また、オゾン曝露した血清を加えて培養したヒト内皮細胞の培養液中には、サイトカインの一種であるInterleukin-8の産生が増加することから、これを介する作用メカニズムがあるものと推測される。

キーワード : オゾン、反応酸素種、過酸化水素、一酸化窒素、内皮細胞、Endothelin-1、E-selectin、Interleukin-8

研究の背景

アテローム性動脈硬化症は血管の病気である。これは動脈壁のアテローム性進行性脂肪変性を伴う。進行すると糖尿病になり手足の壊疽を起こす。オゾン療法がアテローム性動脈硬化症の患者に見られる慢性の手足の局所貧血、安静時に起こる筋肉痛などに有効であることは経験的に知られていた。一般的に行われているのは血管拡張剤や抗凝集剤による治療である。自家血液をオゾン/酸素混合ガスに曝露し、血管に再注入するオゾン療法はアテローム性動脈硬化症に有効である。この病気に伴う手足の貧血、安静時に起こる筋肉痛などによく効き、血管拡張剤や抗凝集剤を使った場合と類似の効果をあらわす。しかし、オゾンが生理的に働く機構はまだ解明されていない。この論文は、オゾン曝露したヒト血清をヒト内皮細胞に加えて培養し、オゾンの生理作用のメカニズムを明らかにしようとしている。

実験方法

1分間、オゾンに曝露したヒト血清をヒト内皮細胞に加えて培養し、細胞から放出される物質を測定した。オゾン発生にはドイツ製オゾン発生装置 (Model Ozonosan PM 100K, Hänsler GmbH, Iffezheim, Germany) を用いた。反応の指標として培養細胞から放出されるNitriteを測定した。さらに3種類の代表的なサイトカイン (Endothelin-1, E-selectin, Interleukin-8) の放出も測定した。

結果と考察

ヒト血清を1分間、オゾン/酸素混合ガスに曝露した (40, 80 μ g/ガス1ml / 血清1ml)。この血清をヒト内皮細胞に加えて培養し、培養細胞から放出されるNitriteを測定した。Nitriteは光で容易に分解し一酸化窒素になる。オゾン曝露の場合、培養細胞中で産生したNitriteはコントロールに比べ増加した。Nitriteの基質となるL-Arginine (20 μ M) を培養液に加えた場合はNitriteの産生量がさらに増加した。しかし一酸化窒素産生阻害剤であるL-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester, 20mM) が共存するとNitriteの産生量は抑制された。

オゾン曝露した血清ではPryor's 反応によって過酸化水素が産生されることを著者らは1994年に報告している。今回はオゾン曝露血清の代わりにヒト内皮細胞の培養液に過酸化水素 (20, 40, 100 μ M) を加え24時間培養し、その時生ずるNitriteを測定した。Nitriteの産生量は過酸化水素を加えると増加している。過酸化水素の量が増加するにつれNitriteも上昇する。しかし一酸化窒素産生阻害剤であるL-NAMEを加えるとNitrite産生は強く抑制された。この実験から、培養液におけるNitriteの産生はオゾンにより産生された過酸化水素によるものと考えられることができる。

過酸化水素は、免疫機能を持つT細胞の働きに影響を持っていることが1994年にHenkel等によって報告されている。過酸化水素はNF- κ Bのトリガーになるのである。オゾンの作用を受けて放出される過酸化水素によってT細胞を介してサイトカインが産生されてくると考えられる。サイトカインはタンパク質からできている液性因子である。上皮細胞などから分泌され、現在では20種類以上が発見されている。免疫応答にかかわる白血球やマクロファージなどの増殖、分化、活性の調節を行っている。ごく微量で効果をあらわし、互いにネットワークを持って働いている。

この論文では Endothelin-1, E-selectin, Interleukin-8といった典型的なサイトカインの遊離が誘導されるのではないかと考え実験している。オゾン(40, 80 μ g/ml)を血清に曝露し、この血清をヒト培養細胞に加えて培養した場合、培養液中の Endothelin-1および E-selectinを測定すると、オゾン曝露による効果は認められなかった。Interleukin-8の場合は4, 6, 24時間培養によって増加が認められた。培養液中に L-Arginineを加えた場合の添加効果は認められなかった。一酸化窒素放出には、内皮細胞にもともと見られるカルシウム依存一酸化窒素合成酵素 (NO synthetase) が存在するためなのか、新しく誘導されたiNOS (カルシウム非依存一酸化窒素合成酵素) が働くためなのか不明である。