

# オゾンの生物学的影響に関する Bocci らの一連の研究

摂南大学薬学部 中室克彦、坂崎文俊

**要旨** 自家血液オゾン療法は主に中央ヨーロッパで行われてきた相補的医療であり、様々な病態の何万人もの患者に適用され、効果を上げている。自家血液オゾン療法では患者の血液を自家輸血用ガラス瓶にとり、酸素/オゾン混合気体に曝露して患者の体内に戻す。このとき、血液中にはオゾンが残留しないにも関わらず自家血液オゾン療法は有効であるが、その機構については不明な点が多い。血液は可溶性成分を含む血漿と他の細胞成分から構成され、オゾンは血液中の細胞成分に作用していることが考えられる。血液中に存在する細胞には赤血球、血小板、白血球があり、白血球はさらにリンパ球、食細胞（マクロファージ、好中球）、好酸球、好塩基球、肥満細胞などに分類される。このうちリンパ球は他の白血球の活動を促進したり抑制したりするはたらきがあり、免疫応答においては特に重要である。Velio Bocciらは自家血液オゾン療法の有効性に関して研究し、多くの免疫学的知見を示した。ここでは1990年から2000年に発表された「オゾンの生物学的影響に関する研究（第1報～第11報）」<sup>1-11)</sup>を概観し、紹介する。

**キーワード**：自家血液オゾン療法、サイトカイン、過酸化水素、一酸化窒素、免疫応答

## 1. 免疫機能の活性化

オゾンを曝露した血液を培養すると、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-2、GM-CSF、IFN- $\beta$ の産生が促進された<sup>1-7)</sup>。これらサイトカインと呼ばれるタンパク質は主にリンパ球によって生産、分泌され、免疫担当細胞の活性化を促す。すなわちオゾンを血液に曝露することによってリンパ球が何らかの刺激を受けてサイトカインを分泌することが明らかとなり、オゾンが免疫担当細胞の活性化を誘導することが示唆された。これらのサイトカインの産生量が最大となるオゾン濃度はおよそ78  $\mu\text{g/mL}$ 血液である。

抗凝血処理のためにヘパリンを用いると促進の度合いが大きいが、CPD（クエン酸リン酸デキストロース）を用いると促進の度合いが小さくなる<sup>8)</sup>。これはクエン酸が血漿中のCa<sup>2+</sup>と結合することにより、リンパ球がCa<sup>2+</sup>を利用できなくなるからであると考えられる。Ca<sup>2+</sup>を過剰量（生理的な濃度の5倍）添加すると溶血が起こったことから、Ca<sup>2+</sup>を添加しても自家血液オゾン療法の効果を増大させることはできないと考えられる<sup>9)</sup>。

オゾンを曝露した血液を室温で1～3時間おいた後に実験に用いても、サイトカインの産生には影響がなかった<sup>3)</sup>。その他の免疫機能に関しては、抗ウイルス活性を有するタンパク質 Mx、および白血球の遊走因子であるIL-8の産生量に増大が見られた<sup>5,8,10,11)</sup>。

## 2. オゾンによる酸化の影響

オゾン曝露によって還元型グルタチオン量が減少したが速やかに回復し<sup>4)</sup>、オゾンによる酸化的障害性は最小限にとどめられると考えられる。しかし、オゾンを過剰量曝露すると還元型グルタチオン量は回復せず<sup>9)</sup>、オゾンの曝露量を正しく管理することの重要性が示唆された。TNF- $\alpha$ やIFN- $\gamma$ 産生量が極大となるオゾン濃度は試料によって変動があり、血漿内抗酸化物質の量が異なることによると考えられる<sup>4)</sup>。オゾンを血漿に曝露すると過酸化水素が生じ、すぐに消失する<sup>7, 11)</sup>。過酸化水素は免疫担当細胞の細胞内シグナルに寄与することが知られているので、オゾンによる免疫機能の活性化に過酸化水素が寄与している可能性が考えられる。血漿中ではカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼのような抗酸化酵素がはたらき、オゾンによる酸化ストレスに抵抗すると考えられる<sup>7)</sup>。脂質過酸化物の増加はオゾン濃度が70  $\mu\text{g/mL}$ 血液においてプラトーになる<sup>7,10)</sup>。

## 3. 凝血と血小板

いくつかの試料で血液の凝固が見られる。リンパ球および単球の顕微鏡観察では形態の変化は見られず、凝固が起こるのは血小板に固有の応答であると考えられる<sup>7)</sup>。抗凝血処理にCPDを用いると凝血しないがヘパリンでは凝血することから、血漿中のCa<sup>2+</sup>が凝血に関与していると考えられる<sup>9)</sup>。しかし前述のようにCa<sup>2+</sup>が存在しなければ免疫機能の活性化も起こらない<sup>3)</sup>。血漿中TGF- $\beta$ 1量はオゾン濃度を156  $\mu\text{g/mL}$ 血液まで上げてオゾン濃度に比例して増加した。他のサイトカイン類の産生量がオゾン濃度78  $\mu\text{g/mL}$ 血液付近で極大となることと異なるので、TGF- $\beta$ 1はオゾンによって産生が促進されたのではなく、あらかじめ生産されて血

血小板にあったものが放出されたと考えられる<sup>9)</sup>。オゾン曝露によって血小板から放出されるPDGF、TGF-β1が増加し、これらが壊死組織の回復に貢献していると考えられる<sup>10)</sup>。凝血を抑制することを重要視すれば、オゾン濃度は40μg/mL血液が適当であると述べている。

#### 4. 血管拡張作用

オゾン曝露した血漿をヒト内皮細胞に添加すると培養液中の亜硝酸が増加したことから、内皮細胞からの一酸化窒素の放出が示唆された<sup>11)</sup>。すなわちオゾン曝露によって放出された一酸化窒素が血管平滑筋に作用して血管を拡張させ、血流を増加させる現象に関与することが考えられる。

#### 5. まとめ

自家血液オゾン療法における抗凝血剤ヘパリンとCPDの長所と短所(表1)から、ヘパリンが有効であることが考えられる。(報告者註 ヘパリン有効とのBocciのコメントは彼の実験結果の結論であって、医療としての安全性の観点からはいささかの血液凝固も許されないので、オゾン療法のスタンダードはクエン酸リン酸塩を抗凝固剤として使用することになっている。)

血液にオゾン曝露すると血漿中に過酸化水素が生成し、これが自家血液オゾン療法における多様な作用を生み出す。免疫担当細胞からはさまざまなサイトカインの放出が促進され、免疫機能が活性化する(表2)。

表1 自家血液オゾン療法における抗凝血剤の影響の比較

	長所	短所
ヘパリン	サイトカイン等の産生が促進される。	凝血が起こることがある。
CPD (クエン酸リン酸デキストロース)	凝血が起こりにくい。	サイトカイン等の産生が起こりにくい。

表2 自家血液オゾン療法によって産生が促進されるサイトカインと免疫関連因子

オゾンにより刺激を受ける細胞	産生される免疫因子	はたらき
リンパ球	TH1	IFN-γ
		IL-2
		GM-CSF
	TH2	IL-6
食細胞		TNF-α
		IL-1β
		IL-8
		PDGF
血小板		TGF-β1
		IFN-β
様々な細胞		細胞のウイルス抵抗性を増強、リンパ球によるウイルス感染細胞の攻撃を補助

また血小板のはたらきにより損傷を受けた組織の修復が促される。血管内皮では一酸化窒素が放出され、血管が拡張して血流が増加する(図1)。

血漿中にはグルタチオンをはじめとする抗酸化物質が存在しており、オゾンが過剰にならなければ酸化的

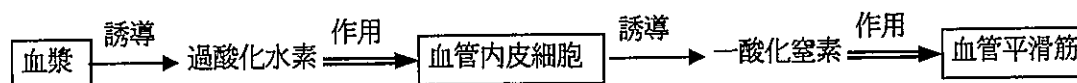


図1 自家血液オゾン療法による血管拡張作用のしくみ

障害性は最小限に抑えられる。オゾン曝露による効果が現れ、かつ凝血などの副作用が出ないための最適なオゾン濃度は40 $\mu$ g/mL血液付近である。このように本療法の作用機構を考えると、自家血液オゾン療法は間接的なサイトカイン療法と称しても過言ではない。

## 6. 引用文献

1. Studies on the biological effects of ozone: 1. Induction of interferon  $\gamma$  on human leucocytes. V. Bocci and L. Paulesu, *Haematologica*, 75, 510-515 (1990)
2. Studies on the biological effects of ozone: 2. Induction of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on human leukocytes. L. Paulesu, E. Luzzi and V. Bocci, *Lymphokine and Cytokine*, 10, 409-412 (1991)
3. Studies on the biological effects of ozone: 3. An attempt to define conditions for optimal induction of cytokines. V. Bocci, E. Luzzi, F. Corradeschi, L. Paulesu and A. Di Stefano, *Lymphokine and Cytokine Research*, 12, 121-126 (1993)
4. Studies on the biological effects of ozone: 4. Cytokine production and glutathione levels in human erythrocytes. V. Bocci, E. Luzzi, F. Corradeschi, L. Paulesu, R. Rossi, E. Cardaioli and P. Di Simplicio, *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 7 (4), 133-138 (1993)
5. Studies on the biological effects of ozone: 5. Evaluation of immunological parameters and tolerability in normal volunteers receiving ambulatory autohaemotherapy. V. Bocci, E. Luzzi, F. Corradeschi and L. Paulesu, *Biotherapy*, 7, 83-90 (1994)
6. 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 and S. Silvestri, *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 8 (4), 108-112 (1994)
7. Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone. V. Bocci, G. Valacchi, E. Corradeschi, C. Aldinucci, S. Silvestri, E. Paccagnif and R. Gerlf, *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 12 (3), 67-75 (1998)
8. Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. V. Bocci, G. Valacchi, F. Corradeschi and G. Fanetti, *Mediators of Inflammation*, 7, 313-317 (1998)
9. Studies on the biological effects of ozone: 9. Effects of ozone on human platelets. V. Bocci, G. Valacchi, R. Rossi, D. Giustarini, E. Paccagnini, A. M. Pucci and P. Di Simplicio, *Platelets*, 10, 110-116 (1999)
10. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. G. Valacchi and V. Bocci, *Mediators of Inflammation*, 8, 205-209 (1999)
11. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. G. Valacchi and V. Bocci, *Mediators of Inflammation*, 9, 271-276 (2000)

---

## 書籍紹介

### オゾン療法のバイブル"Oxygen-Ozone Therapy: A Critical Evaluation"

北海道大学医療技術短期大学部 三浦敏明

2001年9月にロンドンで開催された国際オゾン協会 (IOA) のメディカルセッションでイタリアのシエナ大学のBocci教授から、「オゾン療法のバイブルを執筆するので、貴方達のグループのオゾン化オリーブ油に関する研究成果も引用したい」との申し出を受けた。Bocci教授は、本会報で中室教授らがシリーズで紹介している「オゾンの生物学的影響に関する研究」の著者でもあり、オゾン療法の基礎から臨床までを熟知されている、オゾン療法の第一人者である。待ちかねていた彼の著書が標記のタイトルで Kluwer Academic Press (Netherlands) から出版され、昨年末に入手することができた。本書は39章、440頁からなる大作であり、その内容を簡潔にまとめるのは容易ではないので、概要紹介に替えて全39章のタイトルを以下に記すことにした。各章のタイトルを眺めるだけで、本書がオゾン療法の基礎と応用および関連領域の進歩や現状を漏れなく記