

免疫修飾因子としてのオゾン

Alessandra Larini, Carlo Aldinucci and Velio Bocci

Ozone as a modulator of the immune system

Institute of General Physiology, University of Siena, 53100, Siena, Italy

International Ozone Association,

Proceedings of the 15th ozone world congress,

11th-15th September 2001, Medical therapy conference, pp.1-9 (2001)

摂南大学薬学部 中室克彦、坂崎文俊

要旨 オゾンの免疫修飾特性を明らかにするために、ヒト末梢血単核球をオゾン曝露した血清で刺激し、治療に適したオゾン濃度範囲、免疫刺激効果と毒性影響、オゾン曝露後86時間までのサイトカインの産生のパターンを検討した。その結果、オゾンはIL-6、IL-4、TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-10といったサイトカインの産生を弱く誘発し、サイトカイン産生量とオゾン濃度との間に有意な相関があった。また細胞の増殖を解析したところ、オゾン濃度を増加させると末梢血単核球に細胞毒性が出現することが示唆された。

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、免疫応答

1. はじめに

白血球はリンパ球(20~25%)、単球(5%)、3種の顆粒球(このうち70%が好中球)からなり、異なる細胞群から構成されている。著者らは適切なオゾン量がヒトの血液からIFN- β の遊離をわずかに誘導できることを初めて示した。後にオゾンが誘導するサイトカインはIFN- β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 、TGF- β 1、GM-CSFにおよぶことが明らかとなった。さらに呼吸器粘膜の上皮細胞がオゾンと接触するとサイトカインの産生が誘導されることを確認した。これらの初期の研究により、血液中抗酸化物質による保護効果や、サイトカインによって産生の仕方が異なること、オゾン濃度が高いとき、特に血液1 mLあたり80 μ g/mL以上では逆にサイトカインの産生量が抑制されることが明らかとなった。しかしこれらは限定的な結果である。全血液は限られた時間しか培養できないし、サイトカインを産生している細胞を同定することができなかった。そこで提供者の血液を2つの条件でオゾン曝露し、末梢血単核球の生存率、産生されるサイトカインの種類と量を調査した。最初のオゾン処置条件では血清中に単核球が懸濁した状態で単核球を直接オゾン曝露し、オゾンによって生じる物質のうち、半減期の短いH₂O₂の影響を調べた。2番目の条件では血清にオゾンを曝露して20分後に、末梢血単核球を懸濁し、遅れて生じる半減期が非常に長い脂質酸化物による影響のみを検討した。

2. 実験方法

1) オゾン生成および曝露：オゾンは、オゾン発生器 (Model Ozonosan PM 100K, Haensler GmbH, Iffezheim, Germany)と医用酸素を用いて、電気放電により生成した。オゾン濃度は国際オゾン協会標準化委員会に従って253.7nmの吸光度によって定量した。酸素・オゾン混合ガスをシリンジに取り、多方向ストップコックを介して接続したシリンジに注入し、あらかじめシリンジに入れてあった等容量のヒト男性AB型血漿と混合した。試料は穏やかに20分間混合し、試験管に分注して分析に用いた。対照として酸素を曝露した試料を用いた。

2) 採血および末梢血単核球の精製：インフォームドコンセントを得た後、薬物治療を受けておらず過去1カ月間感染症にかかっていない24~67歳の健常者から静脈血を採取し、0.14 mL/mL血液のクエン酸リン酸デキストロースで抗凝血処理を行った。Ficoll-Hypaque密度勾配遠心分離の後、20 mM HEPES含有RPMI-1640培地で2回洗浄し、低速遠心分離で血小板を除き、最終濃度が1 \times 10⁶ cell/mLになるように再懸濁した。

3) ヒト末梢血単核球の増殖：マイトジェン刺激には最終濃度5 μ g/mLのフィトヘマグルチニン (PHA)を用い、細胞増殖はプロモデオキシウリジン取り込み法で評価した。

4) サイトカインの定量：培養後、遠心分離して上清を-70 $^{\circ}$ Cで保存し、サイトスクリーンイムノアッセイキット (Biosource Intern)を用いて定量した。検量線は標準品を血漿に加えて作成した。

5) 生化学的検査：血漿中の全抗酸化状態 (TAS) はRice-EvansとMillerの方法(1994)で、タンパク性チオール基 (PTG) は5,5'-ジチオ-ビス-2-ニトロ安息香酸 (DTNB)メタノール溶液を用いる方法 (Hu, 1994)で、チオバルビ

バルビツール酸反応基質 (TBARS) はBuege とAustの方法 (1994)で分析した。

3. 結果

末梢血単核球を単離したのち血清中に再懸濁してオゾンを直接曝露したときの効果について検討した。血清のTAS値は0.526 mMであり、新鮮なヒト血漿の通常値 (1.4~1.8 mM) に比べて著しく低い値であった。オゾン曝露の指標として一般的なTBARSとPTGを測定した結果、期待どおりオゾン濃度が増加するにつれてTBARS値は増加しPTG値は減少した。次に末梢血単核球の増殖指数 (PI) を調べると、低オゾン濃度 (2.5~10 µg/mL) においてのみ、62~86時間後、わずかに増殖を引き起こす作用が見られた。酸素はほとんど効果が無く、マイトジェンであるPHAでは非常に高い応答が見られた。オゾンは2~70 µg/mLの範囲で濃度依存的に細胞毒性を示すことが示唆された。血清にオゾン曝露して20分後に末梢血単核球を懸濁した結果、寿命の長い脂質過酸化の関与が高く、寿命の短い過酸化水素の関与は低いことが示唆された。これらの実験では低濃度オゾンではわずかに活性があり、高濃度では阻害があることが明らかになった。血清にオゾン曝露してから単核球を懸濁したときと懸濁後にオゾン曝露したときの比較では違いが認められず、サイトカイン誘導における顆粒球の関与は分らなかった。IL-2とIL-4は培養38~62時間で産生された。62~86時間にIFN-γ、TNF-α、IL-4は測定できたが、オゾン濃度との相関はなかった。62時間において2~5 µg/mLのオゾンはIL-2とIFN-γに対する促進は弱い、IL-6に対しては促進しなかった。IL-10の誘導は無視するレベルであった。今回検討した4人の被験者のうち3人は末梢血単核球がほとんど反応しなかった。

4. 考察

この研究ではまず、オゾン曝露した末梢血単核球が増殖し、サイトカインを産生するかを明らかにし、次に血清にオゾン曝露した際に起こる一連の反応、 H_2O_2 の発生、脂質酸化物 (LOPs) (ペルオキシラジカル、水酸化アルケナール、マロンジアルデヒドなど) の発生を調べた。 H_2O_2 は初期の生産物であり寿命は2.5分であるが、細胞内に拡散することによって転写因子NF-κBを活性化し、サイトカインを含む数種のタンパク質合成を誘導する。この反応経路は細胞内で還元型グルタチオン (GSH)、アスコルビン酸、グルタチオンペルオキシゲナーゼやカタラーゼによって調節されているため、 O_3 濃度が低すぎるとNF-κBを活性化できない。一方 O_3 濃度が高すぎると抗酸化物質を圧倒し、大量の H_2O_2 を産生して細胞に傷害を招く。今回の検討では以前の結果に基づいて5~20 µg/mLの濃度範囲でオゾン曝露したが、実際にはたった2.5 µg/mLで細胞毒性が発現した。細胞に直接オゾン曝露した場合とオゾン曝露した血清を細胞に加えた場合で同じ結果であったことから、LOPは体外においても安定であり、1 µg/mL以下の非常に低い濃度では免疫促進作用を示し、1 µg/mL以上の濃度では細胞傷害性があることが明らかになった。予想に反して4人の末梢血単核球のうち、3人ではサイトカインの産生が少なかった。IFN誘導剤に対する反応に個人差があることはよく知られているが、オゾン処理での個人差と関連があるかは分からない。サイトカイン産生が同一ではないということは、免疫機能の低下した患者にはオゾン療法が有効でない可能性があるという点で特に重要である。次はオゾン曝露によるサイトカイン産生における顆粒球の関与を検討する予定である。

NF-κBの解説

自家血液オゾン療法は、サイトカイン療法であるといわれる。血液中構成成分とオゾンの反応によって生成する過酸化水素 (H_2O_2) が、免疫担当細胞であるリンパ球の1種であるB細胞に入り、最も重要なKey物質である転写調節因子としてのNF-κBを刺激して、多くのサイトカイン (IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IFN-β、IFN-γ、TNF-α など) の産生に関与するといわれている。

NF-κBはNuclear factor for κ chain gene in B cellsの略で、転写因子の1種である。もともとIg light chain遺伝子の発現にかかわるエンハンサーに結合する転写因子として同定されたが、免疫に関わらずさまざまな遺伝子の発現を調節していることが明らかになった。LPS (リポポリサッカライド) 刺激によって活性化され、多くのサイトカインの産生を誘導する。

(中室克彦)