

【研究報告】

ウシにおけるオゾン化自家血液投与による免疫機能に対する効果

寺崎信広, 福田茂夫, 大塚浩通, 田村啓二, 吉野知男, 小岩井照, 緒方篤哉

日本医療オゾン研究会会報, Vol.5, No.3, 6-10. (1998)

研究報告

ウシにおけるオゾン化自家血液投与による 免疫機能に対する効果

寺崎 信広¹⁾ 福田茂夫¹⁾ 大塚浩通¹⁾ 田村啓二³⁾ 吉野知男¹⁾ 小岩政照¹⁾ 緒方篤哉²⁾

¹⁾ 酪農学園大学 ²⁾ 宗谷NOSAI ³⁾ 細菌化学研究所

要約 ウシにオゾン化自家血液を静脈内に投与し、その後の血清インターロイキン(IL)-1 および IL-6 活性、好中球貪食能・殺菌能、単核球サブセット解析および血清免疫グロブリン濃度を経日的に測定し、観察した。オゾン群では対照群と比較して血清IL-1活性値が上昇傾向を示し、血清IL-6 活性値は有意に上昇した(p<0.05)。単核球サブセット解析ではCD14抗原陽性細胞および γ δ 抗原陽性細胞が有意に増加した(p<0.05)。また好中球の貪食能および殺菌能も有意に上昇した(p<0.05)。さらに血清IgG濃度の増加率において有意な上昇を認めた(p<0.05)。本実験から、オゾン自家血液療法はウシの免疫機能に対し何らかの効果があることが明らかになった。

キーワード：ウシ、オゾン自家血液療法、免疫機能、サイトカイン

1. はじめに

オゾン自家血液療法は、患者から採取した少量の血液を体外で微量オゾンと混合した後、再び患者の血管内に戻す治療法である。この治療法はウイルス性疾患、循環障害などに治療効果があり、しかもその効果が一定期間持続する [1]。その効果の説明の一つに、ヒトの血液または分離した白血球に微量オゾンを暴露させると、白血球が活性化されてさまざまなサイトカインの産生が促進されるという報告 [2,3] があげられる。したがって、微量オゾンによって活性化された白血球および誘導されたサイトカインなどが生体の免疫機能に対して効果的に作用すると考えられている [4]。一方、獣医療ではウシの難治性疾患においてオゾン療法による治療効果が報告されている [5,6]。しかし、オゾン自家血液療法によるウシの免疫機能についての研究は現在のところほとんど行われていない。そこで、我々はウシの免疫機能に対するオゾン化自家血液投与 (Ozonated Autohemoadministration ; AHA) の効果について検討した。

2. 材料および方法

オゾン化自家血液投与の手順 オゾン発生装置 (日本オゾン株式会社製) を使用し、濃度が10 μ g/ml のオゾン-酸素混合ガスを発生させた。供試牛の頸静脈から採取した血液 (体重100 kgあたり血液50ml) にオゾン総量が2000 μ g/100 kg 体重を超えないように体外で曝露後、直ちに同一牛の頸静脈内にこのオゾン化血液を投与した [7]。

供試牛 生後2ヶ月から12ヶ月齢の育成期のホルスタイン種6頭、ジャージー種3頭、黒毛和種1頭の10頭を用いた。供試牛は、体重約50kgから200kgで、臨床的に健康なウシを用いた。牛群は、AHAを適用した牛群 (AHA群) と無処置の牛群 (対照群) に分類した。

採材法 採材はオゾン投与前、投与後1、2、3、4、5、10 および15日目に供試牛の頸静脈から25ml 採血し、血液を血清分離用試験管 (10 ml) 、ヘパリンナトリウム添加試験管 (10ml) およびEDTA添加試験管 (3 ml) にそれぞれ分注した。

検査項目および方法 検査項目および方法を表1に示した。

血清サイトカイン活性の測定は、血清 IL-1 活性値をA375細胞の細胞増殖抑制性 [8]で、血清 IL-6活性値を

MH 60 細胞の細胞増殖性 [9] により測定した。

ヘパリン血を用いて比重遠心法により単核球浮遊液と好中球浮遊液を作成した。

単核球細胞表面抗原は単核球浮遊液 (5 ~ 20 × 10⁵/ml) に500倍に希釈したFITC標識抗 IgM 抗体、抗 CD14抗体、抗CD3 抗体、抗CD4 抗体、抗CD8 抗体および抗WC1-N1 抗体をそれぞれ 4℃で60分間作用させた後、FITC標識抗マウスIgG抗体を 4℃で30分間作用させた。その後、フローサイトメーター (EPECS ELITE ESP Coulter Corp.) の単核球ゲートによって、それぞれ IgG、CD14抗原、CD 3 抗原、CD4抗原、CD8 抗原およびγ δ 抗原陽性細胞の動態を解析した。

好中球貪食能はイースト粒子貪食試験 [10] により測定した。好中球浮遊液 (4 ~ 6 × 10⁵/ml) 200 μl に酵母浮遊液 (3 ~ 6 × 10⁴/ml) 100 μl と 5 倍希釈ウシ血清100 μl を混合し、37℃30分間ウォーターバス内で振盪させた後、3 分間遠心し、沈渣をスライドガラスに塗抹してギムザ染色し、鏡検して好中球の酵母貪食率を測定した。好中球殺菌能は好中球浮遊液 (2 × 10⁵/ml) 500 μl を測定用バイアルに入れ、生物化学発光

表 1 検査項目

検査項目	単位	検査方法
○ 臨床症状の観察 元気食欲、体温、心拍数、呼吸数、消化管運動、便、尿など		
○ 一般血液検査		
・ヘマトクリット値	%	毛細管法
・血漿タンパク質濃度	g/dl	屈折計法
・赤血球数	/ μl	自動血球測定器
・白血球数	/ μl	自動血球測定器
・血小板数	/ μl	ユノベット法
・白血球の分類	/ μl	ギムザ染色
○ 臨床免疫学的検査		
・血清IL-1およびIL-6活性値	U/ml	バイオアッセイ法
・単核球サブセット解析	%	フローサイトメトリー法
・好中球貪食能	%	イースト粒子貪食試験
・好中球殺菌能 (CL 活性値)	%	ルミノール化学発光法
・血清免疫グロブリン濃度増加率	%	一元放射免疫拡散法

測定装置 (A l o k a) にセットし、5 分間暗順応させてから測定を開始した。すなわち、20 μl の 0.2%ルミノール溶液を加えて3 分間静置し、刺激剤としてオブソニン化ザイモザン (OPZ ; 10 mg/ml) を20 μl 加え、その後のピーク値を測定した。好中球の活性は投与前のCL値を100%とし投与終了後CL値の変動を相対値で求めた。血清免疫グロブリン濃度は血清 IgG、IgM および IgA 濃度をそれぞれ測定し、オゾン投与前の血清免疫グロブリン濃度を100%

とし、投与終了後の血清 IgG、IgM および IgA濃度の変動を相対値で求めた。

統計処理 各検査結果について、項目毎に各日毎の平均値と標準誤差 (SE) を求め、対照群との有意差を T 検定により解析した。

3. 結果

臨床症状の観察 供試牛においてAHA適用による臨床症状の著明な変化および副作用は観察されなかった
 一般血液検査所見 一般血液検査はヘマトクリット値、血漿タンパク質濃度、白血球数、赤血球数および血小板数においては有意な変化は観察されなかった。AHA群では対照群に比較して好中球数は減少する傾向が観察された。リンパ球数および単球数には著明な変化は認められなかった。

血清 IL-1および IL-6活性値所見 (図1、2) 図1 からIL-1 活性値は、AHA群 (5.4 ± 11.04U/ml) では対照群 (0.1 ± 0.05U/ml) に比較して投与後 1 および 2 日目に上昇が認められた。図2 からIL-6 活性値は、AHA

群 (0.09±0.01U/ml) では対照群 (0.05±0.007U/ml) に比較して投与後3 および4 日目に有意に上昇した (p<0.05) ことが分かった。

単核球サブセット解析所見 (図3、4、5) AHA群では対照群に比較して、CD14 抗原陽性細胞は投与後

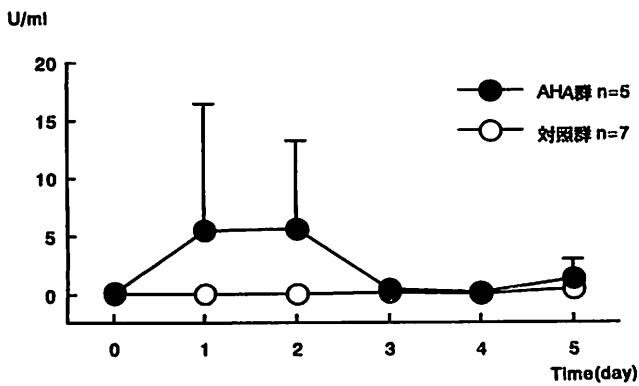


図1 オゾン化自家血液投与による血清 IL-1 活性値の推移

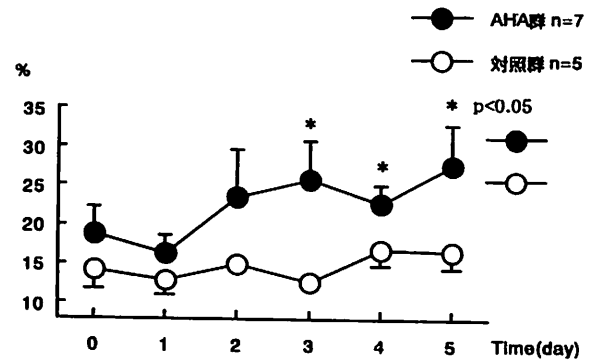


図3 オゾン化自家血液投与によるCD14 抗原陽性細胞の推移

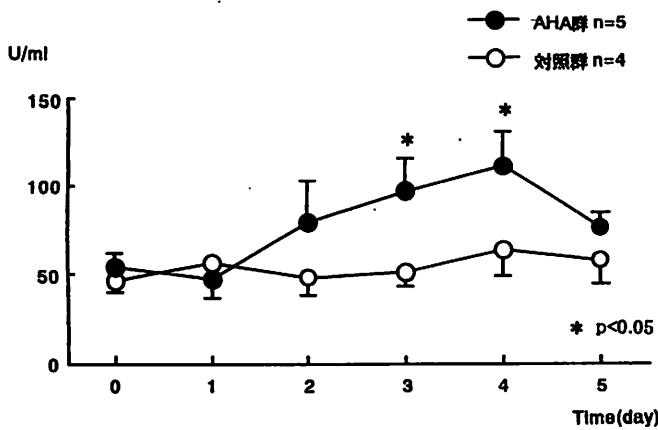


図2 オゾン化自家血液投与による血清 IL-6 活性値の推移

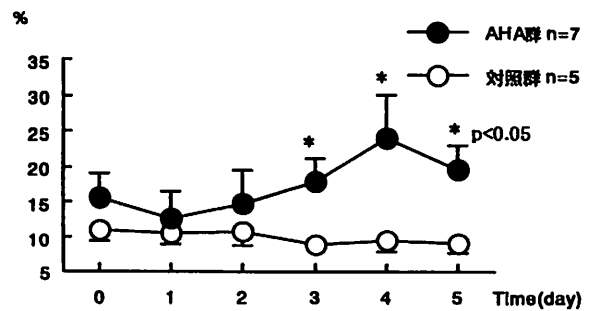


図4 オゾン化自家血液投与によるγδ 抗原陽性細胞の推移

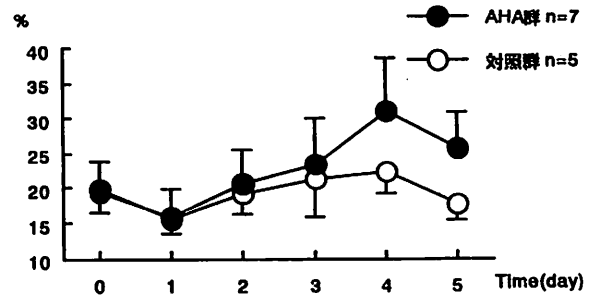


図5 オゾン化自家血液投与によるIgG 陽性細胞の推移

3、4 および5 日目に有意に増加した (p<0.05、図3)。γ δ 抗原陽性細胞は投与後3、4 および5 日目に有意に増加した (p<0.05、図4)。IgG 陽性細胞は投与後4 日目以降に増加傾向が認められた (図5)。

好中球貪食能所見 (図6) AHA群 (88.5±3.1%) では対照群 (71.0±3.2%) に比較して投与後2 日目に有意に上昇した (p<0.05)。

好中球殺菌能所見 (図7) AHA群 (322±76.8%) では対照群 (109.5±35.5%) に比較して投与後2、3 および4 日目に有意に上昇した (p<0.05)。

血清免疫グロブリン濃度増加率所見 (図8、9、10) AHA群では対照群に比較して血清 IgG濃度増加率は投与後4 および10日目に有意に上昇した (p<0.05、図8)。血清 IgM濃度増加率は、15日目に上昇傾向を認めた (図9)。血清 IgA濃度増加率は、4 日目以降に上昇傾向を認めた (図10)。

有意差のなかった項目 単核球サブセット解析でAHA群では対照群に比較してCD3抗原陽性細胞は、3 および4 日目に減少する傾向が認められた。CD4抗原陽性細胞は2 日目以降に増加傾向を認めた。CD8抗原陽性細胞は、5 日目に増加傾向が認められた。

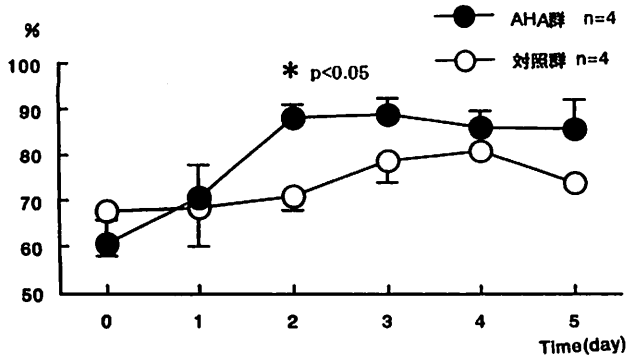


図6 オゾン化自家血液投与による好中球貪食能の推移

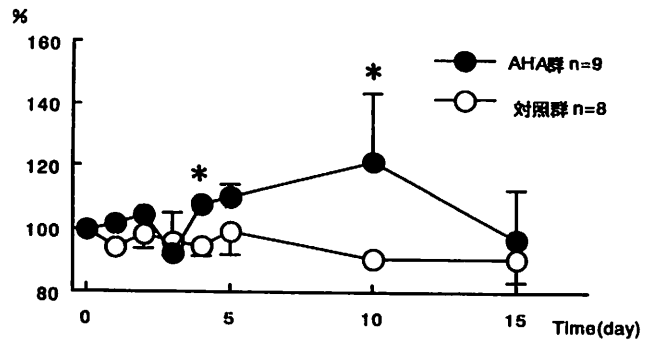


図8 オゾン化自家血液投与によるIgG比率の推移

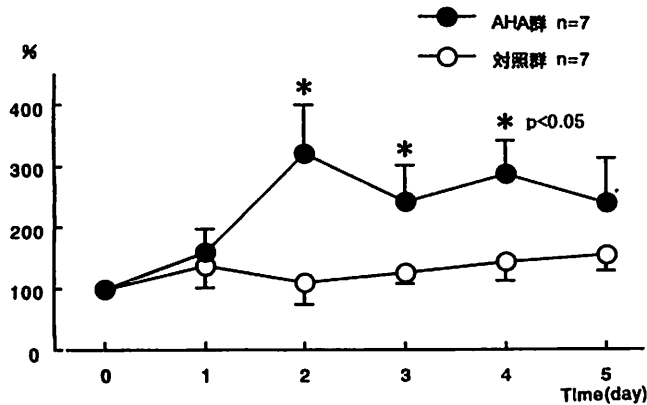


図7 オゾン化自家血液投与による好中球殺菌能の推移

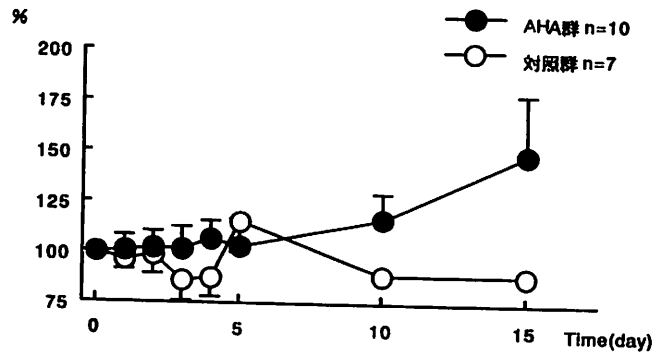


図9 オゾン化自家血液投与によるIgM比率の推移

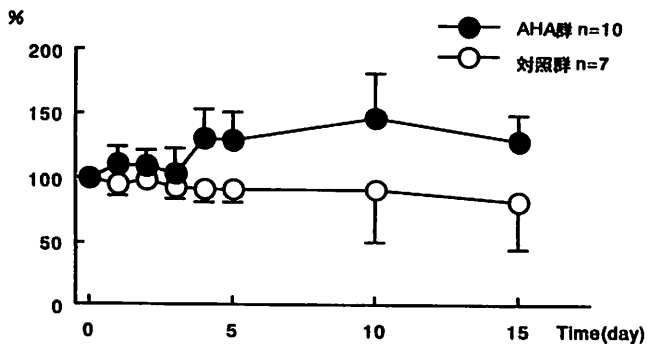


図10 オゾン化自家血液投与によるIgA比率の推移

4. 考察

ヒトのオゾン自家血液療法においては、微量オゾンが血液中の白血球を刺激し、サイトカインの産生を誘導し生体防御機能を賦活化すると考えられている[4]。Bocciらの研究では*in vitro*で末梢血中の白血球を微量オゾンに曝露させると、IFN γ やTNF α などのサイトカインが産生誘導されることが明らかになっている[2,3]。本実験から、ウシに対するAHAにおいてIL-1やIL-6の産生誘導が促進されたことが明らかになり、微量オゾンが直接あるいは間接的に網内系の細胞を活性化し、サイトカイン産生を促進させたものと考えられる。CD14抗原陽性細胞は末梢血中の単球を示し、また $\gamma\delta$ 抗原陽性細胞は末梢血中の $\gamma\delta$ T細胞を示す。いずれも生体の初期感染防御に働く細胞である。IgG陽性細胞は末梢血中のB細胞を示しており、B細胞は生体内において抗体産生を行うなど液性免疫を担う細胞である。AHAにより活性化された白血球からサイトカインなどの情報伝達物質が放出され、それらがCD14抗原陽性細胞、 $\gamma\delta$ 抗原陽性細胞およびIgG陽性細胞の増殖分化を引き起こした可能性が考えられる。これらの変化はAHAによりウシの免疫機能を誘導したことを示し、また、オゾン自家血液療法の治療効果に影響する因子であると考えられる。

AHAによって白血球機能が活性化し、サイトカインが産生されるという報告がある[2,3]。しかしAHAによる好中球機能への影響についての報告はあまり知られておらず、本研究から好中球の貪食能および殺菌能が促進されることが示され、興味深い。好中球機能はIL-1やTNF α などのサイトカインにより亢進することが知られている[11,12]。一方、好中球機能が低下すると、特に易感染性宿主においては、感染が遷延化し難

治性となる。その原因としてLPSやTNF α などのサイトカインに対する好中球の応答性の低下があると報告されている[13]。つまり、好中球機能の低下は細菌感染症の難治化や重篤化の一因と考えられている。オゾン自家血液療法は好中球機能を増強する効果をもち、細菌感染に対する好中球機能が低下しているような疾患に対して、その機能を回復させる有効な治療となり得ると考えられる。

医療においてはリウマチ疾患患者に対してオゾンを一週間筋肉注射すると血清IgG濃度は処置前にくらべ有意に増加し、その治癒効果も認められている[14]。また体液性免疫低下症患者に対してオゾンを適当な間隔をおいて3回直腸内投与すると、一ヶ月後に血漿IgG、IgMおよびIgA濃度は処置前にくらべ有意に増加し、臨床症状の改善が認められたと報告されている[15]。本研究でも、抗体産生の増加が明らかとなった。このことから、ウシに対するオゾン自家血液療法でも抗体産生を促進させる効果があると考えられる。

まとめると、ウシへのAHAにより、血液中の免疫担当細胞に微量オゾンが直接あるいは間接的に作用してIL-1およびIL-6などのサイトカイン産生を誘導するとともに、好中球機能を活性化し、CD14抗原陽性細胞および γ δ 抗原陽性細胞を増加し、抗体産生を促進することが明らかとなった。

参考文献

- [1] R. Mattassi : Ozonoterapia. Organizzazione Editoriale Medico Scientifica, Milano, 1985, pp. 1-179.
- [2] V. Bocci and L. Paulesu : Studies on the biological effects of ozone. 1 Induction of Interferon γ on human leucocytes, *Haematologica*, 75, 510-515 (1990).
- [3] L. Paulesu, E. Luzzi and V. Bocci : Studies on the biological effects of ozone. 2 Induction of tumor necrosis factor on human leucocytes, *Lymphokine Cytokine Res.*, 10, 409-412 (1991).
- [4] V. Bocci : Ozonization of blood for the therapy of viral diseases and immunodeficiencies. A hypothesis, *Med. Hypothesis*, 39, 30-34 (1992).
- [5] 緒方篤哉: 起立難渋を呈する牛に対するオゾン自家血液療法の効果について, 医療オゾン研究会, 第3回研究講演会, 1998.
- [6] 緒方篤哉: オゾン療法による急性乳房炎治療の試み, *酪農ジャーナル*, 30-32 (1997).
- [7] 緒方篤哉: ウシの難治疾患に対する血液オゾン療法の応用とその可能性について, *北海道獣医師会誌*, 40, 34 (1996).
- [8] M. Goto, R. Kirisawa, M. Tajima, K. Takahashi and H. Iwai : A bioassay for bovine Interleukin-1 by the A375 cell growth inhibition, *J. Vet. Med. Sci.*, 57, 523-525 (1995).
- [9] Y. Nakayama, O. Midami, M. Yoshikawa, Y. Motoi, T. Ito, Y. Ishikawa, M. Fuse, K. Nakano and K. Yasukawa : Elevated levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6(IL-6) activities in the sera and milk of cows with naturally occurring coliform mastitis, *Res. Vet. Sci.*, 62, 297-298 (1997).
- [10] 堀内篤: 食能検査, 河合忠, 大国真彦編著「免疫不全」, pp.448-449, 中外医学社, 1971.
- [11] M.R. Shelaby, B.B. Aggarwal, E. Rinderknecht, L.P. Svedersky, B.S. Finkele and M.A. Jr. Palladino : Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors, *J. Immunol.*, 135, 2069-2073 (1985).
- [12] R. Moser, B. Schleiffenbaum, P. Groscurth and J. Fehr : Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage, *J. Clin. Invest.*, 83, 444-455 (1989).
- [13] 斧康雄: 再燃する細菌感染症「細菌感染症と好中球の活性化」, pp.83-96, 菜根出版, 1996.
- [14] J. Washüttl, R. Viebahn and I. Steiner: Immunological examinations in patients with chronic conditions under administration of ozone/oxygen mixtures, *Ozone Science & Engineering*, 11, 411-417 (1989).
- [15] S. Menendez, O. Iglesias, C. Bidot, R. Puga and A. Carballo : Application of ozone therapy in children with humoral immunity deficiency, *Ozone in Medicine, in Proceedings (Vol 3) of 12th World Congress of the International Ozone Association, Lille, France, 1995*, pp.271-274.