

【研究報告】

オゾン化オリーブ油による酸化的細胞毒性ならびに

免疫担当細胞に対する抑制作用

坂崎文俊,奥野智史,上野仁,中室克彦

日本医療・環境オゾン研究会会報, Vol.11, No.4, 6-9. (2004)

ることが可能であり、患部への使用も簡便で安全に作業ができた。治癒経過を観察する限り、オゾン化オイルの治療効果は、臨床的に経験したことのないスピードで進行し、よい結果をもたらした。

この新規の治療方法の治療条件を確立するのが目的の一つであったが、いずれの症例にあっても患部をうっすらと覆う程度のオゾン化オイルが塗布されるだけでよい結果が得られたので、患部がひどい汚染創でなければ直接塗布するだけでよい。汚染創にあっては、可能な限り創を清浄化してからオイルを使用すべきであると考え。オキシドールによる創の洗浄は、患部に強い痛みを生じたが、汚染や壊死組織、化膿などの創外排出に功を奏した。また、浄水にオゾンを応用する時に用いる過酸化水素による促進オゾン法と同様の効果が得られる可能性があると考えた。

オゾン化オイルを塗布した患部に認められた効果は、疼痛、搔痒などの知覚的な症状の軽減であり、治癒困難となっている病変部の修復をやり直すような反応として認められた。正常な治癒過程が種々の障害によって妨げられ著しい治癒の遅延が起きているような症例では、修復を促進的あるいは抑制的に正常化して良好な自然治癒を導くような効果を現しているように観察された。それは、もっぱら患部に対する血液循環の改善の効果がまずあったと考えられるが、結果として患部の修復の機転が活性化し正しい方向に修復スピードを上げ(それは自然治癒するのに必要な時間以上に短縮するものではないが)、今回の治療試験で観察されたような劇的な効果を生じさせていると考えた。

オゾン化オイルの治療試験において、臨床的に満足の行く治療効果を観察することができた。その臨床応用は大きな可能性を秘めており、今後の発展が大いに期待される。安全に取り扱うことができ、副作用はこれまでのところ認められていない。搾乳牛で重大な問題である、抗菌性物質の残留による治療に伴った乳肉の廃棄の必要もなく、酪農・畜産業界の経済的損失の軽減にも貢献するであろう。

研究報告

オゾン化オリーブ油による酸化的細胞毒性ならびに 免疫担当細胞に対する抑制作用

摂南大学薬学部 坂崎文俊、奥野智史、上野 仁、中室克彦

要旨 オゾン化オリーブ油による炎症抑制作用を検討するため、リンパ球幼若化反応およびマクロファージによる一酸化窒素(NO)合成におけるオゾン化オリーブ油の作用を検討した。またオゾン化オリーブ油による酸化的細胞傷害作用を検討した。マウス脾臓リンパ球の幼若化反応に対して、オゾン化オリーブ油は0.025%の濃度で抑制を示したことから、オゾン化オリーブ油はリンパ球を介する免疫応答を抑制する可能性が示唆された。マウスマクロファージ様培養細胞にオゾン化オリーブ油を0.05%以上添加すると一酸化窒素合成活性が消失したことから、マクロファージの一酸化窒素放出に起因する炎症反応が抑制される可能性が示された。抗酸化酵素高発現培養細胞株を用いて酸化的細胞傷害性について検討したところ、0.5%のオゾン化オリーブ油を添加したときに酸化的細胞傷害性が検出された。

キーワード：オゾン化オリーブ油、リンパ球幼若化反応、マクロファージによる一酸化窒素合成、酸化的細胞傷害性

1. はじめに

オゾン化オリーブ油は褥瘡、難治性瘻孔に適用され、効果のあることが報告されている¹⁻³⁾。またオゾン化オリーブ油の作用の本体は酸化力をもつトリオレイントリオゾニドであることが報告されている⁴⁾。

褥瘡や難治性瘻孔の患部にオゾン化オリーブ油を塗布すると殺菌、肉芽形成および上皮細胞の増殖効果のあることが観察されるが、その詳細な作用機構は不明である。最近、オゾン化オリーブ油が細胞内情報伝達因子の1つであるNF- κ Bを抑制するたんぱく質、I κ Bのリン酸化を阻害することにより、シクロオキシゲナーゼ-2の産生を阻害することによって炎症性物質プロスタグランジン類の生成を抑制することが報告された⁵⁾。そこで、プロスタグランジン類以外の因子をオゾン化オリーブ油が抑制する可能性について検討するため、リンパ球幼若化反応およびマクロファージによる一酸化窒素(NO)合成におけるオゾン化オリーブ油の作用を検討した。またオゾン化オリーブ油による酸化的細胞傷害作用を検討した。

2. 実験方法

1) リンパ球幼若化反応におけるオゾン化オリーブ油の抑制作用

BALB/cマウス(5週齢、オス)から脾臓細胞を採取してRPMI-1620培地で洗浄し、96穴マイクロプレートに 2×10^5 個ずつ播種した。培地中にオリーブ油またはオゾン化オリーブ油を添加し、リンパ球に幼若化反応を惹起するために2 mg/mL コンカナバリンAを添加して37℃で4日間培養した。培地を除いてリン酸緩衝液で洗浄後、0.05% ラウリル硫酸ナトリウム溶液を加えて細胞を破壊し、50 mg/mL エチジウムブロマイド溶液を加えてDNAを染色して励起波長515 nm、蛍光波長620nmの蛍光強度を測定した⁶⁾。

2) マクロファージの一酸化窒素産生におけるオゾン化オリーブ油の抑制作用

48穴マイクロプレートにマウスマクロファージ細胞株 J774.1細胞を 1×10^5 個ずつ播種してオゾン化オリーブ油を添加し、24時間培養した。10 mg/mL リポポリサッカライド (lipopolysaccharide: LPS)を添加して24時間培養後、クレブス-リンガー緩衝液で洗浄し、100 μ mol/L L-アルギニンおよび1 μ mol/L ジアミノフルオレセイン-2 (diaminofluorescein-2: DAF-2)⁷⁾を含むクレブス-リンガー緩衝液を添加して、37℃で2時間反応させた。L-アルギニンを基質として産生されたNOが細胞外に拡散して緩衝液中のDAF-2と反応し、蛍光物質ジアミノフルオレセイン-2T (diaminofluorescein-2T: DAF-2T)を生成するので、このDAF-2Tを励起波長515 nm、蛍光波長620 nmの条件で測定した。

3) オゾン化オリーブ油による酸化的細胞傷害性

ヒト子宮がん細胞株 HeLa 細胞およびスーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase: SOD) 高発現 HeLa細胞⁸⁾を 1×10^4 個を96穴マイクロプレートに播種し、37℃で24時間培養後、オリーブ油およびオゾン化オリーブ油を添加して37℃で48時間培養した。培地を除いてリン酸緩衝液で洗浄したのち、カルセイン-AM (calcein-AM)⁹⁾を含むリン酸緩衝液を添加し、37℃で30分間反応させた。細胞内エステラーゼによって生成した蛍光物質を、励起波長495 nm、蛍光波長515 nmの条件で測定した。

3. 結果ならびに考察

1) リンパ球幼若化反応におけるオゾン化オリーブ油の抑制作用

リンパ球は通常時においては細胞分裂せずに停止した状態で存在しているが、外部から侵入した抗原と接触することによって活性化し、細胞増殖を開始する。リンパ球が増殖するときの細胞の形態が未分化なリンパ球に似ていることから、この活性化による増殖を幼若化反応と呼ぶ。

リンパ球に対して抗原非特異的に幼若化反応を起こすタチナタマメ由来糖タンパク質であるコンカナバリ

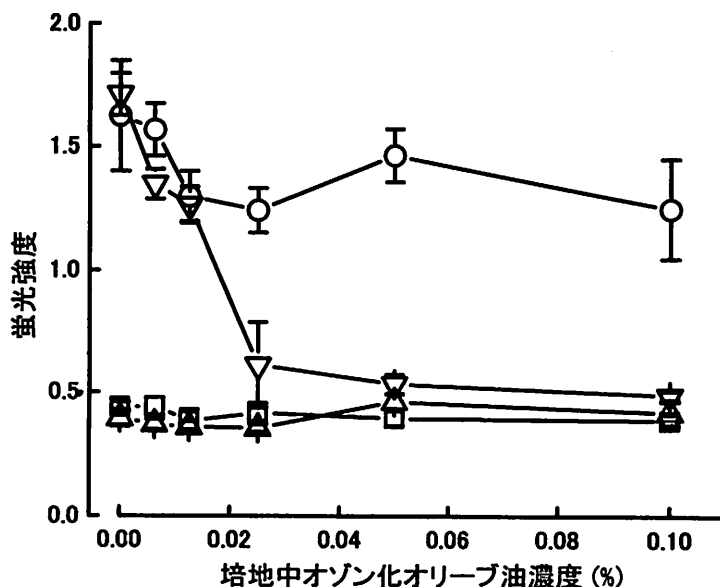


Fig. 1 リンパ球幼若化反応におよぼすオゾン化オリーブ油の抑制作用

- : オリーブ油 △: オゾン化オリーブ油
- : コンカナバリンA+オリーブ油
- ▽: コンカナバリンA+オゾン化オリーブ油

ンAを用いてマウス脾臓リンパ球に幼若化反応を惹起し、リンパ球幼若化反応におよぼすオゾン化オリーブ油の影響を検討した。(Fig. 1)

コンカナバリンAを添加しない細胞にオリーブ油やオゾン化オリーブ油を添加してもリンパ球が増殖しなかった。オリーブ油にもオゾン化オリーブ油にも、リンパ球を幼若化させる作用はないことが示され、オゾン化オリーブ油に起因するアレルギーが生じる可能性は低いことが考えられる。

コンカナバリンAを添加して幼若化反応を惹起した細胞にオリーブ油を0.01%まで添加したとき、リンパ球の幼若化反応は抑制される傾向を示した。しかし0.01%以上オリーブ油を添加しても幼若化反応の抑制の程度は変化しなかったことから、この抑制はオリーブ油が浮遊して培養液の表面を覆うことによる培養条件の変化に起因する可能性が考えられる。

コンカナバリンAを添加して幼若化反応を惹起した細胞にオゾン化オリーブ油を0.025%添加すると、ほぼ完全にリンパ球幼若化反応が抑制された。オゾン化オリーブ油にはリンパ球を介する免疫応答を抑制する作用があることが示唆された。

2) マクロファージの一酸化窒素産生におけるオゾン化オリーブ油の抑制作用

マクロファージは体内に侵入した異物を攻撃するために一酸化窒素(NO)を産生する。大腸菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライドを用いてマクロファージ様培養細胞株 J774.1細胞にNOを産生させ、このNO産生におよぼすオゾン化オリーブ油の影響を調べた。(Fig. 2)

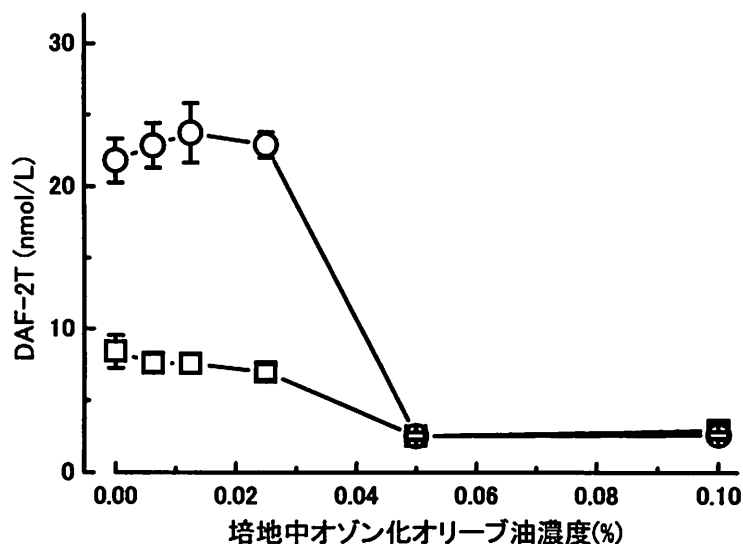


Fig. 2 マクロファージのNO合成におよぼすオゾン化オリーブ油の抑制作用

- ：リポポリサッカライドなし（無刺激）
- ：リポポリサッカライドあり（刺激あり）

オゾン化オリーブ油を0.025%まで添加してもNO産生活性に影響は見られなかった。0.05%以上のオゾン化オリーブ油を添加するとNO産生活性は消失した。このことから、マクロファージのNO放出に起因する炎症反応をオゾン化オリーブ油が抑制する可能性が示された。

3) オゾン化オリーブ油による酸化的細胞傷害性

オゾン化オリーブ油はその酸化力により、細胞に対して酸化的ストレスを与えることが推定される。細胞内において活性酸素を消去する酵素の1つに、superoxide dismutase (SOD)がある。ヒト子宮上皮がん細胞株である HeLa 細胞にSOD発現遺伝子を組み込んで作製したSOD高発現細胞株を用い、通常の HeLa 細胞とSOD高発現 HeLa細胞との間に、オゾン化オリーブ油による細胞毒性の違いが見られるか否かを調べることによって、オゾン化オリーブ油による酸化的細胞傷害性について検討した (Fig. 3)。

対照細胞においてもSOD高発現細胞においても、オリーブ油は1%まで添加しても細胞毒性は認められなかった。一方、オゾン化オリーブ油は0.2~0.5%の濃度で添加すると細胞の生存率の低下が観察された。0.5%のオゾン化オリーブ油を添加したとき、細胞生存率はSOD高発現細胞の方が対照細胞よりも高かった。オゾン

化オリーブ油がHeLa細胞に対して毒性を有することが示されたことから、高濃度のオゾン化オリーブ油は細胞に対して酸化的細胞傷害性を示すことが示唆された。

4. まとめ

オゾン化オリーブ油を培養液中に添加すると、0.025%の濃度でリンパ球の幼若化反応を抑制し、0.05%の濃度でマクロファージの NO 産生を抑制した。これらのことから、オゾン化オリーブ油には炎症時における免疫担当細胞の活動を抑制する可能性が示唆された。また0.5%の濃度においてHeLa細胞に対して毒性を示したことから、高濃度のオゾン化オリーブ油は細胞に酸化的細胞傷害性を示すことが示唆された。

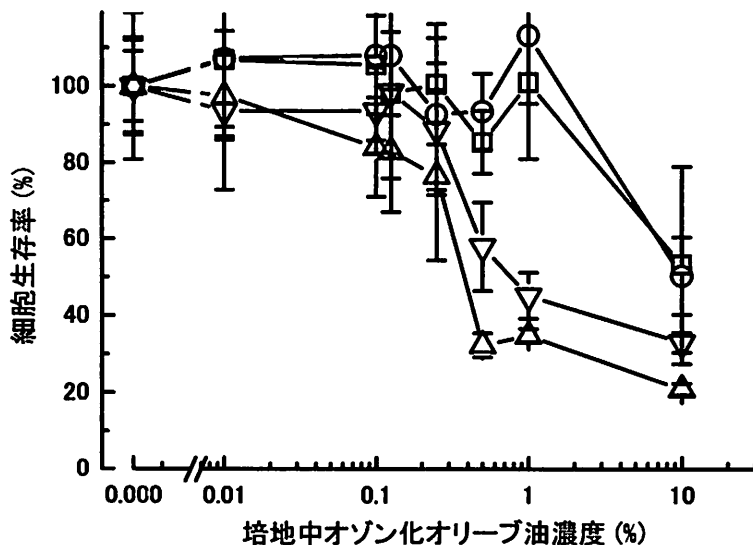


Fig. 3 オゾン化オリーブ油による酸化的細胞傷害性

- ：対照細胞 + オリーブ油
- ：SOD高発現株 + オリーブ油
- △：対照細胞 + オゾン化オリーブ油
- ▽：SOD高発現株 + オゾン化オリーブ油

5. 引用文献

- 1) 松本日洋、櫻井正太郎、神力就子、鈴木滋、三浦敏明 (2000) 外科手術後の難治瘻孔・難治創に対するオゾン化オイルの治療効果、日本臨床外科学会雑誌、61 (6)、7-13.
- 2) 杉原伸夫 (2000) オゾン化油の試用経験 (褥創、皮膚潰瘍に対して)、日本医療・環境オゾン研究会第5回研究講演会要旨集、pp. 28-31.
- 3) 櫻井正太郎 (2001) オゾン化オリーブ油の物理化学的性質と臨床応用、Pharm Tech Japan、17 (11)、pp. 1791-1800.
- 4) 三浦敏明 (2000) オゾン化オイルとオゾニド、日本医療・環境オゾン研究会第5回研究講演会要旨集、22-27.
- 5) 三浦敏明、山崎晃憲、野地裕美、田元浩一 (2004) オゾン化オリーブ油の抗炎症作用メカニズム、日本医療・環境オゾン研究会第9回研究講演会要旨集、25-33.
- 6) Sakazaki H, Ueno H, Umetani K, Utsumi H, and Nakamuro K. (2001) Immunotoxicological evaluation of environmental chemicals utilizing mouse lymphocyte mitogenesis test. J. Health Sci., 47 (3), 258-271.
- 7) Jurgen FL, Thomas RR, Christian M, Angelika MV, Verena MD (2001) Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein, FEBS Letter, 506, 131-134.
- 8) Naganuma A, Miura K, Tanaka-Kagawa T, Kitahara J, Seko Y, Toyoda H, Imura N. (1998) Overexpression of manganese-superoxide dismutase prevents methylmercury toxicity in HeLa cells, Life Sci., 62 (12), PL157-61.
- 9) L. S. De Clerck, C. H. Britts, A. M. Mertens, M. M. Moens, W. J. Stevens (1994) Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. J. Immunol. Methods, 172 (1), 115-124.