

オゾンの生物学的影響に関する研究 第9報

ヒト血小板における効果

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, P. Di Simplicio

Platelets, 10, 110-116 (1999)

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

摂南大学薬学部 中室 克彦、坂崎 文俊

要旨 血小板に対するオゾンの効果について研究した。血小板は抗酸化酵素の種類が比較的少なく、酸化ストレスに対する感受性が赤血球よりも高い。生化学的及び形態学的な検討結果から、オゾンが凝血を引き起こすため、自家血液オゾン療法におけるヘパリンの使用には問題があることが示唆された。しかし、オゾンの臨床利用においてヘパリンのこのような副作用は記録されたことがない。

キーワード：自家血液オゾン療法、血小板、ヘパリン、ACD (クエン酸+クエン酸ナトリウム+デキストロース)、凝血

背景 自家血液オゾン療法では、オゾンの作用によってサイトカインの産生が穏やかに誘導される。これまでの論文で、サイトカイン産生作用は抗凝血剤にヘパリンを用いた血液の方がクエン酸リン酸デキストロース(CPD)を用いた血液よりも強力であることが明らかにされた。おそらくヘパリンは血漿中の生理的なカルシウム濃度(1mM)を維持するが、クエン酸はカルシウムと結合してカルシウムを不活化するからサイトカイン産生作用を抑制することが考えられる。

曝露するオゾンの濃度に比例してサイトカインの産生量が増大する。しかしオゾン濃度が70~80 µg/mL/g bloodに達すると、血小板中に小さな凝血塊を形成することがある。そこで著者らは血小板におけるオゾンの効果について研究した。血小板は抗酸化酵素の種類が比較的少なく、酸化ストレスに対する感受性が赤血球よりも高い。生化学的及び形態学的研究により、オゾンが凝血を引き起こすこと、オゾン自家血液療法におけるヘパリンの使用には問題があることが明らかとなった。

実験方法

医療用酸素を用いて、最新式のオゾン発生器を用いて電気放電によって生成した。オゾン濃度は国際オゾン協会の標準化委員会の提言に従って、253.7 nmの吸光度で測定した。

23~27歳の、健康で、過去2週間以内に血小板を活性化する薬品を使用していない、喫煙していないボランティアより、12時間絶食の後、60 mLを採血した。200×gで20分、遠心分離し、上清をさらに6000×gで15分間、遠心分離することにより、血小板を多く含む沈殿画分(血小板試料)と血小板を含まない血漿とに分離した。血漿は生化学検査に用いた。

既知の容量のオゾン/酸素混合ガスを注射筒にとり、等容量の血小板試料を入れた別の注射筒にY字型コネクタを介して注入し、穏やかに30秒間混合した。血小板の凝集は波長650 nmの光における透過率の変化として測定した。

結果

ヘパリンやACD(クエン酸+クエン酸ナトリウム+デキストロース)で抗凝血処理した血小板における凝集を、オゾン曝露後4分間にわたって測定した。無処理の血小板と酸素を曝露した血小板は凝集しなかった。しかしヘパリン処理した血小板は、オゾン用量に依存的に凝集した。一方ACD処理した血小板では、オゾンによる凝集はわずかしか見られなかった。いずれの血小板試料も、陽性対照であるアデノシン二リン酸(ADP)による凝集は正常に起こった。

過酸化の指標としてのチオバルビツール酸反応物質(TBARS)は、ヘパリン処理においてもACD処理においてもオゾン濃度の増加につれて増大した。全抗酸化状態(TAS)はオゾン濃度の増加につれてわずかに減少

した。グルタチオン(GSH)含量には有意な差が見られなかった。血小板では、酸化剤によって減少したGSH含量は速やかに回復することが知られている。

走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いた観察では、ヘパリン処理した血小板試料にオゾン曝露すると、血小板の凝集が顕著に見られた。しかしACD処理した試料では正常な形態を示し、凝集は見られなかった。

考察

オゾンが血小板の凝集を引き起こす機構は、今回の研究からは分からない。しかし抗凝血剤としてクエン酸を用いると血小板の凝集が起こらないことから、カルシウムが決定的な役割を果たしていると予想される。今回の実験では血液から血小板を集めて血小板試料としているので、赤血球からのADPの放出は関与していないと考えられる。

もう1つの重要な因子は一過性の過酸化水素がオゾンの分解過程において生成することである。血漿中での過酸化水素は半減期が2.5分と短く、速やかに消滅するが、血小板の凝集を引き起こすには充分である。詳細は検討していないが、オゾンは血漿中で過酸化水素を生成するのとは別に、血小板から内因性の過酸化水素を誘導する可能性もある。また血小板にオゾン曝露すると細胞表面で起こる化学反応が引き金となり、血小板からのある種の因子の放出を促進するかもしれない。

今回の結果を基にすれば、自家血液オゾン療法にヘパリンを用いることによって血小板が活性化される可能性があり、血栓塞栓症の発生が危惧される。しかし臨床での処置においてそのような副作用は記録されたことがない。しかし、*ex vivo*での血小板の凝集によりTGF- β や血小板由来成長因子(PDGF)の放出を促進するため、これが下肢虚血患者に自家血液オゾン療法を行った際の潰瘍の治癒をうながしていることが考えられる。

第1回オゾン療法セミナーを開催します

今年1月、当研究会より「ヨーロッパにおける最新のオゾン療法」が発刊されましたが、反響も大きく、実践的にオゾン療法を早急に学びたいとの希望が寄せられました。そこで、急遽、下記の要領で標記セミナーを開催いたします。今回は希望のあった医師に連絡しておりますが、今後、定期的に開催したいと考えますので、事務局へ連絡下さるよう、お願いいたします。

日時 2002年9月7日(土) 10:00~16:00 (受付 9:30 a.m.)

セミナー場所 サンシャインシティプリンスホテル、2F「長瀬」

実技実習場所 大沢眼科・内科(サンシャイン60ビル7F)。ビル内を移動します。

プログラム1 (プリンスホテル)

- | | | |
|---------------------|-------------|-----------|
| 1. 会長挨拶 佐谷戸安好 | 10:00 | |
| 2. オゾンの化学的性質、その取り扱い | 10:05~10:35 | 中室 克彦 |
| 3. オゾン療法について | 10:35~11:40 | 大沢満雄、小島悦子 |
| 4. オゾン療法の生化学的背景 | 11:40~12:10 | 神力就子 |
| 5. 質疑・討論 | 12:10~12:40 | |
| 昼食(弁当) | 12:40~13:10 | |

プログラム2 (大沢眼科・内科)

- | | | |
|--|-------------|-------------|
| 6. オゾン発生器の扱い*と自家血液オゾン療法のデモおよび
各受講者の実習(2グループで実施) | 13:30~15:00 | 大沢、小島、*安中健一 |
| 7. 皮下注射ならびに直腸注入法のデモ | 15:00~16:00 | 大沢、小島 |
| 8. 閉会挨拶 神山五郎 | | |

テキスト「ヨーロッパにおける最新のオゾン療法」(6000円にて頒布します)

参加費 3万円(昼食代含み。領収書を出します)