

学位論文要旨

氏名 黒田 晃平

題目 : Effects and applications of ozonated water on tumors
(腫瘍に対するオゾン水の影響およびその応用)

論文要旨 :

緒言

オゾンは常温では無色・透明で若干青臭い気体であり非常に強い酸化作用を持つ。また非常に不安定な物質であり、半減期は大気中では数時間、水中では数十分である。しかし、不安定であるがゆえに環境中に残留せず、二次的な公害を招く恐れがない酸化物質として、注目されている。近年、医療におけるオゾンの利用が注目されており、大量自家血液療法 (Major Autohemotherapy: MAH) やオゾン/酸素混合ガス直腸注入の腫瘍に対する有効性が報告されている。しかし、これらの利点にも関わらずオゾン療法があまり実施されていないのはオゾンの持つ危険性によるところが大きい。現在のオゾン療法はオゾンガスを用いたものが主流である。オゾンガスは強い肺毒性を持ち、やや臭いはあるものの無色透明であるためその扱いは非常に難しい。

オゾン水はオゾン水を水に溶解した液体である。半減期といった点では課題が残るが、液体であるためにガスと比較して非常に取り扱いが簡便であり、危険性が少ない。しかし、工業利用こそされているものの、医療分野における応用の報告がほとんど存在せず研究段階である。そこでオゾン水のオゾン療法への応用を目的として、本研究ではオゾン水の生体投与による影響および抗腫瘍療法への応用に関して担癌マウスを用いて検討した。

第1章

ヨーロッパにおいて近年、抗腫瘍療法としてオゾン療法が注目されている。しかしオゾンガスは強い肺毒性を持つため、その仕様には常に危険がつきまとう。オゾン水は、オゾンガスと比較し取り扱いが非常に簡便である。しかしながら、オゾン水の生物学的影響に関する報告はこれまで存在しない。そこで私たちは担癌マウスモデルと正常なマウスを用いて、オゾン水の安全性と直接的な抗腫瘍効果に関する研究を行った。正常マウスにオゾン水 (オゾン濃度 $208 \mu\text{M}$) を皮下、筋肉内および腹腔内に投与した所、各臓器に肉眼および組織学的な有害な影響は認められなかった。一方、オゾン水 (20.8 、 41.6 、 104 または $208 \mu\text{M}$) を腫瘍組織に局所投与した場合、腫瘍の壊死がおこり、腫瘍細胞の増殖抑制が認められた。壊死領域のサイズは、オゾン水の濃度に依存した。オゾン水の投与後の末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介デオキシウリジン三リン酸・ビオチンニックエンド標識 Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 陽性細胞の数に有意差はなかった。これらの結果から、オゾン水は正常組織に影響を及ぼさず、腫瘍組織のみにネクロシスを誘導し、増

(別紙様式第 3 号)

腫瘍を抑制する可能性が示唆された。これらの効果は活性酸素種 (ROS) の生成によって作用する可能性がある。またアポトーシスではなくネクローシスの誘導は、腫瘍免疫において非常に有用である。これらの結果より、オゾン水の投与は安全であり、また既存の抗腫瘍治療の補助的または代替的なものとなる可能性が示唆された。

第 2 章

腫瘍内低酸素は、化学療法および放射線療法の感受性を低下させるため、抗腫瘍療法に影響を及ぼす重大な問題である。オゾンガスは、末梢血液灌流および酸素分圧を改善することが知られている。しかし、オゾン水に関する同様の効果は報告されていない。よって我々は、オゾン水が腫瘍内低酸素に及ぼす影響を検討するとともに、抗がん剤と併用した場合の抗腫瘍効果に関して検討した。担癌マウスにオゾン水 (208 μ M) 腹腔内投与したところ、血液ガスの変化は認められなかった。Hoechst33342 陽性領域および腫瘍内酸素分圧が有意に増加した。オゾン水とシスプラチン (CDDP) の併用では、CDDP 単剤投与と比較し、併用群において腫瘍の増殖抑制が認められた。また Ki-67 陽性細胞の数は有意に減少し、TUNEL 陽性細胞数は有意に増加した。さらにオゾン水を併用することにより CDDP 投与量を単剤投与群の 2/3 に減量しても同等の抗腫瘍効果を得ることが可能であった。今回の結果から、オゾン水が腫瘍内血液灌流を増加させ、腫瘍低酸素症を改善することが示された。加えて、オゾン水は CDDP の抗腫瘍効果を増強させた。これはオゾン水により腫瘍内血液灌流が増加することにより、腫瘍に到達する CDDP 量が増加し抗腫瘍効果が増強されたと考えられる。今回の実験から、オゾン水の腹腔内投与は現在の抗腫瘍治療の問題を解決するための新たな治療的アプローチとなる可能性が示唆された。

結論

今回の実験においてオゾン水の生体投与における安全性が示された。またオゾン水の直接投与および腹腔内投与の両方において腫瘍に対するオゾン療法の新たな可能性が示唆された。オゾン水を用いることにより現在の抗腫瘍療法の選択肢を広げ、治療効果を上げる事が可能である。今後検討を重ねることにより、さらなる臨床応用が期待される。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	黒田 晃平
審査委員	主 査：鳥取大学 教授 今川 智敬
	副 査：鳥取大学 教授 岡本 芳晴
	副 査：山口大学 教授 田浦 保穂
	副 査：鳥取大学 教授 竹内 崇
	副 査：鳥取大学 准教授 大崎 智弘
題 目	Effects and applications of ozonated water on tumors (腫瘍に対するオゾン水の影響およびその応用)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>本論文はオゾン水を水に溶解したオゾン水のオゾン療法への応用を目的とし、正常組織や腫瘍組織に与える影響および抗腫瘍療法への応用に関する研究をまとめたものである。</p> <p>第 1 章では担癌マウスモデルと正常なマウスを用いて、オゾン水の安全性と直接的な抗腫瘍効果に関する研究が示されている。正常マウスにオゾン水（オゾン濃度 208 μM）を皮下、筋肉内および腹腔内に投与した所、各臓器に肉眼および組織学的な有害な影響は認められなかった。一方、オゾン水（20.8、41.6、104 または 208 μM）を腫瘍組織に局所投与した場合、腫瘍の壊死がおり、腫瘍細胞の増殖抑制が認められた。壊死領域のサイズは、オゾン水の濃度に依存した。オゾン水の投与後の TUNEL 陽性細胞の数に有意差はなかった。これらの結果から、オゾン水は正常組織に影響を及ぼさず、腫瘍組織のみにネクロシスを誘導し、増殖を抑制する可能性が示唆された。またアポトーシスではなくネクロシスの誘導は、腫瘍免疫において非常に有用である。これらの結果より、オゾン水の投与は安全であり、また既存の抗腫瘍治療の補助的または代替的なものとなる可能性が示唆された。</p> <p>第 2 章ではオゾン水が腫瘍内低酸素に及ぼす影響を検討するとともに、抗がん剤と併用した場合の抗腫瘍効果に関する研究が示されている。担癌マウスにオゾン水（208 μM）を腹腔内投与したところ、血液ガスの変化は認められなかった。Hoechst33342 陽性領域および腫瘍内酸素分圧が有意に増加した。オゾン水とシスプラチン（CDDP）の併用では、CDDP 単剤投与群と比較し、併用群において腫瘍の増殖抑制が認められた。また Ki-67 陽性細胞の数は有意に減少し、TUNEL 陽性細胞数は有意に増加した。さらにオゾン水を併用することにより CDDP 投与量を単剤投与群の 2/3 に減量しても同等の抗腫瘍効果を得ることが可能であった。今回の結果から、オゾン水が腫瘍内血液灌流を増加させ、腫瘍低酸素症を改善</p>	

(別紙様式第 10 号)

することが示された。加えて、オゾン水は CDDP の抗腫瘍効果を増強させた。これはオゾン水により腫瘍内血液灌流が増加することにより、腫瘍に到達する CDDP 量が増加し抗腫瘍効果が増強されたと考えられる。今回の実験から、オゾン水の腹腔内投与は現在の抗腫瘍治療の問題を解決するための新たな治療的アプローチとなる可能性が示唆された。

本論文においてオゾン水の生体投与における安全性が示された。またオゾン水の直接投与および腹腔内投与の両方において腫瘍に対するオゾン療法の新たな可能性が示唆された。オゾン水を用いることにより現在の抗腫瘍療法の選択肢を広げ、治療効果を上げる事が期待される。これらの成果は 2 報の論文として査読付き国際学術論文誌に掲載され、国内外で高い評価を受けている。

以上により、本論文は博士(獣医学)の学位論文にふさわしい価値があると認める。