



Clinical Immunology Society

Annual Conference on

**CLINICAL
IMMUNOLOGY**

NEW

Orleans

1996

May 31 - June 3, 1996

Sheraton New Orleans New Orleans, Louisiana

RESULTS

Results of this Study Demonstrated that:

1. Short term (2 wks.) treatment with TL-Water resulted in a significant increase in NK activity at 2 wks. post treatment, but activity drop to base line level at 2-3 wks. post cessation of treatment.
2. Long term (5 months) treatment resulted in maintaining NK activity at a high level with continuation of exposure to TL-Water. After cessation of treatment, individuals demonstrated a high level of their NK activity up to 6 months.

結果

本試験の結果は次の通りであった：

1. π ウオーターの短期（2週間）投与では、投与開始2週間後にNK活性が有意に増加したが、投与終了2～3週後にNK活性は基線値に戻った。
 2. 長期（5カ月）投与では、 π ウオーター投与期間中NK活性は高レベルに維持された。
この高レベルNK活性は投与終了6カ月後まで持続した。
-

ABSTRACT

INDUCTION OF HUMAN NATURAL KILLER (NK) CELL ACTIVITY BY π -WATER (MRN-100). M. GHONEUM AND Y. KIJIMA, DREW UNIV. OF MED. AND SCI., L. A., CA, 90059 AND ACM CO., LTD., TOKYO, JAPAN.

We examined the effect of π -water MRN-100 on human NK cell activity in vivo and in vitro. The MRN-100 is an iron base compound derived from bivalent and tervalent ferrates. Five individuals were given (50cc) daily by mouth for five months. NK cell activity was examined by standard ^{51}Cr -release assay. Results showed that: 1) π -water significantly increases NK activity at 2 weeks after treatment. NK activities post treatment were 21, 31.6, 40.7, and 54.1 as compared to 6.6, 11.9, 21.5, and 27.5 baseline value representing 189-318% increase in activity, 2) NK activity was further increased at subsequent intervals 2-5 months with continuation of treatment, and 3) In contrast, in vitro studies showed only 15% increase in NK activity post culture of PBL with π -water for 16 hrs. Further studies are needed to investigate the mechanisms(s) by which π -water activates NK cells. We conclude that π -water is a potent immune modulator and may be useful in cancer immunotherapy.

要約

π ウォーター (MRN-100) によるヒトNK細胞活性の誘導

Mamdooh Ghoneum, Yoshimasa Kijima

ドルー医学科学大学 (L.A., CA 90059) およびACM社 (東京)

ヒトNK細胞活性に対する π ウォーター (MRN-100) の効果を生体内および試験管内で検討した。MRN-100は二価および三価の鉄酸塩から誘導された鉄化合物である。これを5人のボランティアに5カ月間毎日 (50 cc) 経口投与した。NK細胞活性は標準的 ^{51}Cr 放出試験により測定した。その結果：1) π ウォーターは投与開始2週後にNK活性を有意に増加させた。NK活性は基線値の 6.6、11.9、21.5および27.5に対して投与開始後は 21、31.6、40.7および 54.1となり、189~318%増加した。2) その後投与を継続したとき、2~5カ月後にNK活性はさらに増加した。3) 一方、試験管内試験では末梢血リンパ球を π ウォーターと共に16時間培養してもNK活性は15%増加したにすぎない。 π ウォーターによるNK細胞活性化の機構を究明するため一層の研究が必要である。私たちは、 π ウォーターが強力な生体応答調節剤 (BRM) でありガン免疫療法に有用である可能性がある と結論した。

MATERIALS & METHODS - 1

1. - TL-Water (MRN-100)

TL-Water (MRN-100) is an iron base compound derived from bivalent and tervalent ferrates.

2. - Human Subjects and Treatment Protocol In vivo:

5 individuals were participated in the study. Their age ranged between 31-46 years of age. Participants were given TL-Water - 50 cc - daily by mouth for 5 months (long term). 20 cc blood for each individual were drawn before and during treatment with TL-Water at 2 wk., 3 month and 6 month. In addition, another group were given TL-Water for 2 wks. (short term).

3. - Separation of peripheral blood lymphocytes (PBL):

Mononuclear cells from the subjects were separated from the fresh whole blood by ficoll-hypaque density gradient centrifugation (Litton Bionetics, Rockville, MD). The lymphocyte band at the interface was collected and cells pelleted by centrifugation, washed twice in RPMI-1640 and suspended in complete medium (CM) which consists of RPMI-1640, supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 2mM glutamine, 25 mM Hepes (pH 7.2), 50 units penicillin and 50 ug streptomycin per ml (Grand Island Biologicals, Santa Clara, CA).

4. - In vitro:

Mononuclear cells were prepaid as mentioned above under sterile condition, and suspended in CM at concentration 2×10^6 . The PBL were cultured with TL-Water for 16 hours, NK activity was examined using Cr-release assay.

5. - NK Cell Activity:

The most common method of assessing NK anti-cancer activity is to use CR-release assay in which fixed number of Chromium₅₁ (CR)-labeled tumor target cells are incubated with varying number of NK effector cells. The percent cell mediated lympholysis is calculated from the following equation:

材料および方法

1. πウオーター (MRN-100)

πウオーター (MRN-100) は二価および三価の鉄酸塩から誘導された鉄化合物である。

2. ヒト対象および生体内試験法:

5人のヒトボランティアを試験対象とした。彼らの年齢は31~46才であった。これら被験者にπウオーター 50 ccを5カ月間毎日経口投与した(長期)。πウオーター投与開始前および開始後2週間、3カ月および6カ月の時点で各被験者から血液 20 ccを採取した。さらに、他の群にπウオーターを2週間投与した(短期)。

3. 末梢血液リンパ球 (PBL) の分離

フィコール-ハイパック密度勾配遠心分離法 (Litton Bionetics, Rockville, MD) を用いて新鮮全血から単核細胞を分離した。界面のリンパ球バンドを採取し、遠心分離により細胞を沈澱させてRPMI-1640で2回洗浄した後、RPMI-1640、10% (v/v) ウシ胎仔血清、2mMグルタミン、25mMHEPES (pH 7.2)、ペニシリン 50ユニットおよびストレプトマイシン 50 μg/ml からなる、完全培地 (CM) (Grand Island Biologicals, Santa Clara, CA) に懸濁した。

4. 試験管内試験

単核細胞は無菌条件下で上述のように調製し、CMに 2×10^6 の濃度で懸濁した。

PBLはπウオーターと共に16時間培養し、NK活性をCr放出試験により測定した。

5. NK細胞活性

NK抗ガン活性を推定するためにふつう使われる方法はCR放出試験を用いることであって、この試験ではクロム51 (CR) で標識した一定数の標的腫瘍細胞を様々な数のNKエフェクター細胞と共に培養する。細胞性リンパ球溶解率は次の式を用いて計算する：

Materials & Methods - 2

$$\% \text{ lysis} = \frac{\text{Exp. Rel.} - \text{Sp. Rel}}{\text{Total Rel.} - \text{Sp. Rel}} \times 100$$

Where Exp. Rel test refers to the counts in supernatants from wells containing effector cells. Sp. rel is the spontaneous release in medium only, and Total Rel. is the maximum counts obtained by lysis with detergent. Usually four serial dilution are made of the NK effector cells and plated in quadruplicate with the tumor targets in microtiter plates. In brief, 5×10^6 per ml CM, and 0.1 ml pipetted to quadruplicate wells to give and effector: Target cell ratio of 100:1, 50:1, 25:1 and 12:1. Microtiter plates were then centrifuged for 3 minutes at 500 RPM and following a 4 hours incubation at 37° C, and the supernatant were counted in a gamma counter. The percentage of isotope released was calculated by the formula mentioned above.

$$\text{細胞溶解率 (\%)} = \frac{\text{実験的放出} - \text{自然放出}}{\text{総放出} - \text{自然放出}} \times 100$$

ただし、実験的放出はエフェクター細胞を含むウェルから得られた上清液中のカウント、
自然放出は培地のみにおける自然放出、
総放出は洗剤を用いた溶解によって得られる最大カウント。

ふつうNKエフェクター細胞は4回階段希釈し、1組4群として、腫瘍細胞とともにマイクロタイタープレートに塗布する。簡単に述べると、CM 1 mlにつき 5×10^6 を懸濁し、1 mlを4つのウェルに分注してそれぞれのエフェクター：標的細胞比を100：1、50：1、25：1、12：1とした。ついでマイクロタイタープレートを500 rpmで3分間遠心分離し、37℃で4時間培養後、 γ カウンターで上清液の放射線を測定した。アイソトープ放出率は上の式によって計算した。

Conclusion

We conclude that TL-Water MRN-100 is a potent Biological Response Modifier (BRM) as manifested by highly increase in human NK cell activity. The increase in activity was detected as early as 2 wks. and maintained at a high level for 6 months.

The induction of NK activity by TL-Water may represent a new immune-therapeutic approach for the treatment of cancer, which needs to be examined in multiple clinical trials.

結論

π ウオーター (MRN-100) は、ヒトNK細胞活性の著明増加が示すように、強力な生体応答調節剤 (BRM) である。活性増加は早くも投与開始の2週間後に見られ6カ月間維持された。

π ウオーターによるNK活性の誘導は、ガンの新しい免疫療法を示唆するが、この点は多くの臨床試験により検討しなければならない。

Introduction

In the field of cancer therapeutics, Medical oncologist had to rely mainly on chemotherapy for cancer treatment. Chemotherapy kills rapidly dividing cells, of which about 80% will be cancer cell and 20% will be healthy rapidly growing body cells, primarily, the lining of the tongue, lining of the gastro-intestinal tract, hair, nails and the immune system. The destruction of cells by these drugs is too indiscriminate, resulting in serious side-effects such as hair loss, painful mouth sores and depression. Toxicity of chemotherapy results in a decrease of the blood cells produced in the bone marrow. The results are controversial regarding the effect of chemo on the life span of breast cancer. While some scientists and clinicians claimed that chemo can add few years to the patient's lives, other experts counter that chemo actually shortens the life of breast cancer patients.

Several attempts have been made to augment NK activity. In the past several years, several biological response modifiers (BRMs) have been discovered. These include: IFN, IL-2, BCG, Poly I:C and others. These BRMs have been an object of great interest because of their immunomodulatory function and their potential value in tumor therapy. The use of these BRMs was limited because of their severe side-effects.

In the present investigation, we demonstrated that TL-Water MRN-100 is a new potent immunomodulator, as indicated by high augmentory action on NK activity.

序

ガン治療の分野では、内科医は主としてガン化学療法に頼らざるを得ない。化学療法は急速に増殖しつつある細胞を殺すが、これら細胞の約80%はガン細胞であり20%は、主として舌粘膜、胃腸管粘膜、毛髪、爪および免疫系の、急速に増殖しつつある健康な細胞である。これら薬剤による細胞破壊はあまりにも無差別的で、脱毛、口腔の疼痛を伴う嚥嚥および陥凹など重篤な副作用を引き起こす。化学療法の毒性は骨髓で作られる血液細胞を減少させる。乳ガン患者の生存に対する化学療法の効果については意見が一致していない。一部の研究者および臨床医は化学療法が二、三年生存期間を延長すると主張するが、他の専門家は化学療法が実際には乳ガン患者の寿命を短縮すると反論している。

NK活性を増強する試みはいくつか行なわれてきた。過去数年間に、いくつかの生体応答調節剤（BRM）が発見された。これらは、IFN、IL-2、BCG、Poly I:Cなどである。これらBRM剤はその免疫調節機能および腫瘍治療に有用と考えられることから注目を集めている。しかし副作用が強く、そのため使用が限られてきた。

本試験で、私たちはπウオーター（MRN-100）が、高いNK増強作用に示されるように、新しい強力な免疫調節剤であることを示した。

Patient Name:

CISNEROS, J

Patient I.D.:

Blood Drawn

Received

Processed

ISL No.

03/25/96

03/25/96

03/28/96

053722

TEST	RESULTS		REFERENCE RANGE	UNITS
	NORMAL	ABNORMAL		
*** T AND B CELL FUNCTION ***				
PHYTOHEMAGGLUTININ	81.0		75-100%	
CONCANAVALIN A		53.0	75-100%	
POKEWEED MITOGEN	76.0		75-100%	
LIPOPOLYSACCHARIDE	75.0		75-100%	
STAPHYLOCOCCUS AUREUS	78.0		75-100%	

Lymphocyte proliferation or transformation is the process whereby new DNA synthesis and cell division take place in lymphocyte after a stimulus of some type (chemical, bacteria, virus, or other antigens), resulting in a series of changes. This test has a broad range of applications, including assessment and monitoring of congenital immunological defects which range from complete lack of function, as in severe combined immunodeficiency disease and DiGeorge Syndrome, to a partial deficit, as in ataxia telangiectasia, Wiskott-Aldrich Syndrome, chemically induced immune dysfunction syndrome, chronic fatigue syndrome, and chronic mucocutaneous candidiasis, to normal reactivity, as in X-linked hypogammaglobulinemia. A wide variety of acquired conditions has been shown to have induced lymphocyte transformation. These conditions include exposure to a variety of chemicals, bacterial and viral infections, as well as autoimmune diseases, such as Sjogren's Syndrome and systemic lupus erythematosus. Lymphocyte transformation has also been used to monitor sequential samples from patients undergoing a variety of immunoenhancing or immunosuppressive therapies in the treatment of disease states.

CONTINUED ON NEXT PAGE

テスト	結果		参考	単位
	正常	異常	範囲	
*** TおよびB細胞機能 ***				
フィトヘマグルチニン（植物凝集素）	81.0		75～100%	
コンカナバリンA		53.0	75～100%	
アメリカヤマゴボウ・マイトジェン	76.0		75～100%	
リポ多糖	75.0		75～100%	
黄色ブドウ球菌	78.0		75～100%	

リンパ球増殖または形質転換は、ある種の刺激（化学的、細菌、ウイルス、または他の抗原）を受けたリンパ球内で新しいDNA合成および細胞分裂が起こる過程であって、この結果一連の変化が起こる。このテストの応用範囲は広く、たとえば重篤な複合免疫不全症やディジョージ症候群など完全機能欠損から毛細管拡張性運動失調やウイスコット-アルドリッチ症候群などの部分的欠損にいたるまでの先天的免疫不全、化学的に誘発された免疫機能不全症候群、慢性疲労症候群、慢性粘膜皮膚カンジダ症、X染色体性低γ-グロブリン血症などにおける正常反応性、などの評価とモニタリングに用いられる。リンパ球形質転換は広範囲の様々な後天的状態により惹起されることが示されている。これら状態には、様々な化学物質への曝露、細菌およびウイルス感染、シェーグレン症候群および全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患が含まれる。リンパ球形質転換はまた、疾患治療のため色々な免疫増強または免疫抑制療法を受けている患者から経時的に採取されるサンプルのモニタリングにも利用されてきた。

Patient Name:

C██████, J██████

Patient I.D.:

Blood Drawn

Received

Processed

ISL No.

03/25/96

03/25/96

03/28/96

053722

TEST	RESULTS		REFERENCE RANGE	UNITS
	NORMAL	ABNORMAL		

*** LYMPHOCYTE SUB-POPULATION ***

TOTAL WBC	6200	②	4800-10800	mm3
TOTAL LYMPHOCYTE	1984		960-4320	mm3
% LYMPHOCYTE	32.0		20 - 40%	
TOTAL T-CELL	1370.0		586-3672	mm3
% T CELL (T11, CD2)	69.0		61 - 85%	
TOTAL T HELPER CELL (T4)	730.0	②	336-2376	mm3
% T HELPER CELL (T4)	37.0	②	35-55%	
TOTAL SUPPRESSOR CELL	670.0		192-1598	mm3
% SUPPRESSOR CELL (T8)	34.0		20-37%	
T-HELPER/T-SUPPRESSOR	1.1	②	1-2.5	
TOTAL B CELL	280		48-648	mm3
% B-CELL (B1, CD20)	14.0		5 - 15%	
TOTAL NATURAL KILLER	417.0	②	52-864	mm3
%NATURAL KILLER CELLS		21.0 ②	5.5-20%	
TOTAL IMMUNOCOMPETENT	79.0	②	14-216	mm3
% IMMUNOCOMPETENT -NKHT3+	4.0	②	1.5-5%	
TOTAL NKHT3 NEGATIVE	337.0		38-648	mm3
% NKHT3 NEGATIVE		17.0	4-15%	
TOTAL CD3+ CD26+	460.0		288-1944	mm3
% CD3+ CD26+ (TA1)		23.0	30-45%	
TOTAL T3 (CD3) POSITIVE C	1390.0		509-3413	mm3
% T3 POSITIVE CELLS	70.0		53-79%	

CONTINUED ON NEXT PAGE

テスト	結果		参考	単位
	正常	異常	範囲	
*** リンパ球の細区分 ***				
総白血球数	6200		4800-10800	mm3
総リンパ球数	1984		960-4320	mm3
リンパ球%	32.0		20-40%	
総T細胞数	1370.0		586-3672	mm3
T細胞% (T11、CD2)	69.0		61-85%	
総ヘルパーT細胞数 (T4)	730.0		336-2376	mm3
ヘルパーT細胞% (T4)	37.0		35-55%	
総サプレッサー細胞数	670.0		192-1598	mm3
サプレッサー細胞% (T8)	34.0		20-37%	
ヘルパーT細胞/サプレッサーT細胞	1.1		1-2.5	
総B細胞数	280		48-648	mm3
B細胞% (B1、CD20)	14.0		5-15%	
総ナチュラルキラー細胞数	417.0		52-864	mm3
ナチュラルキラー細胞%		21.0	5.5-20%	
総免疫担当細胞数	79.0		14-216	mm3
免疫担当細胞%-NKHT3+	4.0		1.5-5%	
総NKHT3陰性細胞数	337.0		38-648	mm3
NKHT3陰性細胞%		17.0	4-15%	
総CD3+ CD26+細胞数	460.0		288-1944	mm3
CD3+ CD26+細胞% (TA1)		23.0	30-45%	
総T3 (CD3) 陽性細胞数	1390.0		509-3413	mm3
T3陽性細胞%	70.0		53-79%	

Patient Name: C█████, J█████

Patient I.D.:

Blood Drawn

Received

Processed

ISL No.

11/03/95

11/03/95

11/06/95

050393

TEST

RESULTS NORMAL ABNORMAL

REFERENCE RANGE

UNITS

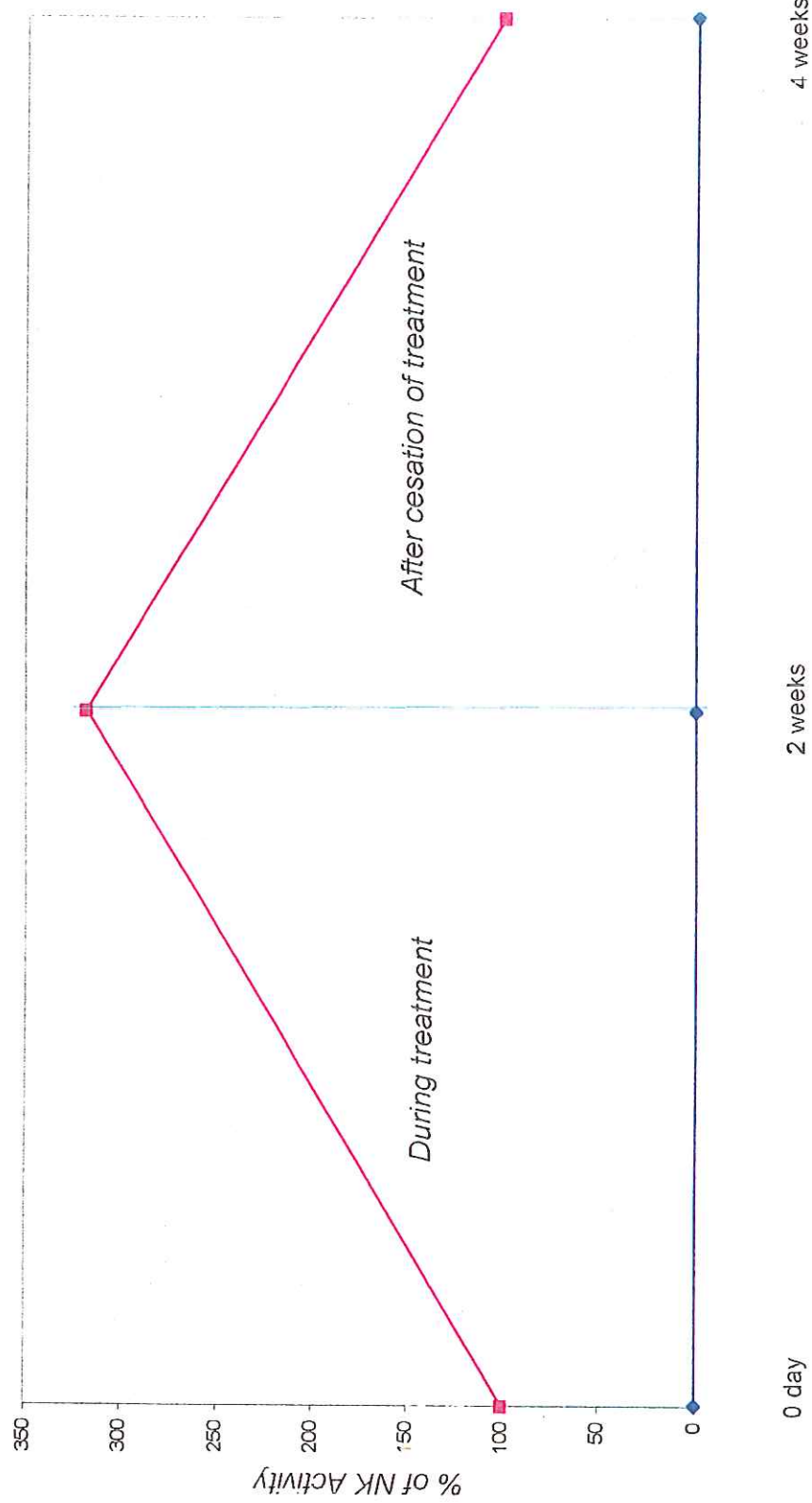
*** LYMPHOCYTE SUB-POPULATION ***

TOTAL WBC	5000		4800-10800	mm3
TOTAL LYMPHOCYTE	1950		960-4320	mm3
% LYMPHOCYTE	39.0		20 - 40%	
TOTAL T-CELL	1330.0		701-3758	mm3
% T CELL (T11, CD2)		68.0	73 - 87%	
TOTAL T HELPER CELL (T4)	620.0		336-2376	mm3
% T HELPER CELL (T4)		32.0	35-55%	
TOTAL SUPPRESSOR CELL	680.0		192-1598	mm3
% SUPPRESSOR CELL (T8)	35.0		20-37%	
T-HELPER/T-SUPPRESSOR		0.9	1-2.2	
TOTAL B CELL	250		48-648	mm3
% B-CELL (B1,CD20)	13.0		5 - 15%	
TOTAL NATURAL KILLER	351.0		52-864	mm3
%NATURAL KILLER CELLS	18.0		5.5-20%	
TOTAL IMMUNOCOMPETENT	20.0		14-216	mm3
% IMMUNOCOMPETENT -NKHT3+		1.0	1.5-5%	
TOTAL NKHT3 NEGATIVE	332.0		38-648	mm3
% NKHT3 NEGATIVE		17.0	4-15%	
TOTAL CD3+ CD26+	640.0		288-1944	mm3
% CD3+ CD26+ (TA1)	33.0		30-45%	
TOTAL T3 (CD3) POSITIVE C	1290.0		509-3413	mm3
% T3 POSITIVE CELLS	66.0		53-79%	

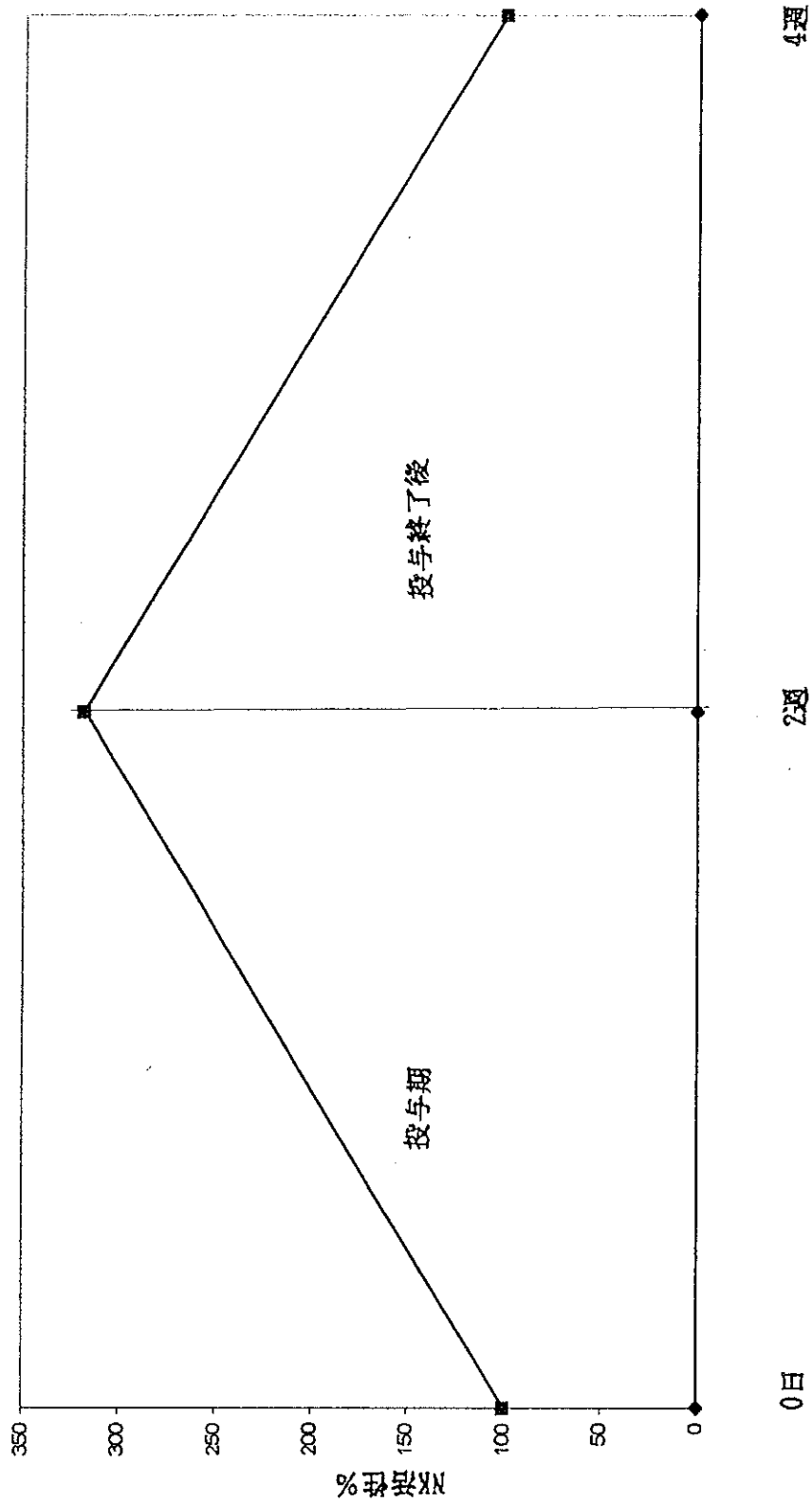
CONTINUED ON NEXT PAGE

テスト	結果		参考	単位
	正常	異常	範囲	
*** リンパ球の細区分 ***				
総白血球数	5000		4800-10800	mm3
総リンパ球数	1950		960-4320	mm3
リンパ球%	39.0		20-40%	
総T細胞数	1330.0		701-3758	mm3
T細胞% (T11、CD2)		68.0	73-87%	
総ヘルパーT細胞数 (T4)	620.0		336-2376	mm3
ヘルパーT細胞% (T4)		32.0	35-55%	
総サプレッサー細胞数	680.0		192-1598	mm3
サプレッサー細胞% (T8)	35.0		20-37%	
ヘルパーT細胞／サプレッサーT細胞		0.9	1-2.2	
総B細胞数	250		48-648	mm3
B細胞% (B1、CD20)	13.0		5-15%	
総ナチュラルキラー細胞数	351.0		52-864	mm3
ナチュラルキラー細胞%	18.0		5.5-20%	
総免疫担当細胞数	20.0		14-216	mm3
免疫担当細胞% - NKHT3+		1.0	1.5-5%	
総NKHT3陰性細胞数	332.0		38-648	mm3
NKHT3陰性細胞%		17.0	4-15%	
総CD3+ CD26+細胞数	640.0		288-1944	mm3
CD3+ CD26+細胞% (TA1)	33.0		30-45%	
総T3 (CD3) 陽性細胞数	1290.0		509-3413	mm3
T3陽性細胞%	66.0		53-79%	

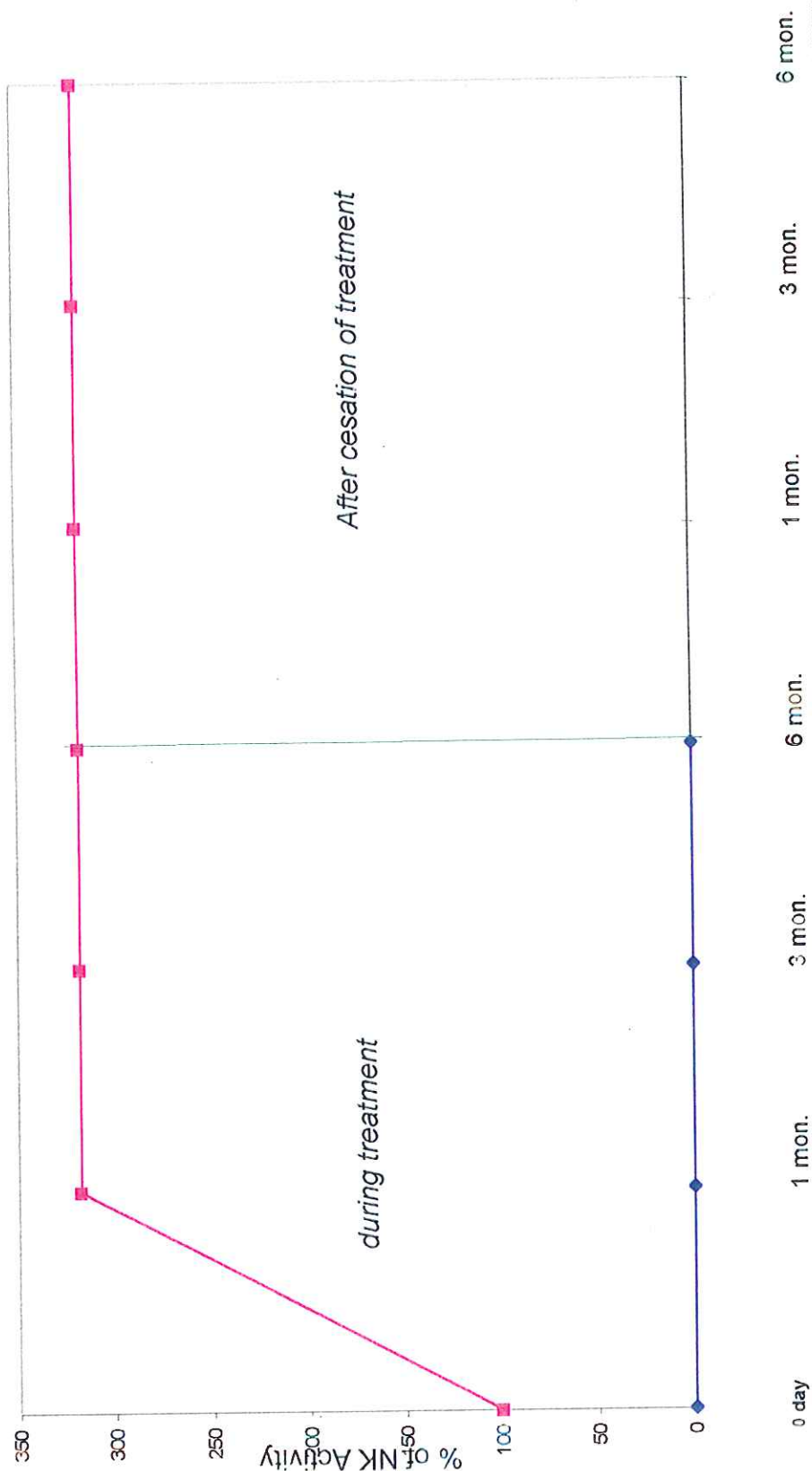
Effect of Short Term (2 wks) Treatment of π -Water In Vivo



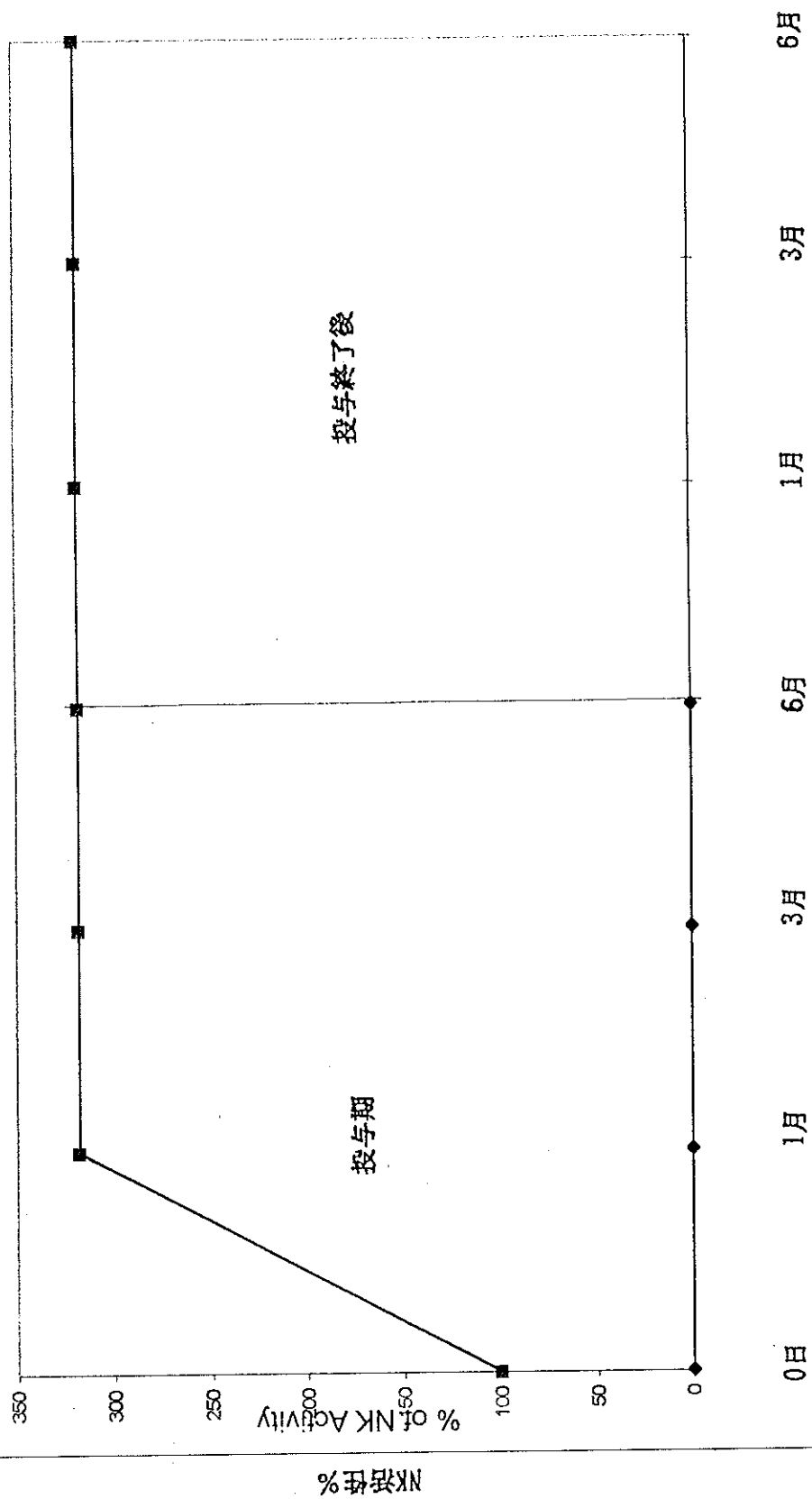
π ウォーター短期（2週間）投与の効果 - 生体内



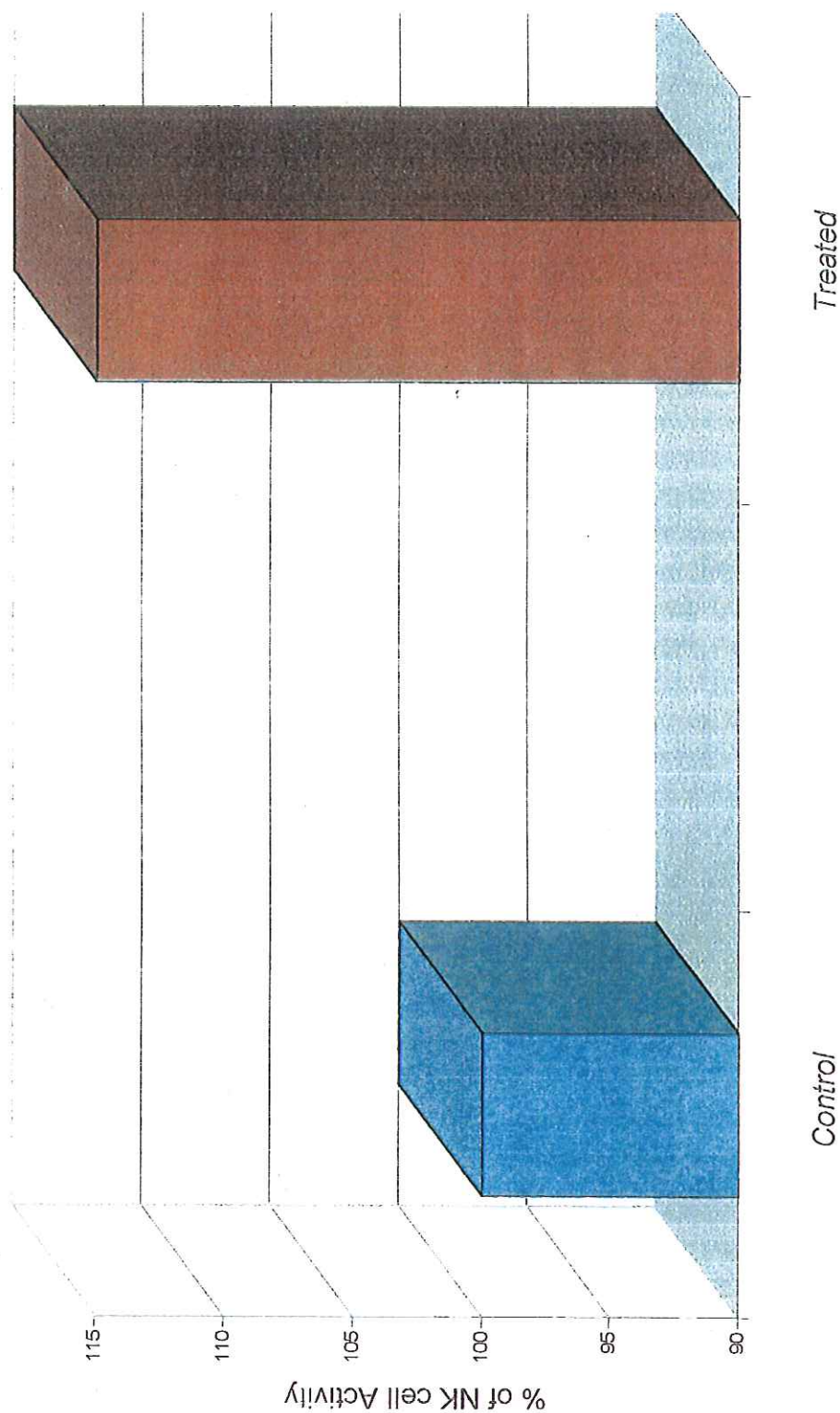
Long term (5 mon.) Treatment with π -Water In Vivo



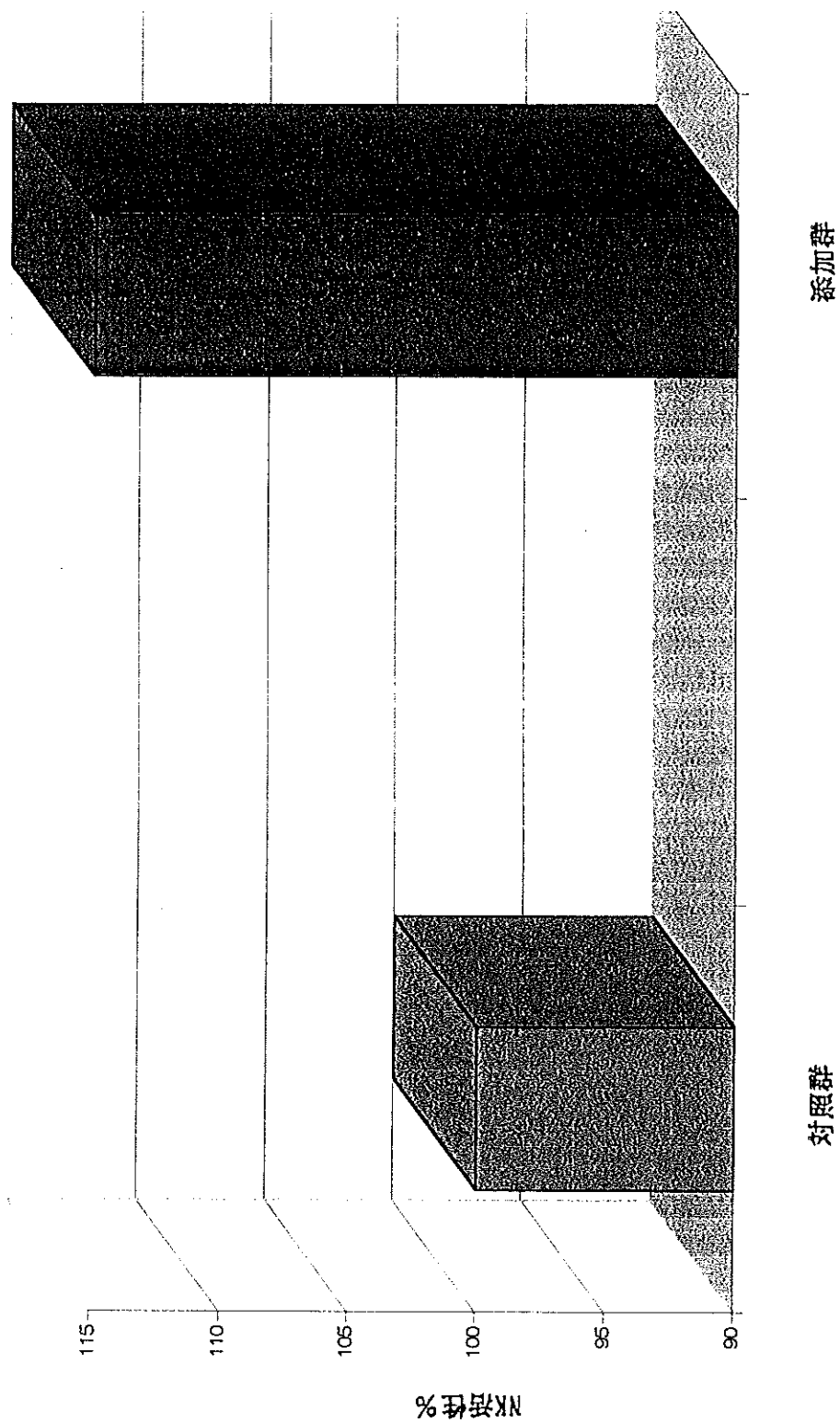
πウォーター長期（5カ月）投与の効果 - 生体内



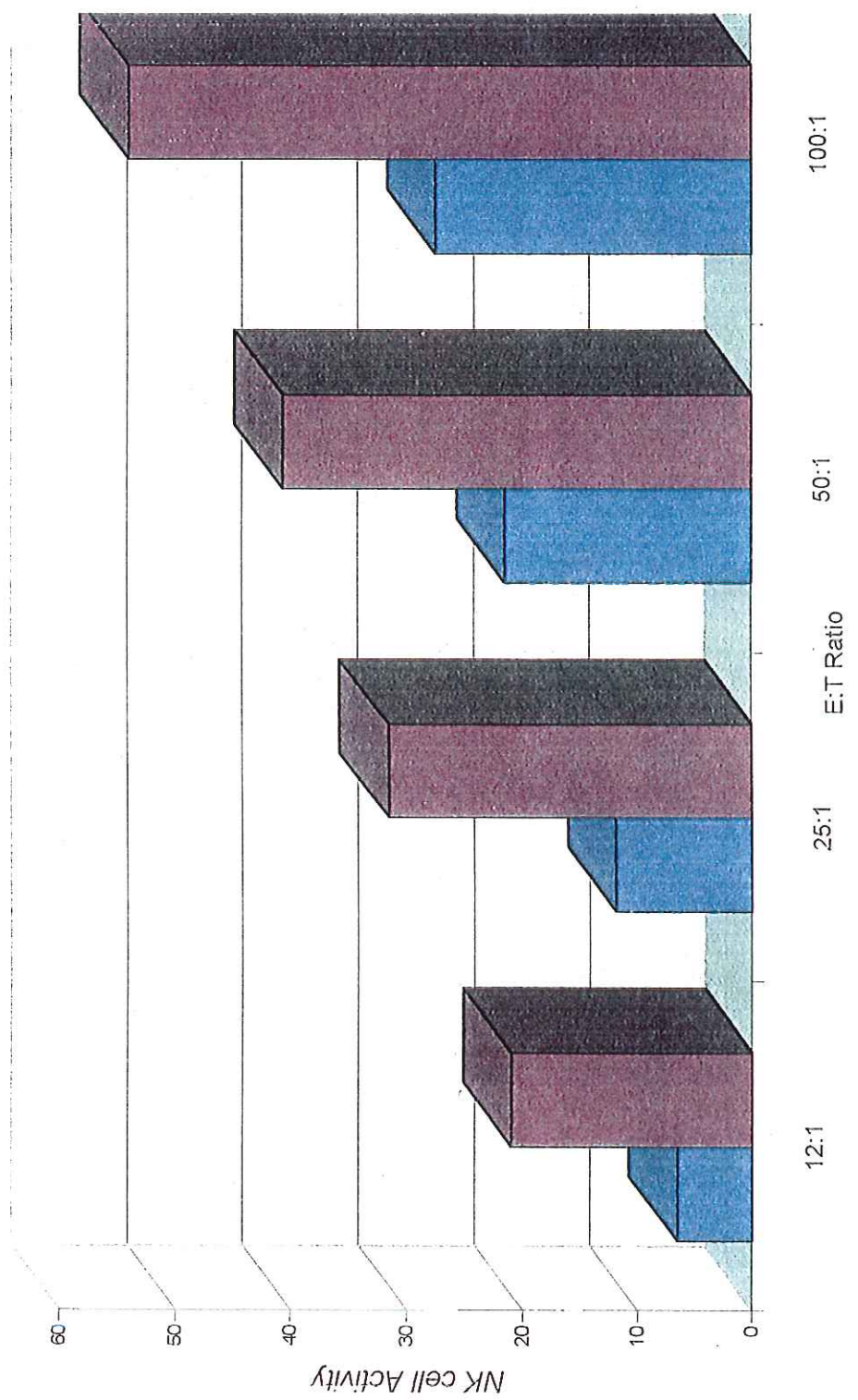
% Increase of NK cell Activity By π -Water (MRN-100) In Vitro



ペウオーター (MRN-100) によるNK細胞活性の増加率 -試験管内-

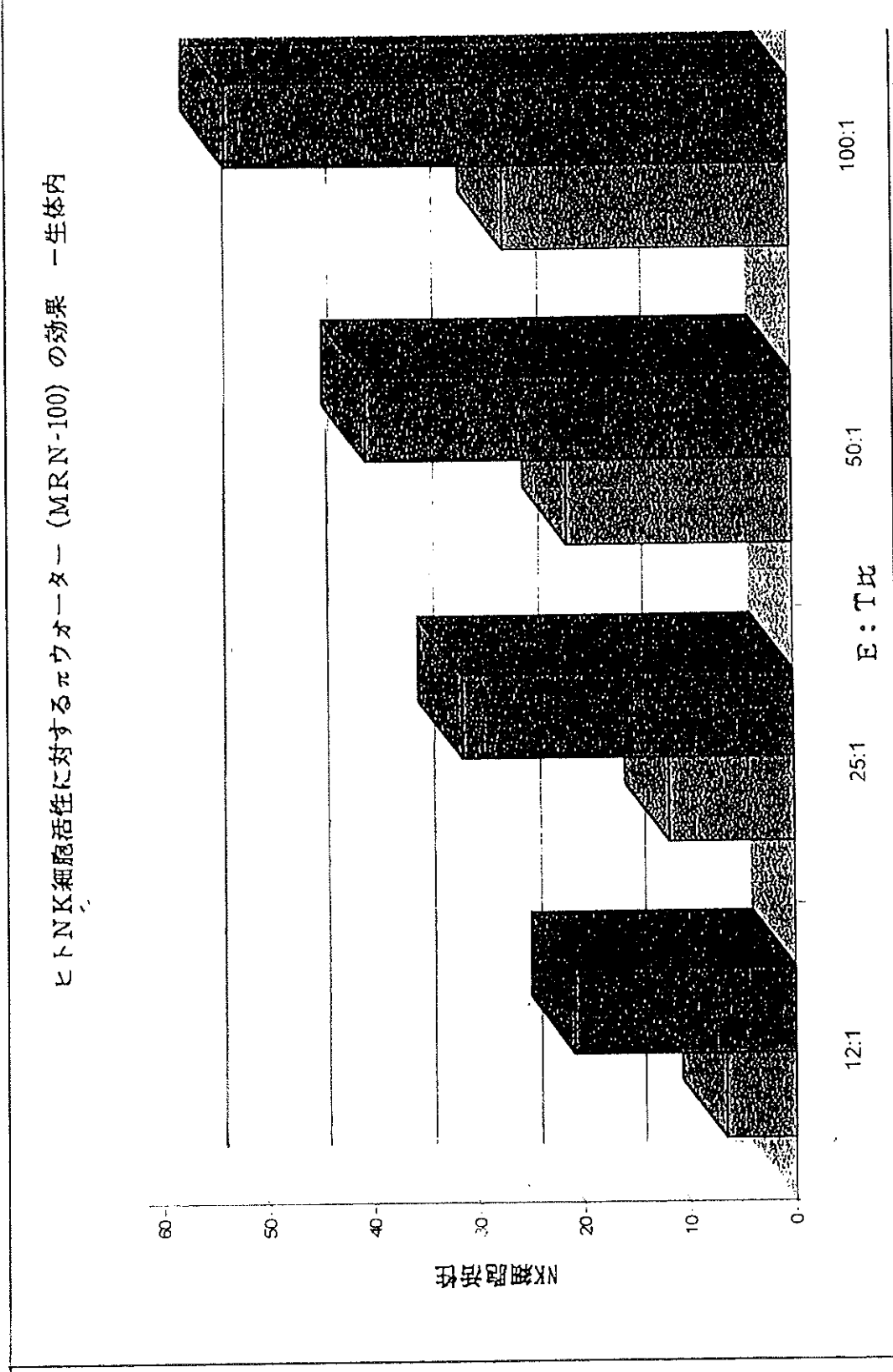


Effect of π -Water (MRN-100) On Human NK cell Activity In Vivo



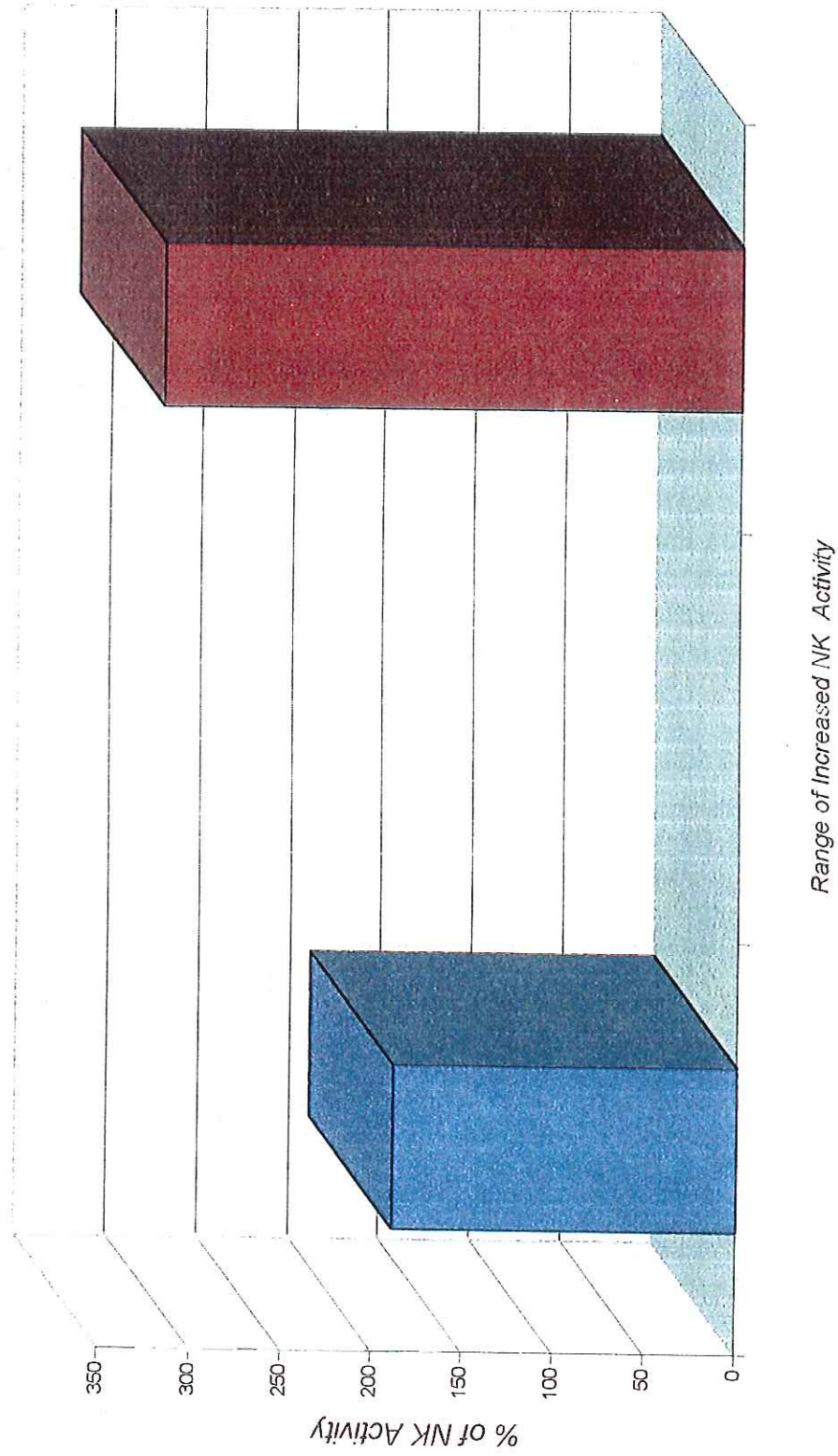
青：飲料前

赤：飲料後

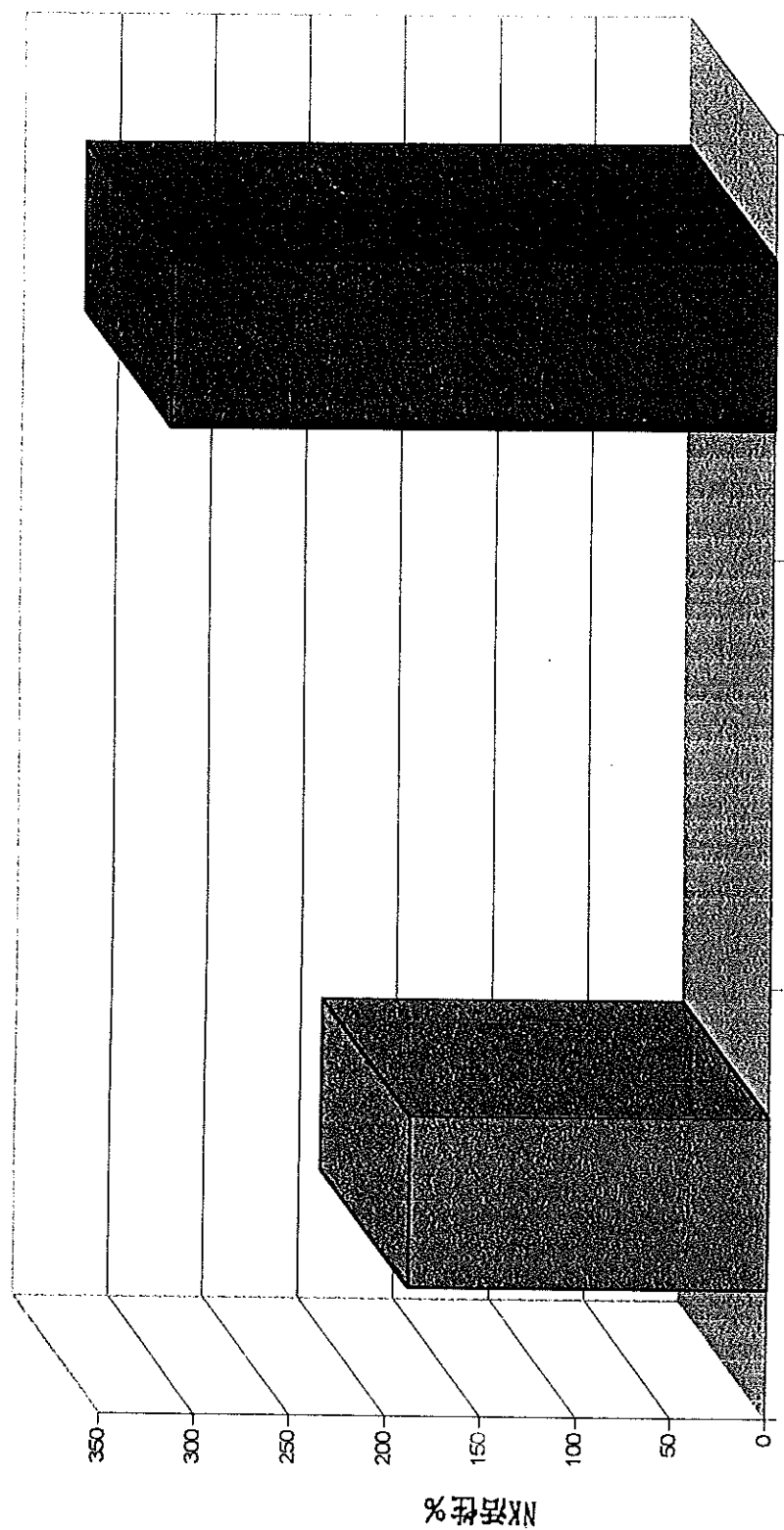


1の癌に対し白血球を12・25・50・100と増やした時のNK細胞の活性の平均値

% Increase in NK cell Activity By π -Water (MRN-100) In Vivo



ペウオーター (MRN-100) によるNK細胞活性の増加率 - 生体内



増加NK活性値の範囲

Volume 5, Number 1

January-March 1996

International Journal of **Occupational Medicine, Immunology, and Toxicology**

国際職業医学

免疫学

毒物学雑誌

Volume 5, Number 1, January-March 1996

Vol. 5, No. 1, 1996年1月~3月号



**PRINCETON
SCIENTIFIC
PUBLISHING CO., INC.**

編集者

EDITORS

Nachman Brautbar, M.D.

(編集長)

Aristo Vojdani, Ph.D.

(副編集長)

— 編集人 —

Farid Ahmed, Ph.D.
Nicholas Ashford, J.D.
Ruth Ashkenazi, Ph.D.
Samuel Bessman, M.D., Ph.D.
Jeffrey Bland, Ph.D.
Chaim Brautbar, Ph.D.
Jorge Chiriboga, M.D.
Anders Englund, M.D.
Arthur Frank, M.D.
Mamdoo Ghoneum, Ph.D.
Philippe Grandjean, M.D.
Pearl Grimes, M.D.

N.F. Izmerov, M.D.
Kaye Kilburn, M.D.
Philip J. Landrigan, M.D.
Marc Lappé, Ph.D.
Marvin S. Legator, Ph.D.
Georges Lucier, Ph.D.
Cesare Maltoni, M.D.
William Marcus, Ph.D.
William Meggs, M.D., Ph.D.
Myron A. Mehlman, Ph.D.
Claudia S. Miller, M.D., M.S.
Frank Mitchell, D.O.

Debdas Mukerjee, Ph.D.
Toshiteru Okubo, M.D.
Gilbert S. Omenn, M.D.
Elihu D. Richter, M.D.
Linda Rosenstock, M.D.
Gerald H. Ross, M.D.
Thomas Schrager, Ph.D.
Ellen K. Silbergeld, Ph.D.
Vera Stejskal, Ph.D.
Mary White Stewart, Ph.D.
Janos Sugar, M.D.
Grace Ziem, M.D.



printed on recycled paper

ISSN: 1054-044X