

文献抄録

Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship

ヒトの血液に作用するオゾンのホルミシス的な用量反応関係 (その 2)

Velio A Bocci, Iacopo Zanardi and Valter Travagli

Journal of Translational Medicine 2011, 9:66

<http://www.translational-medicine.com/content/9/1/66>

大阪大谷大学薬学部 坂崎文俊、摂南大学理工学部 中室克彦

一般にオゾンは酸化ストレスを誘起する物質として知られているが、近年オゾン療法の作用機構として、低用量のオゾンが酸化ストレスに対する防御系を活性化して酸化ストレスを低減するという仮説が提案されている。この様な仮説についてまとめた総説が報告されたので、数回にわたって紹介する。

1. オゾン二次生成物の運命と重要性

体外で血液とオゾンガスを混合してから 5 分間において、 H_2O_2 濃度が最初は急激に増加するものの、その増加速度は、オゾンが消費されるにつれて徐々に遅くなる。血液 1 ml 当たり 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ という治療用としては高濃度のオゾンを曝露しても、2.5 分後の血漿中 H_2O_2 濃度は最大で 40 μM である。これは H_2O_2 が産生されると同時に複数の反応経路で分解されて、 H_2O_2 の産生と分解とが平衡に達するからである。一部の H_2O_2 は、痕跡程度に存在するカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)などの可溶性抗酸化酵素によって還元される。この場合でも溶血は 0.5%未満と無視できるので、遊離の Fe^{2+} や Cu^+ が存在せず、フェントン-ジャクソン反応やハーバー-ワイス反応によってヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) が生成する可能性が少ない。 H_2O_2 は非解離型で存在するため、すべての血液細胞に自由に拡散できるが、大部分は赤血球に取り込まれる。このため、一過性ではあるが、大きな H_2O_2 濃度勾配が血漿と血球細胞質との間に生じ、極く初期における効果的なオキシダントとして作用する。ただし、その最終的な細胞内 H_2O_2 濃度は 10%を超えず、3~4 μM であると報告されている[34~39]。しかし、このような低濃度の H_2O_2 でも、いくつかの重要な生化学反応を毒性なしに誘起するのに十分である。細胞内環境には GSH、チオレドキシシン、カタラーゼおよび GSH-Px が豊富に含まれていて、 H_2O_2 濃度の危険なレベルまで増加させないからである。効果を発現するための閾値がたった数 μM であるにもかかわらず、この濃度は決定的に重要である。たとえば、1 mL 中に 0.42 μmol (20 μgO_3 に相当) 以下のオゾンしか含まれていない医療用酸素-オゾン混合ガス (酸素 95%以上、オゾン 5%以下) を自家血液と 1:1 の比率で反応させた場合は効果がなく、自家血液オゾン療法が失敗に終わることになる。また、オゾン化反応が血漿で生じるか血球を含む血液で生じるかによって、その影響が大きく異なることを思い起こす必要もある。

血漿の場合、総抗酸化物質(TAS)濃度は予測通りオゾンの用量に依存的であり、血漿 1 mL あたりのオゾン量が 0.84 μmol および 1.68 μmol のとき、TAS はそれぞれ 46%および 63%減少した。一方、同じ提供者から採取された血液を同じオゾン濃度で処理した場合、オゾン処理 1 分後の TAS はそれぞれ 11%および 33%しか減少しなかった。さらに驚くべきことに、TAS は 20 分以内に元の値に戻ったことから、血球にはデヒドロアスコルビン酸や酸化型 GSH を素早く再生させる能力のあることが示された[34]。また、赤血球のおかげで、デヒドロアスコルビン酸が 3 分以内にアスコルビン酸に再生されることも証明された[40]。同様に、オゾン処理後 1 分以内に赤血球 GSH の約 20%が酸化されて GSSG になるものの、20 分後には、還元されて正常の値に戻った[41]。これは、図 1 に示すように、NADPH が GSH 還元酵素やチオレドキシシン還元酵素を介してアスコルビン酸、 α -トコフェロール、GSH およびリボ酸を還元し、再生するからである[42]。これらのデータは、治療量のオゾンによる細胞の酸化還元ホメオスタシスの変化が一時的でしかも可逆的であることを示しており、オゾンが医療用薬物として安全であることを保証するものである。

まとめると、細胞のホメオスタシスはオゾン酸化によって最初は混乱するものの、2 つの主な利点により、迅速に再生される。すなわち、第一は、血球中の生化学反応の誘導であり、第二は、脂質過酸化物によって抗酸化酵素が増加されるという適応過程である。

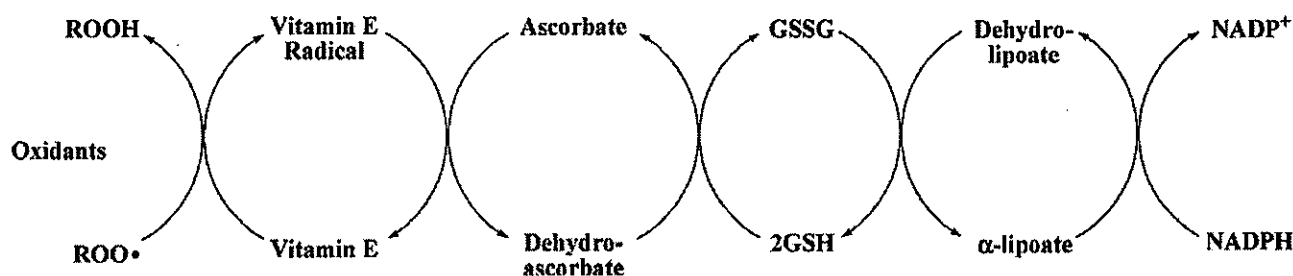


図1 酸化剤曝露に対する細胞の反応 (前回より再掲)

ROOH は脂質過酸化物を示し、ROO•は細胞成分からラジカル反応で生じた酸素原子にラジカルのある有機化合物を示す。GSH と GSSG は、グルタチオン類のスルフィドリル体とジスルフィド体を示す。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP(H))は主要な電子供与源で、細胞の還元系によって再生する。

2. 血液細胞におけるオゾンの作用とは？

1) 赤血球

おそらくホスホフルクトキナーゼの活性化によると考えられるが、血液のオゾン処理で解糖系が促進され、ATP と 2,3-DPG が増加することが示された [4,20]。機能的には、わずかな pH 低下 (約 7.25) と 2,3-DPG 増加によるボーア効果によって、オキシヘモグロビンの生成曲線 (ヘモグロビンの酸素飽和曲線) は高濃度側に移動する。2,3-DPG の増加は、その濃度が元々低かった患者の場合のみで認められるが、ホスホグリセロムターゼがどのようにして活性化されるかは明らかになっていない。オキシヘモグロビン生成曲線が高濃度側に移動するという事は、酸素とヘモグロビンの結合が減弱するという事であり、組織の酸素供給を向上させて、虚血組織からの酸素抽出を容易にする。Rokitansky らは、O₃-AHT セッションを通して、末梢動脈疾患患者の大腿動脈における酸素分圧が 20~25 mm Hg まで低下することを示した [43]。体外でオゾン化された赤血球が短時間とはいえ修飾されることは、明らかである。

オゾン療法を反復して行うと脂質過酸化物が骨髄に達して赤血球産生をわずかに上昇させる可能性があり、生化学的特性に優れた赤血球、かつて「スーパー赤血球」 [20] と命名した新しい赤血球の形成を促す。この仮説が正しければ、オゾン療法を継続している限り、骨髄は毎日スーパー赤血球を約 0.9% の割合で含む赤血球を放出するであろう。実際、オゾン療法を中止しても治療上の利点はすぐには消失せず、むしろ 2~3 ヶ月間持続する。これは、循環するスーパー赤血球の寿命に関連していると思われる [26]。興味深いことに、オゾン療法を継続している間、密度勾配遠心分離により非常に若い赤血球の一部を分離すると、それらの赤血球の G6PD 含有量が有意に高いことが明らかになっている [44]。このような事実は、オゾン療法を 15 回以上繰り返した場合 (3 L 以上の血液をオゾン化したことになる) だけ、虚血性病態を改善できるという説を強く支持している。

2) 白血球

ヒトの好中球は食作用の一部として、オゾン様分子 [45] や揮発性の化合物 [46] を生成することができる。好中球の食作用はオゾン療法を継続している間は強化されることが見いだされた [47]。さらに、H₂O₂ はチロシンキナーゼを活性化し、IκB をリン酸化する。IκB は、無刺激時には転写因子 NFκB に会合して、NFκB を不活性化している。しかし、IκB がリン酸化されて NFκB から離れ、細胞内のプロテアソーム (タンパク質分解器官) で分解されると、NFκB (p50 と p65 のヘテロ二量体) が核に移行して約 100 種類の遺伝子発現を誘導する。その中には急性期タンパク質や IFN-γ、TNF-α、IL-8 といった炎症性サイトカインおよび HIV タンパク質までも含まれる [50]。NFκB の活性化は過剰量のチオールによって抑制されることから、H₂O₂ がシステインの酸化を介して NFκB の活性化の引き金となっていることは疑う余地がない。オゾンによるいくつかのサイトカインの誘導は穏やかであるが [50]、それに伴う免疫調節効果は化学療法後の患者や慢性感染症患者などの免疫力の低下した患者に有用である。血漿は強い抗酸化能力を持っているため、オゾンそのものは本来循環血中に存在できないことは明らかであり、オゾンが体内で病原体を殺すことは不可能である。しかし、免疫系の活性化はこれを有効に作用する [51]。

3. 引用文献

4. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I (2009) The ozone paradox: ozone is strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev* 29(4),646-682.
20. Bocci V (2002) *Oxygen-Ozone Therapy: A Critical Evaluation* Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher.
26. Bocci V (2011) *Ozone. A new medical drug* Dordrecht, The Netherlands: Springer.
34. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Fanetti G (1998) Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and o interleukin-8 production. *Mediators Inflamm*, 7(5),313-317.
35. Valacchi G, Bocci V (2000) Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediators Inflamm*, 9(6),271-276.
36. Antunes F, Cadenas E (2000) Estimation of H₂O₂ gradients across biomembrances. *FEBS Lett*, 475(2):121-126.
37. Stone JR, Collins T (2002) The role of hydrogen peroxide in endothelia proliferative responses. *Endothelium*, 9(4),231-238.
38. Bocci V, Aldinucci C (2006) Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. *J Biochem Mol Toxicol*, 20(3),133-138.
39. Stone JR, Yang S (2006) Hydrogen peroxide: A signaling messenger. *Antioxi Redox Signal*, 8(3-4),243-70.
40. Mendiratta S, Qu ZC, May JM (1998) Erythrocyte ascorbate recycling Antioxidant effects in blood. *Free Radic Biol Med*, 24(5),789-797.
41. Bocci V, Luzzi E, Corradeschi F, Paulesu L, Rossi R, Cardaioli E, Di Simplicio P (1993) Studies on the biological effects of ozone: 4. Cytokine production an glutathione levels in human erythrocytes. *J Biol Regul Homeost Agent*, 7(4),133-138.
42. Packer L, Roy S, Sen CK (1997) Alpha-lipoic acid: A metabolic antioxidant an potential redox modulator of transcription. *Adv Pharmacol*,38,79-101.
43. Rokitanski O, Rokitanski A, Steiner J, Trubel W, Viebahn R, Washüttl J (1981) Di ozontherapie bei peripheren, arteriellen Durchblutungs-strörungen; klinik biochemische und blutgasanalytische untersuchungen. *Wasser IOA Ozon Weltkongress: Berlin*, 53-75.
44. Bocci V, Larini A, Micheli V (2005) Restoration of normoxia by ozone therapy may control neoplastic growth: a review and a working hypothesis. *Altern Complement Med*, 11(2),257-265.
45. Babior BM, Takeuchi C, Ruedi J, Gutierrez A, Wentworth P Jr (2003) Investigation antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc Nat Acad Sci USA* 100(6), 3031-3034.
46. Shin HW, Umber BJ, Meinardi S, Leu SY, Zaldivar F, Blake DR, Cooper DM (2009) Acetaldehyde and hexanaldehyde from cultured white cells. *J Transl Me*, 7:31.
47. Volkhovskaya NB, Tkachenko SB, Belopolsky AA (2008) Modulation of phagocyte activity of blood polynuclear leukocytes with ozonized physiological saline. *Bull Exp Biol Med*, 146(5),559-561.
48. Sen R, Baltimore D (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancerbindin protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* ,47(6),921-928.
49. Baeuerle PA, Henkel T (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 12,141-79.
50. Bocci V, Paulesu L (1990) Studies on the biological effects of ozone 1. Induction of interferon gamma on human leucocytes. *Haematologica*, 75(6),510-515.
51. Burgassi S, Zanardi I, Travagli V, Montomoli E, Bocci V (2009) How much ozon bactericidal activity is compromised by plasma components? *J App Microbiol*, 106(5),1715-1721.