

3. Bocci, V., Paulesu, L. (1990) Studies on the biological effects of ozone. 1. Induction of interferon in human leucocytes. *Haematologica*, **75**, 510-515.
4. Bocci, V., Luzzi, E. et al. (1993) Studies on the biological effects of ozone. 4. Cytokine production and glutathione levels in human erythrocytes. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, **7**, 133-138.
5. Bocci, V. (1995) Immunologische Aspekte. In Beck, E.G., Viebahn-Hänsler, R. (Hrsg.) *Ozon-Handbuch*, ecomed, Landsberg.
6. Brownlee, M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, **414**, 813-820.
7. Hoffmann, A., Viebahn, R. (2001) The Influence of Ozone on 2,3 Diphosphoglycerate Synthesis in Red Blood Cell Concentrates. *Proceedings of the 15th Ozone World Congress*, Imperial College London.
8. Hoffmann, A., Viebahn, R. (2002) Über den Einfluss von Ozon auf die 2,3 Diphosphoglycerat-Synthese in Erythrozyten-Konzentraten. in Knoch, H.G., Viebahn-Hänsler, R. (Hrsg.) *Ozon-Handbuch: Grundlagen-Prävention-Therapie*, ecomed, Landsberg.
9. León, O. S., Menéndez, S., Merino, N., Castillo, R., Sam, S., Pérez, L., Cruz, E., Bocci, V. (1998) Ozone Oxidative Preconditioning: a Protection against Cellular Damage by Free Radicals. *Mediators of Inflammation*, **7**, 289-294.
10. León, O.S. et al. (2005) Typ 2 Diabetes-Klinik und Pharmakologie des Medizinischen Ozones. In Viebahn-Hänsler, R., Knoch, H. G. (Hrsg.) *Ozon-Handbuch*, ecomed, Landsberg, 9. Erg.
11. Lerner, Richard A., Eschenmoser, A. (2003) Ozone in biology. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100** (6), 3013-3015.
12. Nathan, C. (2002) Catalytic antibody bridges innate and adaptive immunity. *Science*, **298**, 2143-2144.
13. Peralta, C., León, O.S., Xaus, C., Prats, N., Sala Planell, E., Puig-Parellada, P., Gelpi, E., Roselló-Catafau, J. (1999) Protective Effect of Ozone Treatment on the Injury Associated with Hepatic Ischemia-Reperfusion. *Antioxidant-Prooxidant Balance. Free Rad. Res.*, **31**, 191-196.
14. Wentworth, P. et al. (2002) Evidence for antibody catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science*, **298**, 2195-2199.

文献紹介

生体内でもオゾンが生成する？— 抗体の新たな機能の発見 —

北海道大学大学院薬学研究院 三浦敏明

要旨 免疫系における抗体の役割は、抗原を認識・提示して、その処理を補体系や貪食細胞に任せることであると信じられてきたが、抗体自体にも抗原を処理する機能が備わっていることが明らかになった。抗体は短寿命の一重項酸素を寿命のより長い過酸化水素やオゾンに変換し、これら活性種を抗原の処理に利用する。この機能はすべての抗体分子に共通するものであった。生体内でもオゾンが生成している可能性が示された。

キーワード：オゾン、抗体、一重項酸素、過酸化水素、抗菌作用

1. はじめに

2005年8月にストラスブルで開催された第17回世界オゾン会議のKeynote Lectureで「活性化された好中球ではオゾンが生成する。オゾンも生体系で生成する活性酸素の一種である」と、オゾン療法に関連する最近のトピックスをViebahn-Hänslerが紹介した(本報53頁、文献紹介参照)。その時は正直に言って「本当かな」「どんな実験・手法で証明したのかな」と疑い半分で聞いていたが、NOの例もあるので、その後、彼女が引用した論文を調べてみた。いずれも一流といわれる学術雑誌に掲載されたもので、どうやら確からしい。これらの論文の著者であるカリフォルニアのスクリプス研究所のWentworthらのグループは「抗体分子の新たな機能の発見」にかかわる研究を精力的に展開しており、①抗体分子が触媒する一重項酸素による水の酸化でオゾン(注)が生成すること、②この反応で生成するオゾンが殺菌や好中球による抗原処理、あるいは炎症反応にも関与している、などを実験的に示している。オゾン分子自体が免疫機能にかかわっているとすれば、その役割はオゾン療法の作用メカニズムにも密接に関係する可能性がある。そこで、Wentworthらが発表したその前後の関連論文も含めて、これらの研究の概要を紹介する。

注：当初の論文では「molecular species with a chemical signature similar to that of ozone」と表現されていたが、その後は「ozone」と断定的に表現されている。

2. 抗体の新たな機能の発見

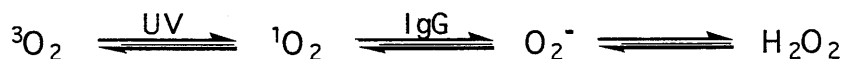
「抗体の唯一の役割は体内に侵入してきた抗原の認識(監視)であり、抗体が認識した抗原、すなわち抗原・抗体複合物の処理を担当するのは補体系や貧食細胞である」というのが、これまでの免疫系についての基本的な理解であった。したがって、補体系や貧食細胞のように、抗原の処理に関係する化学的反応に抗体自体も関与することは全く想定されていなかった。1980年代に入って、化学反応を触媒する抗体、Catalytic antibodyの例が多数報告されたが、それらが免疫系で実際に機能していることを証明した例は知られていなかった。しかし、Wentworthらは、抗体が抗原の認識のみならず、その処理にも関与していることをはじめて明らかにした。すなわち、抗体の新たな機能の発見である。

3. 抗体が触媒する水の酸化

A.D.Wentworth, L.H.Jones, P.Wentworth, K.D.Janda and R.A.Lerner, Antibodies have the intrinsic capacity to destroy antigens. PNAS, 97:10930-10935 (2000).

基底状態の酸素分子(三重項酸素、 3O_2)が励起されて生成する一重項酸素(1O_2)は、スーパーオキシドアニオン(O_2^-)とともに、生体系で生成する重要な活性酸素である。たとえば、貧食細胞では O_2^- の非酵素的不均化反応で 1O_2 を生成するが、生体分子との高い反応性のため、*in vivo*におけるその寿命は約4 μ secと極めて短い。ところがWentworthらは、以下のような実験を通じて、抗体分子が 1O_2 の O_2^- への還元を触媒することによって酸素分子のリサイクルに働いていることを見出した。

① NaCl含有リン酸緩衝液(pH 7.4)に種々の抗原に対するモノクローナルやポリクローナル抗体あるいはそれら抗体の $F(ab')_2$ フラグメントを加え、20°CでUV(312 nm)照射すると過酸化水素が生成した。嫌気的条件下やUV非照射では過酸化水素の生成がみられなかったことから、この反応ではUV照射によって生成した 1O_2 が抗体によって O_2^- に還元され、その不均化反応で過酸化水素が生成すると考えられた。



注：原文では上記の反応を可逆的反応として表現しているが、その根拠は示されていない。

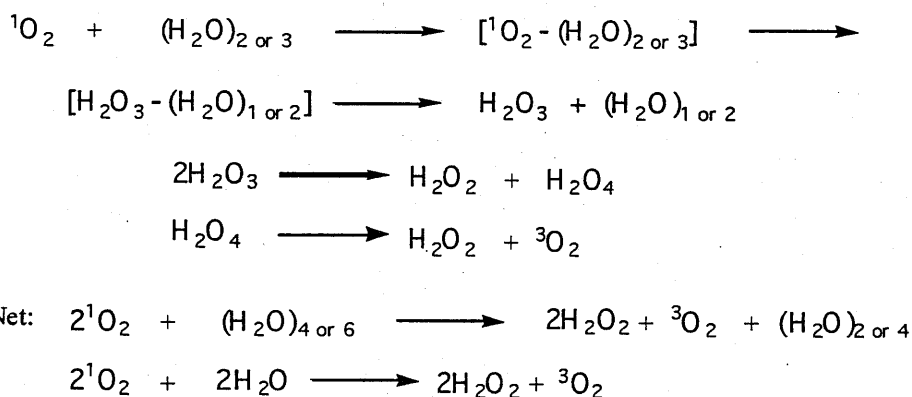
- ② 緩衝液中 O_2 濃度が275 μ Mの条件では、過酸化水素の生成は、反応進行率が10%程度までは直線的に進み、抗体分子1 mol当たり少なくとも40 molの H_2O_2 が生成する。ただし、加熱により変性した抗体分子には、このような活性は認められなかった。また、どのような抗原に対する抗体であるかにかかわらず、モノクローナルでもポリクローナル抗体でも、あるいは $F(ab')_2$ フラグメントであっても同様な活性を示したが、抗体の種類により H_2O_2 の生成速度には0.15-0.97 nmol/min/mg proteinの範囲で差がみられた。
- ③ UV照射の代わりに、 1O_2 の生成系として知られているヘマトポルフィリンIX/白色光照射の系を用いても同様な抗体の活性が認められた。また、加熱によって 1O_2 を発生する3',3'-(1,4-naphthylidene)dipropionateのエンドペルオキシドを用いても抗体存在下で H_2O_2 が同様に生成したことから、抗体は 1O_2 を H_2O_2 に還元することが確認された。
- ④ ヘマトポルフィリンIX/白色光照射の系における H_2O_2 の生成速度は D_2O 存在下で上昇し、 1O_2 の消去剤である NaN_3 の添加で低下した(D_2O 存在下では 1O_2 の寿命は約10倍長くなる)。また、 H_2O_2 の生成速度は抗体として用いたウマIgG濃度が0.5-20 μ Mの範囲で抗体濃度に比例した。ただし、酸素濃度が200 μ M以上では H_2O_2 生成速度に飽和現象が観察されたことから、抗体分子内に1つまたは2つ以上の酸素結合部位があり、これが反応に関与していると推定された。速度データの解析から酸素分子に関する見掛けの K_m は187 μ Mであり、 V_{max} は0.4 nmol/min/mg proteinと見積もられた。

以上のように、Wentworthらは抗体分子が 1O_2 から H_2O_2 の生成を触媒することを明らかにするとともに、このような反応を通じて、抗体分子が抗原の認識のみならず、その処理にも関与する可能性を示した。

P.Wentworth, L.H.Jones, A.D.Wentworth, X.Zhu, N.A.Larsen, I.A.Wilson, X.Xu, W.A.Goddard, K.D.Janda, A.Eschenmoser and R.A.Lerner, *Antibody catalysis of the oxidation of water*. *Science*, 293, 1806-1811 (2001).

前報に続いて、Wentworthらは抗体分子が触媒する H_2O_2 生成反応のメカニズムについて検討し、以下の点を明らかにした。

- ① リン酸緩衝液 (pH 7.4)/UV照射の条件下では抗体以外のタンパク質 (β -galactosidase、Bovine serum albumin、ovalbumin、 α -lactalbuminなど) 共存下でも少量の H_2O_2 が生成するが、その生成は短時間内に停止する。一方、抗体分子が触媒する H_2O_2 の生成は 40 mol/mol antibody まで直線的に進行する。その後生成速度は低下するが、この反応系にカタラーゼを添加 (系内の H_2O_2 の分解) してから除去すると、再び同様な速度で H_2O_2 が生成する。このサイクルを 10 回繰り返すと、抗体 1 分子当たり約 500 分子の H_2O_2 が生成する。つまり、この反応は過剰の H_2O_2 により可逆的に阻害される (IC_{50} は 225 μM)。また、酸素濃度の増加にともなって H_2O_2 生成量の飽和 ($K_m=187 \mu\text{M}$) も認められることから、抗体には反応に関与する結合部位があると考えられる。
- ② 上記の反応条件下で 8 時間 UV 照射しても、抗体分子の凝集や切断が起こらないことが SDS-PAGE 電気泳動で確認された。
- ③ ウマ IgG を用いて測定した吸収スペクトルと作用スペクトル (照射波長に対して H_2O_2 生成量をプロットしたもの) は 260-320 nm の範囲でよく一致し、 H_2O_2 生成効率が 280 nm で最大であったことから、抗体の触媒作用にはトリプトファン残基が関与していると推定された。
- ④ $^1\text{O}_2$ が H_2O_2 に変化するには 2 個の電子が供給されねばならないが、高い H_2O_2 生成効率を説明できる電子供与体としては抗体分子自体 (トリプトファンなどの構成アミノ酸)、塩化物イオンおよび金属イオンは否定され、残った候補が水分子であった。
- ⑤ そこで、ヒツジ IgG を用いた UV 照射実験を $^{16}\text{O}_2/\text{H}_2^{18}\text{O}$ および $^{18}\text{O}_2/\text{H}_2^{16}\text{O}$ の両系で行い、生成した H_2O_2 の $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ を測定したところ (H_2O_2 をホスフィン誘導体と反応させ、生成するホスフィンオキシドのエレクトロスプレーイオン化質量スペクトルを測定)、前者では 2/1、後者では 1/2 であった。この ^{18}O 取り込み実験から水分子が $^1\text{O}_2$ を還元していることが確認された。
- ⑥ 上記の取り込み実験の結果と反応のエネルギー収支の理論的考察から、 $^1\text{O}_2$ と水分子との反応は以下のよう進行し、中間体として H_2O_3 が生成すると推定された。



- ⑦ 上記の反応を触媒する抗体は、 H_2O_3 の安定化や H_2O_2 への変換が促進されるような構造の活性部位が存在すると考えられており、著者らは X 線解析の結果に基づいて活性 (酸素分子結合) 部位の微視的構造についても考察している。

以上のように、Wentworthらは本論文において、抗体分子が $^1\text{O}_2$ による水の酸化を触媒することを明らかにするとともに、その反応の中間体としてオゾンの還元体に相当する H_2O_3 の生成を推定した。

4. 抗体が関与する抗菌作用とオゾン

P.Wentworth, J.E.McDunn, A.D.Wentworth, C.Takeuchi, J.Nieva, T.Jones, C.Bautisa, J.M.Ruedi, A.Gutierrez, K.D.Janda, B.M.Babior, A.Eschenmoser and R.A.Lerner, *Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation*. *Science*, 298, 2195-2199 (2002).

本論文においてWentworthは、抗体分子が上述した H_2O_2 生成反応を触媒することによって抗菌作用を示すとともに、その抗菌活性には H_2O_2 のみならず、オゾンも関与していることを以下のような実験結果に基づいて明らかにした。

- ① NaCl含有リン酸緩衝液 (pH 7.4) に大腸菌 (10^7 cells/ml) とヘマトポルフィリンIX (40 μ M) を加えて白色光を照射 (4°Cで1時間) しても抗菌活性は認められなかったが、これに大腸菌に特異的あるいは非特異的モノクロナール抗体 (20 μ M) を加えて白色光を照射すると、いずれの場合も95%以上の大腸菌が死滅した。顕微鏡で観察した大腸菌の形態学的変化では、抗体が結合した部位での細胞壁および細胞膜に酸化的損傷によると考えられる穴が認められ、膜透過性が亢進していた。この形態学的変化は細菌が貧食細胞によって死滅する場合と同様であった。
- ② この抗菌活性は抗体であるイムノグロブリンに共通する作用であり、試験したすべての抗体が同様な作用を示した。
- ③ 抗菌活性の強さは抗体の濃度、ヘマトポルフィリンIXの濃度および照射時間に比例した。
- ④ この抗菌活性には H_2O_2 が関与しているため、カタラーゼを反応系に添加すると、大腸菌に非特異的なモノクロナール抗体を用いた場合の抗菌活性は完全に消失した。しかし、大腸菌に対する H_2O_2 の ED_{50} と比較すると、非特異的抗体を用いる反応系で生成する H_2O_2 濃度 (35 \pm 5 mM) は遥かに低いにもかかわらず、強い抗菌活性が認められた。したがって、カタラーゼによって消失する、 H_2O_2 以外の活性種も抗菌活性に関与していることが明らかであり、その候補としてオゾンが注目された。オゾン自体は殺菌力が強く、また、オゾンと H_2O_2 の組み合わせは強力な殺菌効果を示す。オゾンの水溶液中における半減期は66 secであり、適当なプローブを用いることにより、その検出が可能である。
- ⑤ 著者らは、抗体が触媒する H_2O_2 生成反応系にIndigo carmineを添加してオゾンの検出を試みた。このプローブはオゾンによって分解すると610 nm ($\epsilon = 20,000$) の吸収が消失し、isatin sulfonic acidを生成する (図1参照)。結果は、抗体の種類にかかわらず、Indigo carmineの消失とisatin sulfonic acidの生成が直線的に進行した。ただし、この反応はオゾンに特異的ではなく、 1O_2 でも同じ生成物を与えるため、オゾンによる反応か 1O_2 による反応かを区別する必要がある。
- ⑥ 生成物は同じでも、オゾンによる反応 (図1 A)と 1O_2 による反応 (図1 B) の反応機構は異なり、前者では溶媒中の水分子の酸素原子が生成物に取り込まれるので、反応溶媒に $H_2^{18}O$ を用いて生成する isatin sulfonic acidをの質量スペクトルから両者の反応を区別することが可能である。実際に、Indigo carmineの共存下でヒツジ IgG とヘマトポルフィリンIX の混合溶液に白色光を照射すると、得られた isatin sulfonic acidには ^{18}O が取り込まれていた。したがって、抗体が触媒する 1O_2 と水の反応ではオゾン (molecular species with a chemical signature similar to that of ozone) も生成し、この反応系の抗菌活性に深くかかわっていることが明らかになった。
- ⑦ 同様な実験を 3-または4-vinylbenzoic acidをプローブとして行った。これらのプローブは 1O_2 とは反応せず、通常のオゾン分解では 3-または 4-carboxybenzaldehyde および 3-または 4-oxiranylbenzoic acidを生成するが、抗体触媒反応でも同様の生成物を与えた。
- ⑧ 好中球は細菌感染防御において主要な役割を担っている。その細胞表面に抗体が結合すると活性化され 1O_2 を含む酸素活性種を生成する。したがって、活性化された好中球では上記抗体触媒反応の基質である 1O_2 が存在するので、光照射を受けなくてもオゾンが生成すると考えられる。そこで、Indigo carmine共存下でヒト好中球をphorbol myristateで活性化したところ、isatin sulfonic acidが生成した。また、 $H_2^{18}O$ を溶媒として同様な活性化を行ったところ、得られたisatin sulfonic acidには50-75%の ^{18}O が取り込まれていた。したがって、ヒト好中球における抗原処理にもオゾンが関与していることが示唆された。
- ⑨ 炎症モデルとしてSD系ラットにBovine serum albuminを静脈内投与後、その抗体を皮膚に投与すると、約8時間後には投与部位に炎症性変化がみられた (Arthus reaction)。この炎症組織と、その周辺の正常組織を切除して、 $H_2^{18}O$ 中、Indigo carmine共存下でインキュベートすると、Indigo carmineの脱色が、正常組織ではみられず、炎症組織で認められた。また、生成したisatin sulfonic acidには ^{18}O が取り込まれていたことから、この炎症反応にもオゾンの関与が示唆された。

以上のように、本論文で著者は 1O_2 存在下で抗体が触媒する水の酸化と、それに伴うオゾンの生成が殺菌などの抗原の処理や免疫応答に関与していることを明らかにした。ただし著者は、これらの作用がオゾンではなく、オゾンと同様の反応性を示すトリオキシド様活性種 (-O-O-O-) による可能性を否定していない。

オゾンは極めて毒性 (反応性) の高い化学種であるが、その寿命は短く、炎症局所で働くには都合の良いエフェクター分子であろう。しかもオゾンは、抗原の処理のみならず、NFkB、インターロイキン-6およびTNF α などの産生誘導を介して免疫応答を増幅するシグナル伝達分子としても作用することが知られている。

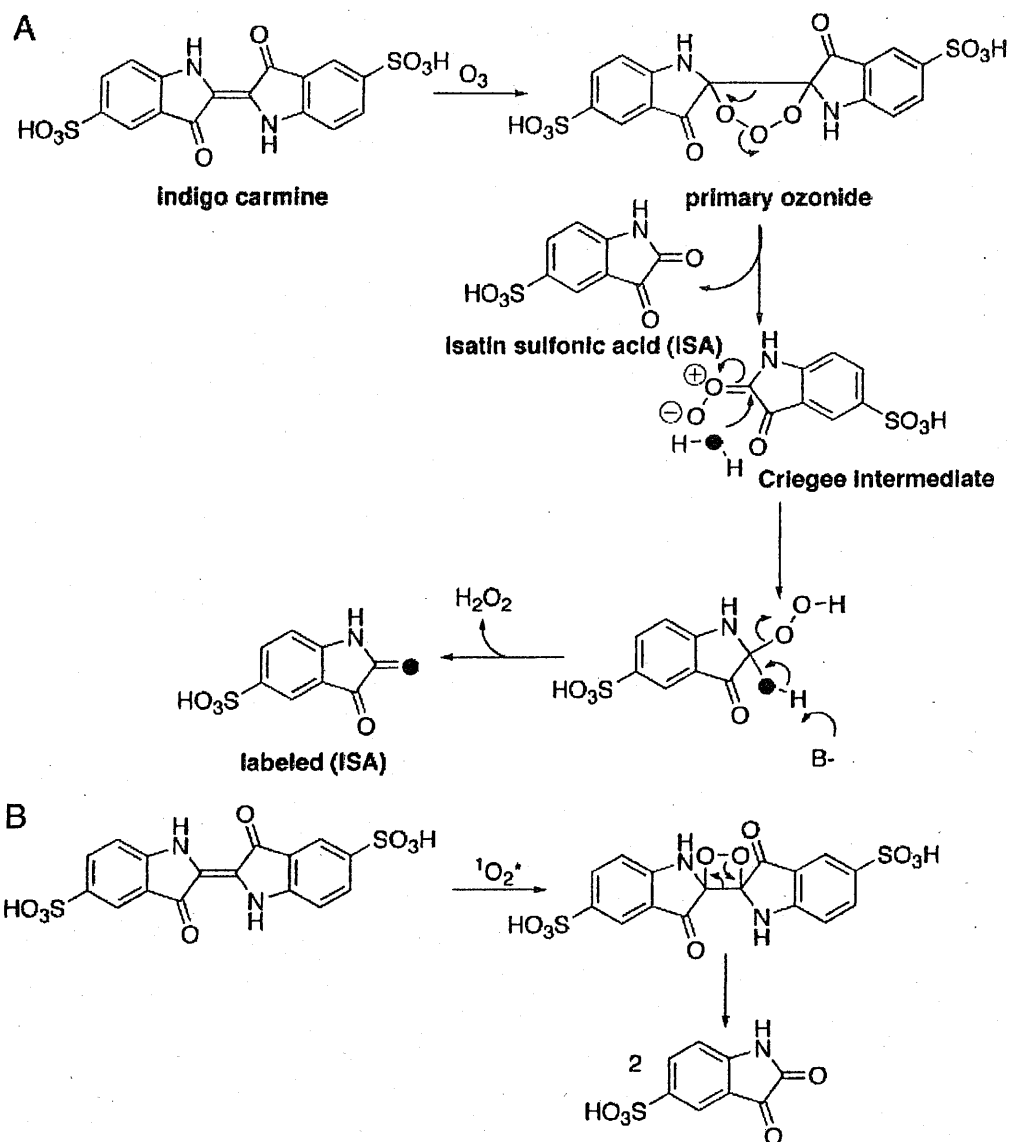


図1 オゾンと 1O_2 によるインジゴカルミンの酸化反応機構の相違
 $H_2^{18}O$ 中の反応では ^{18}O (●) が生成物中に取り込まれるか否かで判断できる。

Science誌ではその号のトピックスを取りあげて論文の評価をしているが、この論文がその対象になり、「予想もしなかった抗体の新しい機能」あるいは「免疫応答におけるオゾンの関与」などに関する発見が賞賛されている。(J.Marx, Antibodies kill by producing ozone. Science, 298, 1319, 2002)

注：この一連の研究では、オゾンが関与している反応であることの確認に Indigo carmineから生成する isatin sulfonic acid に ^{18}O が取り込まれていることを利用している。この方法では確かに 1O_2 による反応との区別ができるが、 O_2^- による反応との区別はできないとする論文がその後に公表されている。

A.J.Kettle, B.M.Clark and C.C.Winterbourn, Superoxide converts indigo carmine to isatin sulfonic acid. J.Biol.Chem., 279:18521-18525 (2004).

この点も含めて、関連論文が10数報あるので、次の機会に紹介したいと考えている。