

文献抄録

急性腎不全におけるオゾン酸化ポストコンディショニング

Proceedings of 19th Ozone World Congress of the IOA Tokyo, Aug 31–Sept 3, 2009

Ozone Oxidative Post-Conditioning in Acute Renal Failure

J. L. Calunga¹, S. Menendez¹, Z. Zamora¹, N. Merino² and T. Montero³¹Ozone Research Center, Havana, ²Center for Pharmaceutical Chem., Havana³"Luis Diaz Soto" Military Medicine Institute, Havana, Cuba

筑波物質情報研究所 神力就子

研究目的

虚血/再灌流 (I/R) によってしばしば臓器や細胞に損傷が生ずる。腎臓の I/R 後に起こる糸球体濾過速度低下の主要なメカニズムは腎血管収縮と尿細管の機能障害であることが明らかにされている。腎虚血後には腎血流速度が 40~50%減少することが実験モデルやヒトにおいて報告されている。現在のところ、これら損傷の主要原因はフリーラジカルであると考えられている。すなわち活性酸素化学種 (ROS: スーパーオキシドアニオン, 過酸化水素, OH ラジカル, 一重項酸素, 次亜塩素酸 (ClHO) が抗酸化物質とのバランスを壊し、酸化ストレスを生じさせる。ROS による損傷を軽減するためのいくつかの試みがあるが、オゾン酸化処置もその 1 つである。瞬時接触でかつ確実なオゾン投与によって細胞中の抗酸化酵素系が調節、増加産生され、また血流や酸素代謝が強化されることが知られている。

本研究はこれらの知見を踏まえ、温腎虚血ラットを実験動物として、オゾン酸化ポストコンディショニング (虚血後に投与) 後の腎臓の形態、機能、生化学的パラメータ (フルクトサミン, ホスホリパーゼ A₂, カタラーゼ, スーパーオキシドジスムターゼ, チオバルビツール酸反応物質) に及ぼす効果を評価するために行った。

キーワード: オゾン療法, 活性酸素種, 再灌流, スーパーオキシドジスムターゼ, 温虚血

実験方法

40 匹のオス Wistar ラット (250~260 g) は、空気濾過され、室温 20~22°C, 相対湿度 50~52% に保たれた飼育室で通常の餌と水で飼育された。実験ではラットを 10 匹ずつ 4 グループに分けた。すべてのラットはペントバルビタールナトリウムによって麻酔し、ヘパリン (50 IU) を皮下注射し、その後腹部切開手術を行った。両腎臓の動脈を 60 分間遮断することにより虚血状態にした後、再灌流を 10 日間継続した。再灌流の終わる 10 分前に腎血漿流量 (RPF), 糸球体濾過速度 (GFR) を測定した。また腎臓の形態学的、機能的、生化学的検査を行った。

ネガティブコントロールグループ (NC-G): 腎臓の疑似曝露を行い、腹部を再縫合したのみである。

ポジティブコントロールグループ (PC-G) (虚血グループ): 無処置のまま再灌流した。

オゾングループ (オゾン-G): オゾン/酸素混合ガス (オゾン濃度 50 μ g/mL) を直腸注入法によって 2.5~2.6 mL 投与した。オゾン投与は虚血の 60 分後に始まり、再灌流 10 日間に毎日 1 回行った。

酸素グループ (酸素-G): 酸素のみをオゾン-G と同様に投与した (酸素: 13 mg/kg-ラット体重)。このグループはオゾン-G のオゾン/酸素投与における酸素の効果を知るために行った。

結果と考察

1. 腎機能 (Table 1 参照)

- 腎血漿流量 (RPF) は PC-G と酸素グループでは NC-G とオゾン-G より有意の差で低かった。オゾン-G は NC-G よりも低い値を示した。糸球体濾過速度 (GFR) も同様のパターンであった。
- 血漿クレアチン濃度は PC-G と酸素-G では NC-G とオゾン-G より高かった。PC-G と酸素-G の間、および NC-G とオゾン-G の間で有意な差はなかった。
- これらの結果は I/R によって腎機能が劣化するが、PC-G と酸素-G ではこれに対する防御効果はなかった。しかしオゾン酸化ポストコンディショニングは RPF, GFR, クレアチン濃度などを NC-G と同程度に保

ち、腎機能を保護したことが示された。

2. 抗酸化物質-酸化促進物質のバランスとタンパク質の酸化 (Table 2 参照)

- ・チオバルビツール酸反応物質 (TBARS) (脂質過酸化物の指標) は酸素-G では他のグループより有意に高く、オゾン-G と PC-G も NC-G よりは有意に高かった。
- ・スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 酵素活性は PC-G が他のグループより有意に低かったが、オゾン-G は有意に増加した。
- ・フルクトサミンとホスホリパーゼ A₂ 酵素活性は PC-G と酸素-G では NC-G とオゾン-G より有意に高かった。NC-G とオゾン-G の間には有意の差はなかった。
- ・これらの結果はオゾン酸化ポストコンディショニングが抗酸化物質-酸化促進物質バランスを保護すること、タンパク質酸化も緩和され NC-G と同様であることを示した。

3. 組織学的調査 (Table 3 と Fig. 1 参照)

- ・I/R により尿細管腫脹 (MTT), 尿細管損壊 (TD), 浸透圧性ネフローゼ (ON) などの種々の病変が生じた。
- ・NC-G では中度 MTT が 5% のみに見られた。PC-G と酸素-G は同様の結果であるが ON と TD は増大した。しかしオゾン-G では MTT に関連する病変の割合が高まったが、ON の割合は低下し TD は無かった。
- ・これらの結果はオゾン酸化ポストコンディショニングが I/R によって生ずる損傷を軽減することを裏付けるものである。

結論

オゾン酸化ポストコンディショニングは 60 分間の虚血と 10 日間の再灌流に曝された腎組織の機能的および組織的回復に有利に作用する。これは細胞の酸化還元バランスの維持と血液循環および酸素代謝を促進するメカニズムに依っている。本研究はオゾン酸化ポストコンディショニングの腎 I/R 損傷に対する保護効果を明らかにした初めての研究である。オゾン療法は腎 I/R 損傷に対して有効性のある医療法であり、腎移植をより可能ならしめることが考えられ、また心臓血管や中枢神経システムの治療にも応用が可能と考える。

文献

1. Ramzi S., Vinay F., Tucker C., *Patología estructural y funcional*. New York: Mc Graw-Hill, 2000, 1011-1012.
2. Brenner B. M., *The Kidney*, 6th edn. Vol. 1. Philadelphia: Saunders, 2000, 1201-1215.
3. Bonventre J., Mechanisms of ischemic renal failure. *Kidney Int.*, 1993, 43, 1160-1178.
4. Ichicawa I., Kiyama S., Yoshioka T., Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int.*, 1994, 45(1), 1-9.
5. Annuk M., Fellstrom B., Akerblom O., et al., Oxidative stress markers in pre-uremic patients. *Clin Nephrol.*, 2001, 56(4), 308-314.
6. Bocci V., *Ozone. A new medical drug*. AA Dordrecht, The Netherlands: Springer Publishers, 2005, 1-85.
7. Gobé G., Willgoss D., Hogg N., et al., Cell survival or death after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.*, 1999, 56, 1299-1304.
8. Caballero M. E., Calunga J. L., Barber E., et al., Epidermal growth factor-mediated prevention of renal ischemia/reperfusion injury. *Biotech Ap.*, 2000, 17, 161-165.
9. Hammerman M. R., Safirstein R., Harris R., et al., Acute renal failure. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. *Am J Physiol.*, 2000, 279, 3-11.
10. Peralta C., León O.S., Xaus C., et al., Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: Antioxidant-Prooxidant balance. *Free Radical Res.*, 1999, 31, 191-196.
11. Peralta C., León O. S., Xaus C., et al., Effect ozone treatment on reactive oxygen species and adenosine production during hepatic ischemia-reperfusion. *Free Radical Res.*, 2000, 33, 595-605.

12. Ajamieh H. H., Berlanga J., Merino N., et al., Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning hepatic ischaemia/reperfusion. *Transpl Int.*, 2005; 18(5): 604-612.
13. Murry C. E., Richard V. J., Reimer K. A. and Jennings R. B., Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res.*, 1990; 66: 913-931.
14. Neschis D. G., Safford S. D., Raghunath P. N., et al., Thermal preconditioning before rat arterial balloon injury: limitation of injury and sustained reduction of intimal thickening. *Thromb Vasc Biol.*, 1998; 18: 120-126.
15. Riepe M. W. and Ludolph A. C., Chemical preconditioning: a cytoprotective strategy. *Mol Cell Biochem.*, 1997; 174: 249-254.
16. León O. S., Menéndez S., Merino N., et al., Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediat Inflamm.*, 1998; 7: 289-294.
17. Ajamieh H., Merino N., Candelario-Jalil E., et al., Similar protective effect of ischemic and ozone oxidative preconditionings in liver ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res.*, 2002; 45(4): 333-339.
18. Barber E., Menéndez S., León O. S., et al., Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediat Inflamm.*, 1999; 8: 37-41.
19. Calunga J. L., Menéndez S., Barber E., et al., Ozone biological response in kidneys of rats submitted to warm ischemia. *Ozone-Sci Eng.*, 2000; 25: 233-240.
20. Borrego A., Zamora Z., González R., et al., Protection by ozone preconditioning is mediated by antioxidant system in cisplatin induced nephrotoxicity in rats. *Mediat Inflamm.*, 2004; 13(1): 13-19.
21. Zhao Z. Q., Corvera J. S., Halkos M. E., et al., Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2003; 285: H579-H588, [Erratum, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2004; 286: H477].
22. Ma X., Zhang X., Li C., Luo M., Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function and LV recovery after myocardial infarction. *J Interv Cardiol.*, 2006; 19: 367-375.
23. Hernández F., Menéndez S. and Wong R., Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. *Free Rad Biol Med.*, 1995; 19: 115-119.
24. Al-Dalain S. M., Martínez G., Menéndez S., et al., Therapeutic efficacy of ozone medical treatments in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol.*, 2005; 523: 151-161.
25. Bratton A. C. and Marshall E. K., A new coupling component for sulfanilamide determination. *J Biol Chem.*, 1939; 128: 537-542.
26. Smith H. W. and Tinkelstin N., The renal clearance of substitute hippuric acid derivative and other aromatics acids in dog and man. *J Clin Invest.*, 1945; 24: 388-391.
27. Schreiner G., Determination of inulin by means of resorcinol. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 1950; 1: 117-120.
28. Minami M. and Yoshikawa H., A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin Chim Acta*, 1979; 92: 337.
29. Rice E. C. and Diplock A. T., Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. In: Burtin R. H., Knippenbrg P. H., ed. *Techniques in free radical res.*, Amsterdam: Elsevier, 1991: 199-201.
30. Ohkawa H., Orichi N. and Yagi K., Assay for lipid peroxidation animal an tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.*, 1979; 95: 351-358.
31. Hotter G., León O. S. and Catafau-Roselló, Tissular prostanoid release phospholipase A2 activity and lipid peroxidation in pancreas transplantation. *Transplantation*, 1991; 51: 987-990.
32. Lowry O. H., Rocebrogh N. I., Farr A. L. and Randall R. I., Protein measurement with the folin fenol reagent. *J Biol Chem.*, 1951; 193: 165-175.

33. Thome J., Münch G., Müller R., Advanced glycation endproducts-associated parameters in the periphric TAU blood of patients with Alzheimer's disease. *Life Sci.*, 1996; 59: 679-685.
34. Al-Dalain S. M., Martínez G., Candelario-Jalil E., et al., Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *Pharmacol Res.*, 2001; 44(5): 391-396.
35. Calunga J. L., García M., Chaple M., et al., Ozonoterapia en la glomerulonefritis tóxica experimental por adriamicina. *Rev Cubana Invest Biomed.*, 2004; 23(3): 139-43.
36. González R., Borrego A., Zamora Z., et al., Reversion by ozone treatment of acute nephrotoxicity induced by cisplatin in rats. *Mediat Inflamm.*, 2004; 13(5/6): 307-312.
37. Yellon D. M. and Hausenloy D. J., Myocardial reperfusion injury. *N Engl Med.*, 2007; 357: 1121-1135.
38. León O. S., Menéndez S., Merino N., et al., Influencia del acondicionamiento oxidativo con ozono sobre los niveles de calcio. *Rev CENIC Ciencias Biol.*, 1993; 29(3): 134-136.
39. Ajamieh H. H., Menéndez S., Martínez-Sánchez G., et al., Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion. *Liver Int.*, 2004; 24: 55-62.
40. León O. S., Ajamieh H. H., Berlanga J., et al., Ozone oxidative preconditioning is mediated by A1 Adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/reperfusion. *Transplant Int.*, 2008; 21: 39-48.
41. Borrego A., Zamora Z., González R., et al., Ozone/Oxygen mixture modifies the subcellular redistribution of Bax protein in renal tissue from rats treated with cisplatin. *Arch Med Res.*, 2006; 37: 717-722.
42. Paller M. S., Effect of neutrophil depletion on ischemia renal injury in the rat. *J Lab Clin Med.*, 1993; 11(3): 379-386.
43. Rodríguez-Puyol D., Lucio J., Ruiz P., et al., Radicales libres y daño glomerular. *Nefrología*, 1996; XVI (S3): 29-34.

日本医療・環境オゾン研究会第 15 回総会

日時 : 2010 年 4 月 18 日 (日) 12:00~12:50

会場 : 日本薬学会館長井記念館 (東京都渋谷区渋谷 2 丁目 12 番 15 号 JR 渋谷駅下車, 徒歩 10 分)

議題 : 平成 21 年度活動報告, 同会計報告, 平成 22 年度活動方針など

理事の改選など重要議題が予定されております。出欠を、本会報 No.62 送付の際に同封するハガキにて返信願います。会員の皆様にはふるってご参加ください。やむをえず出席できない会員の方は、委任状 (ハガキ) の提出をお願いいたします。追加理事候補の推薦を受け付けております。出欠、推薦ともに事務局まで。期限は 4 月 10 日 (土)。

会報原稿募集

臨床報告, 研究紹介, 臨床速報または速報, 解説, 文献紹介, 総説, 寄稿 (会員の交流のため内容は自由。会員だより, 企業だよりを含む), や質問等。詳しくは投稿規程を御覧になるか, 事務局にお尋ねください。