

## 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の用量反応関係 (その 1)

Velio A Bocci, Iacopo Zanardi and Valter Travagli

Journal of Translational Medicine 2011, 9:66

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

摂南大学薬学部 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出版されたので、数回にわたって紹介する。

## 要約

本論文の狙いは、オゾンが血液あるいは他の体液に溶解すると医学的に有用となりうる理由を解明することである。過去 10 年間に末梢動脈疾患 (Peripheral Arterial Diseases (PAD)) について行われた臨床研究から、いわゆる自家血液オゾン療法による治療効果を表現するのにかねてより提唱されていた逆 U 字カーブ、典型的なホルミシスの概念が適当であることが確かになった。ヒトの血液をオゾン化する量的および質的な観点も、オゾンの生物学的治療的安全性の点で俯瞰された。オゾンは長時間吸引すると呼吸器系に有毒であるが、最近治療効果が報告されている他の医療用ガスと組み合わせることで、オゾンが酸化ストレス関連疾患に有効であることが周知されることが望まれる。最後に、オゾンの作用機構および PAD に対する効果が明らかになれば、血管疾患に関連する現行の治療法に比較してオゾン療法が効果的であることを臨床医が評価するようになるだろう。

## 1. はじめに

オゾンは、二面性のある気体である。成層圏のオゾンは太陽が発する波長 100~280 nm の紫外線による変異原性および発がん性を部分的にブロックするという、重要な保護作用を有する<sup>1)</sup>。一方で対流圏のオゾンが増加すると重篤な肺障害を起し、死亡率を増加させる<sup>2,3)</sup>。この欠点にもかかわらず、オゾンの医療用利用に関する実験的および臨床的エビデンスが増加してきた<sup>4-11)</sup>。

16 世紀にパラケルススは「全ての物質には毒性があり、毒性の無い物質はない。毒と薬を区別するのは用量だけである」と考えた。2005 年に Timbrell は著書の中でその概念を繰り返して「毒性のパラドックス：役立つものであり敵害を与えるものとしての化学物質」と言った<sup>12)</sup>。地球上の生物が進化の過程で、酸素を利用したのは、素晴らしい生物多様性と発達をもたらしたが、それはまた、遅効性の「毒」も産生することになった。その後 20 億年かけて抗酸化系がゆっくり分化・進化してきた。ヒトでは毎日 3~5 g 産生されるミトコンドリア内スーパーオキシドアニオンと遍在する NADPH オキシダーゼ由来の過酸化水素を遊離しているが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生理学的産生が生命に必須であることも一般的に知られている。

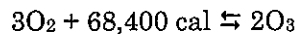
Olivieri ら<sup>13)</sup>および Wolff<sup>14)</sup>は、放射性チミジンも放射線も、高用量に比べて低用量の場合に適応可能な反応をヒトの細胞に誘発していることを最初に報告し、Goldman<sup>15)</sup>は「高用量曝露は有害であるが低用量曝露は有益な効果があること」を「hormesis (ホルミシス)」と命名した。Calabrese はこの概念を利用して、毒性学的閾値より低い用量で刺激的に作用する多くの実験例を示した<sup>16-19)</sup>。2002 年までに、オゾン療法は低用量では刺激的で高用量では抑制的な治療法として薬理的に考えられるようになった。抗原が低用量では刺激的で高用量では抑制的であるという古典的考えを反映しているこの考えは、オゾンの作用は複雑で、高用量でも副作用を伴いながらやはり効果的であったため、漠然としていて不適當であった。

著者らは 2002 年、ヒトの血液を採取して等容量の O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> 混合ガスを添加することにより、生化学反応が惹起されることを詳細に報告した<sup>20)</sup>。まず第一に、血液と酸化剤を混合すると酸化ストレスを意図したとおり正確に惹起することができ、すなわちホメオスタシス的な変化により非常に反応性の高い二次生成物が生じる。酸化ストレスは、他の多くの刺激と同様に、生物学的反応を誘発して適応現象を誘導する。こうい

う反応が起きることは、細菌から植物および哺乳類まで広く認められる。そして、小さい反復的なストレスは非常に有効な適応反応を誘導し、重要な防衛機構が再構築される<sup>20-22)</sup>。同時に、Calabrese と Baldwin は、ホメオスタシスが乱された後で補償的な生物反応が生じることを「過補償刺激ホルミシス overcompensation stimulation hormesis (OCSH)」と表現し<sup>17)</sup>、後に Re もこの可能性を示した<sup>23)</sup>。オゾンによって惹起される微妙な何らかの反応を説明するためには、血漿中有機物質とオゾンガスとの間で生じる生化学反応を解明することが必要であると思われる。

## 2. オゾンは強い酸化力のある気体である

気体オゾンでは、3つの酸素原子が等辺の長さ 1.26 Å の二等辺三角形をつくっており、その構造はいくつかの共鳴寄与式で表される(平衡ではない)<sup>24)</sup>。酸化還元電位 (E°) でみると、オゾン (2.07V) はフッ素 (3.06V) とヒドロキシラジカル (2.80V) に次いで 3 番目に強い酸化剤であり、他には過酸化水素 (1.77V)、次亜塩素酸 (1.49V)、塩素 (1.36V) がそれに続く。オゾンは最外殻電子軌道に非共有電子対を持ち、ラジカルではないが、反応性が酸素よりはるかに高く、酸素が生成するのと同様の活性酸素種(ROS)を容易に生成する。気体のオゾンは非常に不安定で 20°C での半減期が約 40 分であり、その分解は放熱反応である。



このことから、オゾンの作用は何等かの生体成分と反応してエネルギーを付与するという考えが提唱された<sup>20)</sup>。しかし複雑な作用機構が明らかになり、結論としては、血漿に溶解しているオゾンはプロドラッグとして作用し、化学伝達物質を生成することを通じて、電子伝達と全体的な代謝を促進するということがあった。

ドイツの医師である Hans Wolff (1927~1980) はそれを利点として考え、自家血液オゾン療法 (O<sub>3</sub>-AHT) を開発した。すなわち、オゾン耐性で滅菌した調剤用ガラス瓶に血液を採取し、医療用酸素 (95%) とオゾン (5%) から成る混合ガスを通気するという方法である<sup>25)</sup>。

## 3. どの血液成分がオゾンと反応しているか?

およそ 30 年間、オゾン療法はドイツの臨床医の間だけで経験的な手順で行われたことが、アカデミックな臨床研究者達の間で疑念や偏見を与えることになった。

最近 15 年間でようやく、現代式オゾン発生器を用いて 253.7 nm の吸光度で、リアルタイムに、正確に、オゾン濃度を測定しつつ正確な方法 (ここでは血液 1mL 当たりの正確なオゾン用量) で扱えるようになった。それゆえに、血液量に対するオゾンの用量も正確にできるようになり、ヒトの血液で正確にオゾンの反応を研究することが可能になった。オゾンの毒性がその用量に依存することが明確になり、さらに重要なことに、オゾンの用量を制御すれば、生物学的防衛機能によって中和されることも明らかになっている<sup>4,20-22,26)</sup>。

血液は、約 55% の血漿と約 45% の細胞からなり、細胞の大部分は主に赤血球である。血漿の組成は複雑であるが、簡単に言うと、約 92% の水、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> や PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> のような pH を 7.3~7.4 の範囲内に調節する可溶性イオン、親水性分子 (ブドウ糖、尿酸、アスコルビン酸、システインと他のアミノ酸) および疎水性分子 (ビリルビン、ビタミン E、カロチノイド、リコピン)、およそ 5 mg の脂質 (中性脂肪、コレステロール、リン脂質とリポタンパク質)、タンパク質 (アルブミン (4.5 g/dl)、フィブリノーゲン、グロブリン、Fe<sup>2+</sup> と結合するトランスフェリンや Cu<sup>+</sup> と結合するセルロプラスミン)、そして凝血因子およびホルモン類である。血漿の主な機能の一つは抗酸化機能であり、それは尿酸 (4.0~7.0 mg/dl (400 μM))、アスコルビン酸 (0.4~1.5 mg/dl (22.7~85 μM))、GSH (0.5~1.0 μM)、既述の疎水性物質およびアルブミンのような様々な分子によって担われている。詳細にいうと、赤血球は大量の GSH (およそ 1 mmol/l)、利用可能なシステイン残基を 2 つ有するチオレドキシシン、強力な抗酸化酵素 (カタラーゼ、GSH レダクターゼ、GSH-ペルオキシダーゼ、GSH-トランスフェラーゼおよび SOD) を含んでいる。それらの物質は・OH、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、OCl<sup>-</sup>、ONOO<sup>-</sup> といった大量の酸化性物質を速やかに除去し、ペントースリン酸回路で G6PD の活性により再生する NADPH からプロトンと電子が供与されて、被酸化生成物を還元する。注意すべきことは、大部分のこれらの抗酸化剤が共同して働いて、有害な酸化性物質の還元を促進しているということである (図 1)。

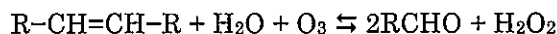
アルブミンはそれ自身において、多数ある Lys199 および His146 とともに Cys34 のような求核性アミノ酸残基をもつため、非常に重要である<sup>27,28)</sup>。

## 4. オゾンと血液の生化学反応

最も正確で安全な体外 O<sub>3</sub>-AHT の方法では、酸素-オゾン混合ガスは血漿に溶解する。酸素は溶解性が低い、酸素分圧は約 400 mmHg までは緩やかに上昇する<sup>29)</sup>。ヘモグロビンは完全に酸素化 (Hb<sub>4</sub>O<sub>8</sub>) されるが、体内に注入する過程で酸素分圧 40 mmHg の静脈血と混合されるため実際にはほとんど意味がない。

一方、オゾンの挙動は全く酸素と異なり、イオンや生体分子と直ちに化学反応するため、分圧と溶解度との関係を示す古典的な Henry 則に従わず、溶解量は分圧に正比例する。もともとオゾンの溶解度は酸素の約 10 倍であり、そのうえさらにオゾンが血漿に溶解すると即座に親水性抗酸化物質と化学反応するのである。すなわち、血液 1mL 当たり 0.84μmol/mL に相当する 40μgO<sub>3</sub>/mL 血液を用いることによって、5 分以内に平均 78%のアスコルビン酸が酸化されてデヒドロアスコルビン酸になり、約 20%の尿酸が酸化されてアラントインになる<sup>30)</sup>。およそ 10%の α-トコフェロールだけが α-トコフェリルラジカルを生成する。同時に、残りのオゾンは不飽和脂肪酸を過酸化する。不飽和脂肪酸は電子供与体であり、大部分はアルブミンに結合して存在している。

n-6 多価不飽和脂肪酸(PUFA)が過酸化されると H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と 4-ヒドロキシ-2E-ノネナール (4HNE) が生成され<sup>31)</sup>、n-3 PUFA が過酸化されると 4-ヒドロキシ-2E-ヘキサナール (4HHE) が生成される<sup>32,33)</sup>。



これらの反応の全てが数秒で起こり、気相中にオゾンが存在する限りオゾンは血漿の水分に溶解し続けて、すぐに反応する。通常、オゾンは 5 分以内に完全に消滅し、わずかな水溶性抗酸化物質の減少と血漿中の活性酸素種および脂質過酸化物の増加を引き起こす。オゾン化された血液は、そのような状態で、患者に注入される。

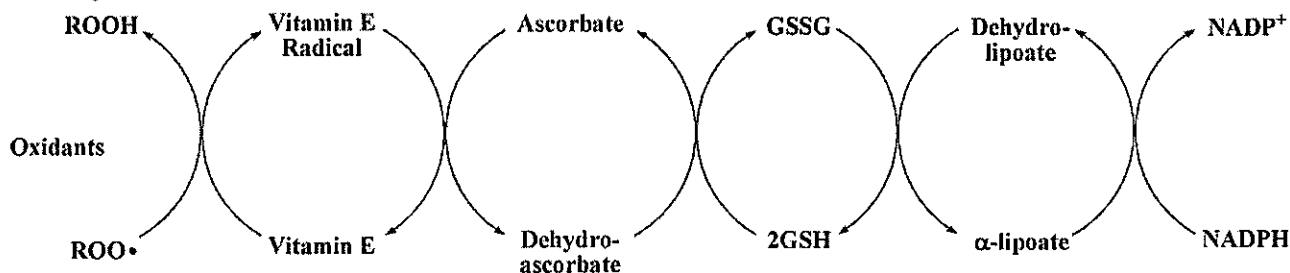


図 1 酸化剤暴露に対する細胞の反応

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、グルタチオン類の還元型と酸化型を示す。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)は主要な電子供与源で、細胞の還元系によって再生する。

## 5. 引用文献

- 1) Xia L., Lenaghan S.C., Zhang M., Zhang Z., Li Q., (2010) Naturally occurring nanoparticles from English ivy: an alternative to metal-based nanoparticles for UV protection. *J Nanobiotechnology*, 8, 12.
- 2) Bell M.L., McDermott A., Zeger S.L., Samet J.M., Dominici F., (2004) Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987-2000. *JAMA*, 292(19), 2372-2378.
- 3) Jerrett M., Burnett R.T., Pope C.A., Ito K., Thurston G., Krewski D., Shi Y., Calle E., Thun M., (2009) Long-term ozone exposure and mortality. *N Engl J Med*, 360(11), 1085-1095.
- 4) Bocci V., Borrelli E., Travagli V., Zanardi I., (2009) The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev*, 29(4), 646-682.
- 5) Bocci V., Di Paolo N., (2009) Oxygen-ozone therapy in medicine: an update. *Blood Purif*, 28(4), 373-376.
- 6) Guven A., Gundogdu G., Vurucu S., Uysal B., Oztas E., Ozturk H., Korkmaz A., (2009) Medical ozone therapy reduces oxidative stress and intestinal damage in an experimental model of necrotizing enterocolitis in neonatal rats. *J Pediatr Surg*, 44(9), 1730-1735.
- 7) Morsy M.D., Hassan W.N., Zalat S.I., (2010) Improvement of renal oxidative stress markers after ozone administration in diabetic nephropathy in rats. *Diabetol Metab Syndr*, 13(2(1)), 29.
- 8) Stepan J., Meaders T., Muto M., Murphy K.J., (2010) A metaanalysis of the effectiveness and

- safety of ozone treatments for herniated lumbar discs. *J Vasc Interv Radiol*, **21**(4), 534-548.
- 9) Demirbag S., Uysal B., Guven A., Cayci T., Ozler M., Ozcan A., Kaldirim U., Surer I., Korkmaz A., (2010) Effects of medical ozone therapy on acetaminophen-induced nephrotoxicity in rats. *Ren Fail*, **32**(4), 493-497.
  - 10) Uysal B., Yasar M., Ersoz N., Coskun O., Kilic A., Cayc T., Kurt B., Oter S., Korkmaz A., Guven A., (2010) Efficacy of hyperbaric oxygen therapy and medical ozone therapy in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas*, **39**(1), 9-15.
  - 11) Di Filippo C., Luongo M., Marfella R., Ferraraccio F., Lettieri B., Capuano A., Rossi F., D'Amico M., (2010) Oxygen/ozone protects the heart from acute myocardial infarction through local increase of eNOS activity and endothelial progenitor cells recruitment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **382**(3), 287-291.
  - 12) Timbrell J., (2005) *The poison paradox: chemicals as friends and foes* Oxford University Press, New York.
  - 13) Olivieri G., Bodycote J., Wolff S., (1984) Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science*, **223**(4636), 594-597.
  - 14) Wolff S., (1996) Aspects of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents. *Mutat Res*, **358**(2), 135-142.
  - 15) Goldman M., (1996) Cancer risk of low-level exposure. *Science*, **271**(5257), 1821-1822.
  - 16) Calabrese E.J., Baldwin L.A., (1998) A general classification of U-shaped dose-response relationships in toxicology and their mechanistic foundations. *Hum Exp Toxicol*, **17**(7), 353-364.
  - 17) Calabrese E.J., Baldwin L.A., (2002) Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol*, **21**(2), 91-97.
  - 18) Calabrese E.J., (2008) Hormesis: principles and applications for pharmacology and toxicology. *Am J Pharm Toxicol*, **3**(1), 56-68.
  - 19) Calabrese E.J., (2010) Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. *Hum Exp Toxicol* **29**(4), 249-261.
  - 20) Bocci V., (2002) *Oxygen-Ozone Therapy: A Critical Evaluation* Dordrecht, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.
  - 21) Bocci V., (2006) Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol Appl Pharmacol*, **216**(3), 493-504.
  - 22) Bocci V., (2007) The case for oxygen-ozonotherapy. *Br J Biomed Sci*, **64**(1), 44-49.
  - 23) Re L., (2008) La terapia con ossigeno-ozono o ozormesi: recenti acquisizioni scientifiche. *Medici & Medici*, **16**, 18-20.
  - 24) Horvath M., Bilitzky L., Huttner J., (1985) *Ozone*, Elsevier, New York.
  - 25) Wolff H.H., (1998) *Das medizinische Ozon. Theoretische Grundlagen, therapeutische, Verlag für Medizin Fischer, Anwendungen Heidelberg.*
  - 26) Bocci V., (2011) *Ozone. A new medical drug*, Dordrecht, Springer, The Netherlands.
  - 27) Aldini G., Gamberoni L., Orioli M., Beretta G., Regazzoni L., Maffei Facino R., Carini M., (2006) Mass spectrometric characterization of covalent modification of human serum albumin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal. *J Mass Spectrom*, **41**(9), 1149-1161.
  - 28) Aldini G., Vistoli G., Regazzoni L., Gamberoni L., Facino R.M., Yamaguchi S., Uchida K., Carini M. (2008) Albumin is the main nucleophilic target of human plasma: a protective role against pro-atherogenic electrophilic reactive carbonyl species? *Chem Res Toxicol*, **21**(4), 824-835.
  - 29) Bocci V., (2006) Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res*, **37**(4), 425-435.
  - 30) Shinriki N., Suzuki T., Takama K., Fukunaga K., Ohgiya S., Kubota K., Miura T., (1998) Susceptibilities of plasma antioxidants and erythrocyte constituents to low levels of ozone. *Haematologia (Budap)*, **29**(3), 229-239.