

## 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 3)

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。

## 2. 血液細胞におけるオゾンの作用とは? (1) 赤血球、(2) 白血球までは前号に紹介]

## 3) 血小板

自家血液オゾン療法を行うと血漿中の PDGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1、IL-8、EGF の濃度がオゾンの用量に依存して増加する。血小板は酸化ストレスに感受性が高いため、急性の酸化ストレスにさらされると、これらのサイトカインを放出する<sup>20)、52)</sup>。循環血液中でこれらの成長因子濃度が上昇すると、糖尿病や末梢動脈疾患に起因する足部の疾患を治癒するうえで有益な効果があるようである。

## 脂質酸化物の多面的な効果

図 2 で示すように、脂質酸化物が産生されると、引き続いて血漿中に存在する多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が過酸化される。そして脂質過酸化ラジカル、アルコキシルラジカル、リポヒドロペルオキシド、F2-イソプロロスタン、アクロレイン、マロンジアルデヒド、ヒドロキシアルケナール、4-ヒドロキシ-2E-ノネナール (4-HNE) および 4-ヒドロキシ-2E-ヘキセナール (4-HHE) など生じる。フリーラジカルとアルデヒドは本質的に有害であるので、それらの産生を低濃度に抑えるために、オゾンを正確に適切に投与することが必要である。

オゾンによって生成するアルデヒド類の中で、4-HNE が最も多く、重要である。4-HNE は両親媒性の分子であり、生理食塩水中の半減期は短い。その一方、4-HNE はアルブミン、酵素、グルタチオン、カルノシンおよびリン脂質のような様々な化合物と反応する<sup>31)、53)</sup>。4-HNE は受容体のあるシグナル伝達物質では無いが、*in vitro* 実験では 1  $\mu$ M 以上の濃度で 70 種類以上の生体分子に結合し、何らかの有害な作用を及ぼすことが報告されている<sup>31)</sup>。他方、オゾンと血液の急速な反応によってヒドロキシアルケナールが生成し、グルタチオンや血液中に豊富に存在するアルブミンと結合しアダクトを生成する。ヒトアルブミンは求核反応基を豊富に有しており、アミノ酸残基 Cys34、Lys199、His146 が 4-HNE と反応して 4-HNE を 9 分子まで消去することができる<sup>27)、28)</sup>。面白いことに、オゾン化されたヒト血漿試料を 37°C で 9 時間温めても、4-HNE はほとんどアルブミンに結合したまま、安定であった<sup>54)</sup>。これらの結果から、体外で血液を適切にオゾン化すると、体内に注入している間、脈管系に障害を与えることが無いことが明らかである。

好氣的生物は、アルデヒドが連続的に生成されるのに耐えられるように、次のような解毒システムを開発した。第一は、ヒトでは 11L 含有する血漿および細胞外液がこれらの生成物を希釈することである。第二は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルドース還元酵素、グルタチオンおよびチオレドキシニンによる解毒反応である<sup>55)、56)</sup>。そして、第三は、胆汁排泄および尿排出である<sup>57~59)</sup>。これらアルケナールの分解経路が存在することは、オゾン化血液中のアルケナールの半減期が 5 分未満であることから明らかにされた<sup>60)</sup>。面白い点は、アルブミンが肝臓から内分泌器官や中枢神経に至る全ての体組織に 4-HNE を輸送するという点である。4-HNE とシステインの結合物は多くの場所で放出され、さまざまな細胞に一過性の急性酸化ストレスを加えて、重要な生化学反応を惹起する。4-HNE は  $\mu$ mol/L または pmol/L レベルでシグナル伝達物質として機能し、 $\gamma$ -グルタミン酸システインリガーゼ、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ、HSP70、ヘムオキシゲナーゼの合成を活性化し、SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼ

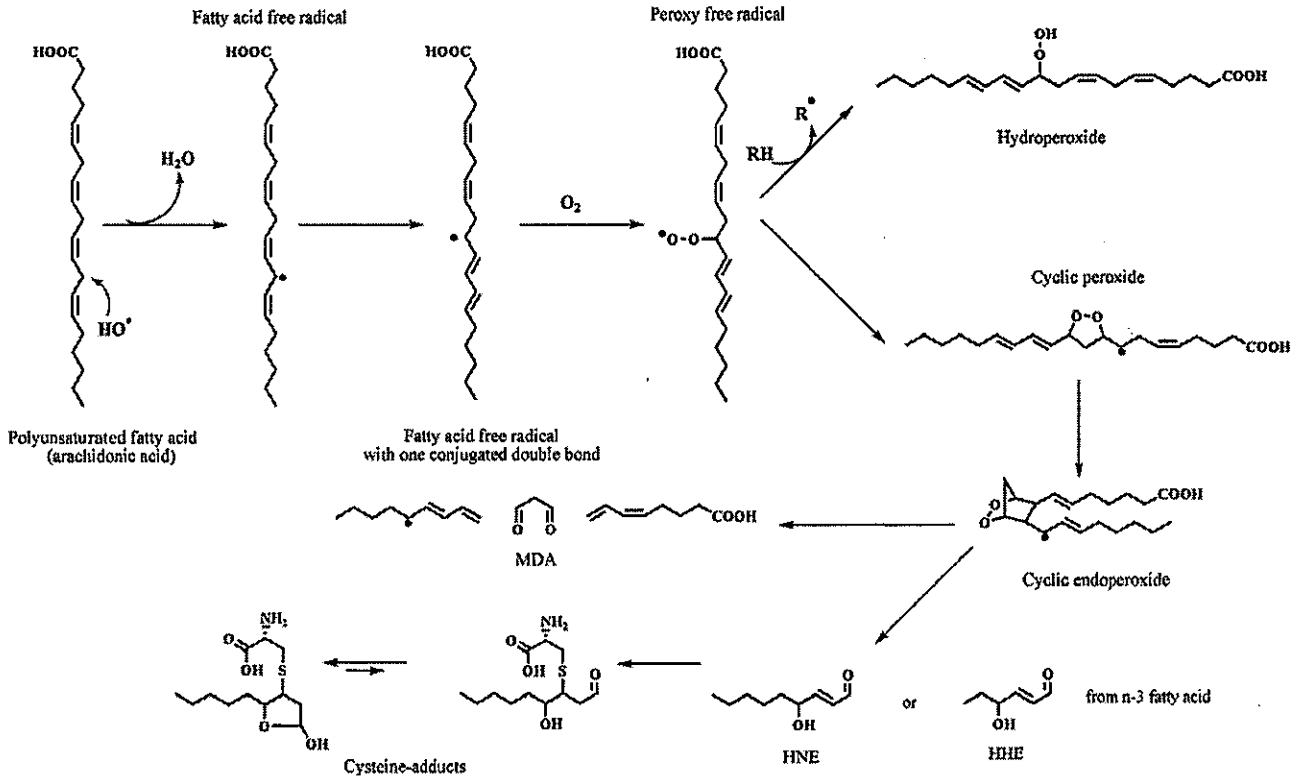


図2 多価不飽和脂肪酸の過酸化反応の一般的なスキーム

アラキドン酸反応の詳細を示す。他の多価不飽和脂肪酸も同様の経路で反応する。

MDA: マロンジアルデヒド、HHE: 4-ヒドロキシ-2E-ヘキセナール、HNE: 4-ヒドロキシ-2E-ノネナール

のような抗酸化酵素の合成を活性化する。また骨髄中の赤血球新生で重要な電子供与体となる G6PDH の産生を活性化する。

小さい酸化ストレスが反復して生じることにより防御分子の誘導が生じることが広く知られている<sup>20, 61~65)</sup>。つまり、正確に制御された酸化ストレスが抗酸化防御を強化するということは良く受け入れられている。繰り返すと、少量のストレスが防御機構を強化するという考えは、ホルミシス効果の概念と一致している。

さらに、オゾン化された血液を注入すると、4-HNE とシステインの付加物は、血管内皮細胞に働いて NO の産生を促進し、NO 自身あるいは反応物のニトロソチオール作用で血管が拡張する<sup>35)</sup>。ヘムオキシゲナーゼ活性によってビリルビンとともに放出される微量の CO も、血管拡張作用を有し、虚血組織の酸素供給を改善する<sup>66)</sup>。H<sub>2</sub>S もまた NO や CO と同様に、微量に放出されて生理的な血管拡張を及ぼす毒性物質である<sup>67, 68)</sup>。さらに、上述の NO、CO、H<sub>2</sub>S と同様に、少量のオゾンが有益な生物反応を誘起するという事も、ホルミシス理論の概念と一致している<sup>69)</sup>。

オゾン療法を行った患者の3分の2において観察されるもう一つの面白い面は、健康と身体エネルギーの感覚である<sup>70)</sup>。これらの感覚がオゾンの作用によってシグナル物質が産生されて内分泌が修飾もしくは改善されることに起因するものかどうか、いまだ不明である。多幸感の原因は酸化状態の改善か、あるいは成長ホルモンや副腎皮質刺激ホルモン、コルチゾール、デヒドロエピアンドロステロンの分泌促進に起因するかもしれない<sup>26, 71)</sup>。激しいダイナミックな運動に観察されるのと同様に、脂質酸化物が視床下部に到達してセロトニンとエンドルフィンの放出を向上させるかもしれない<sup>72)</sup>。

何千回も大量自家血液オゾン療法を行って得られた経験上、主観的にも客観的にも毒性は無いことが明らかである。さらに、治療範囲内のオゾン化によっては血液成分の構造的な障害も酵素的な障害も観察されていない<sup>73, 74)</sup>。その一方、病気の進行した患者に初めてオゾン療法を行うとき、特に高濃度のオゾンを用いた場合は、しばしば非常に疲れて眠いと報告する。これは、Leriche-Fontaine の分類によるステージ III および IV の末梢動脈疾患の患者のおよそ 10%で観察される。そのような知見があることから、オゾン療法では患者の反応を注意深く観察しつつ低濃度から始める必要がある。

## 引用文献

- 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.
- 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 Spectro*, **41**(9),1149-1161.
- 28) Aldini G, Vistoli G, Regazzoni L, Gamberoni L, Facino RM, 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.
- 31) Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. (2008) 4-Hydroxynonenal: membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Re*, **28**(4),569-631.
- 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.
- 52) Valacchi G, Bocci V. (1999) Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediators Inflamm*, **8**(4-5),205-209.
- 53) Petersen DR, Doorn JA. (2004) Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med*, **37**(7),937-945.
- 54) Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Aldinucci C, Silvestri S, Paccagnini E, Gerli R. (1998) Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone. *J Biol Regul Homeost Agents*, **12**(3),67-75.
- 55) Siems W, Grune T. (2003) Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med*, **24**(4-5),167-175.
- 56) Awasthi YC, Ansari GA, Awasthi S. (2005) Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferase. *Methods Enzymol*, **401**,379-407.
- 57) Petras T, Siems W, Grune T. (1995) 4-Hydroxynonenal is degraded to mercapturic acid conjugate in rat kidney. *Free Radic Biol Med*, **19**(5),685-688.
- 58) Alary J, Geuraud F, Cravedi JP. (2003) Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: Disposition and metabolic pathways. *Mol Aspects Med*, **24**(4,5),177-187.
- 59) Jardines D, Correa T, Ledea O, Zamora Z, Rosado A, Molerio J. (2003) Gas chromatography-mass spectrometry profile of urinary organic acids of Wistar rats orally treated with ozonized unsaturated triglycerides and ozonized sunflower oil. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **783**(2),517-525.
- 60) Bocci V. (1996) Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for therapy of human immunodeficiency virus infection and several other diseases. *Med Hypotheses*, **46**(2),150-154.
- 61) Takahashi K, Hara E, Ogawa K, Kimura D, Fujita H, Shibahara S. (1997) Possible implications of the induction of human heme oxygenase-1 by nitric oxide donors. *J Biochem*, **121**(6),1162-1168.
- 62) Dianzani MU. (1998) 4-Hydroxynonenal and cell signalling. *Free Radic Res*, **28**(6),553-560.
- 63) Lin F, Josephs SF, Alexandrescu DT, Ramos F, Bogin V, Gammill V, Dasanu CA, De Necochea-Campion R, Patel AN, Carrier E, Koos DR. (2010) Lasers, stem cells, and COPD. *J Transl Med*, **8**,16.
- 64) Bocci V, Aldinucci C, Mosci F, Carraro F, Valacchi G. (2007) Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. *Mediators Inflamm*, **2007**,26785.
- 65) Chaudhary P, Sharma R, Sharma A, Vatsyayan R, Yadav S, Singhal SS, Rauniyar N, Prokai L, Awasthi S, Awasthi YC. (2010) Mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal induced pro- and anti-apoptotic signaling. *Biochemistry*, **49**(29),6263-6275.
- 66) Taha H, Skrzypek K, Guevara I, Nigisch A, Mustafa S, Grochot-Przeczek A, Ferdek P, Was H, Kotlinowski J, Kozakowska M, Balcerzyk A, Muchova L, Vitek L, Weigel G, Dulak J, Jozkowicz A. (2010) Role of heme oxygenase-1 in human endothelial cells: lesson from the promoter allelic variants.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol, 30(8),1634-1641.
- 67) Wang R. (2002) Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB J, 16(13),1792-1798.
- 68) Nakao A, Sugimoto R, Billiar TR, McCurry KR. (2009) Therapeutic antioxidant medical gas. J Clin Biochem Nutr, 44(1),1-13.
- 69) Calabrese EJ, Stanek EJ, Nascarella MA, Hoffmann GR. (2008) Hormesis predict low-dose responses better than threshold models. Int J Toxicol, 27(5),369-378.
- 70) Bocci V, Zanardi I, Travagli V. (2010) Potentiality of oxygen-ozone therapy to improve the health of aging people. Curr Aging Sci, 3(3), 177-187.
- 71) Michaud K, Matheson K, Kelly O, Anisman H. (2008) Impact of stressors in natural context on release of cortisol in healthy adult humans: a metaanalysis. Stress, 11(3),177-197.
- 72) Viru A, Tendzegolskis Z. (1995) Plasma endorphin species during dynamic exercise in humans. Clin Physiol, 15(1),73-79.
- 73) Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. (2007) A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. Int J Biol Macromol, 41(5),504-511.
- 74) Travagli V, Zanardi I, Bernini P, Nepi S, Tenori L, Bocci V: Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood. Int J Toxicol 2010, 29(2):165-174.

### 日本医療・環境オゾン学会会報投稿規程 (2012年3月)

#### 1. 内容

学会では治療、予防医学、殺菌、衛生等について、オゾンの応用、適用を検討・研究しております。募集原稿はこれらに関する研究や症例研究報告、同紹介、解説(シリーズも可)、文献紹介、情報、寄稿等募集します。

- a. 研究報告：通常の論文スタイル。
- b-1. 臨床報告：臨床治験で、医師・患者などへ情報を伝えたいもの。
- b-2. 研究紹介：環境分野などで啓蒙的に解説的に異分野の会員にも分かりやすく書いたもの。
- c. 臨床速報または速報：臨床治験で、速やかに情報を伝える必要のあるものを臨床速報とします。その他で研究途上でも報告したいものは速報とします。
- d. 解説：上記対象の検討・研究に必要な周辺の解説を含みます。
- e. 文献紹介・総説：通常通り。
- f. 寄稿：所感、会員の交流の場です。内容は自由です。
- g. ひとつこと：編集委員会から依頼します。

#### 2. 原稿の作成

- a. 会報の執筆要領を参考にして下さい。
- b. 編集委員会において、2人以上の査読者が査読します。
- c. 査読意見を参考に再提出された論文は編集委員会において最終決定します。

#### 3. 字数

以下を参照して下さい。1枚の目安は、図表を入れておよそ2000字の計算です。割り付けの段階で増減をお願いすることがあります。

- |              |         |              |                 |
|--------------|---------|--------------|-----------------|
| a. 研究報告      | 1件 4~5枚 | b. 臨床報告・研究紹介 | 1件 2枚以内         |
| c. 臨床速報または速報 | 1件 1枚   | d. 解説        | 1件 2~3枚(シリーズも可) |
| e. 文献紹介      | 1件 1~3枚 | 総説           | 1件 3~4枚         |
| f. 寄稿        | 1件 1~3枚 |              |                 |
| g. ひとつこと     | 600字程度  | h. 質問(Q&A)   | 1件 1枚           |

4. 編集委員会：委員長 三浦敏明、委員：中室克彦、神力就子、日下史章、小阪教由、鷺巣 誠  
村上 弘、扇間昌規、櫻井正太郎、坂崎文俊

#### 5. 事務局(問い合わせ・郵送先)

〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町17-8 摂南大学 理工学部 生命科学科  
編集事務局 中室克彦 TEL/FAX 072-839-8084 メールアドレス (nakamuro@lif.setsunan.ac.jp)