

文献紹介

Ozone Oxidative Postconditioning Efficacy on the Prolapse and Protrusion Phases in Patients with Hernia Disc

椎間板ヘルニア患者の椎間板脱出や突出状態に対する オゾン酸化ポストコンディショニングの効果

Olga Sonia León Fernández⁽¹⁾, Marelis Pantoja⁽¹⁾, Luis Ledesma⁽¹⁾, Renate Viebhan⁽²⁾,
Lamberto Re⁽³⁾, Silvia Menéndez⁽⁴⁾, José L. Calunga⁽⁴⁾

⁽¹⁾Pharmacology Department/Center for Research and Biological Evaluation.,
Pharmacy and Food Institute. University of Havana, Havana City 10 400, Cuba.

⁽²⁾Dr. J Häsler GmbH, Iffezheim, Germany.

⁽³⁾Laboratory of Pharmacology Biotechnology. University of Ancona,
Ancona. Via Ranieri 2 60131, Ancona, Italy.

⁽⁴⁾Ozone Research Center PO Box 6412, Havana City, Cuba.

Proceedings of 19th Ozone World Congress of IOA, Tokyo. Aug 31-Sept 3, 2009

筑波物質情報研究所 神力就子

要旨 椎間板ヘルニア (HD) 患者は過酷な酸化ストレスに曝されている。本研究では、被験患者 33 名に対して、傍脊椎骨にオゾン注射を施療し(Ozone Oxidative Postconditioning, OzoneOxPost)、痛覚強度の変化を調べるとともに、6つのタンパク質損傷マーカーおよび SOD、CAT、GSH などの抗酸化系の血漿濃度を測定した。その結果、酸化ストレスによる機能性タンパク質 (コラーゲン他) の損傷が椎間板の機能性を失わせる初期ステップの 1つであり、そこに荷重または過荷重がかかると椎間板に亀裂が生じ (椎間板症)、ついには脱出や突出へ悪化することが示唆された。OzoneOxPost は細胞酸化還元バランスの レギュレーター であり、必須タンパク質の酸化的損傷を 防止 することによって椎間板の正常な構造・機能を 維持 する。

キーワード: オゾン酸化ポストコンディショニング、椎間板ヘルニア

はじめに

腰痛 (LBP) には急性と慢性がある。慢性腰痛は工業化された社会では最も治療費のかかる良性疾患であり、45 才以下の人々の運動機能障害の主な原因である。この疾患は生物学的・心理的・社会的要因で発症する症候群の 1つと定義されているが、心理的及び社会的側面に比べ生物学的な発症要因についてはあまり明らかになっていない [1]。

椎間板ヘルニア (HD) は長期的には脊椎機能の損傷によって意志通りの動作ができなくなり (進行性の無能力化)、ついには運動機能を消失することになる。[1]。

LBP の引き起こす病理的過程と微細構造の欠陥についての知見は増加しているものの、生体力学 (バイオメカニクス) および椎間板変性と腰痛との関連については論争中であり、まだほとんど分かっていない [2]。

オゾン療法は HD に有効な治療法として広く用いられており、有効性の理由についても幾つかの説がある [3]。たとえば、HD の発症には構造タンパク質 (コラーゲン、オステオネクチン、他 [4]) の損傷が関係

しているとする仮説である。酸化ストレスは、タンパク質のカルボニル化、糖化、過酸化などにより、タンパク質損傷を促進させると考えられる [5、6]。これらの背景をもとに本研究は以下の点を明らかにする目的で行った。

- ・オゾン酸化ポストコンディショニング (OzoneOxPost) は HD の脱出や突出した状態の病的酸化ストレスを緩和し、タンパク質を酸化的損傷から保護するのか？
- ・タンパク質の酸化的損傷と腰痛との間に関連性があるか？

実験方法

この無作為抽出臨床試験は、所属機関に設置された科学倫理委員会により、ヘルシンキ宣言 (1997) に基づいて承認された。

被験患者

異なった民族出身の成人男女で、コンピューター断層撮影法、核磁気共鳴画像 (MRI) 法および臨床評価法により HD と診断された患者が本研究の被験者として選ばれた。ただし、妊婦、精神障害者、酸化ストレス関連の疾患保持者および現在/過去に抗酸化的薬剤を投与された患者は除外した。被験サンプルのサイズの計算には Medstat System (医学統計システム、version 2.1, 1989) を用いた。被験者数は 33 名である。

投与方法と評価項目

被験患者の傍脊椎骨にオゾンを週 2 回注入 (20 セッションを 1 サイクル) した (オゾン発生装置: OZOMED Equipment, Cuba)。1 サイクルの総オゾン量は 3~8mg で段階的に増やしながら注入した。

主な評価項目は以下の通りである:

〈一次評価項目〉 痛みの知覚度(痛覚強度)

最小痛覚強度 “1” から最大痛覚強度 “10” までに分類し、いかなる痛みも感じない場合を “0” とした。

〈二次評価項目〉 以下の化合物の血漿中濃度等

- ・ホスホリパーゼ A (PLA): 炎症性エイコサノイドの指標。
- ・総ヒドロペルオキシド(OPT): 生体高分子の損傷を促進し、フリーラジカル前駆体となる ROS (活性酸素種) の生成指標。(訳注: 官能基-OOH をもつ化合物の総称、過酸化水素はその 1 つ)
- ・マロンジアルデヒド(MDA): 脂質過酸化のマーカーとしての高度酸化能の指標。
- ・フルクトリシン (fructolysine) とタンパク質高度酸化反応生成物(AOPP): タンパク質損傷の指標。
- ・さらに内在性抗酸化系のメンバーとしての還元型グルタチオン (GSH) とスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) およびカタラーゼ (CAT) [5、6]。

表 1 椎間板ヘルニア被験者の臨床像

被験者統計データ	人数	割合(%)
男性	18/33	54.5
女性	15/33	45.5
年齢	43±11	
これまで受けた治療(非ステロイド系抗炎症薬)	8/33	24
これまで手術を受けた人	0名	
発症後の期間 < 3年	20/33	60.6
> 3年	13/33	39.4
HD 重症度 脱出	17/33	51.5
突出	16/33	48.5
腰椎椎間板ヘルニア (L5-S1)	21/33	64

治療効果の評価

被験患者の診察後及び OzoneOxPost 前後に、痛覚強度が Backill Scale [7] で記録され、酸化還元パラメーターが測定された。

〈治療効果あり (プラス変化)〉

OzoneOxPost 後、70%以上の患者では痛みが 30%以上減少し、二次評価項目の酸化還元パラメーターも 70%あるいはそれ以上の患者で有意 (p<0.05) に、基準値方向に移行するか、基準値範囲に戻った。

(治療効果なし)

OzoneOxPost を行った患者の 30%以上で痛みの程度が改善しなかった (痛覚強度の減少が 30%以下)。

統計処理

データは平均値±SEM (訳注: standard error of the mean;平均標準誤差) で表した。グループ間の平均値の比較は one-way analysis of variance 法 (訳注: 一元配置分散分析) を用いて行った。グループ間の有意差検定は Student's t test により行い、5%レベル (p<0.05) を有意差ありと判定した。

結果と考察

被験者の臨床像は表 1 に記されている。平均年齢は 43 才であり、性別による HD (脱出と突出) の重症度に差は認められなかった。病気発症から 3 年未満の被験者が 3 年以上の人より多かった。

表 2 椎間板ヘルニア患者のタンパク質損傷性、抗酸化性酸化還元マーカーおよび OzoneOxPost 後の応答性

酸化還元マーカー [基準値範囲]	OzoneOxPostへの 応答 (**) あり (73%)		OzoneOxPostへの 応答なし (27%)	
	治療前	治療後	治療前	治療後
損傷マーカー				
MDA (μM) [0.78-1.54] ^a	2.96±0.5 ^{b,#}	1.23±0.14	1.19±0.45	0.88±0.55
PP (μM) [3.42-5.42] ^a	11.49±4.5 ^{b,#}	3.79±0.24	12±8.3	14.7±10
AOPP (μM) [2.48-10.88] ^a	88.31±17.4 ^{b,#}	38.44±7.4	39.8±15	87.5±22
OPT (μM) [9.82-13.88] ^a	104.5±10.8 ^{b,#}	52.2±7.5	81.9±16.5	101±16.8
PLA (U/L/min) [6128-6658] ^a	11937±1035 ^{b,#}	9085±763	851±454	10708±742
フルクトリシン (*) [0.14-0.15] ^a	0.19±0.01 ^{b,#}	0.15±0.01	0.16±0.01 [#]	0.21±0.02
抗酸化物質による防御				
SOD (U/L/min) [4.36-11.56] ^a	43.8±10.4 ^{b,#}	14±2.5	5.9±2 ^a	30.4±7.6
CAT (U/L/min) [336-730] ^a	848±14 ^{a,#}	486±106	N.D.	N.D.
GSH (μM) [1181.6-1436] ^a	1727±54 ^{b,#}	1554±29	153±32 ^a	1615±37

数値は血漿中濃度: 平均値 ± SEM。ND は検出可能値以下のレベル。

略号の説明: MDA (マロンジアルデヒド)、PP (Potential Peroxidation 過酸化能)、AOPP (Advanced Oxidation Protein Products タンパク質高度酸化生成物)、OPT (Total Organo-peroxides、全有機過酸化物)、PLA (ホスホリパーゼ A₂)、SOD (スーパーオキシドジスムターゼ)、CAT (カタラーゼ)、GSH (還元型グルタチオン)。

(*) : 吸光度の相対値。

(**) : “OzoneOxPost への応答あり” は酸化還元パラメーターが治療終了後に基準値に近づくか、基準値内に入るかを意味する。

各数値: 平均値 ± SEM。ND: 検出可能値以下のレベル。

上付文字(b): “基準値範囲(a)” と “OzoneOxPost 前の値” との間に有意差 (p<0.05) があることを示す。

: “Response to” と “No Response” の両グループの各パラメーターで “OzoneOxPost 前後” で少なくとも有意差 (p<0.05) がある。

(**) : “応答あり” と “応答なし” の両グループにおいて、OzoneOxPost 前後のパラメーター値間に少なくとも p<0.05 の有意差があることを示す。(原文にないので、消しますか)

被験者の細胞酸化還元バランス (redox balance) を表 2 に示した。治療前の 9 種の酸化還元パラメーターは、カタラーゼ値(CAT)を除く 8 種のすべてが基準値より増加していた。治療による主要な変化はタンパ

ク質損傷 (AOPP)、OPT (総ヒドロペルオキシド) と SOD 活性 (H_2O_2 を生成する) などにみられた。

これらの結果はHD患者が重度の酸化ストレスを受けていたことを示している。一方、GSH や CAT などの抗酸化系はHDにおける ROS (活性酸素種) の過剰生成を防ぐことはできなかった。またタンパク質の著しい損傷 (AOPP とフルクトリシン含量) と脂質過酸化 (MDA と PP) の亢進が示された。MDA はタンパク質 (コラーゲンなど) 中のリシン残基と付加体を形成する。これらの変形タンパク質は組織損傷を引き起こすとともに、変形タンパク質の構造と機能に影響を及ぼすことによって病的細胞応答を増加させる。さらに、OPT が顕著に増加したが、OPT はコラーゲンの架橋 (クロスリンク) に関与しているタンパク質の機能に必須な SH 基を酸化する。このような酸化はコラーゲンの安定性と固さを減少させると考えられる。コラーゲンは細胞外マトリックスの主要構成成分であり、椎間板周辺部の 40-60%、中心部の 10-15% を占める。

椎間板のクッション機能は線維輪の弾力性と髄核の適度な水和に依存している。これらはいずれもタンパク質構造の、主にコラーゲンの、正常性に依存している。

HDにおける炎症の進行とタンパク質損傷には酸化ストレスが関わっていることが明らかにされてきたが、このことは、「オゾンによる酸化的プレ/ポストコンディショニングで細胞酸化還元バランスが調節できる」という周知のメカニズムを考慮すると [5、6]、オゾン療法が神経性障害に有効であることを科学的に支持するものである。

表 2 に示しているように OzoneOxPost 後には、タンパク質などの損傷やその防護に関連する酸化還元マーカーの多くが 73% の被験患者において回復した。強調しておくべきことは、オゾン投与に対して応答しなかった被験者群 (27%) では酸化還元マーカーの有意な変化や酸化ストレスの有意な増加がみられなかったことである。例外はHDに関連するタンパク質損傷に決定的と考えられているフルクトリシン濃度の増加だけである。

痛みはHD患者の生活の質に係わる、より決定的なサインである。図 1 に OzoneOxPost 前後の被験者の痛覚強度を示した。73% の被験者ではオゾン治療後に痛覚強度が 41% 減少した (表 3)。これらの結果は臨床試験における効果の評価基準を満たしている。

椎間板損傷重症度の異なった患者の酸化還元バランスに対する OzoneOxPost の効果を調べるために、患者を病態 (脱出と突起) によってグループ分けして治験した。

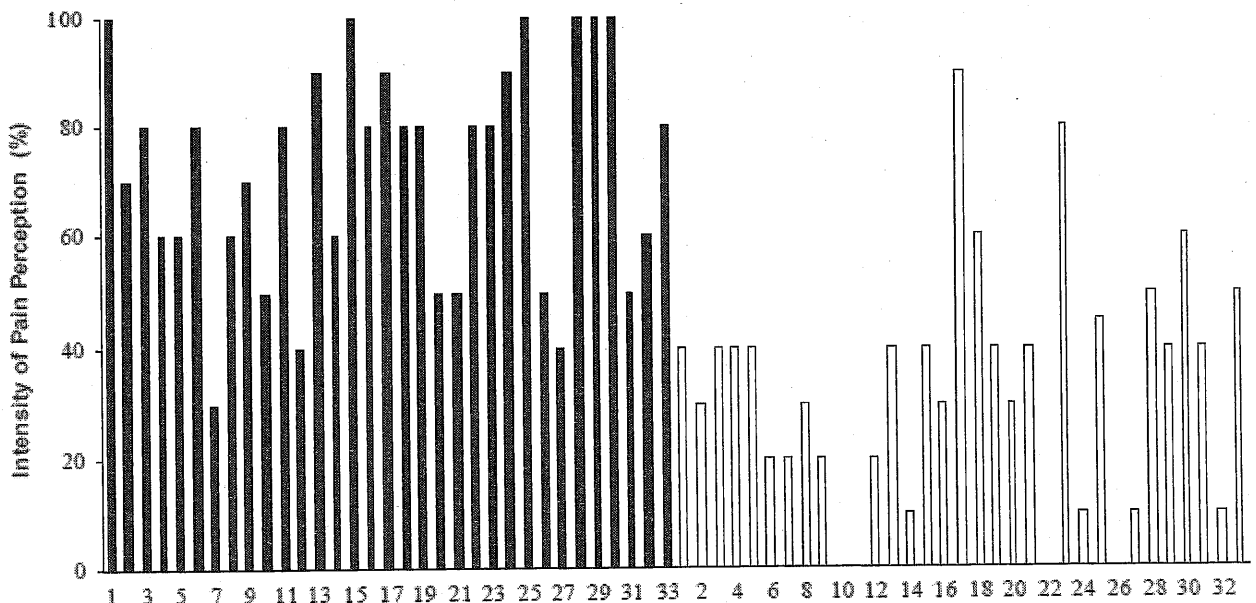


図 1 治験椎間板ヘルニア患者 33 人の痛覚強度 (%)
OzoneOxPost 前 (黒色 33 本) と OzoneOxPost 後 (白色 33 本)

表 3 OzoneOxPost 前後の椎間板ヘルニア患者の痛み平均スコア

	OzoneOxPost前	OzoneOxPost後	痛みの減少(%)
痛みのスコア	74.3 ± 3.5 ^(a)	33.4 ± 3.9 ^(b)	41

数値は平均値 ± SEM。(a、b)は有意差 (p<0.05) があることを示す。

表 4 に HD 患者血漿中の酸化還元マーカー値を示した。病態が「脱出」の患者の 40% 以上で細胞酸化還元バランスが改善し、「突出」の場合は 30% 以上の患者で改善した。

タンパク質損傷のマーカーである AOPP とフルクトリシン値は、「脱出」および「突出」のいずれの患者においても、OzoneOxPost 後に減少した。MDA と OPT はタンパク質の架橋と酸化を促進するが、これらの数値も減少した。このような結果に対応して、内在性抗酸化システムもまた改善された。

痛覚強度と Backill Scale (注：腰痛のため困難な種々の動作を数値化したスケール) で評価される生活の質は臨床効果の指標である。そこで、HD 患者の痛覚強度と酸化還元状態の間に何らかの相関があるどうかを検討した。

表 4 脱出および突出状態の椎間板ヘルニア患者の酸化還元バランス

酸化還元マーカー [基準値範囲]	脱 出			突 出		
	%(*)	治療前	治療後	%(*)	治療前	治療後
損 傷 マ ー カ ー						
MDA (μM) [0.78-1.54]	47	2.09 ± 0.7 ^a	0.89 ± 0.14 ^b	53	2.39 ± 0.5 ^a	1.06 ± 0.2 ^b
PP (μM) [3.42-5.42]	54	9.15 ± 6.4 ^a	3.6 ± 0.32 ^b	46	14.96 ± 7 ^a	3.87 ± 0.4 ^b
AOPP (μM) [2.48-10.88]	47	112 ± 36.3 ^a	34 ± 9 ^b	53	64.8 ± 16 ^a	35.5 ± 7.6 ^b
OPT (μM) [9.82-13.88]	67	104 ± 13.25 ^a	60.8 ± 9.2 ^b	33	103.9 ± 22 ^a	39.3 ± 13 ^b
PLA (U/L/min) [6128-6658]	73	11116 ± 1371 ^a	8531 ± 791 ^a	27	14477 ± 131 ^a	11250 ± 1874 ^a
フルクトリシン(**) [0.14-0.15]	40	0.15 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.01 ^a	60	0.16 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.01 ^b
抗 酸 化 系						
SOD (U/L/min) [4.36-11.56]	65	32.93 ± 5.12 ^a	15 ± 3.67 ^b	35	28.77 ± 6.2 ^a	7.56 ± 1.5 ^b
CAT (U/L/min) [336-730]	71	538 ± 145 ^a	490 ± 105 ^a	29	974 ± 99 ^a	243 ± 0.00 ^b
GSH (μM) [1181.6-1436]	62	1808 ± 116 ^a	1504 ± 68 ^b	38	1748 ± 64 ^a	1550 ± 26 ^b

各数値：平均値 ± SEM。

略号の意味は表 2 と同じ。

(*) : OzoneOxPost 後、各パラメーターが基準値範囲に向けて改善したか、または基準値内に入った患者の割合

(**) : 吸光度の相対値。

上付文字：上付文字が a から b になった数値は傍脊椎骨のオゾン治療によって酸化還元マーカー値が有意 (p<0.05) に変化したことを示している。(文章は変えてないが、位置を変えた。)

その結果 (表 5)、Backill 項目と痛みの間には有意な逆相関があった (p<0.05)。タンパク質損傷マーカーである酸化還元パラメーターと Backill 項目の間にもほぼ同じ値の相関係数が得られた。したがって、動作・行動に伴う痛みと酸化還元パラメーターの間には相関性がある。これらは以下のことを意味している：

- (1) 血漿中 OPT が増加すると、痛みが増し、重い物の持ち上げが困難になる。
- (2) 痛みの増加は歩行能を低下させるが、その低下の度合いは、痛覚強度、MDA、AOPP/フルクトリシン比および OPT/SOD 比の上昇ともに増大する。

表5 腰痛関連項目、痛みおよび酸化還元変数間のノンパラメトリック相関

腰痛を伴う動作・行動	痛みと酸化還元マーカー	動作・行動との相関係数
重いものを持ち上げる	痛み	-0.37
	OPT	-0.33
歩く	痛み	-0.50
	MDA	-0.41
	AOPP/フルクトリシン	-0.38
	OPT/SOD	-0.43
旅行する	痛み	-0.47
	OPT	-0.37
	OPT/SOD	-0.38
30分間座る	AOPP/フルクトリシン	-0.37
低い椅子から立ち上がる	痛み	-0.32
	MDA	-0.38
	AOPP	-0.32
	OPT	-0.42
	AOPP/フルクトリシン	-0.32
	OPT/SOD	-0.33

Sperman's "R" > 0.31 のとき p < 0.05 である。

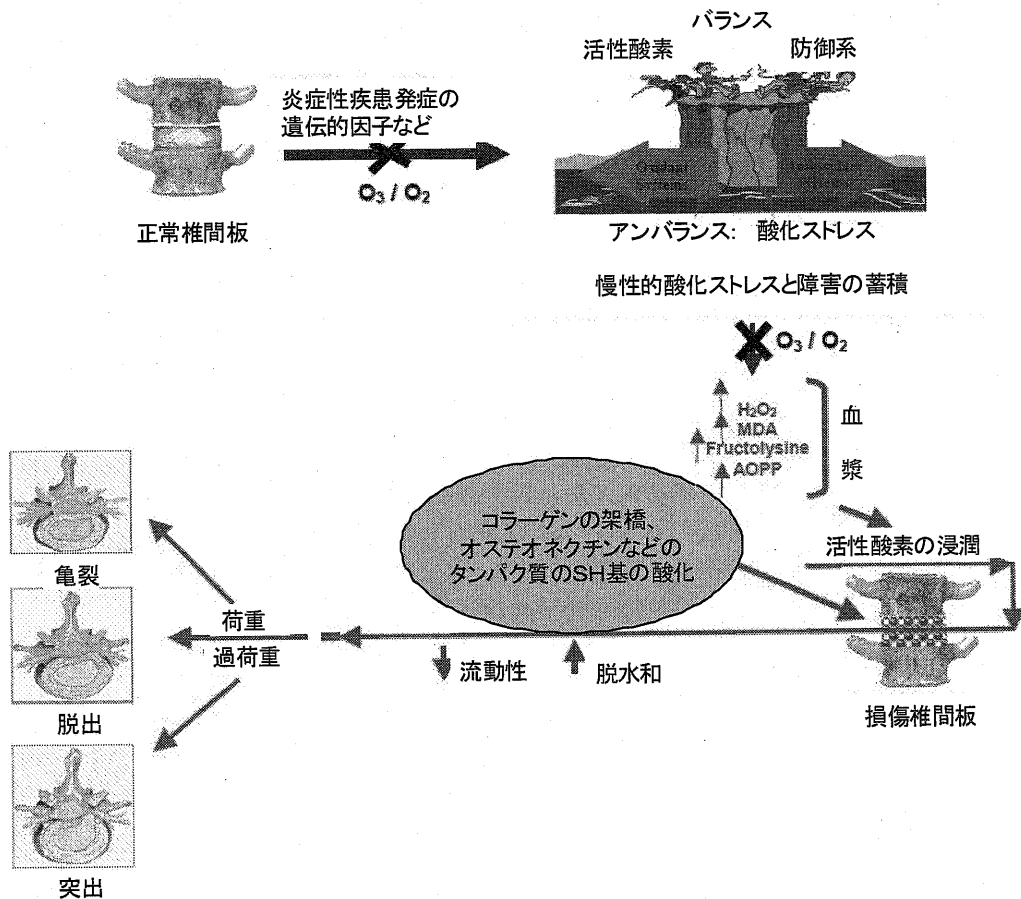


図2 ROSによる脊椎骨間板の損傷とOzoneOxPostによる防御効果のメカニズムの提案

×：オゾン療法によってROSによる脊椎骨間板の損傷をブロックし防御することを示す。

以上の結果を総合すると、タンパク質の損傷がHDに至る必須のステップであると考えられる。そこで我々は図2に示すようなメカニズムを提案する。

OzoneOxPost はその効果を、HDに至る病理カスケードの種々の過程で発揮していると考えられる。脊椎骨間板の正常化に必須なタンパク質は ROS によって損傷されるが、我々の実験では、OzoneOxPost は患者血漿中の細胞酸化還元バランス (主に H₂O₂、MDA、フルクトリシン、AOPP) を制御することによって ROS の浸潤を減少させ、その効果を発揮していることが示された。別の病気に対してオゾン療法を行った場合でも慢性的酸化ストレスのリスクが軽減されているが、これは同時に椎間板機能の保護に寄与していることになる。

まとめ

HD患者は過酷な酸化ストレスに曝されている。本研究結果は、このストレスによる機能性タンパク質 (コラーゲン他) の損傷が椎間板の機能性を失わせる初期ステップの1つであり、そこに荷重または過荷重がかかると椎間板に亀裂が生じ (椎間板症)、ついには「脱出」や「突出」へ悪化することを示唆している。OzoneOxPost は細胞酸化還元バランスのレギュレーターであり、必須タンパク質の酸化的損傷を**防止**し、椎間板の正常な構造・機能を**維持**する。

訳者註：オゾン投与の詳細を Prof.O.S.L.Fernández から以下のように得た。

治療期間：1 サイクル 20 回の注射、週 2 回につき 10 週かかる。

注射位置：ヘルニア椎間板に対応する傍脊椎骨筋肉に、棘状突起の両サイドに 2 cm 深さに注射。

オゾン濃度：20 μg/mL, 量：10mL/1ヶ所、1回につきオゾン量計 400 μg。

投与量：1 サイクルで 3~8 mg の使用量で最大で 8mg である。患者の状況にあわせて徐々に濃度を上げる。

20 μg/mL は高濃度に見えるかもしれないが、局所麻酔はしない。患者には痛みはない。

表中文言の註： Before：血液サンプルは開始時、12 時間絶食後に静脈採血

After：20 回注射 (1 サイクル) の後、最後のオゾン注射後 24 時間経て静脈採血。

コントロールグループ：これまでに腰痛症状はなかった健康な被験者、65 名。年齢、性別、人種は患者に対応している。

訳者・査読者感想：本稿は国際会議のプロシーディングスであるため、簡単に言えばデータなどが不十分であると感じる。しかし、研究の意義は十分あると考え、筆者の原稿を忠実に翻訳した。治療条件を筆者に直接確認し、上記のように明らかにした。是非、このような研究が日本でもなされることを期待している。

文 献

- [1] Saggini R., Cancell F., Di Bonaventura R., Bellomo G., Pezzatini A., Carriel R., 2004. Efficacy of two microgravitational protocols to treat chronic low back pain associated with discal lesions; a randomized controlled trial. *Eur. Med. Phys.* 40: 311-316.
- [2] Iatridis J. M., Mc aclean, Roughley P. J, Alini M., 2006. Effects of mechanical loading on intervertebral disc metabolism *in vivo*. *The J. of Bone and Joint Surgery*: 41-46.
- [3] Cosma F Andreula, Luigi Simonetti, Fabio de Sautis, 2003. Minimally Invasive Oxygen-Ozone Therapy for Lumbar Disk Herniation. *Am. J. Of Neuroradiology* 24: 996-1000.
- [4] Gruber H. E., Ingran J. A., Leslie K., Hanley E. N., 2004. Cellular but not matrix, immunolocalization of SPARC in the human intervertebral disc: decreasing localization with aging and disc degeneration. *Spine* 29: 2223-2228.
- [5] Martínez Sánchez G., Al-Dalain S. M., Menéndez S., Gueliani A., Candelario-Jalil E., Alvarez H., Fdez-Montequín J. F., León O. S., 2005. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur. J. Pharmacol.* 523: 151-161.
- [6] Olga S León Fernández, HH Ajamieh, J Berlanga, S Menéndez, Renate Viebhan HÁnsler, L Re, AM Carmona, 2008. Ozone Oxidative Preconditioning is mediated by A₁ Adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/reperfusion. *Transplant International* 21: 39-48.

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。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。