

## ●原 著

## 酸素中毒と血漿 Hydroxyl Radical の変動について

中山 徹\* 三宅修司\* 高野尚志\*  
土井庸正\*\* 芝山正治\*\* 秋場 仁\*\*  
真野喜洋\*\*

酸素中毒発生の指標を検討する目的で、ウサギを100%及び50%の高濃度酸素暴露し、血漿中の Hydroxyl Radical ( $\cdot\text{OH}$ ), GSH peroxidase (GPX), Lipoperoxide (MDA), 赤血球中の SOD につき 12 hr 毎に経時的に、死亡又は 156 hr まで検討した。

$\cdot\text{OH}$  は電子磁気共鳴法により測定したが、酸素暴露で大きく変動した。GPX については50%酸素暴露群に比し100%酸素暴露群で値の上昇する傾向が認められ、Hydrogen peroxide 発生量の増大が推測された。MDA に関しては100%酸素暴露群のみで値の上昇する傾向が認められた。赤血球 SOD に関しては酸素暴露による有意の変化を認めなかった。 $\cdot\text{OH}$  の変動の機序は明らかではないが、その解明により  $\cdot\text{OH}$  の測定が酸素中毒の発症の予防及び酸素治療の指標となり得る事が示唆された。

キーワード：ヒドロキシル基，グルタチオンパーオキシダーゼ，過酸化脂質，スピントラッピング，スーパーオキシドジスムターゼ

### Relation between oxygen toxicity and hydroxyl radical in plasma

Toru Nakayama\*, Syuji Miyake\*, Naoshi Takano\*, Nobumasa Doi\*\*, Masaharu Shibayama\*\*, Chikashi Akiba\*\* and Yoshihiro Mano\*\*

\*Department of Internal Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo

\*\*Department of Public Health, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo

The purpose of this study is to evaluate the characteristics of oxygen toxicity. Rabbits were exposed to 50 or 100% oxygen and blood samples were obtained every twelve hours until 156 hours or death. Examined parameters were; Hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) production, GSH peroxidase (GPX), lipoperoxidase (MDA) in plasma and superoxide dismutase (SOD) in RBC.  $\cdot\text{OH}$  production varied considerably by oxygen exposures which was

measured by electron spin resonance method. GPX increased more in the group which was exposed to 100% oxygen than those exposed to 50% oxygen. This result suggested that there could be possible increase of hydrogen peroxide. Plasma MDA increased only in those exposed to 100% oxygen, but SOD in RBC did not change significantly.

The real mechanism of  $\cdot\text{OH}$  change was not clear, however,  $\cdot\text{OH}$  could be one of the indexes to predict oxygen toxicity. (author's abstract)

### Keywords:

Hydroxyl Radical  
GSH peroxide  
Lipoperoxide  
Spin trapping  
SOD

### はじめに

临床上患者の呼吸管理に酸素を使用する機会が多い。高濃度酸素による酸素中毒の危険性は従来より知られているが、患者の  $\text{PaO}_2$  低下の為にや

\*東京医科歯科大学医学部第一内科学教室

\*\*東京医科歯科大学医学部公衆衛生学教室

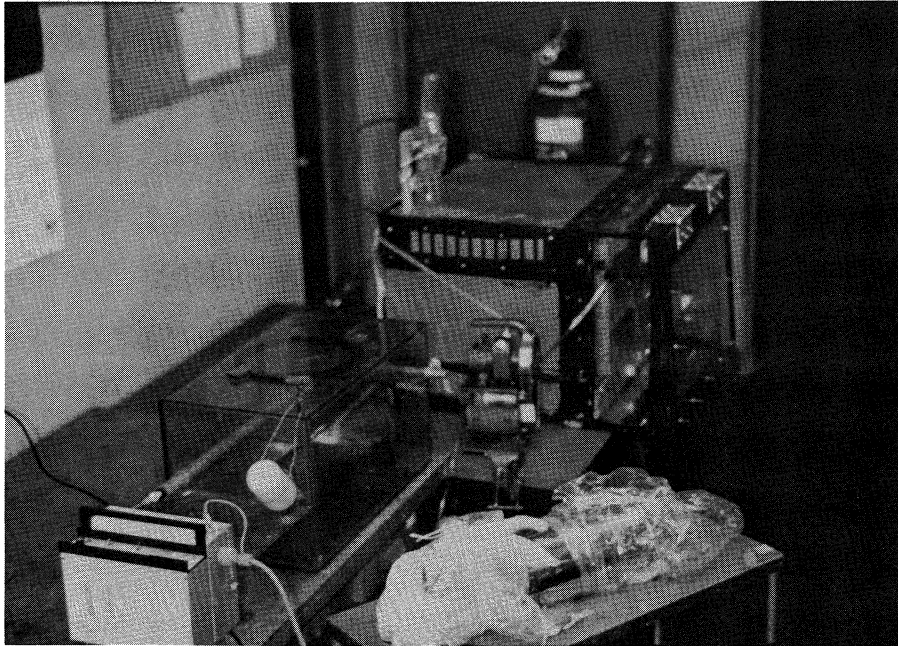


Fig. 1 Oxygen exposure chamber

むなく高濃度酸素を使用せざるをえない場合がある。また ARDS (adult respiratory distress syndrome) のごとく酸素中毒がその一因と考えられている疾患もある。酸素中毒発生の危険性を予知する指標はまだ知られていないが、そのメカニズムには Free Radical の関与が考えられている<sup>1)</sup>。酸素中毒発生の指標を検討する目的でウサギに高濃度酸素暴露を行い、血漿中の hydroxyl radical, GSH peroxidase, lipoperoxide 及び赤血球中の superoxide dismutase (SOD) につき経時的に測定し検討した。

#### 実験方法

被験動物のウサギ(日本白色種, ♂, 2.0~3.0kg) 15羽に対して高濃度酸素暴露実験を行った。3群に分けて A 群 8羽に対しては 100% 酸素暴露を行い、B 群 3羽には 50% 酸素暴露を行った。C 群は control 群として全経過を follow する目的で 4羽を酸素暴露群と同じ方法で 156hr 大気圧空気下における観察を行った。酸素暴露群はまず room air ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) 下で 12hr 毎に 4 回の control 採血を行った後(採血はすべてヘパリン採血), アルミ製(扉はアクリル製)酸素暴露用飼育室内で 100% 又

は 50% 酸素に暴露し, 12hr 毎に採血し, その血漿及び赤血球を検体とした。飼育室内の酸素濃度は 100% 及び 50% 酸素を暴露中それぞれ  $99 \pm 1\%$  及び  $50 \pm 3\%$  に保った。炭酸ガス濃度は 1% 以下に維持した。Fig. 1 中の奥の箱が酸素暴露用飼育箱で, 採血時ウサギは写真のように固定器で固定し, 耳のみ外に出し頭側及び尾側をビニール袋で覆い, 酸素暴露を行いつつ耳静脈より採血した。血液は採血後直ちに氷冷した真空採血管に注入し,  $4^\circ\text{C}$ , 2000rpm で遠沈し血漿は 2ml 用真空採血管に入れた。赤血球は生理食塩水で 3 回洗浄後蒸留水で溶血させ, ethanol と chloroform で処理後遠沈し上清をとった。両者とも測定まで  $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存した。酸素非暴露の C 群についても同様に採血を行った。

Hydroxyl Radical の測定には 5,5-dimethyl-N-oxide (DMPO) を使用した spin trapping 法を用いた。日本電子 KK 製 ESR 測定装置 JES FE2XG を用いた。DMPO  $20\mu\text{l}$  と血漿  $200\mu\text{l}$  とを混合後 30sec で測定した。測定条件は Field  $3350\text{G} \pm 50\text{G}$ , Sweep time 30sec。Hydroxyl Radical 値としては DMPO-OH の ESR spectrum の 4 本線の内側 2 本の線高の平均値を内部

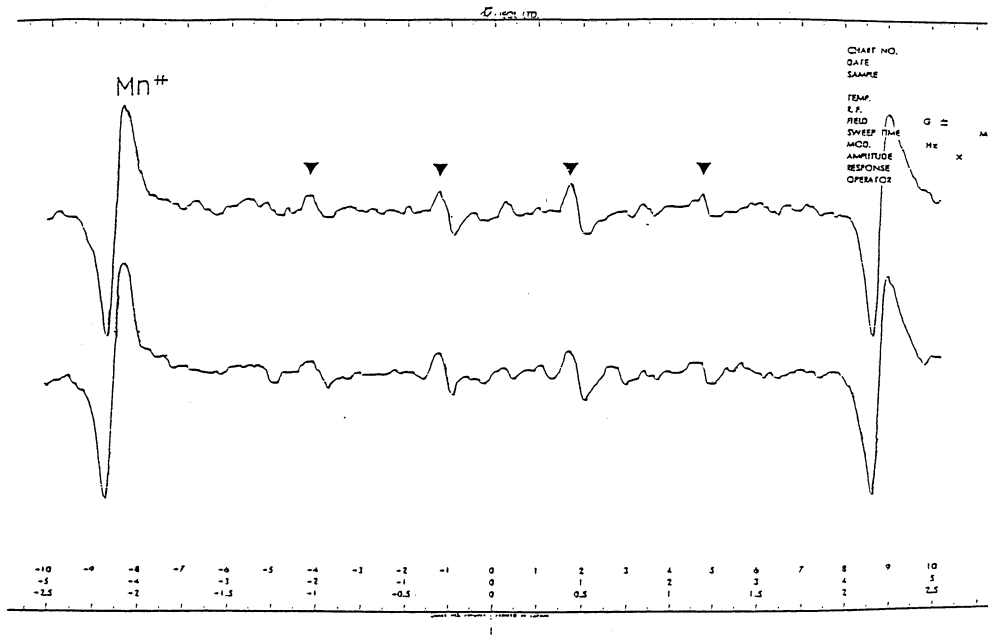


Fig. 2 ESR spectra of DMPO-OH

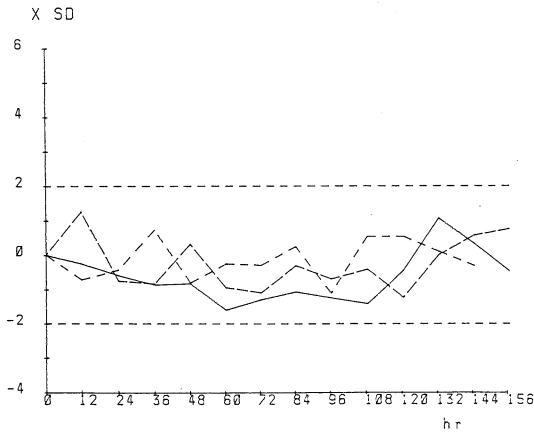


Fig. 3 Hydroxyl radical variation of control in air

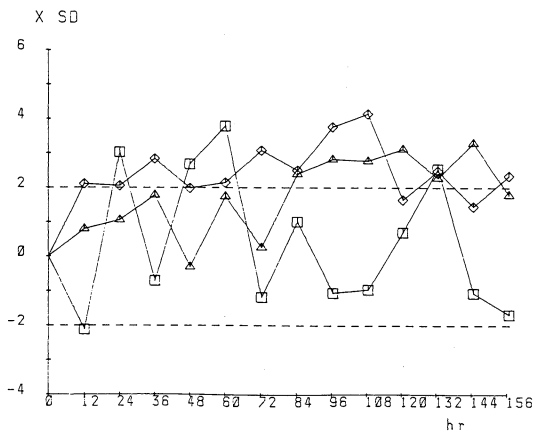


Fig. 4 Hydroxyl radical variation of 50% O<sub>2</sub> exposure group

標準の Mn の線高で除した値を Hydroxyl Radical 値とした (Fig. 2)。その値の酸素暴露後の変動は個々のウサギにつき酸素暴露前の 4 時点の control data の SD を以後のそのウサギの変動幅の基準として解析した。

GSH peroxide は Paglia 及び Valentine の方法で<sup>2)</sup>, Lipoperoxide は 八木法で<sup>3)</sup>, SOD は Fridovich の方法で<sup>4)</sup>測定した。

但し全項目を測定出来なかった個体もあった。

肺の肉眼的, 組織学的検討を行う為, 100%酸素暴露ウサギは死亡後速やかに, また50%酸素暴露ウサギ及び control ウサギはネンブータル静注で薬殺し, 経気管的に肺に緩衝ホルマリンを注入し固定した後解剖した。

### 結 果

100%酸素暴露でウサギは暴露後 144hr 以内に全例 (n = 8) 死亡した。酸素非暴露群 (n = 4)

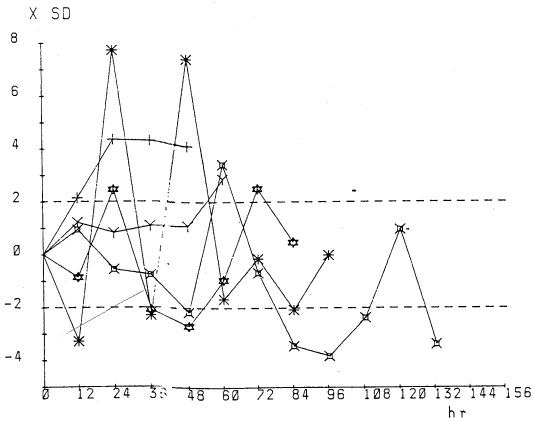


Fig. 5 Hydroxyl radical variation of 100% O<sub>2</sub> exposure group

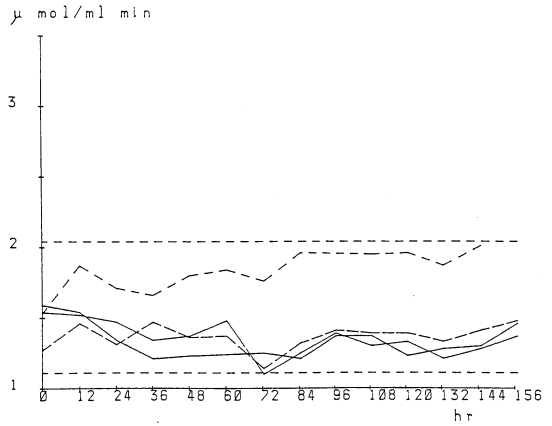


Fig. 6 GSH peroxidase of control in air

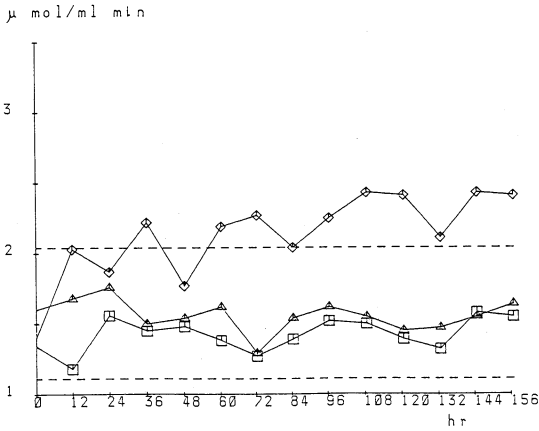


Fig. 7 GSH peroxidase of 50% O<sub>2</sub> exposure group

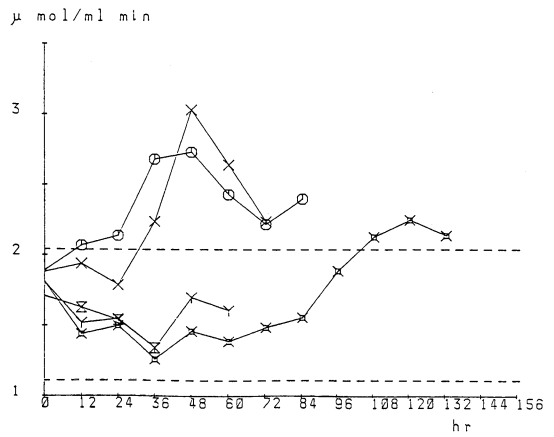


Fig. 8 GSH peroxidase of 100% O<sub>2</sub> exposure group

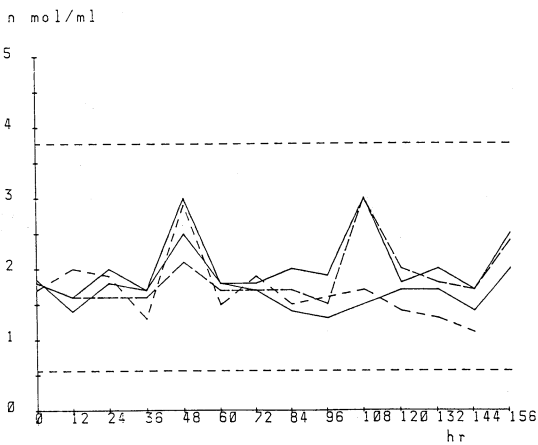


Fig. 9 Liperoxide of control in air

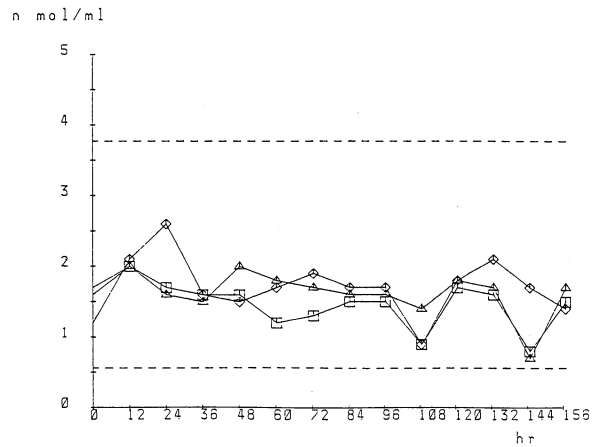


Fig. 10 Liperoxide of 50% O<sub>2</sub> exposure group

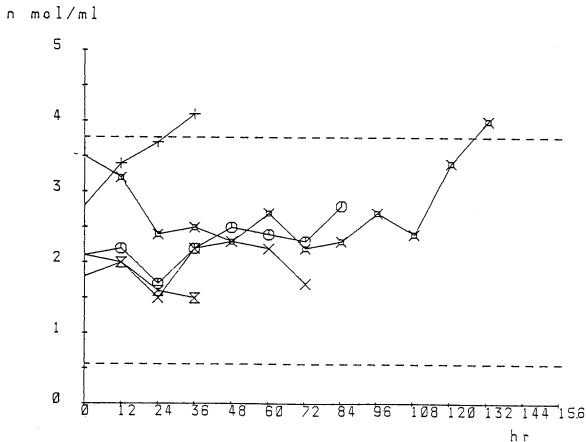


Fig. 11 Lipoperoxide of 100% O<sub>2</sub> exposure group

及び50%酸素暴露群 (n = 3) では死亡例は無かった。血漿 Hydroxyl Radical は酸素非暴露ウサギ (n = 3 のみ測定) においては 156hr (1例は 144hr) 後までそれぞれのウサギの control data の mean より 2SD 以内の変化を示し有意の時間変動はなかったが、100%, 50%酸素暴露(それぞれ n = 5, n = 3)では血漿 Hydroxyl Radical の経時的増減の変動幅が各ウサギの control data に比し 2SD (図中破線で示す) 以上を示し、非暴露ウサギに比し有意に大であった。また100%酸素暴露ウサギでは50%酸素暴露に比し変動幅の大きい個体がみとめられた (Fig. 3, 4, 5)。

GSH peroxidase は100%酸素暴露群 (n = 5) において control 群 (n = 4) に比し値の上昇傾向がみられる個体が認められたが上昇し始める時期及び上昇 pattern には個体差が認められた。また50%酸素暴露群 (n = 3) では値の上昇傾向が認められる個体と、認められない個体とがあった (Fig. 6, 7, 8)。(以下図中破線は酸素暴露前 control の mean ± 2SD の範囲を示す。)

Lipoperoxide も100%酸素暴露群において他群に比し高値となる例が認められた (Fig. 9, 10, 11)。

赤血球 SOD の酸素暴露前 control 値は  $4.3 \times 10^3 \pm 1.3 \times 10^3 \text{ U/g Hb}$  (mean ± SD) であった。酸素暴露後もこの範囲内での変動を示し、各群間に有意の差は認められなかった。

また100%酸素暴露群の死亡時の肺の病理組織

学的所見では鬱血、肺胞内浮腫、硝子膜形成、肺胞壁の肥厚、出血巣の散在が認められた。50%酸素暴露群の暴露後 156hr の肺では軽度の鬱血以外の所見は認められなかった。

## 考 察

血漿 Hydroxyl Radical 値は酸素暴露により変動が増大した。血漿で測定される Free Radical は脂質又は蛋白質遊離基の型で存在するものと考えられる<sup>5)</sup>。高濃度酸素暴露は脂質の自動酸化を進行させることなどにより Free Radical 発生量を増大させることが推測された。但しその増減の経時的変化 pattern には一定の傾向は認められなかった。血漿 Hydroxyl Radical の増減の機序として Hydroxyl Radical の発生量と scavenger 量等の Free Radical 消去系との balance に基づいた変化を反映している可能性がある。Hydroxyl Radical そのものに関与している scavenger については今回検討出来なかったが、Hydroxyl Radical と同様に毒性の強い活性酸素である superoxide radical の scavenger である赤血球 SOD に関しては各酸素暴露群間に有意の差を認めなかった。Hydrogen peroxide の scavenger である GSH peroxidase については50%酸素暴露群に比し100%酸素暴露群で値の上昇する傾向が認められ、Hydrogen peroxide 発生量の増大が推測されたものの Hydroxyl Radical の変動を推測する data を見いだすまでにはいたらなかった。さらに今後の検討を要する。

また GSH peroxidase, Lipoperoxide に関しては100%酸素暴露群において値の上昇傾向のある例が認められた。50%酸素暴露群では GSH peroxidase で上昇例は 3 例中 1 例と少なく、Lipoperoxide では上昇例が無いことは、50%酸素暴露では死亡例がなかったこと、肺の組織所見とあわせ考えて、活性酸素による障害が少ないことを示唆している。血漿 Hydroxyl Radical 値の酸素暴露による変動の機序を解明出来れば、Hydroxyl Radical を測定することに有用性が存することを示唆できるものと思われる。

稿を終るにあたり Hydroxyl Radical または GSH peroxidase の測定にご協力頂きました日本電子 kk 河野雅弘氏及び東京都環境科学研究所 川井利雄氏に感謝いたします。

## 〔参 考 文 献〕

- 1) Crapo, J. D. : Mechanisms of pulmonary oxygen toxicity. 日高庄医誌 **22** : 9-20, 1986.
- 2) Paglia, D. E. and Valentaine, W. M. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med, **70** : 158-169, 1967.
- 3) 八木国夫 : thiobarbituric acid 蛍光法による血漿又は血清中の過酸化脂質の微量定量法. ビタミン **49** : 403-405, 1975.
- 4) McCord, J. M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase. J Biol Chem, **244** : 6049-6055, 1969.
- 5) 大野公吉 : 生体蛋白変性と過酸化脂質. 最新医学 **33** : 664-669, 1978.