

●原 著

好中球活性酸素産生，血清過酸化脂質および遊離脂肪酸におよぼす高気圧酸素治療の影響

物部容子* 近藤正得* 岩藤 晋**
八塚秀彦** 塩飽善友** 小坂二度見*

高気圧酸素療法 (OHP) が好中球の活性酸素産生能におよぼす影響を全血ケミルミネッセンス法により検討し，同時に OHP による全身性の酸化ストレスの程度を血清過酸化脂質，遊離脂肪酸を指標として評価した。

初めて OHP を受ける患者 8 人を対象として，3ATA，2 時間の OHP を行い 7 回目まで経時的に測定を行った。OHP 中に全血ケミルミネッセンス値は上昇し，血清過酸化脂質，遊離脂肪酸は減少した。

3ATA，2 時間，7 回の OHP は全身性の酸化ストレスとはならないと考えられた。また，全身性の酸化ストレスに対する好中球の影響は軽度であると思われた。

キーワード：高気圧酸素，全血ケミルミネッセンス法，好中球，血清過酸化脂質，遊離脂肪酸

Effects of Oxygenation under Hyperbaric Pressure (OHP) on Oxidant-Producing Activity of Neutrophil, Serum Lipid Peroxide and Free Fatty Acid Production

Yoko Monobe*, Masanori Kondo*, Susumu Iwado**, Hidehiko Yatsuzuka**, Yoshitomo Shiwaku** and Futami Kosaka*

*Department of Anesthesiology and Resuscitology, Okayama University Medical School

**Division of Hyperbaric Medicine, Okayama University Hospital

The effects of OHP on neutrophil's oxidant-producing activity and the degree of generalized oxidative stress were presented. Whole blood chemiluminescence (CL), and serum lipid peroxide and free fatty acid (FFA) were measured.

Eight patients were subjected for 2 hours under 3 ATA a day and it was performed more than 7 days.

Whole blood CL increased, and serum lipid per-

oxide and FFA decreased significantly during OHP.

It is suggested that OHP have no adverse effect on generalized oxidative stress and the activation of neutrophil by OHP had slight effect on generalized oxidative stress.

Keywords : _____

OHP
Whole blood chemiluminescence
Neutrophil
Lipid peroxide
FFA

はじめに

高濃度酸素吸入による慢性的酸化ストレスの増加は，臨床的には呼吸器障害として現れるが，高気圧酸素療法 (Oxygenation under Hyperbaric Pressure, 以下 OHP) では，この酸化ストレスはさらに大きくなるものと考えられる。高濃度酸素吸入による呼吸器障害発生の原因として好中球由

*岡山大学医学部麻酔蘇生学教室

**岡山大学医学部附属病院高気圧治療部

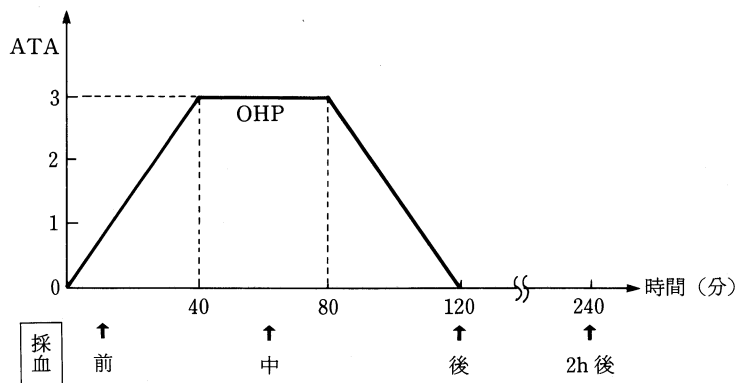


図1 OHPのプロトコール

来の活性酸素が注目されており^{1)~3)}, OHPによる酸化ストレスの発生状況を検討する目的で, 好中球活性酸素産生能の変動を全血ケミルミネッセンス法(全血 Chemiluminescence 法, 以下全血 CL 法)により検討した。また, 全身性の酸化ストレスの指標として血清過酸化脂質を測定し, さらに細胞膜障害の程度を示す指標として遊離脂肪酸を測定した。これらの結果から OHP による全身性の酸化ストレスに占める好中球の役割, 程度を検討し興味ある結果を得たので報告する。

方 法

全身性疾患を持たず, OHP を初めて受ける患者 8 名を対象とした(表 1)。

3ATA, 2 時間の OHP 治療の開始前, 中, 終了時, 終了 2 時間後にそれぞれ静脈血 2ml を EDTA 添加試験管に採血した。初回, 2 回, 3 回, 7 回目の OHP でそれぞれ上記採血を行い, 全血 CL, 血清過酸化脂質, 遊離脂肪酸を測定した(図 1)。

静脈血 100 μ l を 10mM, PH7.4 の HEPES 緩衝液 100 μ l で希釈し増光剤としてルミノール(3-aminophthaloyl hydrazine, 東京化成工業) 100 μ l を加えた後, 37 $^{\circ}$ C で 2 分間恒温槽に静置した。刺激剤としてザイモザン粒子(SIGMA 社)100 μ l (5mg) を加え, Luminophotometer TD4000 (LABO-SCIENCE 社製)にて 20 分間の発光量を測定した(図 2)。本装置では CL 値はピーク値(Relative Luminescent Unit: RLU と略)で表示される。今回の研究では, ピーク値を白血球数

表 1 対象患者

症例	年齢(歳)	性	疾患名
1	46	男	左突発性難聴
2	50	女	右突発性難聴
3	52	女	左突発性難聴
4	49	男	左網膜中心静脈閉塞症
5	52	女	右網膜中心静脈閉塞症
6	68	男	左網膜中心静脈閉塞症
7	41	男	減圧症
8	68	女	両足難治性潰瘍

で除し, 単位好中球あたりの CL 値を検討した。なお, 白血球数が 3000~9400/ μ l の正常範囲以外にある被検者は好中球が感染などの刺激をすでに受けて活性化している可能性があると考え検討の対象から除外した。

ザイモザン(SIGMA 社)2g を Ca, Mg を含まないリン酸緩衝液/生理食塩水(以下 PBS(-)と略)100ml に溶かして, 30 分間煮沸した。煮沸後, 3000rpm, 5 分間遠心し上清を捨て, PBS(-)で 1 回, HEPES 緩衝液で 2 回遠心洗浄し, HEPES 緩衝液に 50mg/ml の濃度で懸濁した。懸濁液は超音波処理した後 -20 $^{\circ}$ C に保存し, 室温で融解して使用した。ルミノールは 0.01N NaOH で 1mM の濃度に溶解したものを 4 $^{\circ}$ C で保存し, HEPES 緩衝液で 5 倍希釈して使用した。

血清過酸化脂質は過酸化脂質の分解で生じるマロンジアルデヒドが, 2 分子のチオバルビツル酸

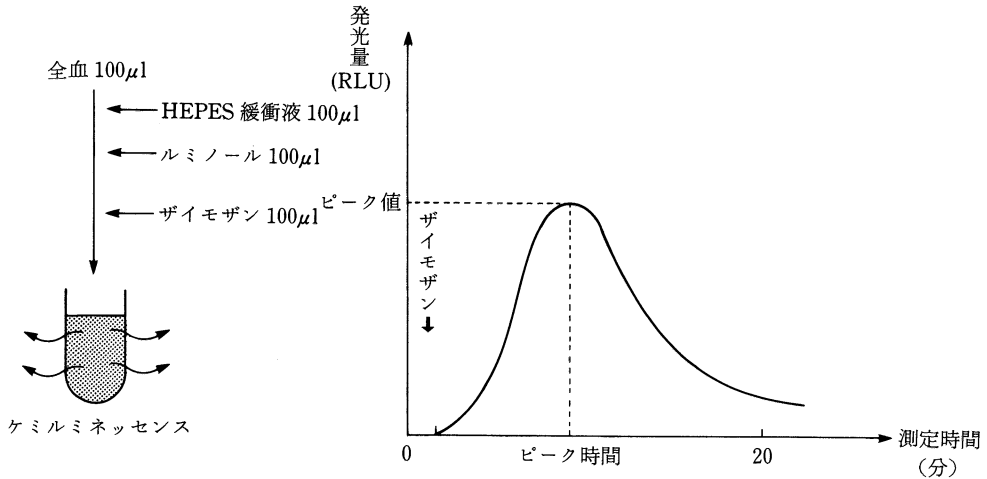


図2 全血ケミルミネッセンス (CL) 測定方法

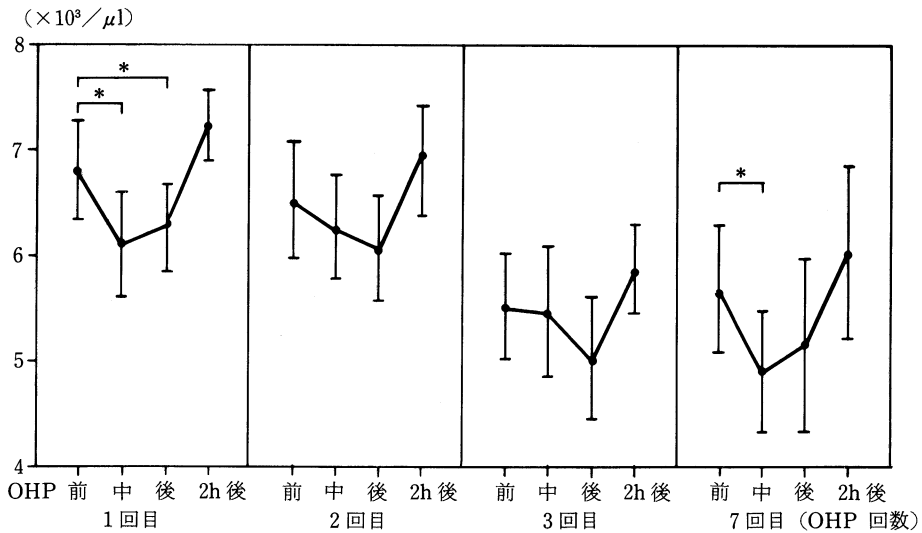


図3 白血球数

■ 平均値±S.E.

* p < 0.05

と縮合反応して生じる赤色物質の濃度を蛍光分析する八木法 (Lipoperoxide-Test Wako) を用いた。また血清遊離脂肪酸は遊離脂肪酸に acyl-CoA synthetase と acyl-CoA oxidase を作用させ、生じる過酸化水素と発色剤との呈色反応を比色定量する酵素法 (NEFA C-Test Wako) を用いた。

統計検定は毎回の OHP 前値に対する各測定値を Wilcoxon の T test を用いて検定し、 $p < 0.05$

をもって有意差ありとした。

結 果

白血球数は、各回とも OHP 中に前値に比し一過性に減少し、OHP 終了と共に前値に復する傾向を示した。中でも 1 回目の OHP 中および OHP 後、7 回目の OHP 中の減少は有意であった (図 3)。血球数で補正した好中球一個当たりの CL 値は OHP 中に増加し、終了にともない減少して

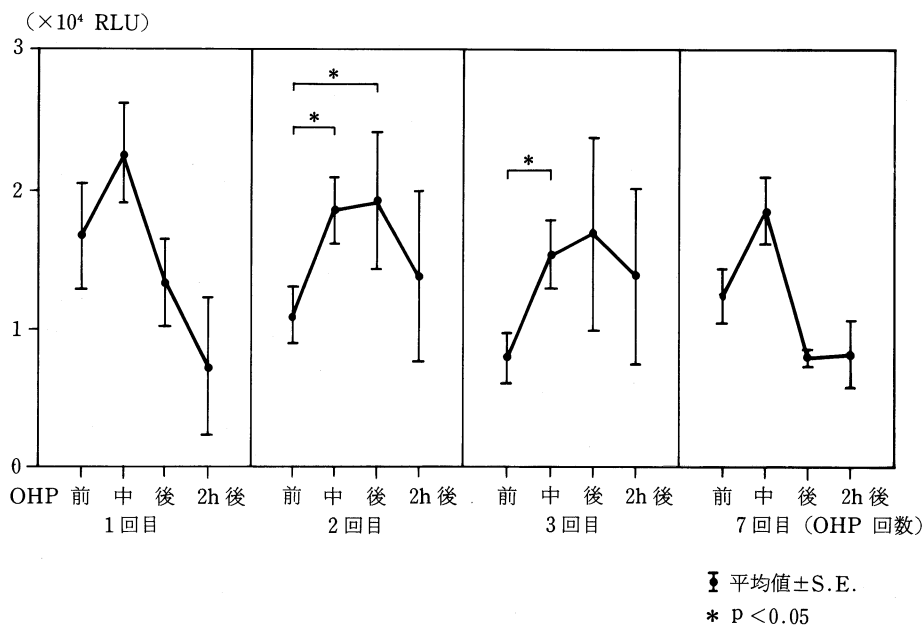


図4 全血CL値

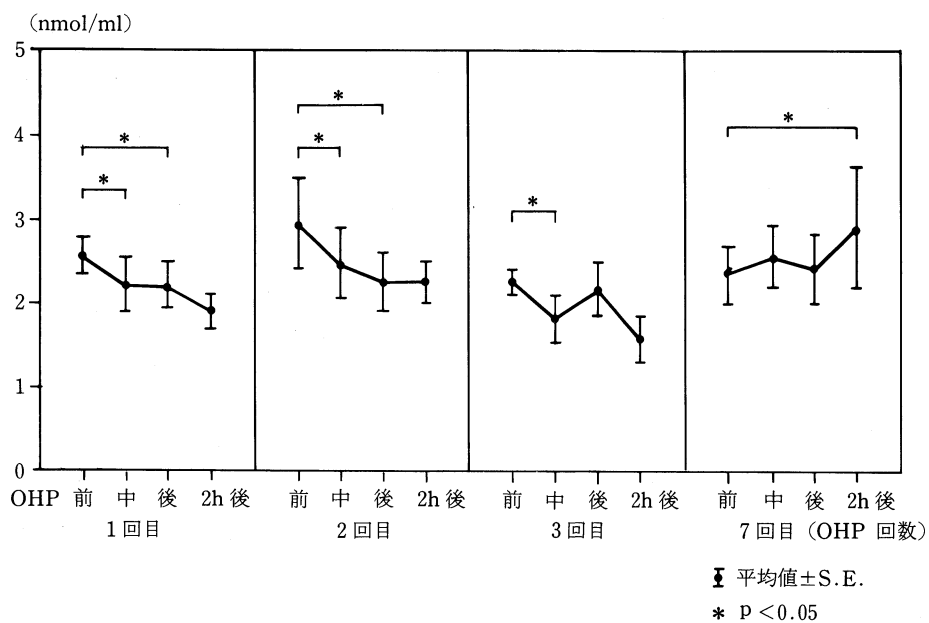


図5 過酸化脂質

OHP 前の状態に戻る傾向を示した。2回目及び3回目のOHP時にはOHP前より有意に増加したが、7回目には初回と同様に有意な増加は認めなかった(図4)。過酸化脂質は1回、2回、3回

目のOHP中で有意に減少したが、7回目には有意に増加した(図5)。遊離脂肪酸も過酸化脂質同様に減少傾向を示し、1回、7回目には有意に低下した(図6)。

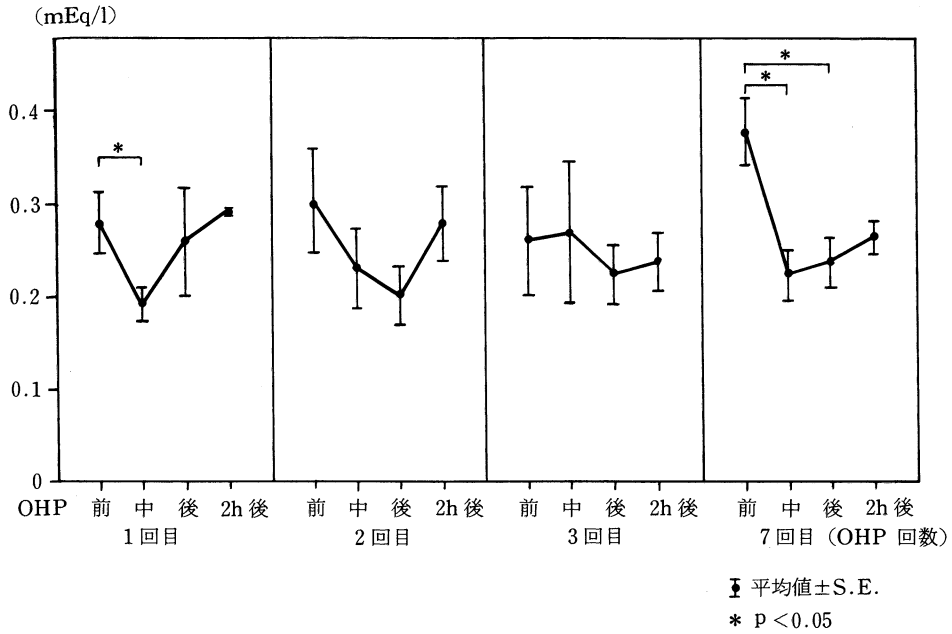


図6 遊離脂肪酸

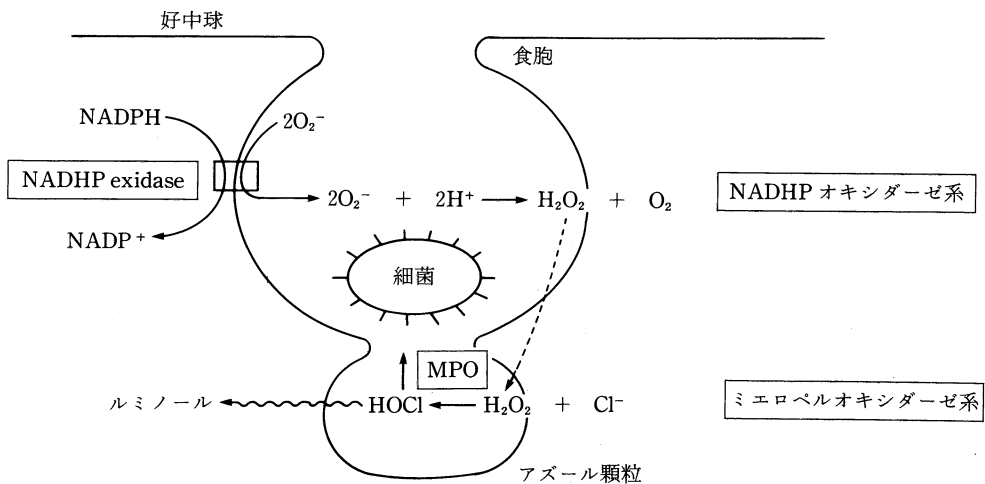


図7 NADPH オキシダーゼ系およびミエロペルオキシダーゼ系から産生される活性酸素

考 察

生体における活性酸素の大部分は酵素反応により生成されと考えられる。OHP下では酸素分圧の上昇にともない活性酸素の生成が増加し⁴⁾、生体への酸化ストレスも増大するものと推測され

る。酸化ストレスとは各種の活性酸素種の定常状態における濃度が上昇した細胞の状態を示し、それは抗酸化剤 (SOD, カタラーゼ, グルタチオンパーオキシダーゼ, ビタミン E や A など) による細胞の防御と酸化状態を引き起こすメカニズムとのバランスがくずれた時に生じる⁵⁾。今回は酸化

ストレスの中でも、肺障害をきたす一因とされる好中球に注目し、好中球由来の活性酸素の OHP による変動を全血 CL を用いて検討した。CL は好中球が異物を貪食殺菌する過程で産生、放出する活性酸素種を化学発光によって測定する方法であり、好中球殺菌能の指標として広く用いられている。好中球の活性酸素は NADPH oxidase 系と myeloperoxidase (MPO) 系から産生される。今回の測定では、発光の増光剤としてルミノールを用いた。ルミノールは MPO 系から産生される活性酸素 (OCI⁻: 次亜塩素酸) を反映すると考えられている⁹⁾ (図 7)。

好中球の CL 測定法としては分離法⁷⁾⁸⁾と今回用いた全血法⁹⁾¹⁰⁾によるものがある。分離法は赤血球による化学発光の抑制がなく、少量の好中球で測定できるが、好中球を分離し測定するまでに時間がかかり、その間に起こる好中球の生理的、生化学的変動の影響が大きいことや、赤血球の溶血操作に伴い好中球膜が障害を受けることなどの問題点がある。全血法は、採血後直ちに測定可能であり、迅速かつ簡便であるが、分離法に比べ赤血球による化学発光の抑制を受け¹¹⁾、また血清や他の細胞からも影響を受けるなどの問題点がある。今回の研究では、採血後早い時間内に測定でき、好中球の貪食殺菌能を *in vivo* に近い状態で観察できることより全血法を採用した。すなわち、血清や他の細胞による影響をも含めた総合的な反応の結果生ずる CL 値を観察しようとしたものである。好中球が活性化され肺を傷害する過程として、Fox ら¹²⁾は、高酸素分圧によってまず肺泡マクロファージが活性化され、次いでマクロファージ由来の遊走因子により好中球が肺血管床に集合粘着し、活性化された好中球から活性酸素が放出され、肺の血管内皮細胞あるいは肺胞上皮細胞を傷害すると推測している。八塚¹³⁾は、3ATA、2 時間の高気圧酸素被曝によって、ラットの肺泡マクロファージの活性酸素産生能は OHP 3 日目、7 日目、14 日目に有意に増加し、遊走能は OHP 2 日目、3 日目、7 日目に増加する傾向にあると報告している。肺泡マクロファージが effector cell として好中球の遊走能を高めるのであれば、好中球の活性酸素産生能も OHP 7 回目までに増加するのではないかと考え、今回の測定も OHP 7 回目まで行なった。

白血球数は OHP 中に減少し、OHP 終了後もとに戻る傾向にあった。これは OHP により活性化された好中球が肺へ一時的に集合したために減少したものと推測される。CL 値が OHP により上昇したことは血中の好中球が OHP により活性化され活性酸素産生能が上昇したものと考えた。この CL の変化は 2 回目、3 回目の OHP 時に強く出現し 7 回目には減弱していた。致死濃度でない酸素に暴露されたラットは、高濃度酸素、高気圧酸素への耐性が増し、ラットの肺には、SOD、カタラーゼなどの抗オキシダント物質が増加している¹⁴⁾¹⁵⁾。酸素毒性の感受性は、動物の種類によっても、また同一種類でも個体によって差がみられるが、今回の結果は、ヒトの好中球においても高気圧酸素に対する耐性が 7 回目には得られていることを示唆してしている。すなわち、全血中の活性酸素消去系が賦活されたか、あるいは好中球の活性酸素産生能そのものが低下した結果であろうと考えられる。しかし、いずれの要因が主体であるのかは今回の研究では、SOD などの消去酵素活性を測定していないため明らかではない。

一方、好中球由来の活性酸素も含めた全身的な酸化ストレスの結果を評価する指標として我々は、血清過酸化脂質と遊離脂肪酸を用いた。Chance らは 5 気圧 OHP 下でラット肝における過酸化水素の生成は 1.6 倍に増加し、スーパーオキシドは 4 倍に増加し、過酸化脂質の生成率は約 2 倍であったと報告している¹⁶⁾。OHP は活性酸素の生成を増加させるので、血清過酸化脂質、遊離脂肪酸も上昇するものと思われたが、今回の我々の検討では、血清過酸化脂質、遊離脂肪酸は OHP 中に有意に減少する傾向を示した。過酸化脂質は最終安定生成物ではなく、一時的に産生蓄積し、生体内では容易にグルタチオンペルオキシダーゼなどにより還元されるなどして変化する¹⁷⁾。今回 OHP 中に血清過酸化脂質、遊離脂肪酸が低下した理由としては、体内での存在様式が変化し、血管外組織に再分布した結果血中濃度が減少したか、あるいは代謝回転が亢進して他の物質に変化している可能性が考えられる。中川ら¹⁸⁾も 2 気圧 1 時間の OHP 下の脂質過酸化の変化を Chemiluminescence analyzer にて調べ、OHP で有意な変化を認めていなかった。加圧条件の違いや、対象が中等度～高度の脳虚血患者であったこ

となどから我々の結果と異なるが、いずれにしろ脂質過酸化反応は OHP 中で OHP 前より増加することはなく、我々が臨床的に用いている 3 気圧、2 時間の暴露条件であれば、7 回程度の加圧では、生体の代償作用が働き、全身性の酸化ストレスとはならないと考えられた。また、全血 CL 値は上昇したにもかかわらず、血清過酸化脂質、遊離脂肪酸は減少したことから、好中球は活性化されたが、OHP による全身性の酸化ストレスに対する好中球の影響は軽度であると思われた。

結 語

1. OHP 治療患者 8 人の白血球数、全血 CL 値、血清過酸化脂質、遊離脂肪酸値の変動を測定した。
2. OHP 中に白血球数は一過性に減少し、全血 CL 値は上昇した。血清過酸化脂質、遊離脂肪酸は減少した。
3. OHP は好中球の活性酸素産生能を上昇させたにもかかわらず、全身性の酸化的ストレスに影響はないものと思われた。

【参 考 文 献】

- 1) Repine, J.E., Bowman, C.M. and Tate, R.M.: Neutrophils and lung edema. *Chest* 81 : 47S-50S, 1982
- 2) Dabis, W.B., Rennard, S.I., Bitterman, P.B. and Crystal, R.G.: Pulmonary oxygen toxicity. *N. Engl. J. Med.* 309 : 878-883, 1983
- 3) 太田保世: 酸素の毒性と酸素中毒および高気圧酸素治療. *最新医学*, 41 : 230-236, 1986
- 4) 高橋英世ら: 高気圧酸素治療における酸素中毒と活性酸素. *最新医学*, 39 : 1374-1382, 1984
- 5) Sies, H. et al: Oxidative Stress and Formation of Excited Species, ed Sies, H., *Oxidative Stress*, London, Academic Press, 1985, 311
- 6) 中野 稔: 発光化合物を用いる顆粒球, マクロファージの酸化種生成能の測定法. *炎症*, 5 : 277, 1985
- 7) 楊井政紀: ヒト多核白血球の chemiluminescence 測定の基礎的研究, *臨床血液*, 20 : 372, 1979
- 8) 辻芳郎, 楊井政紀, 神戸正彦: 多核好中球の Chemiluminescence 測定法の検討. *医学のあゆみ*, 102 : 161, 1977
- 9) Tonooka T, Ueno N, Matsumoto T, et al: Chemiluminescence of whole blood. *Clin Immunol Immunopathol* 26 : 66, 1983
- 10) 諏訪邦彦, 田中茂: 全血利用によるルミノール依存性化学発光—感染症及び非感染症での検討—, *炎症*, 4 : 365, 1984
- 11) Heberer, M., Ernst, M., et al: Measurement of Chemiluminescence in Freshly Drawn Human Blood. *Klin Wochenschr.* 60 : 1443-1448, 1982
- 12) Fox, R.B., Hoidal, J.R., Brown, D.M. and Repine, J.E.: Pulmonary inflammation due to oxygen toxicity: involvement of chemotactic factors and polymorphonuclear leukocyte. *Am Rev Respir Dis.* 123 : 521-523, 1981
- 13) 八塚秀彦: ラット肺胞マクロファージに対する高気圧酸素被曝の影響. *日高圧医誌*, 21 : 161-166, 1986
- 14) Crapo, J.D., Tierney, D.F.: Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am. J. Physiol.* 226 : 1401-1407, 1974
- 15) Crapo, J.D., McCord, J.M.: Oxygen-induced changes in pulmonary superoxide dismutase assayed by antibody titrations. *Am. J. Physiol.* 231 : 1196-1203, 1976
- 16) Chance, B., Boveris, A.: Hyperoxia and hydroperoxide metabolism. In: *Extrapulmonary Manifestations of Respiratory Diseases*. Robin E.D. (ed) Marcel Dekker, Inc. New York, N. Y pp.185-237, 1978.
- 17) 二木鋭雄: フリーラジカルと過酸化反応. *肝胆脾* 16 : 183-190, 1988
- 18) 中川 翼ら: 高気圧酸素療法と過酸化反応について. *日高圧医誌*, 19 : 135-137, 1984