

【原著】

米軍再圧治療表6による Reactive Oxygen Metabolites (ROM) と Biological Antioxidant Potential (BAP) の変化

金剛寺純子¹⁾, 山見信夫¹⁾, 柳下和慶¹⁾, 外川誠一郎¹⁾, 芝山正治²⁾, 眞野喜洋¹⁾

東京医科歯科大学医学部附属病院高気圧治療部¹⁾
駒沢女子大学人文学部²⁾

高気圧酸素治療 (Hyperbaric Oxygen Therapy: HBO) の副作用の一つである酸素中毒は、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) の過剰な産生が原因であるとされる。ROSの検知には電子スピン共鳴法が用いられるが高度な技術を要する。そこで、日常診療の現場でも簡便に測定できる指標を用いU.S. Navy Treatment Table 6 (TT6) に曝露した12人の被験者の酸化ストレスおよび抗酸化状態を評価した。酸化ストレスを示すReactive Oxygen Metabolites (ROM) は、HBO直後に6.2%増加し ($P < 0.05$)、曝露1日後には前値に比し6.8%減少した ($P < 0.05$)。3日後、7日後のROMは、前値と有意な差を認めなかった。抗酸化力を示すBiological Antioxidant Potential (BAP) は曝露直後に4.8%の増加を認めたものの有意差は認められなかった。TT6に曝露直後は、一過性に酸化ストレスが増加するものの、適応反応により抗酸化酵素/物質が動員されることにより、酸化ストレスは曝露1日後までに回復したことが示唆された。

キーワード 高気圧酸素治療 (HBO)、活性酸素種 (ROS)、酸化ストレス、抗酸化物質、酸素中毒

【Original】

Reactive Oxygen Metabolites and Biological Antioxidant Potential in humans after a single exposure to hyperbaric oxygen therapy

Junko Kongoji¹⁾, Nobuo Yamami¹⁾, Kazuyoshi Yagishita¹⁾, Seiichiro Togawa¹⁾, Masaharu Shibayama²⁾, Yoshihiro Mano¹⁾

1) Hyperbaric Center, Tokyo Medical and Dental University

2) Department of Human Relations, Department of Humanities, Komazawa Women's University

It has been suggested that oxygen toxicity due to Hyperbaric Oxygen Therapy (HBO) is caused by increased Reactive Oxygen Species (ROS). Electron Spin Resonance (ESR) is the gold standard for detecting ROS, but their detection is difficult because of their very short lifetimes. Thus we evaluated changes in oxidative stress and antioxidant power, as they are more easily detectable, in humans after a single exposure to HBO. Twelve healthy volunteers were exposed to the U.S. Navy Treatment Table 6 (TT6). Venous blood samples were taken to measure Reactive Oxygen Metabolites (ROM) and Biological Antioxidant Potential (BAP), as indices of oxidative stress and antioxidant power before HBO, immediately after HBO, and then on Days 1, 3, and 7. ROM significantly increased by 6.2%, compared with the pre-exposure value, immediately after HBO ($P < 0.05$), and then decreased by 6.8% on Day 1 compared with that of pre-exposure ($P < 0.05$). BAP increased non-significantly by 4.8% immediately after exposure, and returned to the baseline pre-exposure level after that. Although oxidative stress increased immediately after a single exposure to TT6, antioxidants might be mobilized at the same time by a defense reaction to protect the body against ROS. These data suggested that any increase in ROS after HBO will be eliminated by Day 1.

keywords Hyperbaric oxygen therapy (HBO), Reactive oxygen species (ROS), Oxidative stress, Antioxidants, Oxygen toxicity

緒言

高気圧酸素治療 (Hyperbaric Oxygen Therapy : HBO) の副作用である酸素中毒は、高分圧酸素状態から生じる活性酸素種 (Reactive oxygen species : ROS) の過剰な増加が原因であるとされる¹⁾。ROSを制御するために生体内には抗酸化システムが存在するが、その消去能力を超えてROSが増えた状態を酸化ストレスという。

ROSの直接定量には電子スピン共鳴法 (Electron Spin Resonance : ESR) が用いられるが、ROSの極度に短い半減期と不安定性のために高度のテクニックが必要とされるため、時間的、コスト的にも臨床現場での測定は困難である。よって、HBOの安全限界の指標となる実用的な方法が開発されるべきである²⁾とされる。したがって、日常の診療現場で用いることができる簡便な指標として酸化ストレスを示すReactive Oxygen Metabolites (ROM)³⁾、および抗酸化力を示すBiological Antioxidant Potential (BAP)を測定した。HBO治療において、酸素中毒は自覚症状や画像診断によって評価され、その予防は肺酸素中毒量単位 (Unit of Pulmonary Oxygen Toxicity Dose:UPTD)⁴⁾、および中枢神経系酸素耐性曲線⁵⁾を目安にコントロールされている。しかし、酸素の毒性に対する感受性は個人差や日差変動が大きく⁶⁾、酸素中毒発症の予測は困難である。

一方、減圧症の治療で使用されるU.S.Navy Treatment Table 6 (TT 6)⁷⁾は、一般に汎用されている2.0 ATA (Atmosphere Absolute) に60分間曝露する治療と比較して、UPTDが646と曝露負荷が大きく、中枢神経系限界に近いことから、酸素中毒に対する注意がより必要である。そこで、TT 6にHBO曝露した被験者のROMおよびBAPを測定し、酸化ストレスレベルと抗酸化力について評価した。

方法

12名の健常なボランティア(男性6名、女性6名、平均年齢34.6, SD 7.4歳)に対して、実験の目的および参加することによるリスクを十分説明したうえで同意書を

得た。本研究は、東京医科歯科大学倫理委員会の承認を受け、ヘルシンキ宣言を厳守して行われた。なお、被験者には、抗酸化物質の服用者、低容量および中容量ピル服用者、喫煙者は含まれていない。

被験者は、高気圧酸素装置、中村鐵工所製NHC-412-A型にてTT 6のプロトコールに従いHBOに曝露された。インスピロン社製オキシジェンマスク (スリーインワン型) を使用し、流量15 l /分のフリーフローで純酸素を吸入した。

静脈血は、HBO曝露前、曝露直後、曝露1日後、3日後、7日後に上肢の正中皮静脈より採取した。酸化ストレスの指標である血清ROMと抗酸化力の指標である血清BAPを測定した。

Reactive Oxygen Metabolites (ROM)

ROMテストは血清中のヒドロペルオキシドを測定するものである³⁾⁸⁾。測定原理は、酸性緩衝液により血清タンパク質から鉄が遊離され、アルコキシおよびペルオキシラジカルが発生するフェントン反応およびハーバーワイス反応に基づく。発生したROSは、アルキル化芳香族アミンを酸化し、発色するので、その呈色のレベルを光度計にて測定する。

ROMテストの妥当性はESRによって確認されており⁹⁾、値は任意の単位CARR.U. (Carratelli Units) で表される。1 CARR.U.は、0.08mg/dlの過酸化水素に相当する¹⁰⁾。ROMおよびBAPテストには、分光光度計と遠心分離機が内蔵されたFRAS 4 (ディアクロン社、イタリア) を使用した。詳細はAppendix参照。

Biological Antioxidant Potential (BAP)

BAPテストは、三価鉄イオンが二価鉄イオンに還元されるときに脱色する特性に基づくもので、ROSなど電子に欠ける化学種を中和する血清の能力を示す。鉄などの遷移金属は周囲から電子を受け取る特性をもち、酸化状態の三価鉄から還元状態の二価鉄にシフトする。三価塩化鉄が、特定のチオシアン塩誘導物を含む無色の溶液に溶解すると、その液体は三価鉄イオンとして赤くなる。さらに10 μ l の血清を添加すると三

Table 1. Changes in Reactive Oxygen Metabolites (ROM) and Biological Antioxidant Potential (BAP) in 12 subjects after a single HBO exposure to TT6

	ROM (CARR. U.)	BAP (μ mol/l)
Before HBO	300 \pm 16	2465 \pm 86
Immediately after HBO	319 \pm 17 *	2584 \pm 61
Day 1	280 \pm 19 *	2518 \pm 58
Day 3	293 \pm 19	2435 \pm 47
Day 7	288 \pm 17	2514 \pm 76
Optimal value	<300	>2200

mean \pm SE., n=12, One-way Repeated-Measures ANOVA followed by Dunnett's test

* $P < 0.05$ vs. Before HBO

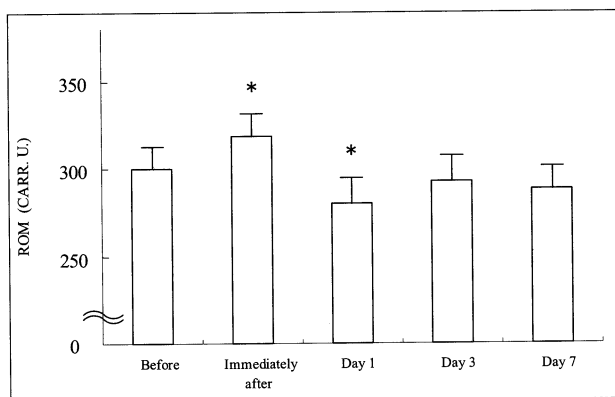


Fig. 1 Change in Reactive Oxygen Metabolites (ROM) after HBO

mean \pm SE., n=12, One-way Repeated-Measures ANOVA followed by Dunnett's test.

* $P < 0.05$ vs. Before HBO

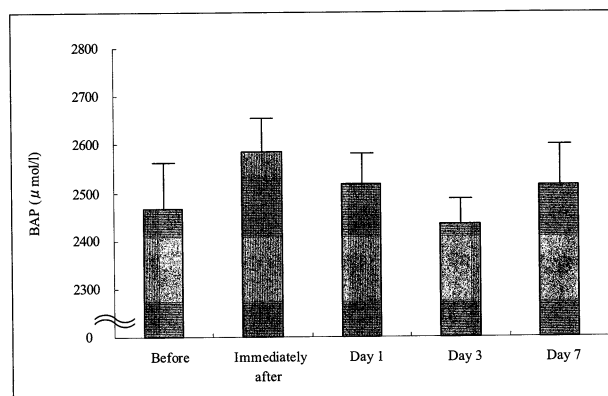


Fig. 2 Change in Biological Antioxidant Potential (BAP) after HBO

mean \pm SE., n=12, One-way Repeated-Measures ANOVA followed by Dunnett's test.

There was no statistical significant difference in the mean values.

価鉄イオンが二価鉄イオンに還元され、当初の赤色の溶液が薄い色に変わる。この呈色変化は、着色したチオシアン酸塩混合物による二価鉄イオンの放出によるものであり、この変化をあらかじめ呈色液の波長を設定しておいた分光光度計で測定する¹¹⁾。詳細は Appendix参照。

統計

データはWindows用 SPSS-PC 11.0 パッケージを使用して分析した。統計分析はOneway Repeated-Measure ANOVA を用い、Dunnettの方法により多重比較を行った。有意差は $P < 0.05$ とした。結果は平均 \pm 標準誤差 (mean \pm SE)で示した。

結果

血清ROMの結果をFig. 1, Table 1 に示す。被験者の曝露前の血清ROMの平均は、300 \pm 16 CARR.U.と正常値であった。血清ROMは曝露直後に有意に6.2%増加したが、曝露1日後に曝露前に比較し6.8%減少した ($P < 0.05$)。曝露3日目以降は曝露前値と有意差を認めなかった。

血清BAPの結果をFig.2, Table 1 に示す。血清BAPの値はHBO 曝露の直後に4.8%の増加を示したが統計的有意差は認めなかった。その後もBAP値は曝露前に比較して有意な変動は認めなかった。

考察

本研究では、血清ROMはHBO前と比較してHBO直

後に有意に6.2%増加したものの、1日後には前値より6.8%の有意な減少を認め、3日後以降はベースラインレベルに戻った。曝露直後は一過性にROSが増加するものの、消去機転により抗酸化酵素/物質の生成が亢進し、曝露1日後までに増加したROSが消去されたことを示唆しているものと考えられる。

HBOを受けた血中ROSの上昇は、酸素濃度、環境圧力、時間に依存することが明らかになっている^{12)~14)}。一般的に、酸化ストレスが負荷されると、生体のもつ防御反応として抗酸化酵素/物質が動員されることによってROSが消去され、酸化ストレスと抗酸化力のバランスを保つシステムが作動することが示唆されている^{15) 16)}。

ROSを消去する主な抗酸化酵素としては、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、還元型グルタチオンなどがある。HBO曝露においては、還元型グルタチオンの代謝回転およびNADPH量が増大し、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼおよびグルタチオンリダクターゼといった酵素が誘導される¹⁷⁾。本研究においても、これらの酵素代謝機転に変化が生じ、増加したROSは曝露1日後までに消去された可能性がある。

Benedettiらは2.5ATA、2×30分のHBOに12人の患者を曝露し、曝露直後に24.6%のROMの増加を認めた。14回の曝露後にROMは37.3%の増加を示し、曝露回数にしたがい漸増する傾向を認めた¹⁰⁾。TT6に比べて少ない曝露負荷にもかかわらず、ROMの有意な増加を認めた理由として、足の糖尿病性壊死、難治性骨髄炎など炎症を背景とした病態の患者が被験者であったことが要因と考えられる。なお、エアブレイクが入る治療表で曝露した場合は、必ずしもUPTDと酸化ストレスは相関しないと推測する。

ROMテストはヒドロペルオキシド全般を測定しているために、連鎖反応の引き金となったROSの種類を特定することはできない。ペルオキシラジカルやアルコキシラジカルの半減期は数秒間のため、測定値は一過性に増加したROSを反映している。また、スーパーオキシドのように初期段階で発生するROSに比べ、ヒドロペルオキシドは連鎖反応の過程で生じる代謝産物で

あるために、直接的な特定はできない。

しかし、採血方法は血糖値測定と同程度の手技で行えるため、患者への苦痛、負担が少なく、かつ安価であるために利便性が高いといえる。さらに、測定機械は自動化されており簡便で、いかなる臨床現場でも繰り返しができる利点がある。また、酸素中毒の感受性が高まっているとされる肺疾患患者や、頻回にHBOを受ける患者などの個々の酸化ストレスレベルを現場でモニタリングできる点で有用であると考えられる。

統計的に有意ではないが、血清BAP値はHBO後に4.8%の上昇が認められた。HBO曝露によって酸化ストレスが増加すると同時に、それに対抗する力として抗酸化力が増加している傾向が認められた。

HBO前後の抗酸化力を測定したもので、明らかな変化を認めた報告はいまだない。Dennongらは、4人の健康な被験者を2.5ATA、3×20分のHBOに曝露し、BAPと同様の原理であるFerric reducing ability of plasma (FRAP)法¹⁸⁾により血清の抗酸化力を測定した。その結果、HBO後に約18%の増加を示したものの、有意差は認めなかった¹⁹⁾としている。同様に、Kotらは健康な被験者52人のTotal Antioxidant Status (TAS)を測定した結果、280kPa(a)、30分のHBOに曝露した変化は認めなかった²⁰⁾と報告している。

BAPとほぼ同原理のFRAP法は、エラーに強くシンプルでスピーディであるので、長期的な抗酸化力のモニターの助けになる²¹⁾との報告もある一方、Trolox-equivalent antioxidant capacity assay (TEAC法)、Oxygen Radical absorbance capacity assay (ORAC法)、FRAP法などの抗酸化力を測定する光学測定法は、現在の開発の段階では、ビタミンCやEなどの服用実験では有意な差を検出することができず、精度や感度に問題が残されている²²⁾との報告もある。

HBO後の抗酸化力の変化が個人によって異なる理由に、ヒトの酸化ストレスに対する感受性や修復力は、遺伝的な違いがある²³⁾ことが示唆されている。また、抗酸化物質を含む食物を摂取することによっても影響を受ける。今回の被験者は年齢が比較的若く、基礎疾患がないなど、もともと十分な抗酸化力を備えており、

発生したROSを比較的短時間で消去した可能性が考えられる。今回の被験者の値は、曝露直後にBAPが増加傾向を示したことから、抗酸化酵素/物質が動員されたと解釈した。しかし、BAPとともにROMが減少しているケースもあり、この場合、酸化ストレスを消去するために抗酸化酵素/物質が消費されたと考えることもできる。ROMとBAPの値の評価は両者のバランスが重要であり、注意深い解釈が必要である。

本研究におけるHBOは単一曝露であり、対象が少人数での結果であったことから、さらに連続HBO曝露における酸化ストレスと抗酸化力の変化を評価する必要があると考えられる。

結語

- 1) HBO (TT 6) に単一曝露後、酸化ストレスは一過性に上昇したが、同時に抗酸化力も増加する傾向が認められ、曝露1日後の酸化ストレスは前値以下に減少した。TT 6による酸化ストレスは、曝露後24時間以内に回復しうるものであった。
- 2) 酸化ストレスを示すROMは、経時的変化を簡便に測定できるので、臨床現場での利用に有用である。抗酸化力を示すBAPの評価はROMとのバランスが重要であり、注意深い解釈が必要である。

謝辞

本研究にご協力くださいました被験者の方々に厚く御礼申し上げます。

引用文献

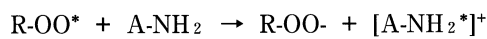
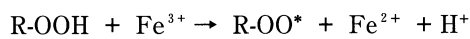
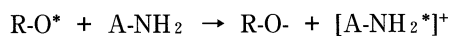
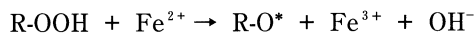
- 1) Narkowicz CK, Vial JH, McCartney PW : Hyperbaric oxygen therapy increases free radical levels in the blood of humans. *Free Radic Res Commun* 1993; 19:71-80.
- 2) K.K. Jain : *Oxygen Toxicity, Textbook of Hyperbaric Medicine* 4th ed. MA; Hogrefe & Huber. 2004; pp.48-58.
- 3) Cesarone MR, Belcaro G, Carratelli M, et al. : A simple test to monitor oxidative stress. *Int Angiol* 1999; 18:127-130.
- 4) Lambertsen CJ : Effects of hyperoxia on organs and their tissues. In : Robin ED ed. *Extrapulmonary manifestations of respiratory disease. Vol. 8 of Lung biology in health and disease.* New York; Marcel Dekker. 1978; pp.239-303.
- 5) Clerk JM, Thom SR : *Oxygen Under Pressure*, Brubakk AO, Nueman TS, eds. Bennet and Elliott's *Physiology and Medicine of Diving*, Edingurgh; Saunders. 2003; pp.358-418.
- 6) Donald KW : Oxygen poisoning in man I & II. *Br.Med J* 1947; 1 : 667-672, 712-717.
- 7) U. S. Navy Diving Manual. Revision 4 ; Naval Sea Systems Command Publication NAVSEA 0910-LP-708-8000. March 2001.
- 8) Trotti R, Carratelli M, Barbieri M : Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Med* 2002; 44:37-40.
- 9) Alberti A, Bolognini L, Macciantelli D, Carratelli M : The radical cation of N, N-diethyl-para-phenyenediamine : a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res Chem Intermed* 2000; 16:253-267.
- 10) Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, et al. : Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clin Biochem.* 2004; 37:312-317.
- 11) Dohi K, Satoh K, Ohtaki H, et al. : Elevated plasma levels of bilirubin in patients with neurotrauma reflect its pathophysiological role in free radical scavenging. *In Vivo* 2005; 19:855-860.
- 12) 眞野喜洋, 秋葉仁, 高野尚志, 他. : 高気圧酸素曝露に伴う血中のhydroxyl radical(\cdot OH)に関する

- る研究. Research on hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) in plasma under hyperbaric oxygen exposure. 日本衛生学雑誌 1987; 42:570-577.
- 13) Dennog C, Hartmann A, Frey G, Speit G: Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis* 1996; 11: 605-609.
- 14) Rothfuss A, Dennog C, Speit G: Adaptive protection against the induction of oxidative DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis* 1998; 19:1913-1917.
- 15) 秋葉仁, 眞野喜洋: 酸素の生体への影響: 酸素ラジカルと肺障害. 日本プライマリケア会誌 1985; 8:117-124.
- 16) Speit G, Dennog C, Eichhorn U, Rothfuss A, Kaina B: Induction of heme oxygenase-1 and adaptive protection against the induction of DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis* 2000; 21:1795-1799.
- 17) 四ノ宮成祥: 高気圧酸素治療の副作用.(酸素中毒, 気圧外傷, その他) 高気圧酸素治療法入門 第4版. 日本高気圧環境医学会. 東京; 2005, pp.89-102.
- 18) Benzie IF, Strain JJ: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239:70-76.
- 19) Dennog C, Radermacher P, Barnett YA, Speit G: Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 1999; 428:83-89.
- 20) Kot J, Sicko Z, Wozniak M: Oxidative stress during oxygen tolerance test. *Int Marit Health* 2003;54:117-126.
- 21) Benzie IF, Strain JJ: Ferric reducing / antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999; 299:15-27.
- 22) Chatherine A: Measurement of Total Antioxidant Activity as a Marker of Antioxidant Status In vivo: Procedures and Limitations. *Free Rad Res* 1999; 33:59-66.
- 23) Perera FP, Whyatt RM: Biomarkers and molecular epidemiology in mutation/cancer research. *Mutat Res* 1994; 313:117-129.

Appendix

ROMテスト

実験手技としては、水素イオン濃度を安定させるために全血をpH4.8の緩衝液に入れ、10 μ l のN,Nジエチルパラフェニレンジアミンを混合し、1分間遠心分離する。ヘモグロビンに含まれている二価鉄イオンと三価鉄イオンが触媒となって、溶解しているヒドロペルオキシドはペルオキシラジカル基とアルコキシルラジカル基に分解される。N,Nジエチルパラフェニレンジアミンは、ROSに触れると酸化され、その濃度に応じてピンクの陽イオンに変化して呈色する。変色の程度はヒドロペルオキシドに直接比例するので、これを分光光度計により505 nm の波長で吸光度を測定した。測定原理の反応式は以下の通りである。



R-OOH = ヒドロペルオキシド全般

R-O* = ヒドロペルオキシドのアルコキシル基

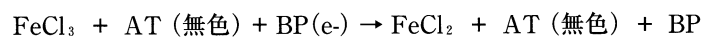
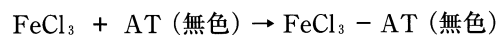
R-OO* = ヒドロペルオキシドのヒドロペルオキシル基

A-NH₂ = N,Nジエチルパラフェニレンジアミン(クロモゲン基質)

[A-NH₂*]⁺ = クロモゲン基質の呈色したラジカルカチオン(陽イオン)

BAPテスト

実験手技としては、血清10 μ l を塩化第二鉄とチオシアン酸塩を混ぜた呈色液に混入し、37°C で5分間保温後、分光光度計により505nmの波長で吸光度を測定した。測定原理の反応式は次の通りである。電子の引き抜きによる連鎖反応を止める力をもつものには、グルタチオンをはじめとするチオール基、血清タンパク質、ビリルビン、尿酸などがある。



AT (無色) = 無色のチオシアン酸塩

FeCl₃ = 塩化第二鉄

FeCl₃ - AT (無色) = 塩化第二鉄とチオシアン酸塩の着色した化合物

BP(e⁻) = 塩化第二鉄イオンを還元する(電子を与える), 抗酸化能をもつ血清分子

BP = BP(e⁻)の酸化した状態の血清分子

FeCl₂ = BP(e⁻)の還元によって得られた塩化第一鉄