

【原著】

# 高気圧酸素曝露による血漿遊離アミノ酸の変化に関する検討

鈴木直子<sup>1)</sup> 山見信夫<sup>2)3)</sup> 金剛寺純子<sup>2)</sup> 柳下和慶<sup>3)</sup>  
外川誠一郎<sup>2)3)</sup> 芝山正治<sup>2)4)</sup> 山本和雄<sup>1)</sup> 眞野喜洋<sup>2)3)</sup>

(株)オルトメディコ研究開発部<sup>1)</sup>  
東京医科歯科大学大学院健康教育学分野<sup>2)</sup>  
同 大学医学部附属病院高気圧治療部<sup>3)</sup>  
駒沢女子大学人文学部<sup>4)</sup>

高気圧酸素 (HBO: Hyperbaric Oxygen) 曝露によってヒト血中reactive oxygen metabolites (ROM) 値が平均6.9%程度上昇することをわれわれは以前報告した (日本高気圧環境・潜水医学会雑誌 2007; 42: 85-91)。HBOにおける急激な酸化ストレスを受けた際、生体系でのラジカル生成と消去に關与する酵素群を構成するアミノ酸も影響をうけるであろうことは推測されるが、これまでヒト血漿遊離アミノ酸がどのように変化するかについてはほとんど知られていない。そこで、我々は、健常な成人男女をアメリカ海軍作成の治療表Table 6のHBO条件下に5時間曝露し、20種類の血漿遊離アミノ酸の変化について検討した。その結果、HBO曝露後の変化としてはバリン値のみに有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ )。予期に反して、グルタチオン代謝など抗酸化に關与することが知られているアミノ酸 (システイン, メチオニン) には有意な変化が認められなかった。その理由の一つとして、ミトコンドリアの脆弱部にあるバリンへの影響を考えている。

キーワード 酸化ストレス, 抗酸化作用, バリン

## 【Original】

### Changes in plasma-free amino acids by hyperbaric oxygen exposure.

Naoko Suzuki<sup>1)</sup>, Nobuo Yamami<sup>2)3)</sup>, Junko Kongoji<sup>2)</sup>, Kazuyoshi Yagishita<sup>3)</sup>  
Seiichirou Togawa<sup>2)3)</sup>, Masaharu Shibayama<sup>2)4)</sup>, Kazuo Yamamoto<sup>1)</sup>, Yoshihiro Mano<sup>2)3)</sup>

- 1) Research and Development Department, Ortho medico Inc.
- 2) Department of Health Education, Graduate school of allied health sciences, Tokyo Medical and Dental University
- 3) Department of Hyperbaric Medicine, Tokyo Medical and Dental University
- 4) Department of Humanities, Komazawa Women's University

## ABSTRACT

We previously reported that hyperbaric oxygen (HBO) increased serum reactive oxygen metabolites (ROM) by approximately 7% (The Japanese Journal of Hyperbaric and Undersea Medicine 2007; 42: 85-91). Under hyperbaric conditions, radicals are produced in vivo, and anti-oxidation systems are activated because of the oxidative effect of HBO. Therefore, the amino acids of enzymes associated with redox (reduction/oxidation) reaction should be subjected to increase by HBO. However, little or no study has been conducted on the change of amino acids under HBO therapy. Ten healthy volunteers (6 male, 4 female) were exposed to HBO equivalent to U.S. Navy Treatment Table 6 for 5 hours. Serum free amino acids were measured before and after the exposure. Of 20 amino acids analyzed, only valine increased after the HBO exposure ( $p < 0.05$ ). The other amino acids, unexpectedly including the ones contributing to the glutathione ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine; GSH) metabolism, such as cysteine and methionine, did not show any meaningful changes. We speculate that the involvement of valine in vulnerable mitochondria sites may be a possible mechanism for its increase with HBO.

keywords oxidative stress, antioxidative function, valine

## はじめに

高気圧酸素(HBO: Hyperbaric oxygen)は、脂質、たんぱく質、DNAの酸化など、細胞障害を起こしうる活性酸素の発生を増加させることが報告されている<sup>1)</sup>。われわれの研究においても、US Navy治療表Table 6の直後で酸化ストレスの指標となるReactive Oxygen Metabolites (ROM)が平均6.9%程度増加しており、HBO後には生体内にラジカルが産生されたことが示されている<sup>2)3)</sup>。HBO曝露はダイビング後の減圧症治療<sup>4)</sup>や慢性的創傷の治療<sup>5)</sup>のために治療として用いられている。また、近年、HBO曝露によるヒト血中CD34の増加<sup>6)</sup>や、動物試験においてのheat shock protein (HSP)の発現<sup>7)</sup>、内皮前駆細胞の発現増強<sup>8)</sup>等について報告がある。

生体はラジカルに対して対応するシステムとして、グルタチオン系<sup>9)10)</sup>、ビリルビン<sup>11)</sup>、アミノ酸<sup>12)</sup>などを利用することは知られている。HBO曝露による生体内抗酸化システム系の動態についてはグルタチオン、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼに明らかな変化が生じなかったというヒトにおける報告がある<sup>13)</sup>。HBOとアミノ酸の関連には、ラット脳でHBO曝露後アルギニン代謝が変動した<sup>14)</sup>、マウス大脳皮質においてグルタミン酸が増加した<sup>15)</sup>という報告があるが、ヒトにおける血漿遊離アミノ酸の変化についてはほとんど知られていない。そこで、今回、われわれは、血漿遊離アミノ酸がHBOでどのように変化するかについて検討することを目的とし、試験を実施した。

## 方法

当研究は、ヘルシンキ宣言に基づき、東京医科歯科大学医学部附属病院の倫理委員会の許可を得た後、被験者の体調、健康状態を充分配慮したうえで行われた。被験者には、当該研究の意味、実験に参加することで得ることのできる利益および不利益について説明し、被験者の同意書を作成したうえで研究を実施した。

健常者10名(男性6名、女性4名、平均年齢34.3±7.2歳)に、US Navy治療表Table 6<sup>16)</sup>に基づいてHBO曝露を実施した。抗酸化剤の常用者、ピル服用者及

び喫煙者は被験者から除外した。

HBO曝露前日までの食事コントロールは行わなかったが、試験当日は、HBO前の採血直後に、朝食としておにぎり2個を摂取した。HBO試行中、ゲージ圧0.09MPaに減圧された際の1回目の空気呼吸(酸素ブレイク)中に、昼食としておにぎり2個を摂取した。HBO前の身体活動については、30分以内の歩行を許可した。HBO中は座位安静・睡眠不可とし、水分摂取は500ml以内とした。HBO曝露に参加した同一の被験者は、1ヶ月が経過した後、HBO曝露なしの安静コントロール群として同様のスケジュールで試験を実施した。

血漿遊離アミノ酸測定のため採血は、HBOの前・後に行った。採血検体は速やかに遠心分離(3,000回転、15分、室温)後、血漿のみを採取し、-18℃にて凍結保存した。HBOの翌日、Table 1に示す20種類のアミノ酸の血中濃度の変化について全ての検体を同時に測定した。解析には陽イオン交換樹脂クロマトグラフィーを用いたニンヒドリン反応による自動アミノ酸分析装置(日立835-50型自動アミノ酸分析器)を使用した。

統計: 血漿遊離アミノ酸は、HBO前値と後値、HBO群と安静コントロール群との比較において、Wilcoxon signed-ranks testを使用し検定した。いずれの検定も $p < 0.05$ をもって有意と判定した。結果については、平均±標準偏差(SD)にて記載した。

## 結果

測定したアミノ酸のうち、統計的に有意な変化を示したアミノ酸はバリンのみであった。すなわち、HBO曝露時のバリン値は前値が $239.7 \pm 50.9$  nmol/mlであり、曝露後は $255.8 \pm 45.2$  nmol/mlに増加した( $p < 0.05$ ) (Fig.1)。安静時バリン値は前値が $233.8 \pm 40.2$  nmol/ml、5時間経過後の値は $228.6 \pm 39.2$  nmol/mlであり、安静5時間後のバリン値と曝露5時間後のバリン値間においても統計的に有意な増加を認めた( $p < 0.05$ )。

Table 1 測定したアミノ酸

アラニン	フェニルアラニン	トレオニン	リシン
バリン	トリプトファン	システイン	アルギニン
ロイシン	メチオニン	グルタミン	ヒスチジン
イソロイシン	グリシン	アスパラギン	アスパラギン酸
プロリン	セリン	チロシン	グルタミン酸

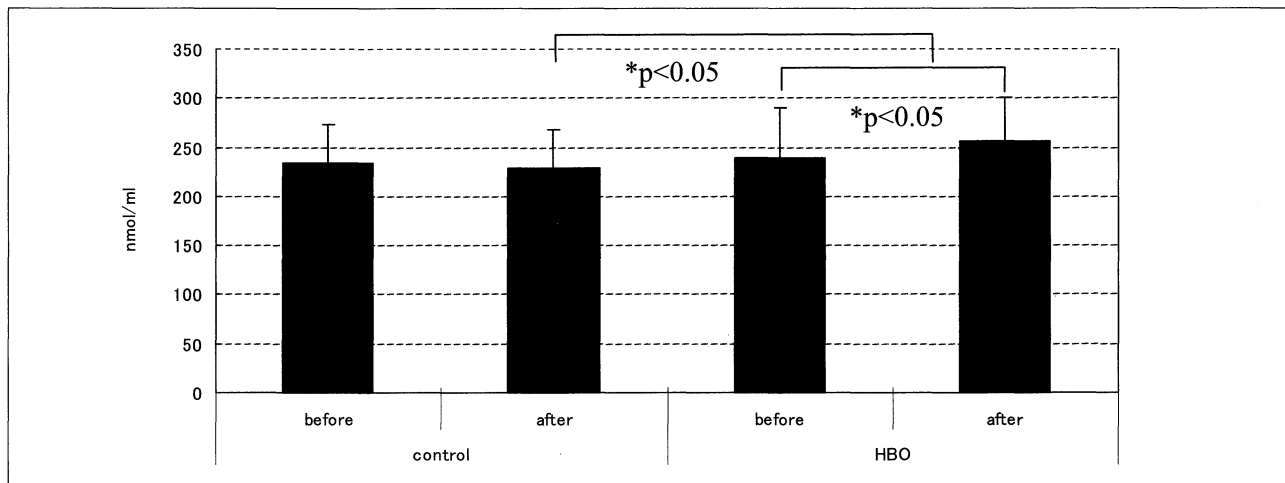


Fig. 1 血中バリン値の変化

## 考察

今回の試験において、曝露直後に有意な変化を示したアミノ酸はバリンのみであった。われわれの報告において、US Navy Table 6 曝露でROMが平均6.9%増加するとともに、尿中8-OHdGの生成速度の増加傾向が認められていたことから<sup>2)</sup>、酸化還元に作用することが知られているシステインやメチオニンには少なくとも統計的な有意差が得られるであろうと考えていた。しかし、予想に反し、これらGSH代謝に関わるアミノ酸は安静時の状態と比較して有意な変化を示さなかった。

今回の結果のひとつの考察として、HBO曝露によるミトコンドリアへの影響を考えている。ラット組織を過酸化脂質で処理することで、ミトコンドリア呼吸鎖を構成する重要なタンパクであるAdenine nucleotide translocase (ANT)を構成するアミノ酸のうちリジン、システイン、アルギニン、バリンが減少したという報告がある<sup>17)</sup>。ANTは6回膜貫通型のヘリックスループをもつタンパクでミトコンドリア外膜に配向して存在し、バリンは細胞膜を貫通するループ付近に存在する<sup>18)</sup>。一般的にループ部分のアミノ酸は障害を受けやすく、従って、細胞外膜折り返し領域に

存在するバリンもラジカル等の障害を受けやすいであろうことが予測される。一方、酵母の試験系において、L142Sの変異では野生株よりも15倍活性が低下することが報告されているが、L142SはL127、V130、I183に相応すると報告があり<sup>19)</sup>、バリンはANTの薬理活性に重要であることが示唆されている。ヒトの筋バイオプシーにおいても、ラジカルのストレスが筋肉中のミトコンドリア酸化還元制御機構に影響をあたえることが示されており<sup>20)</sup>、生体内で生じたラジカルはミトコンドリアを標的のと考えられる。

以上のことから、血中バリン濃度が有意差をもって増加したのは、2,8ATAの曝露によって生体内に産生されたラジカルがANTタンパクの側鎖をターゲットとして障害した可能性が考えられる。バリンは必須アミノ酸であり、ヒトはバリンを合成することができず、ミトコンドリアANTのバリンがターゲットとなった場合、速やかにde novo合成によって補わなくてはならない。そのため、結果として血中のバリン濃度が高まったと考えている。

今後はHBO下において、血中に存在する酸化ストレスに関連するタンパクの挙動をより詳細に検討していきたい。

## 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) 山見信夫, 金剛寺純子, 中山晴美. 他. 高気圧酸素における酸化・抗酸化マーカーの検討 日本高気圧環境・潜水医学会雑誌 2007;42:85-91.
- 3) 金剛寺純子, 山見信夫, 柳下和慶. 他. : 米軍再圧治療表6によるReactive Oxygen Metabolites (ROM) とBiological Antioxidant Potential (BAP) の変化. 日本高気圧環境・潜水医学会雑誌 2007; 42: 23-29.
- 4) Gertsch-Lapcevic Y, Guin P, Butler J, Ryan S : Hyperbaric oxygen therapy : treatment for spinal cord decompression sickness. *SCI Nurs* 1991; 8 : 97-101.
- 5) Abidia A, Laden G, Kuhan G, et al. : The role of hyperbaric oxygen therapy in ischaemic diabetic lower extremity ulcers : a double-blind randomized-controlled trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003; 25: 513-518.
- 6) Thom SR, Bhopale VM, Velazquez OC, et al. : Stem cell mobilization by hyperbaric oxygen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290 : H1378-H1386.
- 7) Thom SR, Bhopale V, Fisher D, et al. : Stimulation of nitric oxide synthase in cerebral cortex due to elevated partial pressures of oxygen : an oxidative stress response. *J Neurobiol* 2002; 51: 85-100.
- 8) Goldstein LJ, Gallagher KA, Bauer SM, et al. : Endothelial progenitor cell release into circulation is triggered by hyperoxia-induced increases in bone marrow nitric oxide. *Stem Cells* 2006; 24: 2309-2318.
- 9) Meister A : Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 1994; 269: 9397-9400.
- 10) Meister A : Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 1994; 54: 1969s-1975s.
- 11) Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, et al. : Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987; 235 : 1043-1046.
- 12) Moskovits J : Methionine sulfoxide reductases : ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1703: 213-219.
- 13) Dennog C, Radermacher P, Barnett YA, et al. : Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 1999; 428: 83-89.
- 14) Ito T, Yufu K, Mori A, et al. : Oxidative stress alters arginine metabolism in rat brain : effect of sub-convulsive hyperbaric oxygen exposure. *Neurochem Int* 1996 ; 29: 187-195.
- 15) Mialon P, Joanny P, Gibey R, et al. : Amino acids and ammonia in the cerebral cortex, the corpus striatum and the brain stem of the mouse prior to the onset and after a seizure induced by hyperbaric oxygen. *Brain Res* 1995; 676: 352-357.
- 16) U. S. Navy Diving Manual. Revision 5, Naval Sea Systems Command Publication NAVSEA 0910-LP-103-8009. August 2005.
- 17) Giron-Calle J, Schmid HH : Peroxidative modification of a membrane protein. Conformation-dependent chemical modification of adenine nucleotide translocase in  $\text{Cu}^{2+}$ /tert-butyl hydroperoxide treated mitochondria. *Biochemistry* 1996 ; 35: 15440-15446.
- 18) Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, et al. : Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxy-

atractyloside. *Nature* 2003; 426: 39-44.

- 19) Zeman I, Schwimmer C, Postis V, et al. : Four mutations in transmembrane domains of the mitochondrial ADP/ATP carrier increase resistance to bongkreikic acid. *J Bioenerg Biomembr* 2003; 35: 243-256.
- 20) Tonkonogi M, Walsh B, Svensson M, et al. : Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle : effects of endurance training and oxidative stress. *J Physiol* 2000; 528: 379-388.