

【原著】

# 高気圧酸素における酸化・抗酸化マーカーの検討

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

東京医科歯科大学医学部附属病院高気圧治療部<sup>1)</sup>  
はるみクリニック<sup>2)</sup>  
駒沢女子大学人文学部<sup>3)</sup>  
(株) オルトメディコ研究開発部<sup>4)</sup>

高分圧酸素を吸入することによって生じる酸素中毒の発現または発現予測について、肺に対してはunit of pulmonary oxygen toxicity dose, 呼吸機能検査, 画像診断, 臨床症状が用いられ, 脳に対しては臨床症状以外に評価できる方法がない。我々は, ヒトにおける酸化ストレスについて血液生化学的に評価できれば臨床的に有用と考え, 近年, 測定が可能と報告されている酸化および抗酸化マーカー, 活性酸素代謝物を評価した。US Navy治療表 Table 6 の前後で, 酸化ストレスの指標とされる血清 reactive oxygen metabolites (ROM) は, 高気圧酸素 (HBO: hyperbaric oxygen) 後に平均6.9%有意に増加した (HBO前: 315.3±52.5 CARR.U., HBO後: 337.0±53.5 CARR.U; p<0.01)。また, 尿 8-hydroxydeoxy-guanosine 生成速度は平均43.1%増加した (p=0.07)。血清coenzyme Q10 (CoQ<sub>10</sub>) および血清CoQ<sub>10</sub>酸化率, 血清および尿hexanoyl-lysine, 血清lipid peroxides, 血清superoxide dismutase, 血清biological antioxidant potentialについては有意な変化を認めなかった。Table 6において活性酸素種は一過性に増加することが示唆され, HBOの酸化ストレスを定量的に評価する指標としてROMは比較的鋭敏に反映するものと考えられた。

**キーワード** 活性酸素, 酸化ストレス, 抗酸化物質, 酸素中毒, 活性酸素代謝産物

## 【Original】

A discussion on oxidative and antioxidative markers under a hyperbaric oxygen environment.

### ABSTRACT

For the prediction of the onset of central nervous system oxygen toxicity caused by hyperbaric oxygen inhalation, no evaluation method exist other than clinical signs and symptoms. For pulmonary toxicity, the unit of pulmonary toxicity dose, respiratory examination, imaging and clinical signs and symptoms are the only practical methods. The oxidative and antioxidative markers, and active oxygen metabolites, which have recently been reported as possible measurement indexes, were evaluated from the view point of clinical usefulness, provided the oxidative stress on the human beings could be evaluated hemo-biochemically. During the US Navy Treatment Table 6, serum reactive oxygen metabolites (ROM), an index of oxidative stress, significantly increased by 6.9% on average after hyperbaric oxygen (HBO) (before HBO, 315.3±52.5 CARR.U.: after HBO, 337.0±53.5 CARR.U.; p<0.01). Additionally, urine 8-hydroxydeoxy-guanosine formation rate increased by 43.1% on average (p=0.07). Serum coenzyme Q10 (CoQ<sub>10</sub>) and serum CoQ<sub>10</sub> oxide rate, serum and urine hexanoyl-lysine, serum lipid peroxides and serum superoxide dismutase, serum biological antioxidant potential had no significant change. For the Treatment Table 6, it was suggested that the reactive oxygen species increased temporarily and ROM was considered as a relatively sensitive index for a quantitative evaluation of oxidative stress during HBO.

**keywords** Reactive oxygen species, Oxidative stress, Antioxidants, Oxygen toxicity, Reactive oxygen metabolites

## 緒言

高気圧酸素(HBO: hyperbaric oxygen)の副作用のひとつである酸素中毒は、活性酸素種(ROS: reactive oxygen species)が関与していることが知られている<sup>1)</sup>。肺酸素中毒の発現予測については、unit of pulmonary oxygen toxicity dose (UPTD)が用いられているが、臨床的には、呼吸器症状の発現、肺活量、1秒率、胸部X線写真などの画像検査をもって判断するしかなく、また、脳酸素中毒については、臨床症状をもって判断する以外に方法がない<sup>2)~5)</sup>。Dennogら<sup>6)</sup>は、2.5絶対気圧(ATA: atmosphere absolute)に20分×3回のHBO曝露(合計酸素吸入時間60分)を1回行った健常被験者4名において、HBO前後でferric reducing ability of plasma-assay (FRAP)測定 of 血清抗酸化力に変化は認められず、血清およびリンパ球のglutathione(GSH)、赤血球中のsuperoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、glutathione peroxidase (GPx)は、いずれも影響を受けなかったことを報告している。しかしながら、リンパ球中の熱ショックタンパクHSP70については誘導が認められたことより、ROSがリンパ球に作用することについて言及している。Kotら<sup>7)</sup>は、280kPa、30分のHBO曝露を行った健常者52名において、血清total antioxidant statusには変化を認めないが、血漿protein carbonylsのわずかな増加と、血漿total thiolおよび血清HSP70の減少を認めたと報告している。さらに、Benedettiら<sup>8)</sup>は、2.5ATA、30分×2回のHBO曝露(合計酸素吸入時間60分)を15回受けた虚血性疾患患者において、血漿reactive oxygen metabolites (ROM)および血漿malondialdehydeの増加と、赤血球中のSODおよびCAT活性の低下が認められ、血漿GSH、血清 $\alpha$ -tocopherol、血清retinol、赤血球中のGPx活性については変化が認められなかったことを報告している。一方、electron spin resonance法による測定では、兎の血清においてHBO曝露の圧力勾配に応じてhydroxyl radicalが増加することが示されている<sup>9)</sup>。以上のように、HBO曝露におけるROSまたは抗酸化力の評価については、いくつかの研究がなされているが、測定系や測定手技の

煩雑さ、精度や再現性の問題、費用と検体数の確保の問題などから、血液生化学的な現象と酸素中毒の症状やUPTDとの関連性については十分に検討できるまで至っていない。

本研究では、ヒトの酸化ストレスを評価する上で臨床的に応用が可能と考えられる酸化・抗酸化マーカーおよび活性酸素代謝物を測定し、HBO曝露における酸化ストレス評価に有用なマーカーであるか否かを検討した。

## 方法

対象は、健常者10名(男性3名、女性7名、平均年齢 $32.8 \pm 5.4$ 歳)とした。被験者は、東京医科歯科大学附属病院高気圧治療部に設置してある中村鐵工所製(NHC-412-A型)においてUS Navy治療表Table 6のプロトコールに従ってHBOに曝露された。酸素吸入用のマスクには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)が使用され、被験者は、酸素流量15L/分のフリーフロー状態で100%酸素を吸入した。

実験に際して、東京医科歯科大学倫理委員会の承認を受け、被験者には実験の目的および参加することによるリスクについて説明がなされ、同意書を得たうえでヘルシンキ宣言を厳守して行われた。被験者には、ビタミン剤およびサプリメントによる抗酸化剤使用者、低容量および中容量ピル服用者、ホルモン系薬剤使用者、喫煙者は含まれていない。

採血は、HBO曝露直前・直後に行われ、採尿は、HBO実施日と翌日のいずれも早朝に行った。測定項目は、血清ROM、尿8-hydroxydeoxy-guanosine(8-OHdG)、血清coenzyme Q<sub>10</sub>(CoQ<sub>10</sub>)濃度、血清CoQ<sub>10</sub>酸化率、血清および尿hexanoyl-lysine(HEL)、血清lipid peroxides(LPO)、血清SOD、血清biological antioxidant potential(BAP)とした。

血清ROMと血清BAP測定については、東京医科歯科大学内のオープンラボ研究機関(株)オルトメディコにおいて、光度計と遠心分離機が内蔵されたディアクロン社製(イタリア)FRAS 4を使用して測定した<sup>10)11)</sup>。尿8-OHdGについてはOsawaらが報告したELISA

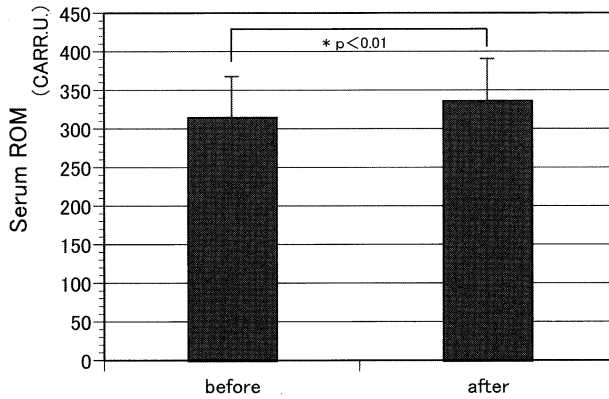


Fig. 1 Change of serum ROM after HBO.

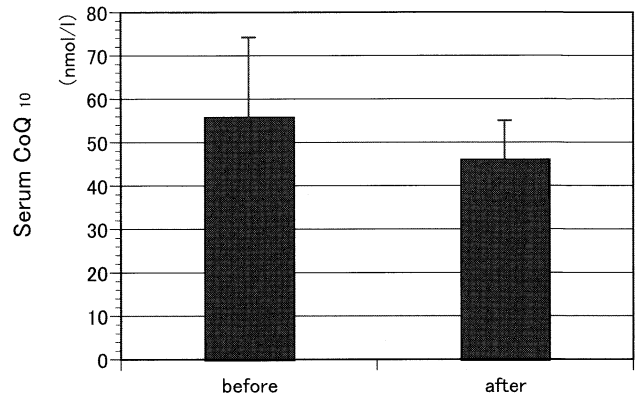


Fig. 3 Change of serum total CoQ10 after HBO.

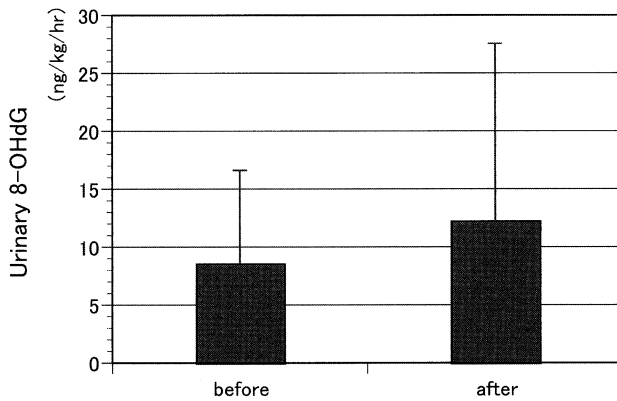


Fig. 2 Change of urinary 8-OHdG formation speed after HBO.

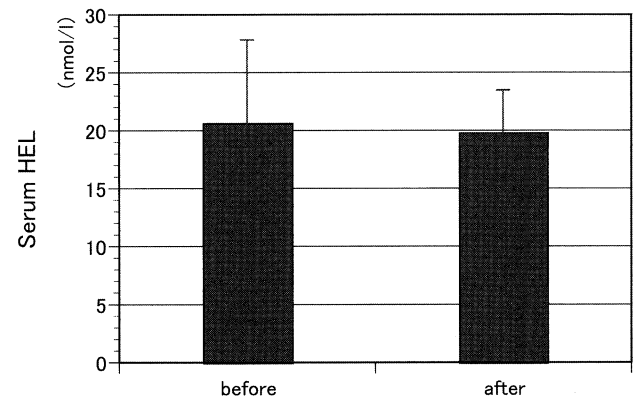


Fig. 4 Change of serum HEL after HBO.

法<sup>12)</sup>, 血清CoQ<sub>10</sub>濃度および酸化率については Yamashita らが開発したHPLC法<sup>13)</sup>, 血清および尿 HELについてはKatoら<sup>14)</sup> が報告したELISA法, 血清 LPOについては八木別法<sup>15)</sup>, 血清SODについては NBT還元法<sup>16)</sup>を用いた。

尚, ROMについては, CARR.U.の単位で算出した。1 CARR.U. (Carratelli Units) は0.08mg/100ml の過酸化水素に相当する<sup>17)</sup>。8-OHdGについては, 体重あたりの生成速度(ng/kg・h)を算出し, HELおよびLPOについては, クレアチニン比を算出して示した。

## 統計

測定値はWindows用 SPSS-PC 11.0 パッケージを使用して分析された。統計分析は, HBO前後の比較において, いずれの項目も対応のあるt検定を用いて比較した。p < 0.05をもって有意と判定し, 表記については平均±標準偏差(mean±SD)とした。

## 結果

酸化ストレスの指標である血清ROMはHBO曝露前に315.3±52.5CARR.U.であったがHBO後は337.0±53.5 CARR.U.となり, 平均値が6.9%増加した(p<0.01) (基準値: 250~320 CARR.U.) (Fig. 1)。酸化・損傷マーカーとされる尿 8-OHdGはHBO曝露前が8.6±8.0ng/kg/h, HBO曝露後が12.3±15.3ng/kg/hであったが有意差はなかった(P=0.07) (Fig. 2)。血清CoQ<sub>10</sub>濃度は, HBO曝露前が56.0±18.2nmol/l, 曝露後が46.2±8.8nmol/lであり有意差はなかった(Fig. 3)。血清CoQ<sub>10</sub>酸化率は, HBO曝露前後ともに0.0%であった。酸化マーカーとされる血清HELの生成速度は, HBO曝露前が21.0±7.2nmol/l, HBO曝露後が19.8±3.6nmol/lで有意差はなかった (Fig. 4)。尿HELは, HBO曝露前が105.8±63.3pmol/mg・crea., HBO曝露後が57.1±14.8pmol/mg・crea.で有意差はなかった (Fig. 5)。血清LPOは, HBO曝露前が0.4±0.3 μM, HBO曝露後

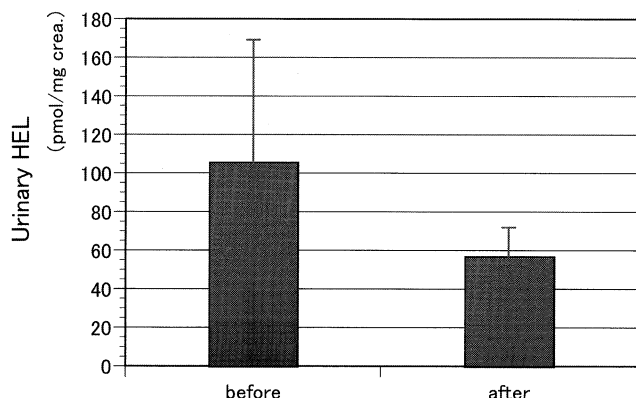


Fig. 5 Change of urinary HEL after HBO.

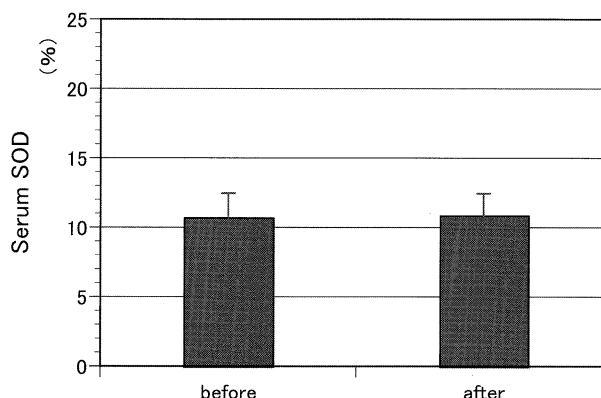


Fig. 7 Change of serum SOD after HBO.

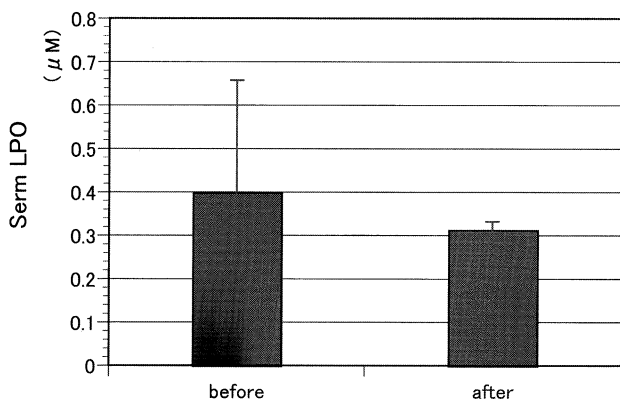


Fig. 6 Change of serum LPO after HBO.

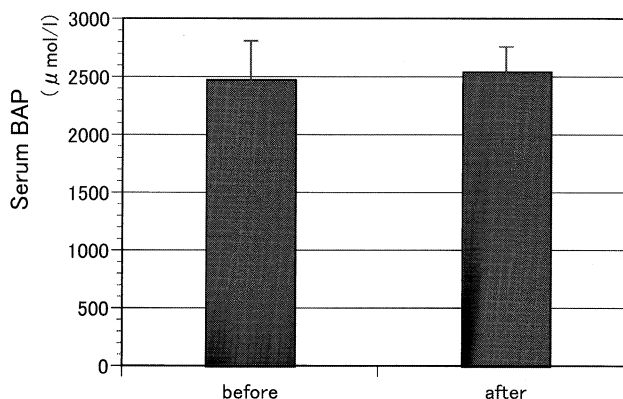


Fig. 8 Change of serum BAP after HBO.

は $0.3 \pm 0.0 \mu\text{M}$ であり有意差はなかった (Fig. 6)。血清SODは、HBO曝露前は $10.7 \pm 1.7\%$ 、HBO曝露後 $10.9 \pm 1.6\%$ であり有意差はなかった (Fig. 7)。抗酸化力の指標となる血清BAPは、HBO曝露前が $2478.1 \pm 329.9 \mu\text{mol/l}$ 、HBO曝露後が $2545.8 \pm 211.7 \mu\text{mol/l}$ で有意差はなかった。

### 考察

本研究では、HBO直後、血清ROM値は増加したが、他の生化学的なマーカーには有意な変化を認めなかった。既存の研究では、HBOによってROSが増加することは知られているが<sup>(6)~(9)</sup>、どのような酸化ストレスマーカーが酸素中毒量を反映するかについては不明である。今回測定したROMはhydroperoxidesを反映する。これまで単回のHBOによってROMが増加することについては報告されていないが、本研究において1回のHBOにおいても酸素分圧と曝露時間によってはROM

が増加することが示唆された。本研究において測定されたROMは、代謝の結果として生じる血中hydroperoxidesを定量的に測定できる酸化ストレスマーカーである<sup>(10)</sup>。一般に、hydroperoxidesに反映されるラジカルはperoxyl radicalやalkoxyl radicalであるが、これらの半減期は数秒といわれているため評価することができない。よって、比較的安定なhydroperoxidesを測定して評価したものである。本研究において測定されたROMは、HBOによって一過性に増加したROS像を観察したことになる。ROM値は、血液中のROS変化を反映しているため、蓄積的な肺酸素中毒の指標とされるUPTDや画像検査による評価と一致して変化するとは考えがたいが、HBOの圧力や曝露時間、曝露回数によって変化する可能性はあると考える。

本研究では、酸化・損傷マーカーのひとつとして8-OHdGを測定した。8-OHdGは、細胞中のDNA構成成分であるdeoxyguanosine (グアニン塩基) が

hydroxyl radicalによって酸化・損傷される際に生じるため、近年、疾病やスポーツ時の酸化ストレス評価に使用されてきている<sup>18)19)</sup>。8-OHdGは、細胞内において生成され、DNAが修復される過程で細胞外に排出され、血液を経て尿中に排泄される。尿8-OHdG排泄量はDNAの損傷とその修復機能を反映すると考えられているため、生体全体のDNAの酸化的損傷を観察するために有用とされている。8-OHdGは、急性心筋梗塞患者において、再灌流傷害の酸化ストレスの経時的変化を評価できることが報告されている<sup>18)</sup>。運動による酸化ストレス負荷実験においては、最大酸素摂取量45%、60分の運動強度で増加しなかったが、70%、60分の強度で有意に増加したとの報告がある<sup>20)</sup>。このように、尿8-OHdGは、酸素消費量すなわちROSの増加、DNAの酸化的損傷の程度とともに、その排泄量は増加することが考えられている。しかしながら、別の報告では運動後の尿において8-OHdG排泄量は増加せず<sup>22)</sup>、激しい運動を連日繰り返すような負荷がかかったときによく尿8-OHdGは有意に増加するという報告<sup>19)</sup>もあり、測定条件や、身体活動による影響、日差変動を考慮して評価、検討する必要がある。

CoQ<sub>10</sub>は、ミトコンドリアの電子伝達系の構成成分であり、還元型CoQ<sub>10</sub>については、抗酸化作用のある物質として知られている。既存の研究では、高分圧酸素に曝露されたマウスにおいて、CoQ<sub>10</sub>投与群が非投与群と比較して痙攣などの酸素中毒症状が抑制され、死亡率も低下したことが報告されている<sup>23)</sup>。CoQ<sub>10</sub>には、還元型と酸化型が存在し、血漿中の割合はおおよそ96:4とされているが、新生児の誕生など、全身の虚血・再灌流障害が生じた際には酸化型が25%程度にも達することが知られている<sup>24)</sup>。これらの現象から、CoQ<sub>10</sub>の酸化・還元率は、酸化ストレスの評価材料になり、酸化ストレスまたは酸化傷害マーカーとしても有用であることが示唆される。本研究においては、血清CoQ<sub>10</sub>の濃度において、HBO前後で変化がなく、血清CoQ<sub>10</sub>酸化率も影響を受けなかった。CoQ<sub>10</sub>が活性酸素の発生するミトコンドリア内に豊富に存在することから考察すると、酸化・還元にまったく寄与しなかったとは考えにくい、

血清中のCoQ<sub>10</sub>酸化・還元率に反映されるほどではなかったと解釈できる。

当研究では血清および尿HELを測定した。HELはROSによる脂質過酸化過程において脂質ペルオキシドに由来する初期生成物である。よって、脂質過酸化の初期段階を捉える酸化ストレスマーカーといえる<sup>14)</sup>。本研究において、血清および尿HELともに有意な変化はなく、HBOが脂質過酸化に大きく作用することは少ないことが示唆される。緩徐な運動を繰り返す行い、身体が運動に適応したトレーニング状態になると、筋肉のミトコンドリアのSOD、およびSOD活性、血中GSH、赤血球GSH還元酵素は、それぞれ増加し、glutathione S-transferase活性も上昇する。一方、最高心拍数の75%強度に相当する運動を30分以上行くと、SOD、creatinine kinase、乳酸脱水素酵素活性は一時的に高値を示すとともに、血液中のLPOを始めとした過酸化物の濃度は増加する<sup>25)</sup>。しかしながら、本研究においては、Table 6の酸化ストレスは、血清SODおよび血清および尿LPOに影響を及ぼさなかった。

本研究において、抗酸化力の指標のひとつとされるBAP<sup>11)</sup>は影響を受けなかった。Table 6は、日常行われているHBO治療表の中では比較的長時間で、かつ高分圧の酸素を吸入するスケジュールである。生体内の抗酸化物質は、酸化ストレスによって動員され、通常、ROSとはほぼパラレルに変動し、一時的に過剰な酸化ストレスを受けても酸化・抗酸化の恒常性が保たれるといわれている<sup>26)</sup>。本研究においてもHBOの酸化ストレスが抗酸化力に影響するほどのものではないということが示唆される。Kotら<sup>7)</sup>は、測定可能な抗酸化指標に影響が現れない理由のひとつとして、ヒトの酸化ストレスに対する感受性の違いや修復力の差を挙げている。また、それらの違いは遺伝子レベルで決定づけられているともいわれている<sup>27)</sup>。本実験における被験者は、比較的、年齢が若く、基礎疾患もなく、抗酸化能を低下させるようなタバコなどの嗜好品を使用していなかったことも、十分な抗酸化力を備えていた理由ともいえる。

今後、HBOの血液学的な酸化ストレスの評価については、実際の臨床に即した連続的なHBOによる変化、

UPTDとの関連性, さらに鋭敏な検査項目の模索等を進めるべきであると考えます。

## 結語

US Navy Table 6 のHBO曝露によってROSは一過性に増加することが示唆された。ROSを定量的に評価する指標としてROMは比較的鋭敏に反映するため有用と考えられた。

## 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) Clark JM, Lambertsen CJ : Pulmonary oxygen toxicity. A review *Pharmacol Res* 1971; 23: 37-133.
- 3) Clark JM : Oxygen toxicity. In: Bennett PB & Elliott DH, eds. *The Physiology and Medicine of Diving*. 4th ed. London : W.B.Saunders 1993; 121-169.
- 4) Wright WB : Use of the University of Pennsylvania, Institute for environmental medicine procedure for calculation of cumulative pulmonary oxygen toxicity. *U.S.Navy Experimental Diving Unit Research Report* 1972; 2-72.
- 5) Donald KW : Oxygen poisoning in man. I & II. *Br Med J* 1947; 1 : 667-72, 712-7.
- 6) Dennog C, Radermacher P, Barnett YA : Speit G Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 1999; 428: 83-9.
- 7) Kot J, Sicko Z, Wozniak M : Oxidative stress during oxygen tolerance test. *Int Marit Health* 2003; 54: 117-126.
- 8) Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, Pagliarani S, Benvenuti F, et al. : Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clin Biochem* 2004; 37: 312-317.
- 9) 眞野喜洋 秋葉仁 高野尚志 土井庸正 芝山正治 : 高気圧酸素暴露に伴う血中のhydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ )に関する研究. *日本衛生学雑誌* 1987; 42: 570-577.
- 10) Cesarone MR, Belcaro G, Carratelli M, Cornelli U, DeSanctis MT et al. : A simple test to monitor oxidative stress. *Int Angiol* 1999; 18 : 127-130.
- 11) Iorio EL : BAP test. A novel test to assess antioxidant status. Principle, procedure, indications, clinical usefulness and comparative studies. *BAP test and global assessment of oxidative stress* 2003; Dec., 2-7.
- 12) Saito S, Yamauchi H, Hasui Y, Kurashige J, Ochi H, et al. : Quantitative determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) by using ELISA. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2000; 107: 39-44.
- 13) Yamashita S, Yamamoto Y : Simultaneous detection of ubiquinol and ubiquinone in human plasma as a marker of oxidative Stress. *Anal Biochem* 1997; 250: 66-73.
- 14) Kato Y, Mori Y, Makino Y, Morimitsu Y, Hiroi S, et al. : Formation of N $\epsilon$ -(hexanonyl) lysine in protein exposed to lipid hydroperoxide. *J Biol Chem* 1999; 274:20406-20414.
- 15) 北島勲 : LPO. *日本臨床* 2004; 62 suppl 11 : 529-531.
- 16) Beauchamp C, Fridovich I : Superoxide dismutase : Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971; 44: 276-287.
- 17) Verde V, Fogliano V, Ritieni A, Maiani G, Morisco F, et al. : Use of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine to evaluate the oxidative status

- of human plasma. *Free Radical Research* 2002; 36: 869-873.
- 18) Nagayoshi Y, Kawano H, Hokamaki J, Miyamoto S, Kojima S, et al. : Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels increase after reperfusion in acute myocardial infarction and may predict subsequent cardiac events. *Am J Cardiol* 2005; 95: 514-517.
- 19) Okamura K : Effect of repeated exercise on urinary 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans. *Free Rad Res* 1997; 26: 507-514.
- 20) 中島早苗, 井下香織, 蒲原聖可, 大野誠 運動負荷後の尿中8-OHdGおよび血中抗酸化物質の動態 *体力科学* 2004; 53: 813.
- 21) Morillas- Ruiz j, Zafrilla P, Almar M, Cuevas MJ, Lopez FJ, et al. : The effects of an antioxidant-supplemented beverage on exercise-induced oxidative stress: results from a placebo-controlled double-blind study in cyclists. *Eur J Appl Physiol* 2005; 95: 543-549.
- 22) Sumida S : No influence of a single bout of exercise on urinary excretion of 8-hydroxydeoxyguanosine in humans. *Biochem Mol Bio Tnt* 1997; 42: 601-609.
- 23) Bertelli A, Bertelli AAE, Giovannini L, Spaggiari P : Protective synergic effect of coenzyme Q<sub>10</sub> and carnitine on Hyperbaric oxygen toxicity. *Int J Tiss Reac* 1990; 12 : 193-196.
- 24) Hara K, Yamashita S, Fujisawa A, Ogawa T, Yamamoto Y : Oxidative stress in newborn infants with and without asphyxia as measured by plasma antioxidants and free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 244-248.
- 25) Maughan RJ : Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. *Muscle Nerve* 1989; 12: 332-336.
- 26) Rothfuss A, Dennog C, Speit G : Adaptive protection against the induction of oxidative DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1913-1917.
- 27) Perera FP, Whyatt RM : Biomarkers and molecular epidemiology in mutation/cancer research. *Mutat Res.* 1994; 313(2-3) : 117-29.