

称号及び氏名	博士（獣医学）	石橋 真紀
学位授与の日付	平成28年3月31日	
論文名	低用量高圧酸素療法が犬血液中 glutathione peroxidase におよぼす影響	
論文審査委員	主査	大橋 文人
	副査	笹井 和美
	副査	長谷川 貴史
	副査	秋吉 秀保

論文要旨

諸言

高圧酸素療法 (hyperbaric oxygen therapy; HBOT) は、大気圧よりも高圧条件下で、高濃度の酸素を一定時間吸入する治療である。近年、HBOT により、抗酸化酵素活性が上昇し、酸化ストレスを軽減する可能性が示唆されており、炎症や腫瘍の抑制に効果が期待されている。

しかし、HBOT は専門医療機関でしか実施できない。そのため、獣医学領域で普及しつつあるのは低用量高圧酸素療法 (lower-hyperbaric oxygen therapy; L-HBOT) で、1.3 atmosphere absolute (ATA)、酸素濃度 21-30% に調整した専用チャンパー内に、30-60 分入る方法である。人では、主にストレス軽減や疲労回復を目的として使用されているが、L-HBOT の抗酸化酵素への影響を検証した報告はなく、また、それ以外の生体への影響も明らかでない。そこで、本研究は、L-HBOT を犬に実施し、その際の酸化ストレス等の生体反応を評価することを目的とした。

酸化ストレスに関する測定項目として、活性酸素種、および抗酸化酵素が挙げられる。中でも一般的なものに、glutathione peroxidase (GPx) 活性測定がある。GPx は、主に glutathione reduced (GSH) の存在下で、活性酸素種を還元する細胞内外の主要な抗酸化酵素である。GPx は生体の組織により異なるアイソザイム

が存在しており、各アイソザイムは分子量や存在量が異なっていることがわかっている。

GPx 活性測定には、サンプル中の GPx が hydroperoxide を還元する際に、GSH と glutathione generated が glutathione reductase を触媒として酸化還元反応を繰り返す GSH サイクルと共役させ、NADPH の減少を 340 nm で測定し算出するという方法がよく用いられる。しかし、この方法は、実際の GPx 活性を測定しているわけではなく、また、前述のように、GPx は部位により存在するアイソザイムの種類や量が異なるため、測定するサンプルが異なると、まったく違う結果が得られ、誤った解釈を招きかねない。

そこで、本研究の第 1 章にて、GPx 活性測定において頻繁に使用されるサンプルである、赤血球、および血漿を用いて、両者の間の GPx 活性の差を検証した。また、第 2 章において、より正確な GPx 活性の変化を検証できるように、GPx アイソザイムごとの活性を測定する方法を検証した。第 3 章では、犬に L-HBOT を実施し、血液中 GPx 活性に対する影響を、先の研究で確立した方法を用いて検証した。さらに、HBOT により影響を受けるとされる、炎症反応の指標や内分泌ホルモンなどのストレス関連指標についても検証した。

第 1 章 GPx 活性測定キットによる犬血液成分中 GPx 活性の差の検証

GPx 活性測定において、血液をサンプルとする場合は、赤血球、血清、および血漿を使用するケースが多いが、赤血球と血漿に存在する GPx アイソザイムの存在量が異なるため、対象とするサンプルが異なると、GPx 活性に差が出る可能性が考えられる。しかし、このサンプル間の差を十分考慮している文献は多くない。

また、EDTA を含む抗凝固剤を使用すると、GPx の構成タンパク質に含まれるセレンがキレートされ、GPx が変質する可能性があり、GPx 活性測定結果に影響をおよぼす可能性が人で指摘されている。

そこで、本章では、犬の血液をサンプルとして GPx 活性を測定する際、血清、血漿、および赤血球間で GPx 活性の差を検証した。さらに、血漿、または赤血球を分離する際に、使用する血液抗凝固剤の種類間で、GPx 活性の差を検証した。

その結果、すべての血液成分において、血液抗凝固剤による GPx 活性の差を認めなかったことから、EDTA を含む抗凝固剤は GPx 活性測定に影響はないと考えられた。しかし、過去の報告では、人の血液において、ヘパリン Na を血液抗凝固剤として使用した場合のほうが、EDTA を含む抗凝固剤を使用した場合と比較し、血漿および赤血球中 GPx 活性が有意に高値を示した。そのため、GPx 活性測定に際し、ヘパリン Na を血液抗凝固剤として使用するのが望ましいと考えられた。

また、血漿、血清と比較し、赤血球中 GPx 活性が有意に高値を示した ($P < 0.01$)。このことから、犬血液においても人での報告と同様に赤血球中 GPx の存在量が

多い可能性が示された。この結果から、用いるサンプルを誤ると、有意な結果が得られない可能性が考えられる。また、赤血球中の GPx は、生体の酸素循環による酸化の影響を受けているため、第 3 章で、酸素循環に影響をおよぼす L-HBOT を用いた実験を行う際、赤血球をサンプルとする必要があると考えた。

第 2 章 血液成分をサンプルとした GPx アイソザイム分離および活性測定方法の確立

一般的な GPx 活性測定方法では、GPx アイソザイムごとの活性を測定することができない。しかし、L-HBOT は、特定の GPx アイソザイムに影響をおよぼす可能性がある。そこで、GPx アイソザイムの分離、染色が必要であるが、過去に犬血液をサンプルとした方法は報告されていない。

そこで、本章では、犬血液成分中の GPx アイソザイムを非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (native-PAGE) により分離し、分離した各アイソザイムの活性を活性染色 MP 法で測定することを試みた。

その結果、赤血球、血漿ともに、異なる分子量をもつバンドを検出した。この結果は、赤血球と血漿で異なる GPx アイソザイムが存在することを示している。また、赤血球サンプルより分離したバンドのうち 1 本が、GPx 標準として同時に泳動したヒト GPx1 と同じ位置に検出された。したがって、本法により GPx アイソザイムの分離、および描出が可能であることが示された。

さらに、ヒト GPx1 の濃度を段階的に変えて同方法を実施したところ、濃度依存性にバンドの面積が変化した。この結果から、本方法を用いて、バンドの面積から GPx アイソザイムの濃度を算出可能であると考え、次の章で用いることとした。

第 3 章 L-HBOT 実施による犬赤血球中 GPx への影響の検証

L-HBOT が犬の酸化ストレスにおよぼす影響を検証するため、健常犬、および手術を実施する疾患犬を用い、L-HBOT を 3 日間実施し、赤血球中 GPx 活性を第 1 章で用いた方法で、赤血球中 GPx アイソザイム活性、および濃度を第 2 章で用いた方法で比較した。また、HBOT が影響をおよぼし、酸化ストレスと関係の深い、炎症反応、および精神的ストレスについても評価するため、炎症反応指標として白血球数 (WBC) および C 反応性タンパク質 (CRP) 濃度を、精神的ストレス指標として血液中コルチゾール濃度を比較した。

その結果、疾患犬 L-HBOT 実施群において、疾患犬 L-HBOT 非実施群と比較し、術後増加した WBC、および CRP 濃度が有意に減少した ($P < 0.05$)。このことから、L-HBOT は、術後の炎症反応を抑制すると考えられた。また、疾患犬 L-HBOT 非実施群において、コルチゾール濃度が高い傾向にあった。このことから、L-HBOT は、手術や環境の変化による精神的ストレスを軽減する可能性が示唆された。

一方、GPx 活性、GPx アイソザイム活性、および濃度について、有意差を認めなかった。L-HBOT 長期実施では、生体の抗酸化酵素産生促進作用が減退する可能性が指摘されており、本研究も同様の結果となった。

HBOT および L-HBOT による生体への影響に関する報告はいまだ少ないため、今後も L-HBOT の条件を変更するなどさらなる研究が必要である。

結論

1. 血液をサンプルとして犬の GPx 活性を測定する際、ヘパリン Na を血液抗凝固剤とする必要がある。また、L-HBOT のように酸素循環に影響をおよぼす実験においては、赤血球をサンプルとする必要がある。
2. 犬血液中 GPx アイソザイム活性測定方法について検証し、native-PAGE と活性染色 MP 法の組み合わせが有用であることが示唆された。
3. L-HBOT は、手術を受けた犬において、術後の炎症反応を抑制する可能性が示唆された。

審査結果の要旨

高圧酸素療法 (HBOT) は、大気圧より高圧条件下で、高濃度の酸素を吸入する治療方法である。HBOT の作用のひとつに、酸化ストレスへの影響が挙げられる。酸化ストレスとは、生体に発生する活性酸素種が増加し、それらを分解する抗酸化酵素の働きが追いつかなくなった結果、生体に悪影響をおよぼすことを指す。そのため、酸化ストレスを評価するには、抗酸化酵素活性を測定することが有用であり、中でも **glutathione peroxidase (GPx)** 活性は多くの文献で測定されている重要な指標である。HBOT は、この GPx 活性を増加し、生体の抗酸化力を増強すると報告されており、炎症や腫瘍の抑制にも効果が期待されている。しかし、HBOT の実施は人の専門医療機関でしか認められておらず、また、高圧、高濃度酸素による爆発や火災等の危険も懸念されている。そこで、獣医療分野では、HBOT よりも低圧かつ低濃度で行う低用量高圧酸素療法 (L-HBOT) が普及しつつある。しかし、L-HBOT が生体におよぼす影響について検証した報告はない。

本研究では、L-HBOT が犬の血液中 GPx におよぼす影響を検証し、下記の結果を得た。

第 1 章では、犬血液中 GPx 活性測定において、使用する血液成分を決定するために、健常ビーグル犬 4 頭から採取した静脈血を、血清分離管、ヘパリン Na 添加管、EDTA-2Na 添加管および EDTA-2K 添加管に分注し、それぞれより血

清、血漿および赤血球を採取し、**GPx** 活性を測定した。その結果、他の血液成分と比較し、赤血球で有意に **GPx** 活性が高値を示し、血液成分間で **GPx** 活性に大きな差があることを明らかにした。一方、使用した血液抗凝固剤間で **GPx** 活性に差を認めなかったが、**EDTA** は **GPx** に含まれるセレンをキレートすることから、ヘパリン **Na** を血液抗凝固剤として使用することを提案した。

第 2 章では、**GPx** 活性をより詳細に検証するため、**GPx** アイソザイムの分離および活性測定方法を確立することを目的とし、第 1 章で採取したヘパリン **Na** 添加犬赤血球、血漿サンプル、ヒト **GPx1** およびウシ赤血球 **GPx** を用い、非ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (**native-PAGE**) および活性染色 **MP** 法による **GPx** アイソザイム分離、染色を試みた。その結果、犬赤血球、ウシ赤血球 **GPx** で 2 本、犬血漿、ヒト **GPx1** で 1 本のバンドを検出し、バンドの位置から犬血液サンプルのバンドは **GPx** アイソザイムであると考えられ、本研究で確立した方法により犬血液中からの **GPx** アイソザイム分離、活性測定が可能であることを示した。また、ヒト **GPx1** は、濃度依存性にバンド面積が変化しており、本方法により、**GPx** アイソザイム濃度の測定も行える可能性が示唆された。

第 3 章では、**L-HBOT** が犬の赤血球中 **GPx** に与える影響を検証するため、健康ビーグル犬および外科手術を実施した疾患犬を用い、健康犬 **L-HBOT** 実施群 (**control: L-HBOT 3 日間実施、n = 6**)、疾患犬 **L-HBOT** 非実施群 (**non L-HBOT: 術後 1 日目よりケージ内 30 分間留置 3 日間実施、n = 6**)、疾患犬 **L-HBOT** 実施群 (**L-HBOT: 術後 1 日目より L-HBOT 3 日間実施、n = 6**) の 3 群を設け、各日 **L-HBOT** またはケージ内留置後に静脈血を採取し、白血球数、**C** 反応性タンパク質濃度、コルチゾール濃度および赤血球中 **GPx** 活性を測定した。また、第 2 章の方法を用い、赤血球中 **GPx** アイソザイム活性および濃度を測定した。その結果、**L-HBOT** 群で、術後白血球数が有意に減少し、**L-HBOT** 実施が犬の術後炎症反応を抑制する可能性を示唆した。**GPx** 活性、**GPx** アイソザイム活性および濃度に **L-HBOT** 実施による差はなく、**L-HBOT** が犬赤血球中 **GPx** に与える影響は少ないことを明らかにした。一方で、分離された **GPx** アイソザイムのひとつが、疾患犬で術前に低値を示し、このアイソザイムは加齢や疾患の有無に影響を受ける可能性が高いことを示した。

本研究は、過去に報告のない、犬における **L-HBOT** 実施に関する貴重なデータを提供するとともに、犬血液中からの **GPx** アイソザイムの分離、染色方法を初めて報告した。これらの成績は、臨床獣医学における術後管理分野において大きく貢献するとともに、近年注目度の高い酸化ストレス研究にも貴重な知見を提供し、分子生物学、生理学においても重要な報告であるものと評価する。

本論文の審査および最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。