

環境温度とグルタチオン代謝

大塚吉則¹⁾ 藪中宗之²⁾ 野呂浩史²⁾ 渡部一郎²⁾ 阿岸祐幸¹⁾

1) 北海道大学医学部リハビリテーション医学講座

2) 北海道大学医学部附属病院登別分院内科

Ambient Temperature and Glutathione Metabolism

Yoshinori Ohtsuka, Noriyuki Yabunaka, Hiroshi Noro, Ichiro Watanabe and Yuko Agishi

1) Department of Rehabilitation and Physical Medicine, Hokkaido University School of Medicine

2) Internal Medicine, Noboribetsu Branch Hospital, Hokkaido University School of Medicine

要旨

環境温度のグルタチオン代謝に与える影響を知る目的で、健康人を水温を変化させて10分間浸漬して採血した。39℃では赤血球グルタチオン代謝、過酸化脂質濃度(LPO)とも変化しなかった。42℃では還元型グルタチオン(GSH)濃度は 2.44 ± 0.14 から 1.80 ± 0.10 mM ($p < 0.0005$, Mean \pm SEM)に減少し、LPO値は 1.87 ± 0.03 から 2.06 ± 0.04 nmol/mlrbcへと増加した($p < 0.01$)。一方25℃ではGSH濃度は 2.46 ± 0.17 から 2.91 ± 0.17 mMへ上昇し($p < 0.05$)、LPO値は変化を示さなかった。グルタチオン還元酵素活性は25℃においてのみ活性型が増加した。グルタチオン過酸化酵素活性は42℃において減少し、25℃において増加した。これらのことから、熱ストレスは生体に酸化的ストレスを与え、寒冷ストレスは抗酸化防御機構を増強していると考えられた。したがって、抗酸化防御機構の低下している糖尿病などの患者は高温環境をできるだけ避けることが望ましいと思われた。

Abstract

To elucidate the effect of heat and cold stress on glutathione metabolism, we immersed men at 3 different water temperatures for 10 min. Peripheral red blood cells were collected before, immediately after, 10 min and 30 min after the end of the immersion. At 39°C, no remarkable changes were observed in the levels of reduced glutathione (GSH) nor in lipid peroxides (LPO). GSH concentration decreased from 2.44 ± 0.14 to 1.80 ± 0.10 mM ($p < 0.0005$, Mean \pm SEM) and LPO levels increased immediately after the

immersion at 42°C (1.87 ± 0.03 to 2.06 ± 0.04 nmol/mlrbc, $p < 0.01$). On the contrary, levels of GSH increased from 2.46 ± 0.17 to 2.91 ± 0.17 mM ($p < 0.05$) after the immersion at 25°C, and those of LPO showed no changes at this temperature. The activities of glutathione reductase (both active and inactive forms) did not change after the immersion at 42°C, whereas those of active form increased at 25°C. The activities of glutathione peroxidase decreased after the immersion at 42°C, while those activities increased at 25°C. From these findings, it is suggested that heat stress causes oxidative stress in human body; however, cold stress is thought to be beneficial to antioxidative defense system, and that patients with impaired antioxidative defense system such as diabetics had better not expose themselves to hot environmental conditions.

<key words> glutathione, erythrocyte, heat stress, cold stress, lipid peroxide

はじめに

酸素呼吸を行っている生物は絶えず活性酸素種による酸化的ストレスに曝されているが、生体に備わっている防御機構によりこれらの活性酸素種は速やかに除去されている。その防御機構の一つにグルタチオン代謝系が知られているが、今までの赤血球を用いた我々の研究では、糖尿病患者においてこの代謝経路が阻害されていること

別刷請求宛先：大塚 吉則

〒059-04 登別市登別東町3-9 北海道大学医学部附属病院登別分院内科

Reprint Requests to Yoshinori Ohtsuka, Internal Medicine, Noboribetsu Branch Hospital, Hokkaido Univ. School of Medicine, 3-9, Noboribetsu-higashimachi, Noboribetsu, Hokkaido 059-04 Japan

が明らかになっている¹⁾。

グルタチオンはグルタミン酸、システイン酸、グリシンの3種のアミノ酸からなるトリペプチドであり、赤血球中の還元型グルタチオン (GSH) 濃度は約2mM (μ mol/ml) である。H₂O₂などの酸化ストレスが加わると、GSHの存在下でグルタチオンパーオキシダーゼ (GPX) はH₂O₂を還元してH₂Oに解毒し、その際にGSHを過酸化して酸化型グルタチオン (GSSG) に変化させている。生成されたGSSGはグルタチオン還元酵素 (GR) の働きによって還元されてGSHになり再び解毒に利用されるか、またはATP依存性に細胞外に輸送されている²⁾

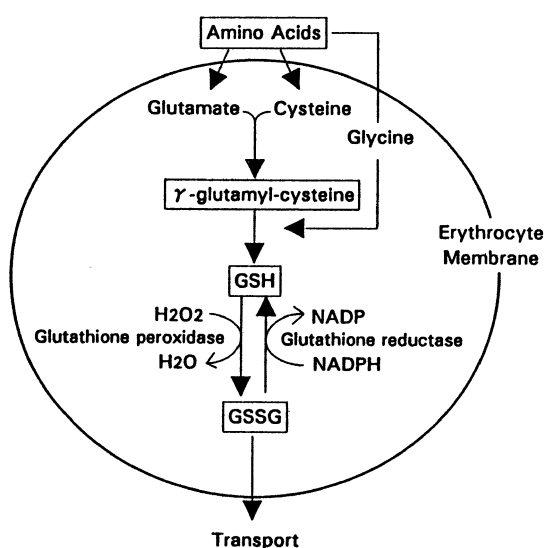


Fig.1 Glutathione metabolism in human red blood cells

(Fig. 1)。

我々の施設には糖尿病患者が運動療法などのリハビリテーション目的で多数入院・通院しており、温泉を利用した温熱療法も行っている。したがって温熱療法の酸化防御機構に与える影響を検討することは、この防御機構が低下している糖尿病患者の治療にとって非常に重要であるので、適切な温度を明らかにする目的で今回検討した。

II. 対象および方法

21名の健常男子大学生を長座位 (膝を伸ばした座位) で、25℃、39℃及び42℃の水中に日を変えて10分間浸漬した。前、直後、10分、30分後に採血して赤血球のグルタチオン代謝と過酸化脂質濃度の変化を検討した。還元型グルタチオン (GSH) 濃度は、酵素リサイクリング法³⁾にて分光光度計で測定し、既知濃度のGSHを用いた標準曲線を作成して、赤血球 (rbc) 単位容積 (ml) 当

りの濃度を計算した。過酸化脂質 (LPO) 濃度はチオバルビツール酸反応物質として分光光度計にて測定し、赤血球単位容積 (mlrbc) 当たりの濃度を計算した⁴⁾。溶血液のグルタチオン過酸化酵素 (GPX)、グルタチオン還元酵素 (GR) 活性は、反応液に含まれるNADPHの消費量を分光光度計にて測定し、単位ヘモグロビン (gHb) 当たりに換算して表した⁵⁾。ヘモグロビン濃度はシアンメトヘモグロビン法で求めた。平均値の差の検定はStudent's *t*-テストを用いて行い、 $p < 0.05$ をもって有意とした。結果は平均 \pm SEで表した。

III. 結果

1. 赤血球のGSH濃度

水温39℃、10分間の水浸ではGSH濃度の変化は認められなかった。42℃では10分間の水浸終了直後に、GSH濃度は 2.44 ± 0.14 から $1.80 \pm 0.10 \mu$ mol/mlrbcへと低下し ($p < 0.0005$)、10分後前値に回復した。一方、水温25℃では 2.46 ± 0.17 から $2.91 \pm 0.17 \mu$ mol/mlrbcへと増加し ($p < 0.05$)、この値は30分後まで増加し続けていた (Fig.

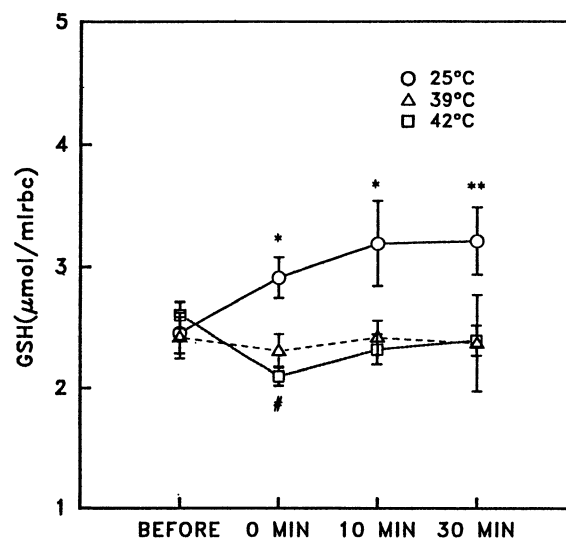


Fig. 2 Effect of thermotherapy on the levels of erythrocyte reduced form of glutathione (GSH). Levels of GSH were determined after the immersion for 10 min at 25°C (○), 39°C (△) and 42°C (□). Values shown are expressed as means \pm SEM for before (BEFORE), at the end of (0 MIN), 10 min (10 MIN) and 30 min (30 MIN) after the end of immersion. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, # $p < 0.0005$ at indicated times versus BEFORE.

2)。

2. 酵素活性

水温39℃、10分間の水浸ではGPX、GR活性の変化は認められなかった。GPX活性は水温42℃での水浸直後に 35.90 ± 1.83 から 34.33 ± 1.66 IU/gHbへと低下し、($p <$

0.01)、10分後に前値に回復した。しかしながら25℃では水浸終了10分後に、 38.22 ± 1.90 から 41.70 ± 2.82 IU/gHbへと増加し ($p < 0.05$)、30分後まで増加し続けた (Fig. 3)。GR活性はFAD非依存性 (活性型)、全活性ともに42℃での変化は認められなかったが、25℃では活性型が水浸終了10分後に高値を示し (5.20 ± 0.42 から 5.68 ± 0.48 IU/gHb、 $p < 0.05$) 30分後まで高値を維持した (Fig. 4)。

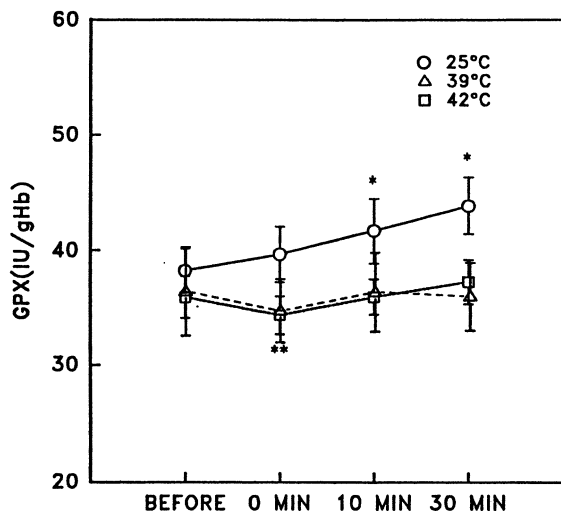


Fig. 3 Effect of thermotherapy on the activities of erythrocyte glutathione peroxidase (GPX). Symbols are expressed as in Figure 2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ at indicated times versus BEFORE.

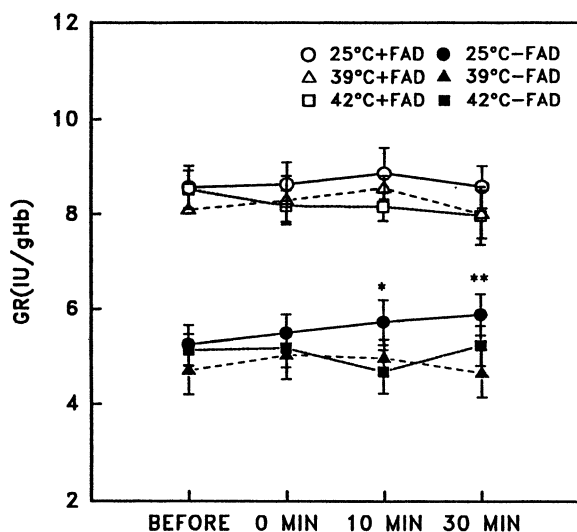


Fig. 4 Effect of thermotherapy on the activities of erythrocyte glutathione reductase (GR). Symbols are expressed as in Figure 2. Open symbols: +FAD (total activity), closed symbols: -FAD (active form)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ at indicated times versus BEFORE.

3. LPO値

水温39℃および25℃では、10分間の水浸でLPO値の変化は認められなかったが、42℃では水浸終了直後に 1.87 ± 0.03 から 2.06 ± 0.04 nmol/mlrbcに増加し ($p < 0.01$) さらに10分間この傾向が持続し、30分後には前値に回復した (Fig. 5)。

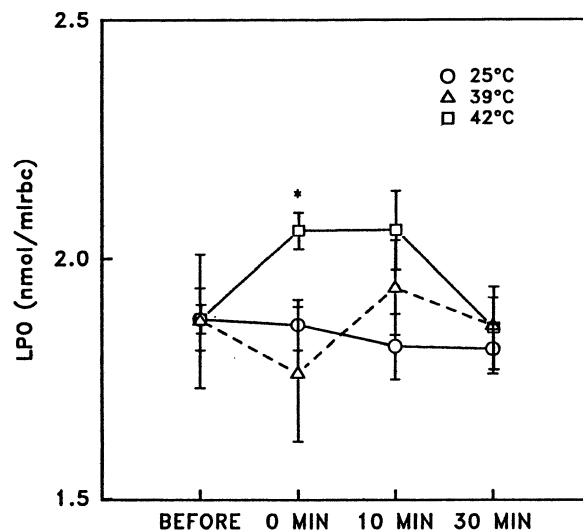


Fig. 5 Effect of thermotherapy on the levels of erythrocyte lipid peroxides (LPO). Symbols are expressed as in Figure 2. * $p < 0.01$ at an indicated time versus BEFORE.

IV. 考察

今回の温度を変えた水浸実験において、赤血球のGSH濃度は39℃では変化は認められなかったが42℃では減少しており (Fig. 2)、高温環境下では何らかの酸化作用を持つ物質がヒト赤血球に作用し、GSHがこれらの物質を除去するために消費されたものと考えられた。この高温環境下における酸化的ストレスの存在を証明するために、赤血球のLPO値を測定したところ42℃でのみ増加しており (Fig. 5)、この温度で産生された過剰の活性酸素種が脂質を過酸化化したものと思われた。また42℃では、GR活性については変化は認められなかったものの、GPX活性が減少していた (Fig. 3、4) ことから、高温ストレスは活性酸素種を産生させるだけでなく、それらの除去に関わる酵素活性をも阻害している可能性が示唆された。

一方、25℃ではGSH量が10分間の水浸により増加しており (Fig. 2)、水浸終了後も30分にわたって増加し続けたことは、機序は不明ではあるが、この温度による効果は、刺激が去った後でもかなりの期間持続していることが示唆された。またGPX、GR活性は両者ともに増加している (Fig. 3、4) ことから、抗酸化防御機構が

25℃の寒冷刺激により強力になっていると考えられ、この温度では産生された活性酸素種を完全に処理することができ、その結果、脂質過酸化物の濃度に変化がなかったものと思われた。

V. 結論

42℃、10分間の水浸による熱ストレスはヒト赤血球に酸化ストレスを与えてグルタチオン代謝に影響を及ぼした。一方25℃、10分間の水浸はヒト赤血球の抗酸化防御機構を誘導させる作用があることが明らかとなった。同様の現象が赤血球のみならず全身に生じているとすれば、糖尿病のような抗酸化防御機構の低下している患者においては、42℃のような高温浴はなるべく避けたほうがよいものと考えられた。

文 献

- 1) Murakami K, Kondo T, et al: Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism* 38:753-758, 1989
- 2) Kondo T, Ohtsuka Y, et al: Erythrocyte-oxidized glutathione transport in pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. *Am J Haematol* 26:37-45, 1987
- 3) Owens CWI, Belcher RV: A colormetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem J* 94:705-711, 1965
- 4) Jain SK, McVie R, et al: Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 38: 1539-1543, 1989
- 5) Beutler E: Red cell metabolism. Beutler E (ed): *A manual of biochemical methods*. Grune & Stratton, Philadelphia, 1984, pp72-76