

原 著

反復温熱刺激のⅡ型糖尿病患者血糖とHbA_{1c} ならびに血小板グルタチオン代謝に及ぼす影響

大塚吉則¹⁾ 藪中宗之¹⁾ 高山 茂¹⁾ 阿岸祐幸²⁾

1) 北海道大学医学部加齢制御医学講座

2) 北海道大学医学部附属病院登別分院

Effect of repeated thermal stimulation on the levels of fasting plasma glucose, HbA_{1c} and platelet glutathione metabolism

Yoshinori Ohtsuka¹⁾ Noriyuki Yabunaka¹⁾ Shigeru Takayama¹⁾ Yuko Agishi²⁾

1) Department of Gerontotherapeutics, Hokkaido University School of Medicine

2) Noboribetsu Branch Hospital, Hokkaido University School of Medicine

要約

糖尿病患者の抗酸化防御機構に与える反復温熱刺激の影響を知る目的で、インスリン非依存性糖尿病患者12名において、1ヶ月の温泉療法前後で血小板グルタチオン代謝を検討した。水温39~40℃で一日2、3回の入浴を指導した。温泉治療前の還元型グルタチオン(GSH)値は空腹時血糖(FPG)値と正相関があり($r=0.692$, $P<0.05$)、糖尿病(酸化的ストレス)のためにGSH合成が誘導されていた。GSH値はFPG値が150mg/dl未満のコントロール良好群では、温泉療法後上昇し($P<0.01$)、150以上のコントロール不良群では減少しており($P<0.05$)、温泉療法により酸化的ストレスが軽減されていた。グルタチオン過酸化酵素(GPX)活性値はFPG値と負の相関があり($r=-0.430$, $P<0.05$)、糖尿病患者における抗酸化防御機構の障害が示唆された。また、GPX活性値は温泉療法後合併症が重症な例で低下し、この様な例では抗酸化防御能が回復しづらいと考えられた。過酸化脂質値は重症な合併症のある患者で温泉療法後低下した。以上より、糖尿病患者の血小板グルタチオン代謝は温泉療法により改善される部分があり、この温泉療法の効用は糖尿病合併症の存在や血糖値に依存しているものと考えられた。(臨床環境5:67~71, 1996)

Abstract

To know the effect of repeated thermal stimulation on antioxidative defense system in patients with diabetes, glutathione metabolism in the platelet was studied before and after one month balneotherapy in 12 non-insulin-dependent diabetic patients. The patients were instructed to take a bath twice or thrice a day at water temperature of 39°C~40°C. Before the balneotherapy, the levels of GSH in the platelet were well correlated with those of fasting plasma glucose (FPG, $r=0.692$, $P<0.05$), which suggested that GSH synthesis was induced by diabetes (or oxidative stress). After the balneotherapy, in well-controlled patients (FPG<150 mg/dl), the level of GSH increased ($P<0.01$), and in poorly controlled patients (FPG≥150 mg/dl), the level decreased ($P<0.05$). These findings indicate that oxidative stress is decreased by balneotherapy. There was a negative correlation between glutathione peroxidase (GPX) activities and the levels of FPG ($r=-0.430$, $P<0.05$), which implied that antioxidative defense system was damaged in diabetic patients. After balneotherapy, the GPX activity decreased in patients with severe diabetic complications, indicating that in these patients antioxidative defense system hardly recovered. The levels of lipid peroxide (LPO) also decreased in these patients. From these findings, we conclude that, the platelet glutathione metabolism can be partly improved by balneotherapy, and the favorable effect of balneotherapy seems to be dependent on the existence of diabetic complications and the plasma glucose level. (Jpn J Clin Ecol 5:67~71, 1996)

《Key words》 diabetes mellitus, balneotherapy, platelet, glutathione, lipid peroxide

別刷請求宛先: 大塚吉則

〒060 札幌市北区北15条西7丁目 北海道大学医学部加齢制御医学講座

Reprint Requests to Yoshinori Ohtsuka, Department of Gerontotherapeutics, Hokkaido University School of Medicine, N-15, W-7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060 Japan

I. 緒言

酸素呼吸を行っている生物は絶えず種々の活性酸素種の脅威に曝されているが、生体にはグルタチオンをはじめとした抗酸化防御機構が備わっているため、速やかにこれらは除去されている。ところが、糖尿病や虚血性心疾患などの疾患群では、この防御機構が障害されているため酸化ストレスが増加していることが報告されている¹⁻³⁾。一方、熱ストレスも生体に酸化ストレスを与えて抗酸化防御機構に影響を与えており⁴⁾、我々のヒトを用いて行った水浴実験でも、42℃の高温浴では生体に酸化ストレスが働く結果、赤血球や血小板のグルタチオン代謝に変化が生じていた。しかしながら、36℃や39℃では変化が認められず、抗酸化防御機構の低下している患者には39℃程度の温浴が望ましいものと報告している⁵⁻⁷⁾。このヒトにおける水浸実験は、10分間の1回水浴の効果を検討したものであるが、繰り返し加えられる温熱刺激が生体の抗酸化防御機構に与える影響は知られていない。糖尿病患者では血小板のグルタチオン代謝が障害を受けており^{8,9)}、前述のように1回の温熱負荷も血小板のグルタチオン代謝に影響を及ぼすので、繰り返し加えられる温熱刺激が糖尿病患者の血小板グルタチオン代謝にどのような影響を及ぼすのかは興味深い。この反復温熱刺激の代表例として温泉療法が挙げられる。今回の実験目的は、糖尿病患者の障害されている血小板グルタチオン代謝が、温泉療法を行うことにより、入浴温度を注意していてもさらに障害が進行するものなのかどうか、あるいは適切な温度を設定することでこの障害されたグルタチオン代謝機構が回復してくるものなのかどうかを検討することである。

II. 対象および方法

1. 対象および実験方法

II型（インスリン非依存性）糖尿病患者12名（男7名、女5名、平均年齢62.4±2.4歳、平均罹病期間14.3±2.0年）において、入院時と温泉療法約4週（平均28.6±3.1日）後の早朝空腹時に、駆血帯を使用せずに静脈血採血を行い、血小板の還元

型グルタチオン（GSH）値とグルタチオン過酸化酵素（GPX）活性値、過酸化脂質（LPO）値を測定した。温泉療法は1日2回前後の温泉浴（Na₂SO₄-NaCl泉、39~40℃の温浴を指導）と水温37~38℃での水中運動30分間を含む運動療法を行い、基本的な食事療法を個人に合わせた処方し、血糖値のなかなか改善しない例には必要に応じて薬物療法を併用した。

2. 生化学的測定方法

血小板浮遊液は既報の方法⁸⁾で調製した。血小板のGSH含量は血小板浮遊液に過塩素酸を加えて除蛋白した試料を炭酸カリウムにて中和させた後、酵素リサイクリング法を用いて測定した^{5,6)}。LPO値、GPX活性値は-70℃にて凍結保存した血小板浮遊液を用いて以前の報告と同様に測定した^{5,6)}。試料の蛋白濃度はBCA試薬を用いて牛血清アルブミンを標準として測定した。得られた結果は単位蛋白濃度あたりに換算した。

3. 材料

GSH、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）、牛血清アルブミンはSigma社より、ビシンコニン酸（BCA）試薬はPierce社より、グルタチオン還元酵素（GR）はオリエンタル酵母から購入した。その他の試薬は特級を用いた。

4. 統計処理

平均値の差の検定はpaired t-testを用いて行い、P<0.05をもって有意とした。結果は平均±SEMで表わした。相関関係はlinear regression analysisを用いて行った。

III. 結果

約4週の反復温熱刺激である温泉療法により、空腹時血糖（FPG）値は151±12mg/dlから117±7mg/dlへと低下し（P<0.01）、HbA_{1c}値は7.5±0.5%から6.7±0.5%へと低下傾向を示した。入院時の血小板GSH値はFPG値と有意の正相関があった（Fig. 1, r=0.692, p<0.05）。約1ヶ月の温泉療法により、入院時FPG値が150mg/dl以上の比較的コントロールが不良の群では、上昇していたGSH値が1例を除き全例（n=5）低下し（P<0.05）、

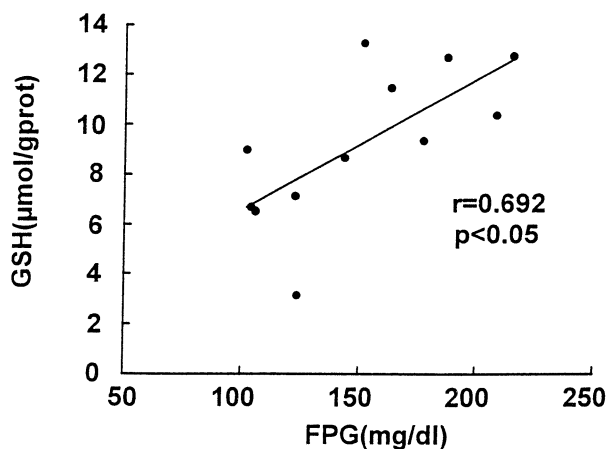


Fig. 1 Relationship between the levels of platelet reduced form of glutathione (GSH) and the fasting plasma glucose (FPG) levels in type II diabetic patients on admission.

150mg/dl未満の比較的コントロールが良好の群では、低下していたGSH値が全ての例 (n=6) で有意に上昇した (P<0.01, Fig. 2)。GPX活性値は治

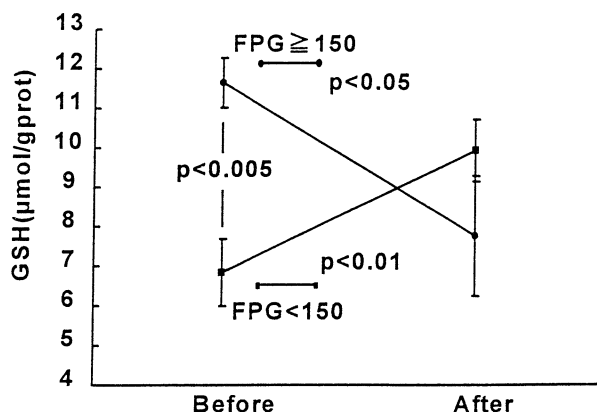


Fig. 2 Effect of balneotherapy on the levels of platelet GSH in type II diabetic patients.

療前後でデータをまとめるとFPG値と負の相関が認められた (Fig. 3, $r = -0.430$, $P < 0.05$)。温泉療法により5例にGPX活性値の上昇 (前値に比べて10%以上) を認めたが、3例は減少 (10%以上) し、4例は変化しなかった (Fig. 4)。LPO値は上昇例 (10%以上) 4例、低下例 (10%以上) 4例、残りは変化を示さなかった (Fig. 5)。これらGPX活性値とLPO値の変化は入院時の血糖値の高低とは関係がなかった (図は示さない)。

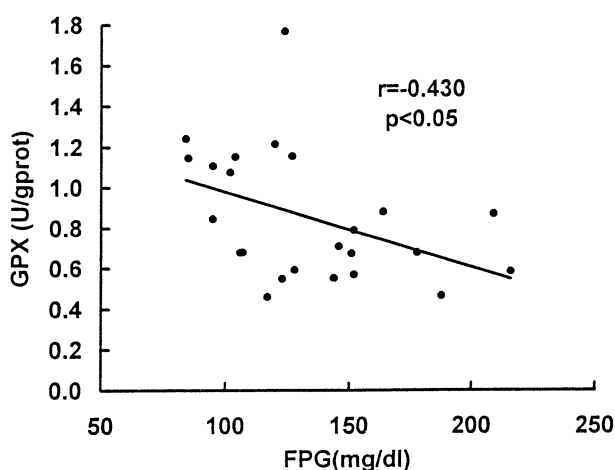


Fig. 3 Relationship between the activities of platelet glutathione peroxidase (GPX) and FPG levels in type II diabetic

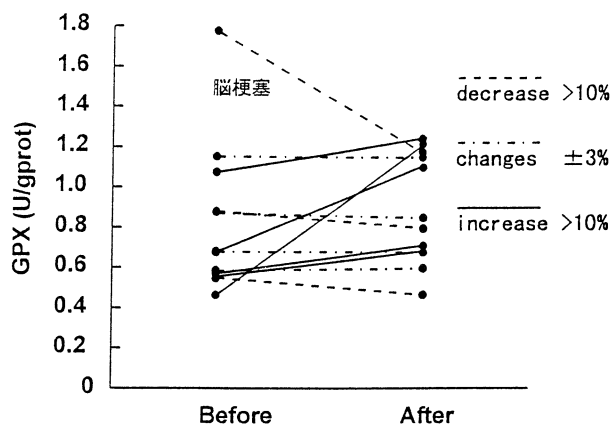


Fig. 4 Effect of balneotherapy on the GPX activities.

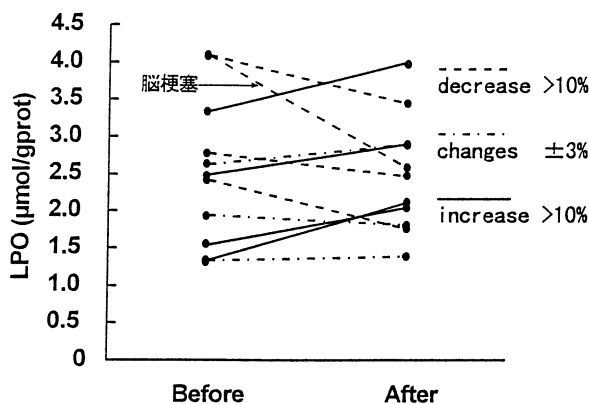


Fig. 5 Effect of balneotherapy on the levels of lipid peroxide (LPO).

IV. 考按

血小板凝集能の亢進が糖尿病や虚血性心疾患の患者で報告されており、合併症の進展や病態の形成に重要な役割を果たしている^{8,9)}。これらの疾患では酸化ストレスに対する防御機構も障害されているため¹⁻³⁾、血小板中に蓄積した過酸化物が、アラキドン酸カスケードにおけるシクロオキシゲナーゼ活性を上昇させ、トロンボキサン合成を増加させて血小板凝集能を亢進させている¹⁰⁾。一方、温泉浴後の血栓症発症の一因に血小板機能の活性化が考えられている¹¹⁾。また血小板を直接43℃でインキュベーションしてもその機能が活性化されることが報告されている¹²⁾。これらから温熱ストレスと血小板機能には何らかの関連が考えられる。熱ストレスは酸化ストレスとなり⁴⁾、また42℃のような高温浴後に酸化ストレスが生じて赤血球や血小板中に過酸化脂質が蓄積してくることを見出している⁵⁻⁷⁾ので、高温浴は血小板機能を亢進させるものと考えられる。

今回の糖尿病患者では、入院時の血小板GSH値とFPG値には有意の正相関があり、測定はできなかったが、GSHの合成が酸化ストレスにより誘導されていることが示唆された。温泉療法は1回水浴では酸化ストレスにはならなかった39℃～40℃程度の温浴を指導した。その結果、コントロールが比較的不良でGSH値が上昇していた群では、温泉療法後GSH値の減少を認め、酸化ストレスの低下が考えられた。逆にコントロール良好群では温泉療法後GSH値は上昇し、抗酸化防御機構の増強が示唆され、両者でGSH値に差がなくなった。このGSH値の変化は生体のホメオスタシスの維持に重要な副腎皮質ホルモンの一つである血中コーチゾールの温泉療法時における経時的変化¹³⁾（温泉療法によりある一定の正常域に収斂してくる）と類似しており、温泉療法におけるいわゆる正常化作用¹⁴⁾と考えられた。

血小板のH₂O₂などを除去するGPX活性値はFPG値と有意の負相関を認め、糖尿病患者における抗酸化防御機能の障害を示しており、今までの報告と一致していた⁹⁾。この低下しているGPX活性値は温泉療法により12例中5例（42%）において前

値よりも10%以上の増加を示したが、10%以上悪化した例（3例、25%）も存在した。この悪化した3例は糖尿病性合併症（眼症、腎症、神経障害など）が他の患者に比して重症であり、一人は脳梗塞を合併していたことから、重篤な合併症を伴う糖尿病患者では、温泉療法を行っても抗酸化防御能が回復しづらいものと思われた。次にLPO値の変化であるが、重症な合併症のある患者（4例）において温泉療法後10%以上の低下を認め、生体にとっては好都合であった。しかしながら、合併症の比較的軽い、あるいはない例（4例）において上昇を示したことは、血小板機能を活性化させる可能性もあるので、温泉療法は慎重に行わなければならない。LPO値の変動が血小板機能にどの程度の影響を与えるのかは今のところ詳細は不明であり、今後の検討課題である。

温泉療法は種々の療法からなる複合療法であり、今回認められた血小板グルタチオン代謝の改善も、単に39℃～40℃の温浴のみが効果をもたらしたとは考えづらい。しかしながら少なくともこの温度では酸化ストレスは生じないので、温泉療法の際には入浴温度にも十分注意しなければならないと思われる。

V. 結論

温浴（39℃～40℃）による温熱刺激を反復する温泉療法は、糖尿病のために障害された血小板のグルタチオン代謝を正常な状態に回復させる作用があり、したがって血小板凝集能も正常化してくる可能性がある。この作用は、血糖値のコントロール状態や合併症の有無などにより反応が異なる場合があるので、温泉療法は注意深く行う必要がある。

文献

- 1) Bono A, Caimi G, et al : Red cell peroxide metabolism in diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 19 : 264-266, 1987
- 2) Murakami K, Kondo T, et al : Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism* 38 :

- 753-758, 1989
- 3) Tho LL and Candlish JK : Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes as indices of oxygen loading in disease : A survey of one hundred cases. *Biochem Med Metab Biol* 38 : 74-80, 1987
 - 4) Skibba JL, Powers RH, et al : Oxidative stress as a precursor to the irreversible hepatocellular injury caused by hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 7 : 749-761, 1991
 - 5) 大塚吉則、藪中宗之、他 : 温熱療法と酸化のストレス. *日生氣誌*30 : 19-24, 1993
 - 6) Ohtsuka Y, Yabunaka N, et al : Effect of thermal stress on glutathione metabolism in human erythrocytes. *Eur J Appl Physiol* 68 : 87-91, 1994
 - 7) 大塚吉則、藪中宗之、他 : 水浴温度と血小板グルタチオン代謝. *日生氣誌*32 : 47-51, 1995
 - 8) Buczyński A, Wachowicz B, et al : Changes in antioxidant enzymes activities, aggregability and malonyldialdehyde concentration in blood platelets from patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 100 : 223-228, 1993
 - 9) Muruganandam A, Drouillard C, et al : Glutathione metabolism enzyme activities in diabetic platelets as a function of glycemic control. *Thromb Res* 67 : 385-397, 1992
 - 10) Brüne B, Appen FV, et al : Oxidative stress in platelets. Sies H (ed) : *Oxidative stress, Oxidants and Antioxidants*, Academic Press, London, 1991, pp 421-443
 - 11) 白倉卓夫 : 温泉浴と血液凝固・線溶系. *日温気物医誌*58 : 3-5, 1994
 - 12) Gader AMA, Al-Mashhadani SA, et al : Direct activation of platelets by heat is the possible trigger of the coagulopathy of the heat stroke. *Br J Haematol* 74 : 86-92, 1990
 - 13) 鈴木仁一 : 温泉利用ストレス保養学の構想. *心身医療*102 : 103-110, 1991
 - 14) 阿岸祐幸、大塚吉則 : 生気象学とリハビリテーション. *リハビリテーション医学*32 : 447-455, 1995