

博士（水産学） 福永健治

学位論文題名

活性酸素ストレスによる生体障害とその防御

学位論文内容の要旨

生体が恒常性を維持している間は、活性酸素や反応性の高い酸素の中間代謝物などの生成を抑制するシステムや消去系が十分に機能し、それらの障害が生体に及ぶことはない。しかし、生体が恒常性を喪失したり、酸化的ストレス環境下に置かれた場合は、過剰に活性酸素を生成し、生体成分に対し無秩序に酸化的に作用し、種々の障害、疾患を誘発する。また、直接、酸化ストレスが生体に及び、障害が発現するような場合のみならず、食生活の変化やあらゆる公害に見られるような環境の変化も酸化ストレスによる健康障害を顕在化させる恐れがある。このような観点に立ち医学的、栄養学的見地から、様々なモデル、実験動物を用いて活性酸素の関わる障害発現機構が研究されている。一方、目的によっては、ヒトのモデルとして種々の病態、障害の研究においてラットなどの実験動物に代わり魚類を用いることの有用性が瞩目されている。進化の過程から見れば、魚類は脊椎動物の根幹に位置し、酸素代謝、異化作用などの生理機能についてもヒトをはじめとする高等動物と多くの共通点が見られることも知られている。活性酸素による障害を解析するとき、生体膜の酸化的損傷が問題となるため、元来、高度不飽和脂肪酸を生体膜構成成分としている魚類を用いる方が、より明確に評価できることが期待できる。本研究では、活性酸素による生体障害防御機構を解析するにあたり、養魚、養殖システムへの応用面でも注目されているオゾンを

酸化ストレス源とし、魚類を実験動物として検討した。すなわち、水産資源としても重要なニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) を用い、オゾン曝露による生体への酸化的障害の発現とその防御機構について検討した。

Wedemeyerらは、低濃度長時間 (0.01 ppm, 24~96 時間) のオゾン曝露によるニジマスへの影響を検討し、標的器官は鰓であり、鰓の機能障害による呼吸および浸透圧失調が障害の主要因であるとしている。しかし、この場合、オゾン曝露による直接的な酸化ストレスの影響なのか、あるいは、飼育環境の変化による二次的な要因のために障害が発現するのかは、個体差が極めて大きいために不明確のままである。この様な問題点を踏まえ、本研究では、オゾン曝露による直接的な生体酸化障害の発現機構解明、ならびに生体防御機構の解明を目的として基本的には、オゾン濃度を 1.5 ppm の高濃度に設定し、短時間の曝露を行った。

第一章では、オゾン曝露により惹起される血液および鰓の障害について、血液学的性状および鰓形態変化、機能、構成成分変化および酸化障害防御系に及ぼす影響を指標として検討した。その結果、オゾン曝露による酸化的損傷、障害は鰓には認められなかったが、赤血球の著しい変形、膨化のほか metHb の生成、溶血が認められた。このように、障害を受けた赤血球は、酸素運搬能の喪失ならびに二次鰓弁内への凝集を起こし、その結果、呼吸不全とともに窒息により死に到らしめるものと結論された。また、このとき、赤血球の膜構造タンパク質は消失し、構成成分である膜脂質の過酸化、タンパク質の酸化が起こり、著しく酸化的損傷を受けていることが確認された。また、オゾン曝露による酸化的障害防御系への影響を検討したところ、血漿および赤血球の抗酸化性成分が著しく消耗し、赤血球中の活性酸素消去系酵素活性の不均衡化の進行を招くことが明らかとなった。以上、本章の結果から、オゾン曝露による第一義的標的は赤血球であることを明らかにした。

第二章では、生体内抗酸化性成分として重要なV. C, V. E およびV. C/V. E混合物の投与による障害抑制効果を血液学的性状および鰓形態変化、機能、構成成分の変化および酸化障害防御系に及ぼす影響を指標として検討した。その結果、いずれの投与群においても供試魚の挙動はもとより、全ての検討項目について著しい改善、すなわち酸化的損傷の軽減効果が認められた。また、溶血に起因するHb由来の鉄の過酸化反応への関与を検討する目的で鉄の特異的なキレーターであるデスフェロキサミンの急性毒性抑制効果についても検討したが、その抑制効果はほとんど認められず、赤血球膜機能の指標である Na^+/K^+ ATPase活性の低下抑制がわずかに認められたにすぎなかった。このことは、溶血によるHbからの鉄の遊離はほとんど起こらないことを示唆している。以上の諸事実、および第一章で確認した膜構成脂肪酸からの過酸化脂質生成反応の進行についてはオゾン分子自身のポテンシャルからは説明できない。すなわち、オゾン以外の活性酸素種が血液中において派生していることを強く示唆するものと考えられた。

そこで第三章では、*In vitro* 系で赤血球の障害に対する血漿の影響について検討した。分離赤血球への血漿の添加は、オゾン曝露初期では、酸化障害に対し抑制的にはたらくが、時間の経過とともに、反対に酸化促進的に作用することが認められた。同時に赤血球の活性酸素消去系酵素活性の不均衡化が引き起こされた。すなわち、SOD活性の低下は認められなかつたがGSH-Pxや Catalase活性は低下した。SOD活性の維持は、 O_2^- の不均化によって H_2O_2 を產生するが、それを無毒化するGSH-PxやCatalaseの活性低下により蓄積した H_2O_2 からヒドロキシラジカルなどの極めて反応性の高い活性種の生成が考えられる。事実、オゾン曝露により赤血球内に明らかな H_2O_2 の生成蓄積が認められ、しかも血漿がその生成に促進的に関与していることを確認した。また、Hbを極めて安定な

COHb に変換すると、抗酸化性成分の維持、脂質過酸化物の生成が抑制され、赤血球の障害は顕著に抑制された。このことは、 oxyHb が安定な COHb に変換されることで metHb が生成されず、したがって oxyHb からの O_2^- の生成はもとより、これより派生する反応性の高い活性種の生成が抑制された結果である。この場合、鉄の安定なキレーターであるDTPAの添加実験から Hb からの遊離鉄の関与は否定され、 Hb 鉄の形態で過酸化触媒に与っていることを明らかにした。

以上の結果から活性酸素ストレスによる生体障害の進行は、オゾン曝露系では赤血球を第一義的標的とし赤血球中の Hb からの O_2^- の生成、活性酸素消去系酵素活性の不均衡化に伴う H_2O_2 の蓄積、 Hb 鉄の形態での過酸化触媒作用によるヒドロキシラジカルなどの極めて反応性の高い活性種の派生など一連の反応の進行による生体構成成分の攻撃に起因するものであると結論し、これらの障害はV. CやV. Eなどの抗酸化性物質によって効果的に抑制されることを明らかにした。

本研究より得られた知見は、飼育水中あるいは魚体を汚染している微生物、寄生虫などを短時間に安全かつ極めて効果的に排除するために従来用いられていなかった高濃度オゾンを積極的に利用し得る指針を含むものであり、魚類増養殖分野での今後の利用が期待される。

学位論文審査の要旨

主査 教授 高間 浩蔵
副査 助教授 鈴木 鐵也
副査 助教授 原 彰彦
副査 助教授 板橋 豊

学位論文題名

活性酸素ストレスによる生体障害とその防御

生命体は多かれ少なかれ種々のストレスに暴露されているが、生体防御機構によってそのホメオスタシスが保たれている。しかし、恒常性を喪失するような過剰ストレスの負荷にあっては種々の健康障害を誘発する。とりわけ、酸化的ストレスは各種活性酸素を多量に生成し、生体成分に対して無秩序に酸化的攻撃を起すとされ、しかも食生活をはじめとする日常の生活環境の中にも酸化的ストレスによる障害発生の要因が随所に存在する。したがって、酸化ストレスと健康障害に関してこれまでに多くの研究が主として医学的見地からなされてきたが、酸化ストレスに対する生体防御系の応答に関する知見は必ずしも充分ではなく不明の点が多く残されたままである。また、これらに関する研究に用いられてきた実験動物は、ラットやマウスなどのゲッ歯類が主であった。申請者は、これらの点に着目し、魚類の酸素代謝や異物代謝などの生理機能が高等動物のそれらと多くの点で共通していること、また魚類はその生体膜構成分に高度不飽和脂肪酸を多量に含有していることなどから、活性酸素種による生体障害の解析に魚類が格好な材料であると考え、水産資源としても重要な魚種であるニジマスを実験動物とし、養魚システムでも利用されているオゾンを高濃度に暴露する実験系を用いて、酸化ストレス負荷における生体障害の発現とその防御機構を解明しようとした。

本研究で得られた成果について審査員一同が評価した点は、概略、以下の通りである。①オゾン暴露による障害発生の第一義的標的は赤血球であり、これまでに考えられていたエラ(鰓)機能に対する障害は二次的現象であることを初めて明らかにした。②その機構について、赤血球

(細胞内)で発生した O_2^- の消去酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は損傷を受けないが、 H_2O_2 を分解するカタラーゼ(Catalase)やその他の有機ヒドロペルオキシドを分解消去するグルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)の活性が著しく低下することを見出した。すなわち、発生した O_2^- から SOD により H_2O_2 が生成するが、 H_2O_2 のその後の処理が不充分なために H_2O_2 が一方的に蓄積する、所謂、活性酸素消去酵素系の不均衡化が起こることを見出した。③生成蓄積した H_2O_2 からより反応性の高い種々の活性酸素種が派生することを推定し、その過程がヘモグロビン型鉄によって触媒されることを見出した。④これら活性酸素種により、赤血球裏打ち骨格タンパク質のアンキリン、スペクトリンが分解消失すること、血球膜構成脂質の過酸化・タンパク質の酸化が促進されることから、血球の膨化変形、崩壊がもたらされることを認め、それらによってエラニン二次鰓弁が閉塞して呼吸機能を喪失し窒息死に至ると結論している。本研究において最も注目すべき発見である活性酸素消去酵素系の不均衡化については、⑤分離赤血球および血漿を用いた in vitro 実験によって再度確認し、あわせて H_2O_2 などから派生する活性酸素種の生成が遊離型鉄ではなくヘモグロビン型のそれによって促進されることをも確認した。⑥上記の赤血球における酸化的障害の発現には血漿成分が促進的に関与することを指摘し、とくに血漿脂質の過酸化が誘因となって連鎖的に進行することを明らかにした。⑦これらオゾンによって惹起される種々の障害現象の進行は、ビタミンCやEによって効果的に抑制・軽減できることを認めた。このことは、抗酸化性物質の摂取(投与)によって予め生体の抗酸化能を高めておけば、高濃度オゾン暴露に対してもそれによる障害を充分に防御し得ることを意味するものである。

本研究の成果は、これまで不明確のままであった酸化的ストレスによる健康障害発生の機構の一端を解明したものであるとともに、実用面でも例えば、水産増・養殖分野での高濃度オゾン利用技術の開発に対して多大なる示唆を与え得るものであるとして高く評価される。よって、審査員一同は、本論文が博士(水産学)の学位を授与されるに値するものと判定した。