



博士（人間科学）学位論文 概要書

Immobilization Stress-Induced Changes in Antioxidant Activities and Neutrophil Functions in Rats

(ラット拘束ストレス負荷による抗酸化機能及び
好中球機能の変化)

2001年7月

早稲田大学大学院人間科学研究科

大石 勝隆

動物実験における拘束ストレスは、身体的ストレス刺激であると同時に情動的ストレス刺激であり、交感神経—副腎髓質系と下垂体—副腎皮質系の両方が賦活化され、様々な部位における活性酸素種の産生を誘導することが知られている。一方、近年になって、ヒトにおける様々な疾病に活性酸素種の産生が関わっている可能性が示されるようになり、ストレスと疾病との関連性を考えてゆく上で、活性酸素種の存在が重大な役割を果たしているように思われる。地球上の好気性生物は、酸素呼吸の結果として必然的に生じる活性酸素種をコントロールするために様々な抗酸化機構を有している。しかしながら、炎症やストレスの結果として過剰に産生された活性酸素種は、通常の抗酸化機構の限界を超え、その結果として様々な疾病を引き起こすものと考えられる。そこで本研究では、拘束ストレス負荷における活性酸素種の産生が生体に与える影響を調べるために、抗酸化機構と末梢血好中球を中心とした非特異免疫機構に焦点を当て検討を行った。

まず最初に、ラットを用いた拘束ストレス負荷が生体に与える影響を検討するために、血漿中の過酸化脂質測定及び生化学分析を行った。拘束ストレス負荷により顕著な血中過酸化脂質の増加が認められ、拘束ストレスの結果として実際に活性酸素種が産生されている可能性が示された。生化学分析の結果、アラニンアミノトランスフェラーゼ及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性の増加、アルブミンの減少、総コレステロールの増加、高密度リポタンパク質コレステロールの減少が認められ、肝機能の低下及び脂質代謝系への影響が示唆された。

ラット末梢各組織における抗酸化機構への影響を調べるために、活性酸素種であるスーパーオキシド (O_2^-) の特異的スカベンジャーであるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 活性を心臓、肺、肝臓、副腎、腎臓で検討した。ストレス負荷から 48 時間後では、肝臓での SOD 活性が、Mn-SOD で 16 倍、Cu/Zn-SOD で 40 倍となっており、少なくとも肝臓においては、ストレスの結果として生じた活性酸素種に対応すべく、抗酸化機能が上昇している可能性が示された。肺においては、Mn-SOD、Cu/Zn-SOD 共に活性の有意な減少が認められ、心臓と副腎においては Mn-SOD 活性が上昇し Cu/Zn-SOD 活性には変化が無く、腎臓においては Mn-SOD 活性が低下した一方で Cu/Zn-SOD 活性は有意に上昇した。また、赤血球中の SOD 活性及びカタラーゼ活性を調べたところ、共にストレス負荷に伴い単位ヘモグロビン当たりの活性が顕著に増加していることが示されたが、末梢血赤血球数がストレス負荷に伴い顕著に減少していることから、抗酸化酵素活性の高い赤血球が新たに分化したのか、もしくは抗酸化酵素活性の高い赤血球のみが血中に残ったものと考えられる。これらの結果から、拘束ストレスの抗酸化機構への影響

は、それぞれの組織間で異なっており、抗酸化酵素の種類によってもその影響が異なっている可能性が示された。

末梢全血を用いた *ex vivo* の系で末梢血好中球機能について検討したところ、拘束ストレス負荷により、大腸菌に対する貪食能およびスーパーオキシド産生能の上昇が認められた。さらに、同様の全血を用いた系で大腸菌に対する殺菌能を比較したところ、ストレス負荷直後のみならず、48 時間後においても対照群に比べて殺菌能の有意な上昇が認められた。ストレス負荷直後の好中球数の劇的な増加を考え合わせると、少なくとも好中球を中心とした非特異免疫機能に関しては、拘束ストレス負荷によりその機能が上昇する可能性が示された。

好中球は、様々な病原体の侵入に対して第一線の生体防御機構として重要な役割を担っている一方で、その過剰な活性化は虚血再灌流障害やリウマチ等の多くの病態と関連していると考えられており、それ故に、両刃の剣とも呼ばれている。従って、拘束ストレス負荷によって劇的に増加した好中球は、ストレス状態の終結と共に素早く通常のレベルにまで戻る必要がある。その際、宿主自身への障害を避けるために、好中球は、アポトーシスの過程を経て減少してゆくことが望ましいと考えられる。そこで、好中球のアポトーシスが、好中球自身によって産生された活性酸素種によって誘導されるか否かを検討するために、*in vitro* の実験系を用いて検討を行った。その結果、好中球の培養液中に SOD やカタラーゼといった抗酸化酵素を添加することによって好中球のアポトーシスが顕著に抑制されたことから、好中球のアポトーシスは、好中球自身によって産生された活性酸素種によって促進される可能性が示された。ラットを用いた拘束ストレスの実験において、拘束ストレス負荷直後の劇的な好中球数の増加、好中球のスーパーオキシド産生能及び大腸菌に対する殺菌能の上昇、血中過酸化脂質の増加、脂質代謝を含めた肝機能の低下などを考え合わせると、拘束ストレス負荷状態における酸化ストレスは、好中球の活性化にその一因が存在していると考えられる。好中球のアポトーシスが、好中球自身によって産生された活性酸素種によって誘導されるということは、拘束ストレス負荷から 48 時間後における急速な好中球数の減少に、何らかの役割を果たしている可能性を示している。

ストレス負荷状態における活性酸素種の産生機序及び抗酸化機構の制御メカニズムと、これらに関連した免疫系への影響等を詳細に調べることによって、ストレスが原因で引き起こされている様々な疾病の病態解明に役立つであろうと期待される。