

氏名（本籍）	倉田昌明（愛知県）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博甲第13号
学位授与年月日	平成7年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Antioxidant Defense Systems in Mammalian Erythrocytes
審査委員	主査 岐阜大学 教授 鈴木正敏 副査 岐阜大学 教授 大橋秀法 副査 東京農工大学 教授 笹本修司 副査 帯広畜産大学 教授 齊藤篤志 副査 岩手大学 教授 首藤文榮

### 論文の内容の要旨

生命維持に不可欠な酸素は、一方で活性酸素の発生源となっており、多くの細胞において酸化障害をひき起こすことが知られている。細胞はこの活性酸素に対する抗酸化機構を有し、とくに赤血球は酸素を運搬する細胞であるため抗酸化機構の存在が重要である。これまでに、赤血球に酸化障害が蓄積した場合、赤血球変形能が損なわれ、脾臓微細循環系で赤血球が崩壊するといった機序が考えられている。しかし、赤血球の抗酸化機構が、酸化ストレスに対し変形能を保護するか、さらには赤血球の寿命にも影響を及ぼすかについての研究はみられない。本研究では、これらの点を中心に、赤血球寿命を左右する重要な生理学的機能である変形能と抗酸化機構との関連を検討した。

#### 1. 抗酸化機構と赤血球寿命

抗酸化機構と赤血球寿命との関連を、比較生化学的手法の一つであるCutlerの方法に従い解析した。まず、各種動物について赤血球抗酸化機構に関与している glutathione (GSH) 濃度、superoxide dismutase (SOD)、glutathione peroxidase (GSH-Px)、catalase (CAT)、glutathione S-transferase (GST) およ

びglutathione reductase (GR) 活性値をまとめ、このGSH濃度や酵素活性値をspecific metabolic rateで除した値を算出した(この値は、GSHや抗酸化酵素の活性酸素処理能力を示す)。この値に対して各種動物の赤血球寿命をプロットすると、GSH、SODおよびGSH-Pxで有意な相関がみられ、とくにGSHでは強い相関がみられた。この成績から、各種動物の赤血球寿命が、GSH濃度と酸化的ストレスによって決定されていることが示唆された (*Comp. Biochem. Physiol.* 104B, 169, 1993 & *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 477, 1993)。

## 2. GSHと赤血球変形能

先の実験で、抗酸化剤として作用するGSHの重要性が示唆されたため、赤血球寿命を決定する因子である赤血球変形能との関連について検討した。

最初に、赤血球変形能が、どの程度生理的に変動するかが分かっていないため、この点について調べた。本実験では、とくに日内変動について検討を行った。動物は、十分な採血量が得られる理由から、イヌ(ビーグル犬)を用いた。実験の結果、変形能に日内変動のないことが明らかにされた (*Comp. Biochem. Physiol.* 105A, 587, 1993)。

次に、酸化的ストレス下における赤血球GSH濃度と変形能との関連を*in vitro*の実験系で調べた。本実験では、赤血球のGSH代謝がよく研究されているウサギの赤血球を用いた。赤血球に0.5 mMの酸化剤(tBHとdiamide)を作用させると、GSHは直ちに酸化型glutathione (GSSG)に酸化された後、30分以内に元のレベルまで再生した(これは、glucoseを基質として解糖系とペントースリン酸経路との共役反応による)。しかし、より高濃度の酸化剤を赤血球に作用させると、GSH再生は抑制され、これに並行して変形能も低下した。基質としてのglucoseを無添加の条件でGSH再生を抑制すると、赤血球変形能の低下が増強された。この結果は、酸化的ストレス下における赤血球変形能の低下が、GSHの再生能力によって左右されることを示している (*Comp. Biochem. Physiol.* 107A, 7, 1994)。

## 3. GSH、CaおよびATP濃度と変形能との関係

近年、酸化的障害以外で変形能を低下させる因子としてCa蓄積とATP濃度の低下が重要視されてきているので、Ca、ATP、GSH濃度と変形能との関連について検討した。ウサギ赤血球にionophore A23187を用いてCaを負荷させると、Ca濃度に依存してGSH再生が低下した。このGSH再生の抑制は、主にATP濃度の低下によるものであった。また、溶血液を用いた検討から、CaはGSH再生に対し殆ど影響しないことがわかった。これらの成績と上記の知見から、GSH、Ca、ATPは互いに関連しあいながら変形能に影響を及ぼすものと考えら

れた (*Comp. Biochem. Physiol.* 印刷中)。

#### 4. 抗酸化酵素を阻害する物質について

さらに、抗酸化機構に影響を及ぼすCa、ATP以外の物質についても検索した。他の組織では、食物中の物質が抗酸化酵素を阻害することが報告されている。ここでは、赤血球の抗酸化酵素に対する阻害について検討した。その結果、植物などに多く含まれるplant phenol類がイヌ赤血球のGSTとGR活性を阻害することが明らかにされた。これらの外因性物質は、赤血球抗酸化機構を修飾する因子と考えられる (*Comp. Biochem. Physiol.* 103B, 863, 1992)。

(総括) 以上の研究から、赤血球抗酸化機構は赤血球の寿命決定因子の一つ変形能を保護すること、また、これはCa、ATP濃度ならびに一部の外因性物質により修飾されることが示された。さらに、抗酸化機構と活性酸素のバランスは、個々の赤血球寿命を左右するのみならず、赤血球寿命の動物種差も左右していることが示唆された。

### 審 査 結 果 の 要 旨

倉田昌明君の博士(獣医学)の学位論文の内容は、哺乳類赤血球の抗酸化機構に関する研究である。抗酸化機構が赤血球の生存維持に不可欠と言われながら、赤血球変形能といった赤血球の生命維持要因との関係が明らかにされていないことが本研究の動機である。この点を中心に研究を始め、発展させる形で論文は作成され、最終的に6つの学術論文に発表された研究成果より、総合的考察で一つの結論を導いている。

1. 抗酸化機構と赤血球寿命との関係。申請者は、まず比較動物学的手法により抗酸化機構(とくにグルタチオン、以下略してGSH)と赤血球寿命が関係していることを示した。これらの関係についての報告はかつてなく、これまでに予測されていた抗酸化機構の生理的な意義を初めて証明した点で大いに評価できる。この研究内容については投稿論文の審査員からも高い評価を得た。また、この検討の過程において赤血球抗酸化機構の動物種差が提示された。この領域において、これほど広範囲かつ体系的に行なわれた検討は類をみない。この地道な研究により、哺乳類動物の抗酸化機構に分類学的あるいは進化的傾向のないことが初めて示唆されるに至ったことも評価の対象として追記したい。

2. 赤血球GSHと変形能との関係。これまでに、活性酸素による酸化的障害からの防御にGSHが重要なこと、また酸化的障害が赤血球変形能を低下させることが知られていた。しかし、GSHが実際に赤血球変形能の保護に関与しているかは明らかにされておらず、極めて重要な点がこれまでの研究では欠けていた。申請者は、この点に着目し、抗酸化機構の生理

的意義を考察するための実験を行い、赤血球変形能の低下がGSHの再生能力によって左右されるといった関係を明らかにした。

3. 赤血球カルシウム、ATPとの関係。さらに、申請者は上記2の研究を拡大し、赤血球カルシウム (Ca) とATP濃度の諸要因を含めた関係を証明した。つまり、細胞内のCaはATPを介してGSHの再生に関連し、この再生されたGSHが赤血球変形能に結びつくことである。さらに、Caは弱いながらもGSH再生に直接関連することも示した。これにより、従来より知られているCaによる細胞骨格系を介した赤血球変形能決定と別経路による変形能決定経路を見いだしたことになり、極めて意義の大きい知見といえる。さらに、このことは、老化赤血球の変形能低下における酸化障害説とCa蓄積説の接点を明らかにした。

4. 変形能の生理的変動。上記2と3の理論的背景を裏付ける実験も本論文にもり込まれている。変形能の低下が赤血球の寿命を短縮するものと考えられているが、生理的に変形能がどの程度変化するか分かっていなかった。特に日内の短い時間に大きな変動を示すのであれば、研究の進行上、それを考慮する必要があった。申請者はその点についても検討を行い、上記の *in vitro* の実験で日内変動による影響が含まれないこと、またその様な変動を考察の展開において考慮する必要のないことを確認している。

5. 赤血球抗酸化機構に影響する外因性物質の影響。Ca、ATPといった内因性の要因にとどまらず、食物中の物質あるいは治療薬などの外因性物質の中から影響する因子を検索した。その結果、植物由来のフェノール類が赤血球抗酸化機構を阻害することをまとめ新しい知見を得ている。

申請者は、これらの成績をもとに赤血球の老化と寿命の観点から考察を展開し、一つの結論へと導いている。すなわち、赤血球抗酸化機構が赤血球の寿命決定因子の一つのである赤血球変形能を保護すること、これにはCa、ATPの様な内因性物質あるいはその他の外因性物質が関連すること、さらに、赤血球の抗酸化機構は個々の赤血球の寿命を決定するのみならず、赤血球寿命の動物種差も決定することを示唆した。

本学位論文の基礎となる論文数が計6編におよび、その中にミニレビューも含まれており、その各々が重要な知見を有している。また、それらを統括し、赤血球の生理学的、生化学的観点から論理を展開している点で、本論文は学位論文に相当するものと判定した。