



Title	温泉療法と血小板グルタチオン代謝
Author(s)	大塚, 吉則; Ohtsuka, Yoshinori; 藪中, 宗之 他
Citation	日本温泉気候物理医学会雑誌, 59(2), 83-88
Issue Date	1996-02
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/44049">https://hdl.handle.net/2115/44049</a>
Type	journal article
File Information	NOKB59-2_83-88.pdf



## 温泉療法と血小板グルタチオン代謝

大塚吉則

北海道大学医学部リハビリテーション医学講座

藪中宗之, 野呂浩史, 渡辺一郎, 阿岸祐幸

北海道大学医学部附属病院登別分院内科

## Balneotherapy and Platelet Glutathione Metabolism

Yoshinori OHTSUKA

Department of Rehabilitation and Physical Medicine,

Hokkaido University School of Medicine

Noriyuki YABUNAKA, Hiroshi NORO, Ichiro WATANABE, Yuko AGISHI

Internal Medicine, Noboribetsu Branch Hospital,

Hokkaido University School of Medicine

### Summary

Two experiments were performed to clarify the effects of balneotherapy on platelet glutathione metabolism. One experiment, in which healthy men were subjected to water immersion at temperatures of 25°C, 36°C, and 42°C for 10 min, showed that the level of platelet lipid peroxides (LPO) tended to increase at 25°C and 42°C, suggesting the presence of oxidative stress at these temperatures. When an antioxidative defense system was induced at these temperatures, the levels of platelet glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR) activities increased. The other experiment, in which 4 weeks of balneotherapy was applied to type II (non-insulin-dependent) diabetic patients, showed that the level of GSH on admission correlated well with that of fasting plasma glucose (FPG,  $r = 0.692$ ,  $p < 0.050$ ). After 4 weeks of balneotherapy, the level of GSH increased ( $p < 0.01$ ) in well-controlled patients ( $FPG < 150$  mg/dl) and decreased ( $p < 0.05$ ) in poorly controlled patients ( $FPG \geq 150$  mg/dl). There was a negative correlation between GPX activities and the level of FPG ( $r = -0.430$ ,  $p < 0.05$ ). After the balneotherapy, the activity increased in five patients, decreased in three patients, and showed no changes in four patients.

These results indicate that, in diabetic patients, 1) platelet GSH synthesis is obviously induced in response to oxidative stress, 2) lowered GPX activities suggest an impaired antioxidative defense system, and 3) platelet glutathione metabolism was partly improved by 4 weeks of balneotherapy but depended on the control status of plasma glucose levels. From these findings, we conclude that 1) patients whose platelet antioxidative defense system is damaged such as those with diabetes mellitus should not take hot or cold bath, and that 2)

balneotherapy improves platelet glutathione metabolism, leading to normalization of platelet aggregability.

**Key words :** Balneotherapy, Thermal stress, Platelet glutathione metabolism, Diabetes mellitus, Platelet aggregability

## I はじめに

温泉療法の血液凝固・線溶系に与える作用として、高温浴後に認められる血液粘度の上昇、血小板凝集能の亢進、線溶能の低下などが挙げられており、このため脳梗塞・急性心筋梗塞などの血栓性疾患の発症が助長されているとの報告がある<sup>1)</sup>。一方、この血小板凝集能は糖尿病や冠動脈病変に基づく心疾患においても亢進しており、さらにはこれらの疾患群では酸化ストレスに対する防御能の低下も認められている<sup>2,3)</sup>。我々はこれまで水浴温度の赤血球抗酸化防御機構（グルタチオン代謝、Fig. 1）に与える影響を検討し、42°Cのような高温浴下では活性酸素種の産生が盛んになり、グルタチオン代謝に影響を与えていることを報告した<sup>4,5)</sup>。これらのことから高温浴による酸化ストレスと血小板凝集能亢進との間には何らかの関連が考えられる。今回、健常人において入浴温度の血小板グルタチオン代謝に与える影響を検討し、さらには酸化ストレスの増大している糖尿病患者において、1回入浴の繰り返しである温泉療法の血小板グルタチオン代謝に与える影響を検討した。

## II 対象および方法

### 1. 試薬

還元型グルタチオン(GSH)、酸化型グルタチオン(GSSG)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸還元型(NADPH)、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)、牛血清アルブミンはSigma社より、ピシンコニン酸(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。

### 2. 対象および実験方法

#### 1) 入浴温度の影響

健常男子大学生5名(21.6±0.4歳, 174.7±1.6cm, 65.2±2.1kg, Mean±SEM)を室温(27°C)で約10分間の椅子上安静の後、25°C, 36°C, 42°Cの水中に、長座位のまま受動的に10分間日を変えて浸漬させ、前、浸漬10分後、出浴30分後に静脈血の採血を行い、血小板を分離し浮遊液を調整した<sup>3,6)</sup>。GSH値、グルタチオン過酸化酵素(GPX)活性、GR活性、過酸化脂質(LPO)値を測定し、結果は水浸前値を100としたパーセント値で表した。

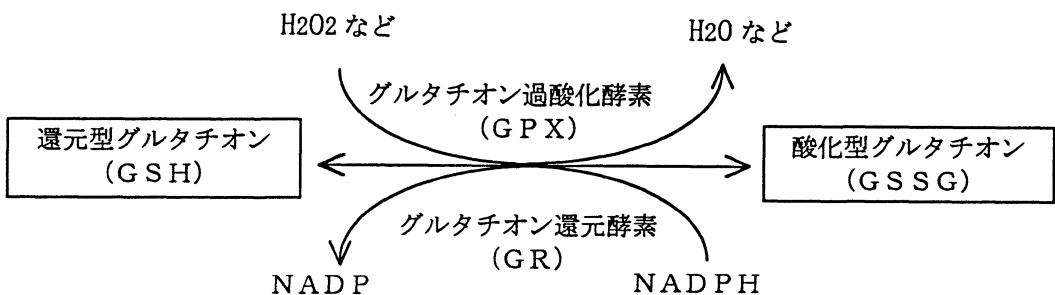


Fig. 1 Glutathione metabolism

Table 1 Effect of immersion temperature on platelet glutathione metabolism

	Glutathione (GSH)	Glutathione peroxidase(GPX)	Glutathione reductase(GR,total)	GR(active)	Lipid peroxide(LPO)
25 °C	138.7±18.4	126.2± 9.8	139.0± 9.4 *	127.7±25.8	114.6±11.5
	134.4±39.3	116.5±14.1	121.6± 8.8	108.9±34.6	114.5±22.9
36 °C	98.4±7.5	116.2±21.0	93.8±4.9	94.6±14.9	113.7±22.0
	95.9±3.6	86.7±17.4	101.6±19.0	99.0±30.5	77.6±18.3
42 °C	127.7±14.4	135.6±18.1	151.6±12.3 *	146.8±16.8 *	102.3±6.5
	129.0±20.9	131.7±12.2	135.8±38.4	117.6±19.4	119.5±18.8

Data are expressed as mean±SEM (%), upper column:after 10min immersion, lower column:30min after the end of immersion, \* p<0.05

## 2) 温泉療法の影響

II型糖尿病患者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)後に採血を行って検討した。温泉療法は既報のごとく7日2回前後の温泉浴(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-NaCl泉,39~40°Cの温浴を指導)と水温37~38°Cでの水中運動30分間を含む運動療法を行い,食事療法や必要に応じて薬物療法を併用した。GSH値とGPX活性の変化について検討した。

## 3) 生化学的測定方法

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<sup>4,5)</sup>。LPO値,GPX活性,GR活性は,-70°C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<sup>4,5)</sup>。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当たりに換算した。

## 3. 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で表した。

## III 結果

### 1) 入浴温度による影響 (Table 1)

GSH濃度は36°Cで変化なく,25°C,42°C

では水浴10分後に上昇し,出浴30分後も高値を持続する傾向にあった。GPX活性は36°Cでは水浴10分後一時的に軽度上昇傾向にあったが,出浴30分後にはかえって前値よりも低下傾向を示した。25°Cと42°Cでは水浴10分後に上昇傾向を示し,出浴30分後でも上昇傾向を持続していた。全GR活性は36°Cで変化なく,25°Cと42°Cで水浴10分後有意に増加し(p<0.05),出浴30分後もその傾向を持続した。活性型GR活性は36°Cで変化なく,42°Cで水浴10分後に増加し(p<0.05),出浴30分後に少し低下したが前値よりも高い傾向を持続していた。25°Cでは水浴10分後に増加傾向を示し,出浴30分後に前値にもどった。血小板中のLPO値は36°Cにて水浴10分後に増加傾向を示したが,出浴30分後には前値に比して低下傾向を示した。25°Cでは水浴10分後に増加傾向を示し,出浴後その傾向は持続していた。42°Cでは水浴10分後は変化なかったが,出浴30分後に上昇傾向になった。

### 2) 温泉療法による影響

約4週の温泉療法により,空腹時血糖値(FPG)は151±12mg/dlから117±7mg/dlへと低下し(p<0.01),HbA<sub>1c</sub>は7.5±0.5%から6.7±0.5%へと低下傾向を示した(データは示さない)。入院時の血小板GSH値は入院時FPGと優位の正相関があった(Fig. 2, r=0.692, p<0.05)。約1ヶ月の温泉療法により,入院時FPGが150mg/dl

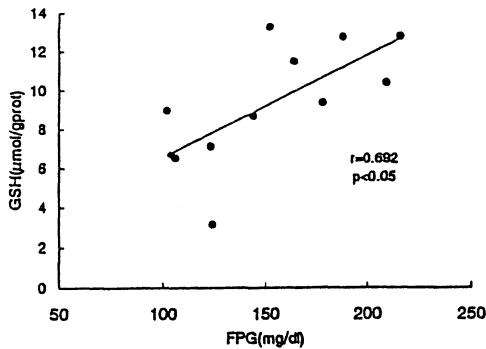


Fig. 2 Relationship between the levels of platelet reduced form of glutathione (GSH) and the fasting plasma glucose (FPG) levels in type II diabetic patients on admission.

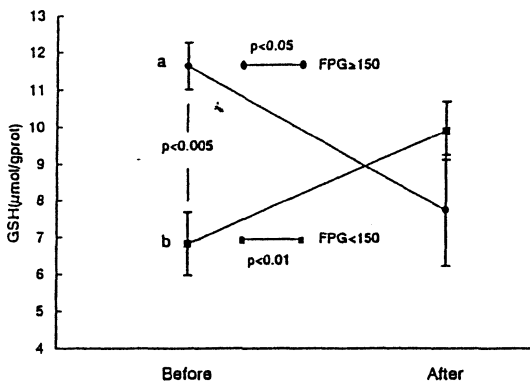


Fig. 3 Effect of balneotherapy on the levels of platelet GSH in type II diabetic patients.

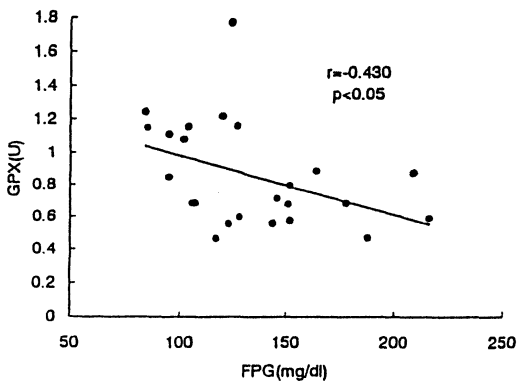


Fig. 4 Relationship between the activities of platelet glutathione peroxidase (GPX) and FPG levels in type II diabetic patients.

以上であったコントロール不良群では、上昇していた GSH 値が有意に低下し (Fig. 3 a,  $p < 0.05$ ), 150mg/dl 未満のコントロール良好群では、低下していた GSH 値が有意に上昇した (Fig. 3b,  $p < 0.01$ )。GPX 活性は FPG 値と有意の負の相関が認められた (Fig. 4,  $r = -0.430$ ,  $p < 0.05$ )。温泉療法により 5 例に酵素活性の上昇を認めたが、3 例は減少し、4 例は変化なかった (データは示さない)。

#### IV 考 察

癌治療における全身体温療法の際に凝固機能が亢進したり<sup>8)</sup>、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<sup>9)</sup>。また血小板を直接 43°C 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<sup>9)</sup>。一方、今までの赤血球を用いた我々の研究では、高温浴を行うと LPO 値が増加して GSH がその除去のために消費されて減少しており、高温環境下では生体内に種々の活性酸素種が産生されていると想像される<sup>4,5)</sup>。したがって、高温浴による血小板機能の活性化と酸化ストレスの間には何らかの因果関係が存在する可能性がある。今回の実験では血小板 LPO 値が 42°C で上昇傾向にあり、この温度では血小板にも酸化ストレスが加わったものと思われた。この際、血小板 GSH 値は赤血球での反応と異なり上昇傾向にあり、高温浴の際に生じた酸化ストレスのために血小板の抗酸化防御機構が誘導されたものと考えられた。また血小板におけるこの GSH 誘導作用は、酸化ストレスが増加している糖尿病患者において、入院時の血小板 GSH 値と FPG 値が正相関を示していることと一致しており、赤血球で認められた糖尿病患者の GSH 値減少<sup>10)</sup>と対照的である。赤血球ではこの誘導作用が弱いため、GSH が消費されても再合成が活発に行われずに減少した可能性があ

るが詳細は不明である。

血小板のグルタチオン関連酵素に関しては、 $H_2O_2$ などを除去する GPX 活性は高温浴で上昇傾向を示し、GSSG を還元して GSH にもどして再利用させる GR 活性も有意に増加していることから、GSH 値の変化と同様に高温刺激は赤血球の抗酸化防御能を低下させ<sup>4,5)</sup>、血小板では逆に活性化していることが想像された。一方、血小板 GPX 活性は FPG と有意の負の相関を示しており、今までの報告である糖尿病患者における血小板 GPX 活性の低下<sup>2)</sup>と矛盾しない結果であった。この低下している GPX 活性は温泉療法により12例中5例(42%)において増加したが、変化しなかった例(4例)、逆に低下した例(3例)も存在した。この低下した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、糖尿病の重症度と GPX 活性の温泉療法に対する反応性とが関連していることが示唆された。

次に25°Cの冷水浴による寒冷刺激の影響を検討したところ、LPO 値の上昇とともに GSH 値、GPX 活性、GR 活性も増加ないし増加傾向にあり、この温度における酸化ストレスの存在と、LPO 値の増加を完全に抑制できるほどではないが、防御機構の誘導作用が認められた。赤血球でも同様に抗酸化防御機構の誘導が認められたが<sup>4,5)</sup>、この際には LPO 値は変化しなかったので、低温刺激による赤血球における抗酸化防御機構の誘導作用は血小板よりも強力であると考えられる。

不感温度である36°C<sup>11)</sup>の水温では、血小板の LPO 値が一過性に上昇傾向を示した後、低下傾向を示し、それに対応して GPX 活性のみに同様の变化を認めているので、36°Cではごくわずかの酸化ストレスが生じている可能性があり、またそのような軽度のストレスでも GPX は敏感に反応して

いるものと思われた。

冠動脈疾患や糖尿病患者における血小板凝集能の亢進は、増加している酸化ストレスにより、血小板内に LPO が蓄積するためにもたらされると考えられている<sup>2)</sup>。また LPO などの酸化ストレスは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るとの報告もある<sup>12)</sup>。したがって、今回のような高温浴や冷水浴などの熱ストレスあるいは寒冷ストレスに繰り返し曝露されると、たとえ抗酸化防御機構が誘導されても、血小板内に LPO が蓄積してきて凝集能を亢進させる可能性が生じてくるものと思われる。一方、温浴(39~40°C)による温泉療法は、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る。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が、糖尿病患者の場合、合併症の程度によっては悪化させることもあり得るので、温泉療法は注意深く行う必要があるものと思われた。

## V 結 語

抗酸化防御機構が障害されて血小板凝集能が亢進している糖尿病患者などは、高温浴や低温浴はなるべく避けた方が望ましく、温浴による温泉療法はグルタチオン代謝を改善させて凝集能を正常化する可能性があるものと考えられた。

## 参考文献

- 1) 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.
- 2) Muruganandam A., C. Drouillard, R.J. Thibert, RM-C. Cheung, T.F. Draisey and B. Mutus: Glutathione metabolic enzyme activities in diabetic platelets as a function of glycemic control. Thromb. Res. 67:385-397, 1992.

- 3) Buczyński A., B. Wachowicz, K. Kedziora-Kornatowska, W. Tkaczewski, and J. Kedziora: Changes in antioxidant enzyme activities, aggregability and malonyldialdehyde concentration in blood platelets from patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 100: 223-228, 1993.
- 4) 大塚吉則, 藪中宗之, 渡辺一郎, 阿岸祐幸: 温熱療法と酸化のストレス. *日生氣誌* 30:19-24, 1993.
- 5) Ohtsuka, Y., N. Yabunaka, H. Fujisawa, I. Watanabe and Y. Agishi: Effect of thermal stress on glutathione metabolism in human erythrocytes. *Eur. J. Appl. Physiol.* 68:87-91, 1994.
- 6) Uotila, J., R. Tuimala, K. Pyykkö and M. Ahotupa: Pregnancy-induced hypertension is associated with changes in maternal and umbilical blood antioxidants. *Gynecol. Obstet. Invest.* 36:153-157, 1993.
- 7) 阿岸祐幸, 大塚吉則: 生気象学とりハビリテーション. *リハビリテーション医学* 32:447-455, 1995.
- 8) Strother, S.V., J.M.C. Bull and S.A. Branham: Activation of coagulation during therapeutic whole body hyperthermia. *Thrombosis Res.* 43:353-360, 1986.
- 9) Gader, A.M.A., S.A. AL-Mashhadani and S. S. AL-Harthy: Direct activation of platelets by heat is the possible trigger of the coagulopathy of heat stroke. *Br. J. Haematol.* 74:86-92, 1990.
- 10) Murakami, K., T. Kondo, Y. Ohtsuka, Y. Fujiwara, M. Shimada and Y. Kawakami: Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism* 38:753-758, 1989.
- 11) O'hare, J.P., N. Dalton, J.M. Roland, J. Gooding, B. Payne, G. Walters and R.J.M. Corral: Plasma catecholamine levels during water immersion in man. *Horm. Metab. Res.* 18:713-716, 1986.
- 12) Brüne, B., F.V. Appen and V. Ullrich: Oxidative stress in platelets. In: *Oxidative stress, oxidants and antioxidants*, edited by H. Sies, Academic Press, London, 421-443, 1991.