

原 著

慢性ストレスがマウス赤血球のグルタチオン代謝に及ぼす影響

中村博範*¹ 三宅沙知*¹ 中村有里*² 山岡伸*³

要 約

ストレスは、副腎からのカテコールアミンや糖質コルチコイドの分泌を高め、血圧や血液成分を変化させる。これらの変化は、赤血球の酸化ストレスを増加させる可能性がある。そこで、本研究では赤血球の抗酸化物質であるグルタチオンに着目し、慢性ストレスがマウス赤血球のグルタチオン代謝に及ぼす影響について調べた。雄 ICR マウスを対照群とストレス群の2群に分け、ストレス群は1日2時間の拘束ストレスを14日間続けて与えた。その結果、グルタチオンの抗酸化機構に関わるグルコース-6-リン酸脱水素酵素、グルタチオン還元酵素、グルタチオンペルオキシダーゼの酵素活性は2群間で差はなかったが、赤血球の総グルタチオン濃度はストレス群が対照群と比較して低い傾向にあった。赤血球の総グルタチオン濃度は、還元型グルタチオン (GSH) の合成と GSH の酸化で生じる酸化型グルタチオン (GSSG) の赤血球外への排出によって決まる。したがって、ストレスによって GSH の合成と GSSG の排泄に不均衡が生じたと考えられる。これらの結果は、慢性ストレスが赤血球のグルタチオン濃度を低下させ、抗酸化機能を低下させる可能性を示唆した。

1. 緒言

慢性ストレスは、心血管障害における重要な危険因子であることが明らかにされている^{1,2)}。

生体にストレスが加わると、生体はいくつかの反応経路により応答する。その代表的なものは、視床下部-交感神経-副腎髄質系 (sympatho-adrenal medulla: SAM 系) と視床下部-下垂体前葉-副腎皮質系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA 系) である。SAM 系が活性化されると、副腎髄質からのカテコールアミン (ノルアドレナリン、アドレナリン) の分泌が亢進し、HPA 系が活性化されると、副腎皮質からの糖質コルチコイド (コルチゾール、コルチコステロン) の分泌が亢進する。その結果、血圧や血流の上昇、血糖や血中脂質の上昇などの変化が生じる^{3,4)}。また、これらの代謝変化は、活性酸素の生成を高め酸化ストレスを増大させる⁵⁻⁷⁾。急性ストレスは、一過性のストレスでその原因がなくなればこれらのストレス反応も弱まるが、慢性ストレスでは、常にストレスに曝された状態にあるためス

トレス反応が持続することになる。そのため、血管が物理的あるいは化学的な刺激によって傷害され動脈硬化へと進展する⁸⁻¹²⁾。また、これらの変化は、血管だけでなく循環血液中の赤血球に対しても影響を及ぼす可能性がある。

赤血球は、核や細胞小器官を欠くため、たんぱく質を合成することができない。そのため、赤血球の構造たんぱく質や酵素たんぱく質は糖化や酸化によって変性すると機能が低下する^{13,14)}。赤血球の機能の維持においては、グルコース代謝 (解糖系、ペントースリン酸回路) とグルタチオン代謝が重要な役割を担い、この2つが連動して抗酸化機構を維持している¹⁴⁾ (図1)。還元型グルタチオン (glutathione: GSH) は赤血球内でグルタミン酸、システイン、グリシンから合成され、グルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase: GPX) による過酸化水素や過酸化脂質の除去に利用される。この反応で GSH は酸化され酸化型グルタチオン (glutathione disulfide: GSSG) となる。GSSG は、赤血球外へ

*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科

*2 川崎医療福祉大学 医療福祉学部 臨床心理学科

*3 青森県立保健大学 健康科学部 栄養学科

(連絡先) 中村博範 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学

E-mail: hironori@mw.kawasaki-m.ac.jp

排出されるか、グルタチオン還元酵素（glutathione reductase：GR）によって還元され再びGSHとなる¹⁵⁾。この仕組みによって、赤血球内の活性酸素濃度が低く保たれ、酵素たんぱく質や膜たんぱく質、膜脂質の酸化が抑えられている。しかしながら、ストレスによって、赤血球内、あるいは血管内での活性酸素の生成が増加した場合、赤血球のグルタチオン濃度が変化する可能性がある。

そこで、本研究では、ストレス負荷を繰り返すことで生じる慢性ストレスがマウス赤血球のグルタチオン濃度とグルタチオン代謝に関連する酵素活性への影響について調べた。

2. 方法

2.1 実験動物及び飼育環境

9週齢の雄ICRマウス（Jcl：ICR）を日本クレア株式会社から購入し、1週間予備飼育をしたあと実験に使用した。飼育は、飼育用ケージで個別に行い、飼料と水は自由摂取とした。飼料には、オリエンタル酵母工業株式会社のMF（固形）を使用した。動物飼育室の環境は、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、明暗サイクル12時間（明期8:00-20:00）であった。

本実験は、動物実験ガイドラインに従い、川崎医療福祉大学動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号：16-010）。

2.2 急性ストレス実験

急性ストレス実験では、拘束ストレスでのストレ

ス反応の有無について確認し、また、マウス赤血球の総グルタチオン濃度への影響についても調べた。

実験は、マウスを対照群（AC群：5匹）とストレス群（AS群：5匹）の2群に分けて行った。実験の当日は両群とも8時以降は絶食とした。AS群は、マウス用ストレスケージ（株式会社夏目製作所）で拘束ストレスを2時間（13~15時）与え、その直後にイソフルラン麻酔下で下大静脈から採血を行った。また、AC群は、AS群と同じ時間帯に採血を行った。

2.3 慢性ストレス実験

拘束ストレスを繰り返すことにより生じる慢性ストレスがマウス赤血球のグルタチオン濃度や酵素活性へ及ぼす影響について調べるため、マウスを対照群（CC群：5匹）とストレス群（CS群：5匹）の2群に分け実験を行った。CS群は1日2時間（13~15時）の拘束ストレスを14日間連続して与えた。2日目以降は拘束ケージを嫌がり入れるのが困難となるため、イソフルランで一時的に麻酔をかけてから拘束ケージに入れるようにした。拘束ストレス中は覚醒した状態であった。両群とも、最終日（14日目）は、8時以降は絶食とし、CS群は拘束ストレスの直後に下大静脈から採血した。また、CC群については、CS群と同じ時間帯に採血を行った。慢性ストレス実験においては、体重、摂食量及び飲水量（シナノ製作所の微量飲水測定用給水瓶を使用）をCC群、CS群ともに毎日定時に測定し記録した。

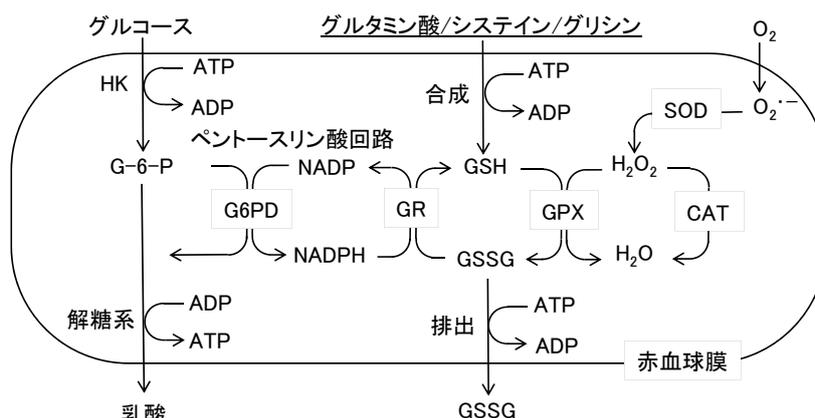


図1 赤血球のグルタチオン代謝

HK：ヘキソキナーゼ
G6PD：グルコース-6-リン酸脱水素酵素
GR：グルタチオン還元酵素
GPX：グルタチオンペルオキシダーゼ
SOD：スーパーオキシドジスムターゼ
CAT：カタラーゼ

G6P：グルコース-6-リン酸
NADP：酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NADPH：還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
GSH：還元型グルタチオン
GSSG：酸化型グルタチオン

2.4 採血と血液処理

採血は、イソフルラン麻酔下で行い、抗凝固剤 (EDTA) を含ませた注射器を用いて下大静脈から行った。血液の一部は、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及びグルコースの測定に使用した。残りの血液はマイクロテストチューブに移し、遠心機 (KUBOTA 3700) で遠心分離 ($1000 \times g$, 10分, 4°C) して、血漿と血球に分離した。血漿は、マイクロテストチューブに採取し、アルブミン、コレステロール及びコルチコステロンの分析まで冷凍保存 (-18°C) した。一方、血球は洗浄するため、15mL 遠心管に移し、約10倍量の冷却したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加えて混和し、遠心機 (KUBOTA 6500) で遠心分離 ($1000 \times g$, 10分, 4°C) した。上澄みを取り除き、沈殿した血球に再び約10倍量の冷却した PBS を加えて混和し、同様に遠心分離した。この操作を3回繰り返し、赤血球分画液を調製した。赤血球分画液は、総 GSH 濃度、ヘモグロビン濃度の測定とグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (glucose-6-phosphate dehydrogenase: G6PD), GR 及び GPX の各酵素活性の測定に用いた。

2.5 赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度の測定

赤血球数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$) の測定は、血球計算盤 (フナコシ株式会社) を用いて行った。ガワーズ液で200倍希釈した血液を血球計算盤に加えて、光学顕微鏡 (WRAYMER EX-1300) で25区画のうち5区画をカメラ撮影し、カウントして赤血球数を求めた。

ヘマトクリット値 (%) の測定は、血液をヘマトクリット毛細管 (EDTA・2K, $75\mu\text{L}$: VITREX) に採取し、シール用パテで栓をしたあとヘマトクリット用遠心分離機 (KUBOTA 3220) で遠心分離 ($15000 \times g$, 5分) し、ヘマトクリットリーダー (KUBOTA) を用いて血球の割合を測定した。

ヘモグロビン (Hb) 濃度 (g/dL) は、和光純薬工業株式会社のヘモグロビン B-テストワコー (シアンメトヘモグロビン法) を使用し測定した。

赤血球指数である平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH), 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) は以下の式でそれぞれ算出した。

$$\text{MCV (fL)} = \text{ヘマトクリット値 (\%)} \div \text{赤血球数} (\times 10^4/\mu\text{L}) \times 1000$$

$$\text{MCH (pg)} = \text{Hb (g/dL)} \div \text{赤血球数} (\times 10^4/\mu\text{L}) \times 1000$$

$$\text{MCHC (g/dL)} = \text{Hb (g/dL)} \div \text{ヘマトクリット値 (\%)} \times 100$$

2.6 グルコース、アルブミン、コレステロール濃度の測定

グルコース (mg/dL) は、全血を用いて自己検査用グルコース測定器 (ニプロ株式会社) で測定した。血漿中のアルブミン濃度 (g/dL), 総コレステロール濃度 (mg/dL) は、和光純薬工業株式会社の A/G テストワコー (プロモクレゾールグリーン法), コレステロール E-テストワコー (コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法) をそれぞれ使用し測定した。

2.7 コルチコステロン濃度の測定

血漿中のコルチコステロンの濃度は、Arbor Assay 社のコルチコステロン測定キット (酵素免疫測定法) を使用し測定した。測定は、マイクロプレートリーダー (CHROMATE4300, Awareness Technology 株式会社) を用いて波長450nmで行った。

2.8 赤血球の酵素活性の測定

慢性ストレス実験では、赤血球の G6PD, GR, GPX の活性を測定した。

測定用の試薬として、GSH, GSSG, グルコース-6-リン酸 (G6P), 塩化マグネシウム (MgCl_2), 酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP^+), 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH), 5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB: エルマン試薬), 過酸化水素水 (H_2O_2), アジ化ナトリウム (NaN_3) 等は和光純薬工業株式会社のものを使用した。また、グルタチオン還元酵素 (GR, 4000U/4mL, Yeast) はオリエンタル酵母工業株式会社のものを使用した。

溶血液の調製は、Thermo Fisher Scientific 社のたんぱく質抽出液 (M-PER) を使用し、赤血球分画液と M-PER を1:4の割合で混合し調製した。

酵素反応は、石英ガラスセル (10mm) 中で行い、測定には分光光度計 (HITACHI U-2001) のタイムスキャン機能を使用した。

G6PD 活性は、反応液 (G6P 7.5mM, NADP^+ 7.5mM, MgCl_2 20mM, pH8.0) 2.0mL に溶血液20 μL 加え、NADPH の生成を波長340nmで5分間測定して求めた。

GR 活性は、反応液 (GSSG 1.0mM, NADPH 0.1mM, DTNB 0.75mM, pH7.5) 2.0mL に溶血液20 μL を加え、GSSG の還元で生じる GSH を DTNB と反応させ、生じた5-mercapto-2-nitrobenzoic acid (TNB) を波長412nm で5分間測定して求めた。

GPX 活性は、反応液 (NADPH 0.15mM, GSH 2.0mM, EDTA 0.4mM, NaN_3 1.0mM, GR 0.5U, H_2O_2 0.1mM, pH7.0) 2.0mL に溶血液10 μL を加

え、GPX による H_2O_2 の処理で生じた GSSG を GR で GSH に還元し、その際に消費される NADPH を波長340nmで5分間測定して求めた。

それぞれの酵素活性は、赤血球分画液の Hb 濃度で補正した。

2.9 赤血球の総 GSH 濃度の測定

赤血球分画液50 μ L と冷却した10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5, 低張液) 450 μ L を混合して溶血液を調製した。その溶血液を遠心ろ過デバイス (ナノセップ 3K, ポール株式会社) で遠心 (10000 \times g, 60分, 4 $^{\circ}$ C) し、ろ液を回収し測定に使用した。

総 GSH (GSH + GSSG) 濃度の測定は、Owens と Belcher の酵素サイクリング法^{16,17)}で行った。測定用の試薬は、酵素活性の測定の時と同様のものを使用した。総 GSH 濃度は、反応液 (DTNB 0.16mM, NADPH 0.13mM, GR 0.3U, EDTA 0.22mM, pH7.4) 3.5mL と試料溶液 (もしくは標準液) 0.2mL を混合し、GSH と DTNB の反応で生じる TNB を波長412 nm で5分間測定して求めた。測定値は赤血球分画液の Hb 濃度で補正した。

2.10 統計処理

値は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計ソフトは IBM SPSS Statistics Ver.22を使用した。統計学的有意水準は5%未満とし、検定には Student's t-test を用いた。

3. 結果

3.1 急性ストレス実験

表1に、急性ストレス後の血中成分を示した。グルコース濃度と総コレステロール濃度は、AC 群と比較して AS 群では高い傾向にあった。また、コルチコステロン濃度は、AC 群と比較して AS 群では有意に高値 ($p < 0.05$) であった。アルブミンは両群間で差はなかった。

表2に、急性ストレス後の赤血球の性状を示した。赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、赤血球指数 (MCV, MCH, MCHC) は、両群間に差はなかった。

図2に、急性ストレス後の赤血球の総 GSH 濃度 (mg/g Hb) を示した。AC 群は 2.65 ± 0.30 , AS 群は 2.72 ± 0.45 で両群間に差はなかった。

3.2 飼育期間中の体重、摂食量、飲水量の経日変化

慢性ストレス実験における体重、摂食量、飲水量の経日変化をそれぞれ図3, 図4, 図5に示した。また、表3に実験飼育開始時と終了時の体重、体重変化量、総摂食量、総飲水量を示した。体重 (g) は、CC 群では飼育開始時から増加した。一方、CS 群はストレス負荷の翌日から減少した。開始時体重と終了時体重を比較すると、CC 群では有意 ($p < 0.05$) に増加し、CS 群では有意 ($p < 0.05$) に低下した。

摂食量 (g/日) は、CS 群では、ストレス負荷の

表1 急性ストレス後の血中成分

	AC群	AS群
グルコース (mg/dL)	157.8 \pm 8.8	223.0 \pm 33.9
アルブミン (g/dL)	2.8 \pm 0.3	2.9 \pm 0.2
総コレステロール (mg/dL)	90.7 \pm 8.5	125.2 \pm 17.9
コルチコステロン (μ g/dL)	10.8 \pm 2.0	27.0 \pm 2.5*

* AC群と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

表2 急性ストレス後の赤血球の性状

	AC群	AS群
赤血球数 ($\times 10^4 / \mu$ L)	529.2 \pm 23.4	523.0 \pm 14.5
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	11.5 \pm 0.7	12.1 \pm 0.7
ヘマトクリット値 (%)	40.8 \pm 1.4	42.4 \pm 0.7
MCV (fL)	77.3 \pm 2.0	81.2 \pm 1.0
MCH (pg)	21.7 \pm 0.7	23.0 \pm 0.8
MCHC (g/dL)	28.2 \pm 1.4	28.4 \pm 1.4

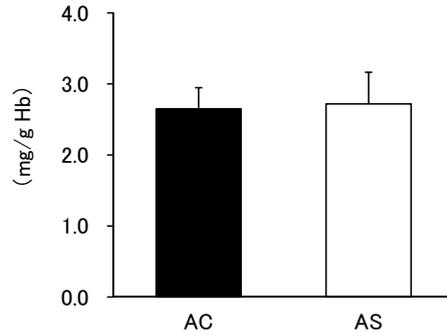


図2 急性ストレス後の赤血球中の総グルタチオン濃度

表3 飼育期間中の体重変化及び総摂食量, 飲水量

	CC群	CS群
開始時体重 (g)	38.6 ± 0.7	37.7 ± 0.8
終了時体重 (g)	40.1 ± 0.7#	35.4 ± 0.9#*
体重変化量 (g)	1.5 ± 0.5	-2.7 ± 0.3*
総摂食量 (g/14日)	73.9 ± 1.9	60.3 ± 1.6*
総飲水量 (g/14日)	80.1 ± 8.5	67.1 ± 2.9

開始時体重と比較して有意差あり (p < 0.05)

* CC群と比較して有意差あり (p < 0.05)

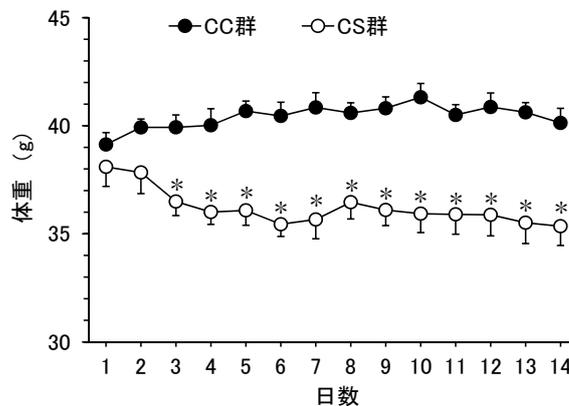


図3 飼育期間中の体重の経日変化

* CC群と比較して有意差あり(p < 0.05)

翌日から低下し, 3日目から6日目で最も低く, 7日目以降は増加した. 総摂食量 (g/14日) を2群間で比較すると, CC群に比べてCS群で有意 (p < 0.05) に低下していた. 飲水量 (g/日) は, CC群ではほぼ一定だったが, CS群では, 摂食量と同様にストレス負荷の翌日から低下し, 3日目で最も低く, その後, 徐々に増加した. 総飲水量 (g/14日) は両群間に有意な差はなかったが, CC群に比べてCS群で低い傾向にあった.

3.3 血中成分, 赤血球の性状

表4に, 慢性ストレス後の血中成分を示した. 表5

に赤血球の性状を示した. いずれも2群間に差はなかった.

3.4 赤血球の酵素活性

表6に G6PD, GR, GPX の酵素活性 (U/g Hb) をそれぞれ示した. いずれも2群間に差はなかった.

3.5 赤血球中総 GSH 濃度

図6に, 慢性ストレス後の赤血球の総 GSH 濃度 (mg/g Hb) を示した. CC群は 2.94 ± 0.42 , CS群 2.27 ± 0.22 で CS群は CC群と比較して低い傾向にあった.

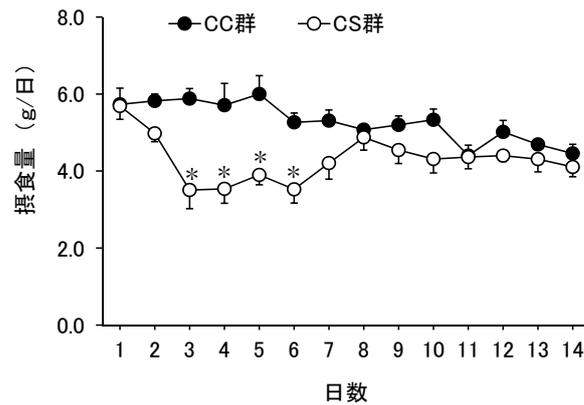


図4 飼育期間中の摂食量の経日変化

*CC群と比較して有意差あり(p<0.05)

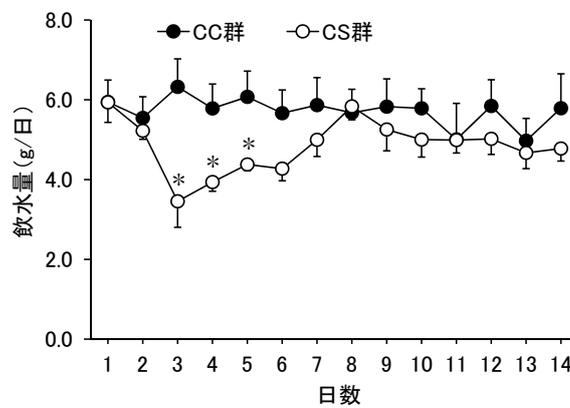


図5 飼育期間中の飲水量の経日変化

*CC群と比較して有意差あり(p<0.05)

表4 慢性ストレス後の血中成分

	CC群	CS群
グルコース (mg/dL)	137.0 ± 6.0	148.0 ± 7.0
アルブミン (g/dL)	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.0
総コレステロール (mg/dL)	106.8 ± 5.2	114.4 ± 17.0
コルチコステロン (μg/dL)	15.0 ± 4.8	13.2 ± 2.6

表5 慢性ストレス後の赤血球の性状

	CC群	CS群
赤血球数 (×10 ⁴ /μL)	527.0 ± 10.0	545.0 ± 6.0
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	12.4 ± 0.6	11.8 ± 0.5
ヘマトクリット値 (%)	40.8 ± 1.1	39.8 ± 1.0
MCV (fL)	77.5 ± 2.6	73.0 ± 1.5
MCH (pg)	23.5 ± 1.1	21.7 ± 1.0
MCHC (g/dL)	30.3 ± 0.8	29.7 ± 0.8

表6 赤血球のグルタチオン代謝関連酵素の酵素活性

	CC 群	CS 群
G6PD(U/g Hb)	11.2 ± 0.7	11.3 ± 0.8
GR(U/g Hb)	2.8 ± 0.5	2.5 ± 0.3
GPX(U/g Hb)	145.7 ± 20.5	152.4 ± 20.6

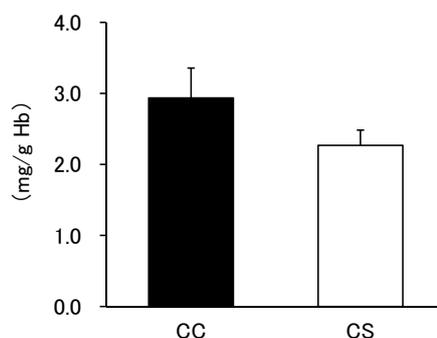


図6 慢性ストレス後の赤血球中の総グルタチオン濃度

4. 考察

4.1 ストレス反応

本実験で用いた拘束ストレスは、ストレス実験で広く用いられている方法の一つである³⁾。生体にストレスが加わった場合、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の分泌によって、副腎皮質から糖質コルチコイドが分泌されるが、ヒトでは主にコルチゾールが、また、マウスでは、 17α -ヒドロキシラーゼの活性が弱いため、主にコルチコステロンが分泌される。急性ストレス実験において、拘束ストレスを2時間与えた AS 群では、血中コルチコステロン濃度が AC 群と比較して有意に高値であった。そのため、拘束ストレスによってストレス反応が生じていたと考えられる。また、AS 群では、AC 群と比較して血中グルコース濃度と総コレステロール濃度が高い傾向にあった。ストレスは SAM 系と HPA 系を活性化させ、肝グリコーゲンの分解や糖新生を亢進させ血糖値を上昇させる。また、脂肪組織の脂肪分解によって血中遊離脂肪酸の増加や肝臓での超低密度リポたんぱく質 (VLDL) の合成と放出によって血中のトリグリセリドやコレステロールが高まる¹⁸⁾。したがって、拘束ストレスによって、SAM 系及び HPA 系が活性化され、血糖や血中脂質が上昇したと考えられた。

次に、慢性ストレス実験では、CC 群と比較して CS 群では、ストレス負荷の開始から体重、摂食量及び飲水量の有意な減少がみられた。ストレス状態においては、交感神経系の活性化により消化管運動

が抑制される⁴⁾。また、ストレスによって視床下部から分泌される副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) や免疫系が刺激されて産生する炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1) は食欲を抑制する¹⁹⁾。したがって、1日2時間の拘束ストレスは、ストレス負荷をかけていた時間帯だけでなく、夜間の摂食行動にまで影響を及ぼしたと考えられる。CS 群では、摂食量が3日目から6日目にかけて一時的に低下したがその後は回復した。また、最終日 (14日目) の血中コルチコステロン濃度や血中グルコース濃度に差がみられなかった。動物実験では、ストレスをある程度繰り返し与えるとその刺激に対する反応が、次第に減弱していくことから²⁰⁾、拘束ストレスに対してマウスは適応したと考えられた。

4.2 赤血球の性状

ヒトの赤血球の寿命は約120日で、マウスでは約45日である²¹⁾。老化した赤血球は、解糖系の低下によって ATP の産生が低下し、赤血球が小球化する¹⁴⁾。また、小球化によって内部粘性が高まると変形能が低下するため、脾臓や肝臓でマクロファージに補足され分解される。

そこで、急性および慢性ストレスが、赤血球の性状に及ぼす影響について調べた。その結果、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球指数 (MCV, MCH, MCHC)、いずれの項目においても差は認められなかった。したがって、今回のストレス条件においては、赤血球の老化や溶血は生じていなかったと考えられた。

4.3 ストレスと赤血球のグルタチオン代謝

慢性ストレスがマウス赤血球の総 GSH 濃度とグルタチオン代謝関連の酵素活性に及ぼす影響について検討した。その結果、拘束ストレスによる慢性ストレスは、マウス赤血球の G6PD, GR, GPX の酵素活性には影響しなかったが、赤血球の総 GSH 濃度には低下傾向がみられた。

GSH は、赤血球内でグルタミン酸、システイン、グリシンから合成される抗酸化物質で、赤血球内では99%以上が還元型として存在する。GSH は赤血球外に排出されることはないが、GSH の酸化で生じた GSSG は高濃度になると赤血球外へ排出される²²⁾。赤血球の GSH の半減期は、ヒトで4.0~4.7日²³⁾、マウスは不明であるがラットでは2.7日²⁴⁾である。したがって、赤血球では、GSH の合成と GSSG の排出が常に行われており、生理的条件下では、そのバランスが一定に保たれている。

慢性ストレスによって赤血球の総 GSH 濃度の低下がみられたが、その原因としては、GSH の合成の低下と GSSG の排出の増加の2つの可能性が考えられる。

まず、赤血球での GSH の合成の低下について考えてみると、赤血球内で GSH の合成を行うためには、その構成アミノ酸であるグルタミン酸、システイン、グリシンが必要となる。このうち、グルタミン酸とグリシンは細胞外に豊富に存在しているのに対し、システインは非常に少ない。また、赤血球はシスチン（システインのジスルフィド型）輸送の活性を持たないのでシスチンを利用することはできない。そのため、GSH 合成においてはシステイン濃度が律速因子となっている²⁵⁾。

このことから、血中のシステインの低下は赤血球の GSH 合成を低下させる原因になると考えられる。CS群では、拘束ストレスによって、はじめの数日間、摂食量の低下がみられた。したがって、たんぱく質摂取の低下によって血中のシステイン濃度が低下していた可能性がある。また、摂食量の低下によって脂肪分解が高まると遊離脂肪酸が増加する。脂肪酸がアルブミンへ結合するとアルブミンの遊離チオール基の反応性が高まることが報告されており²⁶⁾、アルブミンと血中システインとの結合によってシステイン濃度が低下した可能性も考えられる。

次に、赤血球外へ GSSG の排泄の増加については、赤血球内の GSH の GSSG への酸化反応の増加と GSSG の GSH への還元反応の低下の2つの原因が考えられる。

はじめの GSH の GSSG への酸化反応の増加について考えてみると、赤血球は酸素運搬を担うため、

赤血球内では常に O_2^- が発生していると考えられている。 O_2^- は SOD によって H_2O_2 になり、さらに H_2O_2 は GPX あるいはカタラーゼによって H_2O に分解されるので、通常は活性酸素の産生系と消去系のバランスが保たれている。しかし、ストレスによる生体機能の変化は、このバランスを崩すと考えられる。ストレスによって心拍数が増加した場合、赤血球による酸素運搬が増加する。そのため、赤血球内の O_2^- の生成が増加し、 H_2O_2 の生成が増え、GSH の GSSG への酸化反応が増加すると考えられる。また、 H_2O_2 は細胞膜を通過するので、赤血球以外で発生する活性酸素の影響も受けると考えられる。活性酸素は、好中球やマクロファージなどの血液中の細胞のほか、血管内皮細胞や平滑筋細胞からも産生され⁹⁾、この産生には NADPH オキシダーゼやキサンチンオキシダーゼが関与する^{27,28)}。したがって、ストレス反応によって活性酸素が増大し、赤血球内の GSH の GSSG への酸化が増加する可能性が考えられる。

次に、GSSG の GSH への還元反応が低下した場合について考えてみると、GSSG の還元は GR によって行われ、この反応では NADPH が必要である。NADPH は解糖系の側路であるペントースリン酸回路で合成され供給される。G6PD はこの回路の律速酵素である。CS 群の GR および G6PD 活性の低下はなく、GSSG の還元反応は機能していたと考えられる。しかし、NADPH はグルコースの供給の低下によって生成が低下する。CS 群の血中グルコース濃度は CC 群と CS 群に差はなかったが、拘束ストレスの開始から摂食量が低下していた。そのため、その間の血中グルコース濃度が低下していたとすれば NADPH の生成が低下していた可能性がある。

その他、NADPH は GSSG の還元反応のほかに、ポリオール経路でも消費される^{29,30)}。ポリオール経路では、過剰なグルコースがソルビトールに還元され、さらにフルクトースに酸化される。NADPH は、ソルビトールへの還元反応に必要である。したがって、過剰なグルコースは、NADPH を低下させ、GSSG の還元を低下させる。しかしながら、本実験では、急性ストレス後は、血中グルコース濃度の上昇がみられたものの、慢性ストレス後は血中グルコース濃度の上昇はなかったことから、影響はほとんどなかったと考えられる。

今後の課題として、血漿中のシステインや GSH 濃度の評価も同時に行い、赤血球からの GSSG の排泄や赤血球へのシステインの取り込みについて評価していく必要があると考えている。

5. 結語

赤血球中の総 GSH 濃度は、GSH の合成と GSH の酸化で生じる GSSG の赤血球外への排出によって決まる。したがって、ストレスによって GSH の合

成と GSSG の排泄に不均衡が生じたと考えられた。

これらの結果は、慢性ストレスが赤血球のグルタチオン濃度を低下させ、抗酸化機能を低下させる可能性を示唆した。

謝 辞

本研究は平成27年度川崎医療福祉大学医療福祉研究費の助成により行われたものである。

利益相反 (COI)

本研究は開示すべき利益相反 (COI) 関係にある企業等はない。

文 献

- 1) Dimsdale JE : Psychological stress and cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*, **51**(13), 1237-1246, 2008.
- 2) 眞茅みゆき, 筒井裕之 : 精神・心理ストレスと心血管障害. *Angiology Frontier*, **14**(3), 45-51, 2015.
- 3) 斎藤徹編著 : ストレスをめぐる生物学—ネズミから学ぶ—. 丸善出版, 東京, 2016.
- 4) 久住眞理, 鈴木はる江, 筒井末春, 福田潤, 久住武, 小岩信義 : ストレスと健康. 改訂. 人間総合科学大学, さいたま, 2008.
- 5) 井上信孝 : 職業性ストレスと心血管病. 日本職業・災害医学会会誌, **63**(5), 241-246, 2015.
- 6) 池田正春, 南里宏樹 : ストレスと血管壁病変. 動脈硬化, **23**(7-9), 439-441, 1996.
- 7) 末松誠, 土屋雅春 : 臨床における oxidative stress の意義. 日本内科学会雑誌, **79**(9), 1208-1213, 1990.
- 8) 下澤達雄, 藤田敏郎 : 酸化ストレスと心血管病. 循環器専門医, **19**(1), 3-7, 2011.
- 9) 坂田則行 : 酸化ストレスと動脈障害. 脈管学, **43**(11), 685-689, 2003.
- 10) 板部洋之 : 生活習慣病と酸化ストレス. ファルマシア, **37**(9), 805-809, 2001.
- 11) 山科章 : 疫学に学ぶ—心拍数と心血管疾患—. 心臓, **43**(11), 1397-1401, 2011.
- 12) 西森一正 : 長期ストレスによる血管病変. 動脈硬化, **24**(9), 427-430, 1997.
- 13) 今西仁, 中井哲郎, 阿部達生, 瀧野辰郎 : ヒト赤血球の加齢と Glutathione 代謝 (第2報) —GSH 関連酵素について—. 含硫アミノ酸, **8**, 139-145, 1985.
- 14) 高久史磨, 高田明和 : 血液. 医学書院, 東京, 1987.
- 15) 近藤宇史 : 赤血球のグルタチオン代謝とその異常. 蛋白質核酸酵素, **33**(9), 1466-1473, 1988.
- 16) Owens CW and Belcher RV : A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochemical Journal*, **94**, 705-711, 1965.
- 17) 東胤昭 : グルタチオンの分離と定量法. 蛋白質核酸酵素, **33**(9), 1370-1382, 1988.
- 18) 島袋充生, 佐田政隆, 山川研, 益崎裕章 : コルチゾールと脂質代謝. *The Lipid*, **23**(1), 35-41, 2012.
- 19) 太田一樹 : 空腹・満腹のメカニズム—中枢性摂食調節機構について—. 鎌倉女子大学学術研究所報, **12**, 1-12, 2012.
- 20) 日本比較内分泌学会編 : からだの中からストレスをみる. 初版, 学会出版センター, 東京, 2000.
- 21) 何普明, 安本教傳 : 老化促進マウス赤血球の細胞齢によるグルタチオンペルオキシダーゼ活性と酸化タンパク質レベルの変化. 日本栄養・食糧学会誌, **43**(2), 121-125, 1990.
- 22) 谷口直之, 近藤宇史, 石川智久 : グルタチオンのトランスポート. 膜, **12**(4), 180-190, 1987.
- 23) Lunn G, Dale GL and Beutler E : Transport accounts for glutathione turnover in human erythrocytes. *Blood*, **54**(1), 238-244, 1979.
- 24) Mortensen RA, Haley MI and Elder HA : The turnover of erythrocyte glutathione in the rat. *The Journal of Biological Chemistry*, **218**(1), 269-273, 1956.
- 25) 坂内四郎, 立石紀子 : 動物細胞のグルタチオン維持機構. 蛋白質核酸酵素, **33**(9), 1442-1449, 1988.
- 26) 大和真由実 : 肥満・エネルギー代謝と酸化ストレス. 吉川敏一監修, 酸化ストレスの医学, 改訂第2版, 診断と治療社, 東京, 309-315, 2014.
- 27) 木下浩之 : 酸化ストレスからみた臓器保護—心不全と酸化ストレス—. 日本臨床麻酔学会誌, **31**(1), 116-123, 2011.
- 28) 赤堀貴彦, 木下浩之 : ヒト血管と酸化ストレス. 循環制御, **36**(3), 164-167, 2015.
- 29) Yan LJ : Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. *Animal Models and Experimental Medicine*, **1**(1), 7-13, 2018.

- 30) Ciuchi E, Odetti P and Prando R : Relationship between glutathione and sorbitol concentrations in erythrocytes from diabetic patients. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 45(5), 611-613, 1996.

(令和元年6月14日受理)

Effects of Chronic Stress on Glutathione Metabolism of Erythrocytes in Mice

Hironori NAKAMURA, Sachi MIYAKE, Yuri NAKAMURA and Shin YAMAOKA

(Accepted Jun. 14, 2019)

Key words : stress, glutathione, antioxidant, mice

Abstract

Stress increases the secretion of catecholamines and glucocorticoids from the adrenal glands, and change the blood pressure and blood components. These changes may increase oxidative stress in erythrocytes. In this study, we focused on the antioxidant glutathione and examined the effect of chronic stress on glutathione metabolism of erythrocytes in mice. Male ICR mice were divided into two groups, a control group and a stress group. The stress group was subjected to restraint stress for 2 hours daily for 14 days. Although no differences were observed between the two groups in the enzyme activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase, which are involved in the antioxidant system of glutathione, the total glutathione level in erythrocytes was lower in the stress group compared with the control group. The concentration of total glutathione in erythrocytes is determined by the synthesis of GSH and the export of GSSG. Therefore, it is thought that stress caused an imbalance between GSH synthesis and GSSG export. These results suggested that chronic stress may lower the levels of glutathione in erythrocytes and reduce the antioxidant function.

Correspondence to : Hironori NAKAMURA

Department of Clinical Nutrition

Faculty of Health Science and Technology

Kawasaki University of Medical Welfare

Kurashiki, 701-0193, Japan

E-mail : hironori@mw.kawasaki-m.ac.jp

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.29, No.1, 2019 81 – 90)