

## 子牛における血液活性酸素種の迅速測定法の開発

高橋秀之<sup>1)\*</sup>, 宮本 亨<sup>1)</sup>, 高橋雄治<sup>2)</sup>, 堀野理恵子<sup>1)</sup>, 藤野資子<sup>1)</sup>, 中村菊保<sup>1)</sup>,  
山田 学<sup>1)</sup>, 山本 佑<sup>1)</sup>, 大橋 傳<sup>3)</sup>, 筒井 暁<sup>4)</sup>, 南波真広<sup>4)</sup>,  
小柳津研一<sup>4)</sup>, 湯浅 眞<sup>4)</sup>

(平成17年 8月 1日 受付)

### Development of method for rapid measurement of blood reactive oxygen species in calves

Hideyuki TAKAHASHI<sup>1)\*</sup>, Toru MIYAMOTO<sup>1)</sup>, Yuji TAKAHASHI<sup>2)</sup>, Rieko HORINO<sup>1)</sup>, Motoko FUJINO<sup>1)</sup>,  
Kikuyasu NAKAMURA<sup>1)</sup>, Manabu YAMADA<sup>1)</sup>, Yu YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Tsutai OOHASHI<sup>3)</sup>,  
Satoshi TSUTSUI<sup>4)</sup>, Masahiro NANBA<sup>4)</sup>, Kenichi OYAIZU<sup>4)</sup> & Makoto YUASA<sup>4)</sup>

東京理科大学の湯浅らによって開発されたスーパーオキシドアニオンラジカルの電気化学的検出法を子牛血液に応用し、末梢血液中のスーパーオキシドアニオンラジカルなどの活性酸素種濃度を迅速測定する方法を確立するための実験を行った。まず、当該センサーが子牛血液の活性酸素種濃度を検出しているかどうかを確認するため、活性酸素種の生成及び消去酵素であるキサンチンオキシダーゼやスーパーオキシドディスムターゼ、及び貪食細胞刺激剤（貪食細胞からの活性酸素放出刺激剤）であるオプソニン化ザイモザンなどを子牛の血液に投与してセンサーの電流値を調べた。その結果、当該センサーが間違いなく子牛血液中の活性酸素種を検出していることを確認した。次に、当該センサーを用いて子牛の去勢手術に伴う末梢血活性酸素種濃度を7日間にわたって調べたところ、術後3時間目をピークとする上昇を示し、その後、緩やかに低下した。この反応は、末梢血化学発光能や総白血球数の増減にほぼ連動した動きであった。以上、子牛血液中の活性酸素種濃度の変化を迅速測定することに成功した。

#### はじめに

スーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^{\cdot -}$ ) などの活性酸素種 (ROS) は、病原微生物の殺処理など、生命機構を支える不可欠因子として機能している (4)。一

方、過剰のROSの生成に対しては、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) といったラジカル消去系酵素などが消去作業を行い、生体の恒常性が保たれている (3)。しかし、恒常性が崩れて酸化ストレス状態に陥ると、大量のROSが生成された強いラジカル毒性状態となり、種々の病態を引き起こす原因となる (5, 9)。特に、経済性、生産性が最優先される家畜は、常にこのバランスが崩れやすい飼育状態におかれている。例えば、子牛の細菌性下痢や肺炎及び成牛のルーメンアシドーシスに由来する第四胃変位や肝炎などの疾病では、菌体構成成分であるエンドトキシン (LPS) が貪食細胞からのROS放出を促し、それが組織障害や炎症反応促進の原因の一つになることが推測されている。近年、 $O_2$ と $O_2^{\cdot -}$ の間の電子伝

- 1) 動物衛生研究所生産病研究部
- 2) 動物衛生研究所北海道支所
- 3) 動物衛生研究所企画調整部
- 4) 東京理科大学理工学部

\* Corresponding author ; Mailing address : Hideyuki TAKAHASHI, Associate Director, Department of Production Animal Diseases, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0856, Japan. Tel&Fax : +81-29-838-7780. Email : htaka@affrc.go.jp

達の過程で流れる電流を効率良くとらえる電気化学的検出法が東京理科大学の湯浅らによって開発された(13, 14)。この新手法は, ROSを高感度で非破壊的に即時測定ができるといった特徴を備えている。

そこで本研究では, この手法を子牛血液のROS検出に応用し, 血液ROS濃度を迅速, 且つ正確に測定する方法を確立した。また, 外科的ストレスとして去勢手術を行い, そのストレス負荷に伴って血液ROS濃度がどう変動するかを調べた。併せて, 血液化学発光能(血液CL能)や総白血球数(WBC)など, 他の免疫要因などとの関連も調べた。

### 試験研究方法

#### 1. 使用動物及び血液材料

平均体重123.5kgの4~5ヶ月齢のホルスタイ雄子牛, 6頭を用いた。血液材料は, 頸静脈血を用い, ヘパリン処理をした全血を用いた。

#### 2. 子牛血液中のROS検出の確認試験

##### (1) ROS検出の確認

ROS濃度測定用の機器は, 東京理科大学にて製造されたものを用いた(写真1, 2参照)。まず, 当該機器のセンサー(ニードルタイプ)が $O_2^{\cdot -}$ などのROSを検出していることを確認するための実験を行った。キサンチン(XAN)を含んだ生理食塩水中に $O_2^{\cdot -}$ の生成酵素であるキサンチンオキシダーゼ(XOD, 20~60mU/ml)や消去系酵素であるSOD(1U/ml)を加えてセンサーが検出する電流値を調べた。さらに, 好中球などの貪食細胞を刺激する働きを持つオプソニン化ザイモザン溶液(OZ, 1mg/100 $\mu$ l)を加えてセンサーの電流変化量を調べた。

##### (2) 測定時の温度条件

サンプルのROS濃度を調べる場合, どのような温度条件が最適かを調べた。子牛の血液(ヘパリン血)を採取後, 37, 26及び0℃に保温し, 当該センサーを用いて電流変化量を測定した。

##### (3) 採材後の時間条件

当該センサーを採材した血液に浸し, 採血後の時間経過によって血液の電流変化量がどのように変動するかを調べた。採材後の時間は, 採血直後, 30分及び60分であった(写真1, 2参照)。



写真1  $O_2^{\cdot -}$ 測定装置の本体



写真2  $O_2^{\cdot -}$ 測定装置のセンサー部分(ニードルタイプ, 2種類)  
採血後, 採血管ごとアルミニウムブロック恒温槽で37℃に保温し, その血液中にこれらのセンサーを浸して測定した。

#### 3. 去勢手術試験

##### (1) 去勢手術

6頭の子牛(平均体重128.9kg)にキシラジン鎮静下(20mg/1mlを筋注)で精巣摘出手術を行った。すなわち, メスによる睾丸部位の皮膚の切開, 精巣の摘出・除去, 切開部の縫合・消毒を行った。対照群では, キシラジンの筋注のみを行った。

##### (2) 採材時刻

採材時刻は, 手術前, 手術後1.5, 3, 6時間目, 1, 2, 3及び7日目であった。

##### (3) 測定項目

各採材時刻における測定項目は, 臨床所見として直腸温及び心拍数, 血液成分として血液CL能(10), WBC

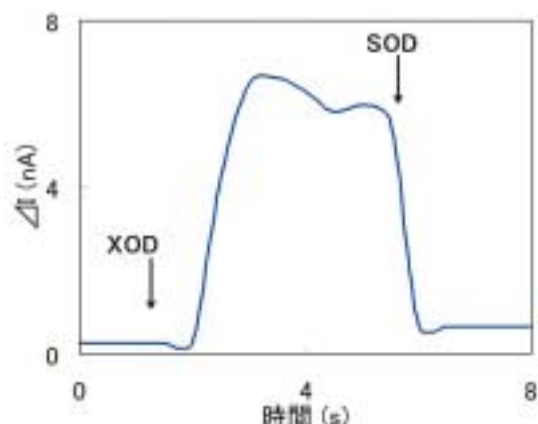


図1 キサンチン (XAN) 含有生理食塩水中へのキサンチンオキシダーゼ (XOD, 60 mU/ml) 及びスーパーオキシドデイスムターゼ (SOD, 1U/ml) の投与に伴う電流変化量の変動

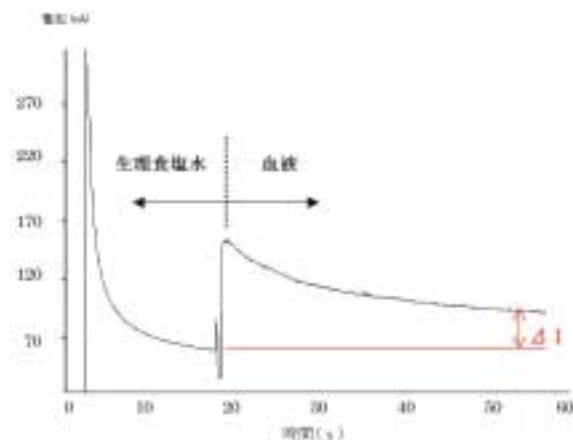


図2 ニードル型ROSセンサーを用いての子牛血液中のROS濃度 ( $O_2^{\cdot -}$ ) の測定例血液測定のプラトー時の値から生理食塩水 (生食) 測定のプラトー時の値を引いた値 ( $I$ ) を原数値とした。以下の全ての原数値を、同様の方法で算出した。生食及び血液の測定は、 $37^{\circ}C$  に保温した状態で行った。

及び血液ROS濃度であった。

(4) 血液ROS濃度の測定

頸静脈血を採血後、直ちにアルミニウムブロック恒温槽にて $37^{\circ}C$  に保温しつつ、血液中にニードルタイプのセンサーを挿入して行った (写真2参照)。

結果の概要

1. 生理食塩水中でのROSの検出

XAN含有生理食塩水中にXODを加えると、電流変化量 ( $I$  (nA)) は直ちに上昇した。次にSODを加えると、電流変化量は直ちに低下した (図1)。これらの結果から、当該センサーはXAN含有生理食塩水中のROSを検出していることを確認した。

2. 子牛血液中でのROSの検出

当該センサーを用いての血液ROS濃度の測定例を図2に示す。すなわち、血液中での電流変化量から生理食塩水中での電流変化量を引いた値 ( $I$  (nA)) を血液ROS濃度とした。

子牛血液中へXODを投与すると、電流変化量が上昇した。更に、XODの投与量を段階的に上げてゆくと、濃度依存的に電流変化量は上昇した (図3)。この結果から、当該機器のセンサーは子牛血液中の $O_2^{\cdot -}$ を検出していることを確認した。また、子牛血液中にOZを投与すると、電流変化量が上昇した (図4)。このことから、当該センサーが子牛血液中のROSを検出していることを確認した。

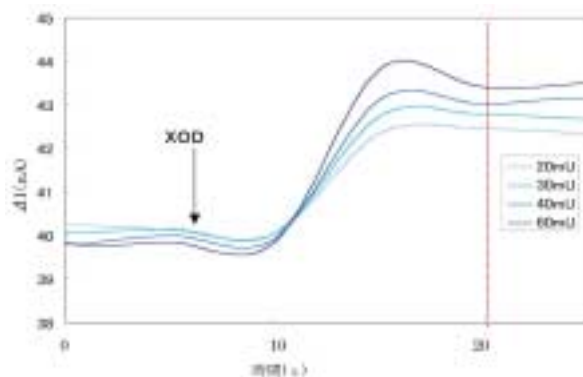


図3 子牛血液中へのキサンチンオキシダーゼ (XOD) の投与量の増加に伴う電流変化量の上昇

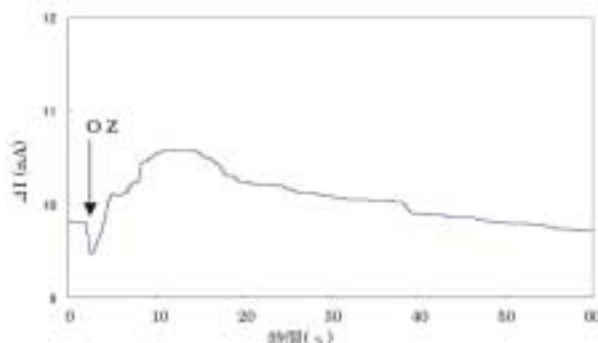


図4 子牛血液中へのオプソニイズ化ザイモザン (OZ, 1mg/100  $\mu$ l) の投与に伴う電流変化量の上昇

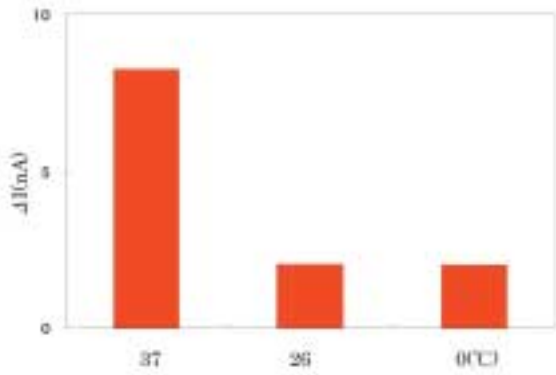


図5 血液サンプルの温度条件と血液ROS濃度

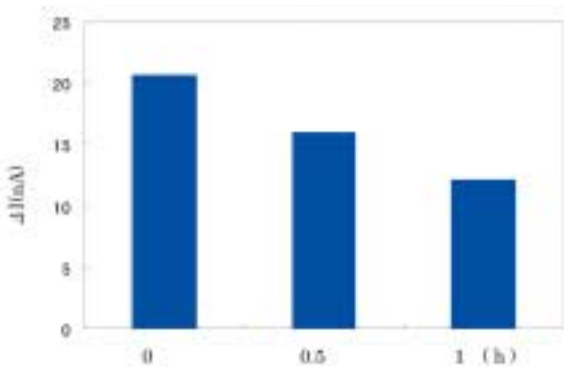


図6 血液サンプルの採血後の時間経過に伴う血液ROS濃度の低下

### 3. 血液ROS濃度の測定条件の設定

採材血液をそれぞれ37, 26及び0 に保温して血液ROS濃度を測定した結果を図5に示す。すなわち, 血液サンプルの温度条件は, 37 が最適であることが判明した。

図6に, 採血後の時間経過に伴う血液ROS濃度の変動を示す。すなわち, 採血後の時間経過によってROS濃度が比較的早く低下することを示しており, 採血後は出来るだけ速やかに測定すべきであることが確認された。

### 4. 去勢手術に伴う臨床所見の変化

直腸温は, 去勢手術後1.5~6時間目にかけて0.3~0.5の上昇が起こったが, その後は手術前の値に戻った(図7)。心拍数は, 手術後1.5~6時間目に手術前の約30%ほど増加したが, その後は手術前の値に戻った(図8)。

### 5. 去勢手術に伴う血液CL能及びWBCの変化

血液CL能は, 去勢手術後3時間目をピークとする上昇を示した(図9)。一方, WBCは6時間目をピークとする上昇を示した(図10)。

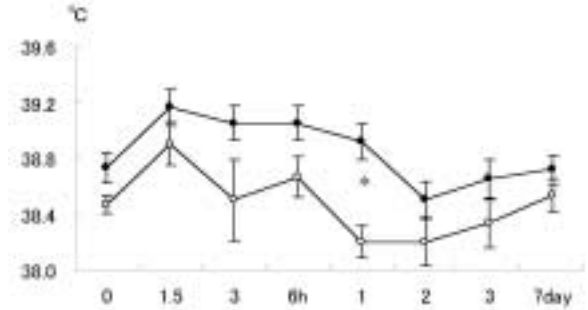


図7 去勢手術に伴う直腸温の変化 ( : 去勢手術群 (n=6, mean ± SE), : 対照群 (n=3, mean ± SE), 両群間の有意差 \* : p < 0.05)

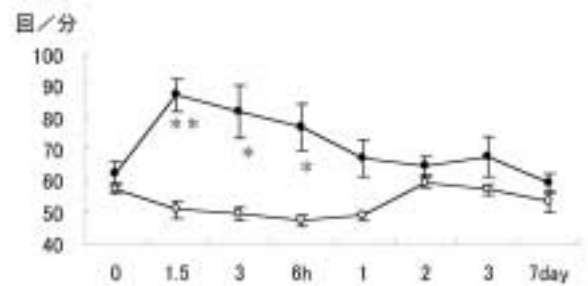


図8 去勢手術に伴う心拍数の変化 ( : 去勢手術群 (n=6, mean ± SE), : 対照群 (n=3, mean ± SE), 両群間の有意差 \* : p < 0.05, \*\* : p < 0.01)

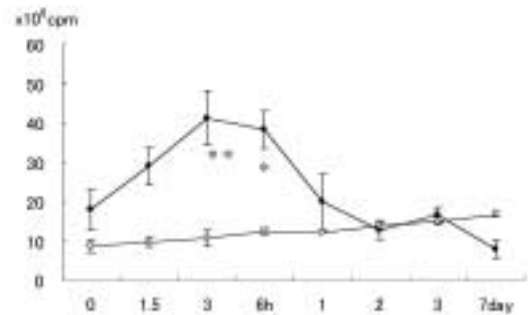


図9 去勢手術に伴う血液化学発光能の変化 ( : 去勢手術群 (n=6, mean ± SE), : 対照群 (n=3, mean ± SE), 両群間の有意差 \* : p < 0.05, \*\* : p < 0.01)

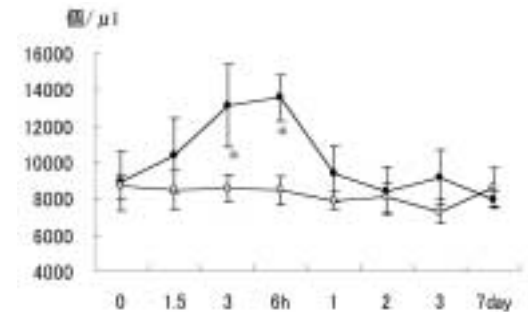


図10 去勢手術に伴う血液白血球数の変化 ( : 去勢手術群 (n=6, mean ± SE), : 対照群 (n=3, mean ± SE), 両群間の有意差 \* : p < 0.05)

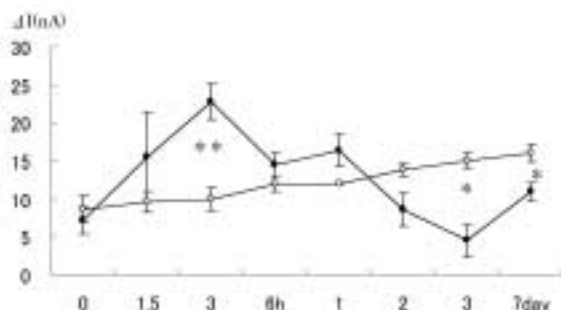


図11 去勢手術に伴う血液活性酸素種濃度の変化 (○: 去勢手術群 (n=6 ± SEM), □: 対照群 (n=3 ± SEM), 両群間の有意差 \*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01)

## 6. 去勢手術に伴う血液ROS濃度の変化

図11に去勢手術に伴う血液ROS濃度の変化を示す。血液ROS濃度は、術後3時間目をピークとする上昇を示し、その後漸減した。

以上、子牛の去勢手術によって血液ROS濃度が術後3時間目をピークとする上昇反応を起こすことが判明した。また、このROS濃度の変動は、血液CL能及び総白血球数の変動にほぼ連動するものであった。

### 考察・まとめ

ROSとは、 $O_2$ が段階的に還元（電子が付加）される過程で生じる活性に富む酸素種をいう。おもなROSとして、 $O_2^{\cdot -}$ 、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ )、一重項酸素 ( $^1O_2$ ) の4種類があげられる。これらの狭義のROSに、さらに酸化窒素 ( $NO$ ,  $NO_2$ )、オゾン ( $O_3$ )、次亜塩素酸イオン ( $ClO^{\cdot -}$ )、脂質過酸化物 ( $LOOH$ ,  $LOO^{\cdot}$ ,  $LO^{\cdot}$ ) などの酸素を含む反応性の高い物質を含めて広義のROSという。このようなROSは、そのほとんどが $O_2^{\cdot -}$ から派生したものであるため、 $O_2^{\cdot -}$ を正確にとらえることが極めて重要となる。しかし、 $O_2^{\cdot -}$ は非常に不安定なラジカルであり、発生後直ちに（数秒以内で）消滅してしまうため、生体中の $O_2^{\cdot -}$ 測定は非常に困難とされている。従来の $O_2^{\cdot -}$ の測定法として、電子スピン共鳴法 (Electron Spin Resonance; ESR) (11)、分光学的生化学法 (シトクロムc還元法、NBT還元法、CL法など) (6, 7, 8) 及び電気化学法 (1, 2, 12) などがあげられる。電子スピン共鳴法は、測定装置が極めて高額であり、また測定操作が複雑である。分光学的生化学法は、試薬の投与等によって検体を刺激し、その反応程度を計測するため、測定操作が煩雑で、結果が出るまでかなりの時間を要する。一方、電気化学法

は、 $O_2^{\cdot -}$ が $O_2$ に変換する時に流れる酸化電流を捉える方法である。この方法では電極センサーに触れる液体のROS濃度を直接測定できるため、*in vivo*測定に適した方法といえる。しかし、従来法は、電極には金電極が用いられ、また電極の触媒としてシトクロムcやSODといった生体由来の物質が用いられるため、測定自体が高価なものとなり、且つ触媒失活がやすく、安定的な測定は極めて困難であった (1, 2, 12)。

湯浅らは金属ポルフィリン誘導体の重合膜を修飾した電極形をセンサー部としたROSセンサーを開発した (13, 14)。この電極センサーは全合成なので触媒失活もなく、安定的なROS測定が可能とされている。また、当該センサーはシトクロムcの活性中心を真似た合成鉄ポルフィリン錯体で修飾した電極を使用しているため、選択度の高い $O_2^{\cdot -}$ 検出が可能とされている (13)。本研究では、このROS検出手法を応用し、子牛血液のROS濃度の迅速測定を試みた。まず、当該センサーが子牛血液のROS濃度を検出できるかどうかを確認するため、 $O_2^{\cdot -}$ の生成及び消去酵素であるXODやSOD、及び貪食細胞刺激剤 (貪食細胞からの活性酸素放出刺激剤) であるOZを子牛の血液に投与してセンサーの電流値を調べた。その結果、当該センサーが間違いなく子牛血液中の $O_2^{\cdot -}$ を検出していることを確認した。

次に、当該センサーを用いて子牛の去勢手術に伴う血液ROS濃度を7日間にわたって調べたところ、術後3時間目をピークとする上昇を示し、その後、緩やかに低下した。この反応は、血液CL能や総白血球数の増減にほぼ連動した動きであった。医学領域において、体液と人工物質の物理的接触だけでも多量のROSが発生しうするため、体外還流を伴う人工透析をはじめ、各種の外科的侵襲を受ける際には、常に強い酸化ストレスが生体に加わることが予想される (13)。今回、子牛の去勢手術によって血液ROS濃度が大きく上昇したことは、去勢手術のような比較的軽度の外科手術によっても血液からROSが多量に放出されることを示しており、また、強い酸化的ストレスが生体に負荷されることを示すと思われる。また、血液ROS濃度が血液CL能や総白血球数の増減にほぼ連動した動きを示したことは、血液ROS濃度の上昇が一連の免疫反応の一環として変動したことを物語られる。

以上、子牛血液中のROS濃度を迅速測定することを世界で初めて可能にした。この新技術が獣医・畜産分野に応用されるならば、次に述べるような点において恩恵がもたらされるものと予想される。(1) 活性酸素種センサ

ーを患部に当てたり, 血液や乳汁に浸したり, 各臓器や組織に装着することによって生体全体あるいは各部位での組織障害や炎症の程度を定量的に把握できるため, 従来よりもより具体的な形で疾病の進捗状況や予後判定が出来るようになる。(2) 疾病の予察や早期発見が可能となり, 早めの効果的な疾病予防対策や飼育管理指針を打ち出せるようになる。(3) 生乳, 肉, 生卵などから発生する活性酸素種の非破壊測定も可能なので, 畜産食品の酸化や劣化, 腐敗の程度を評価することができ, 迅速, 且つ定量的な品質評価が可能となる。

### おわりに

当研究を実施した結果, (1) 子牛血液にセンサーを浸すことによってROSを直接検出できることを証明し, また(2) 軽微なストレス負荷によっても, 血液中からROSが随時放出されていることを発見することができた。今後の家畜を用いた研究の展開として, (1) センサー感度の改良及び測定機器の軽量・小型化, (2) 種々のストレスや疾病での血液ROS濃度の動態の調査, (3) センサーの血管内留置による生体内ROS濃度の測定法の開発, (4) センサーのコードレス化による生体内ROS濃度の測定法の開発, などを予定している。

### 引用文献

- 1) Beissenhirtz, M. K., Scheller, F. W. & Lisdat, F.: A superoxide sensor based on a multilayer cytochrome c electrode. 76, 4665-4671 (2004).
- 2) Cooper, J. M., Greenough, K. R. & McNeil, C. J.: Direct electron transfer reactions between immobilized cytochrome c and modified gold electrodes. J. Electroanal. Chem. 347, 267-275 (1993).
- 3) 井上正康, 江端巖, 安東由喜雄ほか: SODの化学修飾と生体内拳動制御のための分子設計. 活性酸素(中野稔ほか編), 第2版, 237-246, 共立出版, 東京(1990).
- 4) 金ヶ崎士朗, 栗林太: 好中球の殺菌の生化学. 臨床検査, 38, 401-407 (1994).
- 5) 児玉昌彦: 発癌の中の活性酸素. 活性酸素(中野稔ほか編), 第2版, 484-491, 共立出版, 東京(1990).
- 6) 村田英雄, 高橋秀之, 松本英人: 子牛における末梢血貪食細胞のNBT還元能の二, 三の検討. 家畜衛生試験場研究報告, 88, 17-24 (1985).
- 7) 中野稔: 活性酸素の測定 化学及び生化学的方法. 活性酸素(中野稔ほか編), 第2版, 32-40, 共立出版, 東京(1990).
- 8) 中野稔: 活性酸素の化学発光による検出法. 活性酸素(中野稔ほか編), 第2版, 47-55, 共立出版, 東京(1990).
- 9) 大柳善彦: 炎症と活性酸素. 活性酸素(中野稔ほか編), 第2版, 492-500, 共立出版, 東京(1990).
- 10) 高橋秀之, 新井鐘蔵, 渡部淳, 白戸綾子, 菅原靖志, 嶺岸勝志, 木村良男, 田淵一郎, 千綿秀之: 健康牛及び乳房炎牛における血液及び乳汁化学発光能. 家畜衛生研究成果情報, 10, 3-4 (1997).
- 11) 手老省三: 活性酸素のESRによる測定法. 活性酸素(中野稔ほか編), 第2版, 41-46, 共立出版, 東京(1990).
- 12) Tian, Y., Mao, I., Okajima, et al.: Superoxide dismutase-based third-generation biosensor for superoxide anion. 74, 2428-2434 (2002).
- 13) 湯浅真, 小柳津研一: In vivo 活性酸素種センサーの研究開発. 化学と教育, 53, 128-131 (2005).
- 14) Yuasa, M., Oyaizu, K., Yamaguchi, A., et al.: Electrochemical sensor for superoxide anion radical using polymeric iron porphyrin complexes containing axial 1-methylimidazole ligand as cytochrome c mimics. Polym. Adv. Tech., 16, 287-292 (2005).

## Summary

### Development of method for rapid measurement of blood reactive oxygen species in calves

Hideyuki TAKAHASHI<sup>1)\*</sup>, Toru MIYAMOTO<sup>1)</sup>, Yuji TAKAHASHI<sup>2)</sup>, Rieko HORINO<sup>1)</sup>, Motoko FUJINO<sup>1)</sup>,  
Kikuyasu NAKAMURA<sup>1)</sup>, Manabu YAMADA<sup>1)</sup>, Yu YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Tsutai OOHASHI<sup>3)</sup>,  
Satoshi TSUTSUI<sup>4)</sup>, Masahiro NANBA<sup>4)</sup>, Kenichi OYAIZU<sup>4)</sup> & Makoto YUASA<sup>4)</sup>

An electrochemical sensor for reactive oxygen species like the superoxide anion radical using polymeric iron porphyrin complexes was developed by Yuasa et al. of the Tokyo University of Science. The present experiment was designed to develop a method for rapid measurement of reactive oxygen species in calf blood by employing this technique. The needle-type sensor, including an integrated microelectrode, was dipped into calf blood in a test tube. After xanthine oxidase ( $O_2^- \cdot$ -generating enzyme), superoxide dismutase ( $O_2^- \cdot$ -scavenging enzyme) and opsonized zymosan (phagocyte stimulant) were successively administered in the blood, the current value detected by the sensor in the blood was recorded. The current value increased, decreased and reincreased after the successive administrations of xanthine oxidase, superoxide dismutase and opsonized zymosan, respectively. The sensor was proven to detect the reactive oxygen species of blood. Change in the reactive oxygen species concentration of calf blood following castration was investigated, by dipping the needle-type sensor in the calf blood just after sampling. The reactive oxygen species concentration increased to a maximum at 3 hr, decreasing gradually thereafter following the castration. The fluctuation was almost linked to those of the blood chemiluminescence activity and leukocyte count. Thus, we succeeded in performing a rapid measurement of the reactive oxygen species concentration in the peripheral blood of calves.