

北海道医療大学博士論文の内容および審査の結果要旨（平成12年度）

氏名・(本籍)	堀川孝明(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙第48号
学位授与の日付	平成12年9月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(論文博士)
学位論文題目	X線照射によりヒト血漿から発生するフリーラジカルの研究
論文審査委員	主査 金子昌幸 副査 田隈泰信 副査 東城庸介

論文内容の要旨

I. 目的

生体への放射線照射により水分子とのイオン化反応でラジカル種が発生する。その中でOHラジカルは生体組織に種々の傷害を及ぼすことが知られている。血漿はラジカルの発生源である水分の他に抗酸化剤としてアルブミン、尿酸、アスコルビン酸、トコフェロール、スルフヒドリル基含有タンパクなどがありフリーラジカルの消去作用を有している。しかし、実際には未確認の抗酸化作用を示す物質の存在も示されている。そこで著者はヒト血漿からX線照射で発生するフリーラジカル量について、血漿内の溶質成分や個体差による影響について検討した。

II. 材料と方法

1. 対象

対象は本研究の同意を得た98名(男性67名/女性31名)のボランティアで、年齢は22歳から36歳まで平均年齢は24.5歳であった。また、対象者には問診により慢性疾患に対する薬物の投与、B型肝炎ウイルス抗原陽性のキャリアについては除外した。

2. 試料の採取

血液は静脈より採取し、採血後、速やかに遠心分離器により血漿と血球成分を分離した。採取した血漿は速やかに実験に供したが保存する場合は-80度で凍結保存した。

3. 血漿溶質成分の測定

血漿内に含まれる溶質成分は総コレステロール、中性脂肪、総タンパク質、アルブミン濃度を測定した。測定はAutomatic Analyzer 7150を用い総コレステロールはデタミナーLTC試薬、中性脂肪はデタミナーLTG試薬、総タンパク質はランピアTP試薬、アルブミンはランピアALB試薬により各成分濃度を測定した。

4. 試料の作製

各試料へのX線照射に際して個々の試料は血漿100 μ lにNa-リン酸塩緩衝溶液(PBS)50 μ l、キレート剤(DETAPACK)35 μ l、そしてX線照射直前にラジカル補足剤(DMPO)15 μ lを加え攪拌し調整した。

5. X線照射条件

X線照射は軟X線発生装置を用い管電圧80kVp、管電流5mA、付加フィルター1.0mmAl、距離30cm、線量率16Gy/hrの条件で4, 8, 12Gyの各線量で照射した。

6. フリーラジカルの測定

X線照射により血漿内で発生するフリーラジカルはESR装置を用い測定した。測定条件は、周波数:9.475GHz,出力:4.0mW,中心地場:334.5mT,掃引幅:±10mT,変調幅:5×0.1mT,感度:0.4×100,時間定数:0.1秒,掃引時間:2.0分,測定温度:室温とした。発生したラジカルは超微細結合定数からラジカル種を同定し、ラジカル量は標準試料のMnOとの相対信号強度で求めた。

7. ラジカル発生因子の検討

放射線により発生するラジカル量と各血漿溶質成分濃度、そして、ラジカル量に大きな変化を認めたHBs抗体陽性群と陰性群との間で、影響を及ぼす度合いについて多変量解析により検討した。

8. HBs抗体陽性血漿のラジカル発生量の検討

HBs抗体陽性者とHBs抗体陰性者の血漿から発生するフリーラジカル量を検討するため、抗体陽性群と陰性群を対象を分け発生するフリーラジカル量を比較した。

9. HBs抗体陽性血漿のラジカル消去能の検討

HBs抗体陽性血漿のラジカル発生量を検討するため、以下の三つの検討を行った。

1) 抗原-抗体反応による抗体の失活

HBs抗体陽性血漿400 μ lに、酵母由来の組織組み替え沈降B型肝炎ワクチン10 μ lを5名のHBs抗体陽性血漿に添加した。そして、ワクチン添加直後と肉眼的に凝集を確認後、上清を採取しX線4 Gy照射して発生するラジカルを観察した。

2) 抗HBs人免疫グロブリンの消去能

HBs抗体陽性者の血漿からCohnの低温エタノール分画法により分離精製された抗HBs人免疫グロブリンを用い、5名のHBs抗体陰性者の血漿に15%ならびに33%濃度で添加した。そして、X線4 Gy照射して発生するラジカルを観察した。

3) ワクチン接種による抗体獲得までの観察

HBs抗体獲得を目的としてワクチンを接種した1名について、ワクチン接種期間中の血漿から発生するOHラジカルを観察した。血液の採取はワクチン接種前、1回目のワクチン接種1ヵ月後、2回目接種6ヵ月後、そして、3回目接種1ヵ月後の4回行った。採血後、速やかに血漿を分離しX線4 Gy照射して発生するラジカルを観察した。

III. 結 果

1. X線照射で発生するラジカル種の観察

X線によりヒト血漿から発生するフリーラジカルは、ESRスペクトル超微細結合定数からDMPO-OHとDMPO-Hであることを認めた。また、HBs抗体陽性者はESRスペクトルの波形の出現をほとんど認めなかった。

2. X線照射線量とラジカル量との関係

各照射線量におけるOHラジカル量は、4 Gy照射ではRSI=0.31 \pm 0.12, 8 Gy照射ではRSI=0.43 \pm 0.13, 12 Gy照射ではRSI=0.49 \pm 0.14であり、X線線量に比例して増加した。

3. 血漿内の各溶質成分とラジカル発生量との関係

X線照射4 Gyにおける各溶質成分濃度とラジカル発

生量との相関は、総コレステロール、中性脂肪、総タンパク質、アルブミン、そして、アルブミン/グロブリン比のいずれにおいても認めなかった。これはX線8ならびに12Gy照射においても同様であった。

4. ラジカル発生因子の検討

多変量解析では独立変数である総タンパク質とアルブミンは分けて分析した。その結果、標準化回帰係数はHBs抗体の有無が0.754と一番高く、血漿から発生するラジカルは血漿内の各溶質成分濃度、HBs抗体の有無の中で、HBs抗体の有無が最も強い影響を与えているのを認めた。この結果はX線照射8 Gyならびに12Gyでも同様であった。

5. HBs抗体陽性血漿のラジカル発生量の検討

本研究対象者98名の中でHBs抗体陽性者は28名であった。これらHBs抗体陽性群と陰性群のX線4, 8, 12Gy照射におけるOHラジカル量は、HBs抗体陽性群は陰性群に比べて各照射条件で発生するOHラジカルは有意に低かった。

6. HBs抗体陽性血漿のラジカル消去能の検討

1) 抗原-抗体反応による抗体失活

HBs抗体陽性血漿へのワクチン添加では、添加直後ではラジカルの発生は認めなかったが、28時間後に肉眼的に凝集を認めた後ではラジカルの発生を認めた。

2) 抗HBs人免疫グロブリンの消去能

HBs抗体陰性血漿への人免疫グロブリン添加では、15%濃度ならびに33%濃度共に対照であるHBs抗体陰性血漿のラジカル量と同じであった。

3) ワクチン接種による抗体獲得までの観察

B型肝炎ワクチン接種における経日的なOHラジカルの観察は、ワクチン接種前と1回目のワクチン接種1ヵ月後ではラジカルの発生を認めたが、2回目接種から6ヵ月後以降ではラジカルの発生を認めなかった。

IV. ま と め

1. X線照射によりヒト血漿から発生するフリーラジカルはHならびにOHラジカルで、照射線量に比例して発生するラジカルも増加した。

2. X線照射によりヒト血漿から発生するOHラジカル量と血漿内の総コレステロール、中性脂肪、総タンパク質、アルブミンの各溶質成分濃度との間には相関は認めなかった。

3. 血漿内の各溶質成分の中でB型肝炎ウイルス抗体であるHBs抗体の有無がX線により発生するラジカル量に最も大きな影響を与え、HBs抗体陽性血漿はOHラジカルの消去能を示した。

4. HBs抗体によるOHラジカルの消去は抗体自身が直接関与していると考えられた。この消去能は体内に存在する自然な状態でなければ消去しないと考えられ

た。

5. ワクチン接種者では抗体の獲得により初めてHBsの消去能が生じると考えられた。

学位論文審査の要旨

血液は酸素などの栄養分の補給や代謝廃棄物の搬出、さらに生体の防御や恒常性維持に大きな役割を果たしている。血漿には放射線などにより発生するフリーラジカルを消去する各種の抗酸化物質が存在する。既知のものとしてアルブミン、尿酸、ビタミンC、ビタミンEなどがあり、また、これ以外に未知の抗酸化物質が存在するという報告もある。従って、血漿はX線照射による格好のラジカル発生源の場であると同時に抗酸化物質の存在によりラジカル消去能を有すると考えられる。本研究はヒト血漿へのX線照射により発生するフリーラジカルに対して、そのラジカル量と各種血漿成分濃度との関係について検討を行った。ヒト血漿から発生するラジカルはHならびにOHラジカルで、発生量は線量の増加に比例した。血漿成分である総コレステロール、中性脂肪、総タンパク質、そしてアルブミンの各濃度とX線4, 8, 12Gy照射で発生するラジカル量との間に相関は認めなかった、多変量解析により血漿成分の中でHBs抗体の有

無がX線により発注するラジカル量に大きな影響を与え、HBs抗体陽性血漿のラジカル消去能は陰性血漿より有意に大きかった。特に、X線4 Gy照射で発生するラジカルはほとんど消去していた。このHBs抗体陽性血漿から発生するラジカルはB型肝炎ワクチン添加による抗体の凝集反応後でラジカル消去能は減少した。また、市販の抗HBs人免疫グロブリンの添加ではラジカル消去能は認めなかった。そして、B型肝炎ワクチン接種者のラジカル量の経日的観察では抗体の獲得によりラジカルの消去能が生じた。以上の結果から、HBs抗体陽性血漿によるラジカルの消去に抗体自身が関与している可能性が強く示唆される。

本論文はHBs抗体血漿の強いラジカル消去能を示した最初の報告であり、歯科医学の発展に寄与するところが大きい。以上より博士（歯学）の学位を授与するに値するものと判定する。

氏名・(本籍)	山田 幸治 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	乙 第49号
学位授与の日付	平成12年9月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当 (論文博士)
学位論文題目	X線光電子分光法 (ESCA) による口腔内金属修復物から採取した微量金属試料の分析法およびその臨床応用
論文審査委員	主査 大野 弘 機 副査 松田 浩 一 副査 坂口 邦彦

論文内容の要旨

緒 言

近年、金属アレルギー性疾患が漸増し、その中には歯

科用合金の腐食に起因して発症するケースも報告されている。口腔内に装着された金属修復物が原因となってアレルギー性疾患を発症したと疑われる患者に対しては、