電子スピン共鳴法を用いた四肢、 骨盤損傷における血中フリーラジカル測定

土肥 謙二¹ 初見 俊明^{1,2} 新藤 正輝¹
田中 啓司¹ 林 宗貴¹ 有賀 徹¹
佐藤 和恵³

ヒトは酸素代謝を通じてエネルギー産生を行っている。生体内では常に酸化ストレスと抗酸化力のバランスを保ち生命活動を行っている。活性酸素やフリーラジカルは酸素代謝を行っている限りは必ず生体内で産生される。狭義の活性酸素種は一重項酸素、スーパーオキシドラジカル($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)の4種をいう。広義の活性酸素種にはさらに、過酸化脂質、アルコキシラジカル($RO\cdot$)、一酸化窒素、ペルオキシナイトライト、次亜塩素酸、オゾンなども含められる。これらの活性酸素は強い細胞毒性を持っている。

生体内においてフリーラジカルや活性酸素の産生が亢進している状態、あるいは抗酸化能力が低下している場合、産生された活性酸素やフリーラジカルは生体内で処理しきれず、その結果として酸化ストレスのバランスが崩れる。そして、この“バランスの崩れ”は老化や癌をはじめとする多くの疾病を引き起こすと考えられている¹⁾。近年の報告では慢性疾患、悪性腫瘍、中枢神経疾患をはじめとして多くの疾患で活性酸素やフリーラジカルとの関与が報告されている^{1,2,4)}。しかし、臨床においてフリーラジカルを直接的に測定する方法がないために、酸化傷害によって産生される代謝産物による間接的な証明、あるいは動物実験や *in vitro* の研究に頼ってきた。

近年著者らは生体内で産生されるフリーラジカルの中で脂質過酸化に強く関与しているとされるアルコキシラジカルに注目し、神経救急疾患をはじめとした多くの病態におけるアルコキシラジカルの測定を行うべく生体電子スピン共鳴法(ESR法)を応用したフリーラジカル測定法を開発した^{1,3,4)}。本検討では整形外科的外傷である四肢骨盤損傷とフリーラジカルの関与について検討した。

対 象：対象は昭和大学病院救命救急センターに入院した整形外科例で全6例である。詳細な損傷内容についてはTable 1に示した。症例の男女比は3:3、年齢は19歳から64歳で平均年齢は 30.8 ± 16.5 歳(mean $\pm$ SD)であった。

方 法：採血は入院当日または2日目に行った。採血は障害部位近位側の静脈から行った。血液は直ちにスピントラップ剤である5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO)と混和し、電子スピン共鳴装置(JEOL JES REIX, X-band, 100kHz modulation frequency)をもちいて測定した。測定条件は centre field, 335.0 ± 5.0 mT; microwave power, 5 mW; modulation amplitude, 0.1 mT; gain, 200; time constant, 0.1 s; scanning time, 2 minで行った。ラジカル強度はマンガナラジカル(MnO)と比較して半定量解析を行った。統計学的解析は χ^2 検定を用いて、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとして行った。

結 果：全例において静脈血中のアルコキシラジカル産生が認められた(Fig. 1b)。全6例の平均ラジカル強度は 76.2 ± 20.8 であった。健常ボランティア(全5例)の静脈血の平均ラジカル強度(31.9 ± 19.5)と比較して有意に高かった(Fig. 1a-c)⁴⁾。もっともラジカル強度が高かった症例は下肢開放骨折とデグロビング損傷を合併した症例2であり103.6だっ

Free Radical Analysis in Patients with the Limbs or the Pelvic Injuries: a *ex vivo* ESR Study

Kenji Dohi¹, Toshiaki Hatsumi^{1,2}, Masateru Shindo¹, Keiji Tanaka¹, Munetaka Hayashi¹, Tohru Aruga¹, and Kazue Satoh³

¹ 昭和大学医学部救急医学 (Department of Emergency and Critical Care Medicine, School of Medicine, Showa University)

² 同整形外科 (Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Showa University)

³ 同第一解剖学 (Department of Anatomy, School of Medicine, Showa University)

キーワード：フリーラジカル (free radical), 電子スピン共鳴法 (electron spin resonance), モニタリング (monitoring), 整形外科 (orthopedics), 酸化ストレス (oxidative stress)

著者連絡先：〒142-8555 東京都品川区旗の台1-5-8 / 原稿受理日：2005年11月21日 (05-063)

Table 1. Characteristics and alkoxy radical intensities in this series.

Case	Types of injury	Age	Sex	Radical intensity
1	Unstable pelvic fracture Ankle fracture	28	F	91.2
2	Open tibial fracture Degloving injury	25	F	103.6
3	Open tibial fracture Degloving injury	24	M	83.1
4	Bilateral open tibial fracture	19	M	48.1
5	Ankle fracture	64	F	73.4
6	Open tibial fracture	25	M	33.3

Fig. 1.

a: Radical adducts of a control.

b: Radical adducts of a tibial open fracture with degloving injury patient (Case 3).

c: Blood alkoxy radical intensities in healthy volunteers (n=5) and in patients with the limbs or the pelvic injuries (n=6).

BARs: SD, ★: DMPO-alkoxy radical adducts * p<0.05

た。一方ラジカル強度が最も低かったのは下肢開放骨折例（症例 6）で 33.3 であった。症例数は少ないものの、結果として不安定骨盤骨折などの重症度の高い骨折例やデグローピング損傷などの重症軟部組織損傷合併例 (Case 1, 2, 3) では単純な骨傷例 (Case 4, 5, 6) よりラジカル強度が高い傾向が見られた。

考 察：今までにフリーラジカルが骨軟部損傷の

病態に関与していることは報告されている。Prasad らは骨折患者における、血漿中の脂質過酸化に関与している malonyldialdehyde (MDA) と内因性の第二鉄の還元による抗酸化力を測定した⁴⁾。その結果、受傷後の一か月にわたって MDA が上昇し、抗酸化力が低下していたと報告している。さらに、多発骨折例が単一の骨折例と比較して MDA が高く抗酸化力が低いと報告している。これらの値は受傷初期よりむしろ 2-4 週に高い傾向であり、酸化ストレスが治癒による血流の再灌流に伴って発生している可能性について言及している。この結果は骨折の病態と酸化ストレスが密接に関与していることを示唆している⁵⁾。

著者らは、本研究で骨軟部組織の傷害によって受傷後早期より、アルコキシラジカルが産生されることを証明した。脂質の酸化は脂質からヒドロキシラジカル等により水素引き抜き反応を受けて脂質ラジカルが生成することから始まる。このラジカルは酸素分子と反応してペルオキシドラジカルとなり、ペルオキシドラジカルが脂質と反応して再び脂質ラジカルとなり、ラジカル連鎖反応が生じる。系外に出たヒドロペルオキシドは第 1 鉄イオンで還元されてアルコキシラジカルを生成し、このアルコキシラジカルが脂質から脱水素して脂質ラジカルを生成しさらに連鎖反応が加速される。これらの連鎖反応は生体内脂質酸化でも同様のメカニズムで進行しているものと考えられており、今回の結果は四肢骨盤骨折の病態に酸化ストレス、さらには脂質過酸化が関与していることを示唆している。

今まで四肢骨盤骨折症例におけるフリーラジカル産生を直接的に証明した報告はない。さらには生体電子スピントラップ法では血液中におけるフリーラジカル測定が可能であり、患者に対する侵襲度は比較的低い。測定時間も1時間以内であり、迅速かつ経時的な測定（モニタリング）も可能である。

急性期における過剰なフリーラジカル産生は虚血再灌流障害を助長し、その後起こる二次的な炎症反応を助長し二次的組織損傷を悪化させるものと考えられる。急性期における血中ラジカル強度の高い症例ではフリーラジカル制御を目的とした治療法が二次的損傷の予防に対して有効であるかもしれない。そのためにはフリーラジカル消去剤などによる新たな治療法の開発が重要と考えられる。

本検討は症例数が少なく、病態との関係などいまだ不明が多い。今後は症例数を増やして、より病態や治療との関係を明らかにすることが重要と考えられた。

まとめ：電子スピン共鳴法を応用した生体アルコキシラジカル計測法の応用によって、骨軟部損傷におけるフリーラジカル（アルコキシラジカル）の測定とモニタリングが可能となった。整形外科救急領域において、本法は骨軟部損傷のみならず血行再建後、コンパートメント症候群、四肢切断後の再接

着術後や皮弁形成術後などの虚血再灌流障害におけるフリーラジカルのモニタリングなどにも有用と考えられる。

謝辞 本研究における研究費の一部は昭和大学共同研究，日本学術振興会科学研究費（基盤研究(C) 16591815, 2004）によって行われた。

文 献

- 1) 土肥謙二, 佐藤和恵, 森脇寛, 他: 集中治療におけるフリーラジカルモニタリング: 高気圧酸素療法とフリーラジカル. 日本臨床高気圧酸素・潜水医学会雑誌 2004; 1: 2-8.
- 2) Lewen A, Matz P, Chan PH: Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 2000; 17: 871-90.
- 3) 三原結子, 土肥謙二, 佐藤和恵, 他: 脳低温療法を施行した蘇生後脳症患者における血中フリーラジカルの測定. 脳死・脳蘇生 2005; 17: 30-4.
- 4) Mihara Y, Dohi K, Satoh K, et al: Mild brain hypothermia suppresses oxygen free radical in patients with neuroemergency: an ex vivo electron spin resonance study, in Hypothermia for acute brain damage. In: Hayashi N, Bullock R, Dietrich DW, et al eds. *Hypothermia for Acute Brain Damage*. Springer-Verlag, Tokyo, 2004, p96-9.
- 5) Prasad G, Dhillon MS, Khullar M, et al: Evaluation of oxidative stress after fractures. A preliminary study. *Acta Orthop Belg* 2003; 69: 546-51.