

マイクロバブル炭酸浴のストレスコーピング物質産生効果

羽二生稔大¹⁾, 佐藤 真也²⁾, 増田 豊³⁾, 上村佐知子⁴⁾, 長谷川裕晃⁵⁾¹⁾宇都宮大学 地域共生研究開発センター²⁾秋田大学大学院 理工学研究科³⁾秋田大学附属病院 心療センター⁴⁾秋田大学医学部 保健学科⁵⁾宇都宮大学大学院 工学研究科

(received 3 February 2017, accepted 26 April 2017)

Microbubble CO₂ bathing induced stress-coping substancesToshihiro Haniu¹⁾, Shinnya Satoh²⁾, Yutaka Masuda³⁾, Sachiko Uemura⁴⁾ and Hiroaki Hasegawa⁵⁾¹⁾Collaboration Center for Research & Development, Utsunomiya University²⁾Department of Mechanical Engineering, Akita University Graduate School of Engineering and Resource Science³⁾Psychosomatic Division, Graduate School of Medicine, Akita University⁴⁾Department of Physical Therapy, Akita University Graduate School of Health Science⁵⁾Department of Mechanical and Intelligent Engineering, Graduate School of Engineering, Utsunomiya University**Abstract**

We had previously reported that mice given bathing stress produce humoral lipids for coping the stress, and that mice given repeated immunization stress produce an adaptogenic humoral lipid for preventing the anaphylactic death. We thus hypothesized that human given bathing stress might produce adaptogenic humoral lipids preventing mouse anaphylactic death. In the present study, we gave bathing stress to lower legs of healthy volunteers, and examined whether their humoral lipid fractions prevent mouse anaphylactic death. Eight healthy volunteers were given microbubble CO₂ bathing stress in their lower legs, and their blood samples were collected and lipids were fractionated. Four days after later the same volunteers were given bathing stress without bubble in their lower legs and had blood sampling for lipid fractionation. In the volunteers given microbubble CO₂ bathing, 200 µl of the humoral lipid fraction eluted with 100 mMNaCl, and 200 or 150 µl of the humoral lipid fraction eluted with 250 mMNaCl, prevented mouse anaphylactic death. When humoral lipid fractions were prepared from the blood of volunteers given bathing stress without bubble, 200 µl of the humoral lipid fraction eluted with 100 mMNaCl and 200 µl of the humoral lipid fraction eluted with 250 mMNaCl prevented mouse anaphylactic death. These indicate that the volunteers given the bathing stresses produced an adaptogenic humoral lipid preventing mice anaphylactic death in the fraction eluted with 100 mMNaCl or 250 mMNaCl, and that lipid in the 250 mMNaCl fraction was more produced in the volunteers given microbubble CO₂ bathing stress. The present findings would suggest the microbubble bathing has a clinical potential on human in stressful situation.

Corresponding author : Yutaka Masuda
Psychosomatic Division, Graduate School of Medicine,
Akita University, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel : 81-18-884-6122
Fax : 81-18-884-6445
E-mail : y-masuda@hos.akita-u.ac.jp

Key words : microbubble CO₂ bathing, stress-coping effect, humoral lipids, immunization stress, anaphylactic death

緒 言

免疫ストレスを与えられたマウスはそのアナフィラキシーによる死を回避すべく抗ストレス血中脂質を産生する¹⁾。水浴ストレスを与えられたマウスはその体力を保全するために adaptogenic な血中脂質を産生する²⁾。さらにマイクロバブル炭酸浴はその血中脂質の産生を増強することが示されている³⁾。我々はマイクロバブル炭酸浴を負荷されたヒトはマウスのアナフィラキシーによる死を回避せしめる adaptogenic な血中脂質を産生するかもしれないと考えた。本稿において我々は、健康成人にマイクロバブル水浴を負荷し、彼らから得られた血中脂質分画をマウスに投与して、それらのアナフィラキシーによる死の回避効果を検討することにした。

実験環境、実験装置および実験操作

A 検討対象となる血中脂質の分画

1. 被験者

同意を得た健康成人（女性4名、男性4名、年齢21～22歳）を被験者とした。彼らに異なる足湯負荷を4日へだてて与え、それぞれの処置後ただちに腕静脈より2mlの血液を採取した。その血清を集めて4°Cで保存し、動物実験後残りの血清を排棄した。同意書の内容すなわち本実験の目的、採血方法および血清処理は「国立大学法人秋田大学臨床研究倫理規定」を遵守して設定されたものであり、本実験は同委員会の許可（審査番号1613）を得て行われたものである。

2. 実験環境

① 室温20°Cのもとで、縦60cm×横120cm×深さ54cmの浴槽に45cmの高さまで水道水を入れこれを40°Cに保った。被験者は4名ずつ浴槽のへりに腰かけ膝から下の下腿に15分の足湯を負荷された。これを対象 control 群とした。

② 同じ足湯環境において、マイクロバブル発生装置をもってマイクロバブル (microbubble: MB) CO₂ を発生させた。①と4日隔てて、被験者は4名ずつ浴槽のへりに腰掛け15分MB足湯を負荷された。これをMB群とした。

3. MB 発生装置

① 図1に本実験で用いたMB発生装置³⁾を示す。この装置はポンプで装置内に水を高速で送ることにより装置内が負圧になる構造となっている。装置内が負圧になることで気体を装置内へ自吸させることが可能である。発生装置内では、スリットを設けることによる流路変化を利用し、せん断効果を得て気泡を微細化する。本実験条件において発生する気泡の平均気泡径は約55μmである。本実験装置によって発生する気泡の詳細は既報⁴⁾に示してある。

② 図2にMB足湯実験装置を示す。実験装置は浴槽、MB発生装置、駆動用ポンプ、空気流量計、炭酸ガスボンベから構成されており発生装置への供給気体は炭酸ガスである。浴槽内には水を45cmの高さまで入れている。ポンプは足湯試験中は稼働させている。このとき、ポンプの駆動が被験者の身体に影響を与えないようにMB発生装置と駆動用ポンプの吸引側ホースは浴槽底部に取り付けた。

4. 血中脂質の分画

試行終了後直ちに各群の被験者から血液を採取し血清を集めて4°Cで保存した。その血清からメタノール・

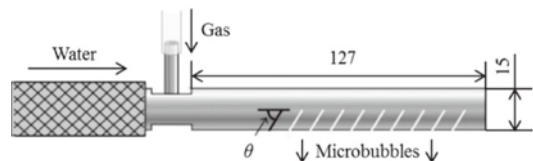


Fig. 1. Microbubble generator

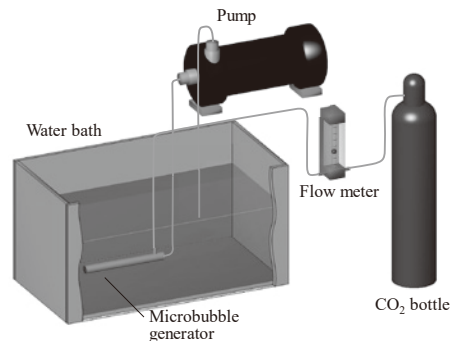


Fig. 2. The examination system

クロロホルム分画法を用いて血中脂質を得た。すなわち、血清 4 ml に 5 ml のメタノールと 2.5 ml のクロロホルムを加え 3 分間激しく混和した。さらにそれに水 4 ml を加え 30 秒激しく混和した後 150 g で 5 分間遠心した。下層にあるクロロホルム層を採取、風乾し、残された血中脂質を 4 ml の水に溶解した。この脂質溶液をあらかじめ 10 mM NaHCO₂ pH 8.3 で飽和され水で洗浄された 500 μm の DE-52 (Whatman Co Maidstone, ULC) に吸着させた。溶出は 50・100・150・200・250 および 300 mMNaCl をもって行い、溶出した分画は水をもって 4 ml に調整した。

B アナフィラキシーによるマウスの死を抑制するヒト血中脂質

1. 実験動物

9 週齢の雄性 DDY マウスを日本クレア株式会社 (浜松, 静岡) より購入した。これらは、室温 21~25°C、湿度 50~60%、7:00 から 19:00 点灯、餌や水分は自由摂取という環境のもとで 1 週間飼育された後、実験に用いられた。なお、動物の飼育および実験はすべて秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター動物実験部門において行った。また、本実験は「国立大学法人秋田大学動物実験規程」を遵守し、秋田大学動物実験委員会の許可 (審査番号 a-1-2824) を受けて行ったものである。

2. アナフィラキシーによるマウスの死のアセスメントシステム

マウスに生理食水 physiological saline (PS) で調整した 1 mg/kg の ovalbumin (OVA, Grade V, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を腹腔内投与した。その 10 日後、同用量の OVA を腹腔内投与した。さらに、その 7 日後、同用量の OVA を腹腔内投与した。マウスのアナフィラキシーによる死は最終免疫の 1 時間後に判定した。

3. 統計検定

統計検定には Fisher の正確検定を用いた。p<0.05 を有意差ありとした。

4. マウスのアナフィラキシーによる死を抑制するヒト血清脂質分画

130 匹のマウスに、前述のスケジュールにしたがって 2 回免疫ストレスを与えた。7 日後、各 10 匹のマウスに MB 群あるいは control 群から得られた血中脂質分画 200 μl あるいは対象としての 200 μl の PS を 1 mg/kg の OVA とともに腹腔内投与した。これらの操

作の 1 時間後にマウスのアナフィラキシーによる死を判定した。

5. 有効分画の用量依存性の検討

130 匹のマウスに、前述のスケジュールにしたがって 2 回免疫ストレスを与えた。7 日後、各 10 匹のマウスに MB 群あるいは control 群の 100 mMNaCl 分画 200 μl, 150 μl あるいは 100 μl, あるいは 250 mMNaCl 分画 200 μl, 150 μl あるいは 100 μl を 1 mg/kg の OVA とともに腹腔内投与した。対象として 200 μl の PS を 1 mg/kg の OVA とともに腹腔内投与した。これらの操作の 1 時間後にマウスのアナフィラキシーによる死を判定した。

実験結果

1. 血中脂質分画の効果

MB 群の血中脂質分画のうち、200 μl の 100 mMNaCl 分画あるいは 200 μl の 250 mMNaCl 分画を投与されたマウスは有意にそのアナフィラキシーによる死を回避した。control 群の血中脂質分画のうち、200 μl の 100 mMNaCl 分画 あるいは 200 μl の 250 mMNaCl 分画を投与されたマウスもまた有意にそのアナフィラキシーによる死を回避した。MB 群の他の分画および control 群の他の分画を投与されたマウスの死亡数は PS を投与されたマウスのそれと有意差を示さなかった (Table 1)。

2. 有効分画の用量依存性

100 mMNaCl 分画において、MB 群由来のもの control 群のものはともどもその 200 μl にアナフィラキシーによる死を抑制する効果のみせた (Table 2)。一方、250 mMNaCl 分画においては、MB 群由来の 200 μl および 150 μl はアナフィラキシーによる死を抑制する効果のみせたが、control 群由来の 150 μl はその抑制効果のみせなかった (Table 3)。

考 察

今回の検討で以下が明らかになった。マイクロバブルの有無に関わらず 40°C 15 分の足湯負荷によって、ヒトはマウスのアナフィラキシーによる死を抑制するところの血中脂質を 100 mMNaCl 分画と 250 mMNaCl 分画に産生する。100 mMNaCl 分画における有効脂質の産生量は MB 群と control 群で差がなかった。一方、

(48)

マイクロバブル炭酸浴の臨床的意義

Table 1. Effect of 200 μ l (eq. serum) of humoral lipid fraction obtained from healthy volunteers given bathing stresses on mouse anaphylactic death

The bathing stress	Dead (\sqrt Total 10)						Control PS
	50	Fraction eluted with NaCl (mM)				300	
Microbubble	5	0*	4	4	0*	3	5
Without bubble	5	0*	5	4	0*	2	

* $p < 0.05$ compared with Control (Fisher's exact test)
PS : physiological saline

Table 2. Dose of the 100 mM NaCl fraction for preventing mouse anaphylactic death

The bathing stress	Dead (\sqrt Total 10)			Control (200 μ l of PS)
	The fraction (μ l)			
	200	150	100	
Microbubble	0*	3	6	6
Without bubble	0*	3	6	

* $p < 0.05$ compared with Control (Fisher's exact test)
PS : physiological saline

Table 3. Dose of the 250 mM NaCl fraction for preventing mouse anaphylactic death

The bathing stress	Dead (\sqrt Total 10)			Control (200 μ l of PS)
	The fraction (μ l)			
	200	150	100	
Microbubble	0*	0*	3	6
Without bubble	0*	3	3	

* $p < 0.05$ compared with Control (Fisher's exact test)
PS : physiological saline

250 mMNaCl における有効脂質の産生量は MB 群が control 群を上まわった。

もとより 100 mMNaCl 分画に産生される有効脂質は身体的ストレスをいやすために産生される²⁾。今回の実験結果は足湯負荷が身体的ストレスであることを示している。一方、海馬神経を虚血ダメージから守る ginsenosideRb1 もマウスのアナフィラキシーによる死を阻止することが報告されている⁶⁾。今回の検討は足湯ストレスを負荷されたヒトはその 250 mMNaCl 分画にマウスの海馬神経に対する adaptogenic な血中脂質を産生するのみならずその産生は MB 刺激により増強されることを示唆している。

ストレスは脳で感知される。脳は免疫ストレスに対応するべく 100 mMNaCl と 250 mMNaCl で分画される血中脂質を産生するのかもしれない。この血中脂質の産生メカニズムは充分明らかにはされたとはいえないが、250 mMNaCl 分画における adaptogenic な血中脂質産生を増強する MB 足湯負荷は特に海馬神経におけるストレスコーピングに寄与するところがあると思われる。

謝 辞

被験者からの採血について本学精神科今西彩医師の

助力を得た。

利益相反

本研究は（株）八森電子デバイスにより財政的支援を受けた。

文 献

- 1) Masuda, Y. (2015) A humoral lipid preventing from mouse anaphylactic death. *Akita J. Med.*, **42**, 37-41.
- 2) Masuda, Y. (2015) A humoral lipid inducing stress-coping behavior motionlessness on mouse given forced swimming stress. *Akita J. Med.*, **42**, 119-123.
- 3) 酒井 駿, 長谷川裕晃, 上村佐知子ら (2015) マイクロバブル炭酸浴のストレスコーピング効果. 秋田医学 **42**, 125-128.
- 4) 長谷川裕晃 (2012) マイクロバブル発生装置. 日本国特許第 4884693 号.
- 5) Hasegawa, H., Nagasaka, Y. and Kataoka, H. (2008) Electrical potential of microbubbles generated by shear flow in pipe with slits. *Fluid Dynamics Research*, **40**, 554-564.
- 6) Masuda, Y. (2016) Ginsenoside Rb1 preventing anaphylactic death in mouse. *Akita J. Med.*, (in print).