

半飽和時間	5分	10分	20分	40分	80分	120分	200分	240分
ワークマンのM値	31.5	26.7	21.8	17.0	16.4	15.8	15.5	15.2
減圧直前	37.6	29.5	21.3	15.4	11.9	10.6	9.6	9.3
水中減圧 6m	22.3	24.1	20.8	16.2	12.6	11.2	9.9	9.6
水中減圧 3m	11.8	14.8	16.3	14.8	12.3	11.1	10.0	9.7
減圧終了時	11.7	14.7	16.2	14.7	12.3	11.1	10.0	9.7

ワークマンのM値に対する浮上直前の窒素ガス溶解率(%)

半飽和時間	5分	10分	20分	40分	80分	120分	200分	240分
減圧直前	119.2	110.4	97.7	90.7	72.5	67.2	61.6	61.1
水中減圧 6m	70.7	90.1	95.3	95.0	76.8	70.7	64.0	63.2
水中減圧 3m	37.3	55.3	74.6	88.8	75.2	70.4	64.3	63.5
減圧終了時	37.1	55.0	74.4	88.7	75.2	70.4	64.3	63.5

## 9-1 九州地区の海洋潜水(B地区)の潜水プロフィール

### (1) 調査期間及び回数

調査期間は2007年11月～2008年1月、延べ潜水回数は23回、延べ日数は23日、1日に1回の潜水作業である。潜水時間、最大水深、平均水深の平均は表に示すが、平均水深は水中減圧時間が含まれている。

表 3-4-1 潜水時間、最大水深、平均水深、休憩時間の平均値

	潜水時間(分)	最大水深(m)	平均水深(m)
mean±SD	89.7±52.1	25.1±5.4	16.5±5.6
min～max	21～254	3.6～27.6	1.9～24.0

### (2) 窒素ガス溶解量の推測

マルチレベル潜水における窒素ガス溶解量を調べた。半飽和時間は、5分、10分、20分、40分、80分、120分、200分、240分である。

### (3) 減圧症の危険性評価

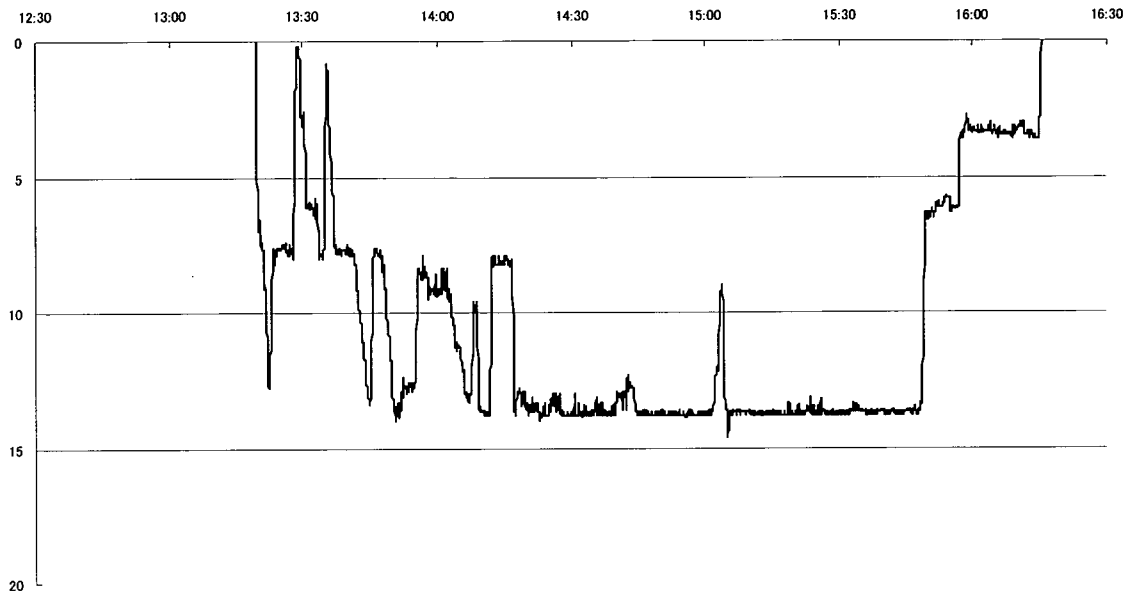
ワークマンのM値に対する割合と減圧症の危険性評価を示す。

表 3-4-2 ワークマンのM値に対する割合と減圧症の危険性評価

各半飽和時間に対する窒素ガス割合	危険性評価
80% ≤ < 85%	ほとんど減圧症の可能性無い
85% ≤ < 90%	少しだけ減圧症の可能性ある
90% ≤ < 95%	減圧症の危険性多少ある
95% ≤ < 100%	減圧症の危険性ある
100% ≤ < 105%	減圧症の危険性高い
105% ≤ < 110%	減圧症の危険性非常に高い
110% ≤	減圧症に罹患している可能性ある

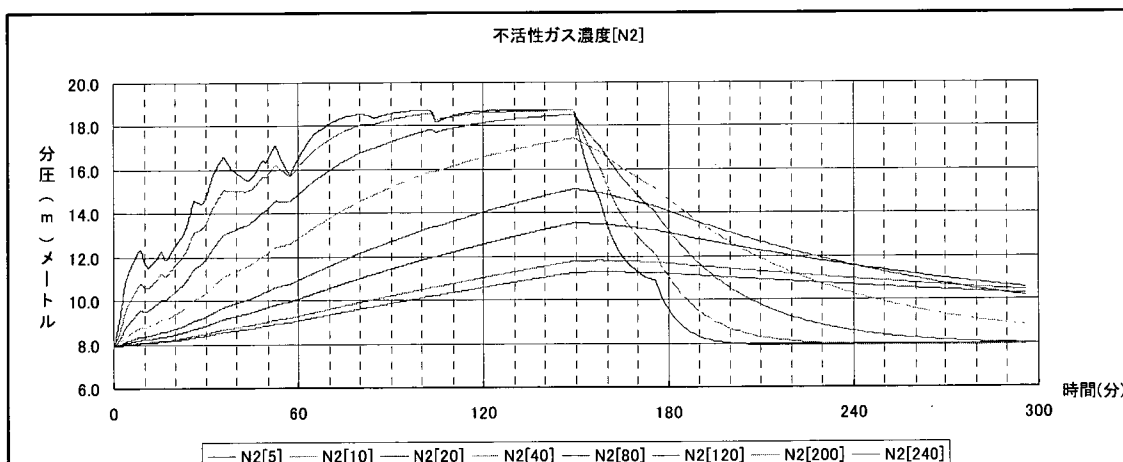
(4) 圧気作業プロフィールと体内窒素ガスの一例

(4-1) 例 1 水中減圧作業のプロフィール



AHIR20070821

	開始時間	終了時間	時間	最大水深	平均水深
作業潜水	13:19	15:48	2:28	14.6	11.8
第1減圧点	15:48	15:49	0:00		
水中減圧 6m	15:49	15:56	0:07		6.1
水中減圧 3m	15:57	16:14	0:17		3.3
減圧終了		16:15	0:27		



半飽和時間	5分	10分	20分	40分	80分	120分	200分	240分
ワークマンのM値	31.5	26.7	21.8	17.0	16.4	15.8	15.5	15.2
減圧直前	18.7	18.7	18.5	17.4	15.1	13.5	11.8	11.2
水中減圧 6m	14.7	16.1	17.1	16.8	14.9	13.5	11.8	11.3
水中減圧 3m	10.9	12.2	14.1	15.1	14.3	13.2	11.7	11.2
減圧終了時	10.8	12.1	14.0	15.1	14.3	13.2	11.7	11.2

ワークマンのM値に対する浮上直前の窒素ガス溶解率(%)

半飽和時間	5分	10分	20分	40分	80分	120分	200分	240分
減圧直前	59.4	70.0	84.9	102.4	91.9	85.5	75.9	73.9
水中減圧 6m	46.5	60.4	78.4	98.9	91.0	85.4	76.1	74.2
水中減圧 3m	34.6	45.5	64.5	89.0	87.2	83.6	75.7	74.0
減圧終了時	34.3	45.2	64.1	88.7	87.1	83.5	75.6	74.0

## 第9章 酸素中毒

高気圧酸素における酸化・抗酸化マーカーの検討

A discussion on oxidative and antioxidative markers under a hyperbaric oxygen environment.

日本高気圧環境・潜水医学会雑誌、2007、 Vol. 42 (2):85-91

### 要旨

高分圧酸素を吸入することによって生じる酸素中毒の発現または発現予測について、肺に対しては unit of pulmonary oxygen toxicity dose、呼吸機能検査、画像診断、臨床症状が用いられ、脳に対しては臨床症状以外に評価できる方法がない。我々は、ヒトにおける酸化ストレスについて血液生化学的に評価できれば臨床的に有用と考え、近年、測定が可能と報告されている酸化および抗酸化マーカー、活性酸素代謝物を評価した。US Navy 治療表 Table 6 の前後で、酸化ストレスの指標とされる血清 reactive oxygen metabolites (ROM) は、高気圧酸素 (HBO : hyperbaric oxygen) 後に平均 6.9% 有意に増加した (HBO 前 :  $315.3 \pm 52.5$  CARR. U., HBO 後 :  $337.0 \pm 53.5$  CARR. U.;  $p < 0.01$ )。また、尿 8-hydroxydeoxy-guanosine 生成速度は平均 43.1% 増加した ( $p = 0.07$ )。血清 coenzyme Q10 (CoQ10) および血清 CoQ10 酸化率、血清および尿 hexanoyl-lysine、血清 lipid peroxides、血清 superoxide dismutase、血清 biological antioxidant potential については有意な変化を認めなかった。Table 6 において活性酸素種は一過性に増加することが示唆され、HBO の酸化ストレスを定量的に評価する指標として ROM は比較的鋭敏に反映するものと考えられた。

### ABSTRACT

For the prediction of the onset of central nervous system oxygen toxicity caused by hyperbaric oxygen inhalation, no evaluation method exist other than clinical signs and symptoms. For pulmonary toxicity, the unit of pulmonary toxicity dose, respiratory examination, imaging and clinical signs and symptoms are the only practical methods. The oxidative and antioxidative markers, and active oxygen metabolites, which have recently been reported as possible measurement indexes, were evaluated from the view point of clinical usefulness, provided the oxidative stress on the human beings could be evaluated hemo-biochemically. During the US Navy Treatment Table 6, serum reactive oxygen metabolites (ROM), an index of oxidative stress, significantly increased by 6.9% on average after hyperbaric oxygen (HBO) (before HBO,  $315.3 \pm 52.5$  CARR. U. : after HBO,  $337.0 \pm 53.5$  CARR. U.;  $p < 0.01$ ). Additionally, urine 8-hydroxydeoxy-guanosine formation rate increased by 43.1% on average ( $p = 0.07$ ). Serum coenzyme Q10 (CoQ10) and serum CoQ10 oxide rate, serum and

urine hexanoyl-lysine, serum lipid peroxides and serum superoxide dismutase, serum biological antioxidant potential had no significant change. For the Treatment Table 6, it was suggested that the reactive oxygen species increased temporarily and ROM was considered as a relatively sensitive index for a quantitative evaluation of oxidative stress during HBO.

キーワード：活性酸素、酸化ストレス、抗酸化物質、酸素中毒、活性酸素代謝産物

Keywords: Reactive oxygen species, Oxidative stress, Antioxidants, Oxygen toxicity, Reactive oxygen metabolites

### 緒言

高気圧酸素 (HBO: hyperbaric oxygen) の副作用のひとつである酸素中毒は、活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) が関与していることが知られている<sup>1)</sup>。肺酸素中毒の発現予測については、unit of pulmonary oxygen toxicity dose (UPTD) が用いられているが、臨床的には、呼吸器症状の発現、肺活量、1秒率、胸部X線写真などの画像検査をもって判断するしかなく、また、脳酸素中毒については、臨床症状をもって判断する以外に方法がない<sup>2~5)</sup>。Dennogら<sup>6)</sup>は、2.5絶対気圧 (ATA: atmosphere absolute) に20分×3回のHBO曝露 (合計酸素吸入時間60分) を1回行った健常被験者4名において、HBO前後でferric reducing ability of plasma-assay (FRAP) 測定の血清抗酸化力に変化は認められず、血清およびリンパ球のglutathione (GSH)、赤血球中のsuperoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、glutathione peroxidase (GPx)は、いずれも影響を受けなかったことを報告している。しかしながら、リンパ球中の熱ショックタンパクHSP70については誘導が認められたことより、ROSがリンパ球に作用することについて言及している。Kotら<sup>7)</sup>は、280kPa、30分のHBO曝露を行った健常者52名において、血清total antioxidant statusには変化を認めない

が、血漿protein carbonylsのわずかな増加と、血漿total thiolおよび血清HSP70の減少を認めたと報告している。さらに、Benedettiら<sup>8)</sup>は、2.5ATA、30分×2回のHBO曝露 (合計酸素吸入時間60分) を15回受けた虚血性疾患患者において、血漿reactive oxygen metabolites (ROM) および血漿malondialdehydeの増加と、赤血球中のSODおよびCAT活性の低下が認められ、血漿GSH、血清 $\alpha$ -tocopherol、血清retinol、赤血球中のGPx活性については変化が認められなかったことを報告している。一方、electron spin resonance法による測定では、兎の血清においてHBO曝露の圧力勾配に応じてhydroxyl radicalが増加することが示されている<sup>9)</sup>。以上のように、HBO曝露におけるROSまたは抗酸化力の評価については、いくつかの研究がなされているが、測定系や測定手技の煩雑さ、精度や再現性の問題、費用と検体数の確保の問題などから、血液生化学的な現象と酸素中毒の症状やUPTDとの関連性については十分に検討できるまで至っていない。

本研究では、ヒトの酸化ストレスを評価する上で臨床的に応用が可能と考えられる酸化・抗酸化マーカーおよび活性酸素代謝物を測定し、HBO曝露における酸化ストレス評価に有用なマーカーであるか否かを検討した。

## 方法

対象は、健常者 10 名（男性 3 名、女性 7 名、平均年齢  $32.8 \pm 5.4$  歳）とした。被験者は、東京医科歯科大学附属病院高気圧治療部に設置してある中村鐵工所製（NHC-412-A 型）において US Navy 治療表 Table 6 のプロトコールに従って HBO に曝露された。酸素吸入用のマスクにはインスピロン社製オキシジェンマスク（スリーインワン型）が使用され、被験者は、酸素流量 15L/分のフリーフロー状態で 100%酸素を吸入した。

実験に際して、東京医科歯科大学倫理委員会の承認を受け、被験者には実験の目的および参加することによるリスクについて説明がなされ、同意書を得たうえでヘルシンキ宣言を厳守して行われた。被験者には、ビタミン剤およびサプリメントによる抗酸化剤使用者、低容量および中容量ピル服用者、ホルモン系薬剤使用者、喫煙者は含まれていない。

採血は、HBO 曝露直前・直後に行われ、採尿は、HBO 実施日と翌日のいずれも早朝に行った。測定項目は、血清 ROM、尿 8-hydroxydeoxy-guanosine (8-OHdG)、血清 coenzyme Q10 (CoQ10) 濃度、血清 CoQ10 酸化率、血清および尿 hexanoyl-lysine (HEL)、血清 lipid peroxides (LPO)、血清 SOD、血清 biological antioxidant potential (BAP) とした。

血清 ROM と血清 BAP 測定については、東京医科歯科大学内のオープンラボ研究機関（株）オルトメディコにおいて、光度計と遠心分離機が内蔵されたディアクロン社製（イタリア）FRAS 4 を使用して測定した (10, 11)。そのほかの項目については、日研ザイル（株）の日本老化制御研究所の検査機器を使用して測定した。尿 8-OHdG については Osawa らが報告した ELISA 法 (12)、血清 CoQ10 濃度および酸化率については Yamashita らが開発した HPLC 法 (13)、血

清および尿 HEL については Kato ら (14) が報告した ELISA 法、血清 LPO については八木別法 (15)、血清 SOD については NBT 還元法 (16) を用いた。

尚、ROM については、CARR.U. の単位で算出した。1 CARR.U. (Carratelli Units) は  $0.08\text{mg}/100\text{ml}$  の過酸化水素に相当する (17)。8-OHdG については、体重あたりの生成速度 ( $\text{ng}/\text{kg} \cdot \text{h}$ ) を算出し、HEL および LPO については、クレアチニン比を算出して示した。

## 統計

測定値は Windows 用 SPSS-PC 11.0 パッケージを使用して分析された。統計分析は、HBO 前後の比較において、いずれの項目も対応のある t 検定を用いて比較した。  $p < 0.05$  をもって有意と判定し、表記については平均±標準偏差 (mean±SD) とした。

## 結果

酸化ストレスの指標である血清 ROM は HBO 曝露前に  $315.3 \pm 52.5$  CARR.U. であったが HBO 後は  $337.0 \pm 53.5$  CARR.U. となり、平均値が 6.9%増加した ( $p < 0.01$ ) (基準値:  $250 \sim 320$  CARR.U.) (Fig. 1)。酸化・損傷マーカーとされる尿 8-OHdG は HBO 曝露前が  $8.6 \pm 8.0$  ng/kg/h、HBO 曝露後が  $12.3 \pm 15.3$  ng/kg/h であったが有意差はなかった ( $P=0.07$ ) (Fig. 2)。血清 CoQ10 濃度は、HBO 曝露前が  $56.0 \pm 18.2$  nmol/l、曝露後が  $46.2 \pm 8.8$  nmol/l であり有意差はなかった (Fig. 3)。血清 CoQ10 酸化率は、HBO 曝露前後ともに 0.0%であった。酸化マーカーとされる血清 HEL の生成速度は、HBO 曝露前が  $21.0 \pm 7.2$  nmol/l、HBO 曝露後が  $19.8 \pm 3.6$  nmol/l で有意差はなかった (Fig. 4)。尿 HEL は、HBO 曝露前が  $105.8 \pm 63.3$  pmol/mg·crea.、HBO 曝露後が  $57.1 \pm 14.8$  pmol/mg·crea. で有意差はなかった (Fig. 5)。血清 LPO は、HBO 曝露前が 0.4

±0.3 μM、HBO 曝露後は 0.3±0.0 μM であり有意差はなかった (Fig. 6)。血清 SOD は、HBO 曝露前は 10.7±1.7%、HBO 曝露後 10.9±1.6% であり有意差はなかった (Fig. 7)。抗酸化力の指標となる血清 BAP は、HBO 曝露前が 2478.1±329.9 μmol/l、HBO

曝露後が 2545.8±211.7 μmol/l で有意差はなかった。

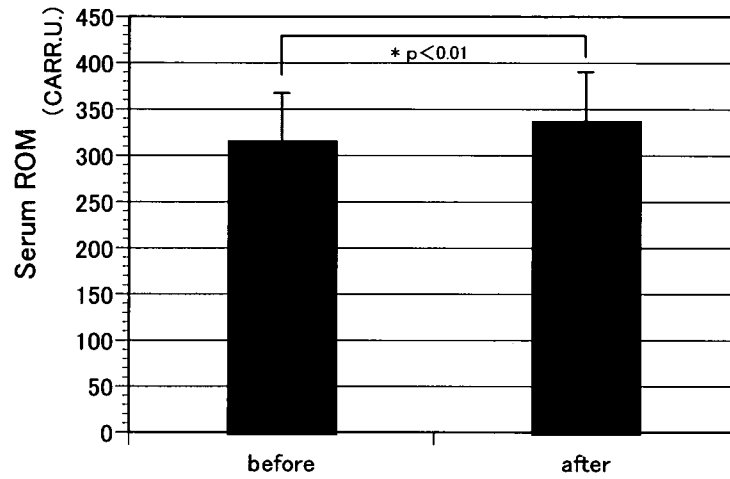


Fig. 1 Change of serum ROM after HBO.

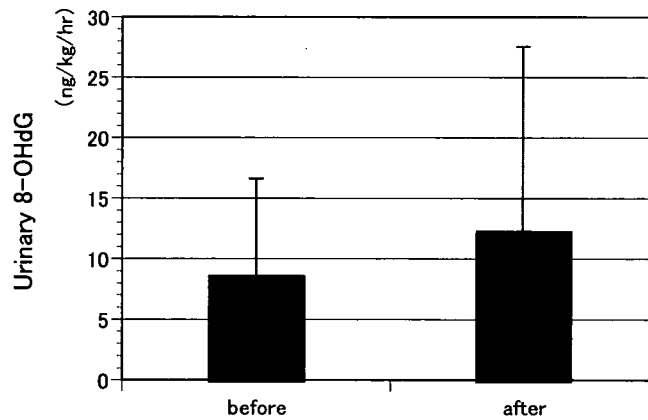


Fig. 2. Change of urinary 8-OHdG formation speed after HBO.



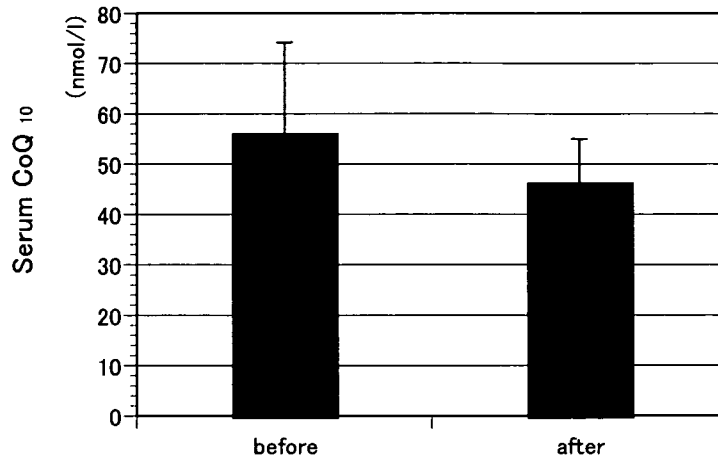


Fig. 3 Change of serum total CoQ10 after HBO.

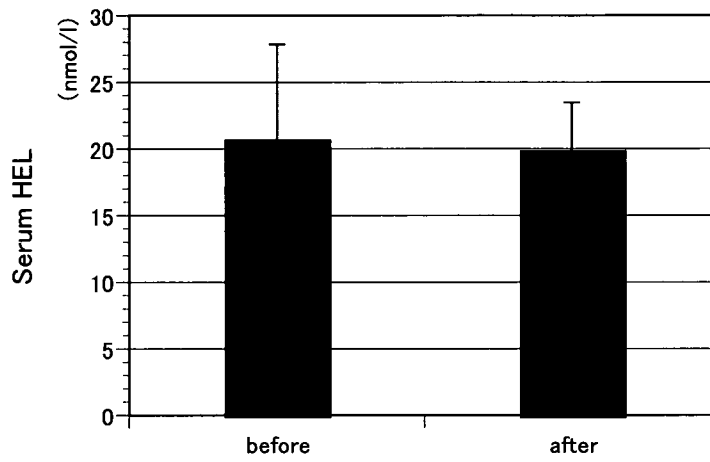


Fig. 4 Change of serum HEL after HBO.

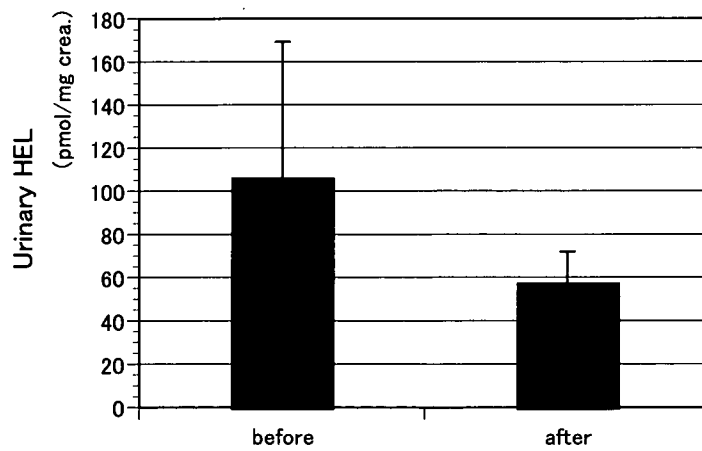


Fig. 5 Change of urinary HEL after HBO.

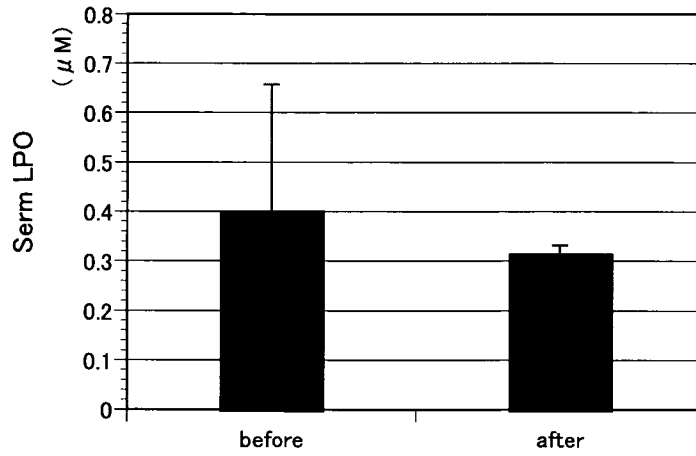


Fig. 6 Change of serum LPO after HBO.

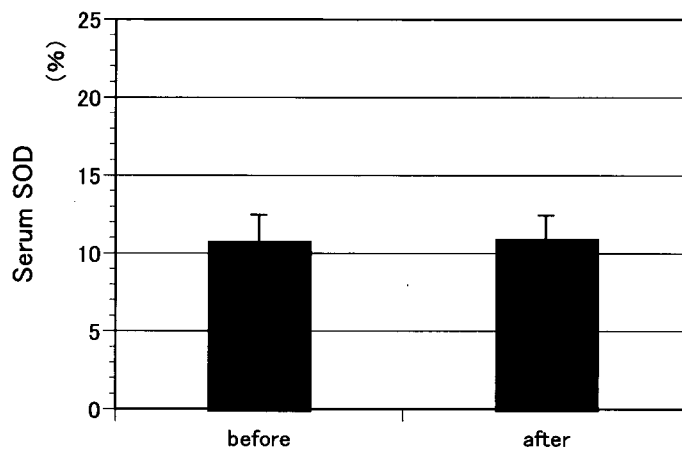


Fig. 7 Change of serum SOD after HBO.

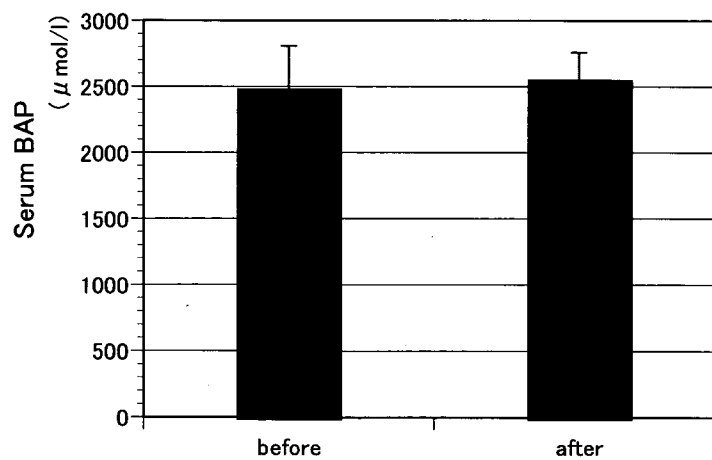


Fig. 8 Change of serum BAP after HBO.

考察

本研究では、HBO 直後、血清 ROM 値は増加

したが、他の生化学的なマーカーには有意な変化を認めなかった。既存の研究では、

HBO によって ROS が増加することは知られているが 6~9)、どのような酸化ストレスマーカーが酸素中毒量を反映するかについては不明である。今回測定した ROM は hydroperoxides を反映する。これまで単回の HBO によって ROM が増加することについては報告されていないが、本研究において 1 回の HBO においても酸素分圧と曝露時間によっては ROM が増加することが示唆された。本研究において測定された ROM は、代謝の結果として生じる血中 hydroperoxides を定量的に測定する方法として近年報告された 10)。一般に、hydroperoxides に反映されるラジカルは peroxy radical や alkoxy radical であるが、これらの半減期は数秒といわれているため評価することができない。よって、比較的安定な hydroperoxides を測定して評価したものである。本研究において測定された ROM は、HBO によって一過性に増加した ROS 像を観察したことになる。ROM 値は、血液中の ROS 変化を反映しているため、蓄積的な肺酸素中毒の指標とされる UPTD や画像検査による評価と一致して変化するとは考えがたいが、HBO の圧力や曝露時間、曝露回数によって変化する可能性はあると考える。

本研究では、酸化・損傷マーカーのひとつとして 8-OHdG を測定した。8-OHdG は、細胞中の DNA 構成成分である deoxyguanosine (グアニン塩基) が hydroxyl radical によって酸化・損傷される際に生じるため、近年、疾病やスポーツ時の酸化ストレス評価に使用されてきている 18, 19)。8-OHdG は、細胞内において生成され、DNA が修復される過程で細胞外に排出され、血液を経て尿中に排泄される。尿 8-OHdG 排泄量は DNA の損傷とその修復機能を反映すると考えられているため、生体全体の DNA の酸化的損傷を観察するために有用とされている。8-OHdG は、急性心筋

梗塞患者において、再灌流傷害の酸化ストレスの経時的変化を評価できることが報告されている 18)。運動による酸化ストレス負荷実験においては、最大酸素摂取量 45%、60 分の運動強度で増加しなかったが、70%、60 分の強度で有意に増加したとの報告がある 20)。このように、尿 8-OHdG は、酸素消費量すなわち ROS の増加、DNA の酸化的損傷の程度とともに、その排泄量は増加することが考えられている。しかしながら、別の報告では運動後の尿において 8-OHdG 排泄量は増加せず 22)、激しい運動を連日繰り返すような負荷がかかったときにようやく尿 8-OHdG は有意に増加するという報告 19) もあり、測定条件や、身体活動による影響、日差変動を考慮して評価、検討する必要がある。

CoQ10 は、ミトコンドリアの電子伝達系の構成成分であり、還元型 CoQ10 については、抗酸化作用のある物質として知られている。既存の研究では、高分圧酸素に曝露されたマウスにおいて、CoQ10 投与群が非投与群と比較して痙攣などの酸素中毒症状が抑制され、死亡率も低下したことが報告されている 23)。CoQ10 には、還元型と酸化型が存在し、血漿中の割合はおよそ 96 : 4 とされているが、新生児の誕生など、全身の虚血・再灌流障害が生じた際には酸化型が 25%程度にも達することが知られている 24)。これらの現象から、CoQ10 の酸化・還元率は、酸化ストレスの評価材料になり、酸化ストレスまたは酸化傷害マーカーとしても有用であることが示唆される。本研究においては、血清 CoQ10 の濃度において、HBO 前後で変化がなく、血清 CoQ10 酸化率も影響を受けなかった。CoQ10 が活性酸素の発生するミトコンドリア内に豊富に存在することから考察すると、酸化・還元にまったく寄与しなかったとは考えにくい、血清中の CoQ10 酸化・還元率に反映されるほどではなかったと解釈でき

る。  
当研究では血清および尿 HEL を測定した。HEL は ROS による脂質過酸化過程において脂質ペルオキシドに由来する初期生成物である。よって、脂質過酸化の初期段階を捉える酸化ストレスマーカーといえる 14)。本研究において、血清および尿 HEL とともに有意な変化はなく、HBO が脂質過酸化に大きく作用することは少ないことが示唆される。緩徐な運動を繰り返し行い、身体が運動に適応したトレーニング状態になると、筋肉のミトコンドリアの SOD、および SOD 活性、血中 GSH、赤血球 GSH 還元酵素は、それぞれ増加し、glutathione S-transferase 活性も上昇する。一方、最高心拍数の 75%強度に相当する運動を 30 分以上行くと、SOD、creatinine kinase、乳酸脱水素酵素活性は一時的に高値を示すとともに、血液中の LPO を始めとした過酸化物の濃度は増加する 25)。しかしながら、本研究においては、Table6 の酸化ストレスは、血清 SOD および血清および尿 LPO に影響を及ぼさなかった。本研究において、抗酸化力の指標のひとつとされる BAP11) は影響を受けなかった。Table6 は、日常行われている HBO 治療表の中では比較的長時間で、かつ高分圧の酸素を吸入するスケジュールである。生体内の抗酸化物質は、酸化ストレスによって動員され、通常、ROS とほぼパラレルに変動し、一時的に過剰な酸化ストレスを受けても酸化・抗酸化の恒常性が保たれるといわれている 26)。本研究においても HBO の酸化ストレスが抗酸化力に影響するほどのものではないということが示唆される。Kotら 7) は、測定可能な抗酸化指標に影響が現れない理由のひとつとして、ヒトの酸化ストレスに対する感受性の違いや修復力の差を挙げている。また、それらの違いは遺伝子レベルで決定づけられているともいわれている 27)。本実験における被験者

は、比較的、年齢が若く、基礎疾患もなく、抗酸化能を低下させるようなタバコなどの嗜好品を使用していなかったことも、十分な抗酸化力を備えていた理由ともいえる。

今後、HBO の血液学的な酸化ストレスの評価については、実際の臨床に即した連続的な HBO による変化、UPTD との関連性、さらに鋭敏な検査項目の模索等を進めるべきであると考えられる。

#### 結語

US Navy Table 6 の HBO 曝露によって ROS は一過性に増加することが示唆された。ROS を定量的に評価する指標として ROM は比較的鋭敏に反映するため有用と考えられた。

#### 引用文献

- 1) Narkowicz CK, Vial JH, McCartney PW: Hyperbaric oxygen therapy increases free radical levels in the blood of humans. *Free Radic Res Commun* 1993; 19: 71-80.
- 2) Clark JM, Lambertsen CJ: Pulmonary oxygen toxicity. A review *Pharmacol Res* 1971; 23: 37-133.
- 3) Clark JM: Oxygen toxicity. In: Bennett PB & Elliott DH, eds. *The Physiology and Medicine of Diving*. 4th ed. London: W.B. Saunders 1993; 121-169.
- 4) Wright WB: Use of the University of Pennsylvania, Institute for environmental medicine procedure for calculation of cumulative pulmonary oxygen toxicity. U.S. Navy Experimental Diving Unit Research Report 1972; 2-72.
- 5) Donald KW: Oxygen poisoning in man. I & II. *Br Med J* 1947; 1: 667-72, 712-7.

- 6) Dennog C, Radermacher P, Barnett YA: Speit G Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 1999; 428: 83-9.
- 7) Kot J, Sicko Z, Wozniak M: Oxidative stress during oxygen tolerance test. *Int Marit Health* 2003; 54: 117-126.
- 8) Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, Pagliarani S, Benvenuti F, et al.: Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clini Biochem* 2004; 37: 312-317.
- 9) 眞野喜洋 秋葉仁 高野尚志 土井庸正 芝山正治: 高気圧酸素暴露に伴う血中の hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ )に関する研究. *日本衛生学雑誌* 1987; 42: 570-577.
- 10) Cesarone MR, Belcaro G, Carratelli M, Cornelli U, DeSanctis MT et al.: A simple test to monitor oxidative stress. *Int Angiol* 1999; 18: 127-130.
- 11) Iorio EL: BAP test. A novel test to assess antioxidant status. Principle, procedure, indications, clinical usefulness and comparative studies. BAP test and global assessment of oxidative stress 2003; Dec., 2-7.
- 12) Saito S, Yamauchi H, Hasui Y, Kurashige J, Ochi H, et al.: Quantitative determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) by using ELISA. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2000; 107: 39-44.
- 13) Yamashita S, Yamamoto Y: Simultaneous detection of ubiquinol and ubiquinone in human plasma as a marker of oxidative Stress. *Anal Biochem* 1997; 250: 66-73.
- 14) Kato Y, Mori Y, Makino Y, Morimitsu Y, Hiroi S, et al.: Formation of Ne-(hexanonyl) lysine in protein exposed to lipid hydroperoxide. *J Biol Chem* 1999; 274:20406-20414.
- 15) 北島勲: LPO. *日本臨床* 2004; 62 suppl 11: 529-531.
- 16) Beauchamp C, Fridovich I: Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971; 44: 276-287.
- 17) Verde V, Fogliano V, Ritieni A, Maiani G, Morisco F, et al.: Use of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine to evaluate the oxidative status of human plasma. *Free Radical Research* 2002; 36: 869-873.
- 18) Nagayoshi Y, Kawano H, Hokamaki J, Miyamoto S, Kojima S, et al.: Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels increase after reperfusion in acute myocardial infarction and may predict subsequent cardiac events. *Am J Cardiol* 2005; 95: 514-517.
- 19) Okamura K: Effect of repeated exercise on urinary 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans. *Free Rad Res* 1997; 26: 507-514.
- 20) 中島早苗, 井下香織, 蒲原聖可, 大野誠 運動負荷後の尿中 8-OHdG および血中抗酸化物質の動態 *体力科学* 2004; 53: 813.
- 21) Morillas- Ruiz j, Zafrilla P, Almar M, Cuevas MJ, Lopez FJ, et al.: The effects of an antioxidant-supplemented beverage on exercise-induced oxidative stress: results from a placebo-controlled double-blind study in cyclists. *Eur J Appl Physiol* 2005; 95: 543-549.
- 22) Sumida S: No influence of a single

- bout of exercise on urinary excretion of 8-hydroxydeoxyguanosine in humans. *Biochem Mol Bio Tnt* 1997; 42: 601-609.
- 23) Bertelli A, Bertelli AAE, Giovannini L, Spaggiari P: Protective synergic effect of coenzyme Q10 and carnitine on Hyperbaric oxygen toxicity. *Int J Tiss Reac* 1990; 12: 193-196.
- 24) Hara K, Yamashita S, Fujisawa A, Ogawa T, Yamamoto Y: Oxidative stress in newborn infants with and without asphyxia as measured by plasma antioxidants and free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 244-248.
- 25) Maughan RJ: Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. *Muscle Nerve* 1989; 12: 332-336.
- 26) Rothfuss A, Dennog C, Speit G: Adaptive protection against the induction of oxidative DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1913-1917.
- 27) Perera FP, Whyatt RM: Biomarkers and molecular epidemiology in mutation/cancer research. *Mutat Res.* 1994; 313(2-3): 117-29.

## CHANGE OF SERUM FREE RADICALS AND ANTIOXIDANT POTENTIAL IN REBREATHING DIVERS

Yamami N, Yagishita K, Togawa S, Kongouji J, Nakayama H, Shibayama M, Suzuki N  
1, Yamamoto K 1, Matsumoto Y1, Nozawa T, Kawashima M 2, Mano Y

Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

1 Research and Development Department, Ortho Medico Inc. Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

2 Kawashima Orthopedic Hospital, Ohita, Japan

### ABSTRACT

**BACKGROUND:** No study exists on the estimated risk from oxidative stress induced by rebreather diving activities, although some observations suggest that inhaled oxygen under hyperbaric treatment increase oxidative stress on living body. This study intended to evaluate oxidative stress and antioxidant potential of divers during rebreather diving activity, and to estimate the effect of reactive oxygen and antioxidant potential.

**MATERIALS AND METHODS:** The subjects were 10 healthy rebreather divers. Diving profile is depth of 30m for 30 min, total diving time was 60 minutes including 10 min of descending time and 20 min of decompression time. Subjects were equipped with their closed circuit apparatus keeping PO<sub>2</sub> as 1.3ATA (constant). Subjects were asked to swim about 1200m underwater for 60 min. Blood samples were collected from divers' forearm vein before and after diving. Immediately after having the samples, a portable free radical and antioxidant potential determination device called FRASR (Free Radical Analytical System) was used to measure the reactive oxygen metabolites (ROM) and the biological antioxidant potential (BAP).

**RESULTS:** ROM, which is the indexes of evaluating reactive oxygen species, had no significant difference (before: 284.5 ± 49.9 CARR.U., after: 284.5 ± 51.2 CARR.U.) (ROM × Hct/43; before: 294.8 ± 48.4 CARR.U., after: 289.5 ± 50.6 CARR.U.). BAP, which indicate antioxidant potential, significantly increased 10.7% after diving (before: 2221.6 ± 466.5 μmol/l, after: 2458.4 ± 363.5 μmol/l) (P<0.05).

**CONCLUSIONS:** In this study, it was confirmed that there was a time frame during which serum BAP increased in rebreather diving, which suggests that antioxidant potential would be induced from some tissues.

### INTRODUCTION

Introduced about 10 years ago, rebreather diving apparatus has acquired some popularity in Japanese expert diving community or diving enthusiasts. Rebreather diving is an activity conducted underwater with underwater rebreathing apparatus, removing CO<sub>2</sub> in the expiration and compensating the metabolised O<sub>2</sub>. Breathing high pressure oxygen supply can bring higher risk of reactive oxygen damage.

It is well known that reactive oxygen is a cause of significant cell damage from the oxidation of membranes or by altering critical enzyme pathways and systems. Many studies point out that oxidative stress appears to be associated with increased production of reactive oxygen radicals that alter the natural antioxidant defense mechanisms present in most cells and tissues.

Some reports states observations that inhaling oxygen under hyperbaric treatment increased oxidative stress on living body. However, there are no study on estimating the risk of oxidative stress caused by high pressure oxygen mixed gas inhalation by healthy subjects during rebreather diving. For divers' health care, it is an important issue whether rebreather diving activity increases oxidative stress or not. The aim of this study is to evaluate oxidative stress and antioxidant potential of divers during rebreather diving activity, and to estimate the effect of reactive oxygen on rebreather diving .

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

The subjects were 10 healthy male rebreather divers (age range  $45.9 \pm 9.6$  years-old, smokers is not included). All subjects were informed of the aim of this study, and informed consent was obtained from all subjects.

Fig.1~3 are full closed circuit rebreather (CCR).

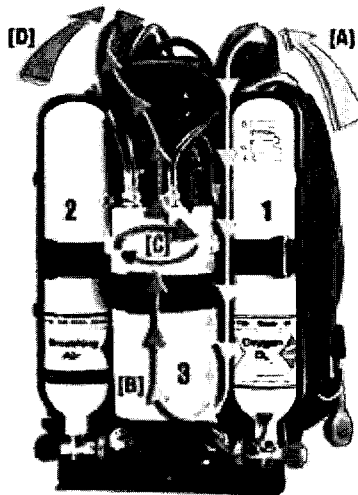


Fig.1 The system of full closed circuit rebreather.

- 1: O<sub>2</sub>, 2: diluent gas
- A: expiration,
- B: CO<sub>2</sub> absorbent,
- C: O<sub>2</sub> addition,
- D: inhalation





Fig.2 Full closed circuit rebreather.



Fig.3 Divers equipped With full closed circuit rebreather.

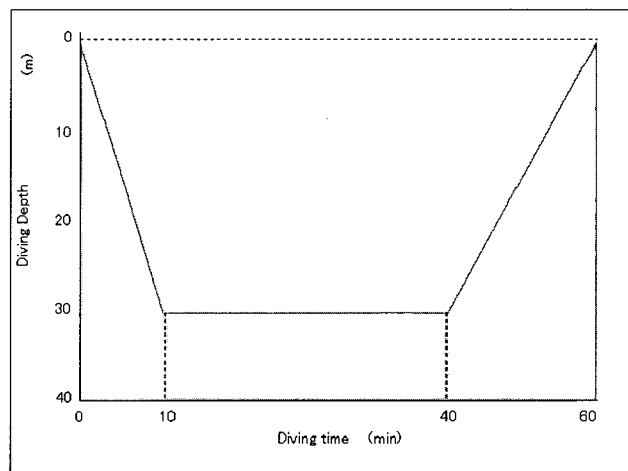


Fig.4 Depth and time in diving profile

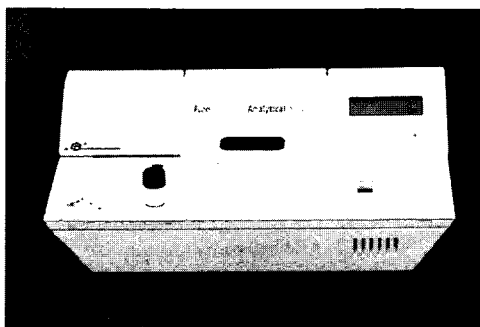


Fig. 5 FRAS4

#### Diving profile

Diving profile was depth of 30m for 30 min, total diving time was 60 minutes including 10 min of descending time and 20 min of decompression time (Fig.4). Bottom temperature is 15°C. The diving profile is shown below.

Subjects were equipped with the full closed circuit apparatus keeping  $PO_2$  as 1.3ATA (constant), and asked to swim across about 1200m underwater for 60 min.

#### Sample collection and measurements

Blood samples were collected from divers' forearm vein before and after diving. Immediately after gathering samples, a portable free radical and antioxidant potential determination device called free radical analytical system 4 (FRAS4®) (Diacron, srl., Italy) (Fig. 5) was used to measure the reactive oxygen metabolites, ROM and the biological antioxidant potential, BAP, and blood chemistry examination; WBC, RBC, Hb, Hct, Plt, MCV, MCH, MCHC, thrombomodurin, and accelerated plethysmography (APG) (Heart rater SA-3000P®: ) before and after diving.

#### Other examinations

During diving, each diver carried a pulse sensor (Seiko pulse graph® Seiko Watch Co., Japan) to confirm one's own heart rate to be below 110 bpm (Fig.6). They also carried diving computers (Citizen air diver®, Citizen Watch Co., Ltd.) to control the time and depth of diving (Fig.7).



Fig. 6 Seiko pulse graph.

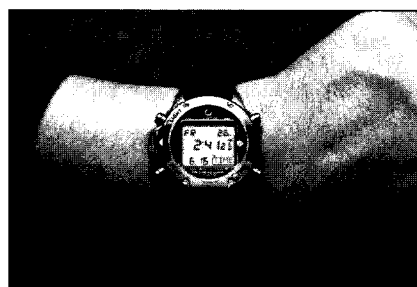


Fig. 7 Citizen air diver.

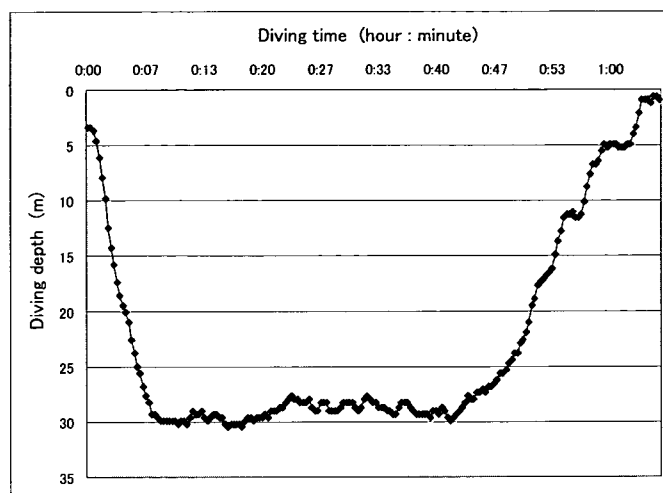


Fig.8 An example profile of rebreather divers.

### Statistics

All data are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed on a personal computer with the Microsoft Excel. Variables were analyzed by paired t-test to analyze change from baselines. P values of less than 0.05 were considered significant.

### RESULTS

Fig.8 is an example of subjects in rebreather diving.

ROM, which is the indexes of evaluating reactive oxygen species, had no significant difference (before:  $284.5 \pm 49.9$  CARR.U., after:  $284.5 \pm 51.2$  CARR.U.) ( $ROM \times Hct/43$ ; before:  $294.8 \pm 48.4$  CARR.U., after:  $289.5 \pm 50.6$  CARR.U.) (Fig.9). BAP, which indicate antioxidant potential, significantly increased 10.7% after diving (before:  $2221.6 \pm 466.5$   $\mu\text{mol/l}$ , after:  $2458.4 \pm 363.5$   $\mu\text{mol/l}$ ) ( $P < 0.05$ ) (Fig.10).

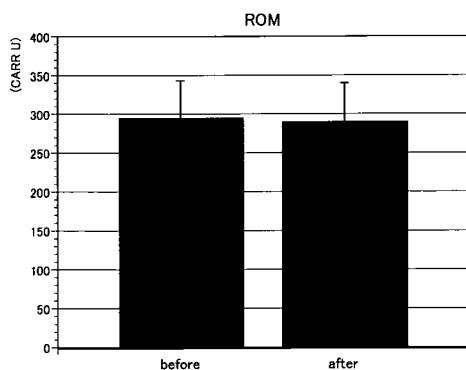


Fig.9 ROM

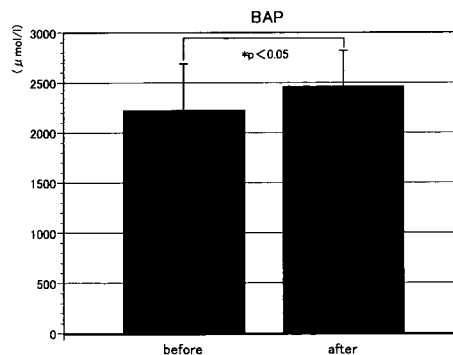


Fig.10 BAP

Table 1 Blood chemistry examination and APG before and after diving.

	before	after
WBC	5175.0±364.2	5437.5±1337.3
RBC	481.1±35.5	481.1±30.3
Hb	14.8±0.6	15.0±0.5
Ht	44.1±1.6	43.5±1.3
PLT	22.0±5.3	22.5±5.3
MCV	91.8±4.5	90.4±4.2
MCH	30.8±1.6	31.2±1.8
MCHC	33.6±0.6	34.5±0.8
TM	15.7±3.1	16.2±3.6
Acceleration plethysmogram	no significant	
Heart Rate	77.4±11.6	76.4±10.8
autonomic nervous system		
Time Domain Analysis	no significant	
Frequency Domain Analysis	no significant	

## DISCUSSION

In this rebreather divings, constant PO<sub>2</sub> of 1.3ATA in the closed circuit apparatus was kept as respiration gas. So during the undersea activities, oxygen partial pressure of inhalation gas did not increase or decrease, although keeping higher compared to open circuit scuba. Differ from the open circuit scuba diving, where at the depth of 30 meters undersea, for example, the environmental pressure becomes 4 atmospheres, and the alveolar oxygen partial pressure theoretically becomes approximately 640 mmHg, which is almost 4 times of atmospheric pressure respiration, in this rebreather diving study, the alveolar oxygen partial pressure stayed approximately 1,000 mmHg, which is almost 6 times of atmospheric pressure respiration. Nevertheless, there have not been any studies or researches conducted in the topic of oxidative stress during rebreather diving.

Generally, it is said that the rise of inhalation oxygen partial pressure increases the generation of reactive oxygen by the effect of promoted oxygen metabolism in the body. When the generated reactive oxygen and free radicals are not appropriately eliminated, there should be a risk of oxidative damage in the body. Although it is said that physical exercise improves antioxidant potential, the change of antioxidant potential in rebreather diving activity wherein high pressure oxygen is inhaled, has not been clarified in relation to physical activities.

In this study, it was confirmed that there was a time frame when serum BAP increased in low stressed rebreather diving, which signifies that antioxidants were induced from some tissue to control oxygen stress, or that free radical damage may be reduced in rebreather diving activities under a certain conditions.

Usually, it is said that about 2% of oxygen consumed in respiration at rest becomes