



Title	強度の等しい有酸素運動における総酸素摂取量の違いと運動誘発性酸化ストレスの関係
Author(s)	神林, 勲; 木本, 理可; 塚本, 未来; 東郷, 将成; 秋月, 茜; 内田, 英二
Citation	北海道教育大学紀要. 自然科学編, 72(2): 29-41
Issue Date	2022-02
URL	<a href="http://s-ir.sap.hokkyodai.ac.jp/dspace/handle/123456789/12247">http://s-ir.sap.hokkyodai.ac.jp/dspace/handle/123456789/12247</a>
Rights	

## 強度の等しい有酸素運動における総酸素摂取量の違いと 運動誘発性酸化ストレスの関係

神林 勲・木本 理可\*・塚本 未来\*\*・東郷 将成\*\*\*・秋月 茜†・内田 英二††

北海道教育大学札幌校保健体育教育研究室

\*藤女子大学人間生活学部

\*\*東海大学国際文化学部

\*\*\*旭川大学短期大学部

†拓殖大学北海道短期大学

††大正大学心理社会学部

## Relationship between Total Oxygen Consumption and Exercise-Induced Oxidative Stress during Moderate Aerobic Exercise at an Identical Intensity

KAMBAYASHI Isao, KIMOTO Rika\*, TSUKAMOTO Miku\*\*, TOGO Masanari\*\*\*,  
AKIZUKI Akane† and UCHIDA Eiji††

Department of Physical Education, Sapporo Campus, Hokkaido University of Education, Sapporo 002-8502

\*Faculty of Human Life Sciences, Fuji Women's University, Ishikari 061-3204

\*\*School of International Culture Relations, Tokai University, Sapporo 005-0825

\*\*\*Asahikawa University Junior College, Asahikawa 079-8501

†Takushoku University Hokkaido College, Fukagawa 074-8585

††Faculty of Psychology and Sociology, Taisho University, Tokyo 017-8470

### ABSTRACT

This study examines the relationship between total oxygen-consumption ( $\Sigma \dot{V}O_2$ ) during exercise and exercise-induced oxidative stress (EIOS) during moderate aerobic exercise. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) level and serum redox balance with electron paramagnetic resonance/nitroxide spin probe method were used as biomarkers of EIOS. Twelve healthy active men [age:  $20.3 \pm 1.9$  yr, height:  $178.7 \pm 5.1$  cm, weight:  $73.8 \pm 7.6$  kg, BMI:  $23.4 \pm 1.9$  kg/(m)<sup>2</sup>] participated in this study after providing written informed consent. The subjects performed incremental exercises to volitional exhaustion to measure peak oxygen uptake ( $\dot{V}O_{2peak}$ ) using a bicycle ergometer. They also exercised on separate days for 30 min (30EX), 60 min (60EX) and 90 min (90EX) at an identical intensity of 50%  $\dot{V}O_{2peak}$  on the bicycle ergometer. Cardio-respiratory data were measured during the

exercise. Urine samples were collected before (baseline) and after (1.5 h) the exercise, and blood samples were collected at baseline, immediately after exercise (0 h), and 1.5 h after exercise. The  $\Sigma VO_2$  were  $746.3 \pm 74.7$  ml/kg,  $1580.9 \pm 78.0$  ml/kg and  $2554.5 \pm 169.9$  ml/kg in 30EX, 60EX and 90EX, respectively. However, urinary 8-OHdG levels and serum redox balance did not change before and after each exercise. These results suggest that  $\Sigma VO_2$  during exercise does not have a significant effect on EIOS in moderate aerobic exercise for up to 90 min.

キーワード：活性酸素種, 尿中8-OHdGレベル, 酸化還元バランス, ナイトロオキサイド化合物, 自転車漕ぎ運動

## 緒 言

ヒトにおける運動誘発性酸化ストレス(exercise-induced oxidative stress, 以下EIOS)の可能性は, 骨格筋収縮において活性酸素種(reactive oxygen species, 以下ROS)生成が発見される(Davies et al., 1982)以前より, 認められていた(Dillard et al., 1978)。そして, この40年間でEIOSについての多くの知見が蓄積され, EIOSが劇的に増加する閾値のような運動強度の存在が示唆される中(Alessio, 1993), 今日, EIOSは運動強度依存性, すなわち短時間でも高強度の運動において生じ(Lovlin et al., 1987; 神林ほか, 2004, 2005, 2015), 中強度以下の運動では認められないというのがほぼ一致した見解となっている。

過剰なROS生成が, 筋張力発揮(Reid, 2001; Moopanar and Allen, 2005)や運動時(Matsunaga et al., 2003; 神林ほか, 2015)の疲労要因であることが認められている。また, オーバートレーニングのような慢性的疲労状態では酸化ストレス指標が増加している(Margonis et al., 2007)等の知見も報告され, 運動・スポーツとEIOSとの関係についてのエビデンスをさらに蓄積することは, 健康・スポーツ科学の発展には欠かすことができないと考えられる。

これまで, 中強度有酸素運動におけるEIOSの報告は, 様々な実験条件において数多く認められている。例えば, 対象者の年齢(神林ほか, 2009)

や鍛錬度(Sen et al., 1994; Morillas-Ruiz et al., 2005; Muñoz Marín et al., 2010; 木本ほか, 2010; 長島, 2011), トレーニングの専門性(木本ほか, 2012), 環境温度(木本ほか, 2015), 性別(木本ほか, 2012)および運動強度(神林ほか, 2009)等の条件が異なっても, EIOSは生じていない。この原因についてはいくつかの仮説があるが, 例えば, ADP濃度とミトコンドリアROS生成の関連性(Chance et al., 1979)やトレーニング状態によるミトコンドリアROS生成の違い(Venditti et al., 1999), 抗酸化能力の向上(齋藤ほか, 2005; Davison et al., 2006; 鈴木ほか, 2007; 長島, 2011)等が考えられている。また, 中強度という強度自体が, 筋線維の動員様式(Vøllested and Blom, 1985)と筋線維タイプ毎の抗酸化能力の違い(Ji et al., 1992)との関係から, EIOSを生じにくい可能性もある。

しかしながら, 中強度有酸素運動において, EIOSが生じる場合の主要因はミトコンドリアROS生成であることから, 運動強度を等しく設定し運動で消費される総酸素摂取量(total oxygen consumption, 以下 $\Sigma VO_2$ )を変化させてEIOSを検討する必要がある。ミトコンドリアは, 細胞内の約9割の酸素を利用し(Boveris et al., 1972), その数パーセントは常にROSへと変化する(Boveris et al., 1973; Chance et al., 1979; Cadenas and Davies, 2000; Balaban et al., 2005)。このことから, 運動で消費される $\Sigma VO_2$

が多ければROS生成も増大するだろう。最大酸素摂取量の50%程度の中強度有酸素運動を30~60分間実施した研究 (Dillard et al., 1978; Sen et al., 1994) では、EIOSの惹起を報告しているものもある。よって、中強度有酸素運動において運動強度を同一に設定し、ミトコンドリアでの酸素利用量の多少に着目した実験を行うことでEIOSの惹起を検討する必要がある。今日、健康の維持・増進やリクリエーションとしてウォーキング、ジョギングおよびランニングの実施は高まっており、特にマラソンのような長時間の有酸素運動も大衆化してきている。「中強度有酸素運動ではEIOSは惹起しない」という見解はあるものの、中強度有酸素運動で利用される $\Sigma \dot{V}O_2$ の多少とEIOSとの関連性をより明確にすることは意義深いと考えられる。

そこで本研究では、運動強度を被検者の最高酸素摂取量 (peak oxygen uptake, 以下 $\dot{V}O_{2peak}$ ) の50%に設定し、この運動を同一の被検者に対して30分間、60分間および90分間実施させる実験条件を設定した。この設定により運動中の $\Sigma \dot{V}O_2$ を継続時間の影響で変化させ、運動後における尿中の酸化ストレス指標と血中 (血清) の酸化還元バランス指標について比較した。本研究では、酸化還元バランス指標にナイトロオキサイド化合物の半減期を用いた。この化合物は不対電子を持ち、電子常磁性体共鳴 (electron paramagnetic resonance, 以下EPR) 法でスペクトルの信号強度を定量化することができる。実験動物の生体内にナイトロオキサイド化合物を投与すると、高い生物学的還元能 (抗酸化能) のため、この化合物のEPR信号強度は減衰する。しなしながら、その周囲にROSなどの酸化物が多量に存在すると還元されたナイトロオキサイド化合物は酸化され、EPR法で再度、信号を検知できるようになり、信号強度の減衰速度が鈍化する。そこで、ナイトロオキサイド化合物の信号強度の減衰速度に着目することでROSなどの酸化物生成を間接的に評価することが可能となる (Bobko et al., 2007)。また、ナイトロオキサイド化合物が存在する周囲の抗酸化能が著し

く増加した場合には、信号強度の減衰速度が速まり、半減期が短くなるという報告もある (Fuji et al., 2012, 神林ほか, 2017)。本研究では、このナイトロオキサイド化合物を用いて運動前後のヒト血清中の酸化還元バランスを評価した。

## 方 法

### 1. 被検者

被検者は大学で運動部に所属する非喫煙者の男子大学生12名 [年齢  $20.3 \pm 1.9$  歳, 身長  $178.7 \pm 5.1$  cm, 体重  $73.8 \pm 7.6$  kg, BMI  $23.4 \pm 1.9$  kg/(m)<sup>2</sup>] であった。実験に先立ち、全員に本研究の趣旨、安全性および予想される苦痛等について十分な説明を行い、自主的な実験参加の同意を文書により得た。なお、本研究は北海道教育大学研究倫理委員会の承認を得て実施された。

### 2. 実験の概要

本研究では、最初に自転車エルゴメーターを用いたランプ負荷法による漸増負荷運動により各被検者の $\dot{V}O_{2peak}$ を測定した。その $\dot{V}O_{2peak}$ と負荷の増加に伴う酸素摂取量の一次回帰式を元に、50%  $\dot{V}O_{2peak}$ に相当する負荷を被検者毎に算出した。予備実験において、算出された負荷をそのまま用いて一定負荷運動を実施した場合、目標とする50%  $\dot{V}O_{2peak}$ を上回ってしまった。このため算出された負荷値の約8割に相当する負荷で予備実験を実施したところ、目標とする50%  $\dot{V}O_{2peak}$ に相当することが判明した。よって、本研究では漸増負荷運動から推定された50%  $\dot{V}O_{2peak}$ に相当する負荷の約8割に相当する負荷を用いて、30分間 (以下30EX)、60分間 (以下60EX) および90分間 (以下90EX) の継続時間が異なる中強度有酸素運動を実施した。実験では採血を3回、採尿を2回実施した。実施のタイミングについては、運動前 (以下baseline) と運動終了1.5時間後 (以下1.5 h) は採血と採尿の両方を、運動終了直後 (以下0 h) には採血のみを実施した。なお、本研究では、酸化ストレス指標として

尿中8-ヒドロキシ-デオキシグアノシン (8-hydroxy-deoxyguanosine, 以下8-OHdG) レベル, 血液より分離された血清の酸化還元バランスを, ナイトロオキサイド化合物の半減期をEPR法で定量化することによって評価した。

### 3. 運動プロトコル

#### (1) 漸増負荷運動

運動は自転車エルゴメーター (COMBI社製エアロバイク75XL) を用いて, 室温22~23℃, 湿度50~60%の環境で行った。被検者は, 体重測定後, 準備運動を15~20分間実施した。その後被検者を自転車エルゴメーターに乗車させ, サドルの高さを調節し, 運動中に足がペダルから外れないように足とペダルをテープで固定した。そして, 呼気ガス分析用のマスク (King Systems社製Inflatable Face Mask), 血圧計 (ミナト医科学株式会社製自動血圧計 EBP-3000) およびスポーツ心拍計 (POLAR社製 RS400TM) を装着した。エルゴメーター上で4分間の安静状態を保持した後, ウォーミング・アップとして2分間, 60 wattsの負荷でメトロノームのリズムにあわせた60 rpmのペダリング運動を行った。その後, 60 rpmを維持した状態で, 毎分30 watts増加するランプ負荷法により疲労困憊に至るまでの漸増負荷運動を実施した。なお, 疲労困憊の判断は, ペダリング頻度が50 rpmを下回った時点とした。

#### (2) 中強度有酸素運動

漸増負荷運動で用いた同じ自転車エルゴメーターを使用し, 室温20~22℃, 湿度45~50%の環境で中強度有酸素運動を行った。被検者は入室して座位での安静を保持した後, 採尿と採血を行い, 衣服を着用しない状態で体重を測定した。その後, 準備運動を15~20分間実施し, 自転車エルゴメーターの椅子の高さとハンドルの位置を調節した後, 漸増負荷運動で用いたのと同じ呼気ガス分析用のマスク, 血圧計および心拍計を装着した。被検者は, 自転車エルゴメーター上で3分間安静状態を保持した後, 1分間, 目標負荷の半分の負荷

で60 rpmを維持したペダリング運動を行い, その後, 連続して目標負荷で一定負荷運動を行った。測定が設定継続時間に達した後, 被検者は自転車エルゴメーターから降車し座位安静状態で直ちに採血を受けた。採血後, 衣服を着用しない状態で体重を測定し, そこから1時間以内に運動による体重の減少量に相当する水分 (市販のミネラルウォーター) を摂取させ, その後, 1.5 hで採尿と採血を行った。なお, 30EX, 60EXおよび90EXの3つの運動の間にはそれぞれ約1週間の期間を設け, 3つの運動は被検者毎に, できる限り同一時間帯で無作為に実施した。また, 被検者には実験前日の激しい運動を制限し, 実験開始前2食の食事は検者が準備したものを摂取させた。一定負荷運動は最後の食事から2時間経過後に実施した。

### 4. 呼気ガス分析

#### (1) 漸増負荷運動

漸増負荷運動中の酸素摂取量 (Oxygen uptake, 以下 $\dot{V}O_2$ ), 二酸化炭素排泄量 (CO<sub>2</sub> production, 以下 $\dot{V}CO_2$ ), 換気量 (Ventilation, 以下 $\dot{V}E$ ), および呼吸交換比率 (Respiratory exchange ratio, 以下RER) の測定は, 自動呼気ガス分析装置 (ミナト医科学社製AE-300S) を用いて, 安静時から運動終了まで15秒毎に呼気ガス採集法によって行った。呼気ガス分析と同時に, スポーツ心拍計により心拍数 (Heart rate, 以下HR) を連続的に15秒毎に測定した。得られた心拍数のうち, 最も高い値を最高心拍数とした。

#### (2) 中強度有酸素運動

一定負荷運動中の呼気循環器系指標として,  $\dot{V}O_2$ ,  $\dot{V}CO_2$ ,  $\dot{V}E$ およびRERを前述の自動呼気ガス分析装置を用いて, 安静時から運動終了後まで breath-by-breath法によって行った。測定されたデータを8呼吸毎に移動平均し, さらに15秒毎に単純平均したものを分析に用いた。得られた $\dot{V}O_2$ の内, 運動開始から運動終了時までの体重当たりの $\dot{V}O_2$ の総量を $\Sigma \dot{V}O_2$ とした。呼気ガス分析

と同時に、前述のスポーツ心拍計によりHRを連続的に15秒毎に測定した。

## 5. 採尿と採血

採尿はbaselineおよび1.5 hの2回行った。運動終了後から1.5 hの採尿までの間は座位安静状態とした。採尿ではすべての尿を採取し、採尿時刻の確認と尿量を計測した後、分注して分析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

採血は医師の指示を受けた看護師が実施し、baseline, 0 hおよび1.5 hの3回、採血管（テルモ社製）を用いて、肘静脈より約20ml行った。採取した血液の内、9 mlを常温で1時間放置した後、3500 rpm,  $0^{\circ}\text{C}$ で10分間遠心分離を施し、血清の抽出に供した。血清サンプルは分析時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。残りの血液においては、外注分析（札幌臨床検査センター）により乳酸値、尿酸値および白血球数を測定した。

## 6. 尿中8-OHdGレベルの測定

凍結させた尿サンプルを常温で解凍した後、遠心分離機（パーソナル冷却遠心機2700, 久保田商事株式会社製）を用い、2000 rpmで5分間遠心分離を行った。そして、沈殿物を除いた上澄みを尿中8-OHdGレベルの分析に用いた。

尿中8-OHdG濃度の分析は酵素免疫（Enzyme-linked immunosorbent assay, 以下ELISA）法による測定キット（日本老化制御研究所製New 8-OHdG Check）を用いた。分析はマニュアル・インストラクションに従い実施した。本研究での尿中8-OHdGレベル（ng/kg/h）は、尿中8-OHdG濃度に尿量を乗じ、被検者の体重および前回排泄時からの経過時間で除したものをを用いた。

## 7. 血清酸化還元バランス指標の測定

血清酸化還元バランスの分析は、水溶性ナイトロオキシド化合物である4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperdine-d16-1-oxyl（以下Tempone）を用いた。測定はEPR法で実施し、Temponeは1 mMに調整されたものを使用した。EPRの測定条件は、

Sweep width =  $\pm 7.5$  mT, Sweep time = 2 min, Gain =  $2.5 \times 100$ , Modulation width =  $1.0 \times 0.1$  mT, Time constant = 0.3 sec, Center field = 336.2 mT, Power = 6 mW, Frequency = 9.43 GHzで行った。

血清酸化還元バランスの測定に際し、対照シグナルとしてTempone（最終濃度 $100\mu\text{M}$ ）と蒸留水を1 : 9の割合で混和し、ガラス管で混合液を吸い上げEPRにセットし、この際のスペクトルを還元0分値とした。そして、血清シグナルとしてTempone（最終濃度 $100\mu\text{M}$ ）と血清サンプルを1 : 9の割合で混和した後、40分間にわたりTemponeと血清サンプルを反応させた。その後EPRで測定されたスペクトルを還元40分値とした。

血清酸化還元バランスの評価は、還元0分値と還元40分値のシグナル強度を対数化してその変化を $y = ax + b$ で表し、a（速度定数）を用いて $0.693/a$ の式からTempone半減期（min）を算出することで行った。なお、予備実験により、還元0分から40分まで5分毎にTemponeのESRスベ

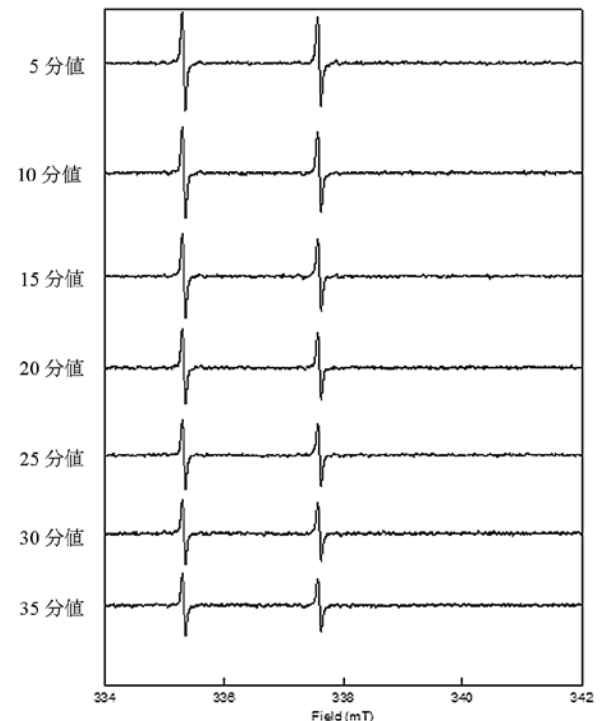


図1 血清にTempone添加後のEPRスペクトル信号強度の変化

スペクトルは上から還元5分値を示し、以後5分毎に還元35分値まで示している。

クトルを測定し（図1），そのシグナル強度の対数化には明確な直線性があることを確認した。

### 8. 統計処理

測定結果は，全て平均値±標準偏差（mean ± SD）で表した。3つの運動間の平均値の比較，各運動におけるbaseline，0 hおよび1.5 hの比較には等分散性を評価するBartlett検定の結果を踏まえ，Kruskal-Wallis検定を実施した。また，各運動のbaselineと1.5 hの平均値を比較する場合には，正規性を検討するKolmogorov-Smirnov検定の結果を踏まえ，Wilcoxon符号順位検定を行った。変数間の相関関係の検討にはSpearmanの順位相関係数を用いた。危険率はすべて5%未満を有意とした。

## 結 果

### 1. 漸増負荷運動

漸増負荷運動の継続時間と最大運動負荷は， $11.5 \pm 1.2$  minと $344.6 \pm 36.0$  wattsであった。呼吸循環器系の変数である $\dot{V}O_{2peak}$ ， $\dot{V}CO_{2peak}$ ，

$\dot{V}E_{peak}$ ，HRpeakおよびRERpeakは，それぞれ $53.7 \pm 4.3$  ml/kg/min， $61.7 \pm 4.1$  ml/kg/min， $138.5 \pm 19.8$  l/min， $191.8 \pm 8.7$  bpmおよび $1.23 \pm 0.08$ であった。

### 2. 中強度有酸素運動時の呼吸循環器系指標と体重の変化

平均 $\dot{V}O_2$ ，% $\dot{V}O_{2peak}$ ， $\dot{V}CO_2$ ， $\dot{V}E$ ，RER，HR，血圧および体重減少量について表1に示した。すべての値は目標負荷での運動開始から終了までとし，体重減少量については運動前の値から運動後の値を減じた値とした。各運動間でこれらの値を比較したところ，体重減少量において，60EXで30EX，90EXにおいて30EX，60EXと比較して有意に高値を示した。その他の指標に有意な差は認められなかった。

各運動の $\Sigma VO_2$ の値を図2に示した。30EX，60EXおよび90EXのそれぞれの値は， $746.3 \pm 74.7$  ml/kg， $1580.9 \pm 78.0$  ml/kgおよび $2554.5 \pm 169.9$  ml/kgであり，いずれの値の間にも有意差が認められた。

表1 各運動における呼吸循環器系変数と体重の変化

variables	30EX	60EX	90EX	significance
$\dot{V}O_2$ (ml/kg/min)	$27.2 \pm 2.1$	$27.1 \pm 1.3$	$28.5 \pm 1.9$	n.s.
% $\dot{V}O_{2peak}$ (%)	$50.5 \pm 2.4$	$50.4 \pm 2.6$	$52.5 \pm 3.1$	n.s.
$\dot{V}CO_2$ (ml/kg/min)	$25.5 \pm 1.8$	$25.4 \pm 1.7$	$26.3 \pm 1.6$	n.s.
$\dot{V}E$ (l/min)	$50.3 \pm 8.2$	$53.1 \pm 8.8$	$54.3 \pm 9.1$	n.s.
RER	$0.94 \pm 0.04$	$0.93 \pm 0.05$	$0.92 \pm 0.04$	n.s.
HR (bpm)	$137.8 \pm 10.3$	$141.8 \pm 14.9$	$148.5 \pm 10.0$	n.s.
BP-sys (mmHg)	$153.3 \pm 16.0$	$160.5 \pm 21.7$	$155.6 \pm 15.4$	n.s.
BP-dia (mmHg)	$67.4 \pm 6.0$	$68.8 \pm 10.7$	$70.1 \pm 8.4$	n.s.
body weight loss (kg)	$0.35 \pm 0.16$	$0.78 \pm 0.19$ +	$1.16 \pm 0.27$ *	* vs 30EX, 60EX (p<0.01) + vs 30EX (p<0.01)

データは平均値±標準偏差で示した。n.s.は有意差なし，BP-sysは収縮期血圧，BP-diaは拡張期血圧を示している。

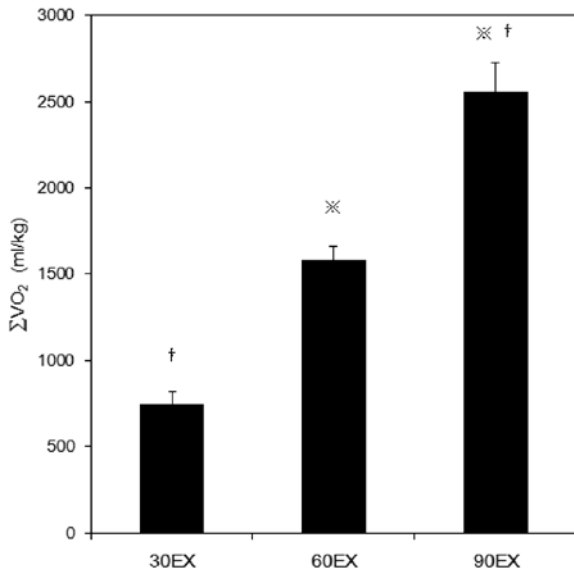


図2 各運動における総酸素摂取量 ( $\Sigma VO_2$ ) の比較  
 ※は30EX, †は60EXと比較して有意差 ( $p < 0.01$ ) のあることを示す。

### 3. 血液中の乳酸値, 尿酸値および白血球数

中強度有酸素運動における血液中の指標を表2に示した。乳酸値と尿酸値においてはbaseline, 0 hおよび1.5 h, また各運動間を比較しても有意な変化は認められなかった。白血球数においては、いずれの運動においてもbaselineに比較して0 hで

有意な増加が認められ, 90EXの値は30EXと60EXよりも高値であった。1.5 hでは, 60EXと90EXにおいて, baselineと0 hに比較して有意に増加し, 3つの運動間の値にも有意差が認められた。

### 4. 尿中8-OHdGレベル

尿中8-OHdGレベルを表3に示した。3つの運動において, baselineの値に差はなく, 運動前後でも有意な増加はなかった。1.5 hの値からbaselineの値を減じた変化量 (以下  $\Delta 8\text{-OHdG}$ ) も3つの運動で違いは認められなかった。

### 5. Tempone半減期

Tempone半減期を表4に示した。3つの運動において, baselineの値に差はなく, 運動前後でも有意な変化はなかった。0 hからbaselineを減じた変化量 ( $\Delta$ 半減期①), 1.5 hからbaselineの値を減じた変化量 ( $\Delta$ 半減期②) とも3つの運動で違いは認められなかった。

表2 各運動における血中の乳酸値, 尿酸値および白血球数の変化

	exercise	baseline	0 h	1.5 h
Lactate acid (mmol/L)	30EX	1.49 ± 0.80	2.25 ± 1.25	1.46 ± 0.92
	60EX	1.43 ± 0.99	2.06 ± 1.41	1.47 ± 0.90
	90EX	1.44 ± 0.93	2.17 ± 1.49	1.73 ± 1.09
Uric acid (mg/dl)	30EX	5.72 ± 0.91	5.87 ± 0.90	5.62 ± 0.83
	60EX	5.64 ± 1.07	5.98 ± 1.01	5.60 ± 0.95
	90EX	5.70 ± 1.03	6.10 ± 1.05	5.87 ± 0.90
WBC ( $10^4/\mu$ )	30EX	5.65 ± 1.38	7.52 ± 2.58*	7.18 ± 1.67
	60EX	5.99 ± 1.15	7.73 ± 1.63*	11.08 ± 2.97** <sup>S</sup>
	90EX	5.82 ± 1.05	11.13 ± 2.60*** <sup>S#</sup>	13.36 ± 1.84*** <sup>S#</sup>

データは平均値 ± 標準偏差で示した。WBC (White blood cell) は白血球を示す。\* ( $p < 0.05$ ) と\*\* ( $p < 0.01$ ) はbaselineとの比較による。また, <sup>S</sup> ( $p < 0.01$ ) は30EX, <sup>#</sup> ( $p < 0.01$ ) は60EXに対して同じ測定タイミングにおける比較を示している。



表3 各運動における尿中8-OHdGレベルの変化

exercise	baseline	1.5 h	significance	Δ8-OHdG
30EX	5.45 ± 2.93	5.91 ± 2.00	n.s.	0.46 ± 2.29
60EX	6.74 ± 4.64	7.32 ± 4.26	n.s.	0.58 ± 2.58
90EX	4.82 ± 1.73	5.77 ± 1.80	n.s.	0.70 ± 1.27

尿中8-OHdGレベルの単位はng/kg/hである。有意性は運動前後（baselineと1.5 hの差）について示している。n.s.は有意差なし。Δ8-OHdGは1.5 h値からbaseline値を減じたものである。

表4 各運動におけるTempone半減期の変化

exercise	baseline	0 h	1.5 h	significance	Δ半減期①	Δ半減期②
30EX	25.4 ± 3.8	23.8 ± 3.5	26.4 ± 4.4	n.s.	-1.6 ± 2.2	1.0 ± 2.4
60EX	25.9 ± 4.2	26.1 ± 4.9	28.2 ± 5.2	n.s.	0.2 ± 2.1	2.3 ± 3.6
90EX	26.2 ± 4.6	27.3 ± 6.4	29.0 ± 6.2	n.s.	1.1 ± 3.4	2.7 ± 3.5

Tempone半減期の単位はminである。有意性は各運動のbaseline, 0 hおよび1.5 hについての結果を表している。n.s.は有意差なし。Δ半減期①は0 h値からbaseline値を, Δ半減期②は1.5 h値からbaseline値を減じたものである。

### 6. ΣVO<sub>2</sub>と尿中8-OHdGレベル, Tempone半減期との関係

ΣVO<sub>2</sub>と尿中8-OHdGレベルの1.5 hの値, Δ8-OHdG について, Spearmanの順位相関係数を求めたところ, -0.163, -0.158および0.163といずれも低く, 有意性は認められなかった。図3 Aは, 3つの運動のΣVO<sub>2</sub> (X軸)とΔ8-OHdG (Y軸)の平均値をプロットしたものである。両者の回帰直線のx係数は正であり, ΣVO<sub>2</sub>が増加するとΔ8-OHdGも増加する傾向にはあった。

Tempone半減期についても同様に, 0 hと1.5 hの値, Δ半減期①およびΔ半減期②について, Spearmanの順位相関係数を求めたところ, 0.258, 0.206, 0.304および0.215といずれも有意差はなかった。図3 Bは, 3つの運動のΣVO<sub>2</sub> (X軸)とΔ半減期①, Δ半減期②の平均値をプロットしたものである。両者の回帰直線のx係数は正であり, ΣVO<sub>2</sub>が増加するとΔ半減期①, Δ半減期②とも増加する傾向にあった。

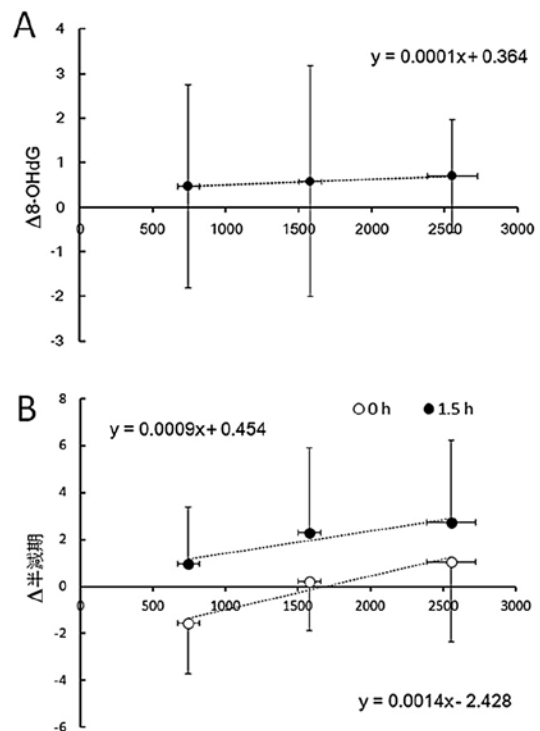


図3 各運動における総酸素摂取量 (ΣVO<sub>2</sub>) と Δ8-OHdG, Δ半減期の関係

上図 (A) はΔ8-OHdG, 下図 (B) はTemponeのΔ半減期 (○は半減期①を, ●は半減期②)。X軸はいずれもΣVO<sub>2</sub>を示す。

## 考 察

本研究では、運動強度が50%  $\dot{V}O_{2peak}$ である運動を30分間、60分間および90分間と被検者に3度実施させ、運動中の $\Sigma VO_2$ と運動前後に測定された尿中8-OHdGレベルと血清のTempone半減期を比較した。運動前後の血清中の酸化還元バランスをTempone（ナイトロオキサイド化合物）によってEPR法で評価したのは、本研究が初めてである。その結果、各運動では $\Sigma VO_2$ に大きな違い（図2）があるにもかかわらず、尿中8-OHdGレベルにおける1.5 h値と $\Delta 8\text{-OHdG}$ （表3）、Tempone半減期における0 hと1.5 hの値、 $\Delta$ 半減期①と $\Delta$ 半減期②に違いは認められなかった（表4）。以上のことから、50%  $\dot{V}O_{2peak}$ の有酸素運動において、 $\Sigma VO_2$ の多少は生体内の酸化ストレスや酸化還元バランスには影響を与えないことが明らかとなった。

このような結果をもたらした要因として、運動時のミトコンドリアROS生成に関しての変化が考えられる。本研究で用いた運動が中強度有酸素運動であったことから、EIOSが生じる場合はミトコンドリアでのROS生成がその主要因と推察される。ミトコンドリアは、細胞内の約9割の酸素を利用し（Boveris et al., 1972）、利用された酸素の数パーセントは電子伝達系で漏出した電子と反応し（Kunwar and Priyadarsini, 2011）、常にROSへと変化する（Boveris et al., 1973；Chance et al., 1979；Cadenas and Davies, 2000；Balaban et al., 2005）。このことから、運動で消費される酸素量が増加すればROS生成量も増加し、EIOSの原因となるだろう。しかしながら、ミトコンドリアは代謝レベルが低い安静時（State 3）に比較して、ADP濃度が高まったような運動時（State 4）ではROS生成が10分の1程度になるという報告がある（Chance et al., 1979）。このことは、運動によって酸素摂取量が10倍程度に増加してもROS生成量は安静時と差がないことを意味する。本研究では、安静時の体重当たりの酸素摂取量を3.5 ml/minとすれば、運動中は約8～9

倍の増加であり、いずれの運動においてもミトコンドリアからのROS生成量は安静時と変わらなかった可能性がある。

運動によりROS生成は高まったが、抗酸化能の向上により尿中8-OHdGレベルやTempone半減期が変化しなかった可能性もある。先行研究では運動により抗酸化能の向上が報告されている（Davison et al., 2006；長島, 2011）。尿酸も高い抗酸化能をもつ物質であるが（益崎ほか, 2013）、本研究では3種類の運動で運動後に血中尿酸値が増加することはなく、ROSなどのラジカル生成を緩衝する役割があると考えられている乳酸（Gohil et al., 1988）の値についても3つの運動で差はなかった（表3）。先行研究ではビタミンCの増加を報告している研究もあるが（Davison et al., 2006；長島, 2011）、これらの研究は自転車競技選手という高度に鍛練された者を被検者としており、運動時間も2.5～3時間と本研究に比較して継続時間が長い。仮に、血清のビタミンC濃度が増加したとしても、ビタミンCが抗酸化能に貢献する役割は0～24%程度との報告もあり（Wayner et al., 1987）、Tempone半減期への影響は大きくなかったと推察される。30～60分間の中強度有酸素運動後に採血された血液から血清を分離し、ROSに対する血清総抗酸化能をEPR法で評価した研究（木本ほか, 2010；木本ほか, 2015）では、血清総抗酸化能に変化は認められていない。以上のことから、本研究では抗酸化能の向上によりROSが消去され、EIOSが認められなかった可能性はなかったと思われる。

本研究は、50%  $\dot{V}O_{2peak}$ の有酸素運動では90分間まではEIOSが生じないことを認めた。しかしながら、図3において、各運動の $\Sigma VO_2$ と $\Delta 8\text{-OHdG}$ 、 $\Sigma VO_2$ と $\Delta$ 半減期①、 $\Delta$ 半減期②の関係をみると、両者の回帰直線のx係数は正であった。Spearmanの相関係数も低くしながら正であったことから、継続時間を90分以上に延長させることで、EIOSが生じる可能性もある。この可能性をもたらす要因として、運動時には深部体温の上昇がある（Brooks et al., 1971）。Flanagan et

al. (1998) は、運動時の高体温状態がROS生成の原因となることを報告している。温度上昇によってミトコンドリアの脱共役が進行し、それによって電子の漏出が増加してROS生成が高まるという知見もある (Salo et al., 1991)。一方で、体温上昇については、ROS生成を促進させるという報告に加え、抗酸化能を活性化させてEIOSを抑制するという報告 (斉藤ほか, 2005) や高温環境下で運動し体温上昇が顕著であってもEIOSは生じず、抗酸化能も変化しないという報告 (木本ほか, 2015) もある。このような研究間の不一致をもたらす原因は明らかではないが、今後、体温上昇とEIOSや抗酸化能との関係についてはより詳細な検討を行っていく必要があると思われる。

表3に示したように、60EXや90EXの運動後では血中の白血球数の増加が認められた。この増加は主に血管壁在プールに存在する好中球の移動による (鈴木ほか, 1995)。好中球には生体に侵入した異物を非特異的に食胞し殺菌するためにNADPHオキシダーゼ系が存在し、ROSを生成する。これがEIOS原因の1つと考えられている (Gomez-Cabrera et al., 2008; Sachdev and Davies, 2008)。血中の好中球数が高い状態が継続すれば、望まない状況や場所でのROS生成が生じる可能性があり、ミトコンドリアROS生成を主要因とはしないものの、図3の結果から推察される運動継続時間の延長によるEIOS惹起が懸念される。

先行研究では、最大酸素摂取量の50%の運動強度で有酸素運動を30分間 (Sen et al., 1994) および60分間 (Dillard et al., 1978) 実施した際、EIOSが認められたことが報告されている。本研究の結果との違いについては明らかにすることはできない。しかしながら、Sen et al. (1994) の研究の対象者 (全員男性、非喫煙者) は平均年齢が $30.0 \pm 1.7$ 歳であるにもかかわらず、体重当たりの最大酸素摂取量が平均で $26.3 \pm 3.1$  ml/min とかなり低い。このような低体力者と本研究の結果を比較するのは難しいかもしれない。また、Dillard et al. (1978) の研究では、対象者数が20

名であるが、60分間の運動を実施したのは4名であり、その内の2名は運動開始20分後から酸化物質であるオゾンを引きながら運動するという特殊な条件下であった。このため、本研究と同様な条件で運動を実施したのは2名と少なく、事例的な報告に留まっている (2名の体重当たりの最大酸素摂取量は49.2 ml/minと51.5 ml/minと本研究とほぼ同様)。以上のことから、これらの先行研究と本研究では実験条件などの違いにより、異なる結果となった可能性がある。また、いずれの先行研究とも脂質過酸化をEIOSの指標としており、用いた指標の違いも影響しているかもしれない。

最後に、本研究の限界と今後の展望について言及する。本研究ではEIOSの評価に尿中8-OHdGレベルを用いた。8-OHdGは、非侵襲的に酸化ストレスの変化を鋭敏かつ経時的に反映する指標として、広範に用いられている (中島ほか, 2005)。また、運動後1~2時間で排泄される最初の尿で評価するのが最も良いことも明らかになっている (神林ほか, 2015)。しかしながら、酸化ストレスを評価する指標は多く存在し、運動後の増加やその動態は指標によって異なり (塚本ほか, 2010)、研究目的に合わせた指標の選択 (McMurray et al., 2016) も指摘されていることから、今後は他の酸化ストレス指標を用いての検討を行う必要がある。また、酸化還元バランス指標として用いたTempone半減期については、運動前後のヒトの血清において初めて応用されたものであり、今後、データの蓄積が必要であると考えられる。本研究の結果を踏まえた展望として、今日のマラソンや超長距離走のブームを考慮すると、自転車漕ぎ運動ではなく、走運動での検討が必要であろう。走動作には酸化ストレスと関連が深い筋損傷を招きやすい伸長性筋収縮も含まれている。また、インターネットによる世論調査 (男性14500名、女性3368名が回答) によると、市民ランナーの平均完走時間は男性が3.5~4.5時間、女性が4~5時間であることから (RUNNET, 2017)、90分間を超え5時間程度までの継続時間での検討も必要であろう。

## 結 論

研究の結果から、健康で活動的な若年被検者の50%  $\dot{V}O_2$  peakに相当する中強度の有酸素運動を30分間、60分間および90分間実施して総酸素摂取量 ( $\Sigma VO_2$ ) を変化させても、尿中8-OHdGレベルやTempone半減期の結果から、運動誘発性酸化ストレス (EIOS) は惹起されないことが示唆された。

## 謝 辞

本研究の実施に当たり、ご協力を賜りました田中章裕氏と佐藤恒太氏 (元北海道教育大学岩見沢校スポーツ教育課程学生) に感謝致します。

## 参考文献

- Alessio, H.M. (1993) Exercise-induced oxidative stress. *Med.Sci.Sports Exerc.*, 25: 218-224.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. and Finkel, T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120: 483-495.
- Bobko, A.A., Kirilyuk, I.A., Grigor'ev, I.A., Zweier, J.L. and Kharamtsov, V.V. (2007) Reversible reduction of nitroxides to hydroxylamines: Roles for ascorbate and glutathione. *Free Radic. Biol. Med.*, 42: 404-412.
- Boveris, A. and Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem.J.*, 134: 707-716.
- Boveris, A., Nori, B.A., Perez, V. and Stoppani, A.O. (1972) The function of liver mitochondria after steroid administration. *Rev.Soc.Argent.Biol.*, 48: 73-83.
- Brooks, G.A., Hittelman, K.J., Faulkner, J.A., Beyer, R.E. (1971) Tissue temperatures and whole-animal oxygen consumption after exercise. *Am.J.Physiol.*, 221: 427-431.
- Cadenas, E. and Davies, K.J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic.Biol.Med.*, 9, 222-230. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00317-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8)
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol.Rev.*, 59: 527-605.
- Davies, K.J.A., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A. and Packer, L. (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem.Biophysic.Res. Commun.*, 107: 1198-1205.
- Davison, G. and Gleeson, M. (2006) The effect of 2 weeks vitamin C supplementation on immunoedocrine responses to 2.5 h cycling exercise in man. *Eur.J.Appl. Physiol.*, 97: 454-461.
- Dillard, C.J., Litov, R.E., Savin, W.M., Dumelin, E.E. and Tappel, A.L. (1978) Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J.Appl.Physiol.*, 45: 927-932.
- Flanagan, S.W., Moseley, P.L., and Buettner, G.R. (1998) Increase flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett.*, 431: 285-286.
- Fujii, H.G., Sato-Akaba, H., Emoto, M.C., Itoh, K., Ishihara, Y. and Hirata, H. (2013) Noninvasive mapping of the redox status in septic mouse by in vivo electron paramagnetic resonance imaging. *Magn. Reson.Med.*, 31: 130-138.
- Gohil, K., Viguie, C., Stanley, W.C., Brooks, G.A. and Packer, L. (1988) Blood glutathione oxidation during human exercise. *J.Appl.Physiol.*, 64: 115-119.
- Gomez-Cabrera, M.-C., Domenech, E. and Viña, J. (2008) Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic.Biol.Med.*, 44: 126-131.
- Ji, L.L., Fu, R.G. and Michell, E.W. (1992) Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: Effects of fiber type and exercise intensity. *J.Appl.Physiol.*, 73: 1854-1859.
- 神林勲・石村宣人・中村寛成・木本理可・内田英二・藤井博匡・武田秀勝 (2005) 運動によるDNA酸化損傷と

- 好中球スーパーオキシド生成能の関係. 北海道体育学研究, 40: 1-7.
- 神林勲・石村宣人・中村寛成・内田英二・武田秀勝・藤井博匡 (2004) 短時間の高強度間欠的運動は尿中8-OHdG含有量を増加させる. 日本運動生理学雑誌, 11: 61-67.
- 神林勲・木戸聡史・木本理可・日下部未来・内田英二・吉田貴彦・武田秀勝 (2009) 中高年者を対象とした一過性の中強度有酸素運動が酸化ストレスと抗酸化指標に与える影響—中高年者の中強度有酸素運動における酸化還元指標—. 北方産業衛生, 47: 11-19.
- 神林勲・塚本未来・木本理可・東郷将成・舩谷夕貴・石村宣人・内田英二・武田秀勝 (2015) 高強度間欠的運動時の運動パフォーマンスと酸化ストレスとの関連. 北海道体育学研究, 50: 43-51.
- 神林勲・沢村祥子・塚本未来・木本理可・東郷将成・内田英二 (2017) ナイトロオキサイドを用いたアトピー性皮膚炎モデルマウスにおける生体内酸化還元バランスの非侵襲的評価. 北海道教育大学紀要(自然科学編), 67(2): 35-42.
- 木本理可・神林勲・塚本未来・内田英二・東郷将成・武田秀勝 (2010) 一時的なビタミンC経口摂取が中高年者における中強度有酸素運動後の酸化還元状態に与える影響. 北海道体育学研究, 45: 11-18.
- 木本理可・神林勲・森田憲輝・塚本未来・阿部千春・高野みさと・藤井達也・室田千佳・内田英二・武田秀勝 (2012) 陸上競技選手における専門種目および性差が中強度運動時の運動誘発性酸化ストレスに与える影響. 北海道体育学研究, 47: 43-49.
- 木本理可・塚本未来・東郷将成・舩谷夕貴・内田英二・武田秀勝・神林勲 (2015) 中強度有酸素運動における温度条件の差異が運動誘発性酸化ストレスに与える影響. 北海道体育学研究, 50: 17-24.
- Kunwar, A. and Priyadarsini, K.I. (2011) Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J.Med.Allied.Sci.*, 1: 53-60.
- Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M. and Belcastro, A.N. (1987) Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur.J.Appl. Physiol.*, 56: 313-316.
- Margonis, K., Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Douroudos, I., Chatzinikolaou, A., Mitrakou, A., Mastorakos, G., Papassotiriou, I., Taxildaris, K., and Kouretas, D. (2007) Oxidativestress biomarkers responses to physical overtraining: implication for diagnosis. *Free Radic.Biol.Med.*, 43: 901-910.
- 益崎裕章・中山良朗・玉城泰太郎 (2013) 尿酸とメタボリックシンドローム. 成人病と生活習慣病, 43(8): 994-1000.
- Matsunaga, S., Inashima, S., Yamada, T., Watanabe, H., Hazama, T., and Wada, M. (2003) Oxidation of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase induced by high-intensity exercise. *Pflügers Arch.*, 446: 394-399.
- McMurray, F., Patten, D.A. and Harper, M.-A. (2016) Reactive oxygen species and oxidative stress in obesity – recent findings and empirical approaches. *Obesity*, 24: 2301-2310.
- Moopanar, T.R., and Allen, D.A. (2005) Reactive oxygen species reduce myofibrillar  $Ca^{2+}$  sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37°C. *J.Physiol. (Lond.)*, 564-189-199.
- Morillas-Ruiz, J., Zafrilla, P., Almar, M., Cuevas, M.J., López, F.J., Abellán, P., Villegas, J.A. and González-Gallego, J. (2005) 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.*, 95: 543-549.
- Muñoz Marín, D., Olcina, G., Timón, R., Robles, M.C., Caballero, M.J., Maynar, M. (2010) Effect of different exercise intensities on oxidative stress markers and antioxidant response in trained cyclists. *J.Sports Med. Phys.Fitness*, 50: 93-98.
- 長島未央子 (2011) 長時間自転車運動が鍛錬者の酸化ストレス度及び血中ビタミン濃度におよぼす影響. 体力科学, 60: 279-286.
- 中島早苗・韓一榮・蒲原聖可・中野優・大野誠 (2005) 一過性運動負荷による尿中8-OHdG排泄量の変動. 慈恵会大誌, 120: 153-159.
- Reid, M.B. (2001) Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle: redox modulation of skeletal muscle

- contraction: what we know and what we don't. *J. Appl. Physiol.*, 90: 724-731.
- RUNNET (2017) ランナー世論調査2017結果 <http://runnet.jp/project/enquete/2017/> (最終参照日: 2017年8月20日)
- Sachdev, S. and Davies, K.J.A. (2008) Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic. Biol. Med.*, 44: 215-223.
- 齋藤益世・田中英登・原川早織・須田和裕 (2005) 生体内DNA酸化的損傷 (尿中8-OHdG排泄量) に及ぼす一過性運動負荷時における環境温度の影響. *日本運動生理学雑誌*, 12: 85-93.
- Salo, D.C., Donovan, C.M., Davies, K.J.A. (1991) HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic. Biol. Med.*, 11: 239-246.
- Saltin, B. and Hermansen, L. (1966) Esophageal, rectal, and muscle temperature during exercise. *J. Appl. Physiol.*, 6: 1757-1762.
- Sen, C.K., Rankinen, T., Väisänen, S. and Rauramaa, R. (1994) Oxidative stress after human exercise: effect of N-acetylcysteine supplementation. *J. Appl. Physiol.*, 76: 2570-2577.
- 鈴木克彦・長沼慎二・望月充邦・白石正彦・中路重之・菅原和夫・戸塚学・佐藤光毅 (1995) 異なる持久性運動条件による血中白血球の数的・構成的パターンの比較. *日本衛生学雑誌*, 50: 631-636.
- 塚本 (日下部) 未来・神林勲・北館健太郎・飯嶋孝行・木本理可・武田秀勝 (2010) 低分子化ポリフェノールの摂取が高強度間欠的運動時の酸化ストレスおよび血清総抗酸化能に与える影響. *北海道体育学研究*, 45: 1-9.
- Venditti, P., Masullo, P. and Meo, S. (1999) Effect of training on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by mitochondria from rat skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 372: 315-320.
- Vøllestad, N.K. and Blom, P.C. (1985) Effect of varying exercise intensity on glycogen depletion in human muscle fibres. *Acta Physiol. Scand.*, 125: 395-405.
- Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Barclay, L.R. and Locke, S.J. (1987) The relative contribution of vitamin E, urate, ascorbate, and proteins to peroxy radical-trapping antioxidant activity of human plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, 924: 408-419.

神林 勲 (札幌校教授)

木本 理可 (藤女子大学准教授)

塚本 未来 (東海大学講師)

東郷 将成 (旭川大学短期大学部准教授)

秋月 茜 (拓殖大学北海道短期大学助教)

内田 英二 (大正大学教授)

