

運動と酸化ストレスと健康

増田 和実・田辺 解・久野 譜也

Exercise, Oxidative Stress and Health Benefit

MASUDA Kazumi, TANABE Kai, KUNO Shin-ya

The health benefits of regular exercise are well documented in a large number of reports. Moderate exercise can result in greater health benefits than vigorous exercise, since intense activity may generate free radicals. This is evidenced by increases in effects such as lipid peroxidation, glutathione oxidation, and oxidative protein damage. It is also known that cytosolic enzyme activity in blood plasma tends to increase after vigorous exercise. These can be regarded as an indirect sign of muscle cell damage. During exercise, increased aerobic metabolism is a potential source of free radicals (oxidative stress) in mitochondria. In muscle cells, mitochondria are one important source of reactive intermediates that include superoxides, hydrogen peroxide, and possibly hydroxyl radicals. Unfortunately, because research focusing on oxidative stress and antioxidants following exercise has up to now been narrow in scope, the mechanism linking oxidative stress and antioxidants in muscle tissue during exercise, is not fully understood. Knowledge of the mechanism of free radical formation during exercise will be useful and may lead to the prevention of oxidative stress and damage associated with physical activity. Recent progress in electronics has made it possible, using electron spin resonance (ESR) and a spin-trapping technique, to determine and quantify the reactive oxygen species involved in chemical reactions. Biological applications of ESR include detecting the production of free radicals and radical scavenging activity in living specimens. This review paper provides a brief account of how exercise leads to oxidative stress and the link with antioxidants, and suggests future paths of research.

Key words: electron spin resonance, exercise, free radical, health, oxidative stress, review

1. はじめに

「運動は健康に良い」ということで、老若男女問わず心身の健康づくりを目的とした運動やスポーツが盛んに行われるようになってきている。また、近年加速化する日本の少子高齢化社会は、益々、国民の健康づくりへの関心を掻き立たせているようにも感じられる。

適度な運動は生活習慣病をはじめとする様々な疾患を予防し、生活の活動レベルや生活の質を向上させる。これに対して、過度の運動は健康を損なわせ、障害をもたらすことにより、身体を壊す原因となることもある。さらには運動そのものが身体に悪いと警告を発する人もいる。その理由の一つとしてしばしば「活性酸素」が挙げられる。

ヒトをはじめとする多くの好気性生物は、酸素

を生命維持に必要な不可欠なものとして進化してきた。通常、酸素は体内に取り込まれた後、ミトコンドリア内のエネルギー（ATP）産生系で利用される。しかしながら、酸素が生命維持に必要なATP産生に利用される過程において、数%の酸素が活性酸素に変化してしまう。この活性酸素は大気中に存在する安定な酸素と比べて反応性が非常に高いため、生体内で過剰な状態になると、生体組織の損傷を引き越す。酸素中毒による急性の硬直性全身痙攣（ポールベール効果）や未熟児網膜症、虚血 - 再灌流障害が目されるまで、酸素の毒性への認識は深くなかった。近年では、活性酸素による組織の損傷は、癌、炎症、動脈硬化など様々な疾患を発生・促進させると言われ、さらには、活性酸素傷害の蓄積が加齢に伴う老化現象の

原因とする説もある (Fig. 1)^{7, 17, 20, 28)}。

運動時には酸素摂取量が通常の10～15倍に達し、活動筋組織への酸素流量は安静時の約100倍に達する²⁵⁾ことから、活性酸素の発生量は高まると容易に想像できる。したがって、運動に伴って発生した活性酸素によって生体組織が損傷されやすくなると考えても間違いではないかもしれない。しかしながら、活性酸素発生量の増加と平行して組織の損傷が増えるかという点、そうではない。それは、長い進化の過程において、生体は常に発生する活性酸素を消去・不活性化し、組織への傷害を最小限に抑える機構を獲得してきたためである。活性酸素の生成系とこれに対する防御系のバランスが崩れた場合、すなわち、防御系の許容範囲を生成量が上回った場合に組織の損傷(いわゆる酸化ストレス)が生じると解釈すべきである。では、どのような状況で、あるいはどの程度の運動によってこれらのバランスが崩れるのか? このことは、運動の功罪を考える上で重要な研究課題の一つであり、運動やスポーツを実施、あるいは推奨している人々にとっても非常に気になる話題である。本稿では運動と活性酸素についての研究報告を中心に、加齢や運動の影響について解説するとともに、今後の研究の方向性についても概説したい。

2. 活性酸素の種類

分子内に不対電子をもって不安定な状態にあるものをラジカルと総称し、中でも酸素原子を持つものを活性酸素(あるいは活性酸素種, reactive oxygen species: ROS)と呼ぶ。ROSとは一般的に、スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル(HO^{\cdot})、一重項酸素(1O_2 : 1g と $^1g^+$ を含む)の4種類を指す。表1に主なROSを示した。ROSの反応によって高度不飽和脂肪酸から生じる ROO^{\cdot} 、 $ROOH$ や食細胞においてROSから作られる殺菌物質の次亜塩素酸イオン(ClO^{\cdot})、クロロアミン($RNHCl$)、さらには情報伝達物質として注目を浴びている一酸化窒素(NO)や NO と $O_2^{\cdot-}$ の反応によって生じるペルオキシ亜硝酸イオン($ONOO^{\cdot}$)などの活性酸素種もROSに含まれる。ROSは通常の酸素より反応性が高いと述べたが、ROSによってそれぞれ反応性が異なる (Table 1)。 HO^{\cdot} の反応性は極めて高いものの、その高い反応性故にその寿命は短く、発生部位から離れた標的分子までは到達せずに、発生箇所の組織を損傷させる。 $O_2^{\cdot-}$ は、それ自身の反応性は高くないので、直接的に脂質や核酸などの生体内物質と反応することはあまりない。しかしながら、生体内で生じるROSの多くは $O_2^{\cdot-}$ 由来であるため、ROSのイニシエータとして重要である。 H_2O_2 は反応性が低く、触媒がない状態であれば、寿命はほぼ無限であるといえる。

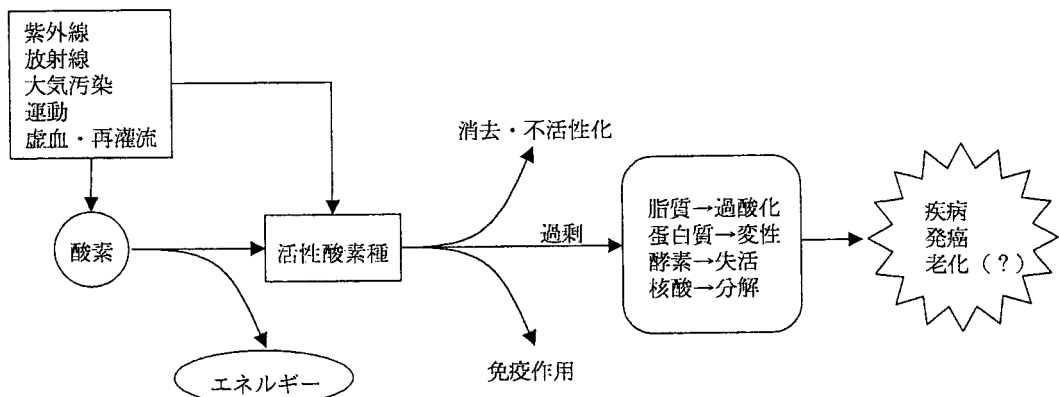


Fig 1. 活性酸素種による生体組織の傷害

体内に取り込まれた酸素の数%は活性酸素となる。生成した活性酸素は、抗酸化防御系によって消去・不活性化されるか、もしくは生体の免疫作用の過程で利用される。組織内で活性酸素が過剰になると、脂質、蛋白質、核酸などの生体組織が損傷を受け、疾病や発癌の原因となる。また、加齢に伴う老化現象に、活性酸素による組織損傷の蓄積が関与しているという説もある。

さらに、生体の膜透過性が高く、大きな拡散作用を持つため、細胞外で発生しても細胞内に入り、 Fe^{2+} や Cu^{+} と反応（フェントン反応）して反応性の高い HO^{\cdot} を生じる。イニシエータである $O_2^{\cdot-}$ のほとんどが速やかに H_2O_2 に変換されるため、細胞内の傷害をもたらす原因となると考えられる。 NO は、反応性の高い疎水性、揮発性のガスである。これより大きな拡散作用を持つことから、血管拡張作用をはじめとする生体内の多くの生理作用において情報伝達物質として関与していると考えられている。また、 $O_2^{\cdot-}$ との反応により生じる $ONOO^{\cdot-}$ は、反応性が非常に高く、細胞内組織傷害を引き起こすといわれている。

Table 1. 主な活性酸素種の種類と寿命

化学式	名称	反応性	寿命
1O_2	一重項酸素	高い	非常に短い (μsec)
$O_2^{\cdot-}$	スーパーオキシド	低い	短い (msec~sec)
H_2O_2	過酸化水素	低い	非常に長い
HO^{\cdot}	ヒドロキシルラジカル	非常に高い	非常に短い (nsec~ μsec)
HO_2^{\cdot}	ヒドロペルオキシラジカル	高い	
$ROOH$	アルキルヒドロペルオキシド	低い	
ROO^{\cdot}	アルキルペルオキシラジカル	高い	
RO	アルキルラジカル	高い	
R^{\cdot}	アルキルラジカル	高い	
ClO^{\cdot}	次亜塩素酸イオン		
$RNHCl$	N-クロロアミン		
RS	チールラジカル	非常に高い	短い
Fe_4^+O	フェリルイオン		
NO	一酸化窒素	低い	短い (約6秒)
$ONOO^{\cdot-}$	ペルオキシ亜硝酸イオン	非常に高い	非常に短い

3. 活性酸素の生成過程

日常生活においてもROSは常に発生している。ここでは、各細胞小器官および細胞レベルでのROS生成過程を簡単に示す。

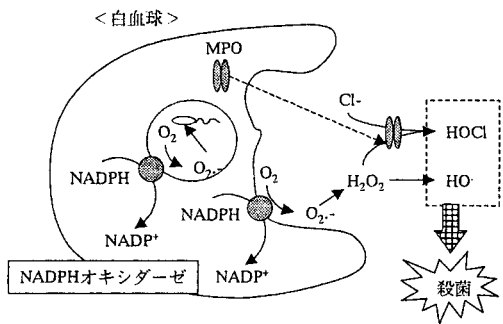
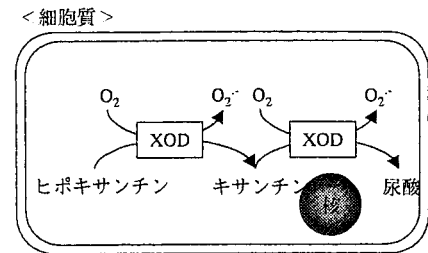
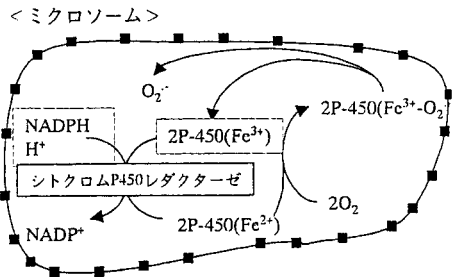
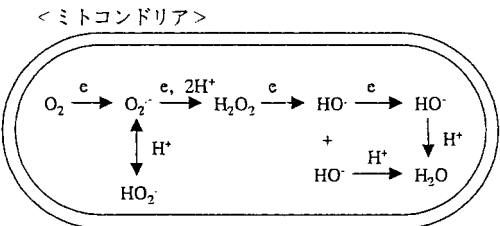


Fig 2. 活性酸素の生成部位と生成過程
ミトコンドリアでは電子伝達系、細胞質ではキサンチンオキシダーゼ系、ミクロソームではNADPH-シトクロムP450レダクターゼおよびシトクロムP450系、白血球ではNADPHオキシダーゼ系でスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) が生成される。

1) ミトコンドリア

ミトコンドリアは、細胞における酸素消費の90%以上を占める器官である³⁾。酸素分子は、電子伝達系の終末酵素において4電子還元されて水になるが、この過程の複合体IのNADH \cdot ユビキノールオキシドレダクターゼと複合体IIIのユビキノールシトクロムcオキシドレダクターゼのステップで1電子の逸脱があり $O_2^{\cdot-}$ が生じる。生成された $O_2^{\cdot-}$ は、ミトコンドリア内膜に存在するMn-SOD（スーパーオキシドジスムターゼ: SODの一つ）により速やかに H_2O_2 へ変換される。激運動時の

ように組織内の酸素濃度が急激に増加し、消去系以上にROS生成が過剰になった場合は、脂質膜¹⁸⁾、マトリクス酵素¹⁶⁾およびミトコンドリアDNA⁸⁾などが傷害を受ける可能性がある。

2) ミクロソーム

ミクロソームは小胞体を主として形質膜やゴルジ体などを含む器官である。ミクロソーム内の電子伝達系では、NADPH-シトクロムP450レダクターゼおよびシトクロムP450のステップで $O_2^{\cdot-}$ が生成される。膜外に放出された $O_2^{\cdot-}$ は細胞質の抗酸化防御系により不活性化されるものの、ミクロソーム膜にはSODとGPxといった抗酸化酵素が存在しないため、膜内の $O_2^{\cdot-}$ は鉄イオンと反応して反応性の高い HO^{\cdot} を生じる可能性がある。

3) 細胞質

細胞質では、xanthine oxidaseによって $O_2^{\cdot-}$ もしくは H_2O_2 が生成される。xanthine oxidaseは、酸素分子を電子受容体としてhypoxanthineやxanthineを尿酸へ酸化させる酵素である。激運動時や虚血-再灌流時には、基質であるヒポキサンチンと酵素のxanthine oxidaseが増加して活性酸素の生成が高まる²⁷⁾。生じたROSは、細胞質内に豊富に存在する抗酸化酵素(Cu, Zn-SODやGPx)によって消去される。

4) 白血球

好中球やマクロファージなどの炎症細胞や好酸球が生体に侵入した微生物をROSによって食し、殺す機能、すなわち、貪食/殺菌反応は生体防御機構として非常に重要であるが、ROSは、微生物だけではなく非特異的に反応してしまうため、場合によっては組織に対して損傷を与える可能性がある。運動はNADPHオキシダーゼ系からのROS生成を増大させるため、炎症部位を中心とした組織の傷害を引き起こす可能性がある。

4. 活性酸素を消去する機構

前段のように、生体内ではROSが常に発生しているにも関わらず、人間は何十年も生き続けることができる。これは、生体内に巧妙な抗酸化機構を備えているためである。Fig. 3に主要なROS生成系と抗酸化機構を示した。抗酸化機構において重要なのは、組織傷害性を持つ極めて反応性の高いROS(HO^{\cdot} , RO^{\cdot} など)の生成を防ぐことである。 HO^{\cdot} , RO^{\cdot} などのイニシエータである $O_2^{\cdot-}$ は、SODにより H_2O_2 に変換され、次いでグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)もしくはカタラーゼ(CAT)のような抗酸化酵素によって H_2O や O_2 に無毒化される。それでもなおROSが無毒化されな

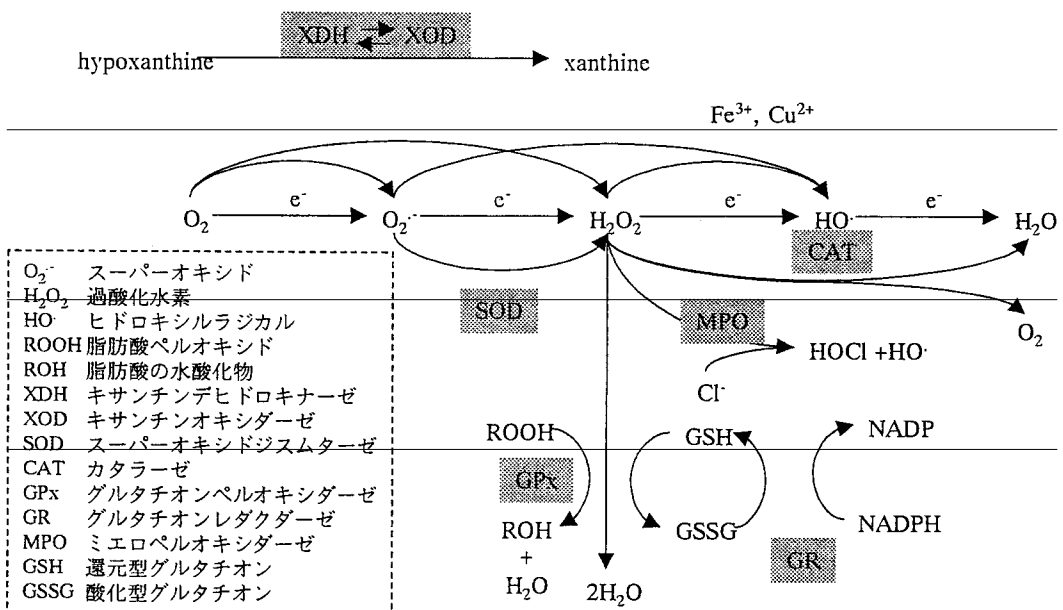


Fig. 3. 活性酸素の生成と抗酸化防御機構

生成された活性酸素は、生体内の種々の抗酸化酵素もしくは抗酸化物質によって消去される。

い場合には、グルタチオン (GSH)、ビタミン C、ビタミン E などといった抗酸化物質が、ROS を捕捉する。これらの防御過程にも関わらず、生体分子が損傷を受けた場合、続く被害を最小限に食い止めるような抗酸化物質が作用する。例えば、細胞膜の脂質が酸化損傷を受けて生成する脂質ヒドロペルオキシド (LOOH) は、さらに活性の高い脂質アルコキシラジカル ($LO\cdot$) や脂質ペルオキシラジカル ($LOO\cdot$) となる可能性がある。生体はこのような場合、酵素 (ホスホリパーゼ A2) でこれを切り離し、膜の損傷の広がりを防ぐ一方で、種々の抗酸化酵素で LOOH を無毒化する。このように、連続して起こるラジカル反応を抑止したり、損傷部位の修復、再生に関わる物質も広義の抗酸化機構といえる。このように、生体内には連続的に生成される ROS に対して何重もの抗酸化機構が作用し、ROS による組織傷害は最小限に抑えられている。さらに、ROS の生成量に応じて必要な量、必要な時間、必要な場所にだけ抗酸化物質/酵素を作用させるように巧みなコントロールがなされている。

5. 加齢に伴う活性酸素発生と消去機構の変化

加齢に伴う生体機能の低下、いわゆる老化現象が、長年にわたる ROS の生成とそれによる生体傷害の蓄積によって引き起こされるという「ROS の老化原因説」を発端として、老化と ROS の関係に注目した研究が多くなされてきた。哺乳類において、ミトコンドリアでの $O_2\cdot^-$ 生成速度が高いほど種の最長寿命が長い¹³⁾、SOD 活性が高いほど最長寿命が長い²⁹⁾、DNA の酸化修飾物である 8-OHdG がラットの加齢に伴って増加する⁷⁾ などの結果をみると、老化と ROS の間には、何らかの生物学的関係がありそうである。しかしながら、ROS の生成や傷害の蓄積がどのようなメカニズムで生体の加齢変化に影響を与えているかについては、未だ明らかになっていない。そこでここでは、ROS の生成や組織の損傷が加齢によってどのように変化するのかについてまとめた。

この酸化ストレスマーカーと加齢の関係を示した研究の多くは、加齢によって酸化ストレスが増大することを報告している。ヒト全杯由来の培養細胞²⁸⁾、ラットの臓器¹⁷⁾、ヒト血清²⁰⁾ において、加齢 (あるいは培養期間) に伴って過酸化脂質が増加する。その他、ラットの肝、腎、小腸な

どの臓器中において、8-OHdG (酸化的 DNA 損傷の指標) が、加齢によって増加することも報告されている⁷⁾。抗酸化系の加齢による変化は、必ずしも一様でなく、抗酸化物質の種類や各臓器によって異なる。ラット臓器の抗酸化酵素の加齢変化を Fig. 4 に示した¹¹⁾。酸素消費の最も多い骨格筋では、加齢に伴いタンパク量が低下したのに対して、全ての抗酸化酵素活性が増加した。さらに、細胞内の過酸化脂質も増加する¹⁰⁾ ことから、骨格筋細胞内では加齢とともに ROS の産生が高まる可能性が示唆されている。心臓においては、細胞質内に局在する抗酸化酵素 (Cu, Zn-

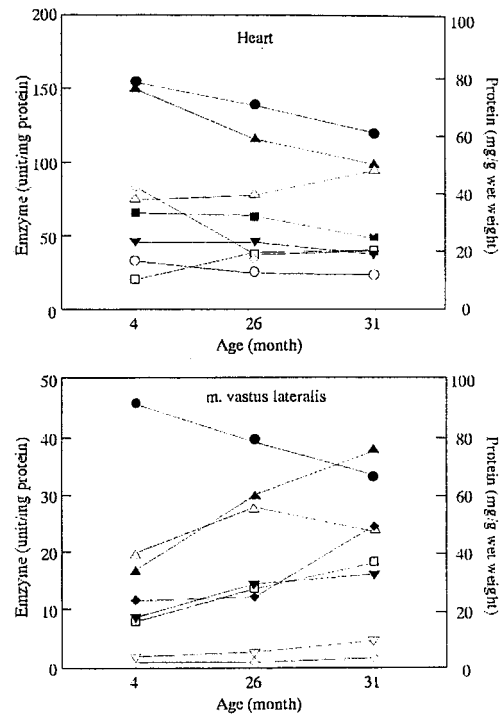


Fig. 4. ラットの (A) 心臓、(B) 骨格筋における抗酸化酵素活性の加齢変化 (Ji et al. 1993)

臓器によって異なるものの、ラットの加齢に伴い抗酸化酵素活性は低下する傾向にあった。● : Cu, Zn-SOD (細胞質内), ▲ : Mn-SOD (ミトコンドリア内), ▼ : カタラーゼ, ○ : 細胞質 GPx, □ : ミトコンドリア GPx, △ : グルタチオンレダクターゼ, ◇ : グルタチオン S-トランスフェラーゼ (細胞質内), × : グルコース 6-リン酸脱水素酵素, ○ : 組織タンパク量, ○ : ミトコンドリアタンパク量

SOD, cytosolic GPx, GSH-S-transferase) 活性は全て加齢とともに低下したものの、ミトコンドリア内に局在する抗酸化酵素 (Mn-SOD, Mt-GPx) 活性は増加した (Fig. 4)。これはミトコンドリアの酸化能力が低下したことによる適応であると考えられる。一般的に、加齢に伴いタンパク質の代謝や細胞新生能力が低下し、次いで抗酸化酵素活性も低下すると考えられる。したがって、加齢によってROSの生成が抗酸化防御能を上回り、組織での酸化ストレスが増大すると思われる。

6. 活性酸素と運動の関係

運動時には組織への酸素流量が安静時の約100倍に達する²⁶⁾。ROSの直接測定が可能な電子スピン共鳴法 (ESR) を用いて運動直後のラット骨格筋組織における活性酸素シグナルを観察したところ、シグナルの増加が確認された (Fig. 5)⁴⁾ ことから、確かに運動を行うことによって、ROSが安静時以上に生成されていることが確認されている。また、Jacksonら⁹⁾は、ラットの下肢筋に電気刺激を加え、筋収縮させたところ、ROSのシグナルが70%増大したことを報告した。では、どのような運動が活性酸素生成あるいは酸化ストレスを増大させるのだろうか。さらに、これに対する防

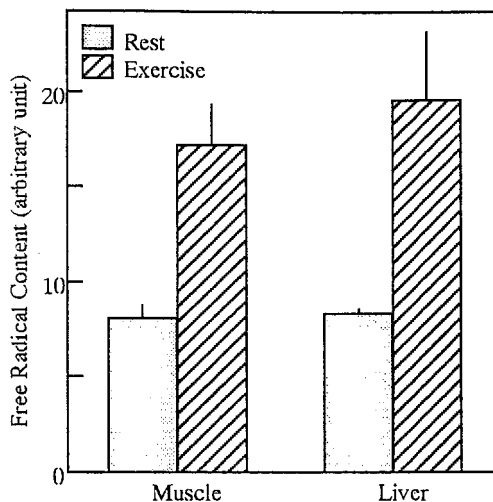


Fig. 5. 疲労困憊運動後のラット骨格筋と肝臓におけるESRシグナル (Davies et al. 1982) 一過性の持久性疲労困憊運動により、ラットの骨格筋 (右図) と肝臓 (左図) におけるフリーラジカルのESRシグナルが増大した。灰色が安静時、斜線が運動後を表している。

御機構はどう変化するのであろうか。運動の種類、強度を考慮してレビューする。

1) 運動の種類

Marazaticoら¹⁵⁾は、一過性の持久的運動およびスプリント後に生じる酸化ストレスと抗酸化能力について検討した。よく鍛練された長距離ランナーにハーフマラソンを行わせ、その後の血漿MDA (マロンジアルデヒド: 過酸化脂質の一種) を測定したところ、安静時と比較して運動直後に増加し、運動6時間後には安静レベルに戻り、24~48時間後には有意に低下した。さらに、抗酸化能力については、運動直後にSODが27%増加し、CATは運動24~48時間後に増加し、GPxは変化しなかった。これに対して、短距離スプリンターに150 mスプリント走を6セット実施させたところ、安静時に比べて運動6時間後にMDAが増加し、12~48時間後まで増加し続けた。SODとGPxは運動直後に30%増加したが、CATの変化は認められなかった¹⁵⁾。これらの結果は、運動の種類によってROSの発生度とその影響度が異なることを示唆している。

また、筋力トレーニングや下り坂歩行 (走行) 時などでの伸張性筋収縮は、筋の微細構造の損傷を引き起こし易い¹²⁾。伸張性筋収縮運動の数日後にCK活性がピークに達し、また、マクロファージの浸潤を伴った筋線維の変性が組織学的に観察される¹²⁾。このような炎症細胞の働きの強まりは、ROSの生成や酸化ストレスを促進させる。

2) 運動強度

酸化ストレスには、運動の強度が強く影響を及ぼすと考えられている。運動強度に依存してROSの生成および酸化ストレスが増大することが示唆されている。非鍛練男性に最大負荷運動および、最大下負荷運動 (有酸素性閾値 (AeT) と無酸素性閾値 (AnaerT)) を30分間行わせたところ、運動強度に依存して (AnaerT>max>AeT)、運動後にGSSG/TGSH比 (酸化ストレスの指標) が高まった (Fig. 6)²⁵⁾。漸増負荷運動中に酸化ストレスマーカーである呼気中のエタンを連続的に測定した実験では、乳酸閾値強度で呼気中のエタンが上昇し、さらにVO₂max強度で上昇した。回復5分後も安静時レベルより高い値にあった¹⁴⁾。また、Satoら²⁴⁾は、ヒト好中球におけるROS生成 (OCI) と運動強度の関係を検討した。50%VO₂max強度

90分間の運動では $OC1^-$ 生成が認められなかったが、55% $\dot{V}O_2max$ 強度90分間の運動においては運動終了直後から3時間後まで有意な上昇を示したこと²⁴⁾から、好中球では運動強度に依存してROS産生が顕在化することが推測される。

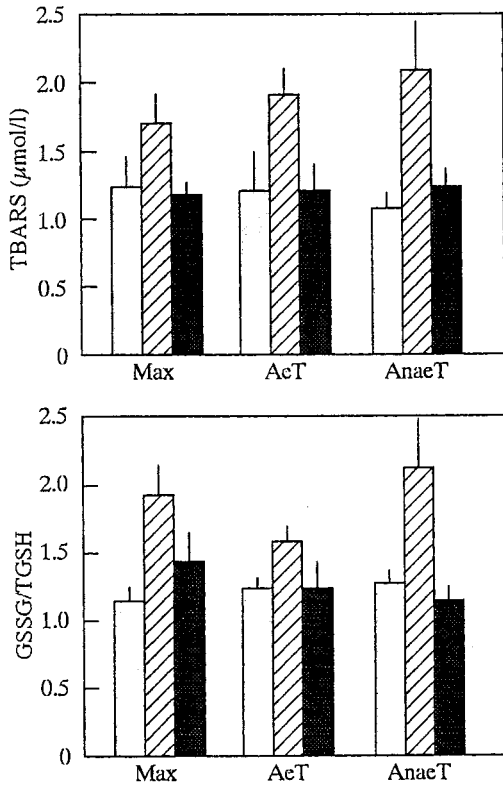


Fig. 6. 運動強度と酸化ストレスの関係 (Sen et al. 1994) 酸化ストレスの指標である血漿過酸化脂質 (TBARS) および酸化型グルタチオン (GSSG) と総グルタチオン (TGSH) の比 (GSSG/TGSH) は、安静時レベル (白抜) に比べて、各強度の運動2分後 (斜線) に増加し、運動24時間後 (黒塗) で安静時レベルに回復した。GSSG/TGSH比に関しては、運動強度 (有酸素性閾値 (AeT) > 最大負荷 (Max) > 無酸素性閾値 (AnaEt)) に依存して運動2分後の酸化ストレスが高まる傾向にあった。

7. 活性酸素生成量と消去系に対する運動トレーニングの影響

トレーニングがラットのヒラメ筋におけるSOD活性に及ぼす影響をFig. 7に示した。一日当たり

のトレーニング時間に比例してSOD活性が高くなったが、運動強度への依存性は観察されなかった^{22, 23)}。高強度の有酸素トレーニングの継続により、安静時のMDAとSOD、GPx, CATといった抗酸化酵素活性がコントロールに比して高くなることが報告されている。スプリントトレーニングでは、安静時のMDAおよびSOD、GPxが高くなる¹⁵⁾。しかしながら、CATレベルは一般人や有酸素トレーニングを行っている人と比べて低く¹⁵⁾、酸化ストレスにさらされやすいかも知れない。トレーニングは、その強度、頻度、時間などによって生体内のDNA損傷を促進させたり、抑制したりする。よく鍛練された長距離ランナーに、漸増負荷トレッドミルランニングを疲労困憊まで実施させたところ、運動直後のMDA値に変化はなかったが、白血球のDNA損傷程度は増加した。しかしながら、鍛練者においては、運動後の白血球DNA損傷の増加率が低いことが報告されている¹⁹⁾。また、30日間の軍隊訓練 (8~10時間/日) 終了後における尿中の8-OHGua (DNAの酸化的損傷指標) 排泄量が有意に増加したとの報告もある²¹⁾。さらに、動物実験では、臓器 (肝、肺、心臓) の8-OHGua量は、強制運動を行わせると臓器 (肝、肺、心臓) の8-OHGua量が高くなり、自発運動では低いという結果が報告されている

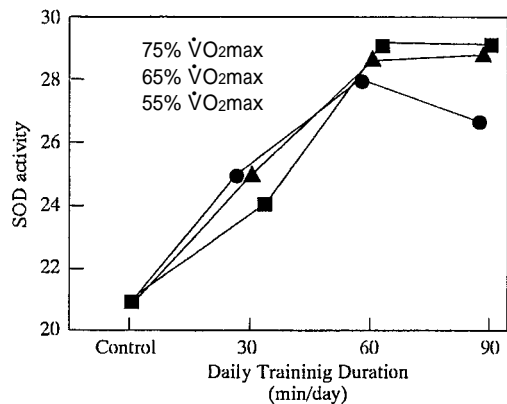


Fig. 7. トレーニング時間および強度とSOD活性の関係 (Powers et al. 1994)

種々の運動時間 (0, 30, 60, 90分/日) と運動強度 (55%, 65%, 75% $\dot{V}O_2max$) で、それぞれ10週間トレーニングさせたラットの骨格筋 (soleus) 中のSOD活性を比較すると、運動強度よりもトレーニング時間に依存してSOD活性が高くなった。

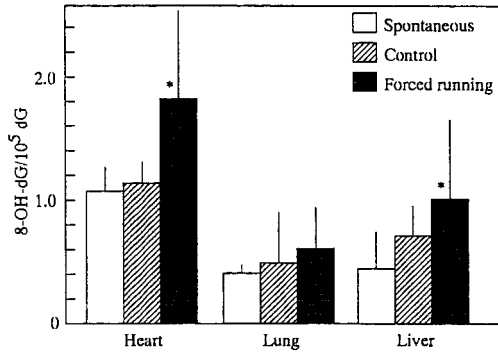


Fig 8. 自発的活動と酸化的DNA損傷 (Asami et al. 1998)

ラットを自発的に運動させる群 (白抜き)、強制的に運動させる群 (斜線)、コントロール群 (黒塗り) に分け、5週間後の各臓器における8-OHdG (DNAの損傷程度を示す指標) レベルを調べたところ、強制運動群に比べ自発的運動群の8-OHdGレベルが有意に低かった。

(Fig. 8)²⁾。我々の研究室でもミトコンドリアDNAの変異が自発走では生じないことを確認している (未発表データ)。これらのことは、個々に応じた適度な運動を自発的に行うことは、生体に悪影響を及ぼさない可能性がある。

8. 活性酸素 (酸化ストレス) に関するアプローチ

活性酸素生成系が消去系を上回り、バランスが崩れた状態を酸化ストレスという。ROSを研究する上で、ROSそのものを直接、観察し、それを定量化することは多くの研究者が望んでいることと思う。

現在、ROSを検出する方法と言えば、ESRの他ならない。ただし、物質のラジカルを検出する装置として利用されてきたESRと言えども、生体内で発生しているROSをリアルタイムに観察することは、未だに開発段階である。その困難さの為、多くの研究は、過酸化脂質、xanthine oxidase、8-OHdG、SOD、GSH (酸化/還元型) などの間接的な酸化ストレスの指標を測定する方法をとり、酸化ストレス状態を推測している。したがって、運動を行うことで発生するROSが、生体に悪影響を及ぼしているのか否かについての直接的な証拠はない。

ラジカルを検出する方法としては、スピントラップ剤の利用が考えられる。スピントラップ剤

は、短寿命のラジカルを一時的に捕まえ、化合物化して、その寿命を延長させるものである。

ESRとスピントラップ剤の併用^{5, 6)}によって、以下の利点が得られる。

- ・サンプルが微量
- ・ラジカルの選択性や定量性がある
- ・検体の色 (分光光度) に左右されない

我々の研究室では、これらの優れた点を利用して、検体 (特に筋) のラジカル消去活性 (radical scavenging activity) を定量測定しようと考えている。

Fig. 9は、xanthine oxidaseによってhypoxanthineがxanthine、さらに尿酸へ酸化される際に生じるO₂^{•-}をDMPO (5, 5-Dimethyl-1-Pyrroline-N-Oxide)¹⁾でスピントラップしたときの (DMPO-OOHの) ESRスペクトルである。さらに、異なる濃度のSODを試薬内に入れ、DMPOとSODの競争反応を起こさせると、SODの濃度が高いほど、DMPO-OOHのシグナル強度が小さくなることを示している (すなわち、SODによってO₂^{•-}が消去された事を意味する)。

この手法は、直接的に生体内のラジカルを検出したり、あるいはその減衰量 (消去量) を測定するものではないけれども、生体に備えている活性酸素耐性に関わる生理的パラメータとして注目したい。また、これまでに報告されているような、生化学的な分析データをESRによるradical scavenging activityの説明因子にしなから、抗酸化機構の段階的な研究が可能になると考えている。

9. これまでの研究の限界と今後

Lancet誌³⁰⁾に掲載された疫学調査の結果は、運動習慣がヒトの寿命に積極的に関わる可能性を示唆している (Fig. 10)。運動は間違いなく、健康増進に貢献してくれるのである。しかしながら、運動を行う上でROSの発生は避けられない。ROSとうまくつきあう策が必要なのである。

これまでに紹介したように、これまでの多くの研究では、ROSによる酸化物 (副産物) を測定することによって、間接的に生体の酸化ストレスの状況を推定するに過ぎなかった。特にヒトの場合においては、ROSの発生源である筋組織の分析報告は少ないため、運動に伴って発生するROSが生体に悪影響を及ぼしているのか否かについての明確な回答はできていない。また、運動の強度、時

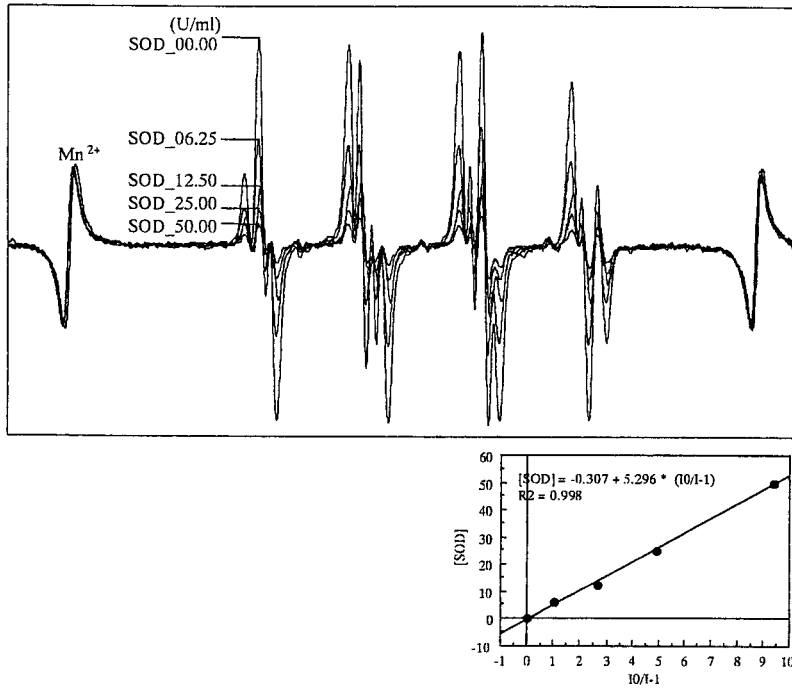


Fig 9. 電子スピン共鳴法 (ESR) とスピントラップ剤 (DMPO) によるラジカル消去活性の評価 (増田, 未発表資料)
 Xanthine oxidaseによってhypoxanthineからxanthineへ酸化する際に発生した $O_2^{\cdot -}$ をDMPO (5, 5-Diemtyl-1-Pyrroline-N-Oxide) でスピントラップし、異なる濃度のsuper oxide dismtase (SOD) でラジカルを消去させたスペクトル (上) と検量線化した図 (右)。SODの濃度が高いほど、DMPOでAdduct (DMPO-OOH) されたラジカルのシグナル強度が小さくなる。

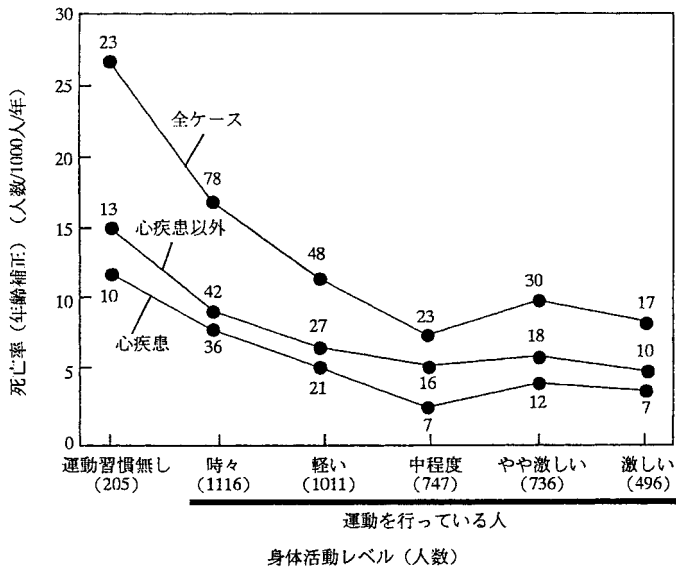


Fig 10. 寿命に及ぼす運動習慣の影響 (Wannamethee et al. 1998)
 中程度以上の運動を継続している人の死亡率は運動習慣の無い人よりも低い。

間、様式などの諸条件を規定している研究結果は極めて少ない。したがって、今後は運動と酸化ストレス、そして、酸化ストレスと抗酸化システムの関係の直接的な証拠を見い出すことが必要であり、その為の手法の開発やマーカーの特定など、クリアして行かなければならない課題が多く残されているように思える。我々の研究室では、ESRを用いてradical scavenging activityを測定することを一つの手がかりとして、ROS耐性を向上させる運動様式や運動プログラム作成の一助となる研究を進めていきたいと考えている。

引用文献

- 1) Arroyo CM, Kramer JH, Dickens BF and Weglicki WB (1987): Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO. *FEBS Lett* 221: 101-104.
- 2) Asami S, Hirano T, Yamaguchi R, Tsurudome Y, Itoh H and Kasai H (1998): Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 678-682.
- 3) Boveris A and Chance B (1973): The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707-716.
- 4) Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA and Packer L (1982): Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 1198-1205.
- 5) Green MR, Hill HA and Turner DR (1979): The nature of the superoxide ion in dipolar aprotic solvents: the electron paramagnetic resonance spectra of the superoxide ion in N,N-dimethylformamide-evidence for hydrated forms. *FEBS Lett* 103: 176-180.
- 6) Green MR, Hill HA, Okolow-Zubkowska MJ and Segal AW (1979): The production of hydroxyl and superoxide radicals by stimulated human neutrophils-measurements by EPR spectroscopy. *FEBS Lett* 100: 23-26.
- 7) Hayakawa M, Hattori K, Sugiyama S and Ozawa T (1992): Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 979-985.
- 8) Hruszkewycz AM and Bergtold DS (1990): The 8-hydroxyguanine content of isolated mitochondria increases with lipid peroxidation. *Mutat Res* 244: 123-128.
- 9) Jackson MJ, Edwards RH and Symons MC (1985): Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 847: 185-190.
- 10) Ji LL, Dillon D and Wu E (1990): Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* 258: R918-923.
- 11) Ji LL (1993): Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc* 25: 225-231.
- 12) Jones DA, Newham DJ, Round JM and Tolfree SEJ (1986): Experimental human muscle damage: morphological changes in relation to other indices of damage. *J Physiol* 375: 435-448.
- 13) Ku HH, Brunk UT and Sohal RS (1993): Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic Biol Med* 15: 621-627.
- 14) Leaf DA, Kleinman MT, Hamilton M and Barstow TJ (1997): The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med Sci Sports Exerc* 29: 1036-1039.
- 15) Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L and Valle GD (1997): Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 37: 235-239.
- 16) McKnight RC and Hunter FE Jr (1966): Mitochondrial membrane ghosts produced by lipid peroxidation induced by ferrous ion. II. Composition and enzymatic activity. *J Biol Chem* 241: 2757-2765.
- 17) Miyazawa T, Suzuki T and Fujimoto K (1993): Age-dependent accumulation of phosphatidylcholine hydroperoxide in the brain and liver of the rat. *Lipids* 28: 789-793.
- 18) Narabayashi H, Takeshige K and Minakami S (1982): Alteration of inner-membrane components and damage to electron-transfer activities of bovine heart submitochondrial particles induced by NADPH-dependent lipid peroxidation. *Biochem J* 202: 97-105.
- 19) Niess AM, Hartmann A, Grunert-Fuchs M, Poch B and Speit G (1996): DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J*

- Sports Med 17: 397-403.
- 20) Olinescu R, Talaban D, Nita S and Mihaescu G (1995): Comparative study of the presence of oxidative stress in sportsmen in competition and aged people, as well as the preventive effect of selenium administration. Rom J Intern Med 33: 47-54.
- 21) Poulsen, HE, Loft S and Vistisen K (1996): Extreme exercise and oxidative DNA modification. J Sports Sci 14: 343-346.
- 22) Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA and Dudley G (1994). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. Am J Physiol 266: R375-R380.
- 23) Powers SK, Ji LL and Leeuwenburgh C (1999): Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. Med Sci Sports Exerc 31: 987-997.
- 24) Sato H, Suzuki K, Nakaji S, Sugawara K, Totsuka M and Sato K (1998): Effects of acute endurance exercise and 8-week training on the production of reactive oxygen species from neutrophils in untrained men. Nippon Eiseigaku Zasshi 53: 431-440.
- 25) Sen CK, Rankinen T, Vaisanen S and Rauramaa R (1994): Oxidative stress after human exercise: effect of N-acetylcysteine supplementation. J Appl Physiol 76: 2570-2577.
- 26) Sen CK (1995): Oxidants and antioxidants in exercise. J Appl Physiol 78: 675-686.
- 27) Sjödin B and Westing YH (1990): Changes in plasma concentration of hypoxanthine and uric acid in man with short-distance running at various intensities. Int J Sports Med 11: 493-495.
- 28) Suzuki T, Miyazawa T, Fujimoto K, Otsuka M and Tsutsumi M (1993): Age-related accumulation of phosphatidylcholine hydroperoxide in cultured human diploid cells and its prevention by alpha-tocopherol. Lipids 28: 775-778.
- 29) Tolmasoff JM, Ono T and Cutler RG (1980): Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. Proc Natl Acad Sci USA 77: 2777-2781.
- 30) Wannamethee SG, Shaper AG, Walker M (1998): Changes in physical activity, mortality, and incidence of coronary heart disease in older men. Lancet 351: 1603-1608.