

# 漸増的運動負荷による血清過酸化脂質濃度の変動と全身持久力との関連性

花房 祐輔<sup>1)</sup> 川口浩太郎<sup>2)</sup> 大成 浄志<sup>2)</sup>

キーワード (Key words) : 1. 過酸化脂質 (lipid peroxide) 2. 漸増的運動負荷 (incremental exercise) 3. ヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼ系 (Hypoxanthine-xanthine oxidase system)

## 緒 言

近年、酸化的ストレスが、様々な疾患の成因や病態に関与していること<sup>1)</sup>、またその酸化的ストレスを抑えることで病態が改善され、臨床的には治療効果が上がることが知られるようになってきた<sup>2)</sup>。

活性酸素による生体傷害の指標の一つとして過酸化脂質 (lipid peroxide ; LPO) が知られている。LPOは、生体細胞膜などを構成する高度不飽和脂肪酸が、活性酸素によって過度に酸化されて生じる物質である<sup>3)</sup>。高度不飽和脂肪酸が過酸化されると細胞膜の形態に変化が生じ、生体膜の機能が低下することが、疾病と深く関連していると考えられている。

このLPOが運動により増加することが明らかにされ、運動生化学の分野においても注目を集めている。脂質過酸化を引き起こす代謝経路については諸家による研究がなされて<sup>4, 5, 6)</sup>、運動により引き起こされる活性酸素生成、脂質過酸化機構が明らかにされてきている。その一つとして、Hypoxanthine-xanthine oxidase system (H-XO system) による活性酸素生成経路<sup>7)</sup>が挙げられる。本経路は虚血 - 再灌流による酸化傷害を引き起こす経路としてもよく知られているが<sup>8)</sup>、角田ら<sup>9)</sup>により、運動による脂質過酸化と尿酸生成経路との関連性が指摘され、H-XO systemが運動による脂質過酸化を引き起こす経路として考えられるようになった。

また、生体における脂質過酸化について検討する際、活性酸素を生成する代謝経路のみでなく、活性酸素を消去する物質 (抗酸化物質) の存在を考慮する必要がある。この抗酸化物質が、最大酸素摂取量 ( $\dot{V}O_{2max}$ ) などの体力の高い対象の生体に多く含まれているとの報告<sup>4, 6)</sup>もいくつかみられることから、運動に起因する LPO の動態には、多くの要因が関与していることが考えられる。

そこで本研究では、H-XO systemの中間代謝産物であるoxypurine、および最終代謝産物であるUAを測定することで、本経路の脂質過酸化に対する関与について検討

するとともに、 $\dot{V}O_{2max}$ の相違が、本経路の代謝に及ぼす影響について検討した。

## 対象および方法

脂質過酸化に及ぼす全身持久力の影響について検討するために、運動特性の異なる2群の競技種目の選手を対象者とし、同一の運動時間、様式にて運動負荷を行い、経時的に血清LPO濃度を測定し比較を行った。

### 1. 対象

対象は男子長距離陸上選手 (長距離選手群) 12名と、短距離、フィールド種目などの男子陸上選手 (その他陸上選手群) 7名とした。各群の対象者の身体的特性を表1に示す。

表1 対象者のプロフィール

	例数 (人)	年齢 (歳)	身長 (cm)	体重 (kg)	Peak $\dot{V}O_2$ (ml/kg/min)
長距離陸上選手群	12	23.5 ± 3.8	168.9 ± 7.2	58.8 ± 6.1	58.22 ± 8.37
その他の陸上選手群	7	22.0 ± 4.7	171.8 ± 8.2	66.9 ± 17.6	47.67 ± 5.06

\* : p<0.01 (unpaired t-test)

事前に行った運動負荷試験の結果、運動負荷中のPeak  $\dot{V}O_2$ は、長距離陸上選手では58.22 ± 8.37ml/min/kg、その他の陸上選手では47.67 ± 5.06ml/kg/minであった。この両群間で対応のないt検定により、有意差が認められた。

今回の測定に先立ち、対象者には測定の内容・方法について説明の説明を十分に行い、承諾を得た後に測定を行った。

### 2. 方法

運動強度の設定は、30W/minでのランプ負荷による運動負荷試験を事前に施行し、酸素摂取量 ( $\dot{V}O_2$ ) と心拍数 (HR) の一次回帰式 ( $\dot{V}O_2$ -HR) を求め、年齢別の

・ The relation to variation of the serum lipid peroxide concentrations by the incremental exercise test and endurance capacity.

・ 所属：広島大学大学院医学系研究科保健学専攻博士課程後期<sup>1)</sup> 広島大学医学部保健学科<sup>2)</sup>

・ 広島大学保健学ジャーナル Vol. 1(1) : 85 ~ 89, 2001

推定HRmaxを代入することで推定VO<sub>2</sub>max（以下VO<sub>2</sub>max）を求めた。運動強度の設定は、各%VO<sub>2</sub>maxに相当するHRを算出し、HRにてモニターすることで行った。また、事前に行った運動負荷試験で得られた最大のVO<sub>2</sub>を、Peak VO<sub>2</sub>とした。VO<sub>2</sub>maxは採血を行う本実験での運動強度設定に用い、Peak VO<sub>2</sub>は各被検者の全身持久力の指標とした。

運動負荷に際しては、十分な安静をとり、自転車エルゴメーターを用いて2分間の40%VO<sub>2</sub>maxに相当する運動強度で2分間ウォーミングアップを行った後、50、60、70、80%VO<sub>2</sub>maxに相当する運動強度で各ステージ3分間の負荷を行い、最終段階では最大努力の負荷をかけ、3分に満たなくとも疲労困憊に至った時点で終了した（図1）。

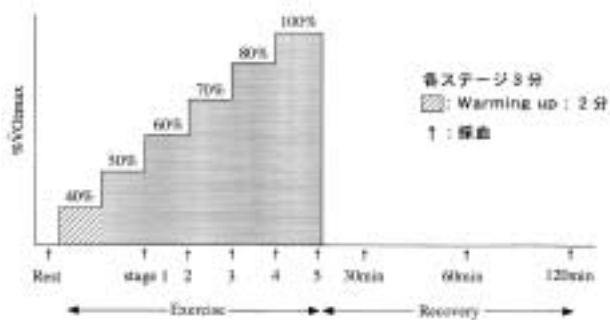


図1 運動負荷プロトコールおよび採血

自転車エルゴメーターは、モナーク社製エルゴメーターERGOMEDIC 818を用いた。HRの測定にはフクダ電子社製Dynascope-3140を、VO<sub>2</sub>の測定にはミナト医科学社製エアロモニターAE280-Sを使用した。

採血は、安静時、各ステージ終了直後と、運動負荷終了後30、60、120分経過した時点の計9回行った（図1）。運動負荷中の採血は肘正中静脈にカテーテルを留置し、1回約10mlの採血を行った。採血中は駆血帯を使用せず、静脈のうっ血を避けるよう配慮した。運動負荷終了後にはカテーテルを肘静脈から除去し、3回の採血では、針付きシリンジにより同様の条件で肘正中静脈から採血を行った。

採取した血液は、ただちに遠心分離にて血清を分離し、血清尿酸（UA）の分析に供した。残りの血清は凍結保存しLPO、oxypurine（hypoxanthine、xanthineの総称）の測定に供した。なお、測定は可能な限り速やかに行い、1週間以内にはすべての測定を完了させた。血清LPO濃度は協和メディックス社製デタミナーLPO分析キットを用いて、メチレンブルー・ヘモグロビン法<sup>10)</sup>により分析した。血清oxypurine濃度は、xanthine oxidase・peroxidase法<sup>11)</sup>にて分析した。

### 3. 統計処理

得られた測定値は安静時の値との差をとり、変化量と

して算出した。測定値等は、特記していない場合はすべて平均値±標準偏差（mean±S.D.）とした。

対象者の競技特性（長距離陸上選手群、その他陸上選手群）および経時的変化という二変量に対して二元配置分散分析を用いて分析を行った。下位検定としてTukey-Kramer検定を行い、各採血時点での平均値の差について検討した。各処理の有意水準は5%とした。

## 結 果

### 1. 血清LPO濃度

その他陸上選手群は運動負荷開始と共に徐々に増加す

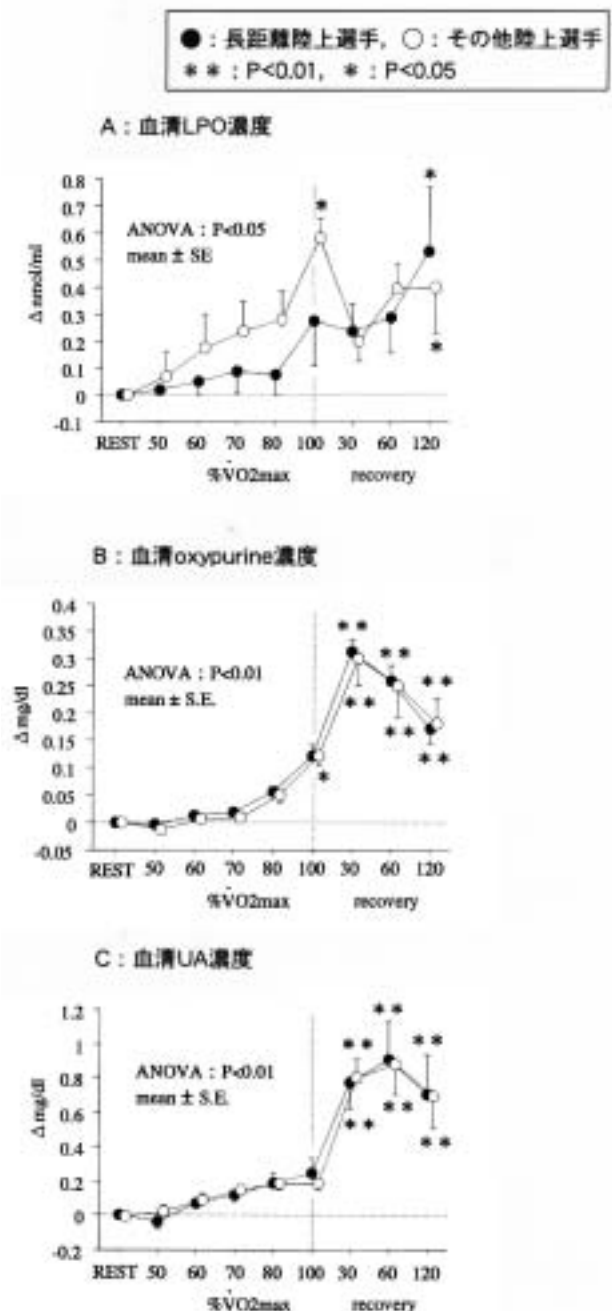


図2 各項目の血清中濃度の経時的変化

る傾向を示し、運動負荷終了後には一旦低下し、その後さらに増加するという、二相性を示した。一方長距離陸上選手群では運動負荷中には著明な変動を示さず、運動負荷終了後に徐々に増加していた(図2-A)。

運動負荷終了後の動態には差は認められなかったが、運動負荷中の動態には両群間に差が認められた(二元配置分散分析,  $p < 0.05$ )。

Tukey-Kramer検定により両群での運動負荷終了後120分経過した時点、およびその他の陸上選手の運動負荷終了直後において、安静値と比較して有意に高い値が認められた(Tukey-Kramer検定)。

## 2. 血清oxypurine濃度

血清oxypurine濃度の経時的変化は、運動中、運動終了後共に両群で類似した動態を示した。70% $\dot{V}O_2\max$ 以下の運動強度では著明な変動は認められなかったが、80% $\dot{V}O_2\max$ に相当する時点から増加傾向を示していた。運動負荷終了後も増加を続け、運動負荷終了後30分の時点で最高値を示した(図2-B)。

運動負荷終了後の30, 60分の各時点において、安静値と比較して両群とも有意に高い値であった(Tukey-Kramer検定)。また、その他の陸上選手においては、運動負荷終了直後も安静値より有意に高い値を示していた。長距離陸上選手群とその他陸上選手群との間に差は認められなかった(二元配置分散分析)。

## 3. 血清UA濃度

血清UA値は、oxypurineの場合と同様に、両群ともに類似した動態を示し、運動負荷中には著明な変動を示さず、運動負荷終了とともに増加する傾向が両群で認められ、運動終了後60分の時点で最高値を示した(図2-C)。

運動負荷終了後の30, 60, 120分の各時点において、安静値と比較して両群とも有意に高い値を示した(Tukey-Kramer検定)。長距離陸上選手群とその他陸上選手群と

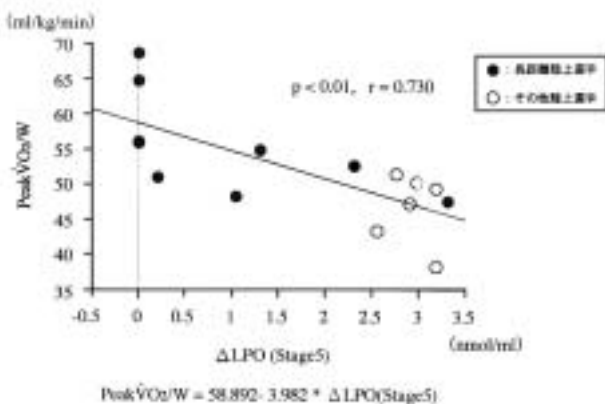


図3 運動負荷終了直後の血清過酸化脂質濃度とPeak  $\dot{V}O_2$ の関係

の間に差は認められなかった(二元配置分散分析)。

## 4. 血清LPO濃度と最高酸素摂取量との関係

長距離選手群、その他陸上選手群のPeak  $\dot{V}O_2$ と運動負荷終了直後の血清LPO濃度の関係を散布図として図3に示す。Peak  $\dot{V}O_2$ と血清LPO濃度に負の相関が認められた( $p < 0.01$ ,  $R = 0.730$ )。

## 考 察

本研究における血清LPO濃度の動態について、運動負荷中と運動負荷終了後を分けて検討すると、運動負荷終了後には2群間で類似した動態を示していたが、運動負荷中には長距離陸上選手群よりもその他陸上選手群で高い上昇を示していたのに対して、運動負荷終了後では両者に差が認められなかった(図2-A)。この結果から、運動による脂質過酸化反応については、運動負荷中、運動負荷終了後を分けて考察する必要があると考えられた。

### 1. 運動負荷終了後の血清LPO濃度の動態について

運動により引き起こされる活性酸素生成、脂質過酸化機構の一つとして、H-XO systemによる活性酸素生成経路(7)が挙げられる(図4)。組織が低酸素状態に陥ることでアデニンヌクレオチド(ATP, ADP, AMP)がhypoxanthineにまで代謝され、酸素供給が回復することでxanthine oxidaseが作用し、hypoxanthine xanthine UAへと変換される過程で活性酸素が発生するとされている。

本研究におけるoxypurine, UAの血清中の濃度変化に

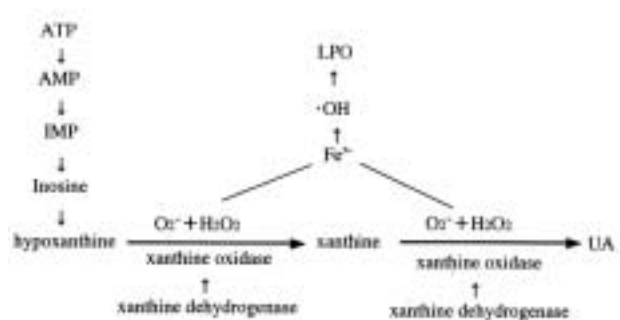


図4 Hypoxanthine-xanthine oxidase system

激運動による酸素供給不足などで組織に低酸素状態が生じると、ATPからAMPへと変化することでAMPが増加し、IMP、inosineを介してhypoxanthineにまで代謝される。このとき同時にxanthine dehydrogenaseのxanthine oxidaseへの変換が起こる。活性酸素( $O_2\cdot$ )は、このxanthine oxidaseによってhypoxanthine xanthine UAに転化される際に産生される。

$O_2\cdot$ は、やがて内因性の抗酸化物質によって過酸化水素と酸素に転換され、鉄( $Fe^{3+}$ )の触媒下でさらにヒドロキシルラジカル(hydroxyl radical;  $\cdot OH$ )が生成されることで、脂質過酸化反応が起こる。

ついてみると、2群とも運動負荷中には著明な変動を示さず、運動負荷終了後に増加するという、類似した動態を示していた。またoxypurine、UAの回復期における動態をみると、oxypurineは運動負荷終了後30分の時点でピークとなり、その後徐々に低下する傾向にあったが、UAはさらにその30分後にピークを迎えていた(図2 - B, C)。

hypoxanthineは、筋運動により骨格筋から放出されること<sup>12)</sup>、xanthineはhypoxanthineの上昇に伴い徐々に増加すること<sup>13)</sup>が報告されていることから、本研究における運動終了後の血清oxypurine上昇は、骨格筋から血中へのhypoxanthine放出、およびそれに伴うxanthineの増加を表しているものであるといえる。

秦野ら<sup>14)</sup>は、inosineからhypoxanthineの代謝を触媒するprine nucleotide phosphorylase (PNP)の局在が血管内皮細胞および赤血球に集中しているため、血中でのinosineの代謝がhypoxanthineなどと比べ早いとしている。また、運動後の長時間にわたるhypoxanthineの血中への放出は、inosineの細胞膜での運搬速度が遅いため、過剰に生成されたinosineが細胞内に蓄積し、徐々にhypoxanthineへ代謝されることにより生ずるとしている。

また、xanthine oxidaseにより触媒される、hypoxanthine xanthine UAへの反応は、多量の酸素を必要とする<sup>8)</sup>ことから、酸素供給の低下する運動中よりも、運動終了後の回復期に反応が起こりやすいといえる。

ここで、本研究における血清LPO濃度の動態についてみると、回復期には両群とも類似した動態を示し、運動負荷終了から120分経過した時点で安静値と比べ有意に高い値を示していた。このことから回復期における血清LPO濃度の増加は、血清oxypurine、UAが時系列的にピークを示すという動態の特徴から運動負荷終了後にxanthine oxidaseによる反応が引き起こされ、それに付随して活性酸素が発生したことによると考えられ、H-XO systemの関与が示唆された。

H-XO systemから発生する活性酸素は、UAが生成される前に発生するものであるにもかかわらず、血清LPO濃度のピークが、oxypurine、UAのピークよりも遅延していたのは、運動負荷後にH-XO systemにより発生した活性酸素により、脂質が徐々に過酸化されたことを反映していたと思われる。今回回復期には、体力に差がある2群間で差が認められなかったことから、運動負荷終了後120分経過した時点までは、H-XO systemにより生じるLPOの産生は、被検者の体力の相違を反映しないことが明らかになった。しかし、運動負荷終了後も脂質過酸化反応が長時間にわたり増加するとの報告<sup>15)</sup>も見られることから、本研究においてもさらに長時間の追跡を行うことにより、両群で異なる動態を示す可能性も考え

られた。

## 2. 運動負荷中の血清 LPO 濃度の動態について

運動負荷中の血清 LPO 濃度には長距離陸上選手群では著明な変動は認められなかったものの、その他陸上選手群では、運動負荷中に徐々に増加する傾向を示し、運動負荷終了直後には安静値と比べて有意に高い値を示していた(図2 - A)。運動中にはoxypurine、UAがほとんど上昇しないことから、運動負荷中に脂質過酸化が上昇する機序としては、H-XO systemの影響は小さいと考えられる。したがって、他の活性酸素生成経路が運動中の脂質過酸化に影響を与えた可能性が大きい。運動負荷中に脂質過酸化を引き起こした機序としては、ミトコンドリアにおける電子伝達系<sup>16)</sup>により産生された活性酸素があげられる。通常ミトコンドリア内でATPが合成される際、酸素分子を4電子還元して水をつくることにより、95%以上の酸素が消費される。その電子伝達系で消費される酸素の2%ほどが、呼吸鎖からleakした電子を受け取って1電子還元され、活性酸素となる。それが激運動時には、消費される酸素量も増加し、さらにleakする電子の割合も増加するので、結果としてミトコンドリアからの活性酸素の産生が増大する<sup>16)</sup>といわれ、H-XO systemと同様、運動による脂質過酸化を引き起こす系として知られている。このことから、本研究においても運動負荷中に運動筋の酸素消費量が増加したことで、電子伝達系において活性酸素が発生し、脂質過酸化が引き起こされたのではないかと予想された。

また、今回運動負荷中の血清 LPO 濃度はその他陸上選手群では増加していたが、長距離陸上選手群では著明な変動がみられなかったように、2群間で動態に相違が認められた。さらに、運動負荷終了直後の血清 LPO 濃度に両群間で有意な差が認められた。このように脂質過酸化の程度に差が生じる原因として、荒尾ら<sup>5)</sup>は、被検者の体力、運動時間、運動様式の違いが影響しているのではないかと考察している。しかし、本研究では運動時間は一定であり、運動様式も自転車エルゴメーターで統一し、運動強度の設定も一定の条件としたことから、これらが脂質過酸化の相違に影響を与えたとは考えにくい。今回対象とした2群間のPeak  $\dot{V}O_2$ の値は、長距離陸上選手群で $58.22 \pm 8.37$ ml/kg/min、その他陸上選手群で $47.67 \pm 5.06$ ml/kg/minであり、両群間で統計学的に有意な差が認められていた。そのため、運動負荷中における血清 LPO 濃度の2群間での相違は、上記の荒尾らにより述べられた、被検者の体力が影響している可能性が存在する。

そのような体力差により脂質過酸化に相違が認められた仕組みについては、次のような報告がある。Ohnoら<sup>4)</sup>は、10週間の走トレーニングによりヒト赤血球に存在す

る抗酸化物質である，catalaseとglutathione reductaseの活性が有意に亢進したとしている．また，Jenkinsら<sup>6)</sup>はVO<sub>2</sub>maxの高い群 (>60ml/kg/min) は低い群に比べ外側広筋において，抗酸化物質のSODとcatalaseの酵素活性が有意に高く，VO<sub>2</sub>maxとcatalase活性との間に有意な正の相関関係が得られたと報告している．これらの報告は，対象者の全身持久力が高ければ，抗酸化能力も高いということを表している．本研究においても，両群間の血清LPO濃度の相違が最も大きかった運動負荷終了直後のLPO濃度と，各被検者のPeak  $\dot{V}O_2$ の関係についてみると，高い負の相関が認められた (図3， $r=0.73$ )．このことから，長距離陸上選手群ではその他陸上選手群よりも，運動負荷中に生じた脂質過酸化反応を効率よく抑制することができたため，その他陸上選手群でみられたような血清 LPO濃度の増加が起こらなかった可能性が示唆された．

## 結 語

H-XO systemが，老化や各種疾患と深い関連があるとされているLPOの，運動による増加を引き起こす機序を明らかにするため，その経路の代謝中間産物であるoxypurine，UAの測定を合わせて行うこととともに，全身持久力が運動による脂質過酸化に及ぼす影響について検討した．その結果，1) 運動負荷終了後の血清 LPO濃度の上昇には，oxyprine，UAの動態から，H-XO systemによる脂質過酸化反応が主に関与していることが示唆された．2) 運動負荷中の血清 LPO 濃度において，長距離選手，その他の陸上選手の2群間で相違が認められた．さらに各被検者のPeak  $\dot{V}O_2$ と運動負荷終了直後の血清LPO濃度に負の相関が認められたことから，対象者の全身持久力と脂質過酸化反応によるLPO動態に関連性がみられた．

## 参考文献

- 1) Clark, I.A., W.B. Cowden, N.H. Hunt : Free radical-induced pathology. *Med. Res. Rev.* 5 : 297-332, 1985.
- 2) 上田之彦, 北 徹 : 高脂血症, 動脈硬化. *治療学*, 26 (5) : 582-620, 1992.
- 3) 宮沢陽夫 : 過酸化脂質, *現代医療*, 26 (5) : 1457-1462, 1994.
- 4) Ohno H., T. Yahata, Y. Sato, K. Yamamura, N. Taniguchi : Physical training and fasting erythrocyte activities of free radical scavenging enzyme systems in sedentary men. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 57 (2) : 173-176, 1988.
- 5) 荒尾 孝, 青木和江, 峯岸由紀子, 永松俊哉 : 血清過酸化脂質に及ぼす運動負荷の影響 - 運動強度について - . *体力研究*, 74 : 10-17, 1990 .
- 6) Jenkins R. R., R. Friedland, H. Howald: The relationship of oxygen uptake to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle. *Int. J. Sports Med.* 5, 11-14, 1984.
- 7) Merrill T., S. Fred: *Oxygen Free Radicals in Tissue Damage*. Boston, Birkhauser : 132-135, 1993.
- 8) 横山善文, 伊藤 誠, D.A.Parks : 肝虚血・再灌流におけるフリーラジカル発生 *Progress in Medicine* 10 : 569-573, 1990 .
- 9) 角田 聡, 田中喜代次, 喜多尾浩代, 渡辺一志, 中嶋二三生, 増原光彦 : 血清過酸化脂質に及ぼす最大運動と最大下長時間運動の影響. *デサントスポーツ科学*, 8 : 231-239, 1987 .
- 10) Ohishi N., H. Ohkawa, A. Miike, T. Tatano, K. Yagi : A new assay method for lipid peroxides using a methylene blue derivative. *Biochemistry International* 10 : 205-211, 1985.
- 11) 秦野伸二, 三上俊夫, 伊藤 朗, 藤島鉄郎 : 酵素的比色法によるOxypurine (Hypoxanthine, Xanthine) 測定法の開発. *臨床病理*, 34 : 1070-1074, 1986 .
- 12) Patterson V. H., K. K. Kaiser, M. H. Brooke : Forearm exercise increases plasma hypoxanthine. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 45 (6) : 552-553, 1982.
- 13) Kurtz T. W., P. M. Kabra, H.A. Al-Bander, A. A. Portable, B. G. Serena, H. C. Tsai, R. C. Morris: Liquid-chromatographic measurements of inosine, hypoxanthine, and xanthine in studies of fructose-induced degradation of adenine nucleotides in humans and rats. *Clin. Chem.* 32 (5) : 782-786, 1986.
- 14) 秦野伸二, 小笠原正志, 伊藤 朗 : 運動性高尿酸現象の発現機序. *日本生理誌*, 49 : 151-159, 1987 .
- 15) Maughan R. J., A. E. Donnelly, M. Gleeson, P. H. Whiting, K. A. Walker, P. J. Clough: Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. *Muscle & Nerve*, 12 (4) : 332-336, 1989.
- 16) Asayama K., K. Kato: Oxidative muscular injury and its relevance to hyperthyroidism. *Free Radical Biol. Med.* 8 (3) : 293-303, 1990.