

高強度運動が血中 Cu/Zn-SOD 濃度と リンパ球中 Cu/Zn-SOD mRNA 発現に及ぼす影響

森 河 亮
(2002年9月30日受理)

Effects of high intense exercise on Cu/Zn-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD)
concentration in blood, and Cu/Zn-SOD mRNA expression in lymphocytes

Akira Morikawa

The purpose of the present study was to investigate the effects of high intense exercise on Cu/Zn-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) concentration in human plasma and Cu/Zn-SOD mRNA expression in human lymphocytes. A single bout of 80% $\dot{V}O_2$ max exercise induced a significant increase of the Cu/Zn-SOD concentration in plasma ($p < 0.05$), but did not affect the expression of Cu/Zn-SOD mRNA in lymphocytes. The expression of Cu/Zn-SOD mRNA in lymphocytes was measured at first, third and last day of a training camp for five days. The expression of Cu/Zn-SOD mRNA in lymphocytes in last day of the camp was significantly increased, compared with those in both first and third day of the camp ($p < 0.01$, and $p < 0.05$, respectively). The results obtained in this study suggest that the increase in plasma Cu/Zn-SOD concentration after acute bout of exercise may be occurred by mechanisms of release from tissues into bloodstream. The results of this study also suggest that repeating high intense exercise may promote the expression of Cu/Zn-SOD mRNA in lymphocytes and Cu/Zn-SOD activity in lymphocytes.

Key words: Cu/Zn-SOD, lymphocyte, exercise, mRNA

キーワード: Cu/Zn-SOD, リンパ球, 運動, mRNA

緒 言

今日、健康維持・増進を目的として、また各種疾患の運動療法として積極的に運動することが推奨されている。これらの運動の有用性については広く認められている反面、過度の運動は生体に傷害を与えるのも事実であり、その生体傷害の原因として活性酸素が関与する場合が知られている。活性酸素は種々の生体成分と反応し、それらを酸化させ、生体の傷害を引き起こ

す¹⁾。一方、生体にはそのような酸化傷害を防御する抗酸化機構が存在し^{2),3)}、発生した活性酸素を適切に代謝処理すれば、酸化傷害は軽度に抑えられる。抗酸化機構にはカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素、ビタミンC、ビタミンEなどの抗酸化ビタミンなどが知られているが、スーパーオキシドラジカルを特異的に代謝するスーパーオキシドジスムターゼ (Superoxide dismutase, SOD) は抗酸化酵素の最上流に位置し、活性酸素代謝において重要な酵素であると考えられている⁴⁾。その SOD には3種、すなわち Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, extracellular SOD (EC-SOD) が存在し、Mn-SOD は主にミトコンドリアに、Cu/Zn-SOD は主に細胞質に、EC-SOD は主に細胞外液中にそれぞれ局在している⁵⁾。

本論文は、課程博士候補論文を構成する論文の一部として、以下の審査委員により審査を受けた。

審査委員: 稲水 惇 (主任指導教官), 小林正夫,
坂手照憲, 佐藤一精, 渡部和彦

運動とSODに関する先行研究では、血中Mn-SODおよびEC-SODの濃度や活性は単回の運動負荷後に上昇すること、また運動トレーニングによる抗酸化機構の亢進を示唆する報告⁶⁾⁻⁹⁾がある。一方、血中Cu/Zn-SOD濃度は単回の運動負荷後に上昇するとの報告¹⁰⁾、血中Cu/Zn-SODの濃度や活性は単回の運動負荷後に変化がみられないとの報告^{7),9)}や逆に減少するとの報告^{11),12)}、また運動トレーニング後にも変化がみられないという報告^{6),8)}もあり、一定した見解は得られていない。その主な要因としては、Cu/Zn-SODの分子量は32,000と比較的小さいため、腎糸球体を通過し、血中Cu/Zn-SODは尿タンパクとして体外に排泄されることが考えられている¹²⁾。この血中Cu/Zn-SOD濃度の減少は、75% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度の15分間の運動負荷でみられるとの報告^{11),13)}、2時間のサッカーの練習後にみられるとの報告¹²⁾がある一方、2時間のバレーボールの練習後には血中Cu/Zn-SOD濃度に変化がみられないとの報告¹³⁾がある。これらの報告から、血中Cu/Zn-SOD濃度は運動時間と運動強度に影響を受けることが推測される。

種々の血中ホルモンや生理活性物質と同様に、血中SODの大部分はSOD産生細胞・組織からの血中への逸脱に由来するものと考えられるが、血中SOD濃度はSOD産生細胞におけるSOD産生量、SOD消費量およびSOD排泄量の総合的な結果を表すもので、血中SOD濃度の高低が必ずしも活性酸素の標的組織・細胞における活性酸素代謝能を反映するわけではない。なかでも、SOD産生細胞におけるSOD産生量が血中SOD濃度に及ぼす最大の要因であり、運動がSODによる抗酸化機構に及ぼす影響を検討するうえで細胞レベルにおけるSOD産生量を検討することが最も重要な点である。このSOD産生量を検討する手段として、最近SOD産生に関わるmRNAの発現量から各々の細胞あるいは組織におけるSOD産生量を検討する分子生物学的手法が取り入れられている。この手法による報告¹⁴⁾⁻¹⁹⁾では、大部分がラット骨格筋から抽出したSODmRNAを検体としており、ヒトからこれらの検体を得るためには筋生検などが必要で、ヒトを対象に行う研究では困難を伴うことが多く一般的ではない。そこでヒトを対象に、SODmRNAを検討できる体細胞としてリンパ球に着目した。リンパ球は、比較的容易に繰り返し採取が可能で免疫機能をはじめとして、内部環境を一定に維持するホメオスタシスのために不可欠な細胞である。強度の高い運動で免疫機能を低下させることが知られており、その原因の一つに活性酸素によるリンパ球傷害が挙げられている。また、リンパ球中のSODは虚血性心疾患、動脈硬化症、糖尿病

等の病態に関与していることも知られている。しかし、運動とリンパ球中SODとの関係を検討した報告は見当たらず、ヒトを対象として、運動とSODとの関係をリンパ球中SODmRNAを指標に検討することは、重要な意義があると思われる。

そこで本研究では、高強度の運動が血中Cu/Zn-SOD濃度とリンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量に及ぼす影響を検討することを目的とした。

研究方法

実験1. 80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度の単回運動が血中Cu/Zn-SOD濃度に及ぼす影響

1. 対象

非喫煙者で日常、運動トレーニングを積んでいる男子大学生13名とした。平均年齢は19.9±1.1歳、身長は171.9±4.7cm、体重は64.5±6.1kg、最大酸素摂取量($\dot{V}O_2\text{max}$)は51.3±6.2ml/min/kgであった。

2. 80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度による運動負荷

自転車エルゴメーター(コンビ232C)、運動負荷システム(フクダ電子, ML-4500)、呼気分析システム(フクダ電子, オキシコンシグマ)を用いて最大負荷法により $\dot{V}O_2\text{max}$ を測定した。後日、自転車エルゴメーターを用いて80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度で30分間運動を負荷し、運動負荷前と運動負荷直後に5mlヘパリン加採血を行った。採血後、直ちに血漿を分離し、Cu/Zn-SOD測定まで-70°Cに保存した。

3. 血中Cu/Zn-SOD濃度の測定

血中Cu/Zn-SOD濃度の測定はCu/Zn-SOD ELISAキット(Bender Med Systems)を用いて、各サンプルをduplicateで測定し、その平均値を血中Cu/Zn-SOD濃度とした。

4. 統計処理

運動前と運動終了後の平均値の検定は、Wilcoxon singled rank testにより行い、5%未満を有意とした。

実験2. 80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度の単回運動がリンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量に及ぼす影響

1. 対象

非喫煙者で日常、運動トレーニングを積んでいる男子大学生10名とした。平均年齢は19.9±1.1歳、身長は170.0±5.5cm、体重は62.2±6.8kg、 $\dot{V}O_2\text{max}$ は53.5±6.2ml/min/kgであった。

2. 80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度による運動負荷

実験1.と同様の器具、方法で行った。

3. mRNA の抽出および SODmRNA 発現量の測定

(1)リンパ球の分離および mRNA の抽出

運動負荷前と負荷直後に 5ml のヘパリン加採血を行った。Lymphoprep^R (Nycomed pharma) を試験管に 5ml 取り、その上に同量の PBS (phosphate buffered saline) で希釈した血液を静かに重層し、2150rpm で 20 分間遠心し、リンパ球層を採取し、これを PBS で 3 回洗浄した。1×10⁶/ml に細胞数を調整後、TRIZOL^R (Life Technologies) を 1ml 加え混和し、さらにクロロホルム 0.2ml を加え混和し、12000rpm で 15 分間遠心し、水質層を採取した。さらにイソプロピルアルコール 0.5ml を加え混和し、12000rpm で 10 分間遠心した。その後上層の液層を取り除き、75%エタノール 1ml を加え 2 回洗浄し、リンパ球中 mRNA を抽出し、mRNA 発現量の測定まで -70°C に保存した。

(2)RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

RT-PCR は RT-PCR キット (東洋紡) を用いて行った。Cu/Zn-SODmRNA の RT-PCR 条件を表 1 に示した。

すなわち RT はマイクロチューブに RNase Free H₂O を 9μl, 5×RTase Buffer を 4μl, Random Primer を 1μl, dNTPs を 2μl, RNase Inhibitor を 1μl, M-MLV RTase (RNaseH-) を 2μl 加え、さらに保存しておいたリンパ球中 mRNA を TE 緩衝液 (コスモ・バイオ株式会社) 20μl で溶解したものを 1μl 加え、ミネラルオイル 50μl を重層し、サーマルサイクラー (Applied Biosystem, PCR System9700) を用いて 30°C で 10 分 → 42°C で 20 分 → 99°C で 5 分 → 4°C で 5 分反応させた。

PCR は RT 産物に Plus Buffer (rTaq) を 10μl, 表 1 に示す Cu/Zn-SOD sense Primer と Cu/Zn-SOD antisense Primer (北海道システム・サイエンスに依頼し作成) を各 2μl, 滅菌蒸留水を 61μl, rTaq DNA polymerase を 1μl 加えた。サーマルサイクラーを用いて 94°C で 1 分 → 54.3°C で 1 分 → 72°C で 2 分を 1 サイクルとし、35 サイクル行った。Cu/Zn-SOD のプライマーは Michael, Y. らの報告²⁰⁾に従った。Cu/Zn-SOD のインナーコントロールとして βactin (Ambion Inc.) を用いた。なお βactin の PCR サイクル数は 24 サイ

表 1. Cu/Zn-SODmRNA の RT-PCR 条件

	Cu/Zn-SOD
RT条件	30°C (10分) ⇒ 42°C (20分) ⇒ 99°C (5分) ⇒ 4°C (5分)
Primer sense	5'-GTGATCTCACTCTCAGGAGA-3'
Primer antisense	5'-TCATTTCCACCTTTGCCCAA-3'
PCR条件	94°C (1分) ⇒ 54.3°C (1分) ⇒ 72°C (2分)
サイクル数	35 サイクル
Product size	88bp

クルとした。また、各サンプルを duplicate で測定した。

(3)SODmRNA 発現量の測定

得られた PCR 産物について 5% アクリルアミドゲル電気泳動を行い、エチジウムブロミド染色の後、写真撮影を行い、それぞれのバンドをパソコンに取り込み、画像解析ソフト Quantity One (PDI 社) により mRNA 発現量を測定した。mRNA 発現量は、Cu/Zn-SODmRNA/βactin 比で表した。また、duplicate で測定した各サンプルの平均値をリンパ球中 Cu/Zn-SODmRNA 発現量とした。

4. 統計処理

運動前と運動終了後の平均値の検定は、Wilcoxon singled rank test により行い、5%未満を有意とした。

実験 3. 5 日間の高強度運動がリンパ球中 Cu/Zn-SODmRNA 発現量に及ぼす影響

1. 対象

大学陸上競技部に所属する非喫煙者の男子大学生 9 名とした。平均年齢は 19.3 ± 1.2 歳、身長は 169.6 ± 5.7cm, 体重は 56.1 ± 4.7kg であった。

2. 実験方法

4 泊 5 日にわたる夏期合宿 (2000 年 9 月 5 日 ~ 9 日) の合宿前、および合宿三日目 (以下合宿中日) と合宿終了日のトレーニング終了後に採血を行い、リンパ球中 Cu/Zn-SODmRNA 発現量と血漿クレアチンキナーゼ値 (以下 CK 値) の測定を行った。合宿中の運動内容を表 2 に示した。

表 2. 合宿中運動内容

	早期	午前	午後
1 日目		移動	16~20km 走 (約 1 時間半)
2 日目	5~15km 走 (約 1 時間)	10km 走 (約 1 時間)	16~30km 走 (約 2 時間)
3 日目	5~15km 走 (約 1 時間)	10km 走 (約 1 時間)	休息
4 日目	5~15km 走 (約 1 時間)	10km 走 (約 1 時間)	20~30km 走 (約 2 時間)
5 日目	5~15km 走 (約 1 時間)	10km タイムトライアル	移動

3. mRNA の抽出および SODmRNA 発現量の測定

実験 2. と同様の方法で行った。

4. 統計処理

合宿間の CK 値および SODmRNA 発現量の変化の検定には一元配置分散分析 one-way ANOVA を用い、Fisher's PLSD post hoc test により統計処理を行い、5%未満を有意とした。

成績

実験 1. 80% $\dot{V}O_2\max$ 強度の運動が単回血中 Cu/Zn-SOD 濃度に及ぼす影響

図 1 に運動前後の血中 Cu/Zn-SOD 濃度を示した。80% $\dot{V}O_2\max$ 強度による運動負荷前後の血中 Cu/Zn-

SOD濃度の平均値は、それぞれ $16.09 \pm 6.57 \text{ ng/ml}$ 、 $27.65 \pm 22.37 \text{ ng/ml}$ で、運動直後の血中Cu/Zn-SOD濃度は運動負荷前と比較して、有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

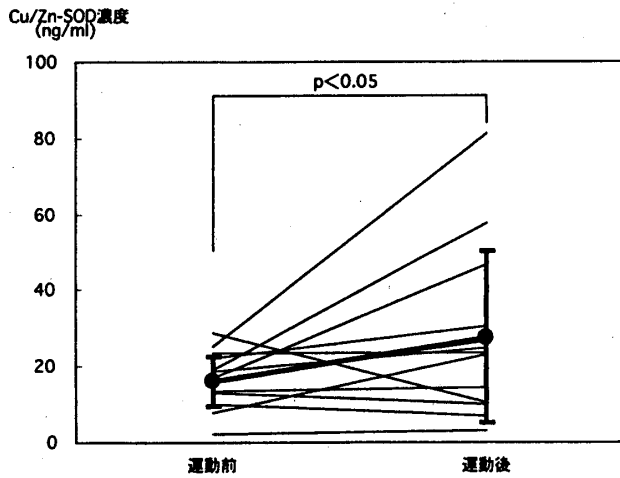


図1. 80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度の運動負荷における血中Cu/Zn-SOD濃度

実験2. 80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度の単回運動がリンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量に及ぼす影響

1. PCR産物

図2にRT-PCRによって得られたPCR産物の泳動図を示した。Cu/Zn-SODは88bp、 β actinは294bpのPCR産物が得られた。

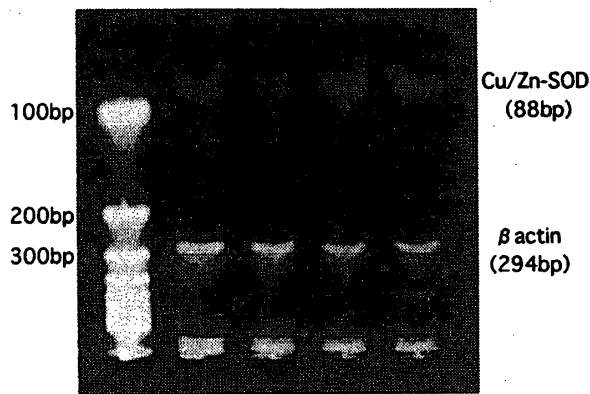


図2. PCR産物泳動図

2. リンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量

図3に運動前後のリンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量を示した。80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度による運動負荷前後のリンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量の平均値は、それぞれ 0.90 ± 0.26 、 0.91 ± 0.33 で運動負荷前後に有意な変動はみられなかった。

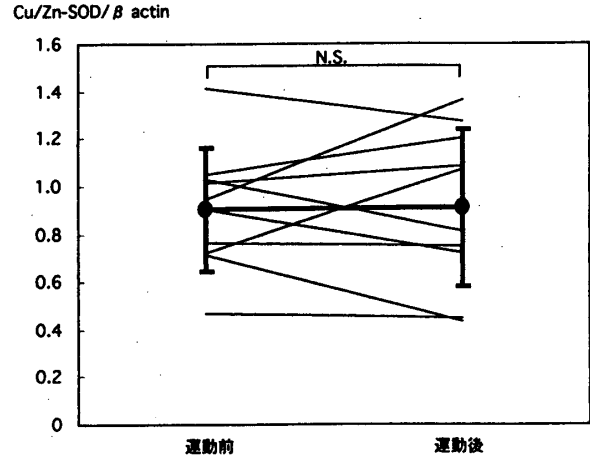


図3. 80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度の運動負荷におけるCu/Zn-SOD/ β actin

N.S.: 有意差なし

実験3. 5日間の高強度運動がリンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量に及ぼす影響

1. 血漿CK値

合宿前、合宿中日、合宿終了日における血漿CK値はそれぞれ $165 \pm 50 \text{ IU/L}$ 、 $594 \pm 347 \text{ IU/L}$ 、 $569 \pm 322 \text{ IU/L}$ で、合宿中日、合宿終了日のCK値は合宿前に比べ、ともに有意な高値を示した ($p < 0.01$)。

2. リンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量

図4に合宿間のリンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量を示した。合宿前、合宿中日、合宿終了日におけるリンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量はそれぞれ 0.22 ± 0.05 、 0.28 ± 0.09 、 0.41 ± 0.15 で、合宿終了日は合宿前、合宿中日に比べ有意な高値を示した (それぞれ $p < 0.001$ 、 $p < 0.05$)。

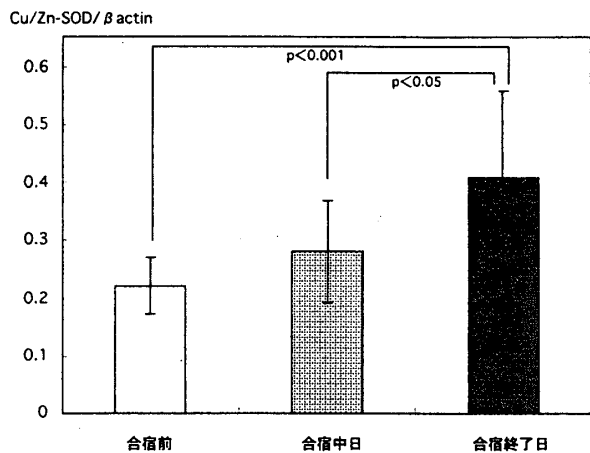


図4. 合宿中のCu/Zn-SODmRNA発現量

考 察

1. 高強度の単回運動が血中 Cu/Zn-SOD に及ぼす影響について

実験 1. の結果, 80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度による30分間運動負荷後の血中 Cu/Zn-SOD 濃度は負荷前に比べ有意な上昇を示した。運動後の血中 SOD 濃度の上昇は, 運動による酸素摂取量増大に伴って, 生体内の活性酸素産生量が増大し, その活性酸素を消去しようとする抗酸化機構の向上の結果であると考え, 80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度の30分間の運動負荷によって生体内に発生したスーパーオキシドラジカルが運動後の血中 Cu/Zn-SOD 濃度の上昇を招来したものと考えられた。また, 筆者らは同実験において, 運動前後で血中過酸化脂質濃度に変動がみられなかったことを認めている¹⁰⁾。過酸化脂質は活性酸素による酸化傷害として, 最も容易かつ頻繁に生じる脂質の過酸化反応の産物であり, 活性酸素による酸化傷害の指標とされている。また, 血中過酸化脂質濃度は運動時間, 運動強度に依存して運動後に高値を示すことが知られている^{21,22)}。これらのことを合わせて考えると, 80% $\dot{V}O_2\text{max}$ の高強度の運動であっても運動鍛練者は運動により増大するスーパーオキシドラジカルを十分に消去できるほどの抗酸化機構を有していることが示唆された。

一方, 単回の運動負荷により血中 Cu/Zn-SOD 濃度は減少するとの報告もある。すなわち, 自転車エルゴメーターを用いた75% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度による15分間の運動負荷前後の比較において, 運動終了15分後に血中 Cu/Zn-SOD 濃度が有意な減少を示したという報告¹¹⁾, 2時間のサッカー運動後は運動前と比較して有意な減少を示したという報告¹²⁾などである。これらの報告では, Cu/Zn-SOD の分子量は32,000と比較的小さいため, Cu/Zn-SOD は腎糸球体を通過し, 血中 Cu/Zn-SOD は尿タンパクとして体外に排泄されるとし, 事実, 運動負荷後に尿中 Cu/Zn-SOD 濃度の上昇を認め, 血中 Cu/Zn-SOD の尿中への排泄増加が血中 Cu/Zn-SOD 濃度減少の主な原因としている。このように, 血中 Cu/Zn-SOD 濃度は必ずしも標的細胞中の Cu/Zn-SOD 濃度を示すものではなく, 各細胞における SOD 産生量, 各細胞から血中への SOD 逸脱量, 血中での SOD 消費量および尿中への SOD 排泄量等の総合的結果であるといえる。これらのうち, SOD 産生細胞から血中への Cu/Zn-SOD 逸脱量は産生細胞における Cu/Zn-SOD 産生量に依存し, 血中での Cu/Zn-SOD 消費量は運動強度, 運動時間に依存し, また尿中への Cu/Zn-SOD 排泄量については, 血中 Cu/Zn-SOD 濃度と腎血流量に依存すると考えられる。さらにその腎血流量

も運動強度, 運動時間に依存する。以上のことから, 運動が SOD に及ぼす影響の検討には血中 SOD 濃度のみならず, SOD 産生細胞における SOD 産生量を検討することが意義のあることであると考えられる。そこで実験 2. において, 実験 1. と同じ運動強度と運動時間を設定し, 活性酸素の標的細胞の1つであるヒトリンパ球の SOD 産生量を検討した。

2. 高強度の単回運動がリンパ球中 Cu/Zn-SODmRNA 発現量に及ぼす影響について

運動が SOD に及ぼす影響を検討した報告は多くあり, その検体も血液, 骨格筋, 肝組織など多様である。血液を検体とした場合, 血中の SOD は上述したような要因により必ずしも標的組織中の SOD を反映するものではない。また骨格筋や組織の SOD においても, その濃度の高低が標的組織での産生あるいは代謝が亢進した結果なのか否か, 特定が困難である。このような問題を解決するために, 最近 SOD 産生に関わる mRNA の発現量から各々の細胞あるいは組織における SOD 産生量を検討する分子生物学的手法が取り入れられている。しかし, 検体として骨格筋や組織を扱うことはヒトを対象に行う研究では困難を伴うことが多く一般的ではない。そこで, ヒトを対象に mRNA が比較的容易に抽出できる体細胞としてリンパ球に着目した。リンパ球は活性酸素の標的細胞であると同時に, 免疫機能をはじめとして, 内部環境を一定に維持するホメオスタシスのために不可欠な細胞である。また, リンパ球中の SOD は虚血性心疾患, 動脈硬化症, 糖尿病等の病態に関与していることも知られている。しかし, 運動とヒトリンパ球中 SOD との関係を検討した報告は見当たらない。したがって, ヒトを対象として, 運動とリンパ球中 SOD との関係を SODmRNA を指標に検討することは, 運動と SOD との関係を知らううえで重要な意義がある。

実験 2. において, 80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度による30分間の運動負荷前後のリンパ球中 Cu/Zn-SODmRNA 発現量に有意な変動は認められず, 運動鍛練者においては30分間の80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度の運動負荷直後にリンパ球中 Cu/Zn-SOD 産生の亢進はみられないことが明らかになった。このことから, 実験 1. で認められた80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度の運動負荷直後の血中 Cu/Zn-SOD 濃度の上昇に, リンパ球中 Cu/Zn-SOD 産生量が関与する可能性の少ないことが示唆された。実験 1. における80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度の運動負荷直後の血中 Cu/Zn-SOD 濃度上昇の機序として, Cu/Zn-SOD の産生の亢進はないが, 血中への Cu/Zn-SOD の逸脱量が増加した可能性, もしくは尿中への Cu/Zn-

SODの排泄量が低下した可能性などが考えられる。しかし、一般的には運動によって腎血流量は増加するため後者の可能性は考えにくい。そこで前者の逸脱量が増加した可能性を考えると、血中へのSOD逸脱量が増加すればCu/Zn-SOD産生細胞内のCu/Zn-SODの減少が起こり、Cu/Zn-SOD濃度が減少すればそれを補充するために、Cu/Zn-SODが産生される。Cu/Zn-SODが産生されるためには、その産生を担うCu/Zn-SODmRNAの発現がみられるはずである。実験2.においては運動負荷直後のみのCu/Zn-SODmRNA発現量の検討であり、上述の推測を確認することはできない。このことを確認するためには、運動負荷直後のみだけでなく運動後の時間経過を追ってmRNA発現量を検討する必要がある、今後の課題である。

単回運動後のCu/Zn-SODmRNA発現量の動態を検討した研究としては、ラットにおよそ65% $\dot{V}O_2\max$ 強度による60分間の運動を負荷し、その運動負荷直後、1時間後、2時間後、4時間後、10時間後および24時間後のラット骨格筋のCu/Zn-SODmRNA発現量を測定した結果、いずれの時間においても非運動負荷群と比べ有意な変動が認められなかったという報告¹⁵⁾がある。このことから、単回運動負荷のCu/Zn-SODmRNA発現量への影響は少ないことが示唆される。しかし、この報告は運動強度が中等度の65%であり、高強度の運動負荷がCu/Zn-SODmRNA発現量に及ぼす影響については不明である。以上のことから、高強度の単回の運動負荷ではなく、高強度の運動負荷が繰り返される合宿に着目し、合宿期間中のヒトリンパ球Cu/Zn-SODmRNA発現量を検討する目的で実験3.を行った。

3. 合宿期間中のリンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量について

合宿期間中の運動内容は表2.に示すように、走距離と運動時間は午前中15~25km、約2時間、午後16~30km、約2時間、平均的なRPE (Rating of Perceived Exertion) はそれぞれ9~15、15~17であった。合宿中の血漿CK値を測定した結果、合宿前に比べ、合宿中日、合宿最終日の値はそれぞれ有意な上昇を示した。血漿CK値は、運動により上昇を示し、運動による疲労の客観的な指標の1つとして利用されている²³⁾。本研究の被験者では合宿前値においても正常値(5~130 IU/L)を越えていた。これは日常の練習の影響によるものと思われる。本研究の合宿中の血漿CK値は正常値の約4倍にまで上昇した。したがって、今回の合宿期間中の運動は、かなりの疲労を伴うほどの高

い運動強度・量であったと考えられた。

合宿中のリンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量は、合宿が進むにつれて漸増し、合宿最終日は合宿前および合宿中日に比べ有意な上昇を示した。このことから、合宿が経過するに従ってリンパ球中でCu/Zn-SODの産生が高まったことが示唆される。リンパ球中Cu/Zn-SODの産生が高まる機序として、今回の合宿のような高強度の運動負荷が連日行われ、活性酸素発生量が増大する状況が繰り返されるような条件下では、そのつど活性酸素消去のためにリンパ球中のCu/Zn-SODが消費され、リンパ球中Cu/Zn-SOD濃度が減少し、その濃度減少を補うためにリンパ球中Cu/Zn-SODmRNAの発現量が合宿の経過に従い漸増的に増加し、その結果Cu/Zn-SOD産生が高まるものと考えられる。

実験2.と同様の研究方法で運動非鍛練者に80% $\dot{V}O_2\max$ の強度で30分間運動を負荷した場合、単回の運動負荷でも負荷直後にリンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量が増加することを示唆するデータがある(未発表データ)。これは、運動非鍛練者にとっては運動鍛練者と同じ単回と同じ強度の運動負荷でも、運動鍛練者に比べて抗酸化機能が低いためにリンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量が増加したものと推測される。

運動鍛練者は運動非鍛練者に比べ、一般に単回運動負荷後に抗酸化酵素レベルが増加することは少ないという報告²⁴⁾がある。Cu/Zn-SODmRNA発現量についてもラットをトレーニング群と非トレーニング群に分け、そのトレーニング後で単回の疲労困憊運動を行わせた結果、トレーニング群の骨格筋のCu/Zn-SODmRNA発現量には変化がみられなかったが、非トレーニング群の骨格筋のCu/Zn-SODmRNA発現量には上昇傾向が認められたとの報告¹⁷⁾があり、その要因を、トレーニング群は運動トレーニングによってCu/Zn-SODの機能が高まり、単回の運動負荷によって生じる活性酸素に対してCu/Zn-SOD産生を高める必要はなかったが、非トレーニング群においてはその単回運動負荷によって生じる活性酸素がCu/Zn-SOD産生を高めるだけの酸化ストレスとなったためと考察している。

これらのことから考えると、本研究の合宿中のリンパ球中Cu/Zn-SODmRNA発現量の漸増的な増加は、合宿が経過するに伴いリンパ球中Cu/Zn-SOD産生を高める必要が生じるほどの活性酸素が発生したことを意味し、運動によって活性酸素産生が高まるような状況が繰り返されれば、その適応現象としてSODによる抗酸化機構が向上することが期待される。

これまでの運動と SOD に関する研究から、SOD に対する運動の効果が明らかになりつつある。しかし、多くの研究では骨格筋をはじめとする組織を検体としており、ヒトを対象に行うには困難を伴うことが多い。その点リンパ球は採取が比較的容易であり、本研究によってリンパ球中 Cu/Zn-SODmRNA 発現量は運動の影響を反映する指標になりえる可能性を示したことは重要な意義を有している。また、リンパ球は免疫機能をはじめとして、内部環境を一定に維持するホメオスタシスのために不可欠な細胞であり、虚血性心疾患、動脈硬化症、糖尿病、肝疾患、腎疾患、老化等の病態に活性酸素と SOD の関与が指摘されており、また同時に、これらの疾患の予防、治療の一つとして運動療法が推奨されている。本研究で示したリンパ球中 Cu/Zn-SODmRNA 発現量に対する運動の効果は、これら疾患の運動療法の有用性について、新たな見解を見出せる可能性があると考えられた。

総 括

本研究によって次のことが明らかとなった。

- 1) 運動鍛練者においては、80% $\dot{V}O_2\max$ 強度による30分間の単回運動負荷によって、血中 Cu/Zn-SOD 濃度が上昇する。
- 2) 運動鍛練者においては、80% $\dot{V}O_2\max$ 強度による30分間の単回運動負荷直後のリンパ球中 Cu/Zn-SODmRNA 発現量の亢進はみられない。
- 3) 高強度の運動負荷が繰り返されることによって、リンパ球中 Cu/Zn-SODmRNA 発現量の亢進がみられ、Cu/Zn-SOD 産生量が向上する。

【参考文献】

- 1) 吉川敏一ら：活性酸素とは。臨床スポーツ医学，11：753-758，1994。
- 2) 樋口 満：活性酸素の酵素的消去システム。臨床スポーツ医学，11：760-767，1994。
- 3) 角田 聡：運動時の非酵素的な抗酸化機構。臨床スポーツ医学，11：769-776，1994。
- 4) 大野秀樹ら：活性酸素と運動～身体運動・栄養・健康の生命科学 Q & A～。杏林書院，54-55，1998。
- 5) 谷口直之ら：スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)。日本臨床，47：303-305，1989。
- 6) 大河原知水ら：運動トレーニングと活性酸素ストレス～トレーニング効果の個人差とスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の関係について。小野スポーツ科学，7：11-21，1999。
- 7) Kayashima, S. et al.: Leucocytosis as a marker of organ damage induced by chronic strenuous physical exercise. *Eur. J. Physiol.*, 70: 413-420, 1995.
- 8) Ohno, H. et al.: Training effects on concentrations of immunoreactive superoxide dismutase iso-enzymes in human plasma. *Acta Physiol. Scand.*, 146: 291-292, 1992.
- 9) Ohno, H. et al.: Changes in immunoreactive manganese-superoxide dismutase concentration in human serum after 93h strenuous physical exercise. *Clin. Chim. Acta*, 215: 213-219, 1993.
- 10) 森河 亮ら：運動がスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) と血中過酸化脂質に及ぼす影響。臨床スポーツ医学，17：1372-1377，2000。
- 11) Ohno, H. et al.: Effect of brief physical exercise on the concentration of immunoreactive superoxide dismutase isoenzymes in human plasma. *Tohoku J. Exp. Med.*, 167: 301-303, 1992.
- 12) Ohno, H. et al.: Effect of physical exercise on urinary excretion of CuZn-superoxide dismutase in male high school students. *Acta Physiol. Scand.*, 148: 353-355, 1993.
- 13) Ohno, H. et al.: Effect of physical exercise on immunoreactive Mn-superoxide dismutase in human plasma. *Jpn. J. Physiol.*, 39: S295, 1992.
- 14) Hollander, J. et al.: Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. *Am. J. Physiol.*, 277: R856-R862, 1999.
- 15) Hollander, J. et al.: Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pfluegers. Arch. Eur. J. Physiol.*, 442: 426-434, 2001.
- 16) Oh-ishi, S. et al.: Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 24: 326-332, 1997.
- 17) Oh-ishi, S. et al.: Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 156: 1579-1585, 1997.
- 18) Gore, M. et al.: Endurance training alters antioxidant enzyme gene expression in rat skeletal muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 76: 1139-1145, 1998.
- 19) Pierre, V. E. et al.: Physical training in patients

- with chronic heart failure enhances the expression of genes encoding antioxidative enzymes. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 38: 194-198, 2001.
- 20) Michael, Y. A. et al.: The expression of key oxidative stress-handling genes in different brain regions in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neuro.*, 11: 151-164, 1998.
- 21) 角田 聡ら：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.
- 22) 荒尾 孝：運動負荷と生体内過酸化脂質及び活性酸素消去酵素活性。運動生化学，3：76-83，1992.
- 23) 河辺典子：クレアチンキナーゼ (CK)，CK アイソザイム。臨床スポーツ医学，14：45-47 (臨時増刊号)，1997.
- 24) 大石修司ら：運動と酸化ストレス。日本運動生理学雑誌，8：73-83，2001.
- (主任指導教官 稲水 惇)