

## 第2章 文献研究

### 2.1 酸化ストレスと抗酸化システム

#### 2.1.1 活性酸素・フリーラジカル

体内に取り入れられた酸素分子の一部（約数%）は、常に不完全に還元されて活性酸素やフリーラジカルになることが知られている。通常の酸素より活性化された酸素とその関連物質を活性酸素あるいは活性酸素種（reactive oxygen species: ROS）、通常二つ対になって存在しているはずの電子が対を形成せず、不對電子を1つ以上有する分子または原子をフリーラジカルという。

生体にかかわりの深い活性酸素とフリーラジカルを Table 2-1 に示した。

狭義の活性酸素は、三重項酸素が励起して生じる一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ )、酸素が1電子還元されたスーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ )、スーパーオキシドが不均化して生じる2電子還元種である過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、過酸化水素より生成されるヒドロキシルラジカル ( $\text{HO}\cdot$ ) の4種をさす。これに、狭義の活性酸素と不飽和脂肪酸 (LH) などの生体成分との反応により生じるペルオキシルラジカル ( $\text{LO}_2\cdot$ )、アルコキシルラジカル ( $\text{LO}\cdot$ )、ヒドロペルオキシルラジカル ( $\text{HO}_2\cdot$ )、 $\text{H}_2\text{O}_2$  と Cl からミエロペルオキシダーゼにより生じる次亜塩素酸 ( $\text{HOCl}$ )、アルギニンと酸素分子から生じる一酸化窒素 (nitric oxide: NO) などを加え、広義の活性酸素と呼ぶ。

フリーラジカルはきわめて多種多様であり、酸素に不對電子がある酸素ラジカル、炭素に不對電子がある脂質ラジカル、イオウに不對電子のあるチールラジカルなどがある。活性酸素にはフリーラジカルであるものが多い。

活性酸素やフリーラジカルは、あらゆる組織や細胞において種々の要因によって産生される。細胞内のミトコンドリアにおけるエネルギー産生系では、その呼吸鎖から電子が一部漏れ

(数%)、これが酸素に渡りスーパーオキシドが恒常的に生成される。一時的に血流量が低下しその後回復する虚血再灌流では、血流が回復したときにスーパーオキシドなどのフリーラジカルが多く生成される。細菌の侵入などにより炎症が生じると、活性化された好中球やマクロファージからスーパーオキシドやその他の活性酸素が多量に産生される。量的には、この殺菌作用や炎症作用を有する生体防御系細胞での活性酸素産生量が多いと考えられている。活性酸

Table 2-1. 生体にかかわりの深い活性酸素とフリーラジカル

ラジカル		非ラジカル	
HO·	ヒドロキシルラジカル	$^1\text{O}_2$	一重項酸素
HO <sub>2</sub> ·	ヒドロペルオキシラジカル	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	過酸化水素
LO <sub>2</sub> ·	ペルオキシラジカル	LOOH	脂質ヒドロペルオキシド
LO·	アルコキシラジカル	HOCl	次亜塩素酸
·NO <sub>2</sub>	二酸化窒素	O <sub>3</sub>	オゾン
·NO	一酸化窒素		
RS·	チールラジカル		
	O <sub>2</sub> · <sup>-</sup>		スーパーオキシド
	Fe=O		鉄-酸素錯体

文献（二木, 2001）より引用

Table 2-2. 代表的な活性酸素発生系

発生系	区画, その他
[O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 産生系]	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> は細胞膜アニオン輸送系を介して細胞外にも漏出 (1 μM, pH7 での寿命は約5秒, 拡散距離は100 μm)
ユビセミキノン	ミトコンドリア
NADH オキシダーゼ	ミトコンドリア
アルデヒドオキシダーゼ	肝臓
NADPH-シトクロム c レダクターゼ	ミクロソーム
P-450	ミクロソーム
グルタチオンレダクターゼ	細胞質, ミトコンドリア
ジアミンオキシダーゼ	小腸 (腎にも多い)
ペルオキシダーゼ/複合体III	
インドールアミン酸素添加酵素	小腸 (肝にはない)
シトクロム c	ミトコンドリア
シトクロム b <sub>5</sub>	細胞膜
NADPH オキシダーゼ (ミエロペルオキシダーゼ)	好中球, マクロファージ, 細胞膜, 細胞外 O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ; 殺菌 (好中球などの食胞内で反応性の高いHClOを形成)
キサンチンオキシダーゼ	血管内皮細胞, 虚血障害, 細胞質, O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 尿酸
オキシヘモグロビン	赤血球内, 溶血時の細胞外液, 溶血性腎毒性
オキシミオグロビン	筋肉細胞, 外傷時の細胞外液, 腎毒性
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 産生系]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> は両親媒性分子として膜脂質層を透過可能 (分解酵素がなければきわめて安定で寿命は長い)
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> の不均化反応	SOD および非酵素的反応
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> の還元反応	GSH やビタミン C との反応
アミノ酸オキシダーゼ	L-およびD-型アミノ酸, ペルオキシゾーム
[HO <sup>•</sup> 産生系]	高反応性(70n秒~200 μ秒)のゆえに, 拡散距離は小さく (20nm), 産生局所で非特異的に反応する. したがって, これに特異的なスカベンジャーと考えられている物質も 生体内では効果が低い
遷移金属イオンによる還元 (Fe <sup>2+</sup> , Cu <sup>+</sup> によるフェントン反応)	ATP-Fe, ADP-Fe, Fe-ascorbate, O <sub>2</sub> <sup>-</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 系
放射線照射	水の分解

文献 (佐藤ら, 1994) より引用

素発生系を Table 2-2 に示した。

### 2.1.2 活性酸素の作用

活性酸素の多くは、生体内の様々な代謝を制御すると同時に、過剰産生により非特異的に生命機構を破壊し、組織細胞障害を誘起することが知られている。紫外線、薬物、金属、虚血再灌流、ストレスなど、様々な要因が引き金となって産生された活性酸素やフリーラジカルは高い化学反応性を有することから、脂質、タンパク質、糖、DNAなどを攻撃し、脂質や糖質の酸化、タンパク質の変性、酵素の不活性化、DNAの主鎖切断、塩基の修飾などを引き起こす。その結果として生体膜の損傷、遺伝子の傷害が誘起され、種々の疾病をはじめ発癌、老化にまでいたる (Fig. 2-1)。

一方、これら活性酸素やフリーラジカルは生体内の様々な代謝を制御し、生体内において有効に利用されている。血中や組織中の食細胞である好中球、好酸球、単球、マクロファージなどは、外敵に対する生体防御反応として活性酸素を利用する。また、活性酸素や酸化ストレスによる heat shock protein、スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase: SOD)、カタラーゼなどの抗酸化酵素や各種タンパク質の遺伝子発現、過酸化水素による nuclear factor kappa B や activator protein-1 の作用調節、NOによるグアニル酸シクラーゼの活性化や呼吸酵素の制御など、重要な代謝制御や遺伝子発現に活性酸素が関与することから、活性酸素がシグナル伝達の調節因子として機能しうることが示唆されている (内海ら, 1996)。

### 2.1.3 生体内の抗酸化システム

生体内には、活性酸素やフリーラジカルの攻撃、それによる障害に対して、いくつかの細胞内外の抗酸化物質や抗酸化酵素間の組織化された相乗作用に依存する防御機構が備わっている。その防御機構は、①活性酸素・フリーラジカルの生成を抑制する、②活性酸素・フリーラジカルを速やかに消去、捕捉、安定化する、③生じた損傷を修復し、損失を再生する、④必要に応じて防御機構を誘導し、特定の場に抗酸化酵素などを遊走させるといったステップから成り立つ (Table 2-3) (二木, 1994, 二木, 2001)。これら抗酸化システムは、低分子化合物と、酵素やタンパク質といった高分子化合物が担っている。

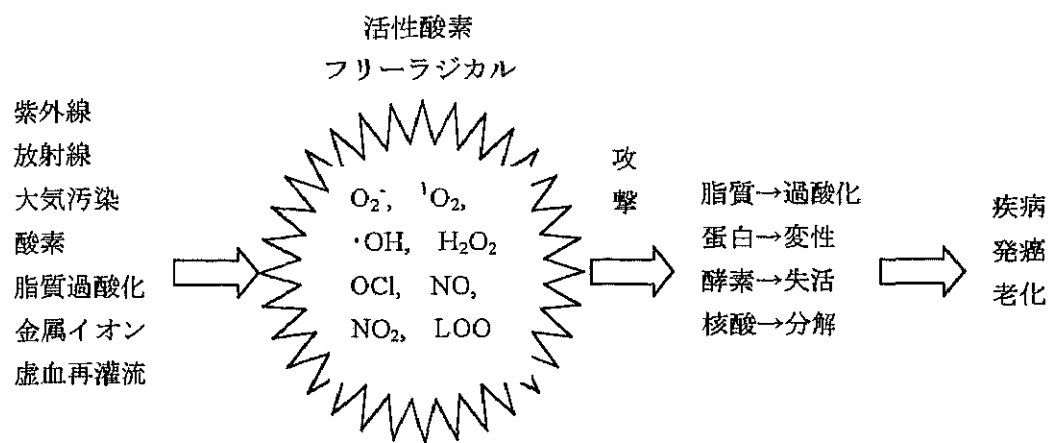


Fig. 2-1. 活性酸素・フリーラジカルによる生体傷害作用

文献 (近藤, 1992) より引用

Table 2-3. 機能からみた生体の酸化傷害に対する防御システム

I. 予防的抗酸化物 (Preventive antioxidants) : フリーラジカル, 活性酸素の生成の抑制	
(a) ヒドロペルオキシド, 過酸化水素の非ラジカルの分解	
カタラーゼ	過酸化水素の分解: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
グルタチオンペルオキシダーゼ (細胞質)	過酸化水素, 脂肪酸ヒドロペルオキシドの分解: $\text{LOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
グルタチオンペルオキシダーゼ (血漿)	過酸化水素, リン脂質ヒドロペルオキシドの分解
リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ	リン脂質ヒドロペルオキシドの分解: $\text{PLOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{PLOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
ペルオキシダーゼ	過酸化水素, 脂質ヒドロペルオキシドの分解: $\text{LOOH} + \text{AH}_2 \rightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{A}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$
グルタチオン-S-トランスフェラーゼ	脂質ヒドロペルオキシドの分解
(b) 金属イオンのキレート化, 不活性化	
トランスフェリン, ラクトフェリン	鉄イオンの安定化
ハプトグロビン	ヘモグロビンの安定化
ヘモペキシン	ヘムの安定化
セルロプラスミン, アルブミン	銅イオンの安定化, 鉄イオンの酸化
(c) 活性酸素の消去, 不均化	
スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)	スーパーオキシドの不均化: $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
カロテノイド	一重項酸素の消去
II. ラジカル捕捉型抗酸化物 (Radical scavenging antioxidants) : ラジカルを捕捉して連鎖開始反応を抑制し, また連鎖成長反応を断つ	
水溶性	
ビタミンC, 尿酸, ビリルビン, アルブミン	水溶性ラジカルの捕捉, ビタミンEなど脂溶性ラジカル捕捉型抗酸化物の再生
脂溶性	
ビタミンE, ユビキノール, カロテノイド	脂溶性ラジカルおよび水溶性ラジカルの捕捉安定化
III. 修復・再生機能	
リパーゼ, プロテアーゼ, DNA修復酵素などによって損傷した膜脂質, タンパク質, 遺伝子の修復, アシルトランスフェラーゼなどによる再生	
IV. 適応機能	
(1) 必要なとき, 必要に応じて抗酸化酵素などを産生し, 必要な量を必要な場に遊走させる	
(2) 酸化ストレスに応じて防御機能を高める (ホルミシス効果)	

文献 (二木, 2001) より引用

低分子の抗酸化物質には、水溶性のビタミンC、GSH、尿酸、リポ酸など、脂溶性のビタミンE（トコフェロール類）、カロテノイド類、ビリルビンなどがあり、相互に作用しながら全体としての抗酸化機能を有機的に増強している。

一方、代表的な抗酸化酵素には、スーパーオキシドを速やかに不均化して過酸化水素に代謝するSOD（Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、EC-SOD）、過酸化水素を分解するカタラーゼ、GSHをコファクターとし過酸化水素と過酸化脂質を分解するGSHペルオキシダーゼなどがある。

## 2.2 血管内抗酸化システム

動脈硬化のリスク軽減は保健・医療の場における重要な課題である。動脈硬化の進展と酸化ストレスとの強い関連性を考えると、酸化ストレス下における血管内抗酸化システムを検討することは意義深い。

赤血球には高濃度の抗酸化酵素ならびに抗酸化物質が存在するのに対し、血漿のそれらの濃度は細胞内と比べるときわめて低い（Table 2-4）（二木, 1994）。血漿は酸素濃度が高く、酸化されやすいリポタンパク質、金属イオンが存在する。血漿では、種々のタンパク質が金属と結合し遊離の金属イオン濃度をきわめて低く保つことでラジカルの発生を抑制している。また、細胞内と比較すると濃度は低いもののラジカルを捕捉安定化する抗酸化物質が多種含まれており、活性酸素・フリーラジカルに対し優れた抗酸化ネットワークシステムを構築し、血管の内皮細胞やリポタンパク質を保護していると考えられている（Stocker and Frei, 1991, 二木, 1994, 加柴および井上, 1996）。

例えば、ヒト血漿では、ビタミンC（アスコルビン酸）、SH基、尿酸、ビリルビンなどの多様な抗酸化物質が存在している。Fig. 2-2に*in vitro*での検討例を示す。血漿中でラジカルを発生させると、各種の抗酸化物質の中でまずアスコルビン酸が消失し、次いでSH基、ビリルビン（99%以上がアルブミンに結合）、尿酸、 $\alpha$ -トコフェロールの順に消失し、アスコルビン酸が消費されると脂質過酸化反応が開始されることが示されている（Wayner et al, 1987, Frei et al, 1988）。ここでいう血漿SH基は、その大部分がアルブミンのシステイン残基であり、その血漿濃度は0.5~0.7 mMと、ビタミンCなどの他の抗酸化物質の数倍から数10倍に達する。このp-SH基は、血漿に生じるペルオキシラジカル（Wayner et al, 1987, Frei et al, 1988）、HOCl

Table 2-4. ヒト血漿中の抗酸化物質の標準的濃度

抗酸化物質	濃度	
	a)	b)
1) 抗酸化酵素	<u>U/ml</u>	<u>/ml</u>
GSH ペルオキシダーゼ	0.4	
GSH トランスフェラーゼ	0.005	
GSSG リダクターゼ	0.03	0.005 – 0.034 U
カタラーゼ		2.0 – 4.8 mg
SOD	5 – 10	
2) タンパク質	<u>mg/ml</u>	<u>mg/ml</u>
トランスフェリン	1.8 – 3.3	2.0 – 4.0
ラクトフェリン	0.0002	
ハプトグロビン	0.5 – 3.6	3.8 – 7.8
ヘモペクシン	0.6 – 1.0	0.5 – 1.15
セルロプラスミン	0.18 – 0.4	0.15 – 0.63
アルブミン	50	35 – 55
3) 抗酸化ビタミンなど	<u>nmol/ml</u>	<u>mg/100 ml</u>
ビタミン C	30 – 150	0.20 – 1.40
尿酸	160 – 450	4.3 – 5.7
ビリルビン	5 – 20	0.3 – 1.1
グルコース	4500	49 – 95
ビタミン E	15 – 40	0.50 – 1.60
ユビキノール 10	0.4 – 1.0	
ユビキノン		0.04 – 0.115
リコピン	0.5 – 1.0	
$\beta$ -カロテン	0.3 – 0.6	0.020 – 0.20

- a) Stocker R and Frei B: Endogenous antioxidant defenses in human blood plasma. "Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants" (H Sies, ed), Academic Press, London, 213-245 (1991).
- b) 日本生化学会編, "生化学データブック", I, 東京化学同人, 東京 (1979).

文献 (二木, 1994) より引用



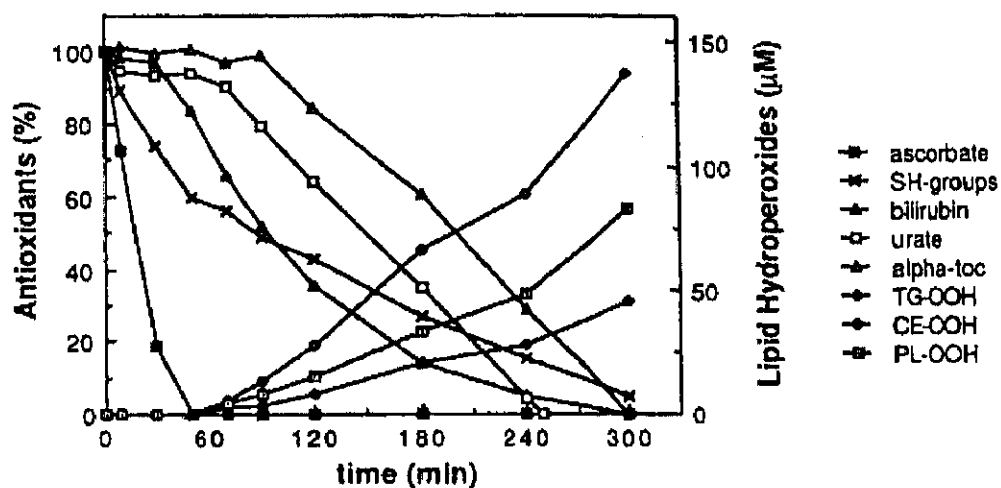


Fig. 2-2. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human plasma exposed to the water-soluble radical initiator AAPH.

Plasma was incubated at 37°C in the presence of 50 mM AAPH. The levels of the antioxidants ascorbate (initial concentration, 72 μM), sulfhydryl groups (SH-groups, 425 μM), bilirubin (18 μM), urate (225 μM), and α-tocopherol (alpha-toc, 32 μM) are given as % of the initial concentrations. The levels of the lipid hydroperoxides triglyceride hydroperoxide (TG-OOH), cholesterol ester hydroperoxide (CE-OOH), and phospholipid hydroperoxide (PL-OOH) are given in μM concentrations (right ordinate). One experiment typical of four is shown.

文献 (Frei et al, 1988) より引用

を消去 (Halliwell, 1988) することが報告されている。これら *in vitro* の結果から、p-SH 基が抗酸化物質として機能していると考えられている (Wayner et al, 1987, Frei et al, 1988, Halliwell, 1988)。

## 2.3 SH 基が果たす役割

### 2.3.1 SH 基とは

SH 基は、活性部位に-SH 残基をもつ有機の硫黄誘導体 (mercaptans、C-SH) であり、チオール基ともよばれる。GSH、システイン、ジヒドロリポ酸といった低分子 SH 基と、高分子化合物の p-SH 基に分類される。有酸素生命体のいたる所に遍在し、還元剤として抗酸化防御システムの中核的な役割を担っているだけでなく、タンパク質の合成や構築、レドックス-感受性シグナル伝達、細胞成長や増殖、プログラムされた細胞死の制御、生体異物代謝、免疫制御といった多くの機能を有している (Meister, 1983, Schafer and Buettner, 2001)。

### 2.3.2 GSH

代表的な低分子 SH 基である GSH は、グルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチド ( $\gamma$ -グルタミル-システニルグリシン) であり、細胞内では mM オーダー (2~10 mM) で存在する (Fig. 2-3)。システイン残基が遊離の状態である還元型と、酸化され S-S 結合した GSSG がある。このチオール/ジスルフィド交換 (thiol disulfide exchange:  $\text{SH} \rightleftharpoons \text{S-S}$ ) 反応によって酸化還元を機構を営む。細胞内の還元状態の維持、デヒドロアスコルビン酸のアスコルビン酸への酵素的還元、ビタミン E ラジカルのビタミン E への再生への関与、GSH ペルオキシダーゼのコファクターとしてヒドロペルオキシドの還元に寄与、過酸化水素や一重項酸素などの消去などの機能を有する。

肝臓で合成された GSH は血漿中と胆汁中に放出される。血漿 GSH は、腎臓、肺、骨格筋、脳などに存在する膜結合の  $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチターゼ ( $\gamma$ -glutamyltranspeptidase:  $\gamma$ -GTP) によって分解され、 $\gamma$ -グルタミル回路を経て再び GSH に合成される。このような肝腎の特異的代謝輸送系 (臓器相関サイクル) を介して、GSH は血中および細胞外区画において酸化還元制御と抗酸化機能を発揮すると同時に、各種の酸化ストレス存在時に混合ジスルフィ

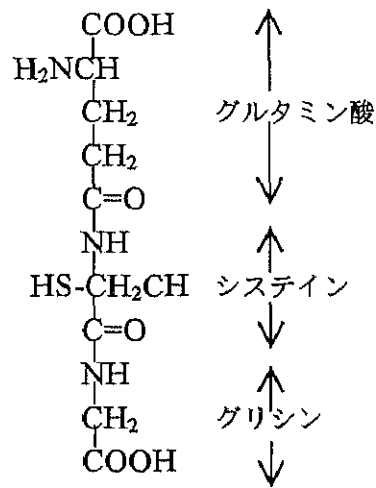


Fig. 2-3. GSH 分子

ト形成を介して種々の酵素活性を変化させ、合目的的な代謝応答を可能にしている (Fig. 2-4) (井上, 1987b, 坂内および立石, 1988, 石川および松田, 1988, 近藤, 1988, 谷口, 1988)。

GSH は、細胞内において GSH ペルオキシダーゼなどの酵素反応や、GSH の自動酸化あるいはラジカル反応によって GSSG に酸化される。GSSG はタンパク質の SH 基を修飾し、種々の酵素活性に変化をもたらす、細胞障害を引き起こす。通常、GSSG は GSH レダクターゼの作用によって NADPH から 1 電子還元を受けて速やかに GSH に酵素的に再還元されるため、細胞内の GSSG 濃度はきわめて低く、GSH レベルの 2% 以下に保たれている。しかし、より強い酸化ストレスが生じた結果 GSSG 還元割合がその形成割合に見合わなくなった場合、結果として細胞内の GSSG の蓄積が生じる可能性がある。細胞内の高濃度の GSSG は細胞毒性となることから、赤血球、心筋細胞、骨格筋細胞ではエネルギー依存メカニズムによって過剰な細胞内 GSSG を細胞から汲み出し、細胞内濃度を下げる機構が存在することが示されている (Srivastava and Beutler, 1969, Ishikawa et al, 1986, Sen et al, 1993)。

なお、システインは還元型では不安定であるため、多くは生体内において 2 分子のシステインが酸化され S-S 結合したシスチンとして存在する。

### 2.3.3 タンパク性 SH 基

細胞内タンパク質のシステイン残基の多くは遊離の SH 基で存在し、S-S 結合を形成しているものは分子内部の残基に限られる。それに対し、血漿タンパク質のほとんどは分子内または分子間 S-S 結合を形成、その高次構造を安定化する要となっている。

血漿のメジャータンパク質であるアルブミンは (66 kDa)、約 40% が血漿に、残りの 60% が細胞外間腔に存在する。ヒト血漿では、全血漿タンパク質 (7.5~8.0 g/dl) の約 50~60% (4.2~5.1 g/dl) が存在し、最も量的に多い。肝臓で約 200 mg/kg/日合成されるが、この量は肝臓が日々産生する全タンパク質の約 25% に相当する。アルブミンは、血漿の膠質浸透圧の保持、輸送タンパク質として生体内における種々の物質の結合や運搬、生体内における予備アミノ酸としての働きなど、さまざまな生理機能を担っている (大久保, 1999)。

ヒト血漿アルブミンは分子内に 35 個のシステインをもつ。このうち 34 個が 17 個の分子内 S-S 結合を呈し、分子の安定化作用に重要な役割を果たしている。残りの N 末端から 34 番目

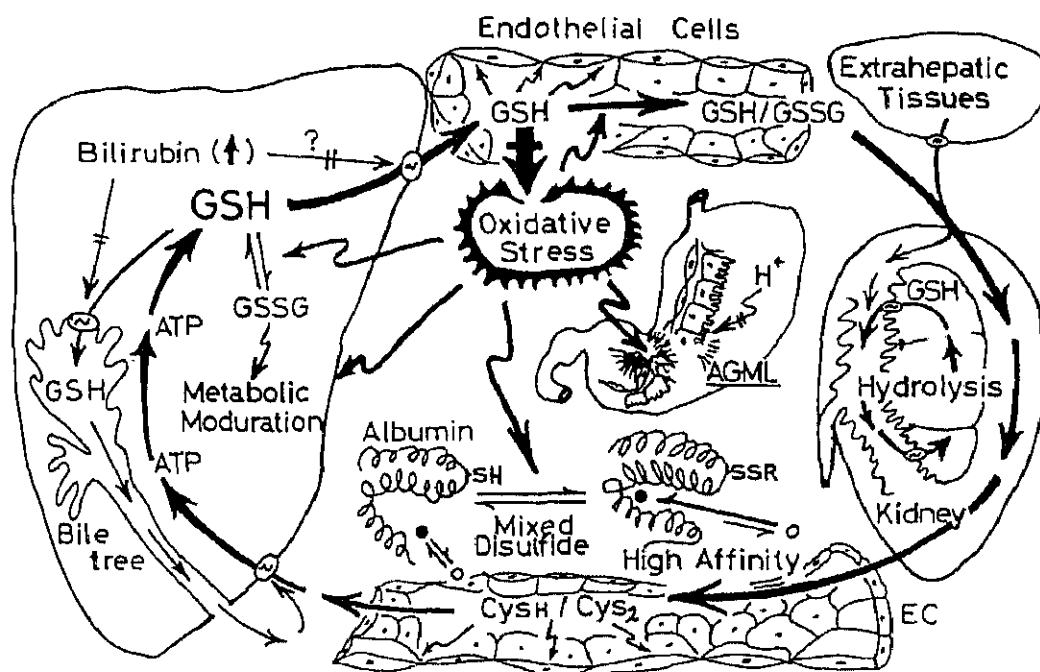


Fig. 2-4. Interorgan and intraorgan cycles of GSH

Since  $\gamma$ -GTP and peptidases that hydrolyze cysteinyl-glycine are highly enriched on the apical membrane surface of kidney, small intestine, and bile-tree cells, luminal GSH and related tripeptides are also degraded to their constituent amino acids.

文献 (Inoue et al, 1995) より引用

のシステイン残基のみが遊離の SH 基(Cys-34)として存在する。その不安定性ゆえにメルカプト型 (Cys-34 が還元型) およびノンメルカプト型 (Cys-34 が GSH やシステインと混合ジスルフィドを形成) の2つの分子状態のあいだを揺れ動くことが判明している (井上, 1987b, 大久保, 1999)。また、その存在比は生体の酸化還元状態により大きく変動し、酸化ストレスに曝された際にはノンメルカプト型が増加することが示唆されている。正常な成人男性では血漿アルブミンのうち約 75%が還元型、残りの 25%が酸化型であること、加齢に伴い酸化型アルブミンが増加すること、慢性の肝疾患患者では還元型が減少し酸化型アルブミンが増加したことが報告されている (Sogami et al, 1984, 井上, 1987b, Era et al, 1995)。また、アルブミンの各種のリガンド結合能は、Cys-34 の酸化還元状態と関係することが示されている (井上, 1987b)。井上 (1987b) によれば、アルブミンは“生体の酸化ストレスに対応して代謝応答すべく、分子内に1個だけ揺れ動く遊離のシステイン残基を残している”という。

一方、赤血球タンパク質の大部分を占めるヘモグロビン (hemoglobin: Hb) は、ヘムを補欠分子族とし、これにアポタンパク質のグロビンが結合したものであり、循環系に分布して酸素の運搬を担う。ヘモグロビンはヘム鉄が2価の状態では  $O_2$  を可逆的に結合する。 $O_2$  を結合するとオキシヘモグロビン、脱酸素されるとデオキシヘモグロビン、ヘム鉄が酸化されて3価になるとメトヘモグロビンとよばれる。

ヒトヘモグロビン (64.5 kDa) は、 $\alpha$ 鎖系と非 $\alpha$ 鎖系 ( $\beta$ 鎖) の2個ずつが対になったサブユニット構造をもつ四量体である。 $\beta$ サブユニットに1つの遊離のシステイン残基が存在している (Cys-93  $\beta$ )。ヒト赤血球ではヘモグロビンが約 4mM 含まれることから、ヘモグロビン由来の遊離のシステイン残基は約 8mM 存在することになる。

動物実験によって、ヘモグロビンが酸化ストレス下において、GSH などの低分子 SH 基と S-S 結合を生じること、状況に応じて Hb-S-SG から  $SH_2 \rightleftharpoons S-S$  反応によって GSH が放出されることが報告されている (近藤, 1988)。

## 2.4 運動によって誘起される酸化ストレス

運動時にはさまざまな過程で活性酸素・フリーラジカルの産生が増大する。酸素消費量が安静時の約 10~20 倍に増加するため (Åstrand and Rodahl, 1977)、亢進された好氣的エネルギー

代謝の過程でミトコンドリア電子伝達系による活性酸素生成が促進される。局所的な虚血再灌流時のヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼ系の代謝過程でのスーパーオキシドの生成促進、炎症時の食細胞や好中球の活性化、カテコールアミンの増加やヘモグロビンの自動酸化による活性酸素生成の亢進などによっても酸化ストレスが高まると考えられている (Jones et al, 1986, Sjodin et al, 1990, Witt et al, 1992, Alessio, 1993, Aruoma, 1994, Ji, 1995, Sen, 1995.)。

1982年、電子スピン共鳴法 (electron spin resonance: ESR) を利用することによって、Daviesら (1982) は、疲労困憊に至る運動を負荷したラットの骨格筋と肝臓中のフリーラジカル検出量が2~3倍に増加したことを証明した (Fig. 2-5)。ヒトでは、酸化生成物や抗酸化物質の測定によって、生体に生じた運動誘発性酸化ストレスが検証されてきた。1978年にDillardら (1978) が報告した中等度の運動負荷による呼気中の脂質過酸化物であるペンタン含量の増加は、ヒトを対象とした運動と酸化ストレスとの関係について述べた初期の報告である。

## 2.5 運動誘発性酸化ストレスによるSH基の変動

### 2.5.1 血中GSH

還元型GSHの減少、酸化型GSSGの増加、あるいはまたGSH/GSSG比のGSSGへの傾きは、酸化ストレスの指標となりうる。1988年、Gohilら (1988) によって発表された最大酸素摂取量 (maximum oxygen consumption:  $VO_2\max$ ) 65%の自転車運動負荷による血中GSHの減少にともなうGSSG濃度の増加を表したグラフ (Fig. 2-6) は、運動によってGSHの酸化が亢進することを明示している。このような複数のヒトを対象とした運動負荷実験によって、運動が血中GSH酸化を誘起することが支持されている (Lew et al, 1985, Duthie et al, 1990, Ji and Fu, 1992, Viguie et al, 1993, Sen et al, 1994a, Sen et al, 1994c, Vina et al, 1995, Tessier et al, 1995, Laaksonen et al, 1996)。

SH基のジスルフィドへの酸化は酸化ストレスの特異的なマーカーとなるが、運動中にみられるヒト血中GSH酸化を検討した研究は限られたものであり、運動の種類や強度、持続時間、対象者のトレーニング状況によって必ずしもその結果は一致していない。男性自転車競技者を対象とした $VO_2\max$ 70%の運動負荷 (>2時間) (Ji et al, 1993)、男性対象者の連続した3日間の繰り返しのある自転車運動 ( $VO_2\max$ 65%、90分) (Viguie et al, 1993)、疲労困憊に至るラン

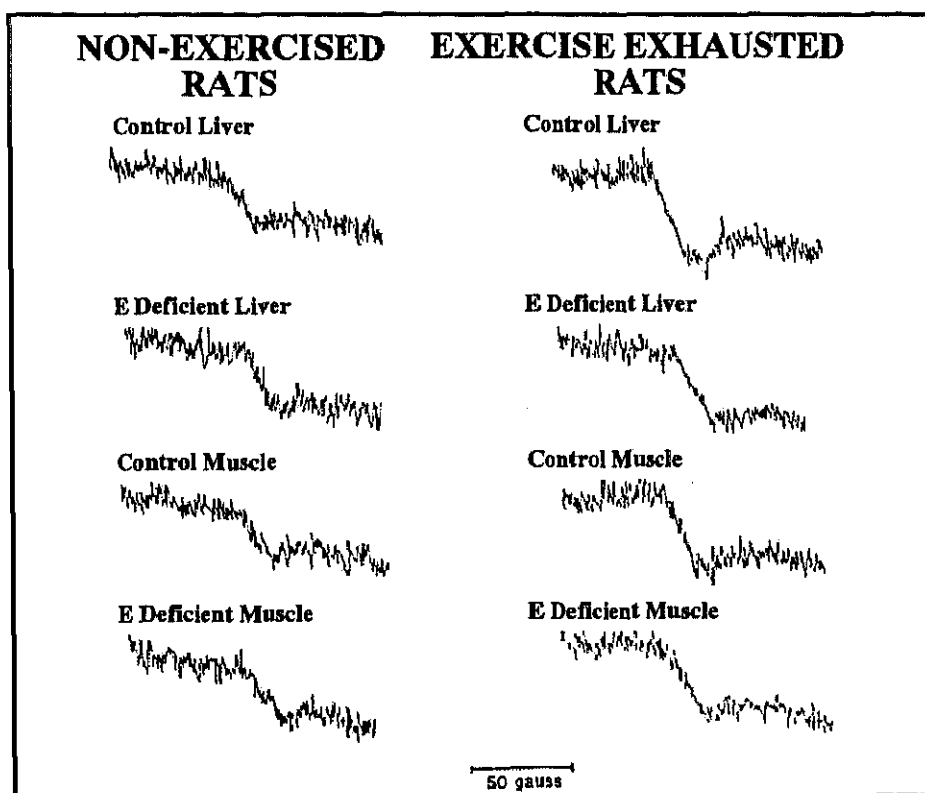


Fig. 2-5. Free radical signals ( $g=2.004$ ) observed by EPR in muscle and liver homogenates, from control and vitamin E deficient rats, at rest or following the endurance exercise test to exhaustion.

EPR settings: power 10 mW, modulation 5 gauss, frequency 9.51 GHz, time constant 0.25 s, temperature 25°C.

文献 (Davies et al, 1982) より引用



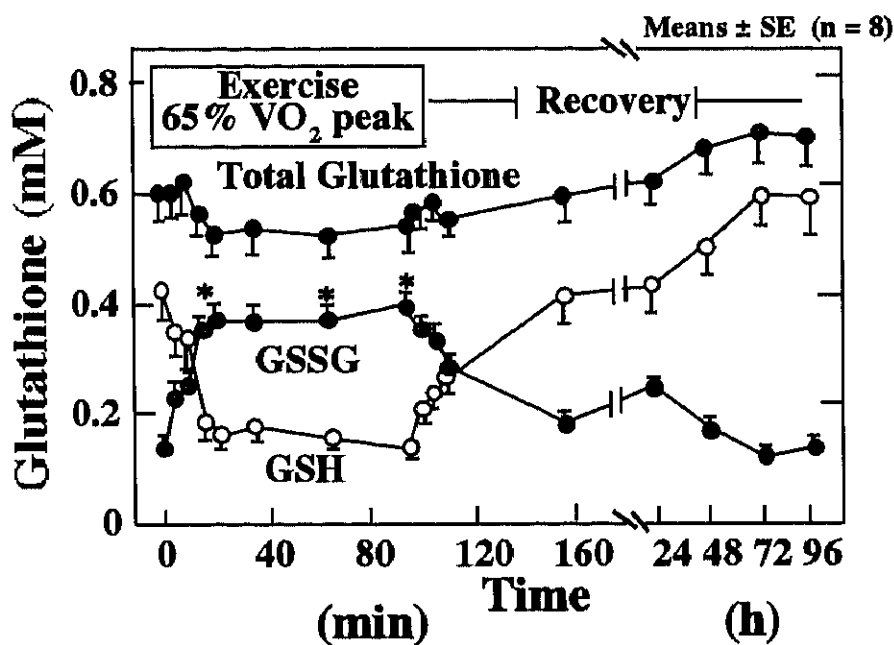


Fig. 2-6. Human blood glutathione levels before, during, and after cycle ergometer exercise at 65%  $VO_2$  peak.

Eight moderately trained male volunteers were exercised to peak  $O_2$  consumption ( $VO_2$  peak) and for 90 min at 65% of  $VO_2$  peak on a cycle ergometer. During exercise to  $VO_2$  peak, blood reduced glutathione (GSH) and total glutathione [GSH + GSSG] did not change significantly. During prolonged submaximal exercise, GSH decreased 60% from control, and GSSG increased 100%.

文献 (Gohil et al, 1988) より引用

ニング負荷 (Sastre et al, 1992) では、有意な血中 GSH 酸化を認めることはできなかった。一方、Sen ら (1994c) は、健常な若い男性を対象に 2 種類の最大運動 (平均時間~14 分) ならびに 1 週間後に実施した有酸素および無酸素性作業閾値での 30 分の一過性の運動負荷が血中 GSSG 濃度を著しく上昇させたと同時に、運動強度と酸化ストレスとの間に関連がみられたことを示唆している。このような結果を考えあわせ、Sen ならびに Packer (2000) はその総説の中で、運動は血中 GSH の酸化を促し、結果として GSH/GSSG 比が GSSG に傾くと述べている。

### 2.5.2 その他の組織の GSH

GSH 代謝における肝臓が果たす役割は大きいですが、肝切除ラットモデルを用いた Kretzschmar ら (1992) の検討では、骨格筋も生体全体の GSH のホメオスタシスにおいて重要な役割を果たすことが示されている。実験動物を対象とした研究では、血中以外の骨格筋、心臓、肝臓といった組織 GSH と運動との関連が検討されており、ラットでは明らかに骨格筋ならびに肝臓の GSH 代謝に運動の影響が及ぶ (Sen and Hanninen, 1994b, Leeuwenburgh et al, 1997)。疲労困憊に至るトレッドミル運動は、ラットの血漿、肝臓ならびに腓腹筋や外側広筋といった活動骨格筋の GSH 含量を減少させ (Lew et al, 1985, Sen et al, 1992, Sen et al, 1994a)、GSSG 濃度を増加させた (Sen et al, 1994a)。Hellsten (1994) は、運動誘発性のキサンチンオキシダーゼによるスーパーオキシド産生増加が近隣の骨格筋に酸化ストレスをもたらし、結果として組織 GSH の損失をひき起こすと説明している。

### 2.5.3 タンパク性 SH 基

運動と SH 基に関する研究のほとんどは、GSH 代謝を観察したものであり、p-SH 基に関する検討は限られたものである (Rajguru et al, 1994, Seward et al, 1995)。GSH は細胞内には mM 単位で存在しているが、この量は細胞内の全 SH 基の半分にしか過ぎない (Sen et al, 1997)。タンパク質の SH 残基は、酸化ストレスに対する感受性が高い。安静時においてさえ細胞で消費される総酸素の 0.9% がタンパク質酸化に寄与すると考えられている (Floyd, 1995)。酸化ダメージが生じた変性タンパク質は速やかに分解され排泄される一方、p-SH 基の混合ジスルフ

イド形成は、酸化ストレスに対する応答の一側面と考えることも可能である(井上, 1987b, Inoue et al, 1995)。ヒト血中に存在する SH 基濃度は、血漿では GSH 10  $\mu$ M 未満に対し p-SH 基 0.5~0.7 mM、赤血球では GSH 2 mM に対し p-SH 基 8 mM である。運動誘発性酸化ストレスと血管内 SH 基との関連を明らかにするためには、低分子 SH 基のみならず p-SH 基にも焦点をあてた検討が必要である。