

## 第4章 ヒト血管内 p-SH 基は中等度の運動負荷の影響を受ける (実験1)

### 4.1 緒言

長時間の激しい運動は ROS の産生を増大させ、酸化ストレスをひきおこすことが知られている (Packer, 1997, Ji, 1999, Sen and Packer, 2000)。酸化ストレス下では、細胞内の GSH は酸化され GSSG に速やかに変化する。自転車エルゴメーター運動 (Gohil et al, 1988, Viguie et al, 1993, Sen et al, 1994c) やハーフマラソンレース (Duthie et al, 1990) の負荷では、ヒト血中 GSH が減少し GSSG が増加した。ラットを用いた検討では、疲労困憊に至る運動負荷によって血漿 GSSG が顕著に上昇した (Lew et al, 1985, Sen et al, 1994a)。一方、疲労困憊に至る水泳負荷では、ラットの血漿 SH 基が増加し赤血球膜の p-SH 基が減少した (Rajguru et al, 1994)。血中にみいだされる GSH は、大部分が赤血球内の GSH を意味する。この GSH 濃度は細胞内 SH 基濃度の一部を説明しているにすぎない (Sen et al, 1997)。それにも関わらず、血中の SH 基に関連する運動誘発性酸化ストレスに関するこれまでの研究の大部分は、赤血球 GSH にのみ焦点をあててきた (Gohil et al, 1988, Ji et al, 1993, Viguie et al, 1993, Sen et al, 1994c)。

タンパク質のシステイン残基はきわめて不安定であり、酸化ストレス下において酸化されやすい。ヒト血漿では GSH 濃度がきわめて低いのに対し (5~25  $\mu\text{M}$ )、主にアルブミンに由来する p-SH 基が高濃度存在する (0.5~0.7 mM)。In vitro の検討では、p-SH 基がヒト血漿の抗酸化能に有意に寄与することが示唆されている (Wayner et al, 1987, Frei et al, 1988)。しかし、in vivo におけるその生理的意義は、未だ不明である。

一方、ヒト赤血球には大部分がヘモグロビンの遊離のシステイン残基に由来する p-SH 基が mM 単位で存在する (~8 mM)。酸化ストレスに対する初期の細胞応答では、protein S-thiolation がみられることが報告されている (Thomas et al, 1995, Klatt and Lamas, 2000)。しかし、生体内における運動誘発性酸化ストレス下における赤血球の Hb-SH 基の酸化・還元は知られていない。

p-SH 基の酸化・還元は、GSH やシステインといった低分子 SH 基の酸化還元状態と関連する。運動による ROS の過剰な生成が、ヒト血中において GSH のみならず、細胞内外の p-SH 基の代謝にも影響をもたらす可能性が考えられる。本研究では、非鍛錬者である健常な女性対

象者に、個人の換気性作業閾値 (ventilatory threshold: VT) レベルの強度での 30 分ランニングを負荷し、血中の低分子 SH 基と併せて p-SH 基の観察を行うことを目的とした。

## 4.2 方法

### 4.2.1 対象者

本研究では、実験前 6 カ月間にわたり運動習慣を持たない 6 名の健常な成人女性を対象とした (年齢  $26.8 \pm 2.4$  歳、平均土標準誤差 (standard error: SE) ; 身長  $162.7 \pm 1.5$  cm ; 体重  $56.9 \pm 2.1$  kg ; 体脂肪率  $22.1 \pm 2.2\%$ )。いずれの対象者も非喫煙者であり、ビタミンサプリメントや薬を服用していなかった。研究に先立ち、トレッドミルを用いた漸増的負荷法にて運動負荷を実施し、各自の VT レベルを決定した。

### 4.2.2 実験計画

実験のプロトコールは、人を対象としたヘルシンキ宣言に則り、国立健康・栄養研究所の倫理委員会にて審査を経た。運動負荷テストの 1 週間後、各対象者は各自の VT レベルの走速度にて 30 分トレッドミルランニングを実施した。対象者には実験当日、ランニング 4 時間前に米を主とする朝食 (脂質をほとんど含まないもの) を摂るよう依頼した。ランニングの 30 分前、ランニング後 5 分、1 時間、2 時間、24 時間後に肘正中皮静脈より採血を行った。血液凝固阻止剤にはヘパリンを使用した。ランニング前後において対象者が摂ったものは水のみであった。

### 4.2.3 試薬ならびに分析方法

試薬はいずれも和光純薬 (株) (大阪) のものを用いた。

低分子 SH 基の測定では、得られた全血の一部を  $10,000 \times g$  で 2 分間遠心分離して得た血漿に、正確に採血 5 分後の時点で 5%スルホサリチル酸 (sulfosalicylic acid: SSA) を加え除タンパクを行った。血漿中の GSH ならびにシステインは、電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) にて定量した (白金電極で電極電位 +600 mV、model S 875、イリカ社、京都) (芝田ら, 1988)。HPLC カラムは QC パック

C18 カラム (4.5×250 mm、イリカ社、京都)、移動相は 0.1 M potassium phosphate ならびに 0.04 M phosphoric acid を含む 3.5 mM aqueous heptanesulfonic acid (pH 2.4) を用いた。

残りの全血は 5,000×g にて 10 分間遠心分離した。赤血球の低分子ならびに p-SH 基の測定のために、血球成分を倍量の生理食塩水にて洗浄した。赤血球低分子 SH 基の測定では、赤血球成分 0.1 ml に生理食塩水 0.1 ml ならびに 5% トリクロロ酢酸 0.8 ml を加え酸処理したものを、10,000×g にて 5 分間遠心分離した。得られた上清 0.1 ml に 0.143 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 0.9 ml ならびに 6.3 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む 2 mM 5,5'-ジチオピス (2-ニトロ安息香酸) (5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid: DTNB) を加え、412 nm にて比色定量した。DTNB のモル吸光係数は  $13.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  を採用した (Sedlak and Lindsay, 1968)。赤血球の総 SH 基量の測定では、赤血球成分 0.1 ml に 0.143 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 0.8 ml、6.3 mM EDTA を含む 2 mM DTNB、1% ラウリル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS) を加えよく混和、とりわけた 0.05 ml にエタノール 0.95 ml を加え 10,000×g にて 5 分間遠心分離を行った。上述の手法にて上清を 412 nm にて比色定量した。赤血球の p-SH 基量は、総 SH 基量と低分子 SH 基量との差から算出した。

血漿 p-SH 基濃度は、DTNB を利用した Sedlak と Lindsay の方法 (Sedlak and Lindsay, 1968) を若干変更し測定した。すなわち、血漿サンプル 0.2 ml に 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.2) -20 mM EDTA 0.3 ml を加えた後、10 mM DTNB 20  $\mu\text{l}$  ならびに 5% SDS 0.15 ml を加えた。最終的に、DTNB 添加 15 分後に、サンプルブランク (DTNB 無) およびリージェントブランク (DTNB 有) を対照に 412 nm にて比色定量した。

血漿シスチン濃度の測定にはアミノ酸分析装置 (Shimadzu LC-VP アミノ酸自動分析装置、島津製作所、京都) を用いた。血漿タンパク質濃度は BCA Protein Assay Kit (Pierce, IL, USA) (Smith et al, 1985)、アルブミン濃度はアルブミン B-テストワコーキット (和光純薬 (株) (Doumas et al, 1971) によって測定した。血漿クレアチンキナーゼ (creatin kinase: CPK) 活性は自動分析装置 (HITACHI 7450E、日立 (株)、茨城) を用い比色法 (Szasz et al, 1976) にて測定した。赤血球ヘモグロビン濃度の測定では、ヘモグロビンテストキット (和光純薬 (株) ) (Oshiro et al, 1981) を用いた。全ての分析は採血後その日のうちに終えた。

#### 4.2.4 統計処理

全ての値は平均±SEにて示した。統計処理は、繰り返しのあるANOVAテストでFisher's Protected Least Significant Differenceによる事後の処理を用いて、ランニング前の値と比較した。 $p<0.05$ をもって有意差有りとした。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 血漿タンパク質濃度ならびにCPK活性

血漿タンパク質ならびにアルブミン濃度の変動をTable 4-1に示した。いずれもランニング5分後有意に上昇した後、1時間後には初期値に回復した。血漿CPK活性はランニング前の濃度と比較し、24時間後に有意に高い活性(+97%、 $p<0.05$ )を示した(Table 4-1)。

#### 4.3.2 運動後の赤血球SH基の変動

赤血球低分子SH基濃度は、ランニング前( $6.10\pm 0.26\ \mu\text{mol}\cdot\text{g of Hb}^{-1}$ )と比較してランニング5分後( $5.40\pm 0.22\ \mu\text{mol}\cdot\text{g of Hb}^{-1}$ 、-11%、 $p<0.05$ )に有意に減少した(Fig. 4-1、左図)。同様に、赤血球p-SH基濃度もランニング5分後に有意に減少した( $36.4\pm 1.2$ から $32.5\pm 1.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{g of Hb}^{-1}$ 、-11%、 $p<0.01$ ) (Fig. 4-1、右図)。赤血球の低分子SH基ならびにp-SH基はいずれも2時間後には初期値まで回復した。低分子SH基と比較して、p-SH基の変動はより著しいものであった。

#### 4.3.3 運動後の血漿SH基の変動

血漿GSH、システイン、シスチンの濃度をTable 4-1に示した。GSHならびにシスチンには有意な運動負荷の影響は観察されなかった。血漿システイン濃度はランニング24時間後に有意に増加したが、初期値からの変動量はわずかなものであった。GSH、システイン、シスチンの初期濃度はいずれも報告値の範囲内であった(Hack et al, 1998, Jones et al, 2000)。

血漿p-SH基濃度は、Fig. 4-2に示したようにランニング前( $8.18\pm 0.30\ \mu\text{mol}\cdot\text{g of protein}^{-1}$ )に比べランニング5分後( $7.77\pm 0.32\ \mu\text{mol}\cdot\text{g of protein}^{-1}$ 、-4.8%、 $p<0.05$ )、1時間後( $7.84\pm 0.26\ \mu\text{mol}\cdot\text{g of protein}^{-1}$ 、-3.9%、 $p=0.10$ )、2時間後( $7.77\pm 0.23\ \mu\text{mol}\cdot\text{g of protein}^{-1}$ 、-4.8%、 $p<0.05$ )

Table 4-1. Changes in human (6 untrained female) plasma levels of proteins, and selected amino acids after the 30-min treadmill running.

	Pre-running	Post-running			
		0h	1h	2h	24h
Protein (mg·ml <sup>-1</sup> )	70.6 ± 1.3	76.2 ± 1.1 **	72.4 ± 1.4	72.0 ± 1.8	73.0 ± 0.6*
Albumin (mg·ml <sup>-1</sup> )	41.2 ± 1.6	44.0 ± 1.1**	42.2 ± 1.1	42.5 ± 1.1*	42.8 ± 0.9*
GSH (μM)	2.3 ± 0.6	2.6 ± 0.7	2.2 ± 0.6	2.2 ± 0.7	3.5 ± 0.8
Cysteine (μM)	6.1 ± 0.5	5.9 ± 1.0	6.3 ± 1.2	4.9 ± 1.0	8.0 ± 1.0*
Cystine (μM)	58.0 ± 3.2	59.7 ± 3.1	60.9 ± 2.6	58.2 ± 2.7	58.2 ± 2.8
CPK (U·l <sup>-1</sup> )	96 ± 7	112 ± 9	113 ± 9	120 ± 12	201 ± 69*

Average ± SE are shown. \* and \*\* show the significant differences ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively) from the pre-running value as analyzed by repeated-measures ANOVA with post hoc test.

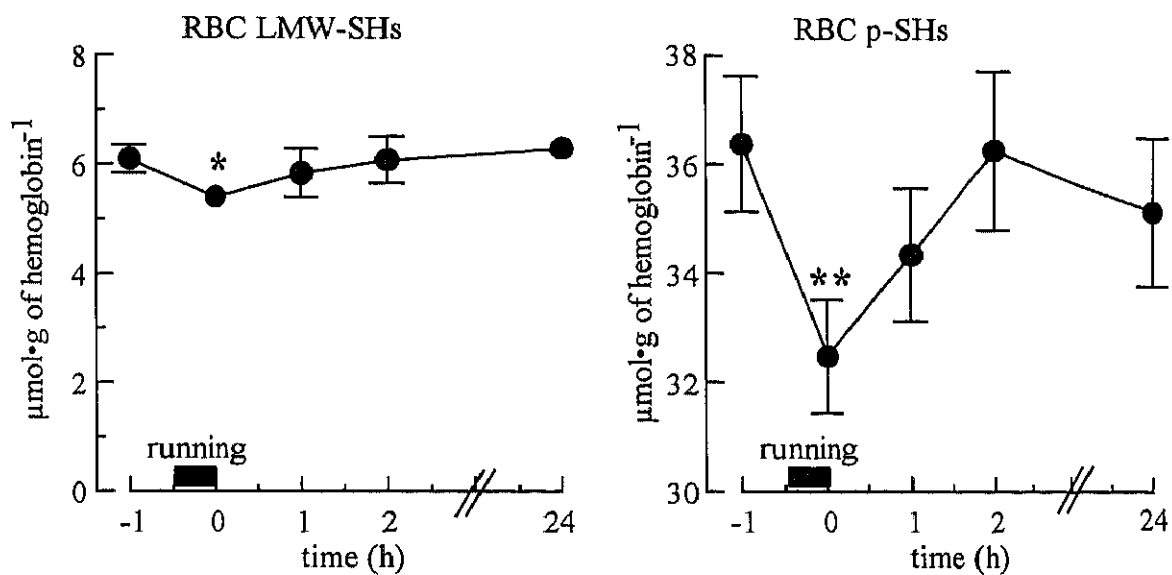


Fig. 4-1. Changes in human (6 untrained female) RBC levels of LMW- and HMW-SHs after the 30-min treadmill running.

Time "-30 min" corresponds to the start time of the running. Blood samples were collected at 30 min before the running and at 5 min, 1 h, 2h, and 24 h after the running. The values are expressed as mean  $\pm$  SE. \* and \*\* show the significant difference ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) from the pre-running value as analyzed by repeated-measures ANOVA with post hoc test.

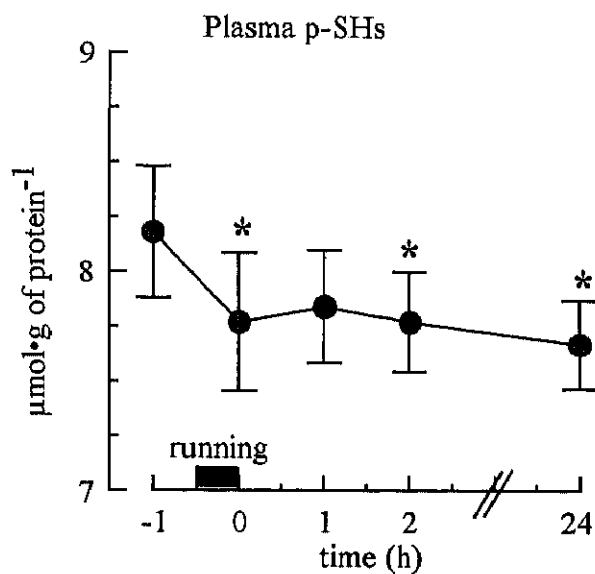


Fig. 4-2. Changes in human (6 untrained female) plasma levels of p-SHs after the 30-min treadmill running. Time "-30 min" corresponds to the start time of the running. Blood samples were collected at 30 min before the running and at 5 min, 1 h, 2h, and 24 h after the running. The values are expressed as mean  $\pm$  SE. \* shows the significant difference ( $p < 0.05$ ) from the pre-running value as analyzed by repeated-measures ANOVA with post hoc test.

と減少した。この血漿 p-SH 基の低値は 24 時間後 ( $7.67 \pm 0.20 \mu\text{mol} \cdot \text{g of protein}^{-1}$ 、-6%、 $p < 0.05$ ) まで継続して観察された。

#### 4.4 考 察

本研究では、非鍛錬者である健常な女性対象者が各自の VT レベルの強度で 30 分トレッドミルランニングを行った結果、赤血球の低分子 SH 基のみならず p-SH 基濃度もランニング 5 分後に著しく減少したことを示した。血漿では、遊離のシステイン、シスチン、GSH がランニングによる変動を示さなかったのに対し、p-SH 基濃度は有意に低値を示した。これらの結果は、中等度の運動が GSH のみならず赤血球ならびに血漿の p-SH 基の酸化をひき起こす可能性を示唆している。

GSH は、非タンパク性 SH 基の中で細胞内に最も高濃度含まれるものであり、酸化ダメージから組織を防御し、細胞内の環境を還元状態に維持するうえで多くの機能を有している (Meister, 1983)。ヒトでは、血中 GSH の酸化が運動誘発性酸化ストレスの指標とみなされている (Ji, 1999, Sen and Packer, 2000)。本研究においても、その大部分が GSH である赤血球の低分子 SH 基がランニングによって酸化されたことを確認した。また、赤血球には GSH よりも高濃度のヘモグロビン由来の p-SH 基が約 8 mM 含まれている。本研究ではそれがヘモグロビン由来であると確定するまでには至らなかったが、運動後にみられた赤血球 p-SH 基の減少は、Hb-SH 基の酸化を示唆するものと考えられる。

GSH の反応性は Hb-SH 基のそれよりも速い (Di Simplicio et al, 1998)。酸化ストレスを受けた場合、細胞内では GSH が酸化型である GSSG に変換される。酸化割合が低い場合、生成された GSSG の大部分は GSH レダクターゼによる酵素反応によって GSH に還元される。しかし、より強い酸化ストレス下において GSSG の生成割合が還元能を超えることになれば、結果として細胞内の GSSG の蓄積がもたらされる可能性が生じる。その場合、GSSG が測定可能になるほど増加する前に、 $\text{SH} \rightleftharpoons \text{S-S}$  反応による protein S-thiolation の生成が誘起されると考えられる (Thomas et al, 1995, Dafre and Reischl, 1998)。なおこの点に関しては、protein S-thiolation が直接的な p-SH 基の酸化によって引き起こされるというもうひとつの可能性も残されている (Thomas et al, 1995)。



運動直後にみられた赤血球 p-SH 基の酸化は、赤血球 GSH と同様、運動後短時間で速やかに回復した。酸化された細胞内 GSH は、NADPH 依存性の GSH レダクターゼによって速やかに再還元される。本研究で観察された細胞内 p-SH 基の速やかな回復は、GSH レダクターゼといった細胞内の還元システムの存在を反映した結果を示唆すると同時に、p-SH 基が運動誘発性酸化ストレス下において、ヒト赤血球の抗酸化システムの一環として機能している可能性を支持するものと考えられる。

一方、血漿では、低分子 SH 基に有意なランニングの影響はみられなかったが、p-SH 基はランニング後有意に減少し、24 時間後においても回復しなかった。細胞外の抗酸化酵素や抗酸化物質の濃度は、細胞内に比べるときわめて低い (二木, 1994)。赤血球の p-SH 基とは対照的に血漿の p-SH 基の回復が観察されなかったことは、細胞内外の還元システムの違いによるものかもしれない。In vitro の検討では血漿 p-SH 基の抗酸化機能が支持されているが、in vivo における血漿 p-SH 基の減少が、抗酸化作用の一端なのか、あるいは酸化ダメージを意味するのか、さらなる検討が必要である。

#### 4.5 要約

非鍛錬者である健常な女性 6 名を対象に、個人の VT レベルの強度で 30 分ランニングを負荷した。その結果、赤血球の GSH ならびに p-SH 基は、運動終了後有意に減少し、2 時間後にはいずれも初期値に回復した。血漿では低分子 SH 基の有意な変動は認められなかったが、p-SH 基は運動直後有意に減少し 24 時間後においても継続して低値を示した。これらの結果から、中等度の有酸素運動は赤血球 GSH のみならず赤血球ならびに血漿の p-SH 基に影響をもたらすことが明らかになった。赤血球 p-SH 基は GSH 同様運動終了後速やかに回復したことから、運動誘発性酸化ストレス下におけるヒト赤血球の抗酸化システムの一環として機能しており、その再還元には細胞内の還元酵素が関与する機序が考えられた。