

## 第6章 持久性運動負荷後の血漿 p-SH 基の回復過程は対象者のトレーニング状況によって異なる (実験3-1, 実験3-2)

### 6.1 緒言

運動によってさまざまな組織に酸化ストレスが引き起こされると考えられている (Sjodin et al, 1990, Witt et al, 1992, Alessio, 1993, Aruoma, 1994, Ji, 1995, Sen, 1995)。循環血液中においても血漿脂質の過酸化 (Lovlin et al, 1987, Kanter et al, 1988, Maughan et al, 1989)、GSHの酸化 (Lew et al, 1985, Gohil et al, 1988, Duthie et al, 1990, Ji and Fu, 1992, Viguie et al, 1993, Sen et al, 1994a, Sen et al, 1994c) といった酸化反応が引き起こされる。

非鍛錬者の成人女性を対象とした有酸素運動負荷で観察された赤血球のGSHおよびp-SH基の減少ならびに速やかな回復は、細胞内の還元システムの関与と同時に、GSHとp-SH基が抗酸化機能を有していることを示す (Inayama et al, 2002a)。一方、血漿p-SH基の減少はシステインとの混合ジスルフィド結合による酸化であることが明らかになった (Inayama et al, 2002b)。しかし、このVTレベルでの30分ランニングでは、運動後24時間経過した時点においても、血漿p-SH基の回復は観察されなかった。*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と考えられているが (Wayner et al, 1987, Frei et al, 1988)、血漿p-SH基の低下が継続されるのであれば、生体での有効な抗酸化物質としての意義は薄れてしまう。

血漿p-SH基に寄与するアルブミン (66 kDa) は、分子量が腎糸球体濾過限界値 (55 kDa) よりも大きいので尿中に漏出しにくい。また、その半減期は約21日と長い。血漿p-SH基が生体内の抗酸化システムとして有効に働いているか否かを明らかにするには、運動負荷によって減少した血漿p-SH基の回復過程の観察が必要である。本研究では、健常な男子学生を対象にフルマラソンレースによる血漿p-SH基の減少からの回復過程を観察した。そのさい、実験3-1では中等度のトレーニング状況にある男子学生を、実験3-2では高強度のトレーニング状況にある男子学生を対象とすることで、トレーニング状況の違いがもたらす血漿p-SH基の変動の違いについても言及した。

## 6.2 方法

### 6.2.1 対象者

実験3-1では、7名の健常な男子大学生（20～23歳）を対象とした。予測 $VO_{2max}$ は、漸増式トレッドミルによる12分間走の負荷テストにおける酸素摂取量から得られる回帰式から推定した（Cooper et al, 1968）。実験3-2では競技歴を有する6名の健常な男子学生（19～25歳）を対象とした。採血期間、対象者の食事ならびに生活に特別な規制は設けなかった。対象者にはインフォームドコンセントをとり、人を対象としたヘルシンキ宣言（1983年）に則り研究計画を遂行した。

### 6.2.2 実験計画

実験3-1ではレースの24時間前、レース終了0.5時間、24時間、48時間後に、実験3-2ではレースの24時間前、レース終了0.5時間、1日後、3日後および5日後に行った。肘正中皮静脈よりヘパリン処置を施した試験管に採血し、採血後30分以内に $5,000 \times g$ にて10分間遠心分離し血漿を得た。採血は、レース終了直後以外は、当日朝8時までに朝食を終えるように依頼し、昼食前の12時に採血を行った。

血漿サンプルは以下の方法にて処理した。SH基の測定では、血漿0.8 mlに100 mM EDTA 0.2 mlを加え氷冷、採血5時間後に測定を行った。CPK活性、チオバルビツール酸反応物質 (thiobarbituric acid reactive substances: TBARS) ならびにアルブミン濃度の測定では、血漿サンプルを液体窒素にて冷凍処置した後 $-70^{\circ}\text{C}$ で保存した。タンパク質濃度測定のための血漿サンプルは冷蔵保存した。全ての分析は採血後4日以内に終了した。

### 6.2.3 試薬ならびに分析方法

試薬は、牛血清アルブミンはSigma Co.、他の試薬は和光純薬（株）のものを用いた。

血漿p-SH基濃度は、既報（Inayama et al, 1996）のSedlakとLindsayの方法（Sedlak and Lindsay, 1968）に従って、DTNBを用いて測定した。モル吸光係数は $13.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ （Sedlak and Lindsay, 1968）に従った。

血漿CPK活性は自動分析装置を用い（HITACHI 7450E、日立製）、比色法にて測定した（Szasz

et al, 1976)。血漿 TBARS 濃度の測定は、テトラメトキシプロパンを標準物質としチオバルビツール酸反応法 (Yagi, 1987) によった。血漿タンパク質濃度は牛血清アルブミンを標準物質として Bradford 法 (Bradford, 1976)、血漿アルブミン濃度はブロムクレゾールグリーン法 (Dumas et al, 1971) にて測定した。

#### 6.2.4 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テストにてFisher's Protected Least Significant Differenceによる事後の処理を行い、レース24時間前の値と比較した。実験3-1のCPK活性のみはWilcoxon testを用いてレース24時間前の値と比較した。いずれも  $p < 0.05$  をもって有意差有りとした。

### 6.3 実験 3-1：中等度のトレーニング状況にある成人男性の結果

#### 6.3.1 対象者

対象者は、マラソン参加を目的としたトレーニングを教える一般体育授業を選択した学生で、6ヶ月にわたり初心者のための長距離トレーニングコースを受講した後、フルマラソンレース (42.195 km) に参加した。授業を選択するまでにランニング歴を有していた学生は、7名中3名 (3~6年のジョギング歴) だけであり、レース前のトレーニング状況は半年間にわたる週1回の体育の授業と自主練習であった。聞き取りによって得られたレース前1ヶ月間の平均走行距離は、1週間当たりの平均走行距離は  $10.1 \pm 1.7$  kmであった。レース1週間前に測定した対象者の身体的特徴ならびに有酸素能、フルマラソンレースタイムをTable 6-1に示した。

#### 6.3.2 血漿 p-SH 基ならびにタンパク質濃度

血漿タンパク質濃度は、フルマラソンレースによる影響を受けなかった (Fig. 6-1、右図)。血漿p-SH基はレース0.5時間後有意に減少し ( $7.04 \pm 0.22$  から  $5.50 \pm 0.19$  nmol·mg of protein<sup>-1</sup>、-22%、 $p < 0.01$ )、引き続きレース24時間後 ( $6.20 \pm 0.15$  nmol·mg of protein<sup>-1</sup>、-12%、 $p < 0.01$ )、48時間後 ( $6.08 \pm 0.15$  nmol·mg of protein<sup>-1</sup>、-13%、 $p < 0.01$ ) まで継続して低値を示した (Fig. 6-1、左図)。非タンパク性SH基は血漿濃度がきわめて低く (<10 μM)、いずれのサンプルにおいても本法

Table 6-1. Exp.1

Physical Characteristics and Marathon Completion Time of Subjects (n=7).

Age	(years)	21.4 ± 0.4
Height	(cm)	170.4 ± 1.1
Weight	(Kg)	66.1 ± 2.8
Running distance for 12 min	(m·min <sup>-1</sup> )	254.0 ± 5.0
Predicted VO <sub>2</sub> max	(ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	57.5 ± 1.4
Race time	(hr)	4.6 ± 0.2

Note. Data are means ± SE. VO<sub>2</sub>max; maximum oxygen consumption.

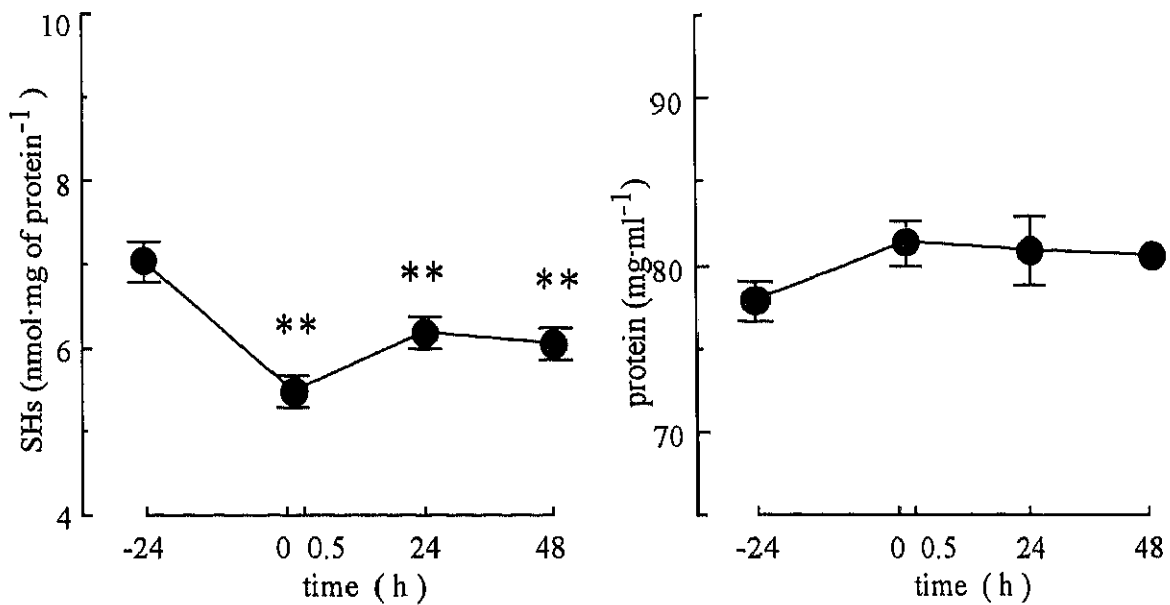


Fig. 6-1. Change in the content of protein-bound sulfhydryl groups (left panel) and protein (right panel) in plasma before and after the full marathon race. Time "0 h" corresponds to the start time of the race. Blood samples were collected at 24 h before the race, 0.5 h, 24 h and 48 h after the race. The values are expressed as means ( $n=7$ )  $\pm$  SE. \*\* show the significant difference ( $p<0.01$ ) from the pre-running value as analyzed by repeated-measures ANOVA with post hoc test.

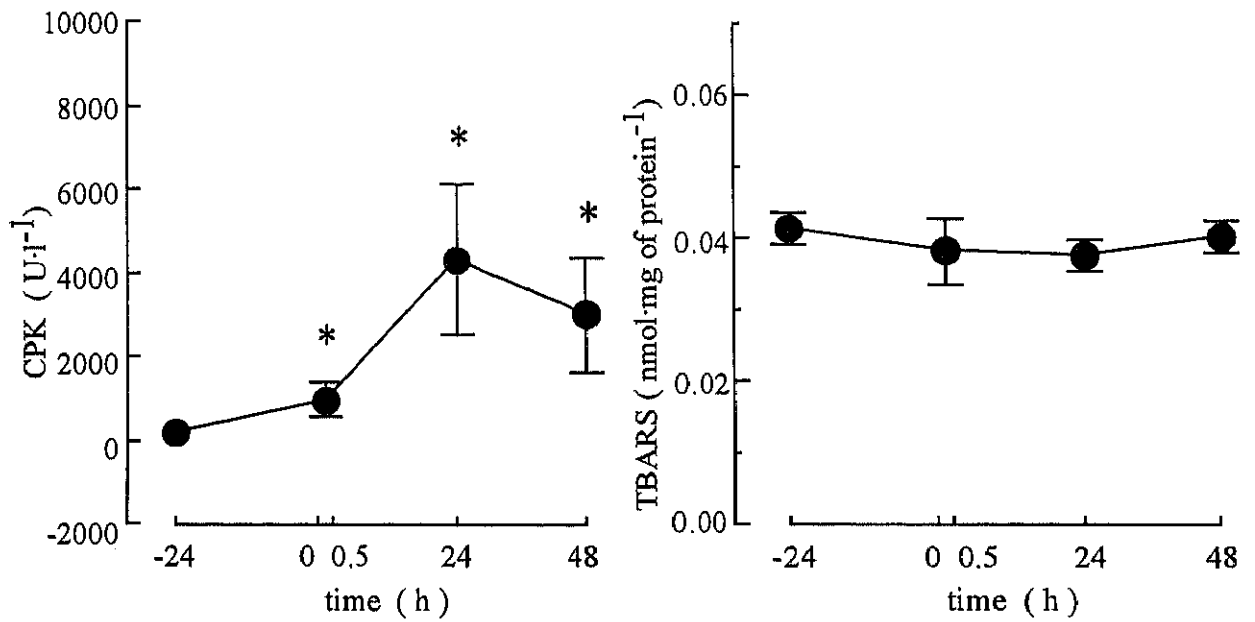


Fig. 6-2. Changes in plasma creatine kinase activity and lipid peroxidation before and after the full marathon race. Time "0 h" corresponds to the start time of the race. Blood samples were collected at 24 h before the race, 0.5 h, 24 h and 48 h after the race. The values are expressed as means (n=7) ± SE. Significance of difference from the 24h pre-race value as indicated by Wilcoxon test: \* $p < 0.05$ .

では検出されなかった。

### 6.3.3 血漿 CPK 活性ならびに TBARS 濃度

血漿 CPK 活性はレース 0.5 時間後から有意に増加し (+48%、 $p<0.05$ )、24 時間後 (+25%、 $p<0.05$ ) をピークに 48 時間後 (+17%、 $p<0.05$ ) まで高値を示した (Fig. 6-2、左図)。レース前の血漿 TBARS 濃度は  $0.041 \pm 0.005$  nmol·mg of protein<sup>-1</sup> であり基準範囲内であった。血漿 TBARS 濃度はレースによって有意な変動を示さなかった (Fig. 6-2、右図)。

## 6.4 実験 3-2 : 高強度のトレーニング状況にある成人男性の結果

### 6.4.1 対象者

対象者の身体的特徴ならびにレース完走時間を Table 6-2 に示した。いずれの対象者も競技者としての経歴を有していた。対象者 6 名のうち大学生 2 名 (1 名は体育学群に在籍) は、レース参加の時点で運動部に所属していた。他の 4 名は、いずれも体育研究科の大学院生であり、大学在籍時に運動部に所属していた。対象者のトレーニング状況は以下の通りである。大学在籍時に陸上部に所属していた対象者 A (大学院生) は、現在も高強度のランニングトレーニングを続けていた。ライフセービング部に所属している対象者 B (大学生) は水泳トレーニングを、自転車競技部に所属している対象者 C (大学生) は自転車トレーニングを行っていた。現役の競技者ではないが大学院生を対象者 D はバスケットボールを、対象者 E はラグビーの練習を続けていた。聞き取り調査から得られたレース前 1 ヶ月間における 1 週間当たりの平均走行距離は  $10.9 \pm 2.5$  km であった。

### 6.4.2 血漿 p-SH 基、タンパク質およびアルブミン濃度

血漿 p-SH 基は、レース 24 時間前の  $7.65 \pm 0.09$  nmol·mg of protein<sup>-1</sup> と比較して、レース終了直後には  $6.92 \pm 0.21$  nmol·mg of protein<sup>-1</sup> と有意に減少した (-9%、 $p<0.05$ )。その後は回復ないし増大し、レース終了 24 時間後には  $8.40 \pm 0.14$  nmol·mg of protein<sup>-1</sup> (+10%、 $p<0.05$ )、レース終了 3 日後には  $7.68 \pm 0.07$  nmol·mg of protein<sup>-1</sup> ( $\pm 0\%$ )、レース終了 5 日後には  $8.15 \pm 0.15$  nmol·mg of protein<sup>-1</sup> (+7%) となった (Fig. 6-3)。血漿 p-SH 基の大部分がアルブミンに由来することから、

Table 6-2. Exp.2  
Physical Characteristics and Marathon Completion Time of Subjects (n=6).

---

Age	(years)	22.8 ± 1.0
Height	(cm)	169.8 ± 2.7
Weight	(Kg)	65.3 ± 2.5
Race time	(hr)	4.1 ± 0.3

---

Note. Data are means ± SE.



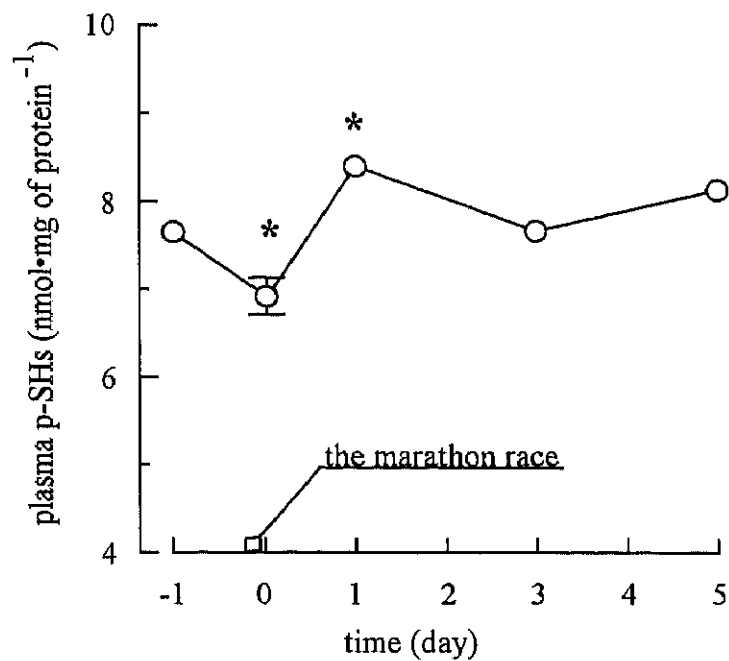


Fig. 6-3. Change in the content of p-SHs in plasma before and after the full marathon race. Time "0 day" corresponds to the start time of the race. Blood samples were collected at 1 day before the race, 0.5 h, 1 day, 3 day and 5 day after the race. The values are expressed as means ( $n=6$ )  $\pm$  SE. \* shows the significant difference ( $p<0.05$ ) from the pre-running value as analyzed by repeated-measures ANOVA with post hoc test.

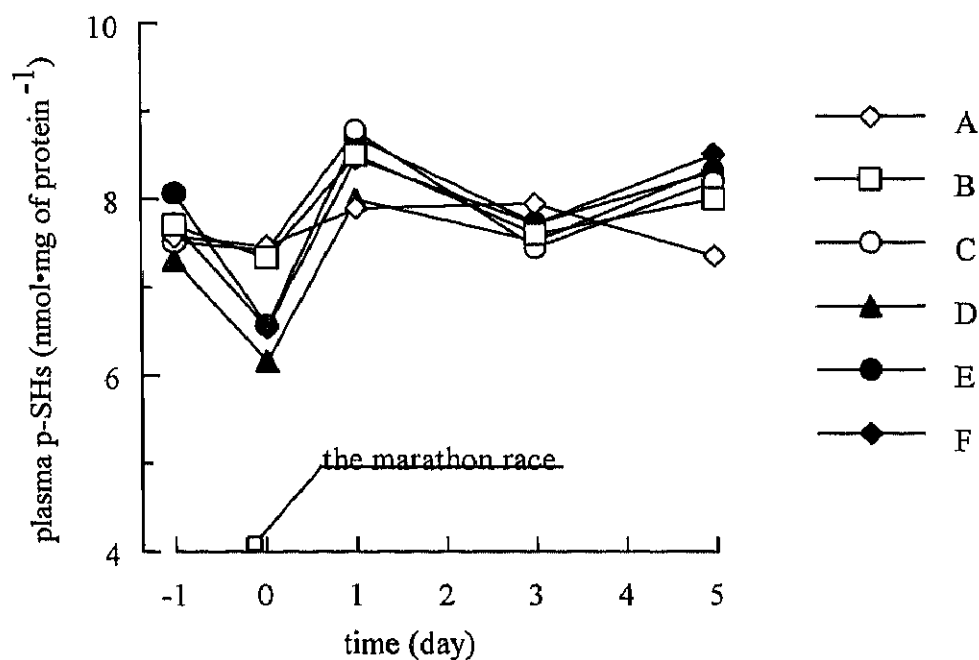


Fig. 6-4. Changes in the content of p-SHs in plasma before and after the full marathon race. Time "0 day" corresponds to the start time of the race. Blood samples were collected at 1 day before the race, 0.5 h, 1 day, 3 day and 5 day after the race.

血漿 SH 基濃度を血漿アルブミン重量 (mg) 当たりに換算すると、レース直後に有意に低下した ( $11.4 \pm 0.1$  から  $10.1 \pm 0.3$  nmol·mg of albumin<sup>-1</sup>, -12%,  $p < 0.01$ )。その後は回復し、レース 24 時間後 ( $11.7 \pm 0.2$  nmol·mg of albumin<sup>-1</sup>)、3 日後 ( $10.9 \pm 0.1$  nmol·mg of albumin<sup>-1</sup>) および 5 日後 ( $11.0 \pm 0.2$  nmol·mg of albumin<sup>-1</sup>) と、レース前の値との有意差が認められなかった。

個人ごとの血漿 p-SH 基の値を Fig. 6-4 に示したが、レース直後の SH 基濃度は、ほとんど減少しなかった例 ( $n=3$ ) と約 20%減少した例 ( $n=3$ ) に分かれた。SH 基濃度が減少しなかった対象者 A、B、C は、レース参加時点で運動部の現役か現役に近いトレーニングを行っていた。SH 基濃度が約 20%減少した対象者 D、E、F は、ランニングやバスケットボール等などのトレーニングを続けていたが、運動部の現役ではなかった。

血漿タンパク質濃度はレース終了 24 時間後に有意な減少を示し ( $70.9 \pm 1.5$  mg·mL<sup>-1</sup> から  $64.7 \pm 1.8$  mg·mL<sup>-1</sup>, -9%,  $p < 0.01$ )、レース 5 日後においても回復しなかった (Fig. 6-5、左図)。血漿アルブミン濃度はレース前後で有意な変動を示さなかった (Fig. 6-5、右図)。

#### 6.4.3 血漿 CPK 活性ならびに TBARS 濃度

血漿 CPK 活性は、レース終了 24 時間後には著しく増大したが ( $p < 0.01$ )、レース終了 5 日後には回復した (Fig. 6-6、左図)。血漿 TBARS 濃度はレース前後で有意な変動を認めなかった (Fig. 6-6、右図)。

### 6.5 考 察

本研究では、血漿 p-SH 基の血管内における抗酸化システムとしての有効性を検討するため、高強度の運動負荷によって減少する血漿 p-SH 基の回復過程をトレーニング状況の異なる男子学生を対象に観察することによって、血漿 p-SH 基の減少が可逆的な反応であり、再還元される可能性があることを明らかにした。

実験 3-1 の中等度のトレーニング状況にある男子学生の場合、血漿 p-SH 基はフルマラソンレース前と比較してレース終了 0.5 時間後に有意に減少し (-22%)、48 時間後まで継続して低値を示した。これに対し、実験 3-2 の高強度のトレーニング状況にある男子学生の場合は、平均血漿 p-SH 基がレース終了直後で有意に減少したものの (-9%)、レース終了 24 時間以降に

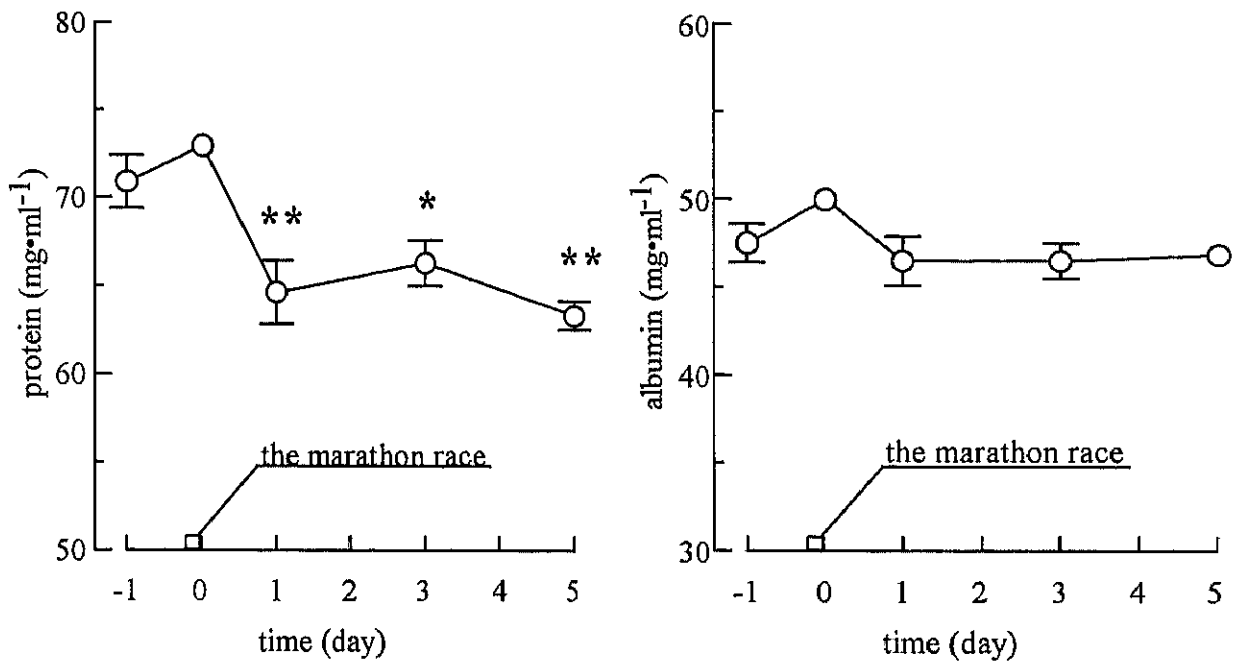


Fig. 6-5. Changes in the content of protein (left panel) and albumin (right panel) in plasma before and after the full marathon race. Time "0 day" corresponds to the start time of the race. Blood samples were collected at 1 day before the race, 0.5 h, 1 day, 3 day and 5 day after the race. The values are expressed as means ( $n=6$ )  $\pm$  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.

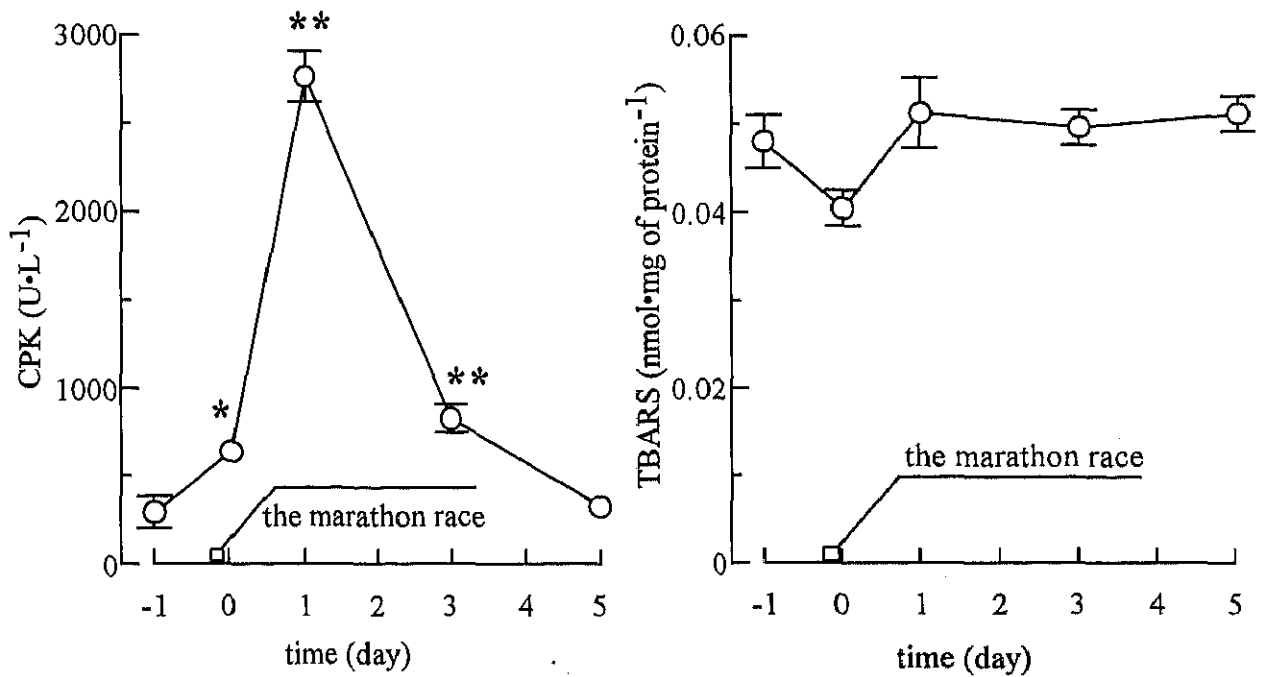


Fig. 6-6. Changes in creatine kinase activity (left panel) and lipid peroxidation (right panel) in plasma before and after the full marathon race. Time "0 day" corresponds to the start time of the race. Blood samples were collected at 1 day before the race, 0.5 h, 1 day, 3 day and 5 day after the race. The values are expressed as means ( $n=6$ )  $\pm$  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.

は回復ないし増大した。このとき、SH 基の変動を個人ごとに見ると、現役の運動部員ではなかった対象者 3 名の SH 基が約 20%減少したのに対し、現役の運動部員かそれに近いトレーニングを続けていた対象者 3 名では、SH 基がほとんど変化しなかった。

ただし、実験 3-2 では血漿タンパク質濃度がレースの 24 時間後から 5 日後にはレース前日に比べ有意に低下していたので、タンパク質重量当たりの濃度に換算した SH 基濃度が過大評価されている可能性は残る。しかし、SH 基濃度をアルブミン重量当たりの濃度に換算しても、24 時間以降はレース前の濃度に比べ有意差が認められなかった。血漿 p-SH 基の回復過程に差が生じた原因として、対象者の競技歴とトレーニング状況の違いが考えられる。

実験3-1の対象者が競技歴をもたないジョギング愛好家であったのに対し、実験3-2の対象者は全員が現役ないしはかつての競技者であり、ランニングの他にも水泳、自転車、バスケットボール等のトレーニングを行っていた。レース前1ヶ月間の平均走行距離は実験3-1では10.1±1.7 km/週、実験3-2では10.9±2.5 km/週、レースタイムは実験3-1では4.6±0.2時間、実験3-2では4.1±0.3時間であった。両者間ではレース前1カ月の走行距離とレースタイムに大きな差はみられなかったが、対象者の競技歴やトレーニング状況を考えると、トレーニング強度にかなりの違いがあると考えられる。このようなトレーニング状況の違いが、運動による血漿p-SH基の減少とその後の回復過程に差をもたらした可能性は高い。さらに、実験3-2の高強度のトレーニング状況にある対象者間でもみられたトレーニング状況による差、すなわち、レース後の血漿p-SH基の変動が運動部の現役ないしそれに近い対象者で少なかったという結果も、このような可能性を支持するであろう。

実験2において、運動誘発性酸化ストレスによる血漿p-SH基の減少は、システインとの混合ジスルフィド結合による酸化であることが明らかになっている。この反応は可逆的なものであり、還元システムが機能する状況であれば、酸化された血漿p-SH基は再還元される。本研究では、運動負荷による血漿p-SH基の減少の程度とその回復の速さにトレーニング状況が影響する可能性が示唆されたが、その機序は不明であり今後の検討を要する。しかし、運動後に減少した血漿p-SH基が24時間後には回復したという結果は、血漿SH基の主要な供与体であるアルブミンの血中半減期の長さ（約21日）を考えると大変興味深い。すなわち、血漿p-SH基の速やかな回復は、アルブミンのSH基が循環血液中中で再還元されたと同時に、血漿p-SH基の

抗酸化システムとしての有効性を示唆する可能性がある。現段階では再還元過程の機序は明らかではないが、少なくとも長時間に及ぶ持久性運動による血漿p-SH基の酸化ならびに還元能力はトレーニング状況に影響されるという可能性が高い。

本研究では、実験3-1ならびに実験3-2のいずれにおいても血漿CPK活性が有意に増加したのに対し、血漿TBARS濃度はレースによる変動がみられなかった。Duthieら（1990）によるハーフマラソンレースの検討でも同様の結果が報告されている。しかし、80 kmランニングでは、血漿過酸化脂濃度は増加した（Kanter et al, 1988）。Maughanら（1989）による45分間のダウンヒルランニングの検討においても、血漿TBARS濃度が増加した。この研究の対象者（Maughan et al, 1989）は通常の身体活動レベルであり、日常のアスレチックトレーニングによる運動能力の向上を観察したものではない。Meydaniら（1993）は、運動によって外側広筋組織の脂質過酸化が増大したにもかかわらず、血漿過酸化脂質濃度には変化がみられなかったことを報告しているが、このとき尿中の脂質過酸化物質濃度は増加した。本研究の結果は、産成されたTBARSが尿中に排泄されたことに関連していると考えられる。

一方、運動により筋に生じる侵襲の指標である血中CPK活性の上昇の程度は実験3-1と実験3-2では異なり、高強度のトレーニング状況にある対象者のCPK活性の変動幅は明らかに小さい。レースタイムに大きな違いはなくとも、競技歴がありレース参加時にもかなり高強度のトレーニングを続けていた対象者では、運動負荷の負担度が軽く、筋への侵襲が小さかった可能性がある。生体内に誘発される酸化的ストレスの程度とその回復過程には、トレーニング強度や運動歴に基づく運動負荷の負担度が影響するのかもしれない。

## 6.6 要約

フルマラソンレースに参加した中等度のトレーニング状況にある男子学生（実験3-1）、高強度のトレーニング状況にある男子学生（実験3-2）を対象とした。実験3-1および実験3-2のいずれにおいても、筋へのダメージの指標と考えられている血漿CPK活性はレース後有意に上昇したのに対し、血漿TBARS濃度はレースによる変動はみられなかった。血漿p-SH基は、実験3-1の中等度のトレーニング状況の男子学生では、初期値と比較してマラソンレース0.5時間後有意に減少し、24時間、48時間後まで継続して有意に低値を示した。一方、実験3-2の高強度の

トレーニング状況の男子学生では、マラソン完走0.5時間後にみられた血漿p-SH基の有意な減少は24時間後に初期値まで回復した。ただし、このとき運動部の現役か現役に近い高強度のトレーニングを行っていた対象者では、マラソンによる血漿p-SH基の減少は観察されなかった。

実験3-2の結果は、運動負荷によって酸化された血漿p-SH基が循環血液中で再還元されること、それゆえ血漿p-SH基が循環血液中で抗酸化機能を担っている可能性があること、回復過程はトレーニング状況に左右される可能性があることを示唆する。