

短時間および長時間の過激な 運動負荷による酸化ストレスの影響

アミナカ マサヒト ワタナベ ヨシヒコ タカタ アヤコ ヤマウチ ヒロシ ヨシダ カツミ
網中 雅仁*1 渡辺 尚彦*4 高田 礼子*2 山内 博*5 吉田 勝美*3

目的 過度の運動負荷から生じる酸化ストレスの生体影響を尿中8 - ヒドロキシデオキシグアノシン (8 - OHdG) 濃度の測定によって明らかにし、生体影響を数量化して評価する方法を検討した。

方法 本研究では過度な短時間運動負荷による生体影響と長時間運動負荷による生体影響を調べるために、2つの調査対象者群を設定した。短時間運動負荷はトレッドミルを用いた運動負荷実験を行った。対象者は負荷実験前後24時間の蓄尿と負荷実験直前後のスポット尿を採取した。また、負荷実験中は Mason - Likar 誘導法による12誘導心電図と血圧を測定し、Bruce 法による運動負荷を用いて被験者の状態を判断しながら最大心拍数の90% (目標心拍数) 程度に達した時点まで負荷実験を行った。一方、長時間運動負荷には、マラソン競技会参加者を対象者とした。対象者にはホルター血圧計を取り付け、マラソン走行時の運動負荷量を確認した。また、競技前後におけるスポット尿と血液を採取した。酸化ストレスの指標には尿中8 - OHdG 濃度を測定し、評価した。

結果 短時間運動負荷の8 - OHdG 濃度では、負荷直後が負荷前日や負荷直前と比較して低下傾向であった。また、負荷実験前日、直前、直後に有意差は認められなかった。一方、負荷実験後日の蓄尿では有意な上昇を認めた ($p < 0.01$)。長時間運動負荷のマラソン競技者における尿中8 - OHdG 濃度は、競技前後で比較して約2.2倍の有意な上昇を認めた ($p < 0.01$)。また、競技後の尿中8 - OHdG 濃度は健常者対照群の約2倍になり、運動負荷による有意な上昇が認められた ($p < 0.01$)。

結論 尿中8 - OHdG 濃度の実測値では負荷直前が、負荷直後に比較して上昇傾向を示した。一方、尿中8 - OHdG 濃度補正值では、短時間の運動負荷直後において低下傾向を示し、これは補正に用いたクレアチニン濃度が約12%上昇したためであった。短時間の運動負荷では、酸化ストレス指標である8 - OHdG 濃度の上昇がクレアチニン濃度の上昇よりも遅延することが推察された。短時間の運動負荷では、クレアチニン補正の使用に注意が必要である。一方、マラソン競技者の尿中8 - OHdG 濃度は、競技後急激に上昇し、約3時間の過度な有酸素運動が酸化的DNA損傷を生じさせた。また、酸化ストレス消去能には個人差のあることも推察された。尿中8 - OHdG 濃度の測定は過度の有酸素運動を判断する指標として有用性が期待でき、個々の有酸素運動の適正な負荷量を数量化して判断する指標として今後さらに検討すべき課題であると考えられた。

キーワード 運動負荷, 酸化ストレス, 8 - OHdG, トレッドミル, マラソン

* 1 聖マリアンナ医科大学医学部予防医学助教 * 2 同講師 * 3 同教授

* 4 東京女子医科大学東医療センター内科講師 * 5 北里大学医療衛生学部公衆衛生学教授

緒 言

わが国では、厚生労働省による21世紀における国民健康づくり運動（健康日本21）が推進され、生活習慣病やその原因となる生活習慣等の9分野の課題について「基本方針」「現状と目標」「対策」が提示された。政府は国民への身体活動・運動を推奨し¹⁾²⁾、日常的なスポーツ活動への意識も高まっている。一方、スポーツ活動の発展にともない循環器への障害³⁾、筋・骨格系への障害⁴⁾⁵⁾、内分泌への影響⁶⁾等の問題が生じている。また、過度の有酸素運動による酸化ストレスの生体影響も注目されてきており、運動と酸化DNA損傷の関係を解明することが新たな課題として検討されている⁷⁾⁹⁾。

本研究は、過度の運動負荷によって見出される酸化ストレスの生体影響を解明する試みとして酸化DNA損傷の指標である尿中8-ヒドロキシデオキシグアノシン（以下、8-OHdG）濃度の測定を行い、生体影響の評価法としての有用性について検討を行った。

方 法

(1) 対象者

本研究では、過度な短時間運動負荷による生体影響と長時間運動負荷による生体影響を調べるために、2つの対象者群を設定した。短時間運動負荷実験の対象者（短時間運動負荷）は、運動習慣のない一般成人22名（男性20名、女性2名）、年齢 33.1 ± 5.12 歳であった。また、長時間運動負荷実験（長時間運動負荷）では、日常的な運動習慣のある某企業の男性マラソン競技者14名、年齢 42.4 ± 9.94 歳を対象者とした。

対象者群には負荷実験の前後に問診を行い、実験による健康上の問題が生じないことを確認した。なお、対照群には日本人健常者248名（男性128名、女性120名）を用いた¹⁰⁾。対照群は性・年齢別に選出して医師の問診と生化学検査を行い、不適格者を除外した。

本研究の短時間運動負荷実験については聖マ

表1 Bruce法による運動負荷

ステージ (各3分)	速度 (km/h)	速度 (mile/h)	傾斜 (%)	予測 (METs)
1	2.7	1.7	10	4.8
2	4.0	2.5	12	6.8
3	5.5	3.4	14	9.6
4	6.9	4.2	16	13.2
5	8.0	5.0	18	16.6
6	8.8	5.5	20	20.0
7	9.6	6.0	22	—

リアンナ医科大学生命倫理委員会による臨床研究の審査を受けた上、承認を得て実施された研究である。また、長時間運動負荷実験については国の倫理指針が定められる平成15年3月以前であったため、倫理審査委員会等による審査は受けていない。しかし、すべての実験参加者には遂行に当たってヘルシンキ宣言に基づいたインフォームド・コンセントを実施し、参加した対象者の同意を得た上で実験を行った。

(2) 運動負荷

短時間運動負荷の対象者には、トレッドミル（MAT-2200フクダ電子）を用いた運動負荷実験を行った。対象者には負荷実験の前後24時間についてホルター血圧計（TM-2431A&D）を取り付け、負荷実験前後24時間の蓄尿を実施した。また、実験直前と直後のスポット尿も採取した。負荷実験中はMason-Likar誘導法による12誘導心電図と血圧測定を行った。トレッドミルによる負荷にはBruce法（表1）を用いて被験者の状態を判断しながら、最大心拍数の90%（目標心拍数）程度に達した時点を実験中止とした。

長時間運動負荷実験の対象者は、渡辺らの報告¹¹⁾によるマラソン競技会の参加時における運動負荷について調査を行った。対象者にはホルター血圧計（TM-2025A&D）を取り付け、マラソン走行時の運動負荷量を確認した。また、競技前後におけるスポット尿と血液を採取した。

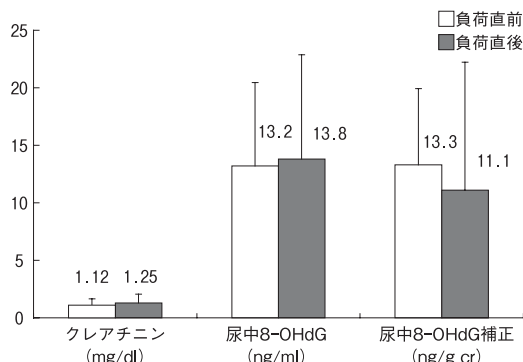
(3) 尿中8-OHdGの測定方法

採取した尿はドライアイスで凍結して移送し、測定まで-30℃で保存した。また血液は採取後

図1 Bruce法を用いたトレッドミル負荷実験中の被験者



図2 短時間運動負荷（トレッドミル）の負荷前後における変化



に冷蔵保存し、検査に用いた。

尿中8-OHdG濃度の測定には8-OHdG Check (日本老化制御研究所 Shizuoka Japan) を使用した¹²⁾。

結 果

短時間運動負荷実験を図1に示した。図2には短時間運動負荷における負荷前後の尿中クレ

アチニン濃度、尿中8-OHdG濃度および尿中8-OHdG濃度の補正值を示した。負荷実験前後の尿中クレアチニン値は、負荷前日 1.29 ± 0.54 mg/dl、負荷直前 1.12 ± 0.56 mg/dl、負荷直後 1.25 ± 0.77 mg/dl、負荷後日は 1.38 ± 0.14 mg/dlとなった。それぞれの尿中クレアチニン値の間に有意な差は認められなかった。一方、尿中8-OHdG濃度は負荷前日 15.5 ± 9.24 ng/ml、負荷直前 13.2 ± 7.25 ng/ml、負荷直後 13.8 ± 9.08 ng/ml、負荷後日では 15.2 ± 5.81 ng/mlであった。

表2 長時間運動負荷(マラソン競技者)の経歴および負荷量

年齢(歳)	42.4 \pm 9.94
身長(cm)	166.4(152-175) ¹⁾
体重(kg)	61(51-69) ¹⁾
経験年数(年)	10.6 \pm 9.00
月平均の走行距離(km)	124.5(50-230) ¹⁾
走行時間(時間)	4.15 \pm 0.42
最高到達脈拍数(/分)	163.5 \pm 7.43
年齢別最大心拍数(%)	-9.33 \pm 4.82

注 1) は最小-最大を示す。

尿中クレアチニン補正後の8-OHdG濃度は負荷前日 12.3 ± 6.39 ng/gcr、負荷直前 13.3 ± 6.85 ng/gcr、負荷直後 11.1 ± 5.95 ng/gcrとなり、負荷後日では 15.1 ± 5.17 ng/gcrであった。負荷実験前日、直前、直後の尿中8-OHdG濃度に有意差は認められなかったが、負荷後日は運動負荷前よりも有意な上昇が認められた($p < 0.01$)。

表3 長時間運動負荷(マラソン競技者)の経歴および負荷量

	競技前	競技後
	平均値 \pm 標準偏差	平均値 \pm 標準偏差
白血球数($\times 10^3$)	7 388.9 \pm 1 526.8	1 7055.6 \pm 3 871.7*
赤血球数($\times 10^4$)	483.3 \pm 45.3	489.3 \pm 42.2
ヘマトクリット値(%)	43.5 \pm 2.7	44.4 \pm 3.7
血小板数($\times 10^3$)	245.1 \pm 77	287.4 \pm 77
尿素窒素(mg/dl)	19.6 \pm 2.7	23.2 \pm 3.3**
クレアチニン値(mg/dl)	1.14 \pm 0.2	1.21 \pm 0.2
クレアチンホスホキナーゼ(mU/ml)	71.8 \pm 30.3	204.1 \pm 89.8*
HDLコレステロール(mg/dl)	57.8 \pm 13.2	65.8 \pm 13.0
コルチゾール(μ g/dl)	16.5 \pm 4.7	40.1 \pm 37.4

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

表2には長時間運動負荷であるマラソン競技者に関する経歴および負荷量を示した。現既往歴として通風1名、高血圧2名、そのうち加療中が痛風1名、高血圧1名であった。

長時間運動負荷の運動負荷量は競技時間、最高到達脈拍数、年齢別最大心拍数差を用いて表した。これらの結果から、長時間運動負荷は過度の運動負荷を受けた集団であったこ

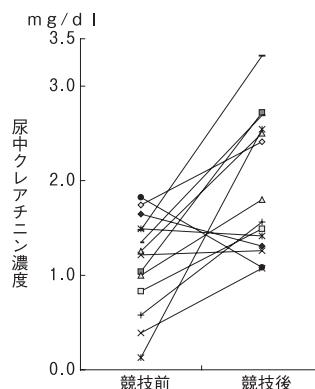
とが確認できた。また、長時間運動負荷では運動負荷後に白血球数、尿素窒素、クレアチンホスホキナーゼがそれぞれ有意な上昇を示した(表3)。

長時間運動負荷の尿中8-OHdG濃度補正值は、競技前後で比較して約2.2倍の有意な上昇を認めた($p < 0.01$)。また、競技後の尿中8-OHdG濃度補正值では対照群の約2倍となり、運動負荷による有意な上昇が認められた($p < 0.01$)。なお、尿中クレアチニン濃度も競技前後で上昇傾向を認めた(図3)。

考 察

長時間運動負荷であるマラソン競技者の血液検査所見からは尿素窒素、クレアチンホスホキナーゼの有意な上昇が認められ、運動負荷による筋肉組織および生体への損傷が確認された。また、白血球数も有意に上昇し、過度の運動負荷による炎症反応を認めた。さらに尿中8-OHdG濃度では競技後の急激な上昇が認められ、過度な有酸素運動が急速な酸化的DNA損傷を促進することを確認した。既報によれば、長時間の有酸素運動と無酸素運動の比較において、尿中8-OHdG濃度の上昇が有酸素運動に関与することが報告されている¹³⁾。本研究における酸化的DNA損傷は約3時間の運動負荷から生じており、著者らが今までに経験した有害化学物質ばく露による酸化ストレス¹⁰⁾等と比較しても極めて短時間で生じることを確認した。一方、短時間運動負荷では負荷直後に8-OHdG濃度の低下傾向を認めた。これは、補正に用いたクレアチニン濃度が負荷前後で約12%上昇したためではないかと推察された。尿中8-OHdG濃度の実測値では15分程度の短時間運動負荷であっても上昇傾向を示したものと推察された。つまり、短時間の運動負荷では酸化ストレスの上昇がクレアチニン濃度の上昇よりも遅延することが示唆された。また、一部の競技者は競技前でも8-OHdG濃度が高値であり、トレーニング後の酸化ストレス消去能には個人差のあることが推察された。これは、競技者が

図3 長時間運動負荷(マラソン競技者)の尿中クレアチニン濃度変化



過度の有酸素運動に適応できる素因を有しているかを判断する指標として8-OHdG濃度の測定が有用であることを示唆しており、かつ個々の有酸素運動の適正な負荷量を判断する指標として、尿中8-OHdG濃度の測定をさらに検討すべきであると考えます。

結 語

過度な運動による酸化ストレスを尿中8-OHdG濃度を用いて評価する場合は、実測値での検討が重要であり、その上で尿中クレアチニン補正による評価を合わせて考慮すべきである。さらに、尿中8-OHdG濃度の測定は過度な有酸素運動に適応できる素因の有無を判断する指標として有用性が期待でき、個々の有酸素運動の適正な負荷量を判断する指標として、今後さらに検討すべきであると考えます。

謝辞

本研究は、日本学術振興会平成18,19年度科学研究費補助金基盤研究(C)「運動負荷による酸化的ストレスの変化と消去能の獲得に関する研究」の一環として実施された。本研究の実施に当たり、被験者として参加頂きました皆様に深謝いたします。

文 献

1) 下光輝一. 健康日本21. 体力科学2005; 54(1):

- 11-2 .
- 2) 高久史磨 . 予防医学はどこまで可能か「健康日本21」の推進と予防医学のあり方 . 新医療2005 ; 32 (2) : 66-8 .
- 3) 田澤俊明 . スポーツに伴う外傷・障害・疾病の特徴と予防 中高年のスポーツ中の脳血管事故 (脳卒中) の特徴と予防 . クリニシアン2005 ; 52 (5) : 471-7 .
- 4) 山田均 . 運動器の10年 スポーツ・健康医学最前線 スポーツに伴う外傷・障害・疾病の特徴と予防 スポーツに伴う腰痛の特徴と予防 . クリニシアン2005 ; 52 (5) : 442-5 .
- 5) 松本學 . 運動器の10年 スポーツ・健康医学最前線 現場でのスポーツ・健康医学の実践と教育 全国高校ラグビー大会 (花園) における医事管理 . クリニシアン2005 ; 52 (5) : 413-9 .
- 6) 人見嘉哲 , 木崎節子 , 中野法彦 , 他 . 骨格筋肥大に関わるホルモン・作動薬・生体内情報伝達物質タンパク質脱リン酸化酵素カルシニューリンは骨格筋肥大に関与するか? . 体力科学2005 ; 54 (1) : 60-1 .
- 7) Orhan H, van Holland B, Krab B, et al. Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man : increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. Free Radic Res 2004 ; 38(12) : 1269-79 .
- 8) Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology 2003 ; 189(1 - 2) : 41-4 .
- 9) Radak Z, Pucsek J, Boros S, et al. Changes in urine 8-hydroxydeoxyguanosine levels of supermarathon runners during a four-day race period. Life Sci 2000 ; 66(18) : 1763-7 .
- 10) Yamauchi H, Aminaka M, Yoshida K, et al. Evaluation of DNA damage in patients with arsenic poisoning : urinary 8-hydroxydeoxyguanine. Toxicol Appl Pharmacol 2004 ; 198 (3) : 291-6 .
- 11) 渡辺尚彦 , 朝日洋一 , 三宅良彦 , 他 . フルマラゾンにおけるホルター心電図と血液生化学所見 試走会と競技大会の比較検討 . 日本臨床生理学会雑誌 1988 ; 18 (2) : 163-71 .
- 12) 斉藤秀 , 山内博 , 蓮井ゆり , 他 . ELISA 法による尿中の8-ヒドロキシデオキシグアノシンの定量法 . 臨床検査 2000 ; 44 (8) : 913-6 .
- 13) Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, et al. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. J Strength Cond Res 2005 ; 19(2) : 276-85 .