

自律神経機能異常を伴い慢性的な疲労を訴える患者に対する
客観的な疲労診断法の確立と慢性疲労診断指針の作成

運動負荷が酸化ストレスおよび抗酸化能に及ぼす効果に関する研究

研究分担者 局 博一（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻）

研究要旨

運動負荷は生体のエネルギー代謝を刺激すると同時に酸化ストレスをもたらすことが知られている。本研究では、運動負荷による血液の酸化ストレスならびに抗酸化能の変化、また心拍、自律神経機能の変化を明らかにする目的で、運動能力が高いことで知られている馬（サラブレッド種など）を用い、血液のd-ROMs（酸化ストレス指標）、BAP（抗酸化能指標）の変化を観察した。その結果、トレッドミル運動によって、115%VO₂max、2分間の強い運動負荷では、d-ROMs値およびBAP値が有意に上昇したが、運動終了30分目ではほぼ運動前のレベルに戻る事が明らかになった。一方、115%VO₂max、30秒走の運動負荷および馬場での軽運動（速歩）では、BAP値が運動直後に軽度上昇する傾向が示されたに留まった。心拍数および自律神経活動（LF、HFパワー）は、運動負荷時に明瞭に上昇し運動負荷の終了とともに速やかに低下した。水素水を2日間飲水摂取後の馬では、運動前、運動直後、運動終了30分目を通じてBAP値が上昇し、d-ROMs/BAPは、運動終了30分目で低下する傾向が示された。これらの結果より、運動負荷量の増大に伴って酸化ストレスおよび抗酸化能が上昇すること、健康な個体では酸化ストレスと抗酸化能のバランスが運動負荷によっても維持されること、また機序は不明であるが、水素水の摂取は弱いながらも抗酸化能を高める方向に作用することが示唆された。

A. 研究目的

スポーツ科学分野では、オーバートレーニングなどの激しい運動負荷は生体に活性酸素（ROS）の増加をもたらすことで、筋肉などの疲労の一原因となり、また疲労からの回復遅延を招くことが知られている。一方、適度な運動負荷は全身のエネルギー代謝を適度に刺激することで心肺機能の向上、免疫力（抗病性）の亢進、抗酸化能の上昇、自律神経バランスの向上など、健康を良好に維持する上で有益に働くものと思われる。本研究では、動物において強度の異なる運動負荷を与えた際の酸化ストレス（d-ROMs）および抗酸化能（BAP）の変化およびその他の生理学的変化を観察することで、これらの運動ストレスおよび疲労回復の指標としての有用性

を検討した。

B. 研究方法

I. 馬の強運動負荷による酸化ストレス、心拍数、血液生化学値の変化

1) 供試動物

馬（サラブレッド、成馬）5頭を用いた。

2) 実験プロトコール

馬専用のトレッドミル（傾斜6%）を用いて、一定の運動負荷を与えた。10分間のウォーミングアップ（1.7m/sec→3.5m/sec→1.7m/sec）の後、115%VO₂maxの強度（走速度11～13.5m/s）で30秒間および2分間の強運動（キャンター）を負荷した。強運動の直前、直後と強運動終了30分後に頸静脈より採血を行った。

3) 血液の活性酸素および抗酸化能測定

上記の採血で得られた血液から血清中の活性酸素・フリーラジカル量 (d-ROMs試験) および抗酸化能を (BAP試験) をフリーラジカル解析装置 (FREE, ウィスマー社) を用いて調べた。d-ROMsは活性酸素やフリーラジカルによる代謝物であるヒドロペルオキシド (R-OOH) 量を測定することで得られる指標である。測定は呈色法に依って、2価鉄および3価鉄を反応させて得られたアルコキシラジカル (R-O⁻) とペルオキシラジカル (R-OO⁻) にN,N-ジエチルパラフェニレンジアミン (クロモゲン基質) を作用させて得られる最終物質 [A-NH2]⁺を測定することで得られる。BAPは、標本中の還元物質 (抗酸化物質) 量を3価鉄 (FeCl⁺³) が2価鉄 (FeCl⁺²) に還元されることを応用して測定される。

4) その他の指標の測定

上記の指標のほかに、心拍数、血液ヘマトクリット値、血糖値、乳酸値、クレアチニンキナーゼおよび酸素消費量を測定した。

II. 馬の軽運動負荷による酸化ストレス・抗酸化能、心拍数、自律神経活動の変化と水素水摂取の効果

馬 (クリオージョ、サラブレッド、セルフランセ) を用いた。特製の水素水生成装置を用いて電気分解法により製造した水素水を厩舎内で2日間自由飲水させた。平均飲水量は25.3L/頭/日であった。水素水は空気に触れると水素分子が発散しやすくなるため、朝飼、夕飼の時刻を中心に常に新鮮な水素水を給与できるようにした。馬の軽運動負荷は、周辺環境が静かな馬場 (約25×35m) を用いて、乗馬経験が豊かな騎乗者の乗馬によって、安静5分→速歩5分→安静5~10分→速歩5分→安静 (30分まで) の順で運動負荷を行った。この間、馬の心電図 (A-B誘導) をテレメトリー法またはデータログ法で記録した。

C. 研究結果

I. 馬の強運動負荷による酸化ストレス・抗酸化能、心拍数の変化と水素水摂取の効果

1) 酸化ストレス・抗酸化能の変化

a. 30秒走

酸化ストレスを表すd-ROMs値 (平均値±標準偏差、U.CARR) は、運動前、運動終了直

後、運動終了後30分目において、それぞれ151±36.8、155±33.6、144±30.5を示したが有意な変化ではなかった。抗酸化能を表すBAP値 (平均値±標準偏差、μmol/L) は、それぞれ2682±89.4、2876±164.2、2596±268.2を示し、運動終了直後は運動終了後30分目に比べて有意 (P<0.05, paired t-test) に高い値を示した。一方、酸化ストレスと抗酸化能の比を表すd-ROMs/BAP値は運動前、運動直後および運動後30分目で一定しており、有意な変化は認められなかった。

b. 2分走

d-ROMs値は、運動前、運動終了直後、運動終了後30分目において、それぞれ153±34.2、178±39.2、155±36.4であり、運動直後は運動前および運動終了後30分目に比べて有意 (P<0.01, paired t-test) に高い値を示した。BAP値は、それぞれ2638±333、3540±258、2949±228を示し、運動直後は運動前および運動終了後30分目に比べて有意 (P<0.01, paired t-test) に高い値を示した。また、運動終了後30分目においてBAP値は低下したものの運動前にくらべて比較的高いレベルを示した。BAP/d-ROMs値は運動前 (18.2) に比べて運動直後 (20.7) および運動終了30分目 (20.0) でやや高い値が示されたが、有意差ではなかった。

2) 心拍数、酸素消費量

30秒走における最高心拍数 (平均値±標準偏差) は184.2±16.7、2分走における最高心拍数は205.8±14.2であった。

30秒走における酸素消費量 (平均値±標準偏差、ml/kg/min) は129.2±14.7、2分走における酸素消費量は159.1±16.7であった。

3) 血液生化学値

各指標における運動前、運動直後、運動終了後30分目の変化 (平均値) を下記に示す。

a. ヘマトクリット値 (%)

30秒走: 42.9→51.8→41.1

2分走: 39.3→59.4→45.1

b. 血糖値 (mg/dl)

30秒走: 103.8→117.5→107.3

2分走: 105.4→125.3→127.1

c. 乳酸値 (mmol/L)

30秒走: 0.65→6.3→2.3

2分走: 0.58→27.5→12.2

d. クレアチニンキナーゼ (IU/L)

2分走：191→214→201

II. 馬の軽運動負荷による酸化ストレス、心拍数、自律神経活動の変化と水素水摂取の効果

1) 酸化ストレス・抗酸化能の変化

d-ROMs値は運動負荷（速歩）によって軽度上昇し、運動終了後30分目には低下する傾向を示したが、これらの変化に有意差はなかった。水素水摂取の影響に関しては、d-ROMs値は運動前、運動直後、運動後30分目を通して水素水摂取後は水素水摂取前に比べてやや高い傾向が示されたが、水素水摂取前後で有意差はなかった。一方、BAP値に関しては運動前、運動直後および運動後30分目のいずれにおいても水素水摂取後は水素水摂取前に比べて有意 ($P<0.05$) に高かった（運動前：2746 v.s. 2265、運動直後：3029 v.s. 2532、運動後30分目：3208 v.s. 2451）。

d-ROMs/BAP値は運動前、運動直後および運動後30分目で有意な変化は示されなかったが、運動後30分目において水素水摂取後は摂取前に比べて値が小さくなる傾向が示された ($P=0.08$)。

2) 心拍数、自律神経活動 (HRV) の変化

心拍数は運動負荷（速歩）によって増加（運動前38～40bpm、運動中135～140bpm）し、運動後5分目には58～60bpmにまで回復した。これらの心拍数の変化に対する水素水摂取の影響は認められなかった。自律神経活動は運動開始後にLFパワー、HFパワーがいずれも上昇し、運動終了後は低下した。LF/HF比は運動開始直後に上昇したが、その後は低下する傾向を示した。これらの変化に対する水素水摂取の一定した影響は認められなかった。

D. 考察

激しい筋運動は活性酸素やフリーラジカルの大幅な増加をもたらすことで筋細胞の炎症性障害や筋疲労を起こすものと考えられている (Fielding R. A. et al., 1997; Duarte J. A. et al., 1993; Powers S. K. et al., 1999; Sacheck J. M. and Blumberg J. B., 2001; König D. et al., 2001; Close G. L. et al., 2004; Aoi W. et al., 2004)。また、精神的ストレスや精神疾患と活性酸素との関連性に関する研究もなされている (Atanackovic D. et al., 2002; Mahadik S. P. et al., 2001; Zhou F.,

2007; Myint A. M. et al., 2012)。

本研究では、馬への強い運動負荷において、30秒走ではd-ROMsは有意な変化を示さなかった反面、BAPは運動直後に軽度の増加を示した。このことから30秒走では活性酸素およびフリーラジカルの産生が軽度であり、抗酸化能が上昇することによって酸化ストレスの上昇が抑制されているものと思われる。一方、2分走では運動直後のd-ROMsおよびBAPはいずれも有意に上昇した。このことから2分走においては明らかに高い酸化ストレスが生じているものと思われる。d-ROMsは運動後30分目で運動前のレベルに完全に戻ったが、BAPは30分後も運動前の値 (2637.7) に比べて比較的高い値 (2949.1) が保たれた。このことは強運動下での抗酸化能 (BAP) の上昇は運動負荷とほぼ同時に起こり、その効果は運動終了後もしばらく持続することが示唆された。一方、BAP/d-ROMs値は運動直後および運動後30分目では運動前に比べてやや高い値が示されたが有意差ではなかった。このことから健康馬では運動によって酸化ストレスが上昇しても同時に抗酸化能が高まることで、酸化ストレスを緩和するようにバランスが維持されるものと考えられる。

Eaton (1992) のトレッドミルを使った基礎実験結果を参考にすると、馬の全力疾走での30秒走は解糖系による無酸素呼吸の割合が約60% (推定) と比較的多いが、2分走では有酸素呼吸の割合が約80% (推定) にまで高まるものと思われる。本研究では、血中乳酸値の最高が30秒走で6.5mmol/L、2分走で27.5mmol/Lであった。サラブレッドの血中乳酸蓄積開始点 (OBLA) の乳酸濃度が約4mmol/Lであることを考慮すると、全力疾走ながら30秒走でのエネルギー (ATP) 要求は小さく、反面、2分走ではエネルギー要求が著しく高くなることが示唆される。

本研究において30秒走では、d-ROMs値の明瞭な増加が認められなかった原因として、還元作用を持つ物質の活性上昇によって活性酸素の増加が抑制されていることが考えられる一方、有酸素呼吸による活性酸素の発生量自体がそれほど多くないことが要因である可能性が考えられる。一方、2分走では、有酸素呼吸による活性酸素の発生量が多くなり、そのことがd-ROMs値の増加をもたらすものと推測される。BAP値は

血液中のアルブミン、トランスフェリン、セロプラスミン、ビリルビン、尿酸、還元グルタチオン、カタラーゼなど還元作用を有す物質（電子供与）の全体量を示すと考えられることから、2分走ではこれらの物質のいずれかの動員が大きくなり抗酸化に働くものと考えられる。このような抗酸化作用は運動中のみならず運動後もしばらくは持続することで、生体の細胞、組織を過酸化から保護し、炎症の抑制や組織傷害からの回復を早める意義が存在するものと考えられる。

本研究において馬の軽運動負荷による酸化ストレス測定では、軽運動（5分間の速歩）によってd-ROMs値が軽微に増加したものの有意差はみられなかった。一方、運動直後および運動後30分目でBAP値はd-ROMs値にくらべてやや増加の程度が大きかった。水素水摂取後のBAP値は水素水摂取前にくらべて運動前、運動直後、運動終了後30分目のいずれにおいてもBAP値が有意に高かった。最近行ったサラブレッド5頭を用い一定条件のトレッドミル運動負荷を与えた予備実験においても水素水摂取によってBAP/d-ROMs比が高くなる傾向がみられている。水素水は水素が分子状態で水に溶解しているとされ、その生体作用の詳細は不明であるが何らかの機序によって生体の還元能を高める方向に作用している可能性が示唆される。

馬の心拍数は運動負荷中に明瞭に増加し、運動終了後は速やかに減少した（強運動負荷の場合、5頭のサラブレッドの平均値で運動前76.2bpm、運動終了後30分で82.2bpm）。これらの心拍数変化に対する水素水摂取の効果は認められなかった。また、心拍変動解析による自律神経活動は運動中、LFパワーおよびHFパワーが上昇する傾向が認められた。今回実験に使用された馬はいずれも健康な個体であったため心拍反応や自律神経反応が明瞭であった。しかしながら、馬の場合もヒトのアスリートの場合と同様にオーバートレーニングによる持続的な疲労症状（食欲減退、筋腱損傷、筋疲労回復遅延、安静時高心拍など）が観察されることがあり、そのような馬はトレーニング効果が減退し、競走成績も振るわないことが知られている。そのため、安静時の心拍数や自律神経緊張バランスの測定、また今回の実験で行われたような血液の

酸化ストレスや抗酸化能のモニターを行うことは疲労レベルの把握や回復過程の把握に有意義であると思われる。

E. 結論

本研究では、馬の運動負荷による酸化ストレス、抗酸化能の変化を中心に調べ、また水素水摂取の効果を調べた。その結果、運動強度が高い運動負荷においては、血中の酸化ストレス指標であるd-ROMs値および抗酸化能指標であるBAP値が有意に上昇することが明らかになった。また、水素水摂取は弱いながらも抗酸化能を高める方向に作用する可能性が示唆された。心拍数および自律神経機能に対する水素水の効果は現在のところ不明であった。

F. 研究業績

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
局 博一、遠藤麻衣子、花房真和、真鍋 昇、ウマおよび騎乗者の乗馬運動負荷効果に関する研究～心拍・自律神経・酸化ストレス反応と水素水摂取の影響（中間報告）第4回日本動物介在教育・療法学会 2011. 10. 15（東京）。

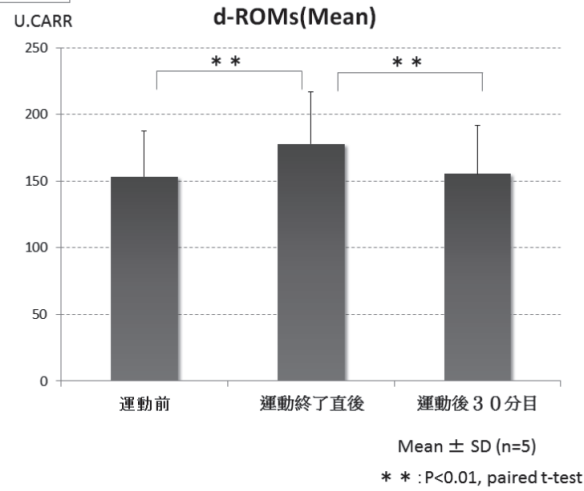
H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
なし

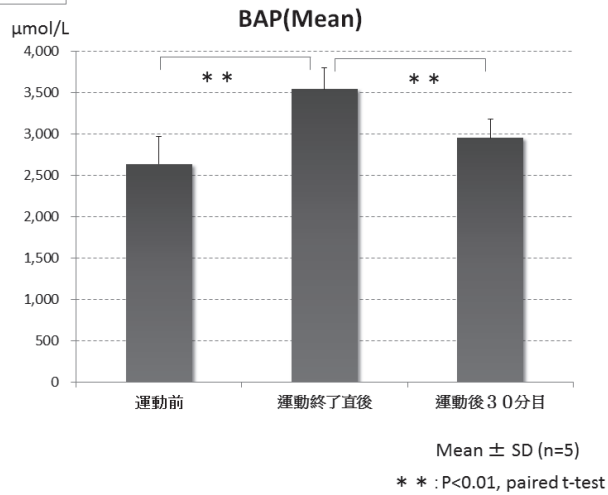
2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

2分走



2分走



2分走

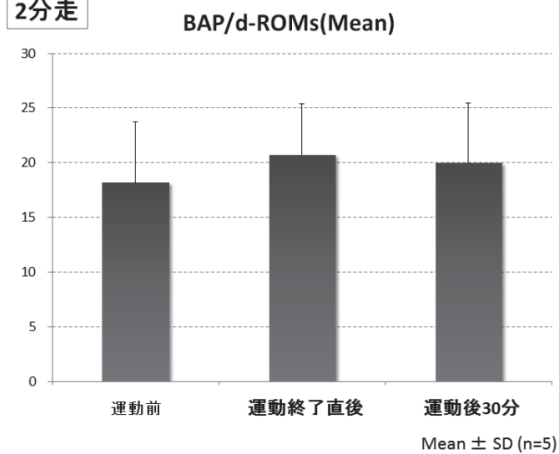


図1. サラブレッドの超最大運動（2分走）における酸化ストレス、抗酸化能の変化