

高強度間欠的運動時の運動パフォーマンスと 酸化ストレスとの関連

神林 勲¹, 塚本 未来², 木本 理可³, 東郷 将成⁴
舩谷 夕貴⁵, 石村 宣人⁵, 内田 英二⁶, 武田 秀勝⁷

Relationship between exercise performance and oxidative stress in high-intensity intermittent exercise

Isao Kambayashi¹, Miku Tsukamoto², Rika Kimoto³, Masanari Togo⁴
Yuki Masuya⁵, Nobuhito Ishimura⁶, Eiji Uchida⁷, and Hidekatsu Takeda⁸

Abstract

We examined whether exercise performance was attenuated by exercise-induced oxidative stress (EIOS) in high-intensity intermittent sprint cycling. Urinary 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) level was used as a biomarker of EIOS. Prior to the experiment, we attempted to clarify whether the spot or 24-hours pooled urine procedure was most suitable for evaluating EIOS by urinary 8-OHdG level. The six subjects were college students who regularly participated in a sports training program. All participants gave written informed consent. Subjects performed 1-min of cycling, consisting of a 7-s sprint at maximal effort (resistance was set at 8% of body weight) and a 53-s recovery (unloaded cycling at 60 rpm) using a bicycle ergometer. Subjects repeated the set 20 times without a break. Urine samples were collected before and after exercise for 24-hours to evaluate 8-OHdG level. With the spot urine analysis, only urinary 8-OHdG level at 1-h after exercise (1 h) was significantly increased compared with baseline (before exercise). However, EIOS could not be discerned in the 24-h pooled urine after exercise. Forty-two college students (including the original 6 subjects) then performed the same intermittent sprint cycling exercise. Urine samples were collected at baseline and 1 h after exercise to determine the relationship between exercise performance and EIOS. Mean power output of 7-sec sprint cycling gradually decreased until the 10th set, and then remained constant. A total power of 20 sets (TP) and decline rate from the 1st to the 10th set (DR) were used for exercise performance

1. 北海道教育大学札幌校
〒002-8502 札幌市北区あいの里5-3-1-5
2. 東海大学国際文化学部
〒005-8601 札幌市南区南沢5-1-1
3. 旭川工業高等専門学校
〒071-8142 旭川市春光台2-2-1-6
4. 酪農学園大学大学院酪農学研究科
〒069-8501 江別市文京台緑町582
5. 北海道教育大学大学院教育学研究科
〒002-8502 札幌市北区あいの里5-3-1-5
6. 大正大学人間学部
〒170-8470 東京都豊島区西巣鴨3-20-1
7. 北星学園大学社会福祉学部
〒004-8631 札幌市厚別区大谷地西2-3-1

著者連絡先 神林 勲
kambayashi.isao@s.hokkyodai.ac.jp

1. Hokkaido University of Education Sapporo
5-3-1-5 Ainosato Kita-ku Sapporo 002-8502
2. School of International Culture Relations, Tokai University
5-1-1-1 Minaminosawa Minami-ku Sapporo 005-8601
3. Asahikawa National College of Technology
2-2-1-6 Shunko-dai Asahikawa 071-8142
4. Graduate School of Dairy Science, Rakuno Gakuen University
582 Midorimachi Bunkyo-dai Ebetsu 069-8501
5. Graduate School of Education, Hokkaido University of Education
5-3-1-5 Ainosato Kita-ku Sapporo 002-8502
6. Faculty of Human Sciences, Taisho University
3-20-1 Nishi-sugamo Toshima-ku Tokyo 170-8470
7. School of Social Welfare, Hokusei Gakuen University
2-3-1 Oyachi Atsubetsu-ku Sapporo 004-8631

indexes. Urinary 8-OHdG level at 1 h ($23.9 \pm 1.6 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) was significantly higher than that at baseline ($6.3 \pm 0.6 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). There was no significant relationship between TP and urinary 8-OHdG level; however, DR was significantly related to urinary 8-OHdG level. Results suggested that EIOS might deteriorate power output of the early phase in high-intensity intermittent sprint cycling exercise.

Key words : mean power, total power, decline rate, urinary 8-OHdG level, spot urine, 24-hour pooled urine

I. 緒 言

球技などの競技スポーツでは、ダッシュやジャンプ等の高強度運動が歩行やジョギング等の低強度運動を挟んで間欠的に反復される。運動は骨格筋により具現化されるため、競技中、高い運動パフォーマンスを維持するには、高強度運動時で発揮される筋力や筋パワーの低下を抑制することが重要となる。

高強度間欠的な運動における発揮パワーの維持には、個人の無酸素能力 (Gaitanos, et al., 1993) に加え、有酸素能力の優劣が重要であるとされている。坂井ほか (1999) は、高強度間欠的なハイパワー発揮能力の維持は有酸素能力と関連が深いことを認めており、神林ほか (2007) も同様な報告を行っている。有酸素能力が高いと、筋内のクレアチンリン酸の減少や pH の低下を抑制することができ、それが発揮パワーの維持につながることを示唆されている (本間ほか, 2005)。

高強度運動においては、活性酸素種 (Reactive oxygen species; 以下 ROS) による酸化ストレスが生じる。例えば、30秒間の全力ペダリング運動からなる Wingate テスト (Groussard et al., 2003) や疲労困憊までの漸増負荷運動 (神林ほか, 2005) の後に酸化ストレスの増大が認められている。また、Kabasakalis et al. (2014) は、50mの全力泳を6回行った後、酸化ストレスの指標である血中の8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-hydroxy-deoxyguanosine; 以下 8-OHdG) 濃度が有意に増加したことを報告している。他方で、ROSを消去する抗酸化物質を投与することで、最高酸素摂取量 (Peak oxygen uptake; 以下 $\dot{V}O_{2\text{peak}}$) の92%に相当する負荷の自転車漕ぎ運動の疲労困憊まで時間が延長したとの報告もある (Medved et al., 2004)。高強度間欠的運動についての報告は少ないものの、体重の8%の負荷での7秒間全力ペダリングを1分間に1回、20回反復させた研究 (神林ほか, 2004) では、運動終了1時間後に排泄された尿のみでの評価ではあるものの、酸化ストレスの指標である尿中8-OHdG含有量の増加を認めている。短距離選手を対象に、同様な負荷で15秒間の全力ペダリングを1分間の休息で4回反復した研究 (Jówko et al., 2014) においても、脂質過酸化の指標であるマロンジアルデヒドが運動後に有意に増加している。

このように間欠的な運動を含む高強度運動では酸化ストレスが生じることが報告されている。また、高強度運

動における疲労の原因の1つとしてROS生成の増大が考えられており (和田ほか, 2006)、酸化ストレスによって筋の張力発揮が低下するという組織レベルの研究もある (Reid, 2001, Moopanar and Allen, 2005, Yamada, et al., 2006)。よって、高強度間欠的運動における酸化ストレスの増大がパフォーマンスの低下と関連するという仮説が立てられるが、この関係を検討した研究は見当たらない。唯一、Deminice et al. (2010) は水泳選手を対象に100mの全力泳を8回反復する運動において、パフォーマンスと酸化ストレスとの相関関係を検討しているものの、用いられているパフォーマンスは個人の最大能力であり、全力泳の反復で認められるパフォーマンスの低下との関連性は検討されていない。

そこで本研究は目的①として、自転車エルゴメーターを用いて高強度間欠的運動を被検者に負荷し、その時の運動パフォーマンスを、発揮パワーの総和である総パワー (total power; 以下 TP) と発揮パワーの低下率 (decline rate; 以下 DR) の2つにより評価し、酸化ストレスの指標である尿中8-OHdGレベルとの関連を検討した。また、実験の開始に先立ち、目的②として、その運動による酸化ストレスを尿中8-OHdGレベルで評価するのに適した採尿法 [蓄尿法もしくは採尿された尿毎 (スポット尿) の評価法] と、スポット尿での評価の場合の採尿タイミングについても合わせ検討した。健康・スポーツ科学において、尿中8-OHdGは生体に負荷された酸化ストレスを示す指標であると考えられているが (Laura et al., 2000)、尿中8-OHdGを用いて運動後の酸化ストレスを評価した研究では、増加するもの (Radak et al., 2000, Tsai et al., 2001, Almar et al., 2002, 齋藤ほか, 2005) と増加しないもの (Sumida et al., 1997a と b, Hartmann et al., 1998) があり、結果が一致していない。増加が認められなかった研究では、8-OHdGの評価に24時間の蓄尿が用いられている。一方で、増加を報告した研究では、スポット尿や短時間での蓄尿を用いて測定が行われていた。加えて、本研究と同様な運動負荷を用いた先の研究 (神林ほか, 2004) では、運動終了1時間後に排泄されたスポット尿のみでしか評価を行っていない。以上のことから、先行研究の結果の不一致には採尿法の影響が考えられ、また、スポット尿で評価する場合には運動終了後のどの程度の時間経過で行えばよいかは明らかになっていない。そこで、本研究では目的①に加えて目的②の検討を行うものである。

II. 方 法

A. 被検者

被検者は大学で運動部に所属し、定期的にトレーニングを実施している男性42名であった(年齢 20.3 ± 0.4 歳, 身長 175.0 ± 1.3 cm, 体重 67.1 ± 1.6 kg, BMI 21.9 ± 1.8 $\text{kg} \cdot (\text{m}^2)^{-1}$, 平均値 \pm 標準誤差). 本研究の参加にあたり, 被検者には研究の趣旨および安全性・危険性について口頭と文書で十分に説明し, 自主的な参加の同意を文書により得た. また, 本研究の実験プロトコルは, 札幌医科大学の倫理委員会の承認を受け, ヘルシンキ宣言に則り実施された.

B. 実験の概要

被検者は, 自転車エルゴメーターを用いた20分間の高強度間欠的運動を行った. 実験前日は激しい運動やトレーニングは制限され, 運動前2食の食事は検者が用意したものを摂らせた. 採尿は, 運動前の安静時(以下baseline)と運動終了1時間後(以下1h)の2回実施した. すべての尿サンプルの8-OHdG濃度の測定には, 酵素免疫測定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; 以下ELISA法)を用いた.

42名の被検者の内, 6名(年齢 20.5 ± 0.4 歳, 身長 171.5 ± 2.8 cm, 体重 67.7 ± 7.8 kg, BMI 22.7 ± 1.8 $\text{kg} \cdot (\text{m}^2)^{-1}$, 平均値 \pm 標準誤差)を対象とし, 4日間に渡る採尿法・採尿タイミングと尿中8-OHdGレベルに関する実験を行った. この期間, 被検者には実験以外での激しい運動やトレーニングは制限し, 食事は実験期間中, 同一のものを摂らせた. 実験1日目は通常的生活を行わせ, 実験2日目の午前9時から4日目の午前中までは検者らが準備した部屋で生活するよう指示した. 実験2日目の午前9時から実験3日目の午前9時までの間に運動前24時間の尿中8-OHdGレベルを調べるため, 自由排泄されたすべてのスポット尿を回収した. 高強度間欠的運動は3日目の午前中に行い, 1hと運動終了3時間後(以下3h), 5時間後(以下5h)で排尿するように指示し, 以後は運動終了後24時間まで自由排泄させ, それらのスポット尿をすべて回収した. 実験2日目と3日目における採尿の概要については図1に示した.

C. 高強度間欠的運動

42名の被検者はパワーマックス(COMBI社製V II)を用いて高強度間欠的運動を行った. 運動前に衣服の着用のない状態で体重を測定し, 着衣後, ウォームアップとストレッチを実施した. パワーマックスの椅子の高さとハンドルの位置を調節した後, 靴とペダルを粘着性のテープにより固定した. 自転車で2分間安静状態を保持した後, 高強度間欠的運動として体重 $\times 0.08$ kpの負荷で全力ペダリングを7秒間, 無負荷(0kp)の状態ですべての被検者に合わせた毎分60回転のペダリング

を53秒間, 計1分間を1セットとし, それを連続的に20セット行わせた. 運動中は, 胸部誘導により心拍数を連続的に記録した. 被検者には1セット目より全力ペダリングを行うこと, 20セットに渡ってできる限り発揮パワーを維持することを指示した. また, 全力ペダリング時には常に検者による声掛けを行い, 全力ペダリングを促した. 各セットの発揮パワーは7秒間の平均パワーとし, その平均パワーを体重で除した値($\text{Watts} \cdot \text{kg}^{-1}$)を分析に用いた. 運動後は運動前と同じ条件で体重の測定を行い, 体重減分に見合う水分量を運動終了30分以内に摂取させた.

20セットの平均パワーの推移から, 各被検者の運動パフォーマンスを2つの方法により評価した. 1つは20セットの平均パワーの総和であるTP, もう1つは1セット目から10セット目までの低下率DRである. TPは, 20セットの総和である TP_{1-20} , 前半10セットの総和である TP_{1-10} , 後半10セットの総和である TP_{11-20} の3つの指標を用いた. DRは, 1セット目から10セット目までの低下率を一次回帰式($y=ax+b$)によって求めた傾き(a)で評価した.

被検者42名中18名(年齢 19.9 ± 0.3 歳, 身長 175.3 ± 1.1 cm, 体重 67.9 ± 1.1 kg, BMI 22.1 ± 0.3 $\text{kg} \cdot (\text{m}^2)^{-1}$, 平均値 \pm 標準誤差)において, 2分間の安静開始から高強度間欠的運動終了まで, 自動呼気ガス分析装置(ミナト医科学社製AE-280S)を用いて, breath-by-breath法により酸素摂取量(Oxygenuptake; 以下 $\dot{V}O_2$)の測定を行った. 測定されたデータを8呼吸ごとに移動平均し, 呼気ガスデータは60秒ごとに単純平均したものを分析に供した. $\dot{V}O_2$ を測定した被検者18名は, 高強度間欠的運動の1週間以上前に, 自転車エルゴメーター(COMBI社製75XL II)によるランプ負荷法($30 \text{watts} \cdot \text{min}^{-1}$)

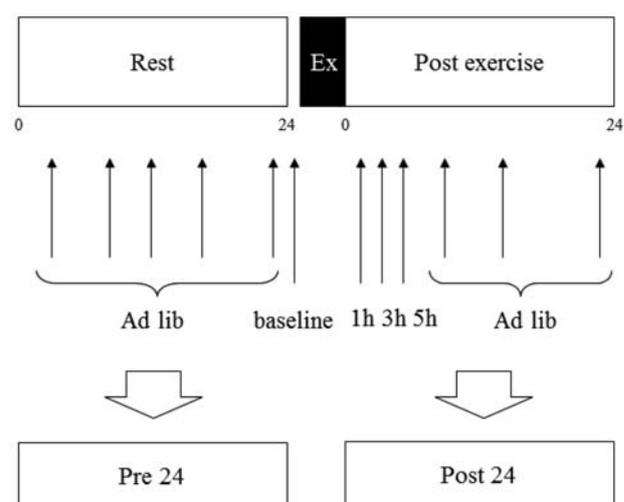


Fig.1 Urine collection in the 2nd and 3rd experimental days. Spot urine samples were stored 2 ml in each urine excretion, and afterwards remnants pooled all together as 24 hours urine samples at rest or after intermittent sprint cycling. Ex; high-intensity intermittent exercise, ↑; Urine excretion

を用いた漸増負荷運動により $\dot{V}O_{2peak}$ の測定を実施した。測定結果は、18名の平均値 (\pm 標準偏差) で $53.3 \pm 2.3 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ であった。

D. 採尿方法

被検者は排尿されたすべての尿をプラスチック製のカップに排泄した。採尿後、ただちに検者が排泄時刻の確認と尿量の測定を行った。その後、尿中8-OHdG濃度の分析のために、2 mlをマイクロチューブに分注し、分析まで -80°C で凍結保存した。4日間にわたる実験に参加した6名の被検者の採尿においては、2 mlの分注後に残った尿をすべて1つに蓄尿し、それを高強度間欠的運動前後の24時間蓄尿 (運動前:以下Pre 24, 運動後:以下Post 24) として分析に供した (図1)。

E. 尿中8-OHdGレベルの分析

凍結保存していた尿サンプルを常温で解凍した後、卓上遠心分離機 (BECKMAN社製Microfuge R) を用い、3000gで10分間遠心分離を行った。そして、沈殿物を除いた上澄みを8-OHdGの分析に用いた。尿中8-OHdG濃度の分析は、96ウェルのプレートを用いたELISA法による測定キット (日本老化制御研究所製) を使用した。各尿サンプルの8-OHdG濃度は、3つのウェルの測定値の平均値を用いた。

本研究は、尿中8-OHdGレベルを尿中8-OHdG濃度に排泄量を乗じ、体重と排泄までに要した時間で除した排泄速度 ($\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) で評価した。その理由は、濃度のみの評価では発汗に伴う尿量減少の影響を受けること、濃度をクレアチニンで補正する方法では運動により尿中クレアチニン量も増加してしまう (Almar et al., 2002) からである。24時間の蓄尿においては、濃度と排泄量を乗じ体重で除した値 (尿中8-OHdG含有量) と尿中8-OHdGレベルの2つで評価した。

F. 統計処理

測定した値は全て平均値 \pm 標準誤差で表した。各変数間についての平均値の差の検定では、2群間の比較には対応のあるt検定を用い、3群以上の比較には一元配置の分散分析を行い、その後多重比較検定を行った。2つの変数間の相関関係の検討にはピアソン積率相関分析を用いた。なお、有意水準はいずれの場合も5%未満とした。

III. 結 果

A. 高強度間欠的運動における運動パフォーマンスの評価

高強度間欠的運動における各セットの平均パワーの推移を図2に示した。平均パワーはセットの中盤 (10~11セット目) まではセットが進むにつれてほぼ直線的に

低下し、それ以降はほぼ一定を維持した。20セット中の $\dot{V}O_2$ について、被検者18名の平均値は $40.5 \pm 2.9 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ であり、 $75.1 \pm 2.7\% \dot{V}O_{2peak}$ に相当する酸素摂取水準であった (換気量; $93.9 \pm 2.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 二酸化炭素排泄量; $42.3 \pm 2.7 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, ガス交換比; 1.04 ± 0.01)。平均心拍数は $160.4 \pm 2.7 \text{ bpm}$ を示した。また、高強度間欠的運動における1セット目の平均パワーの絶対値 ($803 \pm 10 \text{ Watts}$) は、漸増負荷運動において疲労困憊

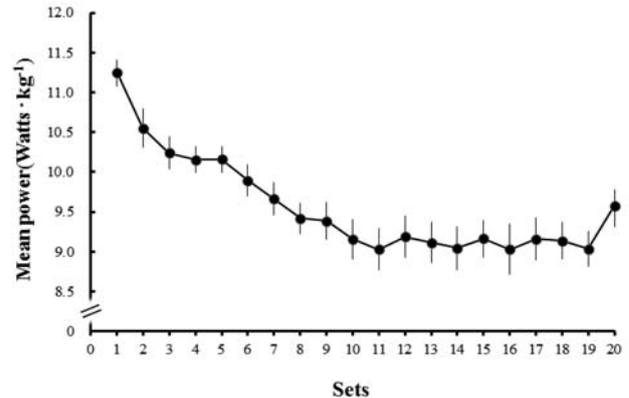


Fig.2 Change of averaged mean power in each set during high-intensity intermittent exercise. Data are presented mean and standard errors.

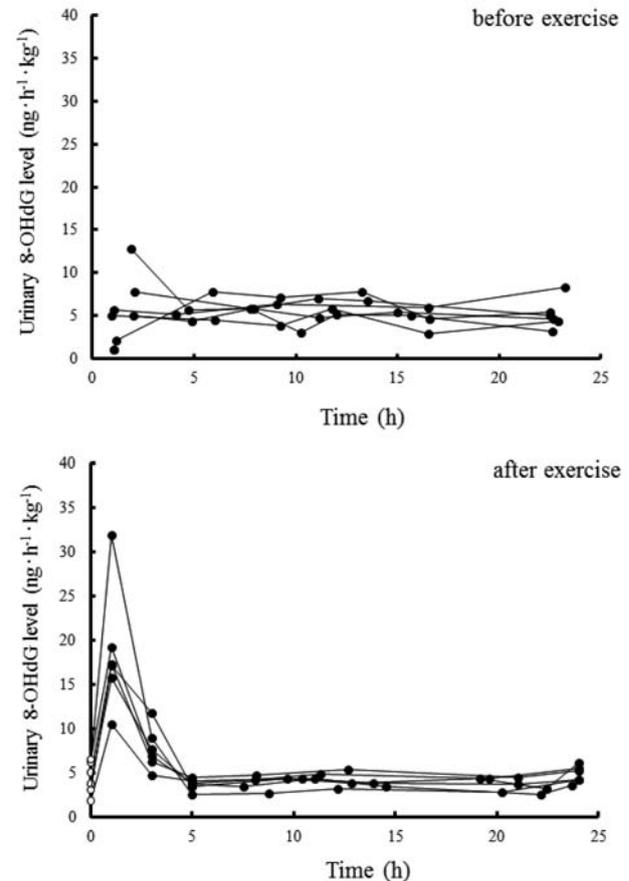


Fig.3 Individual changes of urinary 8-OHdG level at each spot urine sample in 6 subjects during 24 hours before and after high-intensity intermittent exercise. Open circles are presented just before exercise (i.e., baseline).

Table 1 Change of urinary 8-OHdG level before and after high-intensity intermittent exercise in 6 subjects.

	Pre24	baseline	1h	3h	5h	Post24
Urinary 8-OHdG level (ng · kg ⁻¹ · h ⁻¹)	5.5±0.3	4.4±0.8	18.6±2.9**	7.7±1.0	3.7±0.3	5.1±0.4

**denotes significant difference (p<0.01) compared with other values.

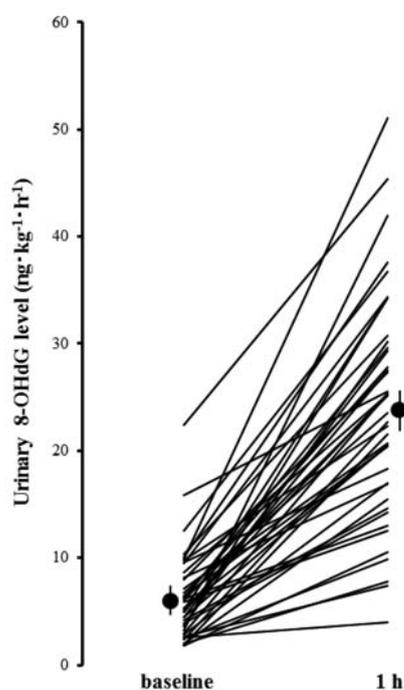


Fig.4 Individual urinary 8-OHdG level before (baseline) and after 1 h of high-intensity intermittent exercise (1h). Closed circles are presented mean and standard errors at baseline and 1 h, respectively.

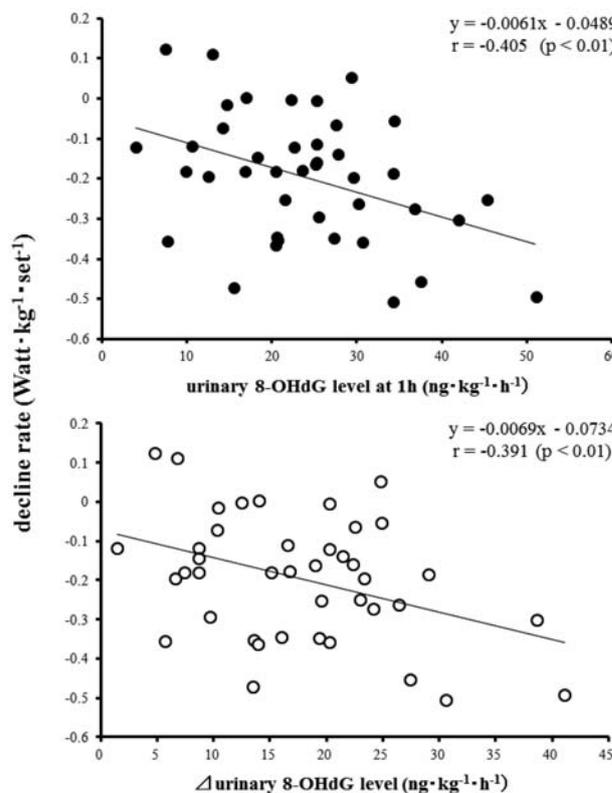


Fig.5 Relationship between urinary 8-OHdG level and decline rate (DR, y-axis) in high-intensity intermittent exercise.

Table 2 Correlation coefficients between exercise performance and oxidative stress makers.

	Urinary 8-OHdG level	
	1 h	Δ
TP ₁₋₂₀	-0.184	-0.040
TP ₁₋₁₀	-0.136	-0.033
TP ₁₁₋₂₀	-0.233	-0.094
DR	-0.405**	-0.391**

Relationships between 3 TP (total power) parameters and urinary 8-OHdG level were not significant. **: p<0.01

に達した負荷 (340±11Watts) のおよそ2.4倍であった。

TP₁₋₂₀, TP₁₋₁₀およびTP₁₁₋₂₀の平均値は, それぞれ 192.3±2.0Watts · kg⁻¹, 99.9±0.91Watts · kg⁻¹および92.1 ±1.3Watts · kg⁻¹であった. DRは, -0.195±0.024Watts · kg⁻¹ · set⁻¹となった.

B. 高強度間欠的運動前後24時間の尿中8-OHdGとその推移

蓄尿であるPre24とPost24の尿中8-OHdG含有量は, それぞれ142.7±11.9ng · kg⁻¹と128.4±12.3ng · kg⁻¹であった. また, スポット尿ごとに尿中8-OHdG含有量を計算し, それを合計した総和は, 高強度間欠的運動前

および運動後でそれぞれ138.6±14.7ng · kg⁻¹, 139.3 ± 8.7ng · kg⁻¹であり有意差はなかった. スポット尿の総和 (X) と蓄尿 (Y) での尿中8-OHdG含有量の回帰分析を行ったところ, 運動前の回帰式の傾きは1.003, 相関係数は0.927, 運動後の回帰式の傾きは1.349, 相関係数は0.959であった. 加えて, 運動前と運動後のそれぞれにおいてスポット尿の総和と蓄尿の8-OHdG含有量の平均値には有意差がなかった. Pre24とPost24における尿中8-OHdGレベルは, 5.5±0.3ng · kg⁻¹ · h⁻¹と5.1 ± 0.4ng · kg⁻¹ · h⁻¹であり有意差は認められなかった.

図3に, 被検者6名における運動前24時間 (上図) と運動後24時間 (下図) の尿中8-OHdGレベルを, すべてのスポット尿で示した. 運動前では2.1ng · kg⁻¹ · h⁻¹から12.9ng · kg⁻¹ · h⁻¹の間で推移していたが, 運動後ではいずれの被検者においても1hに最大値が現れ, その後, 3h, 5hと減少し, それ以降は運動前のレベルで推移した. 被検者6名のPre24, baseline, 1h, 3h, 5hおよびPost24における尿中8-OHdGレベルについて比較したところ, 1hのみが他の値に比較して有意に高値であった (表1).

C. 運動パフォーマンスと尿中8-OHdGレベルの関連

図4には、被検者42名におけるbaselineと1hの尿中8-OHdGレベルの変化を示した。すべての被検者において、1hで増加が認められた。1hの平均値 $23.9 \pm 1.6 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ は、baselineの平均値 $6.3 \pm 0.6 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ よりも有意に高値であった。baselineから1hへの変化量(Δ8-OHdG)の平均値は、 $17.6 \pm 1.4 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ であった。

表2に、運動パフォーマンスと尿中8-OHdGレベルとの相関分析における相関係数を示した。TPについては、3つの指標は1hの尿中8-OHdGレベルとΔ8-OHdGといずれも有意な相関関係は認められなかった。しかしながら、DRは尿中8-OHdGレベル、Δ8-OHdGのどちらとも中程度ながら有意な相関関係があった。それらの散布図を図5に示した。

IV. 考 察

本研究で得られた主要な知見は以下に示す通りである。高強度間欠的運動の前半の発揮パワー低下率(DR)は、1hにおける尿中8-OHdGレベルやbaselineからの増量と中程度ながら有意な相関関係が認められた。このことから、ROSによる酸化ストレスが高強度間欠的運動前半の発揮パワー低下と関連することが示唆された。また、6名の被検者を対象に、高強度間欠的運動前後2日間のすべての尿を回収し、採尿方法・採尿タイミングと尿中8-OHdGレベルの関係を検討したところ、高強度間欠的運動後の尿中8-OHdGレベルを評価するには蓄尿法ではなくスポット尿による評価を用い、運動後1時間以上経過した最初の排尿で評価することが最も適していることが明らかとなった。

先の研究(神林ほか, 2004)で、本研究と同一の運動負荷後、尿中8-OHdG濃度が1hのスポット尿において有意に増加したことが報告され、尿中の8-OHdG濃度は運動後、比較的早期に増加することが示唆されている。スポット尿による採尿タイミングに関する測定から、尿中8-OHdGレベルは1hで最も高くなり、3hや5hではすでに安静時の値と変わらないレベルにまで回復した(図3, 表1)。1h, 3hおよび5hは、被検者への指示によって行われた強制排尿であることから、尿中8-OHdGレベルで運動による酸化ストレスを評価する場合、運動後1時間以上経過した最初のスポット尿で評価することが最も適していることが明らかとなった。この結果は、心拍予備力の60~70%で1時間の自転車漕ぎ運動後において、尿中8-OHdGレベルは運動2時間後に有意に増加し、6時間後には安静時の値に回復することを報告した先行研究(齊藤ほか, 2005)とも一致する。細胞内における8-OHdGの修復酵素のメカニズムや尿中への排泄については明らかではないが(Nakano et al., 2003)、運動により生成が増加したROSが引き起こした

8-OHdGの尿中への排泄は、運動後、比較的早期に完了すると考えられる。以上のことから、運動後24時間の蓄尿で8-OHdGを測定すると、運動による酸化ストレスを評価できず、尿中8-OHdGによって酸化ストレスを評価する場合は、運動後の採尿法・採尿タイミングに留意して実施しなければならないことが示唆される。

表2に示したように、運動パフォーマンスの指標であるTPは、いずれも尿中8-OHdGレベルと有意な相関関係が認められなかった。このことは、20セットを通じてみた運動パフォーマンスは酸化ストレスの影響を受けず、高いTPを発揮するには先行研究でも指摘されているように、優れた有酸素能力が必要なことを示唆する(坂井ほか, 1999; 神林ほか, 2007; 鬼頭ほか, 2007)。また、20セットの中で最も高い平均パワーを100%として各セットの%平均パワーの推移をみると、個人差は小さく、各被検者とも10~11セット目以降はいずれも約80%で推移した。よって、TPを高くするには、有酸素能力の向上に加えて、トレーニングの方向性として1セットで発揮される平均パワーを高めることが必要であると考えられる。

一方で、DRは尿中8-OHdGレベルと有意な相関関係が認められた(表2, 図5)。このことは、高強度間欠的運動の前半における平均パワーの低下は、酸化ストレスとの関連が示唆される。セットの進行に伴う平均パワー低下はアデノシン3リン酸(以下、ATP)供給能の低下の影響が大きいと考えられるが、酸化ストレスによる筋機能低下の関与も推察される。高強度運動によって抗酸化能力を上回る過剰なROS生成が酸化ストレスをもたらし、それが筋機能低下となることが先行研究によって示されている。In vitroの実験では、筋線維をROSに暴露すると、張力が低下しROS補足剤を添加すると張力低下が抑制されること(Reid, 2001)、カルシウムイオン濃度に対する感受性が低下し筋張力が減少すること(Moopenar and Allen, 2005)が報告されている。Matsunaga et al. (2003)は、最大酸素摂取量の100%に相当する強度でラットを走行させ、骨格筋における筋小胞体カルシウムATPase活性の減少とともにATPaseに含有されるカルボニル基(酸化ストレスの指標)が増加したことを認めている。また、このATPaseにATPを局所的に供給するクレアチンキナーゼもROSの影響を受けて活性が低下すると予想されている(和田ほか, 2006)。以上のことから、過剰なROS生成による筋への酸化ストレスが平均パワーの低下をもたらし、酸化ストレスの指標である尿中8-OHdGレベルと関連性が認められたと推察される。

本研究で用いた高強度間欠的運動は、20セット全体の平均値でみると、 $75.1 \pm 2.7\% \dot{V}O_{2peak}$ に相当する酸素摂取水準であった。しかしながら、骨格筋での酸素動態を考えると、高強度間欠的運動は7秒間の全力ペダリングと無負荷での53秒間(60rpm)のペダリングで構成さ

れていたことから、7秒間のハイパワー発揮では機械的圧迫 (mechanical compression) により活動筋内で脱酸素化が生じ、その後の無負荷でのペダリング時の血流回復で再酸素化が生じていたと推察される (加藤と大西, 2006)。運動時においてミトコンドリアでROSであるスーパーオキシドが生成する状況は、酸素が不足した状態で酸化リン酸化が進行しATPの再合成が行われる時である。このような状態では、電子の受け皿となる酸素の供給が不足しているためミトコンドリア内膜上の電子伝達系に電子が貯留し、マトリックス内のプロトン濃度の増加により電圧も増加している。そこへ酸素が急激に供給されると電子が電子伝達系上を一斉に動き出し、電子の漏出が増加する。漏出した電子は酸素と反応して、スーパーオキシドとなる。先行研究 (Shi et al., 1999) において、高強度運動後の疲労した骨格筋内のミトコンドリアでは呼吸調節率 (RCR) が低下し、内膜から電子が漏出しやすくなっていることが報告されている。よって、ミトコンドリアからのROS生成が高強度間欠的運動における酸化ストレスの1要因と推察される。

ミトコンドリアからのROS生成に加えて、ROS生成の他の原因としてキサンチンオキシダーゼ系が考えられる。虚血や高い張力発揮の連続は細胞内カルシウムイオン濃度の増加によりカルシウムイオン依存性プロテアーゼが活性化され、その加水分解作用によりキサンチンデヒドロゲナーゼがキサンチンオキシダーゼに変換される。加えて、ADP濃度の増加によりヒポキサンチン濃度も増加する。このような状態で酸素が供給されると、キサンチンオキシダーゼ、ヒポキサンチンおよび酸素が共存することになり、多量のROSが生成される (Sachdev and Davies, 2008)。以上のように、ミトコンドリアからの電子漏出やキサンチンオキシダーゼ系が、本研究で用いた高強度間欠的運動のROS生成源と推察される。

本研究では、後半10セットの運動においても酸化ストレスが生じていたと推察されるが、平均パワーの低下が認められなかった (図2)。この原因については明らかではないものの、筋パワー発揮の源となるATPの供給能の低下の影響が大きいことが考えられる。筋バイオブシー法を用いた先行研究 (Gaitanos et al., 1993) によると、体重の6.5%の負荷で6秒間の全力ペダリングを30秒間の休息で10回反復させた場合、10回目の運動中の解糖系によるATP再合成能は1回目のそれと比較して13%に、10回目の運動後のクレアチニン酸量は1回目の運動前の16%であったと報告されている。この結果は、後半10セットにおいてはクレアチニン酸量や解糖系によるATP再合成能がほぼ底打ち状態になっていることを示している。よって、後半10セットで平均パワーの低下が認められなかったのは、前述のようなATP供給能の底打ちと関係しているかもしれない。加えて、ROS生成の減少、抗酸化能力の増加もしくはその両方による影響により酸化ストレスが軽減されていた可能性もある。

例えば、電子スピン共鳴装置を用いた *in vitro* の実験において、スーパーオキシドの消去能は調整サンプル内の乳酸濃度に依存して増加することが報告されている (Groussard et al., 2000)。今後、運動前後のみならず運動中の酸化ストレス指標の動態や抗酸化能の測定等、より詳細な検討が必要である。

本研究は、一過性の高強度間欠的運動における運動パフォーマンスの評価指標の1つが、ROSによる酸化ストレス指標と有意な相関関係を認めた最初の研究である。これまでは、抗酸化物質の投与によって筋力低下の抑制が認められたり (Shindoh et al., 1990; Reid et al., 1994)、オーバートレーニングによる慢性的な疲労状態と酸化ストレスとの関連が報告されたりしてきた (Margonis et al., 2007)。その中で一過性の運動において運動パフォーマンスの優劣が酸化ストレスと関連することを示した意義は大きい。Fatouros et al. (2010) は、サッカーゲーム (45分間×2) 後、72時間の回復期で無酸素的な運動パフォーマンス (スピードやジャンプ力) は低下し、酸化ストレス指標が増加していることを報告している。このような報告とも考えあわせ、高強度間欠的運動が含まれる競技スポーツにおいては、酸化ストレスへの対応が必要であると考えられる。

今後の展望として、他の酸化ストレス指標や抗酸化能力の評価、抗酸化物質の投与の影響を検討するための介入実験、異なる運動様式による高強度間欠的運動を実施する等して、高強度間欠的運動の運動パフォーマンスと酸化ストレスとの関連をより詳細に検討して行く必要があるだろう。加えて、本研究では被検者が常に全力で各セットのペダリングを実施したかどうかの客観的な指標を得ることができていないため、研究としての限界も存在する。今後は生理学的・心理学的な指標について検討を深め、被検者が最大努力で間欠的運動に従事していたことを評価する必要があるだろう。

V. まとめ

本研究では被検者42名を対象に、体重×0.08kpの負荷で全力ペダリング7秒間を20セット実施する高強度間欠的運動を負荷し、安静時 (baseline) と運動終了1時間後 (1 h) において採尿を行い、酸化ストレス指標として尿中8-OHdGレベルを評価した。そして、高強度間欠的運動の運動パフォーマンス (TPとDR) と尿中8-OHdGレベルとの関連を検討した。また、6名の被検者を対象に、高強度間欠的運動前後2日間のすべての尿を回収し、採尿法・採尿タイミングが尿中8-OHdGレベルに与える影響を合わせて検討した。結果は以下に示す通りである。

1. 7秒間の平均パワーは中盤 (10~11セット) まではセットが進むにつれてほぼ直線的に低下し、12セット以降はほぼ一定を維持した。

2. 尿中8-OHdG レベルは被検者全員において1 hで増加し、平均値でみるとbaselineに比較して1 hで有意であった。
3. 高強度間欠的運動後の尿中8-OHdG レベルは、1 hで最も高くなり、その2時間後以降は安静時の値にまで回復した。
4. DRは、1 hにおける尿中8-OHdG レベルやbaselineからの増加量と中程度ながら有意な相関関係が認められた。

以上のことから、高強度間欠的運動において尿中8-OHdG レベルで酸化ストレスを評価するには、蓄尿法を用いるのではなく、運動後1時間以上経過した最初の排尿で評価することが最も適していることが明らかとなった。また、運動パフォーマンスの指標の1つであるDRと尿中8-OHdG レベルには有意な相関関係が認められたことから、ROSによる酸化ストレスと運動前半の発揮パワー低下との関連が示唆された。

謝 辞

本研究の一部は、北海道教育大学学術研究推進経費(学長裁量経費) および文部科学省イノベーションシステム整備事業・地域イノベーション戦略支援プログラム(グローバル型) さっぽろバイオクラスター BIO-Sの補助を受けて実施された。

参考文献

- Almar, M., Villa, J.G., Cuevas, M.J., Rodriguez-Marroyo, J.A., Avila, C., and Gonzalez-Gallego, J. (2002) Urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of oxidative damage in road cycling. *Free Radic. Res.*, 36 : 247-253.
- Deminice, R., Trindate, C.S., Degiovanni, G.C., Garlip, M.R., Portari, G.V., Teixeira, M., and Jordao, A.A. (2010) Oxidative stress biomarkers response to high intensity interval training and relation to performance in competitive swimmers. *J.Sports Med.Phy.Fitness*, 50 : 356-362.
- Fatouros, I.G., Chatzinikolaou, A., Douroudos, I.I., Nikolaidis, M.G., Kyparos, A., Margonis, K., Michailidis, Y., Vantarakis, A., Taxildaris, K., Katrabasas, I., Mandalidis, D., Kouretas, D., and Jamurtas, A.Z. (2010) Time-course of changes in oxidative stress and antioxidant status responses following a soccer game. *J.Strength Cond.Res.*, 24 : 3278-3286.
- Gaitanos, G.C., Williams, C., Boobis, L.H., and Brooks, S. (1993) Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. *J.Appl.Physiol.*, 75 : 712-719.
- Groussard, C., Morel, I., Chevanne, M., Monnier, M., Cillard, J., and Delamarche, A. (2000) Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion : an in vitro study. *J.Appl.Physiol.*, 89 : 169-175.
- Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Vincent, S., Sergent, O., Cillard, J., and Gratas-Delamarche, A. (2003) Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur.J.Appl. Physiol.*, 89 : 14-20.
- Hartmann, A., Pfuhler, S., Dennog, C., Germadnik, D., Pilger, A., and Speit, G. (1998) Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or induction of micronuclei. *Free Radic. Biol. Med.*, 24 : 245-251.
- Jówko, E., Długołęcka, B., Makaruk, B., and Cieśliński, I. (2014) The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced oxidative stress parameters in male sprinters. *Eur.J.Nutr.*, 54 : 783-791.
- Kabasakalis, A., Tsalis, G., Zafrana, E., Loupos, D., and Mougios, V. (2014) Effects of endurance and high-intensity swimming exercise on the redox status of adolescent male and female swimmers. *J.Sports Sci.*, 32 : 747-756.
- 加藤孝司・大西祥平(2006) 間欠的運動時の局所骨格筋酸素動態の検討. 慶応義塾大学体育研究所紀要 : 45 : 7-12.
- 神林勲・石村宣人・中村寛成・木本理可・武田秀勝(2007) 大学ラグビー選手の間欠的ハイパワー発揮能力に及ぼすクレアチン経口摂取の効果. 北海道スポーツ医・科学雑誌. 10 : 9-16.
- 神林勲・石村宣人・中村寛成・木本理可・内田英二・藤井博匡・武田秀勝(2005) 運動によるDNA酸化損傷と好中球スーパーオキシド生成能の関係. 北海道体育学研究. 40 : 1-7.
- 神林勲・石村宣人・中村寛成・内田英二・武田秀勝・藤井博匡(2004) 短時間の高強度間欠的運動は尿中8-OHdG含有量を増加させる. 日本運動生理学雑誌, 11 : 61-67.
- 鬼頭伸和・鈴木靖士・境田雅章(2007) 間欠的高強度持久性能力と体力・技術との関係. 愛知教育大学研究報告, 56 : 25-30.
- 本間俊行・鈴木康弘・高橋秀幸(2005) 高強度間欠的運動時の筋エネルギー代謝と運動パフォーマンスとの関連. JISSスポーツ科学会議2005, http://www.jpnsport.go.jp/jiss/Portals/0/jiss-conf-2005/pdf/jiss2005_p062_poster_2-07.pdf (参照日平成27年3月)

- 30日)
- Laura, C.R., Ronenn, R., Simin, N.M., Sung, N.H., and Mohsen, M. (2000) Urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) as a marker of oxidative stress in rheumatoid arthritis and aging : Effects of progressive resistance training. *J. Nutr. Biochem.*, 11 : 581-584.
- Margonis, K., Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Douroudos, I., Chatzinikolaou, A., Mitrakou, A., Mastorakos, G., Papassotiriou, I., Taxildaris, K., and Kouretas, D. (2007) Oxidativestress biomarkers responses to physical overtraining : implication for diagnosis. *Free Radic.Biol.Med.*, 43 : 901-910.
- Matsunaga, S., Inashima, S., Yamada, T., Watanabe, H., Hazama, T., and Wada, M. (2003) Oxidation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase induced by high-intensity exercise. *Pflügers Arch.*, 446 : 394-399.
- Medved, I., Brown, M.J., Bjorksten, A.R., Murphy, K.T., Petersen, A.C., Sostaric, S., Gong, X., McKenna, M.J. (2004) N-acetylcysteine enhances muscle cysteine and glutathione availability and attenuates fatigue during prolonged exercise in endurance-trained individuals. *J.Appl.Physiol.*, 97 : 1477-1485.
- Moopanar, T.R., and Allen, D.A. (2005) Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca^{2+} sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37°C . *J.Physiol. (Lond.)*, 564 : 189-199.
- Nakano, M., Kawanishi, Y., Kamohara, S., Uchida, Y., Shiota, M., Inatomi, Y., Komori, T., Miyazawa, K., Gondo, K., and Yamasawa, I. (2003) Oxidative DNA damage (8-hydroxydeoxyguanosine) and body iron status : a study on 2507 healthy people. *Free Radic. Biol. Med.*, 35 : 826-832.
- Radak, Z., Pucsek, J., Boros, S., Jofjai, L., and Taylor, A. W. (2000) Changes in urine 8-hydroxydeoxyguanosine levels of super marathon runners during a four-day race period. *Life Sci.*, 66 : 1763-1767.
- Reid, M.B. (2001) Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle : redox modulation of skeletal muscle contraction : what we know and what we don't. *J.Appl.Physiol.*, 90 : 724-731.
- Reid, M.B., Stokic, D.S., Koch, S.M., Khawli, F.A., and Leis, A.A. (1994) N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. *J.Clin.Invest.*, 94 : 2468-2474.
- Sachdev, S., and Davies, K.J.A. (2008) Production, detection, and adaptive responses to free radical in exercise. *Free Radic.Biol.Med.*, 44 : 215-223.
- 齋藤益世・田中英登・原川早織・須田和裕 (2005) 生体内DNA酸化損傷(尿中8-OHdG排泄量)に及ぼす一過性運動負荷時における環境温度の影響. *日本運動生理学雑誌*, 12 : 85-93.
- 坂井和明・Sheahan, J.・高松薫 (1999) 間欠的なハイパワー発揮能力と3種のエネルギー産生能力との関係. *体力科学*, 48 : 453-466.
- Shi, Q.D., Zhang, Y., Chen, J.Q., and Liu, S.S. (1999) Electron leak causes proton leak in skeletal muscle mitochondria in exercise-induced fatigue. *Sheng Wu Hua Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 31 : 97-100.
- Shindoh, C., Dimarco, A., Thomas, A., Manubray, P., and Supinski, G. (1990) Effect of N-acetylcysteine on diaphragm fatigue. *J.Appl.Physiol.*, 68 : 2107-2113.
- Sumida, S., Doi, T., Sakurai, M., Yoshioka, Y., and Okamura, K. (1997a) Effects of a single bout of exercise and β -carotene supplementation on the urinary excretion of 8-hydroxy-deoxyguanosine in humans. *Free Radic. Res.*, 27 : 607-618.
- Sumida, S., Okamura, K., Doi, T., Sakurai, M., Yoshioka, Y., and Sugawa- Katayama, Y. (1997b) No influence of a single bout of exercise on urinary excretion of 8-hydroxy-deoxyguanosine in humans. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 42 (3), 601-609.
- Tsai, K., Hsu, T. G., Hsu, K. M., Cheng, H., Liu, T. Y., Hsu, C. F., and Kong, C. W. (2001) Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic. Biol. Med.*, 31 : 1465-1472.
- 和田正信・坂本誠・杉山美奈子・松永智 (2006) 高強度運動における筋疲労の要因 : 無機リン酸, グリコーゲンおよび活性酸素種の影響. *体育学研究*, 51 : 399-408.
- Yamada, T, Mishima, T., Sakamoto, M, Sugiyama, M., Matsunaga, S., and Wada, M. (2006) Oxidation myosin heavy chain and reduction in force production in hyperthyroid rat soleus. *J.Appl. Physiol.*, 100 : 1520-1526.

〔平成27年4月21日 受付〕
〔平成27年8月21日 受理〕