

Effects of Different Type of Training on Blood Antioxidant Capacity and Redox Balance in Middle-aged and Elderly Women

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00000985

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



中高齢女性における血中の抗酸化能力および酸化還元 バランスに対する異なるタイプの運動トレーニングの影響

田辺 解*・増田和実**・衣笠竜太***・菅原 順****・鯉坂隆一*****・
松田光生*****・河野一郎*****・久野譜也*****

Effects of Different Type of Training on Blood Antioxidant Capacity and Redox Balance in Middle-aged and Elderly Women

Kai TANABE*, Kazumi MASUDA**, Ryuta KINUGASA***, Jun SUGAWARA****,
Ryuichi AJISAKA*****, Mitsuo MATSUDA*****,
Ichiro KONO***** and Shinya KUNO*****

Summary

The effect of two different types of physical training (endurance and resistance training) on antioxidant capacity and oxidative stress is still unknown in middle-aged and elderly individuals. In this study, we examined the effect of 12 weeks of endurance or resistance training on glutathione metabolism, indicated redox state in blood, and peroxide state of lipid in plasma in middle-aged and elderly women (64.0 ± 3.7 years old, $n=13$). The endurance training group (End, $n=8$) was performed 5 days/week cycle ergometric exercise at 80 % of ventilatory threshold (VT) for 30 minutes. The resistance training group (Res, $n=5$) carried out 2 days/week isokinetic knee extension, knee flexion, hip extension and hip flexion exercise, and isotonic hip extension, hip flexion and hip abduction exercise. Before and after 12 weeks training, both oxidized and reduced glutathione concentrations ([GSSG] and [GSH]) in blood and the plasma concentration of thiobarbituric acid reactive substance ([TBARS]) were determined in blood samples obtained at rest and immediately after two acute exercise tests: maximal cycle ergometric exercise and steady state cycle exercise at 80 % of ventilatory threshold (VT) for 30 minutes (include one minute of warming up). At rest, both group significantly increased

-
- * 筑波大学大学院博士課程体育科学研究科 (〒305-8574 茨城県つくば市天王台1-1-1)
Doctoral Program in Health and Sport Sciences, University of Tsukuba
- ** 金沢大学教育学部保健学講座 (〒920-1192 石川県金沢市角間町)
Faculty of Education, Kanazawa University
- *** 日本体育大学 (〒158-8508 東京都世田谷区深沢7-1-1)
Nippon sport science University
- **** 独立行政法人産業技術総合研究所人間福祉医工学部門 (〒305-8564 茨城県つくば市並木1-2-1)
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Institute for Human Science and Biomedical Engineering
- ***** 筑波大学体育科学系 (〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1)
Institute of Health and Sport Sciences, University of Tsukuba

[GSH] and significantly decreased the ratio of [GSSG]/[GSH] after training. There was no significant change in [TBARS] at rest. Two different types of training did not alter the changes in [GSH], [GSSG]/[GSH] and [TBARS] parameters induced by both types of acute exercise tests. These data suggest that both endurance and resistance trainings induce antioxidant capacity (reduced glutathione) up-regulation, and thus inhibit lipid peroxide accumulation in middle-aged and elderly women.

Key words: Antioxidants, Training, Exercise, Aging, Oxidative Stress

I. 目的

近年、高齢化や健康への関心の高まりに伴い、中高齢者が運動する機会が多くなっている。最近では有酸素能力の維持、向上を目指した持久性トレーニングだけでなく、筋力や筋量の維持、増進を目的としたレジスタンストレーニングの必要性も指摘されている²⁰。運動のタイプによらず、運動中には活性酸素種が安静時以上に発生する^{21,22}こと及び活性酸素種による酸化障害（酸化ストレス）は疾患を誘起あるいは促進²³する可能性や老化を促進する可能性も示唆されている²⁴ことから、中高齢者における健康増進のための運動プログラムを作成する場合、運動に伴う活性酸素種の発生に対する配慮は重要であると考えられる。一方、継続的な持久性運動は活性酸素種を無毒化する能力（抗酸化能力）を向上させて、活性酸素種に対する耐性力を高めることが知られていることから^{25,26}、継続的な運動が生体に負の影響を与えるか否かについては、活性酸素種の発生系と防御系のバランス（酸化還元バランス）として検討することが重要であろう。この点に関して、中高齢者の持久性トレーニングあるいはレジスタンストレーニングが抗酸化能力、酸化還元バランスおよび酸化ストレスに及ぼす影響を報告した研究データは少ない^{18,29,32,35}。

これまでに我々は、中高齢男女における日常身体活動量が抗酸化能力、酸化還元バランスおよび酸化ストレスに影響を及ぼさないことを報告している³⁰。一方、中高齢ランナーでは、同世代の非鍛錬者よりも抗酸化能力が高く³⁰、継続的な持久性運動は抗酸化能力を向上させる可能性が示唆された。つまり、日常的な身体活動量（総消費カロリー量）よりも一定の強度と時間で行う持久性運動が抗酸化能力の向上に影響を及ぼした可能性が考えられる。持久性トレーニングの運動時間や運動強度に比例して抗酸化能力が高まるという報告³⁰や、若年者の継続

的な持久性運動が抗酸化能力の向上をもたらしたという報告^{3,30}は、一定の強度と時間の持久性運動の継続が抗酸化能力を高めるという我々の仮説を支持するものである。しかしながら、中高齢者を対象に運動強度や時間を規定した持久性トレーニングを行わせ、抗酸化能力、酸化還元バランスおよび酸化ストレスの変化を縦断的に検討した研究はこれまでにみられない。

レジスタンス運動時にも酸素摂取量が増加するため、ミトコンドリアからの活性酸素種の発生が通常以上に増加する。さらに、筋収縮時に虚血-再還流状態となればキサンチンオキシダーゼ系³¹からの活性酸素種発生が増加する可能性もある。また、筋損傷に伴う筋収縮運動であれば、食食細胞からの活性酸素種発生も考えられる³²。持久性運動とは活性酸素種の発生機序が異なるものの、活性酸素種の発生増加を誘発する運動の繰り返しが抗酸化能力の向上を促す³⁰という仮説が正しければ、レジスタンス運動の継続によっても持久性トレーニング時と同様に抗酸化能力の向上が促進される可能性がある。これまでに、中高齢男女を対象として Rall など³³が継続的なレジスタンス運動が酸化ストレスに及ぼす影響を検討しているものの、継続的なレジスタンス運動が抗酸化能力や酸化還元バランスに及ぼす影響については検討されていない。

エストロゲンは、内皮型細胞弛緩因子である一酸化窒素の合成酵素などに作用したり³⁴、抗酸化機構に関与したりすることが示唆されている³⁵。したがって、特に閉経を迎えた中高齢女性では閉経前と比べてエストロゲンを介した抗酸化機能が低下しており^{19,20}、運動に伴って産生される活性酸素種によって酸化ストレスを生じやすくなる可能性が考えられる。また、酸化ストレスは抗酸化酵素や抗酸化分子の発現を促す³⁶ので、中高齢の女性においても継続的な運動によって抗酸化能力を改善できる可能

性は十分にありと予想される。したがって、中高年齢女性における持久性トレーニング及びレジスタンストレーニングが生体に及ぼす影響について、抗酸化能力や酸化ストレスの観点から検討することは重要であり、このことは中高年齢女性への運動プログラムを作成するための大切な基礎資料になり得ると考えられる。

そこで本研究では、活性酸素種の発生増加を促すような一定の運動強度と運動時間を要する2種類の運動トレーニング（持久性トレーニングとレジスタンストレーニング）が抗酸化能力、酸化還元バランスおよび酸化ストレスに及ぼす影響を検討することを目的とし、血中還元型グルタチオン^{9,13,35,42,50} (reduced glutathione, GSH) 濃度を抗酸化能力、血中グルタチオンの酸化型 (oxidized glutathione, GSSG) と GSH の比^{9,13,35,42,50} (GSSG/GSH) を酸化還元バランスそして血漿チオバルビツール酸反応生成物^{1,32,50} (thiobarbituric acid reactive substance, TBARS) 濃度を酸化ストレスの指標として、中高年齢女性における12週間の持久性トレーニングあるいはレジスタンストレーニングが各パラメーターに及ぼす影響を検討した。

II. 方法

A. 被験者

被験者は、過去10年間喫煙習慣のない 64.0 ± 3.7 歳 (59–69歳) の中高年齢女性13名とした。全ての被験者は閉経を迎えており、ホルモン (エストロゲン) 補充療法の経験はなかった。また、医師のメディカルチェックによって、全被験者のトレーニング実施が可能であると判断された。なお、実験に先立ち被験者に実験の趣旨と内容を十分に説明し、書面による実験参加の同意を得た。また本研究は、東京大学大学院生命環境科学系倫理委員会の承認を受けて実施した。

B. 一過性運動プロトコール

トレーニング前後に一過性の最高負荷運動テストおよび定常負荷運動テストを行った。

1. 最高負荷運動テスト

全ての被験者は自転車エルゴメータ上での2分間の安静の後に、20wattsの負荷で4分間のウォーミングアップを行い、ひき続いて10watts/分のランプ負荷¹⁰自転車ペダリングテストを行った。なお、被

験者にはペダルの回転数を60回転/分に維持するように指示した。テストの中止条件は、①心電図計によりモニターされた心拍数が予測最高心拍数に達した時点、②最高血圧が250mmHgを超えた時点、③ペダルの回転数が50回転/分を維持できなくなった時点とし、中高年齢者の安全性を考慮していずれか一つに該当した時点でテストを中止した。なお、ランプ負荷運動終了後にクールダウンとして、無負荷でのペダリングを1分間行った。

ランプ負荷運動中の分時換気量 ($\dot{V}_E$)、酸素摂取量 ($\dot{V}O_2$) および二酸化炭素排泄量 ($\dot{V}CO_2$) を、呼吸ガス分析器 (AE 300S, ミナト医科学社, 大阪)⁴⁰ により breath by breath 法⁴⁰で測定し、有気的持久力の指標としてそれらの15秒ごとの平均値から換気性作業域値 (Ventilatory threshold: VT) を求めた。VTはガス交換比 (R) の運動強度 (Load) に対する上昇点、 $\dot{V}CO_2$ の $\dot{V}O_2$ に対する上昇点と、 $\dot{V}_E/\dot{V}CO_2$ が変化せずに $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ が増加する点から総合的に判断した^{2,8,50}。これらのVT決定方法の再現性は高く^{13,17}、その妥当性^{17,40}も示されている。また、被験者の安全のため、最高負荷運動テストは、医師の立ち会いのもとで行われた。

2. 定常負荷運動テスト

自転車エルゴメータ上での4分間の安静の後に80% VT強度の負荷値の半分で1分間のウォーミングアップを行い、それに続いて80% VT強度で29分間の自転車ペダリング運動を実施した。被験者には、60回転/分のペダルの回転数を維持するように指示した。なお、定常負荷運動終了後に無負荷での自転車ペダリングにより、1分間のクールダウンを行った。定常負荷運動は、最大運動負荷を行った日から少なくとも1週間の間隔をおいて実施した。

3. 総仕事量の算出

最大運動負荷時の総仕事量 (W) は、次式の通りランプ負荷運動負荷時の仕事量とウォーミングアップ時の仕事量の総和を求めた。 $W = \text{ランプ負荷運動時間 (分)} \times \text{最高負荷 (watt)} / 2 + \text{ウォーミングアップ時間 (4分)} \times 20 \text{watts}$ 。なお、仕事量の単位は watt・分とした。定常負荷運動時の総仕事量は、ウォーミングアップおよび定常負荷運動時の負荷に運動時間を乗じたものとした。

C. グルーピング及びトレーニング内容

被験者は、持久性トレーニング群 (End 群 8名、

年齢 63.6 ± 3.5 歳, 身長 151.3 ± 4.2 cm, 体重 51.7 ± 6.0 kg, 体脂肪 29.9 ± 4.4 %, 等速性および等張性筋力トレーニング機器を用いたレジスタンストレーニング群 (Res 群 5 名, 年齢 64.6 ± 4.3 歳, 身長 153.0 ± 3.5 cm, 体重 54.0 ± 2.5 kg, 体脂肪 32.9 ± 3.0 %) に分類された。なお, 両群の年齢および身体組成に有意な差はなかった。トレーニング期間は, 両群ともに12週間 (2000年9月~11月) とした。

1. 持久性トレーニング

End 群は, 被験者の安全面^{4,5,6,7}を考慮して最高負荷運動テスト時に求めたVT強度の80%の負荷で, 30分間の自転車ペダリング運動を週5回行った。トレーニング期間中の運動負荷は, 運動時の平均心拍数に応じて修正した。

2. レジスタンストレーニング

Res 群は, 等速性筋力測定器 (Biodex system 3, Biodex Medical Systems inc., Shirley, NY) を用いて片脚の等速性膝関節伸展・屈曲運動 (角速度 60deg/sec : 5回 $\times$ 2セット, 角速度 240deg/sec : 10回 $\times$ 2セット) および等速性股関節伸展・屈曲運動 (角速度 120deg/sec : 5回 $\times$ 2セット) を実施し, さらに等張性筋力トレーニング機器 (コンパス ヒップトレーナー, 酒井医療, 東京) により等張性股関節伸展・屈曲・外転運動 (10RM: 10回 $\times$ 2セット) を行った。トレーニング頻度は週2回とした。

D. 血液サンプル採取と準備

血液サンプルは, トレーニング前後における一過性運動プロトコルの前の安静時と運動直後3分以内に EDTA 2Na を含む真空採血管を用いて肘前静脈より採取した。被験者へは血液採取するまでの3時間, 食事を摂取しないように指示した。なお, 血液採取は看護師により8:30から13:00の間に行われた。

採取した血液サンプルを3000rpm (4℃) で10分間遠心分離し, 得られた血漿を使用して TBARS 濃度を分析した。

総 GSH 濃度および GSSG 濃度の分析には全血を使用し, 等量の Metaphosphoric acid 試薬 (Metaphosphoric acid 10g, 蒸留水100ml) を加え, 十分に混和し除タンパク質を行った。混合液を室温で5分間放置し, 3000rpm で10分間遠心分離した。この上清を分析に使用するまで -20°C で保存した。

E. 測定項目および測定方法

1. 血液検査

a) 血漿チオバルビツール酸反応生成物 (TBARS) の測定

本研究では, 脂質の過酸化物の一種であるマロンジアルデヒド, その前駆体である過酸化物, およびアルデヒド種を含む血漿中のチオバルビツール酸反応生成物濃度 (thiobarbituric acid reactive substance concentration: [TBARS]) を測定する方法として, 最も多く用いられる八木⁸⁾の方法に従った。なお, TBARS の蛍光強度 (励起波長515nm, 蛍光波長553nm) の測定には, 分光蛍光光度計 (RF-5000, 島津製作所, 京都) を用いた。

b) 血中 GSH および血中 GSSG の測定

除タンパク質された全血サンプル1ml に対して, 測定の直前に50 μ l の triethanolamine 試薬 (4M triethanolamine 水溶液) を加え, 十分に混和し, この混合溶液を測定サンプルとした。血中の総グルタチオン濃度 (total glutathione concentration: [total GSH]) および血中酸化型グルタチオン濃度 (oxidized glutathione concentration: [GSSG]) の測定には Glutathione assay kit (Cayman chemical, Ann Arbor, MI) を使用し, 405nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (マイクロプレートリーダー Model 550, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) により測定した。なお [GSSG] の測定の際には, 1M 2-ビニルピリジンエタノール溶液 (2-vinylpyridine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)/ethanol) により還元型グルタチオン (reduced glutathione: GSH) を完全に除去したサンプルを調整し, [total GSH] と同様に測定した。さらに, 算出された [total GSH] から [GSSG] を減じたものを還元型グルタチオン濃度 (reduced glutathione concentration: [GSH]) とし, 酸化ストレスの指標の一つである [GSSG]/[GSH] を求めた。

c) 血漿サンプルのデータ処理

血漿サンプルから測定された各項目における運動後のデータは, すべて運動後の血漿量の変化率で補正した値とした。なお, 血漿量の変化率は Dill と Costill⁹⁾ の方法に準じて算出した。

2. 抗酸化ビタミン摂取量の調査

食事から摂取されるビタミン類などの抗酸化物質も生体の抗酸化能力に影響する可能性があるため, 以下の方法で食事からの抗酸化ビタミンの摂取量を

求めた。

被験者に毎日の朝、昼、夜の食事内容（秤量した材料の分量）を任意の調査用紙に直接記入させ²⁰⁾、この調査から、食事により摂取した抗酸化ビタミン（ビタミンB₂^{12,40)}、C^{14,20)} およびE^{23,24,25)}）摂取量を算出した。食事記録はトレーニング前と後の1週間毎日行ってもらい、このうち無作為に平日の2日と週末の1日を選び、この3日間の抗酸化ビタミン摂取量の合計を算出し、1日あたりの抗酸化ビタミン摂取量を求めた²⁰⁾。食事調査の事前に、被験者に対して日常的に摂取している食事メニューおよび食事を摂取するように指示した。抗酸化ビタミン摂取量の算出には、PC用ソフトウェア（エクセル栄養君 ver. 2.3, 建帛社, 東京）を用いた。

F. 統計処理

統計量は平均値±標準偏差で示した。関連のない2変数の比較にはpaired t-testを用いた。それぞれの変数における群内変動と群間変動の有意性および交互作用を検定するために、two-way repeated measures ANOVAを採用した。交互作用が認められた場合には、one-way ANOVAを用いて有意性の検定を行った。なお、Post-hocテストには、Fisher's PLSDを用いた。二変数間の関係性の検討には単相関分析を行った。相関係数の検定にはFisherのZ変換を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とした。

III. 結果

A. 血中グルタチオン状態および血漿中の脂質過酸化状態

Figure 1およびFigure 2にそれぞれトレーニング前後における安静時血中[GSH]および[GSSG]/[GSH]の変動を、Table 1に安静時血中[total GSH]、[GSSG]、および血漿[TBARS]の変動を示した。安静時血中[GSH]は、持久性トレーニングあるいはレジスタンストレーニング後に有意に増加した($p < 0.01$, Figure 1)。なお、トレーニングの種類と安静時血中[GSH]の間に交互作用はなかった。安静時の血中[total GSH]は持久性トレーニングあるいはレジスタンストレーニング後に有意に増加した($p < 0.01$)。また、交互作用は認められなかった。安静時の血中[GSSG]の変動には、有意性が認められたものの、交互作用が認められたため、one-way ANOVAにより各変数の有意性の検定

を行った。その結果、End群において有意な変化はなく、Res群においてトレーニング後に有意に減少した($p < 0.01$, Table 1)。血中[GSSG]/[GSH]は、持久性トレーニングあるいはレジスタンストレーニング後に有意に低下した($p < 0.01$, Figure 2)。なお、トレーニングの種類と安静時血中[GSSG]/[GSH]の間に交互作用はなかった。安静時血漿[TBARS]は、持久性トレーニングあるいはレジスタンストレーニング前後に変化が認められなかった(Table 1)。なお、全ての指標の安静値には定常運動負荷テスト前の値を用いた。また、トレーニング前の各指標の安静値に群間差は認められなかった。

Table 2にトレーニング前後の最大運動負荷後および定常負荷運動後における血中[GSH]、[GSSG]/[GSH]および血漿[TBARS]の変化量を示した。

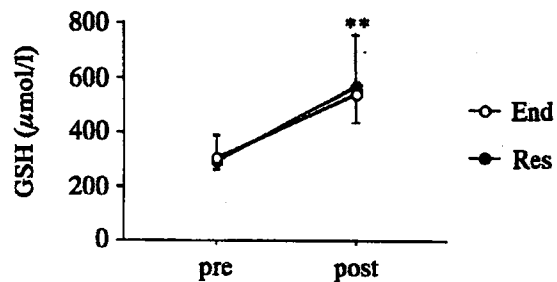


Fig. 1 Influence of physical training on reduced glutathione in blood.

Values are mean±SD. **: $p < 0.01$, significant difference from pre training. ○: endurance training group ($n=8$), ●: resistance training group ($n=5$).

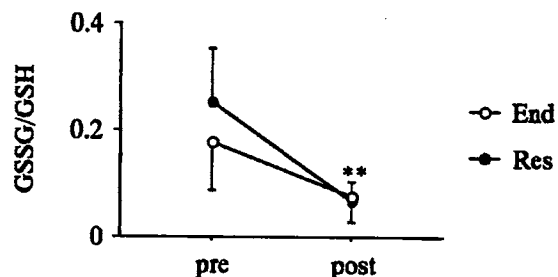


Fig. 2 Influence of physical training on glutathione redox state in blood.

Values are mean±SD. **: $p < 0.01$, significant difference from pre training. ○: endurance training group ($n=8$), ●: resistance training group ($n=5$).

最大運動負荷後の血中 [GSH], [GSSG]/[GSH] および血漿 [TBARS] の変化量におけるトレーニング前後の変動に有意性は認められなかった (Table 2). 定常負荷運動後においても同様に, 各パラメーターの変化量の変動に有意性は認められなかった (Table 2).

トレーニング前後の血漿量は, End 群で有意に減少し ($p < 0.01$), Res 群で減少する傾向にあった ($p = 0.06$). しかしながら, トレーニング前後の安静時血漿量の変化は本研究の結果を左右する要因ではなかった.

B. 抗酸化ビタミン摂取量の変化

トレーニング前後の抗酸化ビタミン (ビタミン B₂, ビタミン C, ビタミン E) 摂取量およびエネルギー摂取量に変化はなかった (Table 3). なお, 抗酸化ビタミンを含むサプリメント摂取者は End 群に 1 名, Res 群に 1 名いたが, 結果に大きな影響を及ぼさなかった. また, トレーニング前後における血中 [GSH], [GSSG], [GSSG]/[GSH] および [TBARS] の変化率と各抗酸化ビタミン摂取量の変化率との間に有意な相関関係は認められなかった.

Table 1 Blood total glutathione (total GSH), oxidized glutathione (GSSG) and plasma thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentration at rest as the result of physical training.

	n	pre	post
total GSH ($\mu\text{mol/l}$)			
End	8	360.0 $\pm$ 94.4	581.6 $\pm$ 118.6**
Res	5	365.8 $\pm$ 22.2	597.6 $\pm$ 194.4**
GSSG ($\mu\text{mol/l}$)			
End	8	53.1 $\pm$ 25.0	40.9 $\pm$ 17.8
Res	5	71.9 $\pm$ 23.1	33.5 $\pm$ 17.4**
TBARS (nmol/ml)			
End	8	1.96 $\pm$ 0.29	2.03 $\pm$ 0.32
Res	5	1.98 $\pm$ 0.29	1.94 $\pm$ 0.26

All data are expressed as mean $\pm$ SD. Asterisks are representing significant differences from value of pre training (**: $p < 0.01$).

End: endurance training group, Res: resistance training group.

Table 2 Acute exercise-induced changes in blood glutathione redox state and plasma thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentration as the result of physical training.

		Ramp exercise test		80% VT exercise test	
	n	Pre	post	pre	post
Δ GSH/W ($\times 10^{-1} \mu\text{mol/l/watt} \cdot \text{min}$)					
End	8	-0.03 $\pm$ 1.58	-0.17 $\pm$ 1.09	-0.21 $\pm$ 0.45	-0.26 $\pm$ 0.35
Res	5	0.27 $\pm$ 2.03	0.00 $\pm$ 1.00	-0.25 $\pm$ 0.73	-0.13 $\pm$ 0.74
Δ GSSG/GSH/W ($\times 10^{-5} / \text{watt} \cdot \text{min}$)					
End	8	13.28 $\pm$ 32.12	2.98 $\pm$ 7.33	0.35 $\pm$ 6.03	2.52 $\pm$ 2.29
Res	5	-1.48 $\pm$ 11.98	0.19 $\pm$ 1.19	-4.16 $\pm$ 6.01	0.76 $\pm$ 4.02
Δ TBARS/W ($\times 10^{-4} \text{nmol/ml/watt} \cdot \text{min}$)					
End	8	-1.33 $\pm$ 4.00	-0.35 $\pm$ 1.87	-0.76 $\pm$ 0.75	-1.70 $\pm$ 2.06
Res	5	-3.06 $\pm$ 10.00	-1.70 $\pm$ 1.04	-0.95 $\pm$ 1.00	-1.15 $\pm$ 0.73

All data are expressed as mean $\pm$ SD. There was no significant change in value from pre to post training. End: endurance training group, Res: resistance training group, Δ : change in value from rest to post exercise, W: total work volume, TBARS: thiobarbituric acid reactive substance, GSH: reduced glutathione, GSSG: oxidized glutathione.

V. 考察

GSHは活性酸素種の無毒化、抗酸化酵素の基質および脂質の過酸化の抑制といった役割を果たす。これまでに、若齢者の持久性トレーニングが血中や血漿中の[GSH]を増加させることが、横断的あるいは縦断的な研究で報告されている^{3,10}。我々はこれまでに横断的な研究の結果より、持久性トレーニングを行っている中高年齢ランナーの血中[GSH]が、同世代の非鍛錬者よりも有意に高いことを明らかにし¹⁰、中高年齢者でも持久性トレーニングを行えば、抗酸化能力の指標である血中[GSH]が上昇するとの仮説を立てた。本研究の結果は、中高年齢女性における持久性トレーニングは抗酸化能力の指標である血中[GSH]を上昇させるという仮説を支持するものであり(Figure 1)、中高年齢女性においても若年者と同様に持久性トレーニングがGSHに代表されるような抗酸化能力を向上させうることが示唆された。

Kretzschmar など¹⁰は、持久性ランナーの血漿GSH濃度は非鍛錬者に比べて有意に高いことを報告しており、その要因として持久性トレーニング(酸化ストレス負荷の繰り返し)が肝臓GSH合成レベル、洞様毛細血管のGSH排出能力、血液あるいは他の組織でのGSH消費量などを高めたことを挙げている。本研究の結果、持久性トレーニング後に[GSH]だけでなく[total GSH]も有意に増加しており(Table 1)、上記のような血液を介したグルタチオン輸送の増加が持久性トレーニング後の

[GSH]増加に関与している可能性がある。しかしながら、血漿中の[GSH]は赤血球中の[GSH]と比べて非常に低く¹⁰、持久性トレーニング後の[GSH]増加には赤血球中[GSH]の増加が主な原因であると推察される。ほ乳類における細胞内の酸化還元状態に非常にセンシティブな転写因子といわれる Activator protein-1 (AP-1) や nuclear kinase of κ B cells (NF- κ B) は、チオール(グルタチオンはチオール化合物の一種)の酸化還元状態に大きく影響されることがわかっている⁴⁰。細胞内のGSSG濃度の増減に応じて、これらの転写因子が活性化あるいは不活性化され、抗酸化タンパク発現の調節が行われることから⁴⁰、持久性運動時に発生が増加する活性酸素種が赤血球細胞内のGSHをGSSGへ酸化させ、この酸化ストレスシグナルが転写因子を介した抗酸化物質や抗酸化酵素の発現あるいは up-regulation を促している可能性が考えられる。

一方、持久性運動時には活性酸素種の発生が安静時以上に増加し^{3,7,40}、一時的に酸化ストレスを高めるという報告がある^{21,21,27}。したがって、持久性運動の繰り返しは酸化ストレスの蓄積を増加させる可能性がある。さらに、女性ホルモンのエストロゲンは抗酸化機構に関与している⁴⁰ため、エストロゲンの分泌が極端に低下する閉経後の女性は、閉経前と比べて抗酸化能力が低下している^{18,20}可能性があり、閉経前よりも運動時に酸化ストレスを受けやすい可能性がある。本研究では、閉経によるエストロゲンの低下が全身の抗酸化能力や酸化ストレスに及ぼす

Table 3 Dietary antioxidant vitamins and energy intake.

	n	pre		post 12wk	
vitamin B ₂ (mg/day)					
End	8	1.7 ±	0.4	2.0 ±	1.0
Res	5	1.9 ±	0.5	2.0 ±	0.6
vitamin C (mg/day)					
End	8	181.6 ±	75.6	265.6 ±	91.0
Res	5	235.0 ±	121.3	234.1 ±	95.7
vitamin E (mg/day)					
End	8	8.9 ±	2.9	12.7 ±	12.7
Res	5	9.4 ±	2.0	7.7 ±	1.7
energy intake (kcal/day)					
End	8	1730.7 ±	463.1	2021.0 ±	421.0
Res	5	2060.3 ±	535.1	2170.0 ±	453.8

All data are expressed as mean ± SD. End: endurance training group, Res: resistance training group.

影響を検討していないので、この点については推察の域を脱しない。しかしながら、閉経後の女性を対象とした本研究では、活性酸素種の発生系とそれに対する防御系のバランスを示す血中 [GSSG]/[GSH] が低下した (Figure 2, $p < 0.01$)。これらの結果は、閉経後の女性においても、持久性トレーニングによって、活性酸素種の発生系よりもむしろ防御系の適応が上回った可能性を示唆するものである。また、血漿 [TBARS] はトレーニング前後の値に変化がなかったことより (Table 1), 持久性運動の繰り返しは、安静時における脂質の過酸化状態に影響を及ぼさないと考えられる。したがって本研究の結果は、閉経後の中高齢女性においても、低強度の持久性トレーニング (80% VT) は、生体の抗酸化能力の向上を促すこと、および酸化ストレスの蓄積を抑制する可能性を示唆するものと考えられる。

これまでに、中高齢者のレジスタンストレーニングが酸化ストレスに及ぼす影響を検討した研究は、Rall など³⁰⁾の研究のみである。彼らは、高齢男女を対象とした12週間のレジスタンストレーニングが尿中の8-OHdG (酸化的DNA損傷の指標) に影響を及ぼさないことを報告している。しかしながら、その研究では中高齢女性のレジスタンストレーニングが抗酸化能力および酸化還元バランス ([GSH], [GSSG]/[GSH]) や脂質の過酸化状態に及ぼす影響については検討していない。本研究は、中高齢女性を対象としたレジスタンストレーニングが血中 [GSH], [GSSG]/[GSH] および血漿 [TBARS] に及ぼす影響を検討した最初の研究であると位置づけられる。

本研究では、レジスタンストレーニング後に血中 [GSH] が有意に増加し (Figure 1, $p < 0.01$)、および血中 [GSSG]/[GSH] の低下 (Figure 2, $p < 0.01$) が認められた。この抗酸化能力の増加および酸化還元バランスの改善程度は、持久性トレーニングで認められた効果と同等であった。持久性運動³⁾とレジスタンス運動^{5,22,40)}の活性酸素発生機序はそれぞれ異なること、およびそれぞれのトレーニングの様式、強度、時間および頻度が異なるため、同一に比較することはできないが、運動様式に関わらず、活性酸素種の発生増加を促すような一定の運動強度と運動時間を要する継続的な運動刺激が、抗酸化能力の向上や血中の酸化還元バランスの改善に影響を及ぼしているのではないかと推察される。

成人男性において、一過性の最大および最大下運動後に血中 [GSSG]/[GSH] および血漿 [TBARS] が高まることが報告されている⁴⁰⁾。また、トレーニング状態 (中年男性ランナー vs 非鍛錬者) によって一過性の最大運動負荷後の血漿 [GSH], [GSSG] および脂質過酸化物濃度 (Lipid peroxide) の変化量が異なることが示されており¹⁹⁾、継続的なトレーニング前後で一過性運動後のグルタチオンや脂質の過酸化状態の変化が異なることが予想された。しかしながら、本研究では中高齢女性における一過性の最高負荷および定常負荷運動後に各パラメーターの変化は認められず、いずれのトレーニングの影響も認められなかった。運動強度や運動時間に依存して活性酸素種発生量が高まる³⁰⁾ことを考慮すると、本研究の結果が先行研究の見解と異なったのは、対象が中高齢者であったため、最高の負荷強度まで追い込むことができなかったこと、運動時間が若年および中年者に比べて短かったことなどが原因として考えられる。

生体には抗酸化作用を示す酵素および物質が存在しており、これらが相互に作用することによって発生した活性酸素を無毒化している⁵⁰⁾。したがって、本研究で用いた GSH だけでは生体における抗酸化能力の全てを評価しているとは言えないが、GSH が抗酸化システムの中で代表的な役割 (抗酸化酵素の基質、活性酸素種の消去) を果たしているという点と筋や血中に高濃度存在している点から、本研究では血中 [GSH] が生体の抗酸化能力を反映する指標とみなした。また、活性酸素種によって過酸化される生体組織は、脂質以外にもタンパクあるいは核酸なども考えられ、運動後に脂質以外の過酸化マーカーが増加することも報告されている^{31,37)}。ゆえに、本研究の運動負荷プロトコールでタンパクや核酸の過酸化マーカーが変化する可能性は否定できないので、今後のさらなる検討が必要である。

本研究のトレーニング前後にみられた血中 [GSSG]/[GSH] の変化には、持久性トレーニングあるいはレジスタンストレーニングの影響だけでなく、測定誤差あるいは季節変動の影響も関与している可能性が考えられる。トレーニング前後の血中 [GSH] および [GSSG]/[GSH] の平均変化率は、End 群でそれぞれ91.3%および-56.6%、Res 群で99.5%および-63.6%であった。これに対して、本研究で用いたグルタチオン測定の変動係数は5.3%

未満であり、トレーニング前後の変化率と比べて小さいことから、血中 [GSSG]/[GSH] の変動に測定誤差が及ぼす影響は非常に小さいと思われる。

血中 [GSSG]/[GSH] の季節変動を検討した研究は少ない^{11,20}。Lenton など²⁰は、中高年齢者におけるリンパ球中の [GSH] に季節変動が認められたことを報告しており、季節変動の主な原因として、季節に伴う食事からの抗酸化物質摂取状況の変化を挙げている。抗酸化ビタミンの摂取が血中 [GSH] に影響を及ぼすことが報告されている^{15,16,20}ように、日常の食事からの抗酸化ビタミン摂取量の多少が安静時の血中 [GSH] に反映される可能性がある。本研究では補足データとしてトレーニング前後に食事調査を実施し、抗酸化ビタミン摂取量を分析した。その結果、血中 [GSSG]/[GSH] 状態に影響を及ぼすと思われるビタミン B₂、ビタミン C およびビタミン E の摂取量^{15,16,20}はトレーニング前後に変化しなかった (Table 4)。さらに、トレーニング後における血中 [GSH]、[GSSG] および [GSSG]/[GSH] の変化率と各抗酸化ビタミン摂取量の変化率との間に有意な相関関係は認められなかったことから、食事からの抗酸化物質の摂取状況はトレーニング前後に認められた血中 [GSSG]/[GSH] の変動に大きな影響を及ぼさないと考えられる。

以上のことから、本研究で認められた血中 [GSSG]/[GSH] の変化には、測定誤差や季節に伴う食事からの抗酸化物質摂取状況よりも継続的な持久性トレーニングあるいはレジスタンストレーニングが強く影響しているものと推察される。

V. まとめ

本研究では、中高年齢女性を対象にした12週間の持久性トレーニングあるいはレジスタンストレーニングが血中のグルタチオン酸化還元状態および脂質の過酸化状態に及ぼす影響を検討することを目的とした。得られた結果は以下の通りである。

持久性トレーニングおよびレジスタンストレーニングの結果として、

1. 安静時における血中 [GSH] はトレーニング後に有意な増加を示した ($p < 0.01$, Figure 1)。
2. 血中 [GSSG]/[GSH] はトレーニング後に有意に低下した ($p < 0.01$, Figure 2)。
3. 安静時の血漿 [TBARS] は、トレーニング後に変化がみられなかった (Table 1)。

以上の結果から、中高年齢女性における12週間の持久性およびレジスタンストレーニングは、抗酸化能力の向上、酸化還元バランスの改善および酸化ストレス増加の抑制を促す可能性が示唆された。

安全性が高く心血管系および代謝系に好影響を及ぼすことが期待される VT 以下の運動強度^{4,28,29}での持久性トレーニングにより、閉経後の中高年齢女性における抗酸化能力の向上および酸化還元バランスの改善といった効果が認められたこと、および健康増進運動として推奨される²⁰レジスタンストレーニングによっても持久性トレーニングと同程度の効果がみられたことは、今後、活性酸素の観点からみた健康増進運動プログラムを作成する上で基盤となるデータになると思われる。

謝辞

本研究は、筑波大学先端学際領域研究センター・TARA プロジェクト (代表: 久野 謙也)、文部科学省・科学技術振興調整費 (代表: 村上和雄) による研究 (SAT プロジェクト) 及び文部科学省 COE 研究の一部である。

引用文献

- 1) Alessio H M, Goldfarb A H and Cao G (1997) Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. *Int J Sport Nutr* 7: 1-9
- 2) Beaver W L, Wasserman K and Whipp B J (1986) A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange. *J Appl Physiol* 60: 2020-2027
- 3) Boveris A and Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707-716
- 4) Brubaker P H, Kiyonaga A, Matrazzo B A, Pollock W E, Shindo M, Miller H S Jr. and Tanaka H (1997) Identification of the anaerobic threshold using double product in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 79: 360-362
- 5) Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B and Leeuwenburgh C (2001) Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med* 31: 745-753

- 6) Davis J A, Frank M F, Whipp B J and Wasserman K (1979) Anaerobic threshold alterations caused by endurance training in middle-aged man. *J Appl Physiol* 46: 1039-1046
- 7) Demopoulos H B, Santomier J P, Seligman M L and Pietronigro L (1984) Free radical pathology: Rationale and toxicology of antioxidants and other supplements in sports medicine and exercise science. In *Sport, health, and nutrition*, 1st Ed., 139-189, Human Kinetics, Champaign, Illinois
- 8) Dill D B and Costill D L (1974) Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 37: 247-248
- 9) Evelo C T, Palmen N G, Artur Y and Janssen G M (1992) Changes in blood glutathione concentrations, and in erythrocyte glutathione reductase and glutathione S-transferase activity after running training and after participation in contests. *Eur J Appl Physiol* 64: 354-358
- 10) Gohil K, Viguie C, Stanley W C, Brooks G A and Packer L (1988) Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol* 64: 115-119
- 11) Goldschmidt L (1970) Seasonal variations in red cell glutathione levels with aging in mental patients and normal controls. *Proc Soc Exp Biol Med* 133: 555-9
- 12) Hustad S, McKinley M C, McNulty H, Schneede J, Strain J J, Scott J M and Ueland P M (2002) Riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in human plasma and erythrocytes at baseline and after low-dose riboflavin supplementation. *Clin Chem* 48: 1571-1577
- 13) Itoh H, Koike A, Taniguchi K and Marumo F (1989) Severity and pathophysiology of heart failure on the basis of anaerobic threshold (AT) and related parameters. *Jpn Circ J* 53: 146-154
- 14) Jacob R A, Skala J H, Omaye S T (1987) Biochemical indices of human vitamin C status. *Am J Clin Nutr* 46: 818-826
- 15) Jain S K, McVie R, Smith T (2000) Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diabetes Care* 23: 1389-1394
- 16) Johnston C S, Meyer C G, Srilakshmi J C (1993) Vitamin C elevates red blood cell glutathione in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 58: 103-105
- 17) 上岡方士, 伊藤 元, 鈴木政登 (2000) 換気性作業域値 ($\dot{V}O_{2GET}$) の算出に適した運動負荷法および GET 判定法に関する研究. *体力科学* 49: 393-402
- 18) Kretzschmar M, Muller D, Hubscher J, Marin E and Klinger W (1991) Influence of aging, training and acute physical exercise on plasma glutathione and lipid peroxides in man. *Int J Sports Med* 12: 218-222
- 19) Krstevska M, Dzhejkova-Stojkova S and Bosilkova G (2001) Menopause, coronary artery disease and antioxidants. *Clin Chem Lab Med* 39: 641-644
- 20) 久野譜也 (2002) 高齢者の筋力トレーニング. *体育の科学* 52: 617-625
- 21) Laaksonen D E, Atalay M, Niskanen L, Uusitupa M, Hanninen O and Sen C K (1996) Increased resting and exercise-induced oxidative stress in young IDDM men. *Diabetes Care* 19: 569-574
- 22) Lee J, Goldfarb A H, Rescino M H, Hegde S, Patrick S and Apperson K (2002) Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc* 34: 443-448
- 23) Lehmann J, Rao D D, Canary J J and Judd J T (1988) Vitamin E and relationships among tocopherols in human plasma, platelets, lymphocytes, and red blood cells. *Am J Clin Nutr* 47: 470-474
- 24) Lenaz G (1998) Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1366: 53-67
- 25) Lenton K J, Therriault H, Cantin A M, Fulop T, Payette H and Wagner J R (2000) Direct correlation of glutathione and ascorbate and their dependence on age and season in human lymphocytes. *Am J Clin* 71: 1194-1200
- 26) Loh H S (1972) The relationship between dietary ascorbic acid intake and buffy coat and plasma ascorbic acid concentrations at different ages. *Int J Vitam Nutr Res* 42: 80-85
- 27) Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L and Della Valle G (1997) Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 37: 235-239
- 28) Massafra C, Gioia D, De Felice C, Muscettola M, Longini M and Buonocore G (2002) Gender-related differences in erythrocyte glutathione peroxidase activity in healthy subjects. *Clin Endocrinol*

- 57: 663-667
- 29) Meijer E P, Coolen S A, Bast A and Westerterp K R (2001) Exercise-induced oxidative stress in older adults as measured by antipyrine oxidation. *Metabolism* 50: 1484-1488
- 30) Mino M, Nagamatsu M (1986) An evaluation of nutritional status of vitamin E in pregnant women with respect to red blood cell tocopherol level. *Int J Vitam Nutr Res* 56: 149-153
- 31) Niess A M, Hartmann A, Grunert-Fuchs M, Poch B and Speit G (1996) DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med* 17: 397-403
- 32) Okamura K, Doi T, Hamada K, Sakurai M, Yoshioka Y, Mitsuzono R, Migita T, Sumida S and Sugawa-Katayama Y (1997) Effect of repeated exercise on urinary 8-hydroxy-deoxyguanosine excretion in humans. *Free Radic Res* 26: 507-514
- 33) Olinescu R, Talaban D, Nita S and Mihaescu G (1995) Comparative study of the presence of oxidative stress in sportsmen in competition and aged people, as well as the preventive effect of selenium administration. *Rom J Intern Med* 33: 47-54
- 34) Powers S K, Criswell D, Lawler J, Ji L L, Martin D, Herb R A and Dudley G (1994) Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 266: R375-380
- 35) Rabinovich R A, Ardite E, Troosters T, Carbo N, Alonso J, Gonzalez de Suso J M, Vilaro J, Barbera J A, Polo M F, Argiles J M, Fernandez-Checa J and Roca J (2001) Reduced muscle redox capacity after endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1114-1118
- 36) Rall L C, Roubenoff R, Meydani S N, Han S N and Meydani 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
- 37) Reznick A Z, Witt E, Matsumoto M and Packer L (1992) Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 801-806
- 38) Riley M, Maehara K, Porszasz J, Engelen M P, Bartstow T J, Tanaka H and Wasserman K (1997) Association between the anaerobic threshold and the break-point in the double product/work rate relationship. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 75: 14-21
- 39) Sacheck J M, Decker E A and Clarkson P M (2000) The effect of diet on vitamin E intake and oxidative stress in response to acute exercise in female athletes. *Eur J Appl Physiol* 83: 40-46
- 40) Sawyer D T (1988) O₂! Who would have imagined all the biological process that involve oxygen? *Chemtech* 18: 369-375
- 41) Saxton J M, Donnelly A E and Roper H P (1994) Indices of free-radical-mediated damage following maximum voluntary eccentric and concentric muscular work. *Eur J Appl Physiol* 68: 189-193
- 42) Sen C K, Rankinen T, Vaisanen S and Rauramaa R (1994) Oxidative stress after human exercise: effect of N-acetylcysteine supplementation. *J Appl Physiol* 76: 2570-2577
- 43) Sen C K (1995) Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* 78: 675-686
- 44) Shimada Y, Yoshiya I, Hirata T, Takezawa J and Taenaka N (1984) Evaluation of a system for on-line analysis of VO₂ and VCO₂ for clinical applicability. *Anesthesiology* 61: 311-314
- 45) Shwaery G T, Vita J A and Keaney J F Jr (1997) Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 beta-estradiol. Requirement for estradiol modification. *Circulation* 95: 1378-1385
- 46) Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil D P, Ley K, Chin W W and Liao J K (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407: 538-541
- 47) Sterner R T and Price W R (1973) Restricted riboflavin: within-subject behavioral effects in humans. *Am J Clin Nutr* 26: 150-160
- 48) 高橋周史, 吉川敏一, 近藤元治 (1996) 活性酸素と組織傷害. *臨床検査* 40: 132-136
- 49) Takano N, Tamura N and Chaki K (1991) Exercise-entrained breathing and non-invasive determination of anaerobic threshold. *Respir Physiol* 86: 381-392
- 50) 田辺 解, 増田和実, 菅原 順, 鯨坂隆一, 松田光生, 河野一郎, 久野譜也 (2002) 中高年齢における日常の身体活動量の相違が酸化ストレスに及ぼす影響. *体力科学* 51: 325-336
- 51) 田辺 解, 増田和実, 河野一郎, 久野譜也 (2002)

- 筋収縮と活性酸素, 体育の科学 52: 635-642
- 52) Tanaka H, Kiyonaga A, Terao Y, Ide K, Yamauchi M, Tanaka M and Shindo M (1997) Double product response is accelerated above the blood lactate threshold. *Med Sci Sports Exerc* 29: 503-508
- 53) Turkki P R, Ingerman L, Schroeder L A, Chung R S, Chen M, Russo-McGraw M A and Dearlove J (1990) Riboflavin intakes and status of morbidly obese females during the first postoperative year following gastroplasty. *J Am Coll Nutr* 9: 588-599
- 54) Wasserman K, Whipp B J, Koyal S N and Beaver W L (1973) Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. *J Appl Physiol* 35: 236-243
- 55) Willett W C, Stampfer M J, Underwood B A, Taylor J O and Hennekens C H (1983) Vitamins A, E, and carotene: effects of supplementation on their plasma levels. *Am J Clin Nutr* 38: 559-566
- 56) 八木国夫 (1975) Thiobarbituric acid 蛍光法による血漿又は血清中の過酸化脂質の微量定量法. *ビタミン* 49: 403-405
- 57) Yamamoto Y, Hughson R L and Peterson J C (1991) Autonomic control of heart rate during exercise studied by heart rate variability spectral analysis. *J Appl Physiol* 71: 1136-1142
(平成15年3月6日受付, 平成15年6月16日訂正, 平成15年8月7日受理)