

血清過酸化脂質におよぼす激運動および強制トレーニングの影響

熊谷 秋三, 長谷川 亨, 江村菜穂子, 友国 勝麿, 西住 昌裕

佐賀医科大学地域保健科学

Effect of Heavy Exercise and Forced Running Training on Serum Lipid Peroxide

Shuzo KUMAGAI, Tohru HASEGAWA, Naoko EMURA, Katsumaro TOMOKUNI
and Masahiro NISHIZUMI

Department of Community Health Science, Saga Medical School, Nabeshima, Saga 840-01, Japan

The purpose of this present study was to evaluate the effect of heavy exercise (triathlon) on man (Exp. I) and moderate running training in rat (Exp. II) on serum lipid peroxide (SLPO). Subjects in Exp. I were 7 triathletes aged 27 to 39 yrs. Blood samplings were taken before race and immediately after completion of each sports activity. In Exp. II, SLPO was divided into 2 components, i.e., aspirin-inhibiting SLPO and other (non-specific SLPO). Wistar male rats (n=50) 6 wks of age, were divided into 2 groups, i.e., control (n=25) and training (n=25) groups. Moderate running training was performed on treadmill for 6 wks. At 12 wks of age, exhaustive running (ER) test was performed. Blood samples were collected at rest and immediately after ER in both groups.

The results of the present study were as follows:

- 1) SLPO during triathlon race was gradually decreased, but not significant.
- 2) Although total SLPO at rest in trained rats was significantly increased as compared with control, non-specific SLPO at rest in both groups was not significant.
- 3) Total SLPO in trained rats was significantly higher than that of control after ER. Total SLPO after ER in both groups was not significantly increased as compared with resting level.
- 4) Non-specific SLPO after ER in both groups was not significantly different between 2 groups.
- 5) Non-specific SLPO after ER in both groups was significantly increased as compared with resting level. Increasing rate in control and training rats were 121% and 73%, respectively.
- 6) Although significant correlation was not observed between total SLPO and blood lactate, a good correlation was found between non-specific SLPO and blood lactate.

Key words: Serum lipid peroxide (SLPO), Triathlon, Rat, Aspirin-inhibiting SLPO, Forced running training

はじめに

過酸化脂質(LPO)は、老化や動脈硬化・脳卒中・心筋梗塞などの促進因子の1つであることが指摘されている。生体内の過酸化脂質の生成は、不飽和脂肪酸を

材料として、活性酸素や遊離基(フリーラジカル)の作用により促進される。

ところで、過酸化脂質には生理活性をもつアラキドン酸の過酸化物であるプロスタグランディン(PG)類

と生体膜中の不飽和脂肪酸を過酸化し細胞の構造や機能に障害を与える non-specific なものとがある。通常、血中過酸化脂質の測定は、Yagi(1976)によって開発された TBA (チオバルビツール酸) 法が用いられている場合が多い。しかし、この方法だと上述した 2 つの過程から生成された過酸化脂質を同時に測るために LPO の由来の区分が明確でなくなることになる。事実、Shimizu ら(1981)は PG 合成酵素(シクロオキシゲナーゼ)の inhibitor であるアスピリンの静注によって、PG と同時に血清 TBA 値の抑制が生じることをウサギを用いた実験で証明している。

運動は、酸素利用の増大によって活性酸素を増加させ、過酸化反応の促進をもたらす可能性があることから、運動による血中 LPO の変動に関する研究が数多くなされているがその結果は一致していない(市川, 1985)。

その理由として我々は、従来の研究では LPO 生成の 2 つの由来を区別して報告していないことや体力水準を考慮していないことが一因であると考えている。そこで我々は、この点を明らかにすべきヒトおよびラットを用いた実験から身体ストレスの指標として血中 LPO 測定の意義を再検討することにした。

まず本研究では、長時間の有酸素運動の典型と考えられるトライアスロン競技中の血中 LPO の変動をヒトを対象に調査した(実験 I)。さらに、ラットを用いた強制トレーニングを実施し、安静および運動後の血中 LPO に及ぼす体力水準の影響を検討した(実験 II)。また、実験 II では、アスピリンを静注することによって、LPO 生成の 2 つの由来を区分して検討した。

方 法

実験 I : トライアスロンレースにおける血清過酸化脂質 (SLPO) の変動

被検者は、数年の間、日常的に持久的トレーニングを実施しているトライアスロン選手 7 名である。体脂肪率は、Nagamine と Suzuki(1964)および Brozek ら(1963)の公式を用い推定した。最大酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2max}$) は、競技の前後 2 週間以内に、トレッドミルと自転車エルゴメーターの双方を用いダグラスバック法により直接法で求めた。トライアスロンレースは、1.25km の水泳、60km のサイクリング、12km のランニングから構成されている。採血は、各競技終了後 3

Table 1 Classification of group of rats in present study.

		(Aspirin)	(n)
Trained group (n=25)	Rest	+	(5)
		-	(5)
	Exercise	+	(7)
		-	(8)
Control group (n=25)	Rest	+	(5)
		-	(5)
	Exercise	+	(7)
		-	(8)

分以内に肘正中静脈より行った。SLPO の測定には、デタミナー-LPO (八木別法; 協和発酵) を用い 24 時間以内に分析した。

実験 II : ラットの SLPO に及ぼす強制トレーニングの影響

1. 対象

被検動物として、5 週令の Wistar 系雄ラットを用いトレーニング群(n=25)と対照群(n=25)に分け 6 週令から 6 週間飼育した。グルーピングは表 1 に示すとおりである。水及び固形飼料は、自由摂食とした。体重は、週 1 回測定した。

2. トレーニング内容

運動様式は、ランニングとし実験動物強制運動測定器(トレッドミル, シナノ製作所)を用いた。トレーニングのスピードは 25m/min (傾斜角 8 度) で 25 分間のランニングを週に 4 回、6 週間継続した。我々は、このランニングの強度であるならば、筋収縮のためのエネルギー動員に関与する代謝過程が有気的であり、30 分以上の運動の継続が可能であることをすでに報告している(熊谷・西住, 1986)。

3. 運動負荷テスト

SLPO に及ぼす急性の運動負荷の影響およびランニングタイムに及ぼすトレーニングの影響を検討するために、運動負荷テストを実施した。運動は、両群ともに 23m/min (傾斜角 2 度) のスピードでのランニングをほぼ疲労困憊(exhaustion)に至るまで実施した。

4. SLPO の区分測定のためのアスピリンの投与

本研究では、Shimizu ら(1981)の研究成績をもとに、アスピリン投与後の SLPO を non-specific SLPO と呼ぶことにする。コントロール群(安静群; n=5, 運動負荷群; n=7)にアスピリン(アセチルサルサル酸; 体重 kg あたり 40mg)を安静群の場合は、採血開

Table 2 Physical characteristics and maximum oxygen uptake of triathletes(n=7).

	Age (yr)	Height (cm)	Weight (kg)	%fat	$\dot{V}O_{2max}$ (ml/kg/min)	
					bicycle	treadmill
$\bar{X}$	31.0	169.9	62.3	12.4	57.1*	64.8*
SD	4.1	4.7	4.9	1.4	3.2	5.2
Range	27-39	162.3-175.0	55.7-68.9	10.4-14.3	54.8-63.2	58.6-72.3

*n=6

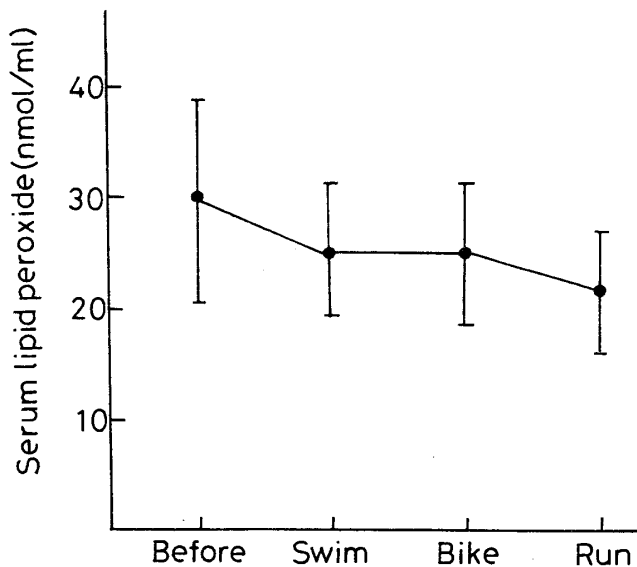


Fig. 1 Changes of serum lipid peroxide before and during race.

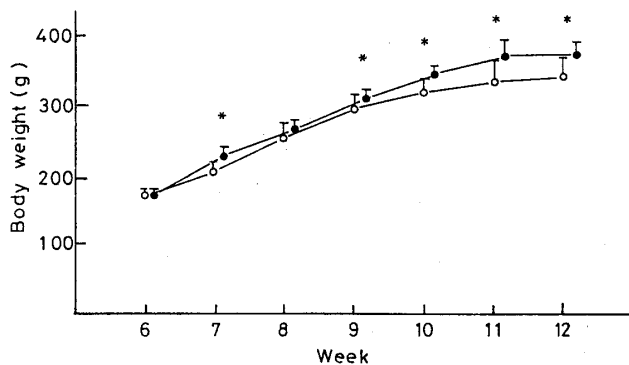


Fig. 2 Changes of body weight in trained (○; n=25) and control (●; n=25) group.

* : p<0.05 trained vs control

始の24時間前と10分前に、トレーニング群の場合は、負荷テスト開始の24時間前と10分前に腹腔内に投与した。

5. 測定項目および手順

採血は、安静時および疲労困憊直後に断頭により行った。SLPOの測定は、デタミナーLPO(八木別法；

協和発酵)を用い、実験当日2～3時間以内に分析した。血中乳酸は、我々が開発した酵素法による Flow Injection Analysis 法 (Kumagai ら, 1986) を用い分析した。

6. 統計解析

実験 I においては、平均値の差の検定を paired-t test, 実験 II では群間の差の検定を student's-t test を用い解析した。有意水準は 5 % 以下とした。

結 果

実験 I

被検者の身体的特性は、表 2 に示すとおりである。自転車エルゴメーターおよびトレッドミルによる $\dot{V}O_{2max}$ は、それぞれ、 $57.1 \pm 3.2 \text{ ml/kg/kin}$, $64.8 \pm 5.2 \text{ ml/kg/min}$ であった。同様な値は、Kohrt ら(1987) や Otto ら(1985) によって報告されており、本研究でのトライアスロン選手の体力水準は高いことが明らかとなった。

SLPO は、競技開始前が一番高く、競技の進行に伴い漸減する傾向にあるが、それぞれの種目終了後の値は、競技前に比べて有意な変化は認められなかった(図 1)。

実験 II

1. 体重の変化

トレーニングに伴う体重測定は、図 2 に示すとおりである。トレーニング開始時点では、両群間に有意差は認められなかった。しかし、その後はトレーニング開始 2 週目を除き、トレーニング群の方が有意に低い値を示した。12 週令でのトレーニング群の平均体重は 345g であり、コントロール群の 375g に比べ 30g 軽かった。

2. Exhaustion time(ET)に及ぼすトレーニングの影響

図 3 に、23m/min (傾斜角 2 度) でのランニング継

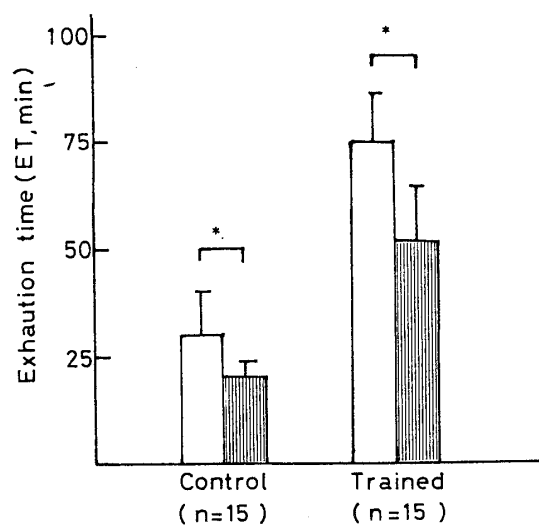


Fig. 3 Exhaustion time at speed of 23 m/min on treadmill in control and trained groups.

□ : without aspirin (n=8)

▨ : with aspirin (n=7)

*p<0.05

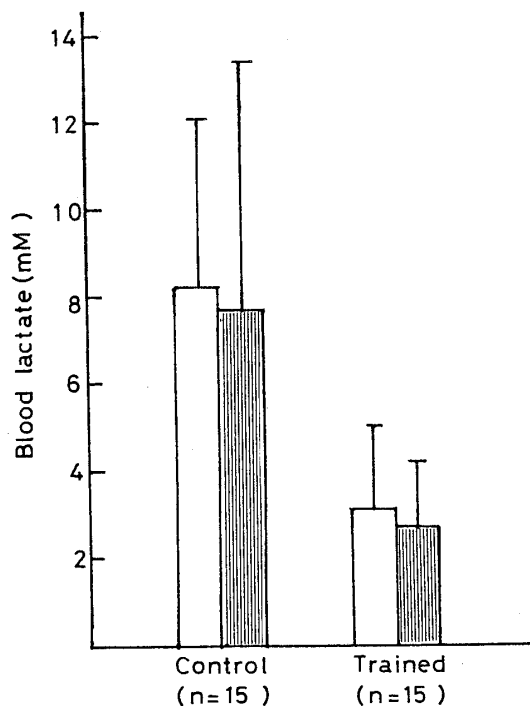


Fig. 4 Blood lactate concentration at exhaustion in control and trained rats.

□ : without aspirin (n=8)

▨ : with aspirin (n=7)

続時間 (Exhaustion time ; ET) を示している。コントロール群の ET は、平均 29.8 ± 10.1 分、トレーニング群で 75.0 ± 21.6 分であり、両群間に有意差を認めた ($P < 0.05$)。また、アスピリン投与ラットの平均 ET

Table 3 Total serum lipid peroxide (SLPO) and non-specific SLPO at rest and exhaustion at speed of 23 m/min in control and trained rats.

	Total-SLPO (nmol/ml)	Non-specific SLPO (nmol/ml)
(Control)		
Rest	7.5 (1.3)	3.96(0.97)
After exhaustion	8.7 (3.8)	8.78(4.14)*
(Trained)		
Rest	11.08(3.12)	4.22(1.9)
After exhaustion	13.06(5.96)	7.31(1.31)*

*p<0.05

は、トレーニング群で75分から52分へ、コントロール群で29.8分から20分へと有意に減少した ($P < 0.05$)。図4は、運動終了後の血中乳酸濃度を示している。トレーニング群では、アスピリン無投与群で 3.1 ± 1.96 mM、投与群で 2.7 ± 1.50 mM と低いのに比べ、コントロール群ではアスピリン無投与群 8.21 ± 3.93 mM、投与群 7.75 ± 5.76 mM と高値を示した。

3. SLPO に及ぼす強制トレーニングの影響(表3, 図5)

A 安静時

トレーニング群の total SLPO は、 11.08 ± 3.12 nmol/ml であり、コントロール群の 7.5 ± 1.3 nmol/ml に比べ有意に高値を示した ($P < 0.05$)。しかしながら、アスピリン投与後の SLPO には、両群間に有意差は認められず、non-specific SLPO には有意差は認めなかった。すなわち、アスピリン投与に伴う SLPO の減少率は、トレーニング群の61%に比べ、コントロール群は47%と低かった。

B Exhaustion 時

両群ともに、total SLPO は、運動によって増加したが、統計学的に有意ではなかった。しかし、アスピリン投与群の SLPO (non-specific SLPO) は、両群ともに運動後に有意な上昇をもたらした ($P < 0.05$)。安静値からの増加率を比較するとトレーニング群が73%であるのに比べ、コントロール群は121%であり、non-specific SLPOの増加率は、トレーニング群が低値を示した。また、コントロール群では、exhaustionでの total SLPO と non-specific SLPO が同水準であることから、運動によって増加した SLPO は、ほとんどが non-specific な LPO 生成に由来していると考えられた。

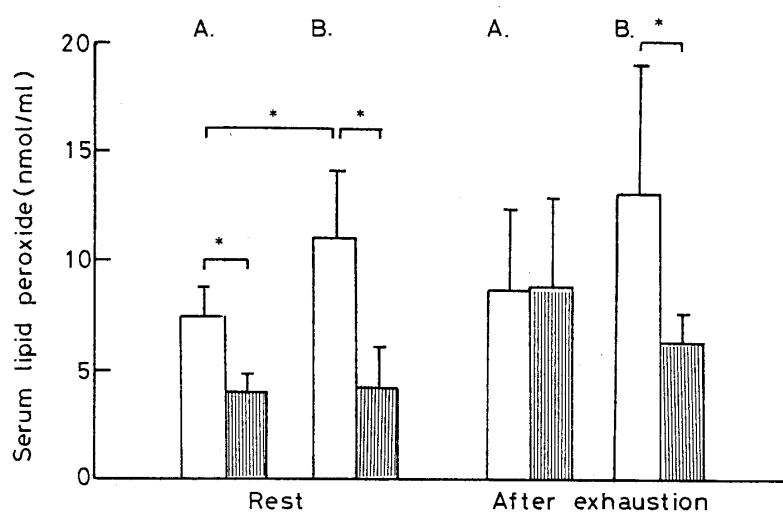


Fig. 5 Total and non-specific SLPO at rest (left) and exhaustion at speed of 23 m/min (right) in control (A) and trained (B) rats.

□ : without aspirin

▨ : with aspirin

* : $p < 0.05$

考 察

実験 I

SLPO は、トライアスロン競技の進行に伴い漸減する傾向にあったが、競技前に比べ有意な変化は認められなかった。この点に関しては、 $\dot{V}O_{2\max}$ が高い人の筋肉では、過酸化脂質抑制酵素の活性が高いことを実証した Jenkins ら(1984)の報告がひとつの示唆を与えてくれる。彼らは、抗酸化系酵素である筋肉中の Super oxide dismutase および Catalase 活性と $\dot{V}O_{2\max}$ との間に有意な正相関を認めている。つまり、トライアスロン競技中 SLPO が有意に変化しなかったことから、多量の酸素を取り込む能力を有する競技者は、生成した過酸化脂質を無毒化する能力の高い筋肉を有していると考えられる。したがってこのようなスプリントタイプのトライアスロンであれば、生体へのダメージは少ないであろうと考えられた。

しかしながら、この実験においては体力水準の違いや、生成した LPO の由来の違いを検討できないことから、我々はラットを用いた強制トレーニングが安静および運動後の血清過酸化脂質値に及ぼす影響について検討した。

実験 II

本研究において、強制的身体トレーニングは安静時の total SLPO を高めるが、non-specific SLPO への影響はないことが明らかとなり、トレーニング群の total

SLPO に占める specific SLPO の割合が高いことが明らかになった。最近、Rauramaa ら(1984)は、健康な中年男性を対象に、中程度の強度の身体トレーニングを実施して、6-Keto-PGF 1α の有意な上昇を認めている。また、Kiyonaga ら(1985)は、本態性高血圧患者を対象に 50% $\dot{V}O_{2\max}$ の運動強度での身体トレーニングによって、PGE 2 の有意な上昇を認めている。これらの成績から、トレーニング群の specific SLPO が高い理由として我々は、プロスタグランディンの関与を考えているが、ラットの身体トレーニングに伴うアラキドン酸代謝の変化やそれと過酸化脂質との関連性に関する報告はないので、今後の検討課題としたい。

ところで、運動によるフリーラジカル生成に関する成績は一致していないようである。Davies ら(1982)は、ラットの定常状態での exhaustive running によってフリーラジカルおよび過酸化脂質の有意な上昇を認めている。また、Dillard たち(1978)もヒトで、呼気中ペンタン濃度が運動によって増加することを報告している。しかしながら、Viinikka たち(1984)は、ランナーを対象に最大運動を負荷した場合、LPO の有意な増加はないことを報告している。前にも指摘したように、この矛盾した成績の原因として我々は、体力水準の違いや LPO の由来の区分が明確でないためであろうと考えた。そこで、本研究では、急性の運動負荷への SLPO 応答に及ぼす体力水準の影響を検討した。その

結果, exhaustion 後の total SLPO には両群ともに有意な上昇は認められなかった. この成績は, トライアスロンレースにおける SLPO の変化に関する成績と一致するものであり, 運動後の total SLPO には体力水準の影響は少ないことを示している. しかし, non-specific SLPO は両群ともに有為に増加しており, その増加率はコントロール群の方が高いことを認めた. さらに, コントロール群の SLPO の増加は, ほとんどが non-specific SLPO の増加によるものであることが明らかとなった.

最近 Lovin らは, 運動強度とマロンジアルデハイド (MDA) として測定された過酸化脂質との関連性を検討している. それによると, 70% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度以下での自転車運動では, MDA は安静時より減少し, 100% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度でのみ有意な増加が認められることを報告している. さらに, 彼らは MDA と血中乳酸濃度との間に有意な正相関を認めている. つまり, exhaustion での MDA が増加するメカニズムを次のように考えている. 運動によって乳酸が増加すると, cytoplasm の NADH や NADPH が減少する. そうするとフリーラジカスカベンジグエンザイムの活性が低下し, フリーラジカルの生成を高め過酸化脂質が生成されるというものである.

しかしながら, 本研究において exhaustion 後の total SLPO と血中乳酸との間には有意な関連性は認めなかったけれども, exhaustion 後の non-specific SLPO と血中乳酸には有意な正の相関を認めた ($r=0.74$; $p<0.05$; $n=14$) (図 6). つまり, 我々は non-

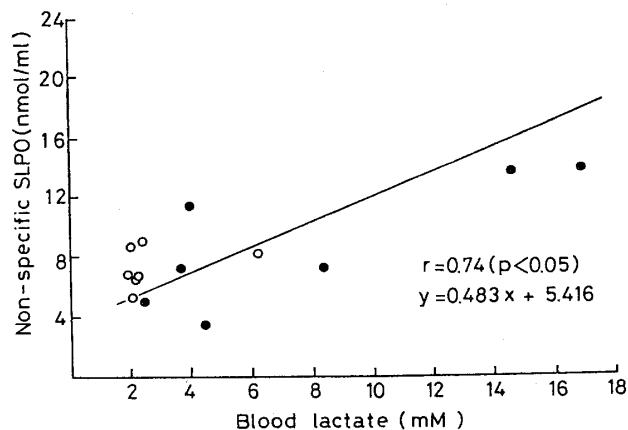


Fig. 6 Relationship between blood lactate and non-specific SLPO in control (●) and training rats (○) ($n=14$).

specific SLPO の生成には, Lovin らのいうフリーラジカル生成のメカニズムが関与しているものと考えた. 最近, Kanter たち(1988)は, 80km レース後の MDA とクレアチンキナーゼ-MB アイソザイムの間に有意な関連性($r=0.85$)があることを報告している.

さらに本研究では, exhaustion 後の non-specific SLPO の安静値からの増加率は, ET が短いにもかかわらず, コントロール群の方がトレーニング群に比べ, 高いことを認めた. この差は, おそらく両群の体力水準の違いに依存していると考えている. 本研究におけるトレーニングラットの有酸素的作業能力の改善は, 同一スピードでの ET がコントロール群に比べ有意に増加した事実からも明らかである. Salminen たち(1983a, b)は, マウスのトレーニングによって運動負荷による LPO は減少か不変, 同時に, 抗酸化性が増したことを報告している. したがって, トレーニング群の exhaustion 後の non-specific SLPO の増加率が低かった理由としては, 有酸素的作業能力の改善に伴い, 抗酸化系酵素活性が高まり, 過酸化脂質生成の抑制が生じたものと考えた.

要 約

本研究では, SLPO に及ぼす激運動および強制ランニングトレーニングの影響を検討することによって, 身体ストレスの指標としての過酸化脂質測定の意義を再検討した.

- (1) トライアスロンレース中の SLPO の有意な変化は認められず, その理由として被検者の体力水準の高さを指摘した.
- (2) 実験 II よりコントロール群, トレーニング群ともに同一スピードでの exhaustive running 後の total SLPO は有意な増加は認められず, 体力水準の違いはないと考えられた.
- (3) 同一スピードでの exhaustive running 後の non-specific SLPO の増加率は, トレーニング群の方が低いことから, non-specific LPO の生成には, 体力水準の違いが影響していると考えた.
- (4) exhaustion 後の non-specific SLPO と血中乳酸との間には, 有意な正相関を認めた.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 測定, 分析等にご協力いただ

いた高橋かおりさん，論文作成にご協力いただいた市山薫さん，快く研究への参加を同意していただいたすべての被検者の方に心から感謝致します。

文 献

- Brozek, J., F. Grande, J.T. Andersen, and A. Keys, 1963: Densitometric analysis of body composition: reversion of some quantitative assumption. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 110: 113-140.
- Davies, K.J.A., and Packer, L., 1982: Free radical and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 107: 1198-1205.
- Dillard, C.J., Litov, R.E., Savin, W.M., Dumelin, E. E., and Tuppel, A., 1978: Effect of exercise, vitamine E and ozone on pulmonary function and lipid peoxidation, *J. Appl. Physion.*, 4: 927-932.
- Higuchi, M., Cartier, L.J., Chen, M., and Holloszy, J. O., 1985: Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle.: Adaptive response to exercise. *J. Gerontol.*, 40: 281-286.
- 市川勇, 1985: 2. 運動およびストレス, 過酸化脂質と生成. (内山充ら編). 学会出版センター, 123-144.
- Jenkins, R.R., Friedland, R., and Howald H., 1984: The relationship of oxygen uptake to superoxide dismutase and catalase activity. *Int. J. Sports Med.*, 5: 11-14.
- Kanter, M.M., Lesmes, G.R., Kaminsky, L. A., Ham-Saeger, J.L., and Nequin, N.D., 1988: Serum creatin kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race: Relationship to lipid peroxidation. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 57: 60-63.
- Kiyonaga, A., Arakawa, K., Tanaka, H., and Shindo, M., 1985: Blood pressure and hormonal responses to aerobic exercise. *Hypertension.*, 7: 125-131.
- Kohrt, W.N., Morgan, D.W., Bates, B., and Skinner, J.S., 1987: Physiological responses of triathletes to maximal swimming, cycling, and running. *Med. Sci, Sports Exer.*, 19: 51-55.
- 熊谷秋三, 西住昌裕, 1986: ラットにおける血中乳酸を指標とした運動強度の評価. *日衛誌*, 41: 648-652.
- Kumagai, S., Hirai, V., Hasegawa, T., Tokudome, S., Tomokuni, K., and Nisizumi, M., 1986: Enzymatic determination of blood lactate by flow injection analysis. *Annals. Physiol. Anthropol.*, 5: 97-100.
- Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M., and Belcastro, A.N., 1987: Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 56: 313-316.
- Nagamine, S., and Suzuki, S., 1964: Anthropometry and body composition of Japanese young men and women. *Human Biol.*, 36: 8-15.
- Otto, R. M., Smith, F.K., Weathermax, R.S., Southard, J.J., and Wygad, J.W., 1985: The relationship of metabolic capacity to triathlon performance with novice triathletes. *Med. Sci. Sports Exer.*, 17: 218.
- Rauramaa, R., Salonen, J.T., Kukkonen-Harjula, K., Seppanen, E-S., Vapaatalo, H., and Hyttunen, J. K., 1984: Effects of mild physical exercise on serum lipoproteins and metabolites of arachidonic acid: a controlled randomised trial in middle aged men. *Brit. Med. J.*, 288: 603-606.
- Salminen, A., and Vihko, V., 1983a: Endurance training reduced the susceptibility of mouse skeletal muscle to lipid peroxidation in vitro. *Acta Physiol. Scand.*, 117: 109-113.
- Salminen, A., and Vihko, V., 1983b: Lipidperoxidation in exercise myopathy. *Exp. Mole. Pathol.*, 38: 380-388.
- Shimizu, T., Kondo, K., and Hayaishi, O., 1981: Role of prostaglandin endo-peroxides in the serum thiobarbituric acid reaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 206: 271-276.
- Viinikka, L., Vuori, J., and Vlikorkala, O., 1984: Lipid peroxides, prostacyclin, and thromboxane A2 in runners during acute exercise. *Med. Sci. Sports Exer.*, 16: 275-277.
- Yagi, K., 1976: A simple fluometric assay for lipidperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, 15: 212-216.

(1988年7月1日受付)