

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

神林 勲*・石村宣人**・中村寛成**・内田英二***・
武田秀勝****・藤井博匡****

Urinary 8-OHdG Content Increases after Short-term and High-intensity Intermittent Exercise

Isao KAMBAYASHI *, Nobuhito ISHIMURA **, Tomonari NAKAMURA **,
Eiji UCHIDA ***, Hidekatsu TAKEDA **** and Hirotada FUJII ****

Abstract

The purpose of this study was to examine whether urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) content, which was assumed to be a biomarker of oxidative DNA damage, increased after short-term and high-intensity intermittent exercise. Fourteen healthy males (age; 19.9 ± 0.8 yr, height; 173.7 ± 6.1 cm, weight; 69.2 ± 11.0 kg) performed an intermittent sprint cycling exercise for 20-set. Exercise consisted of 7-sec maximal pedaling (body weight $\times 0.08$ kp) and 53-sec recovery (49-sec unloaded cycling with 4-sec setting for an ergometer). Mean heart rate during exercise was 156.0 ± 2.9 bpm ($n=13$). Urine samples were collected just before (Pre) and 1 hour after exercise (Post). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for analyzing urinary 8-OHdG content. Urinary 8-OHdG content increased after exercise in all subjects. There was significant difference between Pre (8.38 ± 1.58 ng·ml⁻¹) and Post (26.84 ± 3.17 ng·ml⁻¹) values ($p < 0.001$). It is likely that superoxide anion production increased due to activated aerobic energy metabolism and ischemia-reperfusion in working muscles. We conclude that urinary 8-OHdG content increases after short-term and high-intensity intermittent exercise.

Key words: Exercise, Oxidative stress, Urine, DNA damage, 8-OHdG

* 北海道教育大学教育学部札幌校 (〒002-8502 札幌市北区あいの里5条3丁目)

Hokkaido University of Education Sapporo

** 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条3丁目)

Graduate School of Education, Hokkaido University of Education

*** 國學院短期大学 (〒073-0014 滝川市文京町3丁目1番1号)

Kokugakuin Junior College

**** 札幌医科大学保健医療学部 (〒060-8556 札幌市中央区南1条西17丁目)

Sapporo Medical University, School of Health Science

I. 緒言

運動による酸素消費量の増加は、活性酸素種形成の増加を引き起こし、脂質の過酸化、タンパク質やDNAの酸化修飾を導く。これらは、老化や発癌、動脈硬化といった様々な疾病の原因となると考えられている。

尿中や血中の8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-hydroxydeoxyguanosine: 8-OHdG)含有量の測定は、活性酸素種によるDNAの酸化ダメージを定量する方法の1つである。この値は、活性酸素種の発生と抗酸化物質によるその除去とのバランスに左右され、人体にかかる酸化ストレスを示す生体指標であると考えられている⁶⁾。最近では、尿中の8-OHdG含有量を、酵素免疫測定法(Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA法)による分析用キットにて簡便に測定することが可能である。

これまでに、ロードサイクリングレース²⁾やマラソン^{1,16)}、スーパーマラソン⁹⁾などにより運動後の8-OHdG含有量が運動前に比べ有意に増加したことが報告されている。このことから、8-OHdG含有量は長時間にわたる有酸素運動後に有意に増加すると言える。これらに対して、自転車ペダリング運動^{13,14)}やローイング運動⁸⁾による疲労困憊までの漸増負荷運動を行わせた研究では、運動後の8-OHdG含有量に有意な増加は認められていない。疲労困憊までの単発運動は運動継続時間が短いため、運動後の8-OHdG含有量を変化させるほどの酸化ストレスとはならなかったのかもしれない。

Groussardら⁴⁾は30秒間の全力での自転車ペダリング運動からなるWingate testを被検者に行わせ、脂質ラジカル産生や赤血球の抗酸化物質の変化を調べた。そして、Wingate testでは活動筋内で虚血-再灌流と同様な脱酸素化および再酸素化が起こることから、強い酸化ストレスが生じていると推察している。虚血-再灌流では、キサンチン-キサンチンオキシターゼ系により、多量のスーパーオキシド(O_2^-)が生成される^{3,10)}。また、坂井ら¹⁰⁾は7秒間の全力ペダリング運動と45秒間の軽い負荷でのペダリング運動を交互に20セット繰り返す高強度間欠的運動を行った結果、全力ペダリング時のハイパワー発揮能力の維持には有酸素系のエネルギー産生能力が重要であることを報告している。よって、高強度間欠的運動中には有酸素系エネルギー代謝への依存が強く、ミトコンドリアにおいて多くの O_2^- が発生して

いると思われる。以上のことから、短時間でも高強度間欠的運動を実施すれば酸化ストレスが強まり、運動後に尿中8-OHdGの増加が生じるのではないかと考えられる。

そこで、本研究はこの仮説を検証するため自転車ペダリング運動による高強度間欠的運動を短時間行わせ、運動前後における尿中8-OHdG含有量の変化を調べることを目的とした。

II. 実験方法

A. 被検者

被検者は大学で運動部に所属する活動的な男子14名(年齢 19.9 ± 0.8 歳, 身長 173.7 ± 6.1 cm, 体重 69.2 ± 11.0 kg, 最大酸素摂取量 49.2 ± 5.9 ml \cdot kg $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$)であった。実験に先立ち、全員に本研究の趣旨および安全性について十分な説明を行い、自主的な参加の同意を得た。

B. 高強度間欠的運動

実験室においてパワーマックス(COMBI社製)を用いた間欠的運動を行った。実験に先立ち被検者全員に予備テストを実施させ、運動プロトコルに慣れるよう配慮した。また、本実験の24時間前は激しい運動を行わないよう指示した。実験では体重の測定および心拍計(Heart rate monitor PE 3000, POLAR ELECTRO社製)の装着後、ウォームアップとして3分間のストレッチ、100wattに設定された自転車エルゴメーター(ISOPWER ERGOMETER, 竹井機器工業社製)での5分間のペダリング運動、および5分間のストレッチを行わせた。ウォームアップ終了後、パワーマックスに乗り靴とペダルをテープにより固定した。間欠的運動として①体重 $\times 0.08$ kpの負荷で7秒間の全力ペダリング運動、②無負荷(0kp)の状態49秒間、メトロノームのリズムにあわせて毎分60回転のペダリング運動、③パワーマックスの負荷を調整するための4秒間を1セットとし、それを20セット行わせた(Fig. 1)。各セットにおいて全力ペダリング時の平均パワー(以下パワー)を記録し、その体重あたりの相対値を分析に用いた。また、運動中の心拍数の計測は5秒間隔で行った。運動中の給水は自由とし、市販のスポーツドリンクを摂らせた。

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

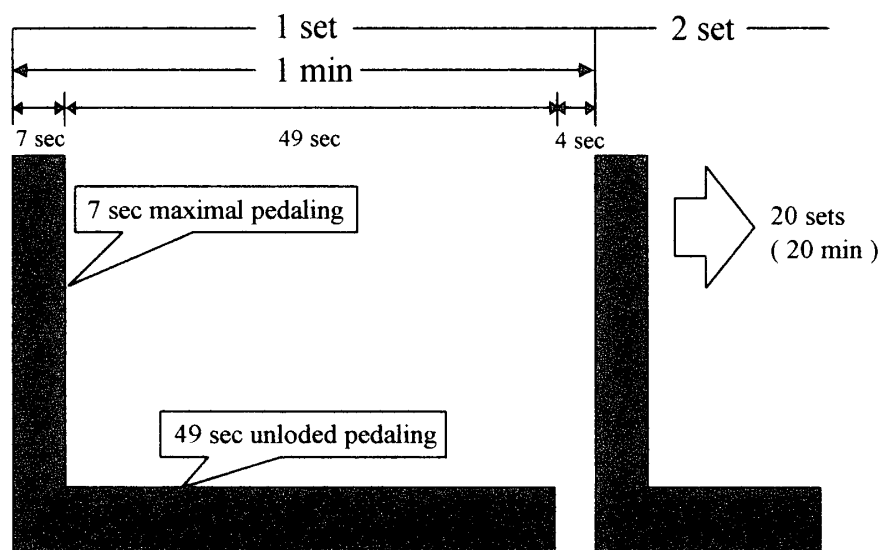


Fig. 1 Measurement protocol of the intermittent sprint cycling.

C. 採尿方法

間欠的運動開始前に採尿を行い、そのうち約5 mlを分注し分析に用いた。高強度間欠的運動の終了後、被検者には安静座位をとらせた。そして、運動終了から1時間後に採尿を行い、運動前と同様に約5 mlを分析に用いた。なお、運動1時間後に採尿を実施したのは、運動によって血漿過酸化脂質が運動終了後から3時間後の間に大きく増加すること¹⁵⁾、および被検者の尿排泄の負担を考慮したことによる。また、運動後から採尿までに被検者全員に市販のスポーツドリンクを500ml摂らせた。運動前と運動後の尿は分析まで -80°C の冷凍庫で保存した。

D. 尿中8-OHdG含有量の分析

冷凍していた標本を常温で解凍した後、遠心分離機（パーソナル冷却遠心機2700，久保田商事株式会社製）を用い、2000rpmで5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。

8-OHdG含有量の分析は、ELISA法による測定キット（日本老化制御研究所）を用いて行った。調整した試料と再構成した第1抗体（Primary antibody）をそれぞれのウェルに $50\mu\text{l}$ ずつ分注し、 37°C で1時間反応させた。反応終了後、ウェルの反応液を捨て、洗浄液（Washing solution）で3回洗浄を行った。そして、第2抗体（Secondary antibody）を $100\mu\text{l}$ 加え、再び 37°C で1時間反応させた。3回

の洗浄の後、発色剤（Chromatic solution）を $100\mu\text{l}$ 加え遮光した状態で15分間反応させ、反応停止液（Reaction terminating solution）を加えた。吸光度の測定にはマイクロプレートリーダー（Bio Rad社製）を使用した。測定キットに含まれている8-OHdG標準液（Standard 8-OHdG solution）を用いて、8-OHdG濃度と吸光度との関係を片対数グラフ用紙にプロットし、8-OHdGの標準曲線を作製した。この標準曲線を用い各サンプルの吸光度より8-OHdG含有量を定量した。各標本を3つのウェルで測定し、その平均値を8-OHdG含有量として評価した。

E. 統計処理

測定した値はすべて平均値 \pm 標準誤差で表した。間欠的運動でのパワーの変化の分析は、Stat Viewを用いた反復測定分散分析を行い、Post-hoc多重比較を行った。他の変数間の差の検定には対応のあるt検定を用いた。なお、危険率はいずれの場合も5%以下で判断した。

Ⅲ. 結果

A. 間欠的運動におけるパワーと心拍数の変化

高強度間欠的運動における体重あたりの平均パワーの変化をFig. 2に示した。1セット目に対して、5から20セット目に有意な低下が認められた（5セット目； $p < 0.01$ ，6セットから20セット目； $p < 0.001$ ）。

Fig. 3 に間欠的運動中の平均心拍数の経時的变化を示した。心拍数は3セット目以降、安定した変化を示した。各被検者の20分間の平均心拍数は128.9bpmから169.4bpmであり、平均値は 156.0 ± 2.9 bpmであった。なお、1名については心拍計の不具合により、計測ができなかった。

B. 尿中8-OHdG 含有量

Fig. 4 A に運動前と運動後の8-OHdG 含有量についての個人の変化を、Fig. 4 B に運動前後の平均値を示した。すべての被検者において、運動後の8-OHdG 含有量は増加した。そして、運動後の値 26.8 ± 3.2 ng \cdot ml $^{-1}$ は運動後の値 8.4 ± 1.6 ng \cdot ml $^{-1}$ と比較して有意に高値であった ($p < 0.001$)。

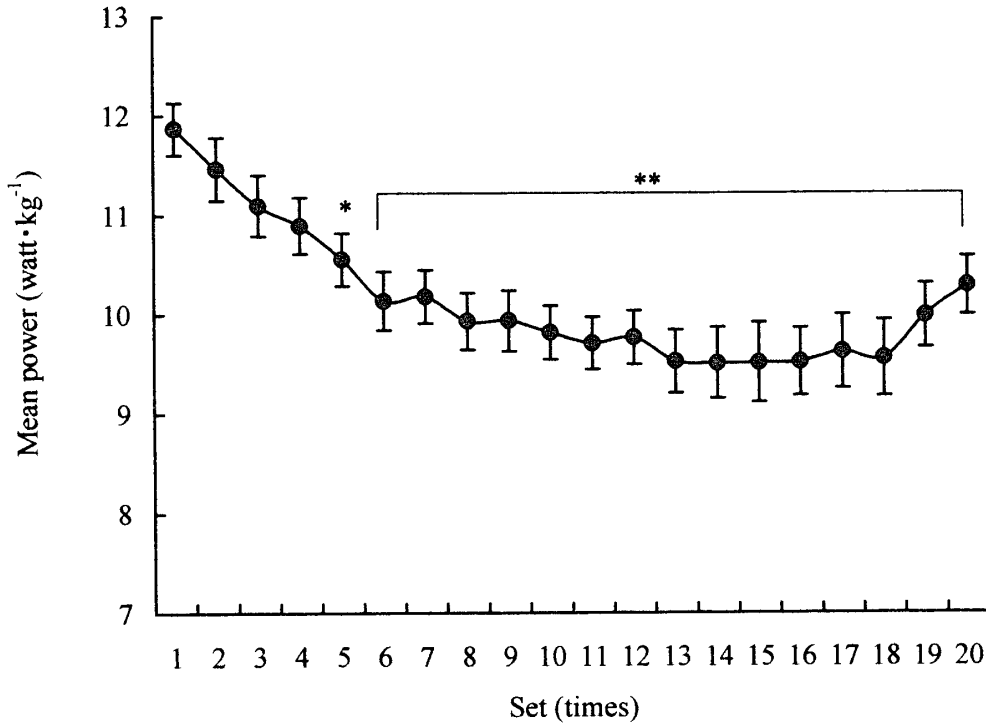


Fig. 2 Change of mean power output during the ntermittent sprint cycling. Values are mean \pm SE. * $p < 0.01$ (vs. set 1), ** $p < 0.001$ (vs. set 1), $n = 14$

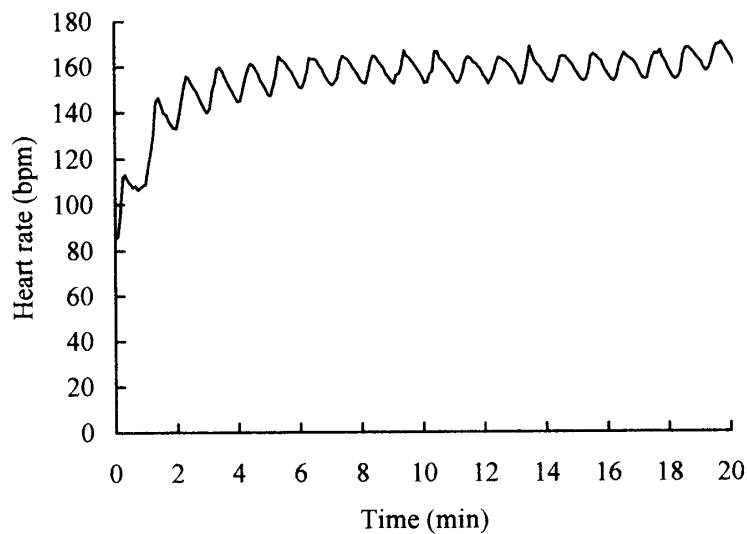


Fig. 3 Change of heart rate during the intermittent sprint cycling. $n = 13$

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

IV. 考察

これまで、ロードサイクリングレース²⁾やマラソン^{1,16)}、スーパーマラソン⁹⁾といった長時間にわたる有酸素運動後に尿中8-OHdG含有量は有意に増加したことが報告されている。しかしながら、疲労困憊までの漸増負荷運動^{8,13,14)}のような単発運動では有意な変化が認められていない。本研究では虚血-再灌流と同様の脱酸素化および再酸素化を引き起こし⁴⁾、有酸素系エネルギー代謝の依存度も高いとされる¹⁰⁾高強度間欠的運動を20分間行わせた。その結果、運動終了1時間後に尿中の8-OHdG含有量が有意に増加した。これは、初めて短時間の運動後に尿中8-OHdG含有量の有意な増加を認めた研究である。

高強度間欠的運動後の尿中8-OHdG含有量は $26.8 \pm 3.2 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ であり、運動前の値の $8.4 \pm 1.6 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ と比較して有意に高い値であった (Fig. 4 B)。高強

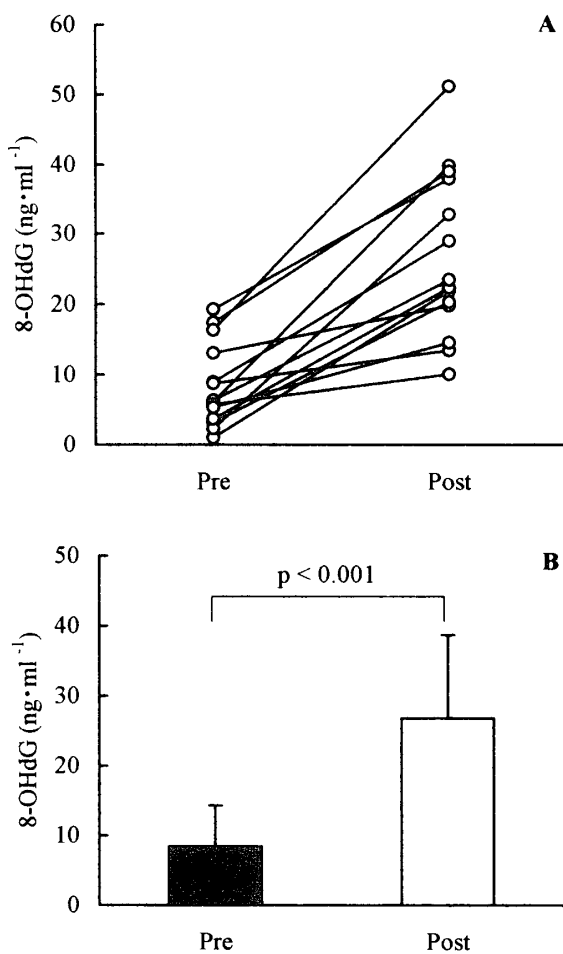


Fig. 4 Urinary 8-OHdG content before and after the intermittent sprint cycling. Panel A and B show individual data and mean values \pm SE, respectively.

度間欠的運動中の平均心拍数は $156.0 \pm 2.9 \text{ bpm}$ であり、心拍数と酸素摂取量 (oxygen uptake: $\dot{V}O_2$) には正の相関関係があることから、運動中の $\dot{V}O_2$ が増加していたことを示している。Loft ら⁷⁾は、運動中の $\dot{V}O_2$ の増加がミトコンドリア電子伝達系の過程で発生する O_2^- を増加させるため、 $\dot{V}O_2$ と DNA の酸化ダメージには正の相関関係があることを報告している。今回の運動でも、全力ペダリング時のエネルギー供給およびローパワー運動中の ATP 再合成のために有酸素系のエネルギー供給機構が働き、ミトコンドリア電子伝達系での代謝が高まっていたと考えられる。

間欠的運動中の平均心拍数である $156.0 \pm 2.9 \text{ bpm}$ は、 $\dot{V}O_2$ にすると 70% $\dot{V}O_{2\text{max}}$ 程度の強度の運動である^{18,19)}。Viguie ら¹⁷⁾は 65% $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ の強度で 90 分間の自転車ペダリング運動を 3 日間続けて行わせ、尿中の 8-ヒドロキシグアノシン含有量を用いて DNA の酸化ダメージを調べた結果、有意な変化が認められなかったことを報告している。この研究と比較して、今回の間欠的運動の強度は決して高いとは言えず運動時間も短い。それにも関わらず、本研究で尿中の 8-OHdG 含有量が有意に増加したことは、運動様式の違いによるものかもしれない。全力ペダリング運動とローパワーでのペダリング運動の繰り返しは活動筋内の脱酸素化や再酸素化を引き起こし、虚血-再灌流と同様の状態であったと考えられる⁴⁾。虚血や激しい運動時には細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加により Ca^{2+} 依存性プロテアーゼが活性化され、キサンチンデヒドロキナーゼがキサンチンオキシダーゼに変換される。加えて、虚血時には ATP よりアデノシンを経てヒポキサンチンが生じるため、虚血組織中ではヒポキサンチン濃度が上昇する。増加したキサンチンオキシダーゼとヒポキサンチンの存在下に、再灌流によって血液とともに酸素が供給されると大量の O_2^- が生成される^{3,11)}。このため、活性酸素種の発生が高まり、DNA の酸化ダメージが増大したと考えられる。

Sumida ら¹³⁾は自転車による疲労困憊までの漸増負荷運動を行わせ、その後 24 時間の蓄尿を 3 日間調べた結果、尿中 8-OHdG 含有量に変化がなかったことを報告している。この中で Sumida らは、運動 15 分および 10 時間後に尿中 8-OHdG 含有量の有意な増加が認められた論文^{1,5)}と比較して、その採尿方法の違いを指摘している。つまり、24 時間蓄尿したサン

ルを用いた場合には変化が認められず、それより短い時間で蓄尿した場合には有意な増加が認められるということである。前述の Viguie らの研究¹²⁾でも運動後24時間蓄尿したサンプルを用いている。活性酸素種によって形成された8-OHdGは酵素により修復され、血液を経て尿中に排泄される¹³⁾。本研究の結果から、このような修復や排泄は運動終了後比較的短時間に完了すると推察される。よって、24時間の蓄尿では安静レベルの尿を含むため運動によるDNAの酸化ダメージを正確に定量していないことが考えられる。しかしながら、今回の実験では運動1時間後以降の尿について調べてはいないため言及することはできない。今後さらに検討する必要があると考えられる。

運動前の尿中8-OHdG含有量は $1.0\sim 19.3\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ の間であった (Fig. 4 A)。これは安静時の標準値とされる $2\sim 20\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (日本老化制御研究所) のほぼ範囲内ではあるが、ややばらつきが大きかった。尿中の8-OHdG含有量は生体内での活性酸素種の発生とそれを除去する抗酸化システムとのバランスを反映するものであり、食事は抗酸化システムに影響を与える要因の1つである。今回、実験前24時間の運動は制限したが、食事については考慮していない。そのため、このばらつきは食事の違いによるものかもしれない。また、Wingate testを実施した Groussard らの研究⁹⁾では、運動直後にスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase: SOD) 活性の有意な低下が認められている。これは抗酸化システムの低下を示唆するものである。今回は抗酸化システムについて調べていないため、運動後に8-OHdG含有量が有意に増加したことに対する、抗酸化システムの影響については明らかではない。今後、実験期間中の食事コントロールを行った上で、抗酸化システムの指標を同時に検討する必要がある。

V. 結論

本研究の目的は短時間の高強度間欠的運動後の尿中8-OHdG含有量の変化を検討することであった。高強度間欠的運動として、体重 $\times 0.08\text{kp}$ の負荷で7秒間の全力ペダリング運動と無負荷で毎分60回転のペダリング運動を交互に20セット行わせ、その運動前と運動1時間後に採尿を行い、ELISA法を用いて尿中8-OHdG含有量を調べた。

その結果、尿中8-OHdG含有量は被検者全員で運動後に増加が認められ、運動後の平均値 $26.8\pm 3.2\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ は運動前の平均値 $8.4\pm 1.6\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ と比較して有意に高値であった。高強度間欠的運動は有酸素系エネルギー代謝の依存度も高く、筋内で虚血-再灌流も生じているとされている。よって、多量の O_2^- が発生し、DNAの酸化ダメージが生じたと考えられる。

引用文献

- 1) Allesio H M (1993) Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 25: 169-173
- 2) 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
- 3) Grander D N, McCord J M, Parks D A and Hollwarth M E (1986) Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 90: 80-84
- 4) 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
- 5) Inoue T, Mu Z, Sumikawa K, Adachi K and Okochi T (1993) Effects of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn J Cancer Res* 84: 720-725
- 6) 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: Effect of progressive resistance training. *J. Nutr. Biochem.* 11: 581-584
- 7) Loft S, Astrup A, Buemann B and Poulsen H E (1994) Oxidative DNA damages correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J* 8: 534-537
- 8) Nielsen H B, Hanel B, Loft S, Poulsen H E, Pedersen B K, Diamant M, Vistisen K and Secher N H (1995) Restricted pulmonary diffusion capacity after exercise is not an ARDS-like injury. *J Sports Sci* 13: 109-113

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

- 9) 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
- 10) 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
- 11) Sjödin B, Westing Y H, and Apple F S (1990) Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 10: 236-254
- 12) 角田 聡 (2000) 8-ヒドロキシグアニン (8-OH-Gua) の反応は? 大野秀樹, 跡見順子, 伏木 亨 編 活性酸素と運動, 杏林書院, 東京, 42-43
- 13) Sumida S, Doi T, Sakurai M, Yoshioka Y and Okamura K (1997) Effect of single bout of exercise and β -carotene supplementation on the urinary excretion of 8-hydroxy-deoxyguanosine in humans. *Free Radic Res* 27: 607-618
- 14) Sumida S, Okamura K, Doi T, Sakurai M, Yoshioka Y and Sugawa-Katayama Y (1997) No influence of a single bout of exercise on urinary excretion of 8-hydroxy-deoxyguanosine in humans. *Biochem Mol Biol Int* 42: 601-609
- 15) Toshinai K, Haga S, Miyazaki H, Takemasa T, Nomura T, Kizaki T and Ohno H (2000) Effects of different intensity and duration of exercise with the same oxygen consumption on the ability of neutrophils to generate superoxide anion radicals in humans. *Adv. Exerc Sports Physiol* 6: 91-95
- 16) 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
- 17) Viguie C A, Frei B, Shigenaga M K, Ames B N, Packer L and Brooks G A (1993) Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J Appl Physiol* 75: 566-572
- 18) 山地啓司 (1981) 作業 (運動) 強度と心拍数. 心拍数の科学, 大修館書店, 東京, 37-68
- 19) 山地啓司 (1973) 最大下及び最大作業時の非鍛錬者と鍛錬者の生理的反応の相違 (II). *東京大学教育学部紀要* 13: 253-259
(平成15年10月6日受付, 平成16年1月14日訂正, 平成16年3月12日受理)