

〔研究ノート〕

## 成長期における運動負荷の様式が 成体期の酸化ストレス・抗酸化能・骨・筋組織に及ぼす影響

橋本 淳一<sup>1)</sup>, 李 相潤<sup>1)</sup>, 鈴木 孝夫<sup>1)</sup>

1) 青森県立保健大学健康科学部理学療法学科

### 要旨

本研究では成長期における運動負荷の特性が、成体期の酸化ストレス度、抗酸化能、骨形態、筋組織に及ぼす影響について動物実験を行った。

その結果、酸化ストレスは運動強度や運動時間、運動内容によっては抗酸化ストレス作用を凌駕し増加すること、また、骨格や筋の成長に伴い増加する可能性が推察された。さらに、成長期における無酸素運動は、有酸素運動より酸化ストレスへの影響が大きいことが示された。骨については、運動負荷群の大腿骨骨長軸は、対照群に比べて有意に低く、成長期における過度な運動負荷は骨長の発育（骨重量や形態）抑制に影響することが示された。つまり、適度な負荷量の有酸素運動は骨発育を活性化させるが、過度な負荷量の無酸素運動は骨発育の抑制作用に働くことが考えられた。また、跳躍の無酸素運動では、トレッドミルの有酸素運動や対照群と比べて、下肢筋の Type I 繊維、Type II 繊維の横断面積はともに低値の傾向を示した。このことから、筋肥大を目的とする運動では、筋繊維への刺激の大きさとともに運動による損傷からの回復時間を考慮に入れた運動負荷の設定が必要と思われる。

キーワード：①成長期 ② d-ROMs ③ BAP ④骨形態 ⑤筋組織

### I. はじめに

運動は健康を維持するために重要である一方、運動負荷様式によっては活性酸素が産生され、生体に酸化障害をきたす。こうした酸化ストレスは活性酸素の産生と抗酸化能のバランスにより調整されるという点を考えると、活性酸素を除去するための酸化制御システムの獲得、つまり、抗酸化能について検討することが重要といえる。抗酸化能は、血液中のアルブミン、トランスフェリン、ビリルビン、尿酸、還元グルタチオンなど還元作用を有する物質の全体量を示し、酸化ストレスに対してこれらの物質が作用することで抗酸化に働くものである。この働きにより生体の細胞、組織を過酸化から保護し、炎症の抑制や組織障害からの回復を早めるものとされている。さらに、骨や筋などの身体的な発達段階である成長期において、運動が発育に与える影響の知見が得られれば、成長期の健康指導や治療を目的とする運動療法に寄与することが期待できると考えた。

運動によって血中の酸化ストレスが増大するメカニズ

ムとしては、主に酸素摂取量の増大、骨格筋の損傷などが挙げられる<sup>1)</sup>。とくに過度な運動負荷は、骨格筋の損傷によって好中球などの炎症性細胞の浸潤が生じ、これらの炎症細胞から活性酸素が産出される。活性酸素は異物が生体内に侵入した際や炎症時などに白血球から産生され、生体防御機構として重要な役割を果たす<sup>2)</sup>。しかし生体内の過剰な活性酸素の産生は蛋白質や遺伝子情報を担う DNA に酸化性の障害を引き起こす<sup>3-6)</sup>。血中の酸化ストレスは運動の強度や時間の影響を受け、短時間高強度運動や長時間の運動によって酸化ストレスは増大しやすいことが報告されている<sup>7-10)</sup>。一方、鍛錬者は非鍛錬者に比べ運動時の酸化ストレスが小さいことが報告<sup>11)</sup>されており、抗酸化能が関連していることが考えられる。酸化ストレスの増大は、様々な疾患と関連性が示唆されており、生体内の酸化ストレスの動態は非常に重要視されている<sup>12-16)</sup>。しかし運動に伴う酸化ストレスの変化に関する既存の研究では、若年や中高齢を対象にした報告<sup>7-10)</sup>は数多く見られるが、成長期からの運動負荷

が生体に及ぼす影響については明らかにされていない。

近年、加齢に伴う骨粗鬆症の予防として成長期における最大骨量の増加に焦点がおかれている。最大骨量の決定因子は、先天的因子と環境的因子に大別される。このうち、環境的因子である運動が占める割合は約20%程度とされている。運動負荷による骨形成は、骨の歪みに伴う骨細管内の液流により促進される。しかし成長期における運動負荷が骨長や骨量に及ぼす結果については二分化した報告が散見され、未だに一貫した報告は見当たらない。つまり、骨の形成過程である成長期に運動負荷の特性が骨形態に及ぼす影響を検討することは、加齢に伴う骨粗鬆症の予防策として重要と考えられる。

筋には遅筋 (type I) 線維と速筋 (type II) 線維の2つの筋 Type がある。Type I 線維は遅筋線維と呼ばれ、酸化酵素活性が高く疲労耐性の高い持久能力に優れた筋線維である。一方、Type II 線維は速筋線維と呼ばれ、解糖系酵素活性が高く無酸素性運動に適している<sup>17)</sup>。筋線維 Type の構成比は、各筋組織によって異なり、運動様式に適応して変化するため、筋組織の特性は生活習慣や運動負荷に左右される。走トレニングでは遅筋線維の肥大<sup>18)</sup>が示唆されており、跳躍トレニングでは速筋線維の肥大<sup>19)</sup>が顕著であることが報告されている。運動負荷が筋組織に与える影響については数多く報告されているが、成長期を対象とした筋組織の結果には不明な点が多い。

本研究では、これらの成果を得るため、本来であればヒトを対象に行うべきであるが、継続的な運動負荷やその後の測定で血液、実物の骨、筋を使用するため、代用としてラットを用いた動物実験を行い、基礎的な知見を得ることを目的とした。

## II. 方法

本動物実験は「青森県立保健大学における動物実験に関する指針」に則り実施した。

### 1. 実験動物・飼育環境

実験動物は、生後4週齢のWistar系雄性ラット24匹を用い、無作為にて対照群 (C, n = 8)、トレッドミル群 (T, n = 8)、跳躍群 (J, n = 8) の3群に分類した。実験動物は1週間予備飼育し、室温は飼育期間中を通じて23°C ± 1、湿度55% ± 5%に保ち、12時間を暗期とする明暗サイクルとした。全ての実験動物は、ゲージ内を自由に移動することが可能で、飼育には実験動物用飼料CE-2 (日本クレア社) を与え、水道水と共に自由摂取とした。

### 2. 運動負荷方法

運動負荷には有酸素運動としてトレッドミル走を用い、無酸素運動として跳躍を用いた。いずれも運動頻度は5日/週とし、8週間同時刻午前中に実施した。

T群は小動物専用のトレッドミルMK-680/OP (室町機械社製) を用いた。トレッドミルの運動負荷プロトコールは、Huangら<sup>20)</sup>の方法に基づいた有酸素運動レベルの負荷量を用いた。速度10m/min、運動時間20分間/日から開始し、その後、運動速度22m/min、運動時間60分間となるまで速度、運動時間を徐々に増加させた。

J群の跳躍運動はUmemuraら<sup>21)</sup>の方法に準じて、四方を板で囲んだ箱の底にラットを置き、刺激電極板による電気刺激を与え、自発的な跳躍ができるようにした。跳躍回数は、ラットの前足が箱の上縁まで達した場合を1回としカウントした。運動負荷は100回/10分間とし、25cmの高さから開始し、その後、週に5cmずつ高くして4週目から実験最後まで40cmとした。

### 3. 血液の酸化ストレスおよび抗酸化能測定

採血は実験開始前4週齢の安静時と、実験終了12週齢の安静時にラットの尾から採取した。採取した血液は3000rpmで15分間遠心分離を行い、血漿と血球に分離させた。血中酸化ストレス及び抗酸化能はFree Radical Analytical System 4 (FRAS4, H & D srlco, Italy) を用いた。

#### 1) 酸化ストレス (Reactive Oxygen Metabolites-derived compounds: d-ROMs)

d-ROMsの測定は、血漿10 µlを酢酸緩衝液に入れて攪拌させ、ドライクロモゲンを加えて再度6000rpmで1分間遠心分離を行い、血球細胞を分離させる。その後、37°Cに一定した温度下で、波長505nmで5分間計測した。

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量を測定することで得られる。測定は二価鉄、三価鉄を反応させて得られたアルコキシラジカルとペルオキシラジカルにNN-ジエチルパラフェニレンジアミン (クロモゲン基質) を作用させる。このクロモゲンはフリーラジカルに触れると酸化され、フリーラジカルの量に応じて赤紫色のラジカル陽イオンに変化する特性がある。赤紫色に変化した色の濃度は血中にあるヒドロペルオキシドの濃度を反映し、活性酸素・フリーラジカルの影響を受けた細胞、分子の副産物である活性酸素代謝物の量に直接比例する。赤紫色のラジカル陽イオンを光度計で計測し、ヒドロペルオキシドの量を定量化する方法である。単位はU.CARRが用いられ、1U.CARRが過酸化水素0.08mg/dlに相当する。

表1 初期土族授産の概要

群	実験開始前	2ヶ月後	p
対照 (n=8)	106.3 ± 7.9	476.5 ± 30.0	0.001
トレッドミル (n=8)	111.7 ± 6.1	406.8 ± 52.1	0.001
跳躍 (n=8)	115.6 ± 8.2	423.1 ± 41.8	0.001

平均 ± 標準偏差

## 2) 抗酸化能 (Biological Antioxidant Potential: BAP)

BAP測定は、血漿中の還元力を有する物質による還元作用を評価する方法である。チオシアン酸塩液の中に三価鉄クロモゲン 50  $\mu$ l を混合し、赤く呈色させ、この溶液を波長 505nm の光度計に入れ三価鉄イオン濃度を3秒間測定した。その後、血漿 10  $\mu$ l を入れて攪拌させ、37°C に温度管理された光度計に入れ5分間測定した。

BAPは標本中の抗酸化物質量を三価鉄が二価鉄に還元されることを応用して測定される。三価鉄塩はある特定のチオシアン酸塩誘導物を含む無色の溶液に溶解すると三価鉄 Fe<sup>3+</sup> イオンの機能として赤くなるが、血漿を添加すると血漿中の抗酸化物質の作用で二価鉄 Fe<sup>2+</sup> イオンに還元され、脱色される。その色の変化を光度計で測定し、血漿の抗酸化力を評価する方法で、単位は  $\mu$  mol/L である。

## 4. 筋組織の標本作製・組織化学的分析

実験終了後は、ジエチルエーテル麻酔下で開胸し、左心室より生理食塩水にて灌流屠殺し、直ちに左右のヒラメ筋、足底筋を摘出した。その後、同試料を OCT compound (Sakura, USA) にて包埋し、液体窒素イソペンタン中にて急速凍結し、解析まで -80°C のディープフリーザに保存した。凍結標本はクリオスタット HM500-OV (MICROM, Germany) を用いて -20°C の中で厚さ 10  $\mu$ m に薄切した。切片は各筋の中央筋腹の3部位から5枚ずつ作製し、Adenosine 5- Triphosphate Disodium Salt (ORIENTAL YEAST 社製) を用い、ATPase 染色 (pH10.4) を行い、筋線維を分染した。その後、ATPase 染色を行った筋組織は、顕微鏡用デジタル写真撮影装置にて撮影し、Windows 用汎用画像処理パッケージ Win ROOF (三谷商事株式会社製) を用いて200個以上の筋細胞を測定し、筋横断面積を算出した。また、Type I と Type II のそれぞれの細胞数を用いて筋線維 type の構成比率を求めた。

## 5. 骨形態

実験4の筋組織の摘出が終了した後は、大腿骨と脛骨を摘出した。摘出した対象骨は電子ノギスを用いて最大骨長を測定し、筋や結合組織などを除去してから電子天秤計を用いて湿重量を計測した。

## 6. 解析

測定結果については、統計処理 IBM SPSS Statistics ver. 22 を用い、各群の実験前後においては対応のある t 検定を行った。そして3群間においては一元配置分散分析後、多重比較として Scheffe 検定を行い、統計学的な有意水準は5%未満とした。

## III. 結果

### 1. 体重の変化

体重は実験開始前に比べて実験終了時には、すべての群においてそれぞれ有意に上昇した (何れも  $p < 0.001$ )。そして増加率は C 群 > J 群 > T 群の順であった (表1)。

### 2. 酸化ストレス (d-ROMs) の変化

実験開始前における成長期安静時の d-ROMs について3群間の有意な差はなかった。一方、実験開始8週間後の成体期の安静時では、C 群に対して J 群のみ 28.2% 有意に高かった ( $p < 0.05$ ) (図1)。

### 3. 抗酸化能 (BAP) の変化

実験開始前の成長期安静時及び、実験開始8週間後の成体期の安静時における BAP の3群間の有意な差はなかった (図2)。

## 4. 骨形態

### 1) 骨長

大腿骨長は C 群に比べて T 群が 2.1 % ( $p < 0.05$ )、J 群が 3.1 % ( $p < 0.01$ )、それぞれ有意に短かった。一方、脛骨長において有意な差はなかった (図3)。

### 2) 湿骨重量

湿骨重量は C 群に比べて J 群の大腿骨が 8.4 % 有意に重かった ( $p < 0.05$ )。一方、脛骨においては C 群に比べて 14.9 % 有意に重かった ( $p < 0.01$ ) (図4)。

## 5. ヒラメ筋横断面積 (図5)

Type I 線維横断面積は、T 群 (4808.3 ± 1825.9  $\mu$ m<sup>2</sup>) > C 群 (4510.9 ± 1643.2  $\mu$ m<sup>2</sup>) > J 群 (3219.1 ± 1575.6  $\mu$ m<sup>2</sup>) の順であった。C 群に比べて T 群は 6.6% 有意に

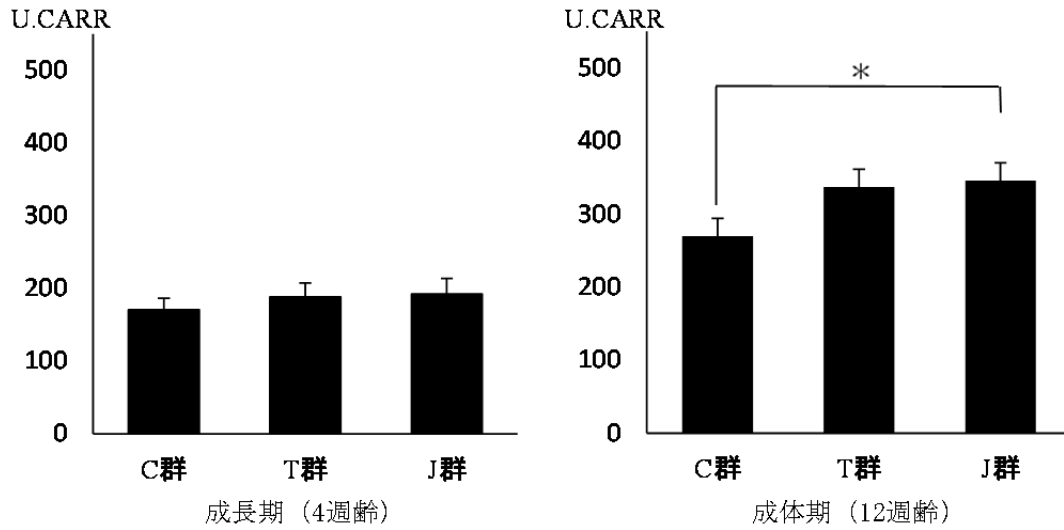


図1 成長期および成体期における d-ROMs

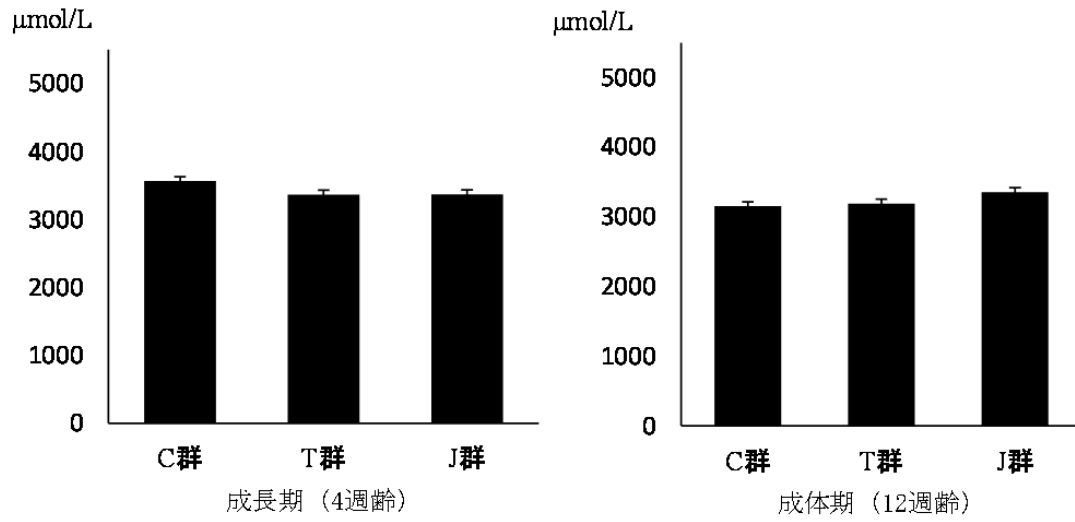


図2 成長期および成体期における BAP

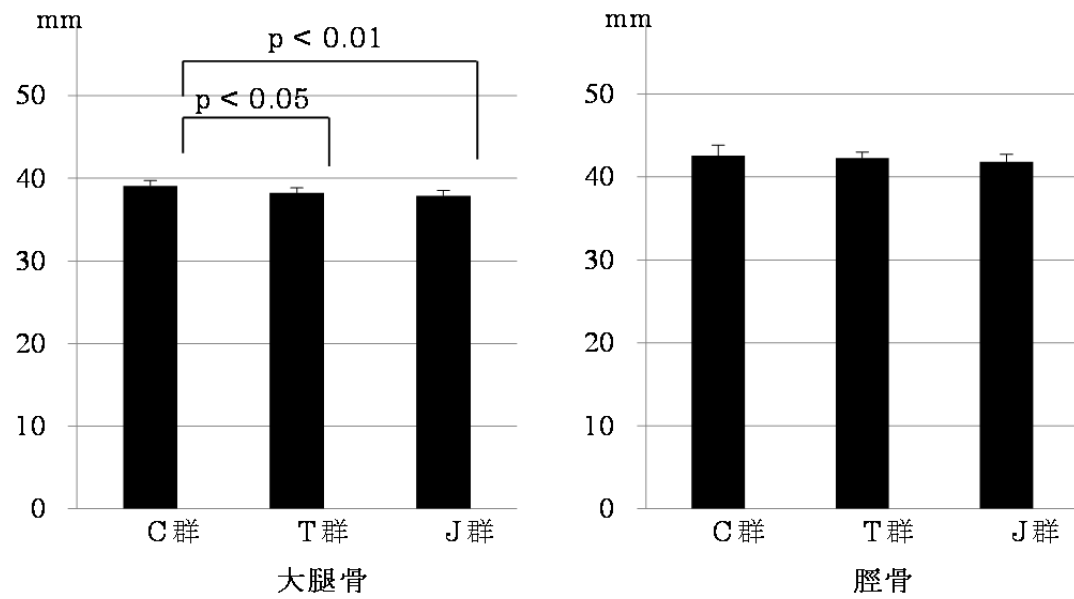


図3 骨長

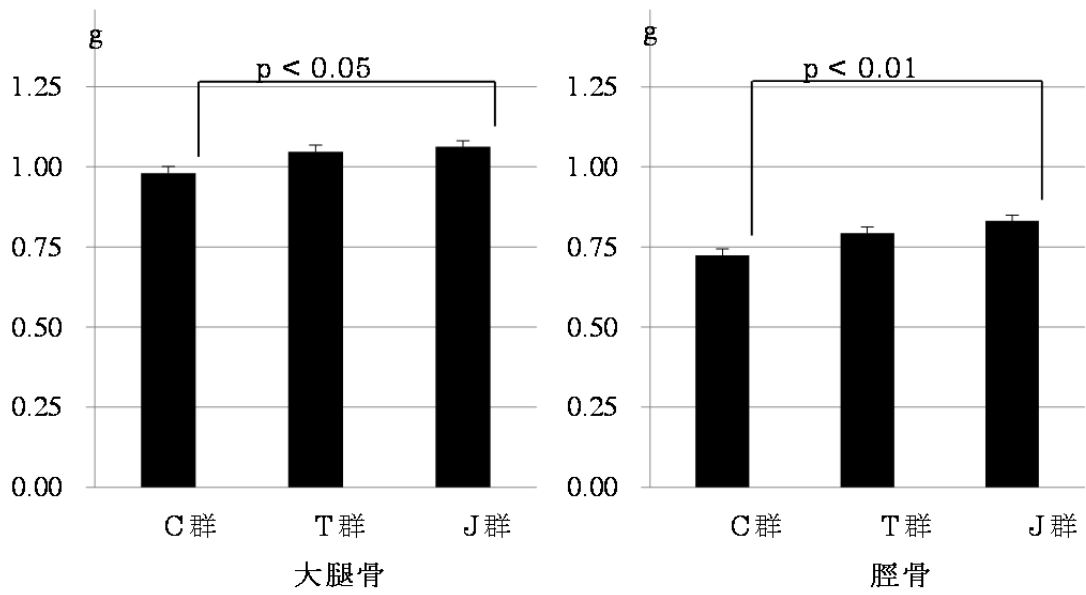


図4 湿骨重量

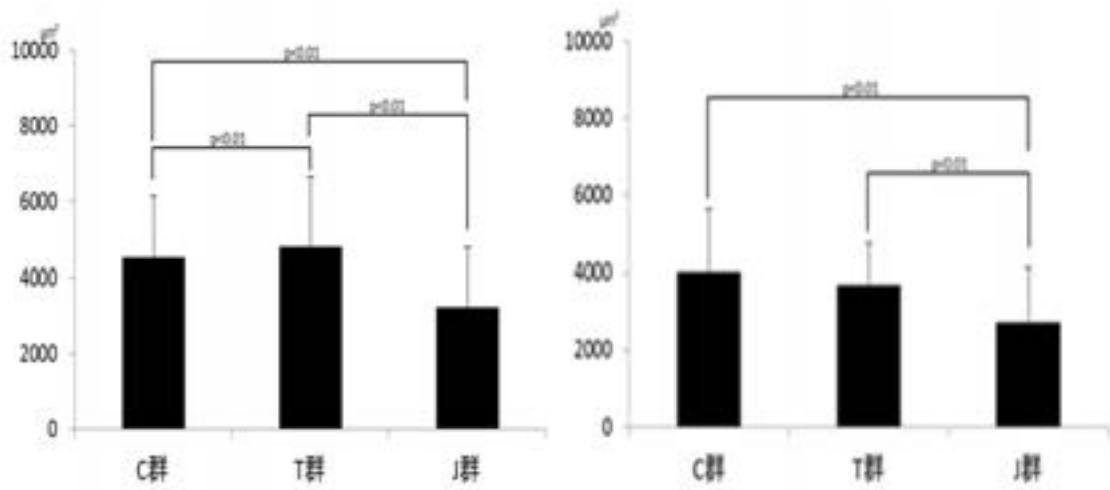


図5 ヒラメ筋横断面積 (左; Type I 繊維, 右; Type II 繊維)

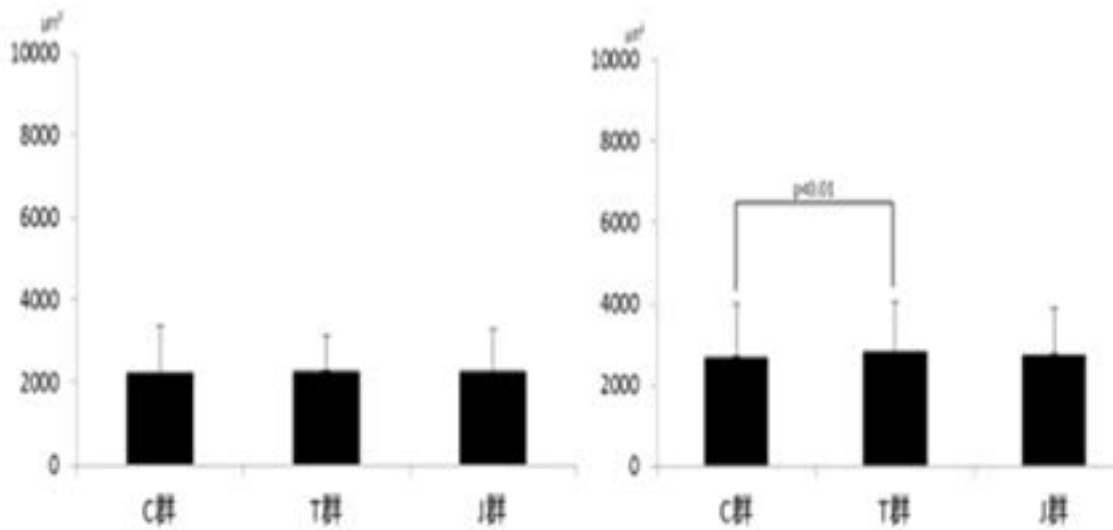


図6 足底筋横断面積 (左; Type I 繊維, 右; Type II 繊維)



高値を示し、J群は28.6%有意に低値を示した（何れも  $p < 0.01$ ）。T群に比べてJ群は33.1%有意に低値を示した（ $p < 0.01$ ）。一方、Type II線維横断面積はC群（ $4017.9 \pm 1626.8 \mu\text{m}^2$ ） $>$  T群（ $3700.2 \pm 1065.0 \mu\text{m}^2$ ） $>$  J群（ $2727.0 \pm 1398.9 \mu\text{m}^2$ ）の順であった。C群に比べてJ群では32.1%有意に低値を示し、T群に比べてJ群では26.3%有意に低値を示した（何れも  $p < 0.01$ ）。

#### 6. 足底筋横断面積（図6）

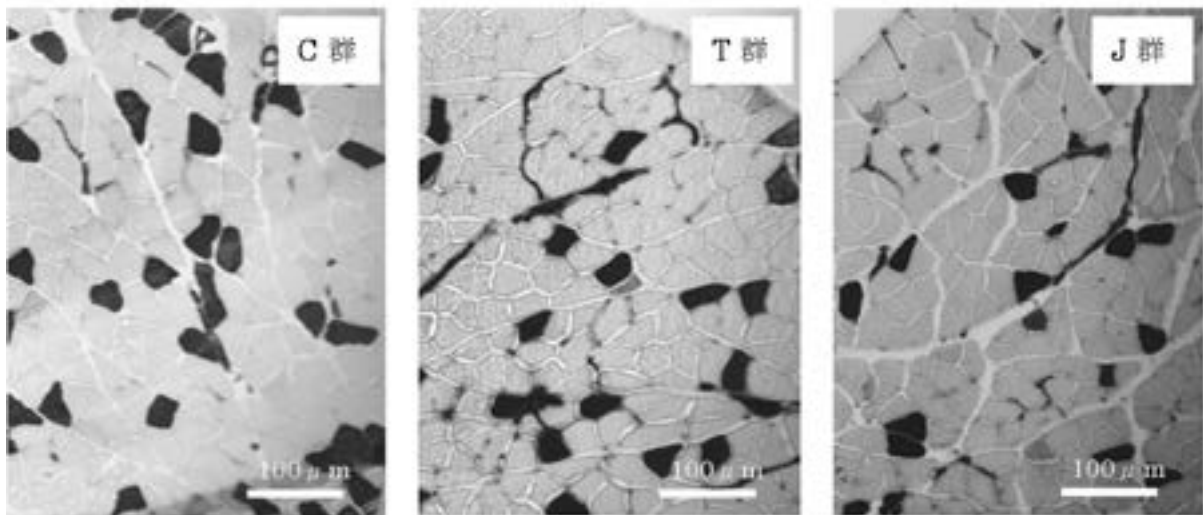
Type I線維の横断面積はT群（ $2287.6 \pm 848.7 \mu\text{m}^2$ ） $>$  J群（ $2267.6 \pm 1025.6 \mu\text{m}^2$ ） $>$  C群（ $2245.9 \pm 1332.0 \mu\text{m}^2$ ）の順であった。一方、Type II線維の横断面積はT群（ $2815.5 \pm 1214.2 \mu\text{m}^2$ ） $>$  J群（ $2745.2 \pm 1140.8 \mu\text{m}^2$ ） $>$  C群（ $2684.6 \pm 1294.0 \mu\text{m}^2$ ）の順であった。C群に比べてT群は4.9%有意に上昇した（ $p < 0.01$ ）。

#### IV. 考察

##### 1. 酸化ストレス・抗酸化能について

酸化ストレスについては、C群に対してJ群のみで有意な増加がみられた。運動負荷による酸化ストレスに及ぼす影響は、運動内容や運動時間などに大きく依存するとされている。また、酸化ストレスは、最大酸素摂取量の70～80%程度の運動強度まで増加を認めないとの報告<sup>22)</sup> や予測最大心拍数の50%未満の低強度運動は酸化ストレスに変化がないことが<sup>23)</sup> 報告されている。このことから、T群では前述した運動強度の範囲内であったことが考えられ、今回設定したJ群の運動は負荷が最大酸素摂取量の70～80%程度の運動強度の範囲を超えた負荷量であったことが考えられた。一方、抗酸化能については、成長期と成体期の3群間の比較では、それぞれで有意な差はみられなかった。このことから、運動強度や運動時間、運動内容によっては抗酸化ストレス作用を

#### <ヒラメ筋>



#### <足底筋>

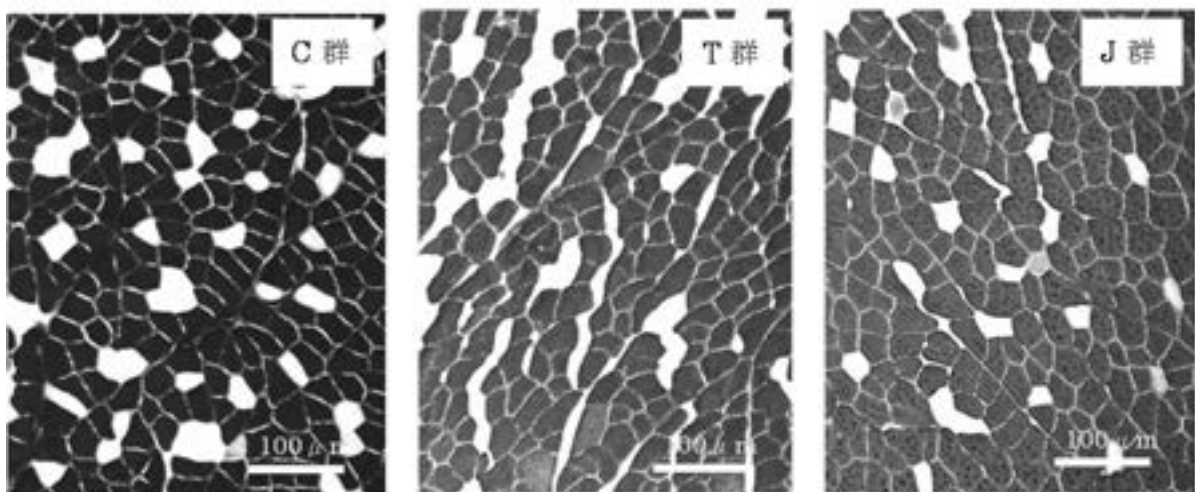


図7 顕微鏡標本（淡染；Type I 繊維，濃染；Type II 繊維）

凌駕して、酸化ストレスは増加する可能性が推察された。特に骨格筋の発達が著しい成長期において跳躍のような無酸素運動は、身体に対する負荷が強く、骨格筋のダメージが大きくなり酸化ストレスの増加に関与していることが考えられた。

今回の実験から、成長期における無酸素運動では運動により生体へのダメージが大きくなっていることが考えられることから、成長期における運動では、運動の様式、負荷量について十分配慮し実施される必要性が考えられた。また、酸化ストレスに対する抗酸化能の働きは、運動の際にどの段階で最大となるのか、どの程度持続するかについては、今後の課題である。

## 2. 骨形態・筋組織の変化について

成長期からの異なるメカニカルストレス様式が骨・筋組織に及ぼす影響について検討し、以下の結果が得られた。成長期からの運動負荷群の大腿骨骨長は、対照群に比べて有意に短かった。成長期における強い運動負荷は骨量増加や骨強度の向上に寄与する。そして、ヒラメ筋 Type I 線維では T 群が C 群より筋線維横断面積が有意に高値を示し、J 群が C 群より有意に低値を示した。足底筋の Type II 線維では T 群が C 群より高値を示した。

成長期における過度な運動負荷は骨長の発育（骨重量や形態）抑制に大きく影響することが示唆された。つまり、適度な負荷量の有酸素運動は骨発育を活性させるが、過度な負荷量の無酸素運動は骨発育の抑制作用に働くことが考えられた。運動は筋組織の細胞内蛋白質の破壊など筋の損傷を誘発させ、筋衛星細胞などにより再生過程を通して修復される。いわゆる損傷した細胞の修復の繰り返す過程で、筋線維は筋肥大を引き起こす。筋組織の損傷から再生への形態的再構築や機能的改善については、筋発生時と類似した過程と既存の筋線維への融合を経て約 1 ヶ月後に回復することが知られている<sup>24)</sup>。本結果の T 群では、このような経過により筋肥大がみられたものと考えられるが、一方で、運動強度が高かった J 群の筋横断面積の減少が認められた。これは強運動負荷による筋の損傷が拡大していること、また筋線維の回復に必要な回復期間に達していない可能性が考えられた。つまり、成長期からの過度な運動負荷では、筋の損傷が起きやすく、再生過程にある筋線維が多くなるため筋横断面積が減少したことが考えられた。したがって、筋肥大を目的とする運動負荷には、筋線維への刺激の大きさとともに運動による損傷からの回復時間を考慮した運動負荷が必要であることが考えられた。

## V. 文献

- 1) Fisher-Wellman K, Bloomer RJ : Acute exercise and oxidative stress : a 30 year history. *Dyn Med*, 8, 1, 2009
- 2) 江口裕伸, 藤原範子, 大河原知水ら : 酸化ストレスと健康. *生物試料分析*, 32 (4), 247-256, 2009
- 3) 大石修司, 松岡健, 大野秀樹 : 運動と酸化ストレス. *日本運動生理学雑誌*, 8 (2), 73-83, 2001
- 4) 内藤裕二, 吉川敏一 : 酸化ストレス度の項目と評価. *治療*, 85 (8) : 2433-2436, 2003
- 5) 佐藤英介, 井上正康 : 運動と活性酸素 - その基礎的知見. *臨床スポーツ医学*, 23 (1), 7-11, 2006
- 6) RADAK Zsolt, OGONOVSKYI Helga, W. TAYLOR Albert, et al : Exercise-induced Alteration of Oxidative DNA Damage. *Advances in Exercise and Sports Physiology*, 7 (2), 43-46, 2001
- 7) 丸岡弘, 小牧宏一, 井上和久 : 心肺運動負荷試験が酸化ストレス度に及ぼす影響について. *日本臨床生理学雑誌*, 35 (5), 283-288, 2005
- 8) 丸岡弘, 小牧宏一, 井上和久 : 運動負荷が酸化ストレス度に及ぼす影響について - 異なる運動強度による検討 -. *心臓リハビリテーション*, 13 (2), 384-387, 2008
- 9) 井上航, 廣瀬昇, 奥壽郎 : 短時間における多段階運動負荷前後の酸化ストレス変化. *臨床福祉ジャーナル*, 9, 45-49, 2012
- 10) 河村孝幸, 石田篤子, 金澤雅之ら : 日常生活における中等度以上の活動頻度および活動継続時間の特徴と運動耐容能の関係. *心臓リハビリテーション*, 14 (1), 119-122, 2009
- 11) 沖田孝一 : 運動と酸化ストレス. *医学のあゆみ*, 218 (1), 105-110, 2006
- 12) 大野秀樹, 中野法彦, 桜井拓也ら : 運動と活性酸素 - 人体におけるその代謝と疾病. *臨床スポーツ医学*, 23 (1), 13-18, 2006
- 13) 三村邦裕, 小林隆志, 水越聡子 : 生活習慣によってもたらされる酸化ストレス定量化に関する検討. *臨床病理*, 55 (1), 35-40, 2007
- 14) 畑山知子, 長野真弓, 大貫宏一郎 : 健常成人の酸化ストレスおよび抗酸化力と生活習慣および血液指標との関連. *日本未病システム学会雑誌*, 14 (1), 6-11, 2008
- 15) 永田勝太郎, 長谷川拓也, 広門靖正ら : 生活習慣病と酸化ストレス防御系. *心身医学*, 48 (3), 177-183, 2008
- 16) Ambrose JA, Barua RS : The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease : an

- update. J Am Coll Cardiol, 43 (10) , 1731-1737, 2004
- 17) 山崎敦：各筋線維のタイプ分類. Clinical Physical Therapy, 6, 31-34, 2003
- 18) 伊藤一生：ラット骨格筋線維に及ぼす持久性トレーニングの影響に関する組織化学的研究. 体力科学, 30, 157-166, 1981
- 19) Costil DL, Coyle EF, Fink WF, et al : A Adaptations in skeletal muscle following strength training. J Appl Physiol, 46, 96-99, 1979
- 20) T.H. Huang, S.C. Lin, F. L. Chang, et al : Effects of different exercise modes on mineralization structure and biomechanical properties of growing bone. J Appl Physiol, 95, 300-307, 2003
- 21) Yoshihisa Umemura, Toshihiro Ishiko, Kayo Sakurai, et al : Structural and mechanical adaptations of the limb bones to jump training in rats. The Japanese Journal of Physical Fitness and Sports Medicine, 45, 311-318, 1996
- 22) Dekkers JC, van Doornen LJ, Kemper HC : The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. Sports Med, 21 (3) , 213-238, 1996
- 23) Finaud J, Lac G, Filaire E : Oxidative stress : relationship with exercise and training. Sports Med, 36 (4) , 327-358, 2006
- 24) 新藤恵一郎：筋線維の増生と再生. リハビリテーション医学, 41, 313-323, 200