

運動による血漿 Cu 濃度及び赤血球 SOD 活性の変動

徳田 修司・松原 恵理*・山田 博久**

(2002年10月15日 受理)

Changes in Plasma Cu Concentration and Erythrocyte SOD Activity due to Aerobic Bicycle Exercise

TOKUDA Shuji, MATSUBARA Eri, YAMADA Hirohisa

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of transient aerobic exercise on plasma Cu concentration and erythrocyte SOD (superoxide dismutase) activity in human male subjects. Nine male subjects performed 30 minutes of aerobic exercise on a bicycle ergometer at a 120beats/min heart rate. Plasma Cu concentration and erythrocyte SOD activity were measured before, immediately after, and 30 min. after the exercise. The results were as follows : 1) Plasma Cu concentration levels found before exercise were slightly increased immediately after exercise, and had returned to pre-exercise value 30min. after the exercise. Plasma Cu concentration in untrained subjects was slightly higher than that of trained subjects after exercise (N.S.). 2) Erythrocyte SOD activity had increased by 30min. after exercise. Erythrocyte SOD activity in untrained subjects had lowered in comparison with those of trained subjects 30min. after exercise (N.S.). 3) There were highly significant correlations between plasma Cu concentration and erythrocyte SOD activity at pre-exercise values. 4) Significant change in plasma NO concentration was not observed because of violent variations among subjects. These results indicate that regular aerobic exercise may induce enzymatic adaptation with high SOD activity and protect the oxidation by superoxide radicals. Therefore, supplementation of trace-element (Cu) seems to be important for trained subjects.

Keywords : aerobic exercise, plasma Cu concentration, plasma SOD activity

* 鹿児島大学教育学部教育学研究科

** 鹿児島大学教育学部研究生

I はじめに

健康な体を維持するために、運動を適切に行うことは重要であり、とりわけ生活習慣病予防対策には効果が期待されている。しかし一方では、激しい運動による活性酸素種の有害性が指摘され、活性酸素種消去系と運動との関係について多くの研究が進められている。

活性酸素種にはフリーラジカルである O_2^- 、 OH^- や H_2O_2 、 OCl^- 、 NO 、 LOO などがあり^{1) 2)}、酸素摂取量が増加した運動時には当然これらの活性酸素種は増加していると考えられる。発生した活性酸素種は、容易に脂質を過酸化し、その結果過酸化脂質を生成する。過酸化脂質は、細胞膜を壊し、さらに DNA 塩基を損傷し、タンパクを酸化分解すると考えられている²⁾。これらのことから多くの疾病の発生に活性酸素種が関与していることが推測される³⁾。しかし、生体内ではこれらの活性酸素種を消去するシステムが備わっており、これらのバランスをうまく調節することにより健康を維持していると考えられている。

活性酸素の消去系いわゆる抗酸化機構の抗酸化酵素には、最上流に SOD があり、続いて GSH-px とカタラーゼがあり、抗酸化物質といわれるものにビタミン C や E がある。

昨年、著者ら⁴⁾は、心拍数120拍/分レベルの有酸素性自転車運動による血漿中の過酸化脂質と GSH-px 活性について検討した結果、定期的な有酸素性の運動を行っている被検者では血中の GSH-px の活性が高くなっており、血中過酸化脂質の増加が抑えられ GSH-px 活性の運動適応が見られることを報告した。Kretzschmar ら⁵⁾は、GSH-px 活性は年齢により減少するが運動により代償性に活性を維持すると述べ運動による老化の予防に抗酸化系からの有効性を示唆している。

抗酸化機構の最上流に位置する SOD は、いろいろな原因で生じたスーパーオキシドラジカル (O_2^-) を捕捉し、 H_2O_2 に変換する反応を触媒する金属酵素であり、3つのアイソザイムが知られている。CuZn-SOD は細胞質に存在、Mn-SOD はミトコンドリアに局在、EC-SOD は、細胞外に存在していることが知られている^{2) 3)}。赤血球や筋肉、肝臓などの組織をもちいた SOD 活性と運動との関係についての研究は多く⁷⁾、酸素摂取量や過酸化脂質などとの関係について検討され⁵⁾、定期的な運動によって活性が高くなり、運動への適応を示すことが知られている。

赤血球の主な働きは、 O_2 を運搬することであり、ヘモグロビンの Fe が酸化されたり水素イオンの変動などにより多量の活性酸素種の発生が考えられる。そのために赤血球の内部は抗酸化能が高く保たれているものと推測され、運動による赤血球 SOD 活性は変動が見られない²⁾ という報告や有意に活性が上昇するという報告もある¹³⁾。

本研究では、有酸素運動と赤血球 SOD 活性および血漿中の Cu 濃度との関係を明らかにするために、心拍数を可能な限り120拍/分に保ちながら30分間の自転車運動を行い、その前後で一過性の運動の影響及び日頃の運動習慣との関連について検討した。また、一部のサンプルで NO の血中濃度の測定を試みた。

II 実験の方法

1. 被検者

被検者は、平均年齢29.4歳（18～53歳）、平均身長168.5cm（165.0～177.0cm）、平均体重65.4 kg（53.0～75.0kg）の健康な男子9名であった。これらの9人の被検者は、4人が日頃あまり運動をしていないグループ（Untrained）で5人が定期的に運動をしているグループ（Trained）に分かれた。二つのグループのBMIは、それぞれ 24.2 ± 0.71 と 22.1 ± 2.48 であった。

被検者には本実験の内容について説明し、被検者となることの同意を得て参加してもらった。

2. 運動負荷と負荷強度

運動の負荷は、モナーク社の自転車エルゴメータを用い、1分間に60回転のスピードで平均心拍数が1分間に120拍を維持するように設定した。運動中の心拍数の計測は、POLAR社のパルスモニターを用いて5分毎に計測した。自転車運動時間は、30分とした。

3. 採血と測定項目および測定方法

材料：血液の採取は、運動を始める前15～20分間の安静後の運動前安静時、30分の自転車運動直後、および運動終了後30分の計3回、椅座位にて前腕正中皮静脈より行った。抗凝固剤としてヘパリンを用いた。血液は、速やかに血漿を分離し、buffy coatを取り除いた。血漿と赤血球部分は、測定まで -80°C に保存した。測定時に蒸留水400 μl に赤血球100 μl を溶解し、アルコール/クロロホルムで抽出して測定した。

測定項目：血漿中Cu（銅）濃度、赤血球SOD（スーパーオキシドディスムターゼ）活性、血漿中NO（一酸化窒素）濃度であった。

測定方法：血漿中Cu濃度は、結合状態のCuを酸性下に遊離させ、還元剤（アスコルビン酸）で Cu^{+} に還元し、キレート化合物をつくり発色させて比色定量する(株)シノテスト社（日本）のキット「Cuダイレクトシノテスト」を使って測定した。赤血球SOD活性は、Oxis Resarch社(U. S. A.)の測定キットBioxytech SOD-525（比色法）により島津製の分光光度計を用いて525nmにて比色定量した。

NO濃度は、Bio Dynamics Laboratory社(U. S. A.)の測定キットNitrate / Nitrite Colorimetric Assay Kitを用いて行った。

4. 結果の統計処理

有意差の検定は、一元分散分析を行い、危険率5%をもって有意水準とした。図中のデータは、運動負荷強度と心拍数が平均値 \pm 標準偏差（Mean \pm SD）、その他は平均値 \pm 標準誤差（Mean \pm SE）で示した。

Ⅲ 結果

1. 運動の負荷強度と心拍数の推移

① 運動負荷強度の平均の推移を Fig 1 に示す。

被検者 9 人の平均負荷強度は、運動開始 5 分目に 1.56 ± 0.28 kp, 10 分目に 1.54 ± 0.33 kp, 15 分目に 1.51 ± 0.32 kp, 20 分目に 1.51 ± 0.32 kp, 25 分目に 1.53 ± 0.28 kp, 30 分目に 1.47 ± 0.30 kp であった。

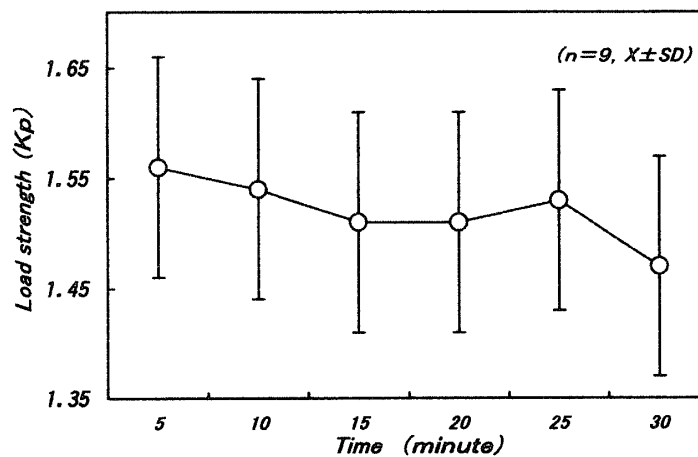


Fig 1 Changes in work load during 30min. bicycle ergometer exercise

② 運動時の平均心拍数の推移を Fig 2 に示す。

被検者 9 人の平均心拍数は、安静時に 70.4 ± 18.3 拍, 運動開始 5 分目に 119.3 ± 5.7 拍, 10 分目に 122.2 ± 4.2 拍, 15 分目に 121.3 ± 1.9 拍, 20 分目に 122.2 ± 2.2 拍, 25 分目に 121.9 ± 1.4 拍, 30 分目に 123.8 ± 2.7 拍, 運動終了後 30 分に 67.1 ± 10.6 拍であった。

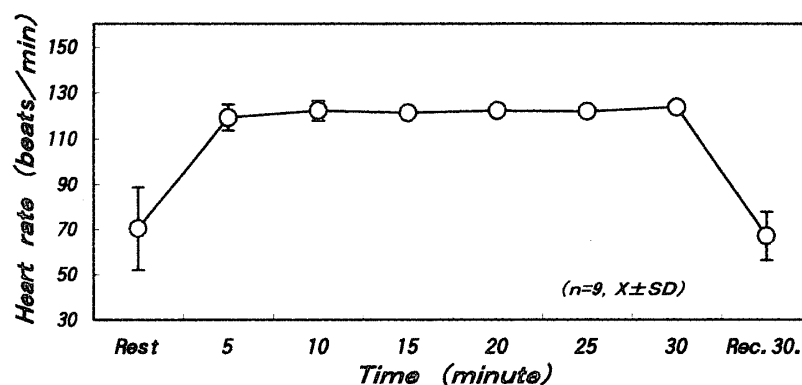


Fig 2 Changes in heart rate during 30min. bicycle ergometer exercise

2. 血漿 Cu 濃度の変動

Fig 3 に血漿中の Cu 濃度の変動を示す。

被検者 9 人の平均値 (Total) では運動前の安静値 $111.5 \pm 7.9 \mu\text{g}/\text{dl}$, 運動の直後に $124.2 \pm 29.6 \mu\text{g}/\text{dl}$, 運動後30分で $113.9 \pm 25.3 \mu\text{g}/\text{dl}$ であった。被検者を日頃定期的に運動している 5 人 (Trained 群) と日頃ほとんど運動しない 4 人 (Untrained 群) に分けて示すと Trained 群

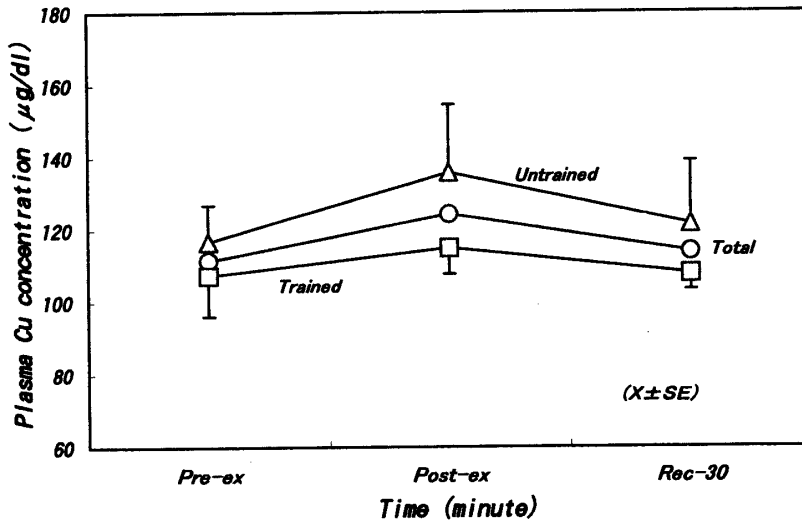


Fig 3 Changes in plasma Cu concentration during 30min. bicycle ergometer exercise

は, 運動前の安静値 $107.3 \pm 11.3 \mu\text{g}/\text{dl}$, 運動の直後に $114.9 \pm 7.2 \mu\text{g}/\text{dl}$, 運動後30分で $107.8 \pm 4.5 \mu\text{g}/\text{dl}$, Untrained 群は, 運動前の安静値 $116.7 \pm 10.1 \mu\text{g}/\text{dl}$, 運動の直後に $135.7 \pm 18.8 \mu\text{g}/\text{dl}$, 運動後30分で $121.5 \pm 17.5 \mu\text{g}/\text{dl}$ であり運動直後に高くなる傾向であった。統計的に有意差が認められなかった。

3. 赤血球 SOD 活性の変動

Fig 4 に赤血球 SOD 活性の変動を示す。

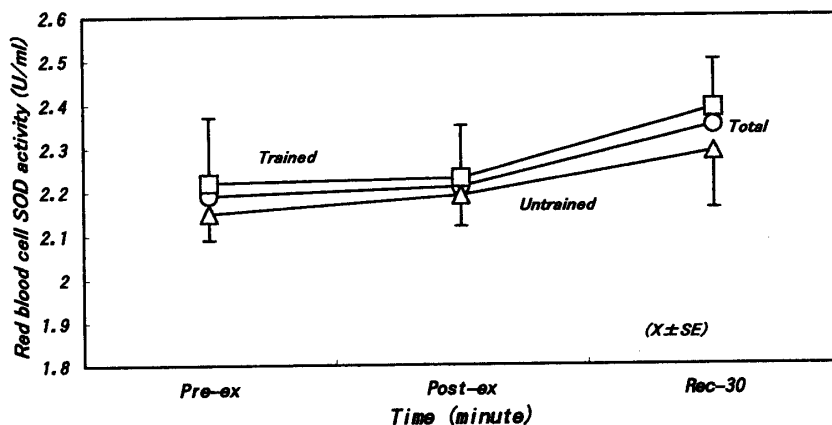


Fig 4 Changes in erythrocyte SOD activity during 30min. bicycle ergometer exercise

全被検者の平均値 (Total) では運動前の安静値 $2.19 \pm 0.086 \text{ U}/\text{ml}$, 運動の直後に $2.21 \pm 0.073 \text{ U}/\text{ml}$, 運動後30分で $2.35 \pm 0.087 \text{ U}/\text{ml}$ となり運動後30分で安静値に比べ高くなる傾向であった。被検者を日頃定期的に運動している 5 人

(Trained 群) と日頃ほとんど運動しない 4 人 (Untrained 群) に分けて示すと Trained 群は、運動前の安静値 $2.22 \pm 0.15 \text{U/ml}$ 、運動の直後に $2.23 \pm 0.12 \text{U/ml}$ 、運動後30分で $2.39 \pm 0.11 \text{U/ml}$ 、Untrained 群は、運動前の安静値 $2.15 \pm 0.06 \text{U/ml}$ 、運動の直後に $2.19 \pm 0.07 \text{U/ml}$ 、運動後30分で $2.29 \pm 0.13 \text{U/ml}$ であり、いずれも運動後30分に安静値より高くなる傾向であったが統計的には有意な差ではなかった。また Trained 群の方が Untrained 群より高かった。

4. 血漿 Cu 濃度と赤血球 SOD 活性との関係

Fig 5 に運動前、安静時の血漿 Cu 濃度と赤血球 SOD 活性の相関を示す。

全体の相関係数は $r=0.768$ 、Trained 群は $r=0.864$ 、Untrained 群は $r=0.687$ で、Trained 群は、血漿 Cu 濃度と赤血球 SOD 活性の間に高い相関関係が認められた。

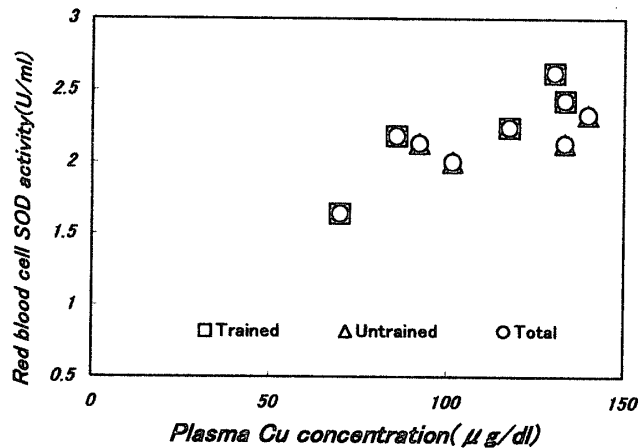


Fig 5 Relation between erythrocyte SOD activity and plasma Cu concentration

5. 血中 NO 濃度

血中の NO 濃度は、ランダムに選んだ 4 人の被検者の血漿において測定した。運動前値が平均で $9.02 \mu\text{M}$ 、運動直後に $8.67 \mu\text{M}$ 、運動後30分で $9.05 \mu\text{M}$ であったが個人間の差が大きかった。

IV 考察

本実験で負荷した運動は、Fig 2 からわかるように心拍数がほぼ 120 拍/分に保持されており定常状態が維持できていた。負荷強度は、被検者が Trained 群と Untrained 群に分けられ日頃の運動経験が自転車の負荷強度に反映され個人間でのばらつきが大きかったと考えられる。

血漿中の Cu は、銅が胆汁を通じて排泄されるため、肝内・肝外の胆汁分泌異常や胆汁性の肝機能異常で高値を示すと言われ、臨床検査の項目ともなっている。本研究では SOD に 3 種類があり、

細胞質に存在する CuZn-SOD との関係を検討するために測定した。

Suttle ら⁸⁾は、実験的に低 Cu モデルを作り、サプリメントとして Cu と Se を与え、著明な赤血球中の SOD および GSH-px 活性の上昇を認めた。これらのことから血漿中の Cu 濃度のレベルが赤血球中の SOD 活性に関与することが推測される。今回の結果は、Trained 群に安静値における血漿 Cu 濃度と赤血球 SOD 活性との間に高い相関関係が見られた。運動の影響については運動後に SOD 活性は上がる傾向を示すが血漿中の Cu 濃度はむしろ低くなる傾向であった。統計的に有意な差ではなかった。

この運動後の血漿 Cu 濃度の変動は、運動中の発汗による脱水で血液濃縮が起こったことも考えられる。今回発汗は観察できたが、血液の濃縮については検討しなかったので明確には言及できない。

運動後に SOD 活性が上がる傾向が示されたが、一方 Trained 群については血漿 Cu 濃度の低下がみられ、運動後30分の間は水分の補給をしていないことから血液の濃縮が生じていたとしても、血漿から赤血球内への Cu のシフトなど何らかの関係があるのかもしれない。Cordova ら⁹⁾は、運動による血漿 Zn の動態について検討し、持久性のトレーニングを慢性的に行っている運動選手たちは運動しない人たちと比べて血漿 Zn レベルが低いことを報告し、骨格筋中の Zn レベルも低下し疲労しやすく、免疫機能も変わってしまうことを示唆している。今回 Zn レベルの測定はしなかったが Cu と Zn を活性基に持っている SOD はどちらか一方でも何らかの影響を受けると活性に変化が起こることも考えられる。

Robertson ら¹⁰⁾は定期的な身体運動と抗酸化機構について栄養を含む広い角度から調査研究した結果について報告し、血中の抗酸化系を改善するには運動と抗酸化酵素の補助因子としての抗酸化ビタミン (C, E) や必須微量元素 (Se) の食事からの摂取の両方が重要であることを示唆している。SOD は、Cu, Zn, Mn などの微量元素を必要とし、これらは主に毎日の食事またはサプリメントから補わなければならない。

定期的な持久性のトレーニングにより様々な血中の抗酸化系は活性化する^{11) 12) 13) 14)}。しかし、運動強度の違いや栄養状態の管理の違いなどのために必ずしも一定の知見が得られていない。このような状況の中でいわゆる抗酸化物質と言われるビタミン C や E, Q などの重要性は、別の視点から注目され、運動単独でなく栄養化学の成果をとり入れた広い視野からの捉え方が重要である^{10) 14)}。

Toshinai ら¹⁵⁾は、血中の抗酸化系について運動強度と時間について検討し、抗酸化系の活性化には最大酸素摂取量の60%以上の運動強度と10分以上の運動時間の両方が必要であると述べている。

Mena ら¹³⁾は、自転車運動でプロの選手並みのトレーニングで赤血球中の SOD, GSH-px, カタラーゼなどの活性が増加すると述べ、トレーニングを中止すると比較的簡単に元のレベルに戻ること示唆している。本実験においても日頃から定期的に有酸素運動を行っている被検者の方が一過性の運動に対し、日頃運動しない被検者に比べ、SOD 活性が高くなる傾向であった。このことは定期的に運動刺激を与えることの重要性を示唆している。

最近NO（一酸化窒素）が活性酸素と並んで注目を集めている。NOは、L-アルギニンから血管内皮細胞で生成され、平滑筋を弛緩させ、血管抵抗を下げたり、発生したスーパーオキシドラジカルを補足するなど運動との関連が注目されている。持久性トレーニングでNO合成酵素活性が高くなった¹⁶⁾り、血管内皮細胞でのNOの生成が増大¹⁷⁾することが知られており、NOの知られている限りでの働きから運動による適応が見られると推察される。本実験では運動直後には血中NO濃度はやや低下する傾向で運動の30分後には安静レベルにもどっていた。今回の一部の測定結果ではデータのばらつきが大きく確かなことはいえないが、特にサンプルの前処理や測定方法の的確な選択など十分な配慮により安定した結果が得られると考えている。

V 総括

健康な男子9人の被検者を用い、心拍数120拍/分を維持して30分間の自転車運動を行わせ、運動の前と直後および30分後の血漿中Cu濃度と赤血球中のSOD活性、一部の血中NO濃度を測定し、有酸素運動における抗酸化酵素および関連物質の変動について検討した。被検者は、日頃定期的に運動をしているTrained群とUntrained群に分けられたので両群の比較検討も行った。その結果、次のような結論を得た。

- 1) 血漿Cu濃度は、運動直後に安静値よりわずかに高くなり運動後30分には安静レベルに下がった。Untrained群の方がTrained群より血漿Cu濃度は高い傾向が見られた。しかし、統計的には有意ではなかった。
- 2) 赤血球中のSOD活性は、運動直後に変動はなく、運動後30分に増大する傾向であった。この傾向は、Trained群もUntrained群も同じであった。また、Untrained群の方がTrained群より赤血球中のSOD活性は低い傾向が見られた。統計的有意性はなかった。
- 3) 安静時の血漿中Cu濃度と赤血球中SOD活性の間に高い相関関係がみられ、とりわけTrained群において高かった。
- 4) 一部（4人）の血漿で測定したNO濃度は、運動後に低下し、30分後に増加したがSDが大きく個人間の差が大きかった。

以上の事から、日頃定期的に有酸素運動を実施していると一過性に運動をしても有酸素運動に適応した抗酸化酵素の働きにより活性酸素の攻撃を防御できるようになるものと推測される。また、抗酸化酵素に必要な必須微量元素であるCu, Zn, Mnなどは運動により少なくなる可能性が示唆され、食事やサプリメントから補う必要性があるものと考えられる。

参考文献

- 1) 大野秀樹, 大石修司, 長澤純一, 木崎節子 (1995): スポーツとフリーラジカル からだの科学増刊 52 ~57

- 2) 大野秀樹, 跡見順子, 伏木 亨 (1998) : 活性酸素と運動 杏林書院
- 3) 大柳善彦 (1990) : 活性酸素と病気 化学同人
- 4) 徳田修司, 山田博久, 奥 保宏 (2002) : 運動による血中脂質及び GSH-px 活性の変動
鹿児島大学教育学部研究紀要 53, 45~52
- 5) 森河亮, 稲水惇, 小笠原忍 (2000) : 運動がスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) と血中過酸化脂質に及ぼす影響 臨床スポーツ医学 17(11), 1372~1376
- 6) Kretzschmar M and Muller D (1993) : Aging, Training and Exercise A Review of Effects on Plasma Glutathione and Lipid Peroxides. *Sports Medicine* 15(3), 196~209
- 7) 荒尾孝, 青木和江, 峰岸由紀子, 永松俊哉 (1990) : 急性遊泳運動負荷がラット血清及び組織中の過酸化脂質と組織 SOD 活性に及ぼす影響 体力研究 76, 43~51
- 8) Suttle NF, Jones DG, Woolliams C and Woolliams JA (1987) : Heins body anaemia in lambs with deficiencies of copper or selenium. *Br J Nutr* 58(3), 539~548
- 9) Cordova A and Alvarez-Mon M (1995) : Behaviour of zinc in physical exercise: A special reference to immunity and fatigue. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 19(3), 439~445
- 10) Robertson JD, Maughan RJ, Duthie GG and Morrice PC (1991) : Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clinical Science* 80, 611~618
- 11) Evelo CTA, Palmén NGM, Artur Y and Janssen (1992) : Changes in blood glutathione concentration, 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
- 12) Ohno H, Yahata T, Sato Y, Yamamura K and Taniguchi N (1988) : Physical training and fasting erythrocyte activities of free radical scavenging enzyme system in sedentary men *Eur J Appl Physiol* 57, 173~176
- 13) Mena P, Maynar M, Gutierrez JM, Maynar J, Timon J and Campill JE (1991) : Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. Adaptation to training. *Int J Sports Med* 12(6), 563~566
- 14) Jan Karlsson (1994) : Antioxidants and Exercise. *Human Kinetics*
- 15) Toshinai K, Ohno H, Bae SY, Iwashita T, Koseki S and Haga S (1998) : Effect of different intensity and duration of exercise with the same total oxygen uptake on lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in human plasma. *Adv Exerc Sports Physiol* 4(2), 65~70
- 16) Sun D, Huang A, Koller A, et al (1994) : Short term daily activity enhances endothelial NO synthesis in skeletal muscle arterioles of rats. *J Appl Physiol* 76, 2241~2247
- 17) Jungerstein L, Ambring A, Wall B, et al (1997) : Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *J Appl Physiol* 82, 760~764