

2014 年度 修士論文

水素摂取が一過性持久運動時の酸化ストレスに及ぼす影響

The effect of molecular hydrogen (H<sub>2</sub>) on oxidative stress  
caused by acute endurance exercise in rats

早稲田大学大学 大学院スポーツ科学研究科

スポーツ科学専攻 身体運動科学研究領域

5013A025-5

河村 拓史

Kawamura, Takuji

研究指導教員： 村岡 功 教授

## 目次

第1章 緒言	1
第2章 文献考証	4
2.1. 酸化ストレスとその指標	4
2.2. 一過性運動と酸化ストレス	5
2.3. 一過性運動の酸化ストレスに対する抗酸化サプリメント摂取の効果	7
2.4. 抗酸化物としての水素	9
第3章 本研究の目的と研究課題	17
3.1. 本研究の目的	17
3.2. 実験1. 水素摂取が中強度運動時の酸化ストレスに及ぼす影響	17
3.3. 実験2. 水素摂取が低強度長時間運動時の酸化ストレスに及ぼす影響	34
第4章 総括と今後の課題	47
参考文献	50

< 図一覧 >

Fig. 2-1. The generation of reactive oxygen species.....	12
Fig. 2-2. Definition of the oxidative stress.....	13
Fig. 2-3. Markers of oxidative stress.....	14
Fig. 2-4.	
The generation of reactive oxygen species in skeletal muscle during exercise.....	
.....	15
Fig. 2-5. The effect of molecular hydrogen on reactive oxygen species.....	16
Fig. 3-1. Dissolved hydrogen concentration.....	25
Fig. 3-2. Plasma TBARS.....	26
Fig. 3-3. Muscle TBARS.....	26
Fig. 3-4. SOD activity.....	27
Fig. 3-5. GPX activity.....	27
Fig. 3-6. Plasma IL-6.....	28
Fig. 3-7. HSP70 content.....	28
Fig. 4-1. Dissolved hydrogen concentration.....	39
Fig. 4-2. Plasma TBARS.....	40
Fig. 4-3. Muscle TBARS.....	40
Fig. 4-4. SOD activity.....	41
Fig. 4-5. GPX activity.....	41
Fig. 4-6. Plasma IL-6.....	42
Fig. 4-7. HSP70 content.....	42

< 表一覽 >

Table3-1. Body weight change in rats.....	25
Table4-1. Body weight change in rats.....	39

## 第1章 緒言

われわれは大気中に約 21%存在する酸素を用いて、様々な生命活動を行うとともに命を生きながらえている。このように、酸素はわれわれにとって不可欠な存在であり、酸素なくしては生命を維持することは不可能である。通常、この酸素は安定した状態で存在しているが、酸素が代謝エネルギーとして利用された場合に、その一部はスーパーオキシド、過酸化水素やヒドロキシラジカルなどの活性酸素を経て水となることが知られている。このように、ミトコンドリアでの呼吸や、白血球による食作用あるいは血液の虚血—再灌流などにおいて発生する活性酸素および不対電子を持つフリーラジカルは、不安定でかつ様々な物質と反応し易い活性化した状態にある。その結果、これらの活性酸素およびフリーラジカルは、食細胞による殺菌やウイルスおよび癌細胞を攻撃するというメリットを有する一方で、細胞膜の脂質、核、タンパク質、酵素などに傷害を与えることで様々な疾病を誘発すると考えられている。

運動時にはその強度に応じて酸素が必要とされ、最大運動時における酸素摂取量は、安静時の 10 数倍(一般人)から 20 数倍(持久的競技者)までに上昇し、活動筋組織では約 100 倍に達する(Sen et al.1995)。また、運動の種類によっては、骨格筋において血流の虚血—再灌流に似た状況が生まれたり、さらには、最大運動時に消化管や腎臓に配分される血液量は安静時の 1/4~1/5 程度までに減少することから、これらの臓器でも虚血—再灌流に似た状況が生まれるとも言える。これらのことから、運動時にはより多くの活性酸素・フリーラジカルが発生すると考えられている。また、運動誘発性筋損傷(Exercise-induced muscle Damage:EIMD)においては、炎症部位に好中球などの炎症性細胞が浸潤することにより、活性酸素の発生量が増加することが明らかにされている(Malech et al.1987)。

一方、生体には活性酸素を消去する仕組みも備わっており、その一つはグルタチオン、ビタミン C およびビタミン E などの抗酸化物であり、もう一つは、スーパーオキシドジス

ムターゼ(SOD)、カタラーゼ(CAT)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)などの抗酸化酵素である。これらは生体内での活性酸素の生成を抑制し、発生した際にはそれを捕捉して連鎖開始反応を防止するというように働いている。一般的に、抗酸化防御系を上回る量の活性酸素が発生した状態は酸化ストレスと定義されており(Sies et al.1985)、運動と酸化ストレスの関係を検討した研究は年々増加の一途を辿っている。

これまでに、長期的な運動トレーニングによって抗酸化防御能を高められることが明らかにされている(Ji et al.2008)。しかしながら、抗酸化防御能が低下した高齢者や低体力者、あるいは、高い抗酸化防御能を有しながらも、さらに高い負荷の運動を行うアスリートには、ビタミンCやビタミンEなどの抗酸化物を多めに摂ることが勧められている。また、抗酸化サプリメントを補助的に摂取することで酸化ストレスを抑制する方策についても検討がなされている。実際に、抗酸化サプリメントが運動誘発性酸化ストレスに及ぼす影響について多くの研究が行われている。

最近になって、Nature Medicine に、水素ガスの摂取により活性酸素を効率的に除去できることが動物実験において報告された(Ohsawa et al.2007)。以来、水素による抗酸化作用が注目されるようになり、水素の有用性に関する論文も数多く発表されるまでになっている。そのほとんどは、抗炎症、抗アレルギー、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病などの疾病に対するものであり、これらの疾病改善において、水素は効果的であることが報告されている。一方、運動時の効果に関する論文は、わずか1編しか存在しない(Aoki et al.2012)。この論文では、水素水の摂取により、運動中の血中乳酸濃度の低下と膝伸展運動時の初期段階でのピークトルクの改善がみられたものの、酸化ストレス傷害マーカーに対する効果は観察されていない。これらのことから、著者らは、水素水の摂取量やタイミングについて、今後更なる研究が必要であると結論付けている。

この研究で使用されたのは水素水であるが、経口的に摂取する水素水の問題点として、大量に飲料するのが困難であること、水素が逃げやすいことなどが挙げられる。これに代

わって、近年では水素発生剤を使用し、水素を経皮的に摂取する方法が模索されている。水素発生剤の特徴は、水素を安定的に長期保存できること、安全で手軽に利用できること、計算通りに水素を生成することができることにある。これを使用することで、水に溶けた水素が主に経皮的に、一部は呼吸によって吸収されることで、水素水飲用に比べ、より多くの水素を生体内に供給することができる。吸収された水素は最も反応性の高いヒドロキシラジカルと反応して水に変換することで、有害な活性酸素を消去すると考えられる。また、水素は、最小の分子で身体の隅々まで届き細胞内に入ることや、拡散性が高く体内に留まらないために副作用がないという特徴を有している (Ohta, 2012)。

## 第2章 文献考証

### 2.1. 酸化ストレスとその指標

活性酸素(Reactive Oxygen Species : ROS)は、反応性の高い酸素種の総称であり、不対電子を帯びたフリーラジカルと、不対電子を帯びないノンラジカルとに分類することができる。また、広義には、活性窒素種(Reactive Nitrogen Species : RNS)を含め、活性酸素・窒素種(Reactive Oxygen and Nitrogen Species)と表記される場合もある。通常、酸素は代謝エネルギーとして利用されるものの、ミトコンドリア内で消費される酸素の一部は、スーパーオキシドとなり一連の生化学的反応を開始させる(Boveris et al.1973)。スーパーオキシドは、過酸化水素、ヒドロキシラジカルを経て最終的には水となって体外に排出される(Fig.2-1)。これらの活性酸素は、安静時においても常時発生しているものの、放射線、大気汚染、薬物、アルコール、重金属、細菌、ウイルス、日光、食品といった要因により発生量が増加することが知られている。

一方で、生体には活性酸素を消去する仕組みも備わっており、それらは非酵素的抗酸化物および酵素的抗酸化物に分類することができる。非酵素的抗酸化物は、グルタチオン、ビタミンC、ビタミンEなどであり、酵素的抗酸化物には、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(CAT)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)などが挙げられる。Siesら(1985)は、これら生体の持つ抗酸化力に対し、酸化促進が優位になり、両者の平衡が崩れることを酸化ストレス(Oxidative stress)と定義している(Fig.2-2)。近年では、活性酸素の発生量増加に伴う分子傷害を含めて酸化ストレスと定義される場合もある(Sies.2007)。

生体の酸化ストレスを判断する測定項目は多岐に亘るが、Powersら(2008)は、酸化ストレス指標を4つのカテゴリーに分類している(Fig.2-3)。一つ目は、活性酸素を直接検出する方法である。活性酸素は反応性が高く寿命が短いため、電子スピン共鳴法(Electrical Spin Resonance : ESR)などの高額な装置を利用しなければ測定することは困難である。二つ目は、グルタチオン、ビタミンC、ビタミンEなどといった生体内の抗酸化物を測定する

方法である。抗酸化物の減少は酸化ストレスを反映するが、これらの指標は食事の影響を受けやすいという難点がある。また、マウスやラットを含む多くの哺乳類は、ビタミン C を体内で合成できる点にも注意を要する。三つ目は、酸化傷害を受けた分子を評価する方法である。具体的には、タンパク質の酸化を示すカルボニル化タンパク質 (Protein Carbonyls)、脂質の過酸化を示すマロンジアルデヒド (Malondialdehyde : 以下 MDA)、DNA の酸化を示す 8-OH-dG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) を含め、多くの指標が存在する。四つ目は、細胞内の酸化-抗酸化バランス (Cellular Redox Balance) を測定することである。代表的な項目として、グルタチオン/酸化型グルタチオン (GSH/GSSH) があり、酸化ストレスが加わることでこの比率が低下する。このように、酸化ストレスを評価する方法は数多く存在するが、それぞれデメリットを有することから、現段階では複数の項目を併用することが勧められている (Powers et al. 2008)。

## 2.2. 一過性運動と酸化ストレス

活性酸素は、運動により発生量が増加することが知られている。運動と酸化ストレスに関する研究は、1978 年の Dillard らの研究を発端としている。この研究では、50%  $\dot{V}_{O_2max}$  の強度で自転車エルゴメーター運動を 60 分間行わせた結果、脂質の過酸化マーカーである呼気中のペンタン濃度が増加することを明らかにしており、それと同時に、ビタミン E の補助的な摂取によりペンタン濃度の上昇が抑制されることを報告している。Brady ら (1979) は、強制水泳運動終了後のラット骨格筋および肝臓において、過酸化脂質 (TBARS) が増加することを報告しており、ビタミン E の摂取により肝臓の TBARS 増加が抑制されることを明らかにしている。また、Davies ら (1982) は、電子スピン共鳴法を用いて、トレッドミルによる疲労困憊運動直後のラット骨格筋において、活性酸素の産生量および TBARS が増加することを報告している。加えて、この研究は、活性酸素が生体組織を傷害する可能性について言及した初めての論文であり、活性酸素による細胞傷害が何らかの刺

激となり、ミトコンドリア新生を促進する可能性について言及している。このように、1980年代の初頭には、活性酸素の生理的意義について触れられているものの、1980年代から90年代にかけては、活性酸素の傷害効果を検討した論文が大半である。

運動時の活性酸素の発生源については、いくつかの場所が挙げられる (Fig. 2-4)。Boveris ら (1973) は、ミトコンドリアで消費される総酸素摂取量のうち 2~5% は、1 電子還元を受けスーパーオキシドを形成すると述べている。その他の研究においても、骨格筋における活性酸素の主要発生源はミトコンドリアであるという考え方が一般的である (Loschen et al. 1974., Davies et al. 1982., Koren et al. 1983)。最大運動時の酸素消費量は、安静時の 10 数倍から 20 数倍まで増加し、活動筋のミトコンドリアでは 100 倍を超えることから (Sen et al. 1995)、活性酸素の発生量は酸素消費量の上昇に伴い増加すると考えられてきた。しかしながら、ミトコンドリアで消費される酸素のうち、スーパーオキシドとなるのは、わずか 0.15% 以下であるとの報告もなされており (St-Pierre et al. 2002)、ミトコンドリアは運動時の骨格筋において、活性酸素の主要発生源ではないとの指摘もなされている (Powers et al. 2008)。

Gomez-Cabrera ら (2005) は、ラット骨格筋において、細胞質基質(サイトゾール)のキサンチンオキシダーゼを介してスーパーオキシドが産生されることを報告している。キサンチンオキシダーゼは、ヒポキサンチンをキサンチンに酸化する過程でスーパーオキシドを産生すると考えられているが (Powers et al. 2011)、ヒト骨格筋ではラットに比べてキサンチンオキシダーゼの含有量が低いことから (Linder et al. 1999., Gomez-Cabrera et al. 2003)、今後も議論の余地があるだろう。また、Powers ら (2008) は、NADPH オキシダーゼを介して活性酸素が発生する可能性を示唆しているものの、未だエビデンスが限られる。

加えて、特に伸長性収縮を伴う筋活動では、運動後の筋損傷を招くことは広く知られているが、その回復過程においても活性酸素の発生量が増加すると考えられている。Malech

ら(1987)は、筋損傷後には、損傷部位に好中球やその他の食細胞が浸潤し、相当量の活性酸素が放出されることを報告している。実際に、筋損傷を伴うレジスタンス運動を行うことにより、酸化傷害マーカーが上昇することが明らかにされており (Hudson et al. 2008)、マウスを用いた実験では、活性酸素の放出レベルが筋損傷の度合いに応じて変化する可能性が示唆されている (Zebra et al. 1990)。

ところで、近年の研究により、活性酸素は細胞内の情報伝達分子としての役割を担うことが徐々に明らかにされつつある。実際に、活性酸素がミトコンドリア新生や、筋のタンパク質合成、インスリン感受性に関与している可能性や (Gomez-Cabrera et al. 2008., Makanae et al. 2013., Yfanti et al. 2011)、抗酸化酵素、インターロイキン-6(IL-6)、熱ショックタンパク質 70(HSP70)などのタンパク質合成を促進する可能性が示唆されている (Ji et al. 2008., Kosmidou et al. 2002., Khassaf et al. 2003., Jackson et al. 2004., Fischer et al. 2006b)。

### 2.3. 一過性運動の酸化ストレスに対する抗酸化サプリメント摂取の効果

これまでに、酸化ストレスを軽減する手段として抗酸化サプリメントを用いた研究が数多く行われている。Dillardら(1978)は、一般健常者に対し一日当たり1,200 IUのビタミンEを2週間摂取させることで、安静時および運動時の呼気中ペンタン濃度が低下することを明らかにしている。また、Simon-Schnassら(1988)は、高地滞在中の登山家に対し200mgのビタミンEを1日2回、4週間に亘り摂取させたところ、呼気中のペンタン濃度が減少することを報告している。その他にも、ビタミンEの抗酸化効果について、いくつかの報告がなされている (Rokitzki et al. 1994., Jessup et al. 2003., Silva et al. 2010)。同様に、ビタミンCの効果についても検討がなされている。Thompsonら(2001)は、200mgのビタミンCを1日2回、2週間摂取させた結果、シャトルランテストを行った直後の血漿MDA濃度の上昇が抑制されることを明らかにしている。しかしながら、抗酸化サプリメント

トの効果について、否定的な結果を示した論文も多く (Kaikkonen et al.1998., Nieman et al.2002., Bailey et al.2011.), 逆に酸化を促進するという報告も散見される (Bryant et al.2003., McAnulty et al.2005.).

ところで、ダウンヒルランニングやレジスタンス運動といった伸長性収縮を伴う筋活動は筋損傷を引き起こすことは広く知られている。それに付随する形で、運動24時間から48時間後をピークとして、遅発性筋痛 (Delayed Onset Muscle Soreness : DOMS) が生じる。そのメカニズムについては未だ解明されていないものの、その要因の一つとして、活性酸素の関与が指摘されている (McArdle et al.2004)。そのため、抗酸化サプリメントの摂取により、筋損傷および遅発性筋痛を抑制する方策が検討されてきた。これまでに、抗酸化サプリメントが細胞傷害 (Silva et al.2010)、炎症反応 (Fischer et al.2004)、運動後の筋力低下 (Nakazato et al.2010) を抑制したとの報告がなされている。一方で、細胞傷害 (Beaton et al.2002)、筋痛 (Connolly et al.2006)、炎症 (Nieman et al.2002) に効果がなるとする研究も散見され、逆に筋損傷を促進し、回復を遅める可能性を示唆する研究も存在する (Childs et al.2001., Teixeira et al.2009)。

加えて、エルゴジェニックエイド (競技力向上のための補助的手段) としての抗酸化サプリメントの利用可能性を検討した研究も存在する。Sharman ら (1971) は、男性の水泳選手を対象として、ビタミン E 摂取の効果を検討したものの、持久的パフォーマンスに及ぼす影響は観察されていない。一方で、Shindoh ら (1990) は、N-アセチルシステイン投与によりラット横隔膜の筋疲労が遅延されることを明らかにしており、それ以外にも、N-アセチルシステインが持久的パフォーマンスを改善したとする研究が散見される (Travaline et al.1997., Medved et al.2004)。また、Novelli ら (1990) は、ビタミン E においても筋疲労の遅延効果が観察されたことを報告しており、他の抗酸化物質においても疲労の軽減効果について一部報告がなされている。

以上のように、抗酸化サプリメントが酸化ストレスに及ぼす影響、筋損傷に及ぼす影響、

運動パフォーマンスに及ぼす影響について多くの研究が行われているものの、実験結果にはばらつきがあり、抗酸化サプリメントの有効性について一致した見解は得られていないのが現状である。結果の不一致を生む要因として、Petaneljら(2011)は、サプリメントの摂取条件(量, 期間, タイミング)や運動条件(運動様式, 強度, 時間), あるいは対象者(年齢, 性別, 体力レベル)の違いなどによる影響を挙げている。また、近年では、抗酸化サプリメントを過剰に摂取することで、運動トレーニングによる生理的適応を阻害する可能性も示唆されており(Gomez-Cabrera et al. 2008., Makanae et al. 2013), 抗酸化サプリメントの長期的かつ過剰な摂取には注意を要する。

#### 2.4. 抗酸化物としての水素

水素分子(以下水素)は無味・無臭・無色で高い可燃性を有する2原子のガスであり、大気中には1ppm以下しか含まれていない(Huang et al. 2010)。また、大気中の濃度が4~75%の範囲内にあるときは、爆発のリスクを伴う(Ohta. 2012)。このような特徴を持つ水素には、近年抗酸化作用を有するメディカルガスとしての注目が高まっている。

Doleら(1975)は、水素ガスを混入させた部屋にマウスを2週間曝露した結果、ガンに対する治療効果があったことを報告している。そのメカニズムとして、著者らは水素によるヒドロキシラジカルのスカベンジング(除去)効果を挙げている。同様に、Gharibら(2001)も、水素の抗酸化作用に関する研究を行っている。しかしながら、多くの研究者は、水素爆発の危険性を憂慮したため、当該分野の研究は拡大していかなかった。その後、Ohsawaraら(2007)は、培養細胞を用いて水素の抗酸化作用を調査したところ、水素が最も細胞毒性の高いヒドロキシラジカルを選択的に除去し、細胞を保護することを明らかにした(Fig.2-5)。また、脳梗塞に対し、水素ガスの吸引が効果的であることを動物実験において報告している。以来、水素による抗酸化作用が注目されるようになり、水素の有用性に関する論文も数多く発表されるまでになっている。現在では、脳梗塞だけでなく、アルツ

ハイマー病(Li et al.2010), 心筋梗塞(Hayashida et al.2008), 動脈硬化(Ohsawa et al.2008), 糖尿病(Kajiyama et al.2008)などの疾病に対する効果も報告されており, アメリカの死因トップ10に挙げられる疾病のほとんどに対し効果があることが報告されている(Dixon et al.2013). また, NASAによる宇宙飛行士の放射線被曝対策として水素を利用している研究(Schoenfeld et al.2011)や, 水素水飲用による代謝促進効果を示す研究(Kamimura et al.2011)なども存在しており, 水素の抗酸化作用に着目した研究は増加の一端を辿っている. 加えて, 水素のスキンケア効果を示唆する論文(Kato et al.2012)も存在しており, 疾病の予防, 改善だけでなく, 美容の分野においても注目が集まっている.

一方で, 水素が運動に及ぼす影響について検討した論文はわずか1編しか存在しない(Aoki et al.2012). この論文は, 大学のサッカー選手を対象として, 30分間の75% $\dot{V}O_{2max}$ での運動と100回の等速性膝伸展運動を行わせ, 水素水摂取の効果を検討したものである. その結果, 水素水摂取により運動中の血中乳酸濃度の低下と膝伸展運動時の初期段階でのピークトルクの改善がみられたことを報告している. しかしながら, 酸化ストレス傷害マーカーおよびクレアチンキナーゼに対する効果は観察できなかった. その理由として, 著者らは, トレーニングにより被験者の抗酸化システムが発達していた可能性や, 水素水の摂取量およびタイミングが適切でなかった可能性を挙げており, 今後さらなる研究が必要であると結論付けている.

これまでに発表された水素研究の総説(Hong et al.2010., Huang et al.2010., Dixon et al.2013., Ohta.2014)を概観すると, 水素の様々な長所が述べられている. 一つ目は, 分子量が小さく, 核内や活性酸素の主要な発生源とされるミトコンドリア内へと急速に拡散することができる点である. ゆえに, 運動時においても, 活性酸素の発生と同時にそれらを捕捉できる可能性がある. 二つ目は, 生理的役割を担う活性酸素には作用せず, 最も攻撃的なヒドロキシラジカルを選択的に除去できる点が挙げられる. そのため, 細胞内のシグナリングプロセスを阻害せずに, 酸化傷害を防げる可能性がある. 三つ目は, 副作用が

ないことである。これまでの研究により、過剰に摂取された水素は、肺を経由して呼気中に排出されることが明らかにされており (Shimouchi et al. 2013), 体温や血圧, pH, PO<sub>2</sub>などの生理的パラメーターに影響しないことも報告されている (Hong et al. 2010).

これらの長所に加え、水素はガス状の分子であることから、摂取方法が多彩であるという特徴を有する。最も直接的な摂取法としては、水素ガスの吸引が挙げられる。先行研究では、水素の爆発範囲の濃度 (4~75%) を避けた濃度 2% 前後の水素ガスが使用されている (Ohsawa et al. 2007., Hayasida et al. 2008). 水素ガスは、日常生活において継続的な摂取が難しいため、最も簡便な摂取法である水素水を用いた研究も行われている。水素は、大気圧下において 0.8mM まで水に溶解させることができる。水素水の生成は、水素ガスを注入する方法、電気分解により水素を発生させる方法、マグネシウム金属と水を反応させて水素を発生させる方法などがある。しかしながら、水素はその特性上プラスチックやガラスを透過してしまうため、長期間保存する場合はアルミニウム容器に保管する必要がある。

加えて、水素は皮膚を容易に通過することができることから、水素入浴により経皮的に摂取することができる。実際に、様々な水素入浴剤が市場で販売されており、とりわけ習慣的に入浴を行う日本人に非常に適合した方法だと考えられている (Ohta. 2014). 経皮吸収の経路は、毛包、汗腺などを経由する経付属器官ルートと経角質ルートに大別され、そのうちの 99.9% が経角質ルートを通過する。また、経角質ルートは経細胞ルートと細胞間ルートに分けることができ、表皮を通過した物質は真皮中の血管から全身循環系に移行する。分子が経皮吸収されるか否かは、分子量や溶媒への可溶性といった要因により決まるが、水素分子は最も小さな分子であり、水溶性、脂溶性を問わず細胞を通り抜けることができることから (Ohta. 2012), 皮膚を容易に通過することができるものと思われる。実際に、ヒトにおいては、水素入浴開始から 10 分後には呼気中水素濃度が上昇することが確認されている (Ohta. 2012).

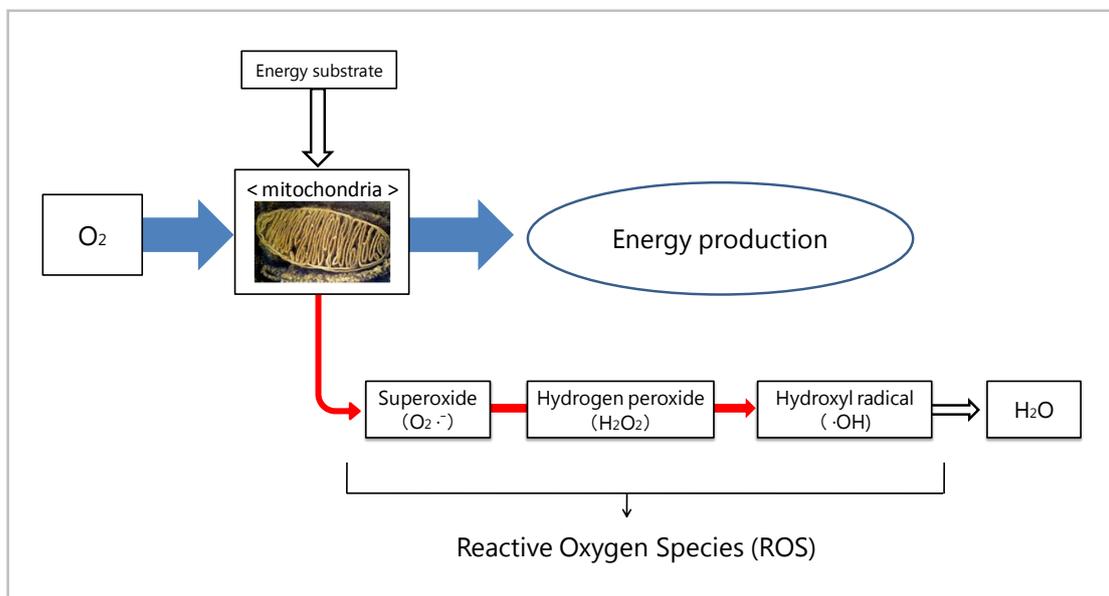


Fig.2-1. The generation of reactive oxygen species

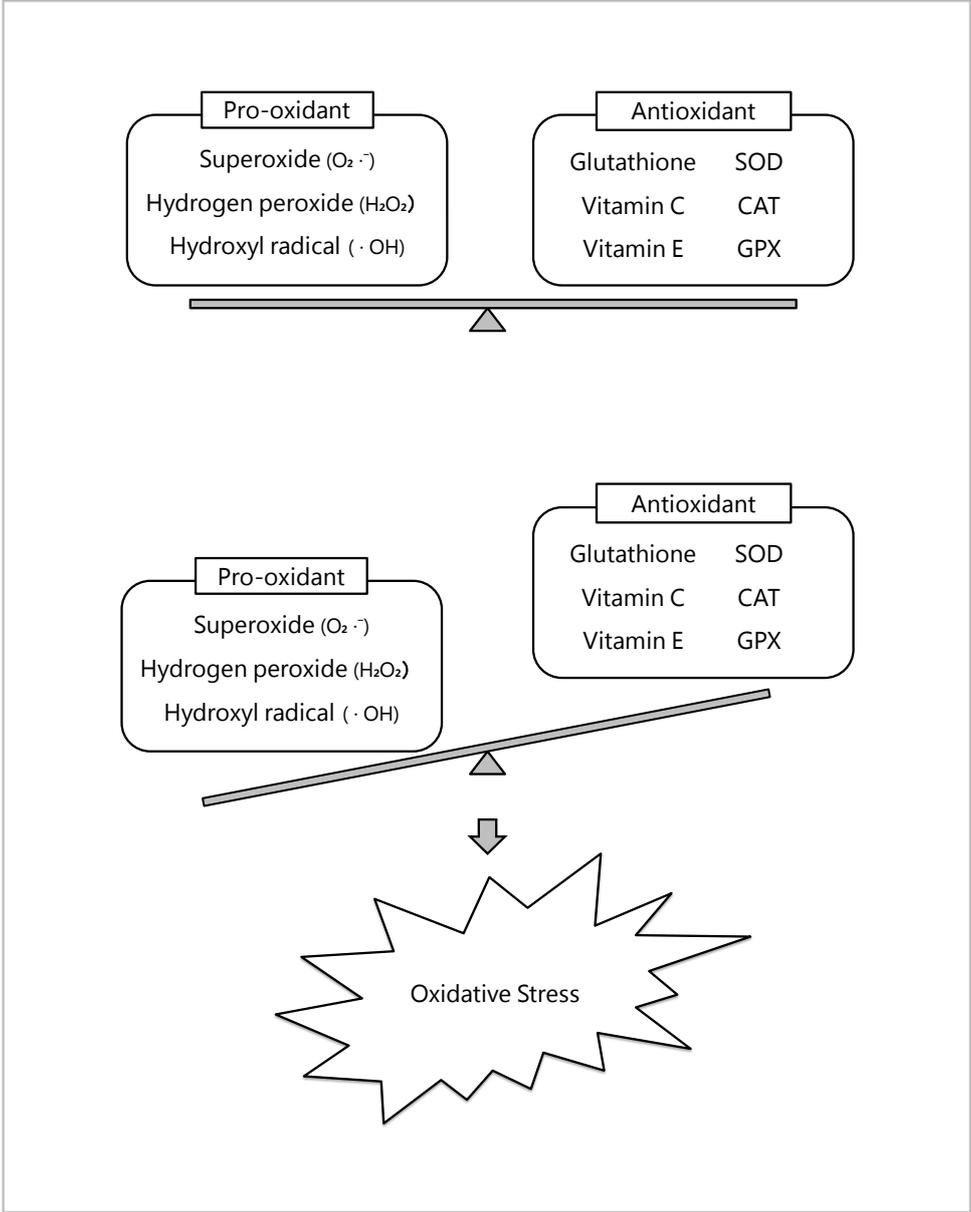


Fig.2-2. Definition of the oxidative stress

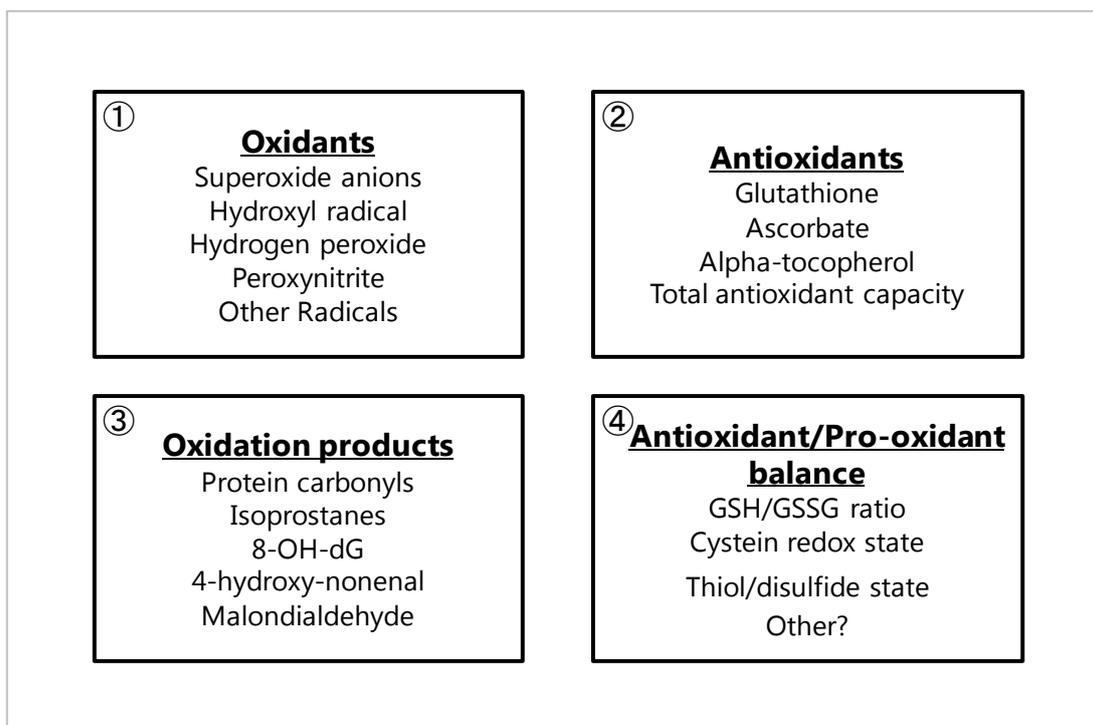


Fig.2-3. Markers of oxidative stress (Powers&Jackson.2008)

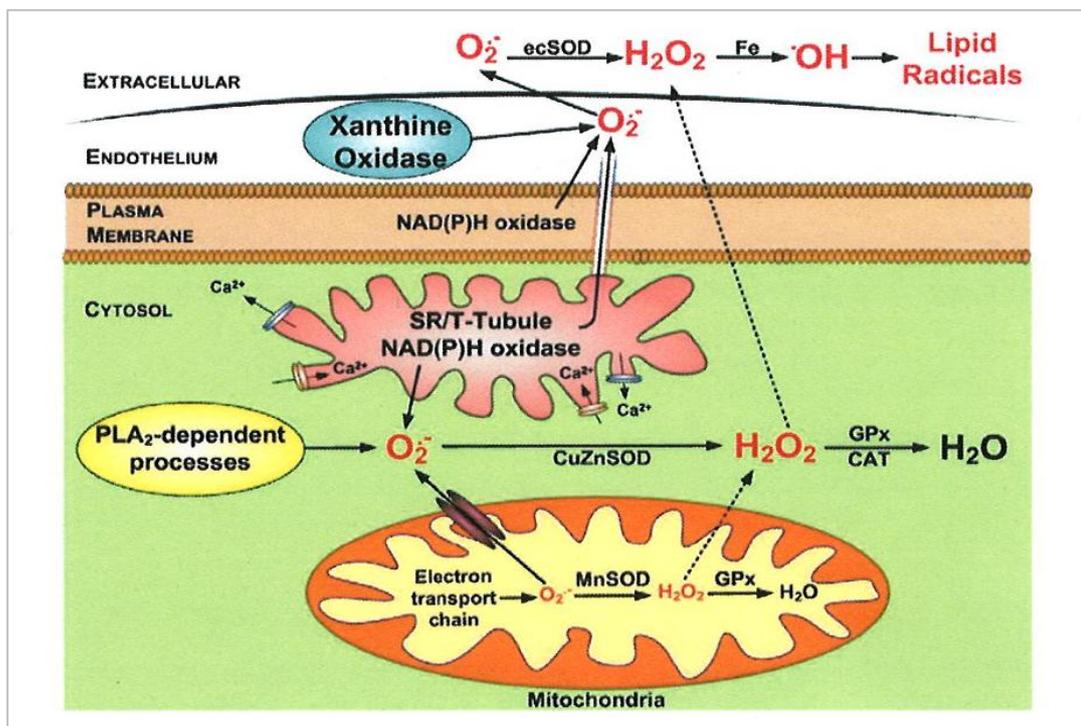


Fig.2-4. The generation of reactive oxygen species in skeletal muscle during exercise (Powers et al.2011)

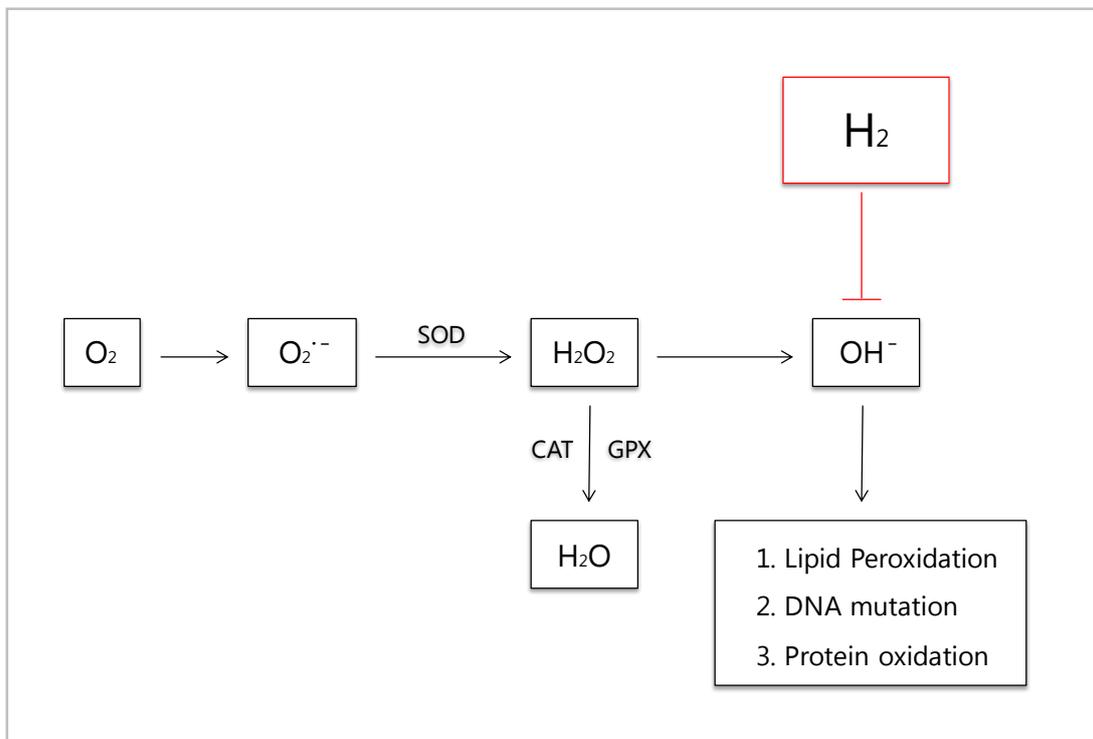


Fig.2-5. The effect of molecular hydrogen on reactive oxygen species

### 第3章 本研究の目的と研究課題

#### 3.1. 本研究の目的

本研究の目的は、水素発生剤を用いて行う水素摂取が一過性持久運動時の酸化ストレスおよびその関連指標に及ぼす影響を動物実験により明らかにすることである。そこで、本研究では、2つの研究課題を設定した。実験1では、体重の4%の重量を負荷した60分間の強制水泳運動を行わせ、実験2では、自重での強制水泳運動を45分間の休憩を挟み合計6時間行わせた。本研究の仮説は、水素は運動時の酸化ストレスおよびその関連指標の増加を抑制することである。

#### 3.2. 実験1. 水素摂取が中強度運動時の酸化ストレスに及ぼす影響

これまでに、実験動物に対する一過性持久運動が酸化ストレス指標に及ぼす影響について検討した論文は数多く存在する。その中で、強制水泳運動を行わせた研究もいくつか存在しており、Deminiceら(2012)は、4%の重量を負荷した60分間の強制水泳運動により、運動直後の血漿TBARSおよびヒラメ筋のTBARSが増加することを明らかにしている。運動誘発性の酸化ストレスは、細胞を傷害することで生体に様々な悪影響をもたらす可能性があり、また他方では、筋の発揮張力を低下させ、運動パフォーマンスの低下を引き起こす可能性が示唆されていることから(Moopanar et al. 2005)、運動時の酸化ストレスを軽減する方策を検討する必要があると考えられる。

一方で、活性酸素は細胞内の情報伝達因子としての働きを有しており、IL-6や熱ショックタンパク質(Heat Shock Protein: 以下HSP)などのタンパク質の遺伝子発現に関与していることが明らかにされている(Vassilakopoulos et al. 2003., Fischer et al. 2004., Khassaf et al. 2003., Jackson et al. 2004., Fischer et al. 2006b)。IL-6は、炎症反応や免疫調節を行う細胞間情報伝達物質であるサイトカインの一種で、炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの分泌を促すなど、機能が多彩なことから多機能性サイトカインと呼ば

れている。加えて、運動時には骨格筋においても産生され、糖および脂質代謝に関与することが知られており (Pedersen. 2012)、マイオカイン(Myokine)と命名され近年注目を集めている。

HSP は、別名ストレスタンパク質とも呼ばれ、活性酸素を含む様々なストレスにより発現が増加する。HSP は分子シャペロンとしての機能を有しており、タンパク質のフォールディング(折りたたみ)の制御や、変性したタンパク質の修復および分解に関与しており、タンパク質の細胞内輸送においても重要な役割を担うことが明らかにされている (Morton et al. 2009)。このような役割を持つ HSP は、運動ストレスによっても増加することが報告されており (Hernando et al. 1997)、活性酸素から細胞を保護するための一種の生理応答として発現量が増加するものと考えられている。

ところで、近年、医学分野における水素利用に向けた研究が盛んに行われており、水素は抗酸化作用だけでなく、抗炎症作用や細胞保護作用などを有することが明らかになっている。また、動物を対象とした研究だけではなく、既に臨床研究も行われるまでになっている。しかしながら、水素が運動に及ぼす影響についてはほとんど研究が行われておらず、わずか一編のみ存在する先行研究においても、十分な結果が得られていないのが現状である (Aoki et al. 2012)。この論文では、運動前夜、運動日の起床後、運動直前に水素水 500mL を摂取させているが、経口的に摂取する水素水の問題点として、大量に飲料するのが困難であることが挙げられる。一方で、本実験で使用する水素発生剤(二水素化マグネシウム:以下  $MgH_2$ )は、水素の発生量をコントロールすることができ、主に経皮的に、より多量の水素を生体組織に供給できるものと思われる。

そこで本実験では、 $MgH_2$  を用いた水素摂取が、重量を負荷した強制水泳運動時の酸化ストレスおよびその関連指標に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。本実験の仮説は、水素は運動時の酸化ストレスおよびその関連指標の増加を抑制することである。

## 【方法】

### 1. 実験動物および飼育条件

本実験では、7週齢の雄性 Sprague-Dawley (SD)系ラット(日本クレア株式会社)を用いた。ラットは、室温  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $60\pm 5\%$ 、12時間-12時間の明暗サイクルにコントロールされた動物飼育室にて、1ケージにつき2匹ずつ飼育した。飼料は一般固形飼料(オリエンタル酵母, MF)を水とともに自由摂取させた。なお、本実験は、早稲田大学動物実験委員会の承認を得たうえで行われた(承認番号 2014-A092)。

### 2. 運動プロトコル

4日間の予備飼育後、水に慣れさせるために1日10分間の予備水泳運動を3日間行わせた。その後、ラットをコントロール群(C群,  $n=8$ )、エクササイズ群(Ex群,  $n=8$ )、エクササイズ+水素摂取群(Ex+H<sub>2</sub>群,  $n=8$ )に無作為に振り分けた。C群はケージ内で通常通りの飼育を行い、Ex群およびEx+H<sub>2</sub>群には、水温  $32\sim 35^{\circ}\text{C}$ に設定されたプラスチックバケツにおいて、体重あたり4%の重量を負荷した強制水泳運動を60分間行わせた。この運動は、最大乳酸定常状態(Maximal Lactate Steady State: MLSS)にあたる強度で、血中乳酸濃度を保ったまま行える最大運動強度であると言われている(Voltarelli et al. 2002)。また、水泳運動では、4匹を同時に泳がせた。Ex+H<sub>2</sub>群では、MgH<sub>2</sub>を用いて水素水プールを作り、その中で運動を行わせることにより経皮的に水素を摂取させた。一方、Ex群では、コントロール剤として水酸化マグネシウム(以下 Mg(OH)<sub>2</sub>)を使用した。

### 3. 水素の発生および安全管理

本実験で用いたMgH<sub>2</sub>は、マグネシウムに水素を吸蔵させており、水に触れると1gあたり約1.7gの水素を発生させる(反応式:  $\text{MgH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mg(OH)}_2 + 2\text{H}_2$ )。溶存水素濃度を測るために、メチレンブルー溶液を用いて、水泳運動中10分間隔で測定を行った。なお、MgH<sub>2</sub>と

H<sub>2</sub>O が反応して H<sub>2</sub> が発生するまでに多少の時間を要するため、MgH<sub>2</sub> の投与は水泳開始 10 分前に行った。

大気中に水素が大量に存在する場合(4%以上)には、水素爆発のリスクが生じる。しかし、MgH<sub>2</sub> 2.5g からおよそ 4.25L の水素が発生するものの、そのほとんどは水に溶解した状態で存在するため、全ての水素が実験室に拡散したとしても、濃度 0.1% に満たない。従って、水素爆発を起こす危険性は全くない。

#### 4. 分析方法

##### 1) 組織の摘出および保存

強制水泳運動終了直後、ペントバルビタールナトリウムの投与(60~100mg/kg 体重)による完全麻酔下で解剖を行った。解剖時には、腹大静脈から血液を採取し、その後、上腕三頭筋の摘出を行った。採取した血液は、抗凝固剤(EDTA-2Na)入りの真空採血管(VP-NA070K, TERUMO)に移して氷上に静置した後に、4°C, 3000rpm で 10 分間遠心して血漿を得た。一方、摘出した上腕三頭筋は、液体窒素中で瞬間凍結させた。得られた血漿および骨格筋サンプルは、分析まで-80°C のフリーザーで保存した。血漿は過酸化脂質(TBARS)および IL-6 の分析に、骨格筋は過酸化脂質(TBARS)、抗酸化酵素活性(SOD・GPX)、HSP70 の分析に供した。

##### 2) ホモジナイズおよびホモジネイトの調節

摘出した上腕三頭筋は、液体窒素を注入した乳鉢にて乳棒を用いて粉砕した。粉状の筋 40mg に対し、400 μL のホモジナイズバッファーを加え、電動ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。なお、ホモジナイズの際は、摩擦熱によるサンプルへの影響を排除するため、試験管は氷水に浸したうえで行った。ホモジネイトは、1.5mL のマイクロチューブに分注し、各分析に供した。

### 3) TBARS (血漿・骨格筋)の測定

血漿および骨格筋の TBARS は, TBARS assay kit(10009055, Cayman chemical)を用いて測定した. 1.5mL のマイクロチューブにサンプル(血漿・ホモジネイト)25 $\mu$ L を加えた後に, TBA SDS Solution 25 $\mu$ L および Color Reagent 1mL を加え, 100°C に設定されたヒートブロック (Accublock Digital Drybath, Labnet)において 1 時間煮沸させた. 1 時間後, 取り出したチューブは, 直ちに ice bath にて 10 分間冷却し, その後, 4°C, 1600 $\times$ g で 10 分間遠心した後, 室温にて 30 分間静置した. 上清 150 $\mu$ L をブラックプレートに滴下し, 分光蛍光光度計 (FLOstar OPTIMA, BMG LABTECH)を用いて励起波長 530nm, 発光波長 550nm で測定を行った. 測定値は, TBA Malondialdehyde Standard から算出した検量線 (Standard Curve)をもとに算出した.

### 4) 抗酸化酵素活性の測定

#### 4)-1 SOD 活性

骨格筋の SOD 活性は, SOD activity assay kit(KSD-005W, Northwest Life Science Specialities, LLC)を用いて測定した. Assay Buffer 230 $\mu$ L を各ウェルへ分注し, ホモジネイト 10 $\mu$ L を加えてから混和し, そのまま 2 分間培養した. 次に, マルチチャンネルピペットを用いて Hematoxylin Reagent 40 $\mu$ L をウェルへ滴下し, 自動酸化反応を開始させた. ウェルの内容物を素早く混ぜ合わせた後に, マイクロプレートリーダー (VERSAmax Molecular Devices)を用いて 10 秒間隔で 560nm における吸光度を 5 分間測定した. SOD 活性は, ブランクウェル(サンプルの代わりに Assay Buffer 10 $\mu$ L を添加)およびサンプルの吸光度上昇率から算出し, C 群に対する活性比 (%Control) を求めた.

#### 4)-2 GPX 活性

GPX 活性は, GPX activity assay kit(KGX005W, Northwest Life Science Specialities,

LLC)を用いて測定した。まず、希釈したホモジネイト 50  $\mu$ L を各ウェルに加え、NADPH Diluent により希釈した NADPH Reagent 50  $\mu$ L を加えた。さらに、希釈した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Reagent 50  $\mu$ L を添加し、1 分間静置した後に 340nm における吸光度を 30 秒間隔にて 5 分間測定した。測定値は、ブランクウェルおよびサンプルの吸光度の低下率をもとに算出し、C 群に対する活性比(%Control)を求めた。

#### 5) IL-6 の測定

血漿中の IL-6 濃度は、IL-6 ELISA kit (R6000B, R&D Systems)を用いて測定した。50  $\mu$ L の Assay Diluent を各ウェルに加えた後に、50  $\mu$ L のサンプルを加え、溶液を混ぜ合わせてから室温にて 2 時間培養した。2 時間後、プレートの溶液を捨て、Wash Buffer により 5 回洗浄した後に、100  $\mu$ L の Rat IL-6 Conjugate を加え、室温にて 2 時間培養した。2 時間後、プレートを洗浄し、100  $\mu$ L の Substrate Solution を加え、室温で 30 分間培養した。最後に Stop Solution 100  $\mu$ L を加え、560nm および 450nm の波長で吸光度を測定した。測定値は、560nm の吸光度から 450nm の吸光度を差し引いた光学濃度 (Optimal Density : O.D.) として求めた。

#### 6) HSP70 の測定

骨格筋の HSP70 含有量は、HSP70 ELISA kit (SKT-108, STRESSMARQ BIOSCIENCES INC.)を用いて測定した。最初に 100  $\mu$ L のサンプルを各ウェルに加え、37°C で 2 時間培養した。2 時間後、プレートの溶液を捨ててから、Wash Buffer を用いて 4 回洗浄した。その後、100  $\mu$ L の Biotinylated Antibody Working Solution を加え、再び 37°C で 2 時間培養した。プレートを洗浄した後に、100  $\mu$ L の Streptavidin-HRP Working Solution を加え、37°C で 30 分間培養した。30 分後、プレートを洗浄し、100  $\mu$ L の TMB Substrate をウェルに加え、室温にて 30 分間酵素反応を行わせた。その後、Stop Solution を加えて反応を停止させ、マ

マイクロプレートリーダーを用いて 450nm の波長で吸光度を測定した。測定値は、HSP70 standard から作成した検量線をもとに算出した。

## 5. 統計処理

データは全て平均値±標準誤差で表した。統計処理はSPSS(日本IBM社)を用いて行った。3群間の比較には、一元配置の分散分析を用い、多重比較にはTukeyのHSD testを用いた。統計学的有意水準は危険率5%未満とした。

### 【結果】

#### 1. ラットの体重変化

実験1で用いたSDラットの飼育前後での体重変化をTable 3-1に示した。飼育開始時の体重は、C群：241.1±6.1g, Ex群：241.6±7.9g, Ex+H<sub>2</sub>群：242.5±7.8gであり、飼育開始後(運動開始直前)の体重はC群：323.6±11.5g, Ex群：319.1±17.0g, Ex+H<sub>2</sub>群 327.4±12.8gであり、群間で統計的な差は見られなかった。

#### 2. 溶存水素濃度

水泳運動時の溶存水素濃度の変化をFig. 3-1に示した。水素濃度は、MgH<sub>2</sub>投入後緩やかに上昇し、運動開始時には0.4ppmを超え、最大で1.0ppmまで上昇した。その後、運動終了時まで0.8ppm以上の値を維持し続けた。

#### 3. 運動直後のTBARS

血漿TBARSは、C群：4.7μM, Ex群：4.3μM, Ex+H<sub>2</sub>群：4.1μMであり、3試行間で統計的な差は見られなかった(Fig. 3-2)。同様に、上腕三頭筋のTBARSにおいても、C群：1.02

$\mu\text{M}/\text{mg protein}$ , Ex 群 :  $0.93 \mu\text{M}/\text{mg protein}$ , Ex+H<sub>2</sub> 群 :  $1.23 \mu\text{M}/\text{mg protein}$  であり, 試行間に差は見られなかった (Fig. 3-3).

#### 4. 抗酸化酵素活性

上腕三頭筋における SOD と GPX の抗酸化酵素活性は, ともに C 群を 100 とした場合の活性比で示した (Fig. 3-4, Fig. 3-5). Ex 群, Ex+H<sub>2</sub> 群の SOD 活性は, C 群に対し, それぞれ 126%, 145% を示しており, Ex+H<sub>2</sub> 群の SOD 活性は, C 群と比べて有意に高い値を示した ( $p < 0.05$ , Fig. 3-4.). 一方で, GPX 活性は, Ex 群 112%, Ex+H<sub>2</sub> 群 116% であり, 3 試行間に差は見られなかった (Fig. 3-5).

#### 5. IL-6

血漿 IL-6 は, それぞれ Optimal Density (O. D.) で示した (Fig. 3-6). IL-6 の値は, C 群 : 0.0300, Ex 群 : 0.0313, Ex+H<sub>2</sub> 群 : 0.0485 であり, Ex+H<sub>2</sub> 群では他の 2 群に対し有意に高い値を示した (Ex+H<sub>2</sub> vs C :  $p < 0.001$ , Ex+H<sub>2</sub> vs Ex :  $p < 0.001$ ).

#### 6. HSP70

上腕三頭筋の HSP70 含量は, C 群 :  $2.5 \text{ng}/\text{mg protein}$ , Ex 群 :  $2.1 \text{ng}/\text{mg protein}$ , Ex+H<sub>2</sub> 群 :  $3.8 \text{ng}/\text{mg protein}$  であり, Ex+H<sub>2</sub> 群では, 他の 2 群に比べて有意に高い値を示した (Fig. 3-7, Ex+H<sub>2</sub> vs C :  $p < 0.05$ , Ex+H<sub>2</sub> vs Ex :  $p < 0.01$ ).

Table3-1. Body weight change in rats.

	C	Ex	Ex+H2
<b>Body weight (g)</b>			
7-weeks	241.1±6.1	241.6±7.9	242.5±7.8
8-weeks	323.6±11.5	319.1±17.0	327.4±12.8

Values are means±SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake(Ex+H2) groups.

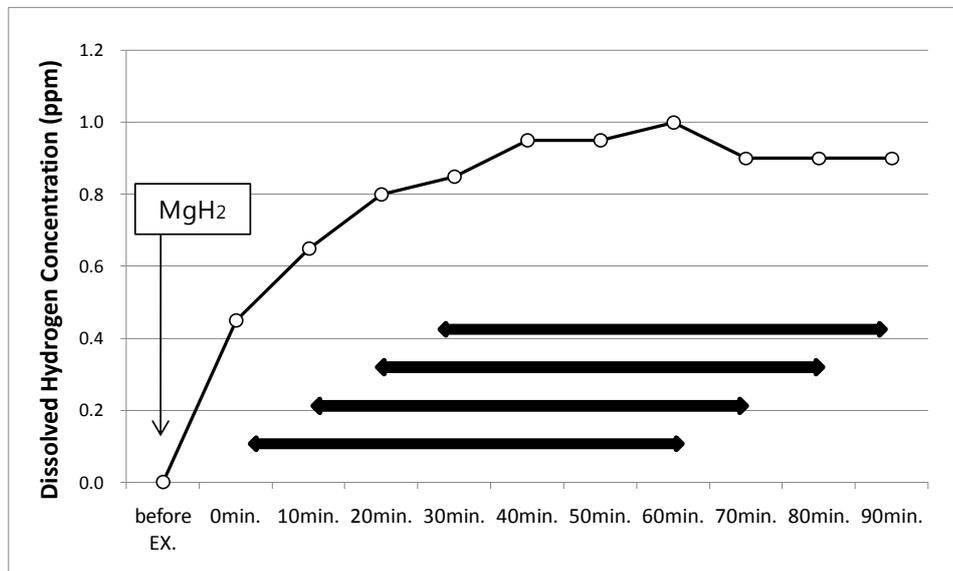


Fig.3-1. Time course of dissolved hydrogen concentration during swimming exercise. The measurement was carried out by methylene blue solution. Values are expressed as mean. The bold arrows in the figure indicate the exercise time.

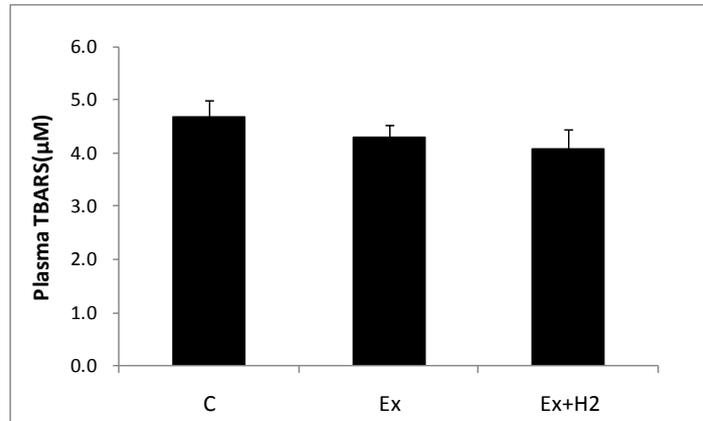


Fig.3-2. Plasma thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) immediately after 1h swimming exercise. Values are means  $\pm$ SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake(Ex+H2) groups.

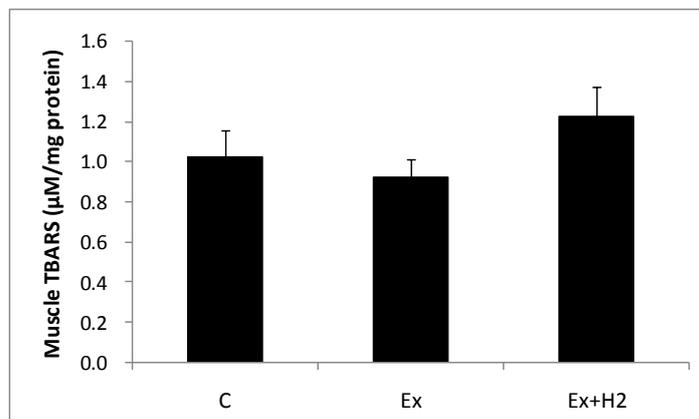


Fig.3-3. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in rat triceps muscle immediately after 1h swimming exercise. Values are means  $\pm$ SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake (Ex+H2) groups.

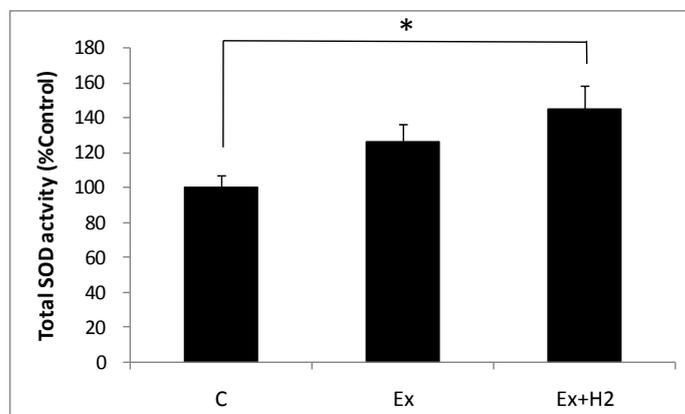


Fig.3-4. Superoxide dismutase(SOD) activity in rat triceps muscle immediately after 1h swimming exercise. Values are means±SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake (Ex+H2) groups. \* indicates significant difference at a level of  $p<0.05$ .

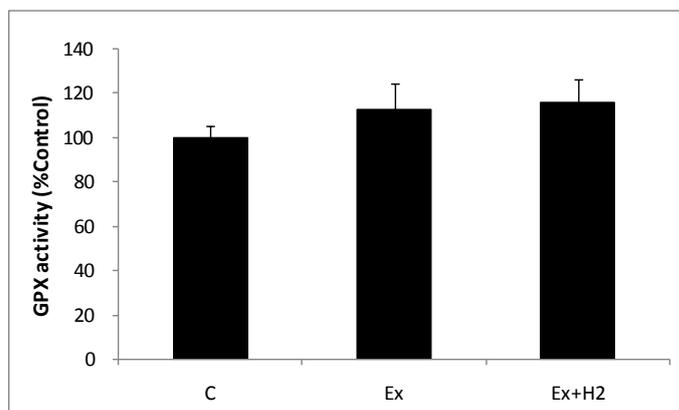


Fig.3-5. Glutathione peroxidase(GPX) activity in rat triceps muscle immediately after 1h swimming exercise. Values are means±SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake (Ex+H2) groups.

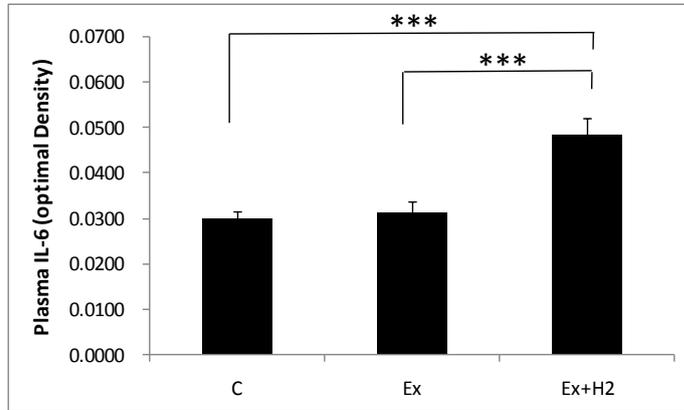


Fig.3-6. Plasma IL-6 level immediately after 1h swimming exercise. Values are means±SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake (Ex+H2) groups. \*\*\* indicate significant differences at a level of  $p < 0.001$ .

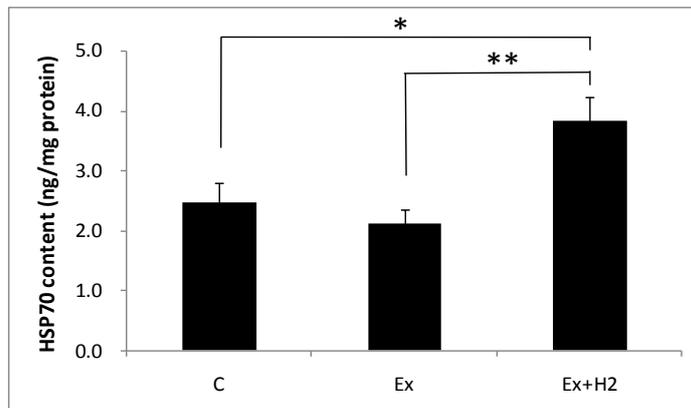


Fig.3-7. Heat shock protein 70 (HSP70) content in rat triceps muscle immediately after 1h swimming exercise. Values are means±SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake (Ex+H2) groups. \* and \*\* indicate significant differences at a level of  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

## 【考察】

本実験では、一過性の水泳運動(Ex 群)により、酸化ストレス指標である TBARS、および抗酸化酵素活性に上昇は観察されなかった。同様に、血漿 IL-6 および HSP70 の増加も観察することができなかった。その一方で、Ex+H<sub>2</sub> 群では、運動直後の SOD 活性が C 群と比べて有意に高い値を示した。また、血漿 IL-6 濃度においては、C 群、Ex 群と比べて Ex+H<sub>2</sub> 群では有意に高い値を示し、HSP70 においても、Ex+H<sub>2</sub> 群では他の 2 群よりも有意に増加することが示された。

Deminice ら(2012)は、体重の 4%を負荷した 60 分間の水泳運動により、運動直後の血漿 TBARS が増加することを報告しており、同様に、運動直後のヒラメ筋および腓腹筋の TBARS も増加することを報告している。体重の 4%の重量を負荷した運動は、MLSS にあたる強度で、血中乳酸濃度を保ったまま行える最大運動強度であると考えられている(Voltarelli et al. 2002)。しかしながら、本実験では、血漿および上腕三頭筋の TBARS 値が変化しなかった。

その理由は必ずしも明らかではないが、運動強度が低かった可能性も考えられる。実際に、Gonchar(2005)は、体重の 10%を負荷した 30 分間の水泳運動により、運動直後の TBARS レベルが上昇することを報告している。また、他方では、無負荷での水泳運動を疲労困憊まで行わせた場合に、運動後の血清 TBARS が増加したことを示す研究も存在する(Wang et al. 2006)。従って、今後は、運動誘発性酸化ストレスを生じさせるためにより重い負荷で運動を行わせるか、あるいは運動時間を延長する必要があると思われる。

さらに、本実験では、SOD、GPX とともに Ex 群における活性の上昇は見られなかった。先行研究においては、水泳運動後の SOD 活性の上昇を示したデータも存在するが(Wang et al. 2006)、その一方で、SOD 活性の変化が認められなかったものや(Balci et al. 2012)、反対に活性が低下したとする報告がなされている(Gonchar. 2005)。また、GPX 活性では、一過性の水泳運動により活性が上昇したとする報告(Yu et al. 2012)がなされているものの、十

分なエビデンスが得られていないのが現状である。抗酸化酵素活性が上昇しなかった要因として、グルタチオンやビタミンCおよびEなど他の抗酸化物の働きにより酵素の活性が上昇しなかった可能性も考えられる。

グルタチオン(以下GSH)は、水素原子(H)を供与することで活性酸素と直接的に反応することができ、また、GPXの基質として利用されることで間接的に抗酸化作用を発揮することができる(Powers et al. 2008)。GSHは、GPXによる酵素反応後には酸化型グルタチオン(以下GSSG)となることから、生体内のGSHとGSSGの濃度をGSH/GSSG比として表わすことで、生体内の酸化ストレスの程度を知る手がかりとなる。実際に、Yuら(2012)は、一過性の疲労困憊運動により、SOD活性の上昇を伴わずに筋中のGSHおよびGSH/GSSG比が低下することを明らかにしている。同様に、ビタミンの抗酸化作用について検討した論文も数多く存在しており、Bradyら(1979)は、強制水泳運動を疲労困憊運動まで行わせた直後のTBARS値が、事前にビタミンEを摂取させた群では抑制されることを明らかにしている。しかしながら、本実験では、ビタミン類やグルタチオン濃度の測定は行っていないため、他の抗酸化物による影響を裏付けることはできない。ラットは体内でビタミンCを合成できるために注意が必要であり、今後は、生体の抗酸化能を評価する際には、抗酸化酵素だけではなく、非酵素的な抗酸化物についても検討を行う必要があると考えられる。

興味深いことに、Ex+H<sub>2</sub>群のSOD活性がC群と比べ有意に高い値を示した(p<0.05)。これまでに、水素摂取によりSOD活性が上昇することを示した研究はいくつか存在する。Qianら(2010)は、水素を腹腔内投与したラットにおいて、放射線被曝(酸化ストレスを誘導する)から12時間後のSOD活性が生理食塩水を投与した群に比べて有意に上昇することを明らかにしている。また、Nakaoら(2010)は、臨床研究において、8週間の水素水摂取により尿サンプル中のSOD活性が介入前よりも上昇していたことを報告している。水素の標的分子として、現在のところヒドロキシラジカルのみが報告されているものの、それだけでは

説明のつかない実験結果が数多く存在する。Shi ら(2012)は、水素がリガンド(配位子)として金属と結合することで、代謝に影響を及ぼす活性酸素の可能性について言及している。

SODの活性調節は、サイトゾルに局在するCu/ZnSODでは、銅(Cu)および亜鉛(Zn)により、また、ミトコンドリアに局在するMnSODでは、マンガン(Mn)が活性部位に結合することにより行われる。従って、本実験では、水素が間接的にSOD活性に影響を及ぼした可能性も考えられる。しかしながら、この仮説の検証は未だ不十分であり、本実験においても、水素そのものが酵素活性の調節に関与しているのか、あるいは運動と水素の組み合わせにより酵素活性が上昇したのかを判断することは難しいと言える。

酸化ストレス指標および抗酸化指標の測定結果と同様に、血漿IL-6においても、運動(Ex群)による増加を観察することができなかった。IL-6は、免疫調節において中心的な役割を担う多機能性サイトカインの一種であり、活性酸素刺激により増加することが明らかにされている(Kosmidou et al. 2002)。このことから、ビタミンサプリメントの摂取が運動後のIL-6濃度に及ぼす影響について、いくつかの研究が行われている。Vassilakopoulos ら(2003)は、長期的な抗酸化サプリメントの摂取により、持久運動を行った直後の血漿IL-6の増加が抑制されたことを報告している。同様に、Fischer ら(2004)は、ビタミンCおよびEを1ヶ月摂取することで、膝伸展運動後30分、60分、90分の血漿IL-6値の上昇が抑制されることを明らかにしている。

これらのことから、本実験では、抗酸化および抗炎症作用を有する水素を摂取することで、運動後の血漿IL-6の増加が抑制されるものと仮定した。しかしながら、本実験では、Ex群におけるIL-6の増加は観察されず、Ex+H<sub>2</sub>群においては、他の2群に比べて有意に高い値を示した。Ex群において血漿IL-6が増加しなかった1つの要因として、運動により酸化ストレスが生じなかったことが挙げられる。このことは、血漿TBARSおよび骨格筋TBARSの値が上昇しなかったことから明らかである。そのため、今後はより負荷の高い運動を行わせて検討する必要があると考えられる。

Ex 群において、血漿 IL-6 の上昇が観察されなかった一方で、Ex+H<sub>2</sub> 群では血漿 IL-6 が有意に高い値を示した。IL-6 は、当初、運動誘発性の筋損傷に対する反応として、主に白血球から産生されると考えられていた (Bruunsgaard et al. 1997)。しかしその後の研究により、運動時には、骨格筋からも IL-6 が分泌されることが明らかにされている (Steensberg et al. 2002)。IL-6 は、筋グリコーゲン量の減少に伴い発現が増加し、骨格筋における糖の取り込みおよび脂肪酸酸化を促進する役割を担うと考えられている (Pedersen. 2012)。また、Kamimura ら (2011) は、水素水の摂取により糖および脂質代謝が亢進することを動物実験において報告している。そのため、本実験で見られる Ex+H<sub>2</sub> 群の IL-6 増加は、水素が骨格筋における糖の利用率を高めることで、間接的に IL-6 の産生量を増加させていた可能性もある。しかしながら、Kamimura らの研究では水素水を長期的に摂取させており、また、運動を行わせていないため、本実験で見られた IL-6 の増加を説明することはできない。加えて、本実験では血漿 IL-6 の測定を行ったのみであり、骨格筋の IL-6 濃度を知ることはできなかった。これらのことから、今後は、運動時の水素摂取が骨格筋のエネルギー代謝に及ぼす影響を検討する必要があるように思われる。

骨格筋の HSP70 含量は、運動 (Ex 群) による増加が観察されなかったものの、Ex+H<sub>2</sub> では他の 2 群に比べて有意に高い値を示した。この実験結果は、IL-6 のデータと類似する。Morton ら (2009) は、HSP の発現増加に関わる因子として筋温変化、酸化ストレス、代謝的ストレス、サイトカイン産生および炎症ストレスを挙げている。ゆえに、サイトカインの一種である IL-6 の増加が HSP70 の発現過程において何らかの影響を及ぼした可能性もある。実際に、Febbraio ら (2002a) は、IL-6 を安静時のヒト骨格筋に注入したところ HSP70 mRNA が増加することを報告している。そのメカニズムとして、著者らは、IL-6 が HSP70 の調節因子である STAT3 (Signal Transducer and Activity of Transcription 3) を活性化している可能性について言及している。また、Febbraio ら (2002b) は、筋グリコーゲン含量の低下に伴い HSP70 が増加することを報告している。仮に、水素が運動時における骨格筋の糖代謝

を促進したのであれば，本実験における HSP70 の増加を解釈することができる．しかしながら，先に述べたように，本実験の結果だけでは運動時の水素摂取が骨格筋のエネルギー代謝に及ぼす影響や，IL-6 および HSP70 が増加した理由，IL-6 と HSP70 の相互作用について議論するのは困難である．

#### 【結論】

体重の 4% の重量を負荷した 60 分間の水泳運動は，酸化ストレスおよびその関連指標に影響しないものの，運動と同時に水素を摂取させることで，SOD 活性，血漿 IL-6 ならびに HSP70 を増加させることが明らかとなった．

### 3.3. 実験 2. 水素摂取が低強度長時間運動時の酸化ストレスに及ぼす影響

実験 1 では、重量を負荷した 60 分間の水泳運動により、酸化ストレス指標が上昇しなかった。その理由として、運動強度が低かった可能性や運動時間が短かった可能性が考えられる。それゆえ、運動時間の増加により運動誘発性酸化ストレスが上昇する可能性がある。実際に、Higashida ら (2011) は、合計 6 時間に亘る自重での強制水泳運動 (3 時間運動・45 分休憩・3 時間運動) によって、運動直後の酸化ストレス指標 (TBARS) が増加することを明らかにしている。

そこで、本実験では、 $MgH_2$  を用いた水素摂取が、低強度長時間運動時の酸化ストレスおよびその関連指標に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法】

##### 1. 実験動物および飼育条件

本実験では、5 週齢の雄性 SD 系ラット (日本クレア株式会社) を用いた。ラットは、室温  $22 \pm 2^\circ C$ 、湿度  $60 \pm 5\%$ 、12 時間-12 時間の明暗サイクルにコントロールされた動物飼育室にて、1 ケージにつき 2 匹ずつ飼育した。飼料は一般固形飼料 (オリエンタル酵母, MF) を水とともに自由摂取させた。なお、本実験は、早稲田大学動物実験委員会の承認を得たうえで行われた (承認番号 2014-A098)。

##### 2. 運動プロトコル

予備飼育後、水に慣れさせるために 1 日 10 分間の予備水泳運動を 3 日間行わせた。その後、ラットをコントロール群 (C 群,  $n=8$ )、エクササイズ群 (E 群,  $n=8$ )、エクササイズ+水素摂取群 ( $Ex+H_2$  群,  $n=8$ ) に無作為に振り分けた。C 群はケージ内で通常通り飼育を行い、Ex 群および  $Ex+H_2$  群には、水温  $32 \sim 35^\circ C$  に設定されたプラスチックバケツにおいて、無負荷での強制水泳運動を合計 6 時間 (3 時間運動・45 分休憩・3 時間運動) 行わせた。また、水泳

運動では、4匹を同時に泳がせた。実験1と同様に、Ex+H<sub>2</sub>群およびEx群の運動時には、それぞれMgH<sub>2</sub>、あるいはMg(OH)<sub>2</sub>を水に溶解させ、溶存水素濃度の測定にはメチレンブルー溶液を用いた。

### 3. 分析方法

#### 1) 組織の摘出および保存

休憩を挟んだ6時間の水泳運動を行った直後に、ペントバルビタールナトリウムの投与(60~100mg/kg 体重)による完全麻酔下で解剖を行った。解剖時には、腹大静脈から血液を採取し、その後、上腕三頭筋の摘出を行った。採取した血液は、抗凝固剤(EDTA-2Na)入りの真空採血管(VP-NA070K, TERUMO)に移して氷上に静置した後に、4°C、3000rpmで10分間遠心して血漿を得た。一方、摘出した上腕三頭筋は、生理食塩水で血液を洗い流した後液体窒素中で瞬間凍結させた。得られた血漿および骨格筋サンプルは、分析まで-80°Cのフリーザーで保存した。血漿は過酸化脂質(TBARS)およびIL-6の分析に、骨格筋はTBARS, 抗酸化酵素活性(SOD・GPX)およびHSP70の分析に供した。

#### 2) ホモジナイズおよびホモジネイトの調節

ホモジナイズおよびホモジネイトの調節は、実験1と同様の方法で行った。

#### 3) TBARS の測定

血漿および骨格筋 TBARS の測定は実験1と同様の方法で行った。

#### 4) 抗酸化酵素活性の測定

##### 4)-1 SOD 活性

SOD 活性の測定は実験1と同様の方法で行った。

#### 4)-2 GPX 活性

GPX 活性の測定は実験 1 と同様の方法で行った.

#### 5) IL-6 の測定

IL-6 の測定は実験 1 と同様の方法で行った.

#### 6) HSP70 の測定

HSP70 の測定は, 実験 1 と同様の方法で行った.

#### 4. 統計処理

各々の値は全て平均値±標準誤差で示した. 統計処理は SPSS(日本 IBM 社)を用いて行った. 3 群間の比較には, 一元配置の分散分析を用い, 多重比較には Tukey の HSD test を用いた. 統計学的有意水準は危険率 5%未満とした.

### 【結果】

#### 1. ラットの体重変化

実験 2 で用いた SD ラットの飼育前後での体重変化を Table 4-1 に示した. 飼育開始時の体重は, C 群 :  $136.9 \pm 2.9$ g, Ex 群 :  $133.4 \pm 2.2$ g, Ex+H<sub>2</sub> 群 :  $135.9 \pm 2.2$ g であり, 飼育開始後(運動開始直前)の体重は, C 群 :  $244.3 \pm 5.8$ g, Ex 群 :  $241.9 \pm 4.9$ g, Ex+H<sub>2</sub> 群 :  $243.8 \pm 2.5$ g であり, 群間で統計的な差は見られなかった.

#### 2. 溶存水素濃度

水泳運動時の溶存水素濃度の変化は, Fig. 4-1 に示した. 水素濃度は, 運動開始時には

0.4ppm 付近に達し、最大で 0.9ppm 付近まで上昇した。その後、運動開始 120 分後、180 分後には、0.6ppm, 0.5ppm まで緩やかに減少した。

### 3. TBARS

血漿 TBARS は、C 群 :  $8.0 \mu\text{M}$ , Ex 群 :  $7.4 \mu\text{M}$ , Ex+H<sub>2</sub> 群 :  $8.5 \mu\text{M}$  であり、3 試行間において統計的な差は見られなかった (Fig. 4-2)。同様に、上腕三頭筋の TBARS においても、C 群 :  $0.41 \mu\text{M}/\text{mg protein}$ , Ex 群 :  $0.39 \mu\text{M}/\text{mg protein}$ , Ex+H<sub>2</sub> 群 :  $0.41 \mu\text{M}/\text{mg protein}$  であり、試行間に差は見られなかった (Fig. 4-3)。

### 4. 抗酸化酵素活性

抗酸化酵素活性は、SOD, GPX とともに、C 群を 100 とした場合の活性比で示した (Fig. 4-4, Fig. 4-5)。Ex 群, Ex+H<sub>2</sub> 群の SOD 活性は、C 群に対し、それぞれ 86%, 82% であり、3 群の間に有意差は認められなかった (Fig. 4-4)。しかしながら、運動を行った両群、とりわけ Ex+H<sub>2</sub> 群では C 群と比べて活性が減少する傾向にあった ( $p=0.08$ )。

同様に、上腕三頭筋の GPX 活性は、Ex 群 : 94%, Ex+H<sub>2</sub> 群 : 109% であり、3 試行間に差は見られなかった (Fig. 4-5)。

### 5. IL-6

血漿 IL-6 は、それぞれ Optimal Density (O.D.) で示した (Fig. 4-6)。IL-6 の値は、C 群 : 0.0399, Ex 群 : 0.0494, Ex+H<sub>2</sub> 群 : 0.0422 であり、3 群の間に有意差は見られなかった。

### 6. HSP70

上腕三頭筋の HSP70 含量は、C 群 :  $2.7\text{ng}/\text{mg protein}$ , Ex 群 :  $2.7\text{ng}/\text{mg protein}$ , Ex+H<sub>2</sub> 群 :  $3.0\text{ng}/\text{mg protein}$  であり、3 群の間に有意差は見られなかった (Fig. 4-7)。

Table 4-1. Body weight change in rats.

	C	Ex	Ex+H2
<b>Body weight (g)</b>			
5-weeks	136.9±2.9	133.4±2.2	135.9±2.2
7-weeks	244.3±5.8	241.9±4.9	243.8±2.5

Values are means ± SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake(Ex+H2) groups.

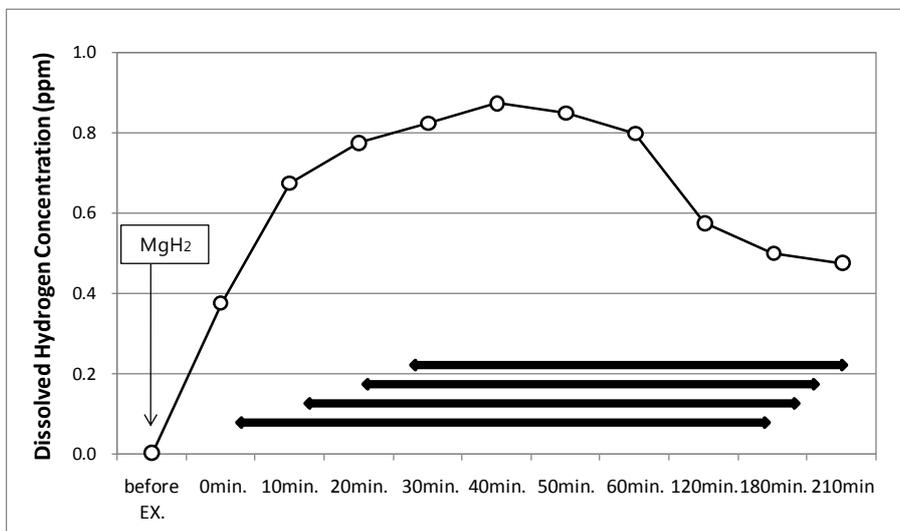


Fig.4-1. Time course of dissolved hydrogen concentration during swimming exercise. The measurement was carried out by methylene blue solution. Values are expressed as mean . The bold arrows in the figure indicate the exercise time.

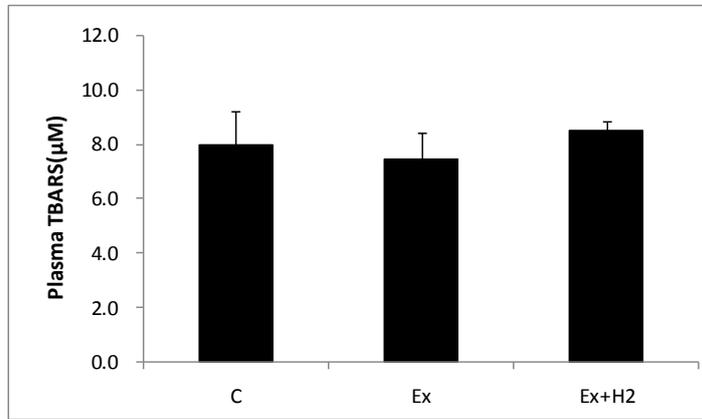


Fig.4-2. Plasma thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) immediately after 6h(3h-3h) swimming exercise. Values are means $\pm$ SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake(Ex+H2) groups.

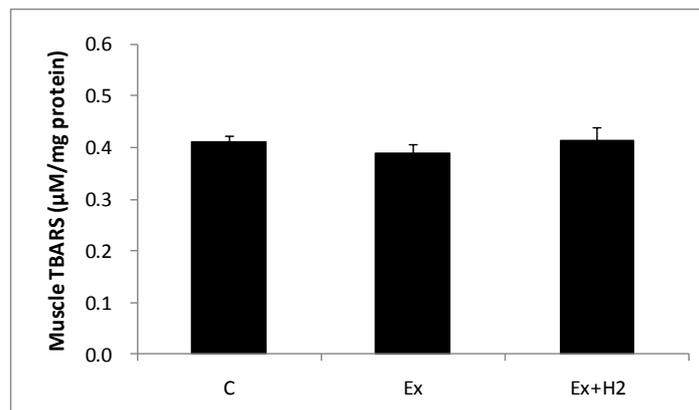


Fig.4-3. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in rat triceps muscle immediately after 3h(3h-3h) swimming exercise. Values are means $\pm$ SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake (Ex+H2) groups.

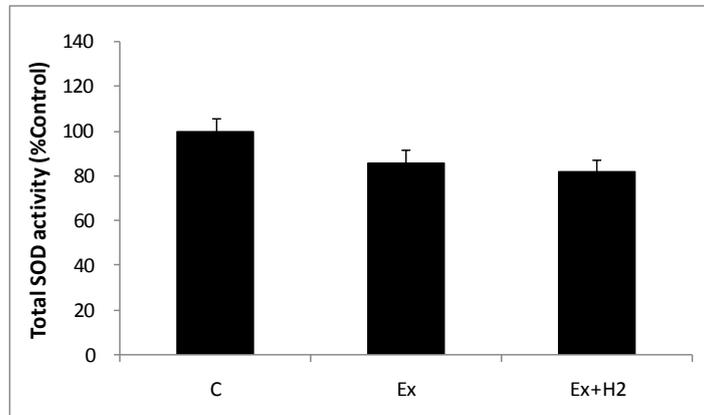


Fig.4-4. Superoxide dismutase(SOD) activity in rat triceps muscle immediately after 6h(3h-3h) swimming exercise. Values are means $\pm$ SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake (Ex+H2) groups.

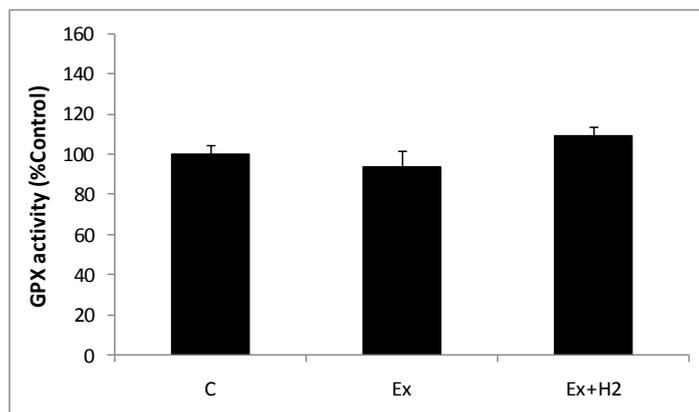


Fig.4-5. Glutathione peroxidase(GPX) activity in rat triceps muscle immediately after 6h(3h-3h) swimming exercise. Values are means $\pm$ SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake (Ex+H2) groups.

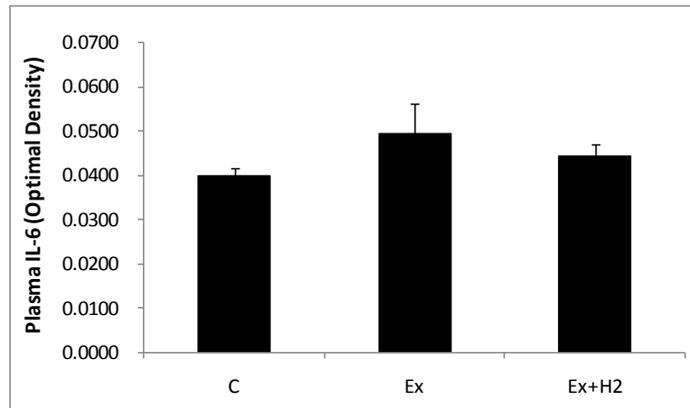


Fig.4-6. Plasma IL-6 level immediately after 6h(3h-3h) swimming exercise. Values are means  $\pm$  SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake (Ex+H2) groups.

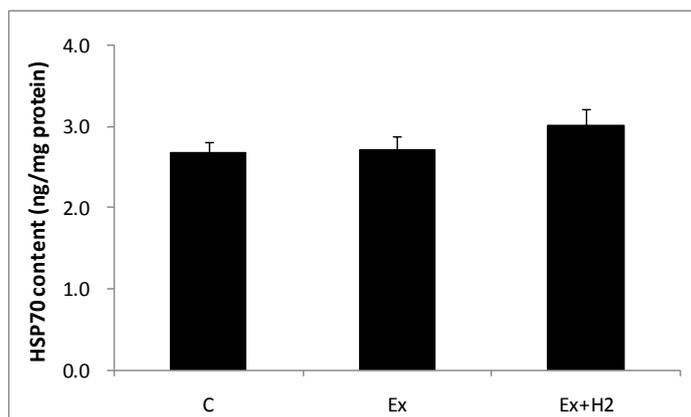


Fig.4-7. HSP70 content in rat triceps muscle immediately after 6h(3h-3h) swimming exercise. Values are means  $\pm$  SEM for 8 rats in each of the Control (C), Exercise(Ex), and Exercise with Hydrogen intake (Ex+H2) groups.

## 【考察】

本実験では、無負荷での低強度長時間運動(Ex 群)を行わせたものの、酸化ストレス指標およびその関連指標において有意差は見られなかった。また、Ex+H<sub>2</sub>群においても他の2群との間に有意差は認められなかった。

生体の酸化ストレス指標として、酸化生成物を測定する方法は頻繁に用いられている。中でも、TBARS は酸化ストレスの指標として最もよく測定される項目の一つであり、脂質の過酸化によって生じるマロンジアルデヒド(Malondialdehyde : MDA)などのチオバルビツール酸反応性物質を測定するものである。TBARS は、運動と活性酸素の研究が始められた当初から使用されており(Brady et al. 1979)、現在でも運動時の酸化ストレスを示す指標として頻繁に利用されている。

これまでに、ラットを対象とした強制水泳運動が血漿 TBARS に及ぼす影響について検討した論文はいくつか存在している。Higashida ら(2011)は、休憩を挟んで行う合計6時間の水泳運動により、運動直後の TBARS が約80%増加することを明らかにしている。また、Wang ら(2006)も、無負荷での強制水泳運動を疲労困憊まで行わせることで、運動直後の血清 TBARS が安静時と比べて有意に増加することを報告している。さらに、Deminice ら(2012)は、体重の4%の重量を負荷した60分間の水泳運動により、運動直後の血漿 TBARS レベルが上昇することを明らかにしており、TBARS レベルの上昇は、運動2時間後、6時間後においても持続することを報告している。

同様に、ラット骨格筋の TBARS レベルに及ぼす水泳運動の影響についてもいくつか検討が行われている。Balci ら(2012)の研究では、無負荷での疲労困憊運動後の腓腹筋 TBARS の増加は観察していないものの、その他の研究では運動後の TBARS レベルの増加を観察している。Venditti ら(1996)らは、体重の2%の重量を負荷した疲労困憊運動直後の腓腹筋 TBARS が、安静時と比べて2倍近くまで増加することを明らかにしている。また、Goncher(2005)は、体重の10%の重量を負荷した30分間の水泳運動後に、腓腹筋(赤筋、白

筋)の TBARS 値が安静群と比べて増加することを報告している。加えて, Deminice ら(2012)は, 体重の 4%の重量を負荷した 60 分間の水泳運動により, 運動直後のヒラメ筋および腓腹筋(赤筋)の TBARS が増加することを報告するとともに, 腓腹筋とヒラメ筋では運動後の TBARS の値が全く異なる時系列変化を示すことを明らかにしている。

これらの先行研究の多くは, 運動直後に筋の摘出を行っており, 本実験における筋摘出のタイミングも同様であった。また, 先に示したように, 血漿 TBARS についても運動直後の上昇を観察している論文が多く, 本実験の採血のタイミングも同様であった。それゆえ, これらの先行研究と本実験における結果の違いを説明することは困難である。今後は, 運動強度や時間, あるいは運動の回数などの条件を変更し, TBARS レベルを確実に上昇させる運動プロトコルを作成する必要があると言える。

ところで, 本実験における SOD 活性は, 3 群の間に差は見られなかったものの, Ex+H<sub>2</sub> 群では, C 群と比べて減少傾向を示した(p=0.08)。この結果は実験 1 の結果とは相反するものである。その要因として, 運動強度やラットの週齢の違いが影響した可能性が考えられる。実験 1 および 2 では, 先行研究の実験プロトコルに基づいて運動を行わせるために, それぞれ異なる週齢のラットを用いた。また, 本実験では実験 1 において Ex 群の TBARS が上昇していなかったことから, 無負荷での長時間運動を実施した。しかしながら, 2 つの実験ではともに, Ex 群における SOD 活性の変化は見られなかった。

これまでの先行研究では, 水泳運動直後の SOD 活性が減少傾向(p=0.07)を示したとする研究や(Yu et al. 2012), 活性が低下したことを示す研究(Gonchar. 2005)などが存在する。しかしながら, なぜ水素を摂取させた群において SOD 活性が変化する傾向にあったかについては研究がなく, その理由は不明である。

一方, GPX においても, 3 群の間に有意差は認められなかった。これまでに, ラットを用いた一過性のトレッドミル運動が GPX 活性を上昇させることが報告されているものの(Ji et al. 1988), 水泳運動が GPX 活性に及ぼす影響について検討した論文は非常に少なく, 体

重の3%の重量を負荷した疲労困憊運動により GPX 活性が上昇したとする研究 (Yu et al. 2012) は存在するが、その数は限られるというのが現状である。

また、本実験では、運動による IL-6 の増加は観察されず、水素摂取の影響も見られなかった。これまでに、一過性運動が IL-6 応答に及ぼす影響について、数多くの研究が行われている。その研究の多くがヒトを対象としたものであるが、運動時間と血漿 IL-6 は高い相関を示すことが明らかにされており (Fischer. 2006a)、また、IL-6 の増加は運動直後にピーク値に達し、その数時間後に安静値に戻るとの報告がなされていることから (Febbraio et al. 2005)、本実験における運動時間および採血のタイミングは適切であったと思われる。しかしながら、本実験では、IL-6 の発現量増加に関与する酸化ストレスが生じなかったことから、生体負荷が低過ぎた可能性がある。

IL-6 と同様に、本実験では運動による HSP70 の増加は観察されず、水素摂取の影響も見られなかった。HSP70 は、最も広く研究されている HSP であり、HSP70 の増加は、抗酸化酵素の活性化と同様に、運動時の生化学的ストレスを反映するものと考えられている (Locke. 1997)。ゆえに、本実験においても、運動誘発性酸化ストレスに対する生理的応答として HSP70 が増加するものと思われた。しかしながら、本実験では、運動による HSP70 の増加は観察できず、水素摂取の影響を検討することはできなかった。HSP70 は、一過性運動後に増加することが報告されているものの (Hernando et al. 1997., Tupling et al. 2007)、水素摂取による影響を検討した論文は見られない。この影響を検討するためには、まずは酸化ストレスを生じさせるための運動プロトコルを考える必要がある。

本研究の2つの実験では、IL-6, HSP70 ともに異なる実験結果を示した。その理由として、SOD 活性と同様に運動強度の違いやラットの週齢の違いを挙げることができる。しかし、運動実施時の週齢の違いはわずかに1週間であり、このことが実験結果に及ぼす影響は小さいと思われる。そのため、実験結果の相違は、運動強度の違いによりもたらされた可能性が高い。実際に、IL-6 と HSP70 の発現を増加させる共通のメカニズムとして筋グリコー

ゲンの枯渇や、グリコーゲンの生物学的利用能(Bioavailability)の低下といった代謝的要因が挙げられている(Pedersen et al.2008., Morton et al.2009). これまでに、水素がエネルギー代謝に影響を及ぼす可能性を示唆した論文もいくつか存在していることから、運動と同時に行う水素摂取は、骨格筋のエネルギー代謝に影響を及ぼしている可能性も考えられる。しかしながら、本研究では、運動時の血中エネルギー基質や、ホルモン動態、あるいは運動終了後の筋および肝グリコーゲン量などの測定を行っていないため、一過性の水素摂取がエネルギー代謝に及ぼす影響について明らかにすることはできない。

#### 【結論】

休憩を挟んで行う合計6時間の水泳運動は、酸化ストレスおよびその関連指標に影響せず、同様に、水素を摂取させても測定結果に影響しないことが明らかとなった。

## 第4章 総括と今後の課題

実験1では、体重の4%の重量を負荷した60分間の水泳運動を行わせたものの、酸化ストレスおよびその関連指標に変化は見られなかった。しかしその一方で、運動と同時に水を摂取させた群では、SOD活性が高まり、血漿IL-6および骨格筋HSP70の値が増加した。また、実験2では、低強度長時間運動時の酸化ストレスおよびその関連指標において、全ての群で差は見られなかった。

本研究では、水素は運動時の酸化ストレスおよびその関連指標の増加を抑制するとの仮説を立てた。しかしながら、実験1および実験2において酸化ストレス指標であるTBARSの上昇を観察することはできなかった。先行研究では、体重の4%の重量を負荷した60分間の水泳運動(Deminice et al. 2012)、自重による6時間の水泳運動(Higashida et al. 2011)において、運動直後のTBARSが増加することが示されている。そのため、これらの先行研究と本実験における結果の違いを説明することは難しい。

酸化ストレス指標と同様に、本研究では、抗酸化酵素活性、IL-6およびHSP70においても、運動による影響は観察されなかった。その要因の一つとして、運動により酸化ストレスが生じなかったことが挙げられる。このことは、血漿TBARSおよび骨格筋TBARSの値が上昇しなかったことから明らかである。従って、今後は運動強度や時間、あるいは運動の回数などの条件を変更し、生体への負荷をより高める必要があると言える。

以上のように、本研究では、酸化ストレスおよびその関連指標に対する運動の効果は観察できなかった。一方で、Ex+H<sub>2</sub>群では、実験1においてSOD活性、IL-6およびHSP70の増加が観察された。しかしながら、実験2では水素摂取による影響は見られなかったことから、2つの実験結果は全く異なるものであった。

先行研究において、水素の摂取がSOD活性を高めたとの報告がなされており(Qian et al. 2010., Nakao et al. 2010)、実験1で見られたSOD活性の上昇は、水素がSODの活性因子である銅や亜鉛、マンガなどと結合したことで、SODの活性を高めた可能性も考えられ

た。しかし、実験 2 では、SOD 活性の上昇は観察されず、反対に SOD 活性は減少傾向を示したことから、実験 1 で見られた SOD 活性の上昇は、水素が SOD の活性調節に直接影響していないことを示している。そのため、2 つの実験結果の違いには、運動強度やあまり考えられないがラットの週齢の違いが影響していた可能性がある。

SOD 活性と同様に、IL-6 および HSP70 で示された実験結果の違いには、運動強度が影響した可能性が高い。実際に、IL-6 と HSP70 の発現を増加させる共通のメカニズムとして、筋グリコーゲンの枯渇や、グリコーゲンの生物学的利用能の低下といった代謝的要因が挙げられている (Morton et al. 2009)。

ところで、これまでに報告された水素の正の効果は多岐に亘っており、中にはエネルギー代謝を促進したとする報告もなされている (Kamimura et al. 2011)。この論文では、糖および脂質代謝を促進する FGF21 の mRNA 量の増加を観察しており、併せて  $\dot{V}O_2$  および  $\dot{V}CO_2$  が増加することが明らかにされている。しかしながら、本研究では、酸化ストレスに着目して測定項目を選択したことから、運動時の水素摂取が骨格筋のエネルギー代謝に及ぼす影響について検討することはできなかった。今後は、運動時の血中エネルギー基質やホルモン濃度の変化、あるいは筋および肝グリコーゲン量などの測定を行うことで、運動時の水素摂取がエネルギー代謝に及ぼす影響について明らかにする必要がある。

本研究では、酸化ストレス指標である TBARS が運動により上昇しなかったため、結果の解釈が困難なものとなった。そのため、今後の課題として、TBARS が確実に上昇する運動プロトコルを確立する必要があると言える。また、本研究では酸化ストレス指標として TBARS のみを測定したが、今後は、カルボニル化タンパク質や 8-OHdG といった他の指標と併せて測定を行い、運動時の酸化ストレスの程度について複合的に判断していく必要があるだろう。

もう一つの課題として、今後、経皮的にどの程度の水素が取り込まれたのかを明らかにする必要がある。水素は拡散性が高く、体内に留まらないことから測定するのが困難であ

る。しかしながら、これまでに、水素電極を直接生体組織に挿入する方法(Kamimura et al. 2011)や、採血後、血液をアルミ容器に移し、ガスクロマトグラフィーにより分析する方法(Ohsawa et al. 2007)が採用されていることから、これらの方法を用いて水素濃度の測定を行う必要があると思われる。

## 参考文献

Aoki K, Nakao A, Adachi T, Matsui Y, Miyakawa S. Pilot study: Effects of drinking hydrogen-rich water on muscle fatigue caused by acute exercise in elite athletes. *Med Gas Res.* 2012;2(1):12.

Bailey DM, Williams C, Betts JA, Thompson D, Hurst TL. Oxidative stress, inflammation and recovery of muscle function after damaging exercise: effect of 6-week mixed antioxidant supplementation. *Eur J Appl Physiol.* 2011;111(6):925-36.

Balci SS, Pepe H. Effects of gender, endurance training and acute exhaustive exercise on oxidative stress in the heart and skeletal muscle of the rat. *Chin J Physiol.* 2012;55(4):236-44.

Beaton LJ, Allan DA, Tarnopolsky MA, Tiidus PM, Phillips SM. Contraction-induced muscle damage is unaffected by vitamin E supplementation. *Med Sci Sports Exerc.* 2002;34(5):798-805.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973;134(3):707-16.

Brady PS, Brady LJ, Ullrey DE. Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat. *J Nutr.* 1979;109(6):1103-9.

Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen TL, MacLean DA, Pedersen BK. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol.* 1997;499 ( Pt 3):833-41.

Bryant RJ, Ryder J, Martino P, Kim J, Craig BW. Effects of vitamin E and C supplementation either alone or in combination on exercise-induced lipid peroxidation in trained cyclists. *J Strength Cond Res.* 2003;17(4):792-800.

Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C. 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.* 2001;31(6):745-53.

Connolly DA, Lauzon C, Agnew J, Dunn M, Reed B. The effects of vitamin C supplementation on symptoms of delayed onset muscle soreness. *J Sports Med Phys Fitness*. 2006;46(3):462-7.

Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982;107(4):1198-205.

Deminice R, Jordao AA. Creatine supplementation reduces oxidative stress biomarkers after acute exercise in rats. *Amino Acids*. 2012;43(2):709-15.

Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1978;45(6):927-32.

Dixon BJ, Tang J, Zhang JH. The evolution of molecular hydrogen: a noteworthy potential therapy with clinical significance. *Med Gas Res*. 2013;3(1):10.

Dole M, Wilson FR, Fife WP. Hyperbaric hydrogen therapy: a possible treatment for cancer. *Science*. 1975;190(4210):152-4.

Febbraio MA, Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Hiscock N, Pedersen BK. IL-6 activates HSP72 gene expression in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002a;296(5):1264-6.

Febbraio MA, Steensberg A, Walsh R, Koukoulas I, van Hall G, Saltin B, Pedersen BK. Reduced glycogen availability is associated with an elevation in HSP72 in contracting human skeletal muscle. *J Physiol*. 2002b;538(Pt 3):911-7.

Febbraio MA, Pedersen BK. Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc Sport Sci Rev*. 2005;33(3):114-9.

Fischer CP, Hiscock NJ, Penkowa M, Basu S, Vessby B, Kallner A, Sjöberg LB, Pedersen BK. Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. *J Physiol*. 2004;558(Pt 2):633-45.

Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?

Exerc Immunol Rev. 2006a;12:6-33.

Fischer CP, Hiscock NJ, Basu S, Vessby B, Kallner A, Sjoberg LB, Febbraio MA, Pedersen BK. Vitamin E isoform-specific inhibition of the exercise-induced heat shock protein 72 expression in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2006b;100(5):1679-87.

Gharib B, Hanna S, Abdallahi OM, Lepidi H, Gardette B, De Reggi M. Anti-inflammatory properties of molecular hydrogen: investigation on parasite-induced liver inflammation. *C R Acad Sci III*. 2001;324(8):719-24.

Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV, Sastre J, Vina J, Garcia-del-Moral L. Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA*. 2003;289(19):2503-4.

Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL, Vina J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*. 2005;567(Pt 1):113-20.

Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Vina J. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(1):142-9.

Gonchar O. Muscle fiber specific antioxidative system adaptation to swim training in rats: influence of intermittent hypoxia. *J Sports Sci Med*. 2005;4(2):160-9.

Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373(1):30-5.

Hernando R, Manso R. Muscle fibre stress in response to exercise: synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. *Eur J Biochem*. 1997;243(1-2):460-7.

Higashida K, Kim SH, Higuchi M, Holloszy JO, Han DH. Normal adaptations to exercise despite protection against oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.

2011;301(5):E779-84.

Hong Y, Chen S, Zhang JM. Hydrogen as a selective antioxidant: a review of clinical and experimental studies. *J Int Med Res.* 2010;38(6):1893-903.

Huang CS, Kawamura T, Toyoda Y, Nakao A. Recent advances in hydrogen research as a therapeutic medical gas. *Free Radic Res.* 2010;44(9):971-82.

Hudson MB, Hosick PA, McCaulley GO, Schrieber L, Wrieden J, McNulty SR, Triplett NT, McBride JM, Quindry JC. The effect of resistance exercise on humoral markers of oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* 2008;40(3):542-8.

Jackson MJ, Khassaf M, Vasilaki A, McArdle F, McArdle A. Vitamin E and the oxidative stress of exercise. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1031:158-68.

Jessup JV, Horne C, Yarandi H, Quindry J. The effects of endurance exercise and vitamin E on oxidative stress in the elderly. *Biol Res Nurs.* 2003;5(1):47-55.

Ji LL, Stratman FW, Lardy HA. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch Biochem Biophys.* 1988;263(1):150-60.

Ji LL. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(2):142-52.

Kaikkonen J, Kosonen L, Nyssonen K, Porkkala-Sarataho E, Salonen R, Korpela H, Salonen JT. Effect of combined coenzyme Q10 and d-alpha-tocopheryl acetate supplementation on exercise-induced lipid peroxidation and muscular damage: a placebo-controlled double-blind study in marathon runners. *Free Radic Res.* 1998;29(1):85-92.

Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, Kitawaki J, Imai S, Nakano K, Ohta M, Adachi T, Obayashi H, Yoshikawa T. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res.* 2008;28(3):137-43.

Kamimura N, Nishimaki K, Ohsawa I, Ohta S. Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing hepatic FGF21 and stimulating energy metabolism in db/db mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(7):1396-403.

Kato S, Saitoh Y, Iwai K, Miwa N. Hydrogen-rich electrolyzed warm water represses wrinkle formation against UVA ray together with type-I collagen production and oxidative-stress diminishment in fibroblasts and cell-injury prevention in keratinocytes. *J Photochem Photobiol B*. 2012;106:24-33.

Khassaf M, McArdle A, Esanu C, Vasilaki A, McArdle F, Griffiths RD, Brodie DA, Jackson MJ. Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *J Physiol*. 2003;549(Pt 2):645-52.

Koren A, Sauber C, Sentjurc M, Schara M. Free radicals in tetanic activity of isolated skeletal muscle. *Comp Biochem Physiol B*. 1983;74(3):633-5.

Kosmidou I, Vassilakopoulos T, Xagorari A, Zakynthinos S, Papapetropoulos A, Roussos C. Production of interleukin-6 by skeletal myotubes: role of reactive oxygen species. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26(5):587-93.

Li J, Wang C, Zhang JH, Cai JM, Cao YP, Sun XJ. Hydrogen-rich saline improves memory function in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease by reduction of oxidative stress. *Brain Res*. 2010;1328:152-61.

Linder N, Rapola J, Raivio KO. Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Invest*. 1999;79(8):967-74.

Locke M. The cellular stress response to exercise: role of stress proteins. *Exerc Sport Sci Rev*. 1997;25:105-36.

Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett*. 1974;42(1):68-72.

Makanae Y, Kawada S, Sasaki K, Nakazato K, Ishii N. Vitamin C administration attenuates overload-induced skeletal muscle hypertrophy in rats. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013;208(1):57-65.

Malech HL, Gallin JI. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med*. 1987;317(11):687-94.

McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Morrow JD, Shooter LA, Holmes S, Heward C, Henson DA. Effect of alpha-tocopherol supplementation on plasma homocysteine and oxidative stress in highly trained athletes before and after exhaustive exercise. *J Nutr Biochem*. 2005;16(9):530-7.

McArdle A, Dillmann WH, Mestril R, Faulkner JA, Jackson MJ. Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. *FASEB J*. 2004;18(2):355-7.

Medved I, Brown MJ, Bjorksten AR, Murphy KT, Petersen AC, Sostaric S, Gong X, McKenna MJ. N-acetylcysteine enhances muscle cysteine and glutathione availability and attenuates fatigue during prolonged exercise in endurance-trained individuals. *J Appl Physiol* (1985). 2004;97(4):1477-85.

Moopanar TR, Allen DG. Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca<sup>2+</sup> sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37 degrees C. *J Physiol*. 2005;564(Pt 1):189-99.

Morton JP, Kayani AC, McArdle A, Drust B. The exercise-induced stress response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans. *Sports Med*. 2009;39(8):643-62.

Nakao A, Toyoda Y, Sharma P, Evans M, Guthrie N. Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome-an open label pilot study. *J Clin Biochem Nutr*. 2010;46(2):140-9.

Nakazato K, Ochi E, Waga T. Dietary apple polyphenols have preventive effects against lengthening contraction-induced muscle injuries. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(3):364-72.

Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Opiela SJ, Morrow JD. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon. *J Appl Physiol* (1985). 2002;92(5):1970-7.

Novelli GP, Bracciotti G, Falsini S. Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice. *Free Radic Biol Med*. 1990;8(1):9-13.

Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med*. 2007;13(6):688-94.

Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377(4):1195-8.

Ohta S. Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(5):586-94.

Ohta S. Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacol Ther*. 2014.

Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*. 2008;88(4):1379-406.

Pedersen BK. Muscular interleukin-6 and its role as an energy sensor. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(3):392-6.

Peternejl TT, Coombes JS. Antioxidant supplementation during exercise training: beneficial or detrimental? *Sports Med*. 2011;41(12):1043-69.

Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008;88(4):1243-76.

Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(5):942-50.

Qian L, Cao F, Cui J, Huang Y, Zhou X, Liu S, Cai J. Radioprotective effect of hydrogen in cultured cells and mice. *Free Radic Res*. 2010;44(3):275-82.

Rokitzki L, Logemann E, Huber G, Keck E, Keul J. alpha-Tocopherol supplementation in racing cyclists during extreme endurance training. *Int J Sport Nutr*. 1994;4(3):253-64.

- Schoenfeld MP, Ansari RR, Zakrajsek JF, Billiar TR, Toyoda Y, Wink DA, Nakao A. Hydrogen therapy may reduce the risks related to radiation-induced oxidative stress in space flight. *Med Hypotheses*. 2011;76(1):117-8.
- Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* (1985). 1995;79(3):675-86.
- Sharman IM, Down MG, Sen RN. The effects of vitamin E and training on physiological function and athletic performance in adolescent swimmers. *Br J Nutr*. 1971;26(2):265-76.
- Shi P, Sun W. A hypothesis on chemical mechanism of the effect of hydrogen. *Med Gas Res*. 2012;2(1):17.
- Shimouchi A, Nose K, Mizukami T, Che DC, Shirai M. Molecular hydrogen consumption in the human body during the inhalation of hydrogen gas. *Adv Exp Med Biol*. 2013;789:315-21.
- Shindoh C, DiMarco A, Thomas A, Manubay P, Supinski G. Effect of N-acetylcysteine on diaphragm fatigue. *J Appl Physiol* (1985). 1990;68(5):2107-13.
- Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1985;311(1152):617-31.
- Sies H. Biological redox systems and oxidative stress. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(17):2181-8.
- Silva LA, Pinho CA, Silveira PC, Tuon T, De Souza CT, Dal-Pizzol F, Pinho RA. Vitamin E supplementation decreases muscular and oxidative damage but not inflammatory response induced by eccentric contraction. *J Physiol Sci*. 2010;60(1):51-7.
- Simon-Schnass I, Pabst H. Influence of vitamin E on physical performance. *Int J Vitam Nutr Res*. 1988;58(1):49-54.
- Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Osada T, Febbraio MA, Pedersen BK. IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(6):E1272-8.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production

from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 2002;277(47):44784-90.

Teixeira VH, Valente HF, Casal SI, Marques AF, Moreira PA. Antioxidants do not prevent postexercise peroxidation and may delay muscle recovery. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(9):1752-60.

Thompson D, Williams C, McGregor SJ, Nicholas CW, McArdle F, Jackson MJ, Powell JR. Prolonged vitamin C supplementation and recovery from demanding exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2001;11(4):466-81.

Travaline JM, Sudarshan S, Roy BG, Cordova F, Leyenson V, Criner GJ. Effect of N-acetylcysteine on human diaphragm strength and fatigability. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(5):1567-71.

Tupling AR, Bombardier E, Stewart RD, Vigna C, Aqui AE. Muscle fiber type-specific response of Hsp70 expression in human quadriceps following acute isometric exercise. *J Appl Physiol (1985).* 2007;103(6):2105-11.

Vassilakopoulos T, Karatza MH, Katsaounou P, Kollintza A, Zakyntinos S, Roussos C. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. *J Appl Physiol (1985).* 2003;94(3):1025-32.

Venditti P, Di Meo S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys.* 1996;331(1):63-8.

Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MA. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(11):1389-94.

Wang JJ, Shieh MJ, Kuo SL, Lee CL, Pan TM. Effect of red mold rice on antifatigue and exercise-related changes in lipid peroxidation in endurance exercise. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;70(2):247-53.

Yfanti C, Nielsen AR, Akerstrom T, Nielsen S, Rose AJ, Richter EA, Lykkesfeldt J, Fischer CP, Pedersen BK. Effect of antioxidant supplementation on insulin sensitivity in response to endurance exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;300(5):E761-70.

Yu SH, Huang HY, Korivi M, Hsu MF, Huang CY, Hou CW, Chen CY, Kao CL, Lee RP, Lee SD, Kuo CH. Oral Rg1 supplementation strengthens antioxidant defense system against exercise-induced oxidative stress in rat skeletal muscles. *J Int Soc Sports Nutr.* 2012;9(1):23.

Zerba E, Komorowski TE, Faulkner JA. Free radical injury to skeletal muscles of young, adult, and old mice. *Am J Physiol.* 1990;258(3 Pt 1):C429-35

## 謝辞

本修士論文は、早稲田大学スポーツ科学研究科運動生理学研究室において行った研究をまとめたものです。

本学の村岡功教授には、本研究科進学から本論文の完成まで、終始御指導御鞭撻を頂きましたことを心より感謝致します。また、副査を快く引き受けて頂き、本論文に対する貴重なコメントを頂きました本学樋口満教授、坂本静男教授に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、あたたかい御支援と御助言を頂きました運動生理学研究室の池村司助手と前助手であり現国立健康・栄養研究所健康増進研究部の丸藤祐子研究員をはじめ、本論文の作成や大学院生活を様々な方面から支えて頂いた村岡研究室の皆様我心より感謝致します。また、本学高橋将記助手には本論文に対する貴重な意見を頂きましたことを厚く御礼申し上げます。さらに、本研究に関して常に御懇意なる御指導ならびに御校閲を賜りました東田一彦助教に心から御礼申し上げます。

最後に、本論文作成のために、大学院生活を温かく見守り支えてくれた家族に心から感謝の意を表します。