

2019 年度 修士論文

断続性歩行が閉経後女性の
酸化・還元バランスに与える影響

早稲田大学大学院スポーツ科学研究科

スポーツ医科学研究領域

5018A043-3

関 泰一

研究指導教員：宮下 政司 准教授

目次

第1章 緒言.....	1
第2章 方法.....	5
2-1 被験者.....	5
2-2 実験デザイン.....	6
2-3 実験プロトコール.....	6
2-4 血液検査項目.....	7
2-5 統計解析.....	8
第3章 結果.....	9
3-1 酸化ストレスマーカーおよび副次評価血液項目の初期値.....	9
3-2 酸化ストレスマーカーの 1 日の経時変化.....	10
3-3 酸化ストレスマーカーと中性脂肪との関連性.....	13
3-4 酸化ストレスマーカーと血液組成の変化率との関連性.....	15
第4章 考察.....	21
4-1 初期値の酸化ストレスマーカーの状態.....	21
4-2 酸化ストレスマーカーの 1 日の経時変化.....	22
4-3 抗酸化力と中性脂肪.....	24
4-4 酸化・還元バランスと白血球数.....	25
第5章 結論.....	27
参考文献.....	28
謝辞.....	33

第1章 緒言

世界一の高齢社会を迎えているわが国は、世界に先駆け「健康長寿社会」の実現を提唱している[1]。世界保健機構（WHO）が2018年に発表した統計では、日本人女性の平均寿命は世界1位の87歳であるが、健康寿命は75歳の世界2位であり、平均寿命と健康寿命の差は男性が「9年」に対し、女性は「12年」である[2]。この「介護が必要な期間短縮」への取り組みは医療費の削減だけではなく、生活の質が高く、希望ある健全な地域・社会づくりに不可欠である。

がん、心疾患、脳血管疾患、糖尿病、慢性閉塞性肺疾患などの生活習慣と関わりの強い疾患は死亡原因の約6割を占めている[3]。生活習慣病には酸化ストレスが深く関わっており[4][5]、急性高血圧症の予測因子には多くの生化学検査項目の中で、血清中の活性酸素代謝物測定（Derivatives-Reactive Oxygen Metabolites : d-ROMs）のみが有効であったことも報告されている[6]。また、酸化ストレスは100以上の疾患に関与していることが知られている[7]。したがって、健康寿命延伸には酸化ストレスを軽減することが重要と考えられる。

酸化ストレスの原因物質である活性酸素種（Reactive Oxygen Species : ROS）は触媒を介在する場合と、そうでない場合を含めて、細胞の内外で産生される[8]。ROSは酸素分子由来の反応性に富む分子群の総称で、ミトコンドリアの電子伝達系における副産物やNADPHオキシダーゼなどの酵素によって産生される。ROSは活性酸素群と不対電子を持つフリーラジカル群の二つに分類されている。前者は一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、過酸化水素 (H_2O_2)など、後者は一酸化窒素 (NO^\cdot)、アルコキシリラジカル (LO^\cdot)などであり、両方の要素を持つのが、スーパーオキシド ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシリラジカル (OH^\cdot)

などであるが、いずれも強い酸化力を有していることは同じである。ROSは体内に侵入したウイルスや細菌を攻撃する免疫反応、有害物質を除去する解毒反応、細胞内シグナル伝達[9]など生命を維持する生理機能だけではなく、子孫を残すという生物が存続するために非常に重要な役割も果たしている[10]。その反面、その強力な酸化力で脂質、タンパク質、糖質、細胞膜やヌクレオチドなどを酸化損傷する危険な面も有している[8]。

これらの ROS が細胞や細胞外組織にダメージを与えないようにするために、生体内には抗酸化機能を備えている。抗酸化物質には生体内で作り出す「内因性抗酸化物質」と食事から摂取する「外因性抗酸化物質」がある。前者の内因性抗酸化物質はスーパーオキシドディスクターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシターゼなどの酵素系抗酸化物質と血液中のアルブミン、尿酸などであり、後者の外因性抗酸化物質はビタミン、ミネラル類、親脂質性化合物などである[11][12][13]。これらの抗酸化物質が ROS から細胞を防御しているが、生体内の抗酸化防御力を上回る活性酸素・フリーラジカルの産生が起こり、その状態が継続すると生体内の酸化・還元バランスが崩れ、酸化ストレス状態となる。

酸化・還元バランスを整えるための有効な方法として、身体活動が注目されている。しかし、運動時には酸素摂取量が通常の 10~15 倍に達し、その結果として生体内の ROS の産生量は当然増加する。そこで、スポーツは健康に悪いと言われた時期もあった。身体活動が生体内の酸化・還元バランスを整える機序を説明する上で、抗酸化物質の産生に関わるストレス応答性転写因子である Nrf2 (Nuclear factor erythroid2-related factor2) とその制御因子である Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)が挙げられる。ROS の増加を感じると Keap1 は Nrf2 を解離する。Keap1 から解離された Nrf2

は核に移動し抗酸化剤応答配列である ARE (Antioxidant Response Element) を介して抗酸化物質の転写を誘導する[14]。つまり ROS そのものが抗酸化物の産生を賦活化させていることになる。これは Nrf2 系に見られる DNA が関与する極めて優れたシグナル伝達の例である。この生体内の酸化防御システムにより、適度な身体活動を継続的に行うことが、抗酸化物質産生能力の増強をもたらし、結果として酸化ストレスが軽減されるということが示されている[15]。また、身体活動が多いほど最大酸素摂取量は高まり、最大酸素摂取量が高いほど酸化・還元バランスが良い状態になり、酸化ストレスは低くなることが報告されている[16]。

加齢と酸化ストレスマーカーとの関係では、暦年齢が進むほど活性酸素代謝物の d-ROMs 値は上昇し、生体抗酸化能の BAP 値は低下することが報告されている[4][17]。また、閉経後女性は女性ホルモンの 1 つであるエストロゲンの分泌量が低下する。エストロゲン自体が抗酸化作用をもち、ROS を消去するとともに、運動後の炎症を緩和することが明らかとなっている[18]。加齢と共にエストロゲンの抗酸化作用などの恩恵を受けにくくなり、心血管疾患リスク要因である酸化 LDL や中性脂肪が増加する可能性がある。しかし、閉経後女性の身体活動量と酸化・還元バランスの関係では、身体活動量が多いほど活性酸素代謝物（主にヒドロペルオキシド : ROOH）の d-ROMs 値と脂質過酸化マーカーのマロンジアルデヒド濃度が低いことが示され、定期的な身体活動は、閉経後女性の抗酸化力を増加させ、酸化ストレスに対する保護作用があることが報告されている[19]。さらに、低強度の身体活動を週あたり 90 分（1 回に 30~60 分を週に 2 回）を 12 週間継続した結果、閉経後女性の酸化・還元バランスを改善させたことが報告されている[20]。

日本動脈硬化学会および日本医師会が発行している脂質代謝改善のための

身体活動指針では、中等度強度の身体活動を 1 日 30 分以上、1 週あたり 90 分以上行うことが推奨されている[21]。しかし、厚生労働省の調査では、1 回 30 分以上の運動を週 2 回以上実施し、1 年以上継続している者の割合は 30.6%（男性：35.1%、女性：27.4%）であり[22]、しかもわが国の中年女性を対象とした身体活動調査では、1 日の身体活動の 90%以上が 1 分以下の断続的な身体活動である[23]。さらに、女性は加齢とともに体力と身体活動が低下することが報告されている[24]。これらの現状を勘案すると、日常的に運動習慣がない者や体力低下がみられる高齢者にとって、身体活動指針で定められている様な、まとまった運動時間を定期的に確保し実施することは困難である。

このような背景から、1 回の運動時間を短く区切った断続性運動と連続性運動の脂質代謝改善効果の比較は、国内外で多数研究されてきている[25][26][27][28]。近年の閉経後女性を対象とした研究では、1.5 分間の歩行を 20 セット行う断続性歩行が食後の中性脂肪濃度を低下させると報告されている[28][29]。この断続性歩行（1.5 分間の歩行を 15 分間隔で 20 回の積算 30 分）と連続性歩行（1 回に連続 30 分）が食後の中性脂肪濃度の低減効果が同等であったことが示されている[29]。しかし、1 日を通して細切れで行う断続性歩行が、閉経後女性の酸化・還元バランスにどのような影響を及ぼすのかを検討した研究は行われていない。また、閉経後女性に対して、一定期間にわたる身体活動が酸化・還元バランスに与える影響は検討されているが、1 日の中で 30 分間の身体活動が閉経後女性の酸化・還元バランスに与える影響についての検討はほとんど行われていない。

そこで、本研究では、閉経後女性を対象とし、1 日の中で断続性歩行が酸化・還元バランスに与える影響について検討を行うことを目的とした。

第2章 方法

2-1 被験者

被験者は、年齢 65 歳から 76 歳の外科的疾患および喫煙習慣を有しない閉経後女性 11 名であった。服用は降圧剤のみが 1 名、降圧剤と導眠剤が 1 名、脂質低下剤のみが 1 名の計 3 名であった。被験者には、研究の目的、方法および実験に伴う苦痛、予想される危険性について十分な説明を行い、同意書に署名したうえで実験に参加して頂いた。また、個人の自由意思による参加を尊重し、途中で研究から離脱する権利を有することを伝えた。本研究は、ヘルシンキ宣言を尊重し、被験者の人権および利益の保護に配慮した研究計画を行い、早稲田大学研究倫理委員会の承認を得て行われた（承認番号：2017-103）。実験に参加した被験者の身体的特性は年齢 71 ± 3 歳、身長 1.55 ± 0.04 m、体重 53.7 ± 7.0 kg、体格指数 22.5 ± 3.3 kg/m²、腹囲 80.1 ± 10.7 cm、収縮期血圧 125 ± 16 mmHg、拡張期血圧 76 ± 10 mmHg であった（表 1）。

表 1 被験者の身体的特性

	平均値±標準偏差	範囲
年齢 (歳)	71 ± 3	65-76
身長 (m)	1.55 ± 0.04	1.46-1.61
体重 (kg)	53.7 ± 7.0	37.9-62.0
体格指数 (kg/m ²)	22.5 ± 3.3	17.0-29.0
腹囲 (cm)	80.1 ± 10.7	59.3-96.5
収縮期血圧 (mmHg)	125 ± 16	109-152
拡張期血圧 (mmHg)	76 ± 10	63-91

N=11、

2-2 実験デザイン

本研究は①安静試行、②断続性歩行試行の 2 試行を無作為化交差試験にて行った。各試行間には少なくとも 6 日以上の間隔をあけて行った。実験の前日は激しい運動および飲酒を控え、各試行の前日の食事を統一するように被験者に依頼した。事前に各被験者に配布した食事記入用紙に各試行の前日の食事内容、調理方法、調理に用いた食材や調味料の重さを記入してもらうよう依頼した。栄養計算ソフト（エクセル栄養君 Ver8、建帛社）を用いて前日の食事記録から、タンパク質、脂質、炭水化物の摂取量を計算した。実験当日の空腹時の血液項目への影響を考慮し、各試行の前日の身体活動を測定した。身体活動量の測定のため、1 回目の試行の前日から 2 回目の試行終了まで活動量計（ライフコーダ EX、スズケン）の装着を依頼した。

2-3 実験プロトコール

被験者は 8 時 20 分に実験室に来室し、9 時より朝食、12 時より昼食を摂取した。各試行とも朝食と昼食のメニューは同一メニューとし、摂取時間は各試行間で同じ時間で食べてもらうよう依頼した。また、水分摂取量も 1 回目の試行と 2 回目の試行で統一した。安静試行では実験開始の 9 時から終了の 17 時まで実験室内で座位姿勢にて安静を保った。断続性歩行試行では朝食摂取後に 30 分の座位安静を保った後、10 時より 17 時まで約 15 分おきに 1.5 分間歩行を計 20 セット行った。歩行を行った時間帯は、午前中に計 7 回、10 時、10 時 15 分、10 時 30 分、10 時 45 分、11 時 15 分、11 時 30 分、11 時 45 分、午後は計 13 回、13 時 15 分、13 時 30 分、13 時 45 分、14 時、14 時 15 分、14 時 30 分、14 時 45 分、15 時 15 分、15 時 30 分、15 時 45 分、16 時、16 時 15 分、16 時 30 分であった。歩行の速さは、事前の測定より得ら

れた被験者自身が早歩きと感じる速さの歩行運動 (4.2 ± 1.2 km/h) で行った。歩行中は運動強度の把握および安全管理のため、被験者の胸部に心拍計を装着し (RCX3, Polar 社製)、30 秒おきに心拍数を測定した。安静試行の心拍数の平均は 67 ± 7 bpm、歩行時の平均心拍数は 87 ± 23 bpm であった。断続性歩行試行では、歩行運動以外の時間は座位安静とした。血液採取は各試行共に 9 時、11 時、13 時、15 時、17 時に真空採血管を用いて、被験者の上腕静脈から行った。実験プロトコールを図 1 に示す。

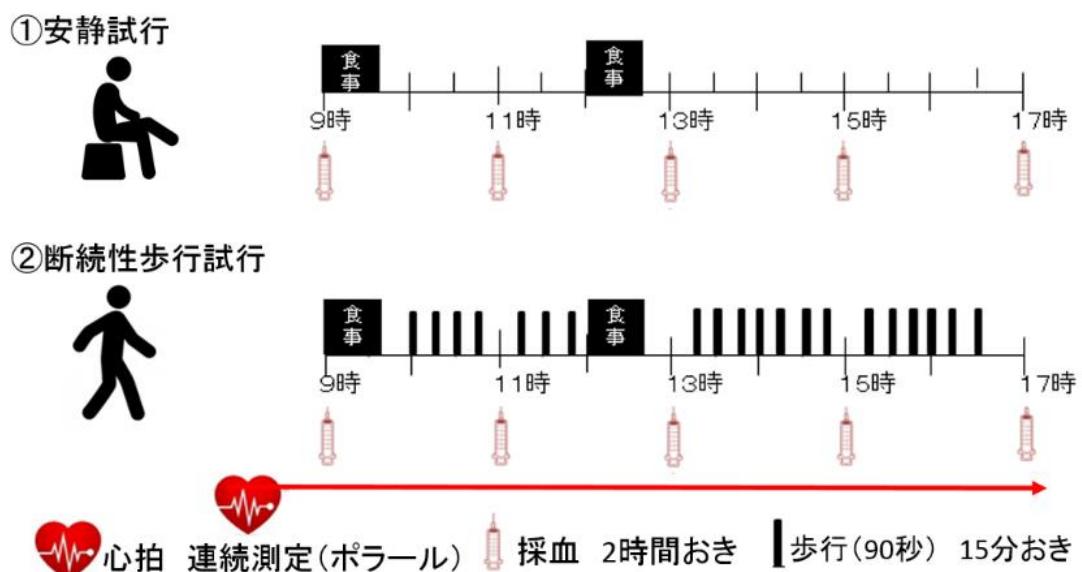


図 1 実験プロトコール

2-4 血液検査項目

血液は、各試行の 9 時、11 時、13 時、15 時、17 時に被験者の上腕静脈より採取をした。主評価項目の酸化ストレスマーカーは酸化度の指標として活性酸素代謝物 (Derivatives-Reactive Oxygen Metabolites : d-ROMs) [30]、抗酸化力の指標として生体抗酸化能 (Biological Antioxidant Potential : BAP) [31] の測定を行った。酸化・還元バランスを評価する為、BAP 値を d-ROMs

値で除して得られる酸化還元指数（Redox Index）[4]も主評価項目とした。副次評価項目としては、中性脂肪、赤血球数、白血球数、血小板数、ヘマトクリットの測定を行った。

2-5 統計解析

すべての統計処理には統計解析ソフト（SPSS Statistics version 26、IBM社製）を用いた。本研究で得られたデータは平均値±標準偏差で表した（ただし、図は平均値±標準誤差）。試行間における初期値の評価項目の比較は、対応のあるt検定により検定した。試行（測定条件）と時間を要因とした測定項目の変化については、二元配置の分散分析によって検定した。また、変数間の関連性についてはピアソンの相関係数によって検定した。有意水準はいずれも $p < 0.05$ とし、p値が5%以上で10%未満の場合は傾向とした。

第3章 結果

3-1 酸化ストレスマーカーおよび副次評価血液項目の初期値

主評価項目である血清 d-ROMs 値、BAP 値、および Redox Index の初期値には 2 試行間に有意な差は認められなかった（表 2）。また、血液検査項目の副次評価項目である中性脂肪、赤血球数、白血球数、血小板およびヘマトクリットの初期値も 2 試行間に有意な差は認められなかった。

表 2 試行間の酸化ストレスマーカーと副次評価血液検査項目の初期値

	安静試行	断続性歩行試行	p ¹
d-ROMs (unit carr)	410±60	404±52	0.620
BAP (μmol/L)	2385±214	2348±233	0.659
Redox Index	5.96±1.03	5.90±0.91	0.760
中性脂肪 (mg/dl)	112.3±82.8	113.5±99.6	0.867
赤血球数 (万個/μl)	430±24	429±30	0.956
白血球数 (個/μl)	4327±1055	4136±1399	0.447
血小板 (万個/μl)	22.5±3.1	22.4±3.6	0.919
ヘマトクリット (mg/dl)	39.6±2.7	39.7±3.3	0.868

N=11、

¹ t 検定における統計解析

3-2 酸化ストレスマーカーの1日の経時変化

d-ROMs 値の1日の平均は安静試行で 400 ± 55 carr unit、断続性歩行試行で 396 ± 51 carr unit であり、各試行間で試行による主効果 ($p=0.608$) は認められなかった。また、時間による主効果 ($p=0.002$) は認められたが、試行と時間による交互作用 ($p=0.869$) は認められなかった（図2）。

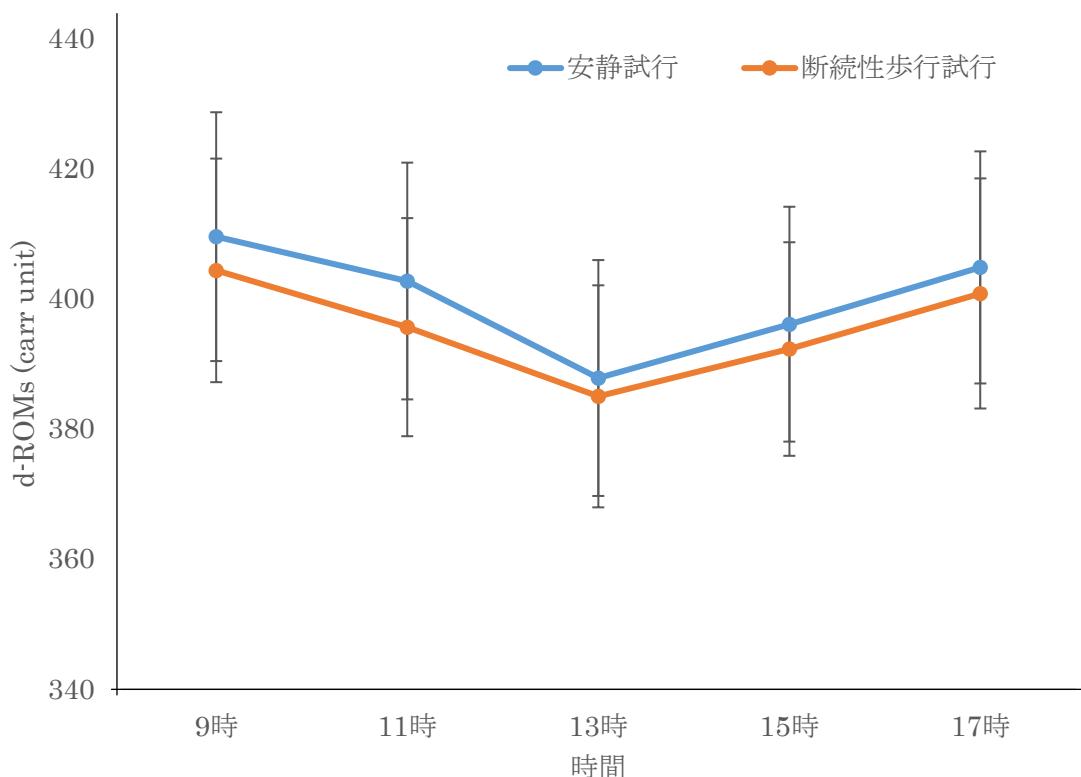


図2 活性酸素代謝物 (d-ROMs) の推移

(N=11、平均土標準誤差)

二元配置の分散解析：試行による主効果 $p=0.608$ 、時間による主効果 $p=0.002$ 、試行と時間による交互作用 $p=0.869$

BAP 値の 1 日の平均は安静試行で $2314 \pm 200 \text{ } \mu\text{mol/l}$ 、断続性歩行試行で $2298 \pm 183 \text{ } \mu\text{mol/l}$ であり、各試行間で試行による主効果 ($p=0.796$)、時間による主効果 ($p=0.249$)、試行と時間による交互作用 ($p=0.439$) は認められなかった（図 3）。

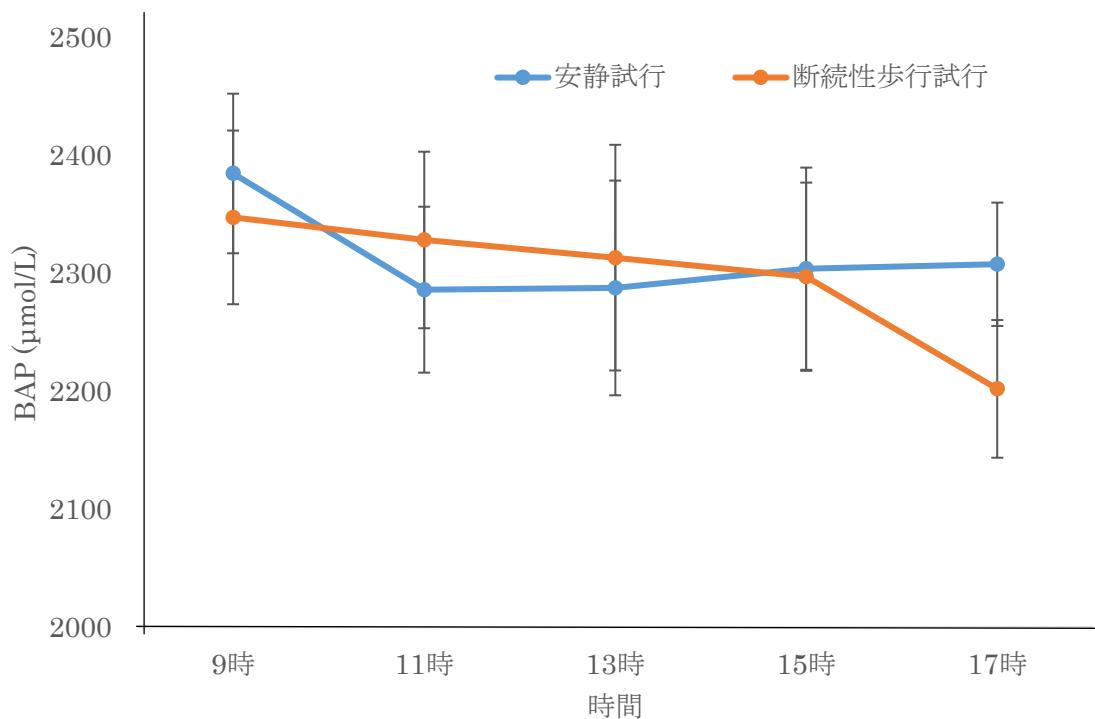


図 3 生体抗酸化能 (BAP) の推移

(N=11、平均±標準誤差)

二元配置の分散解析：試行による主効果 $p=0.796$ 、時間による主効果 $p=0.249$ 、試行と時間による交互作用 $p=0.439$

Redox Index の 1 日の平均は安静試行で 5.88 ± 0.82 、断続性歩行試行で 5.91 ± 0.90 であり、各試行間で試行による主効果 ($p=0.816$) は認められなかつた。また、時間による主効果 ($p=0.026$) は認められたが、試行と時間による交互作用 ($p=0.575$) は認められなかつた (図 4)。

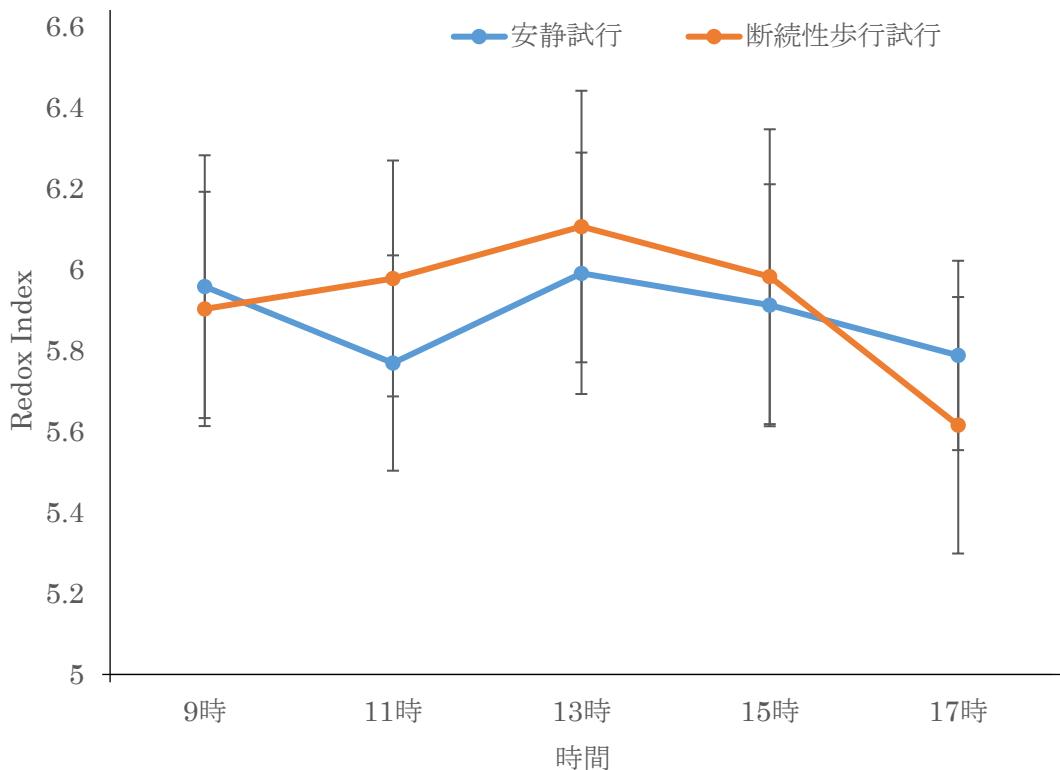


図 4 Redox Index の推移

(N=11、平均土標準誤差)

二元配置の分散解析：試行による主効果 $p=0.816$ 、時間による主効果 $p=0.026$ 、

試行と時間による交互作用 $p=0.575$

3-3 酸化ストレスマーカーと中性脂肪との関連性

1日のd-ROMs平均値と中性脂肪平均値の相関係数は安静試行 ($r=-0.312$ 、 $p=0.379$)、断続性歩行試行 ($r=-0.290$ 、 $p=0.417$) であり、両試行共に関連性は認められなかった。1日のBAP平均値と中性脂肪平均値の相関係数は安静試行で負の相関傾向を示し ($r=-0.626$ 、 $p=0.053$) (図5)、断続性歩行試行でも負の相関を示した。 $(r=-0.730$ 、 $p=0.017$) (図6)。1日のRedox Index平均値と中性脂肪平均値の相関係数は安静試行 ($r=-0.111$ 、 $p=0.761$)、断続性歩行試行 ($r=-0.192$ 、 $p=0.595$) であり、各試行共に関連性は認められなかつた。

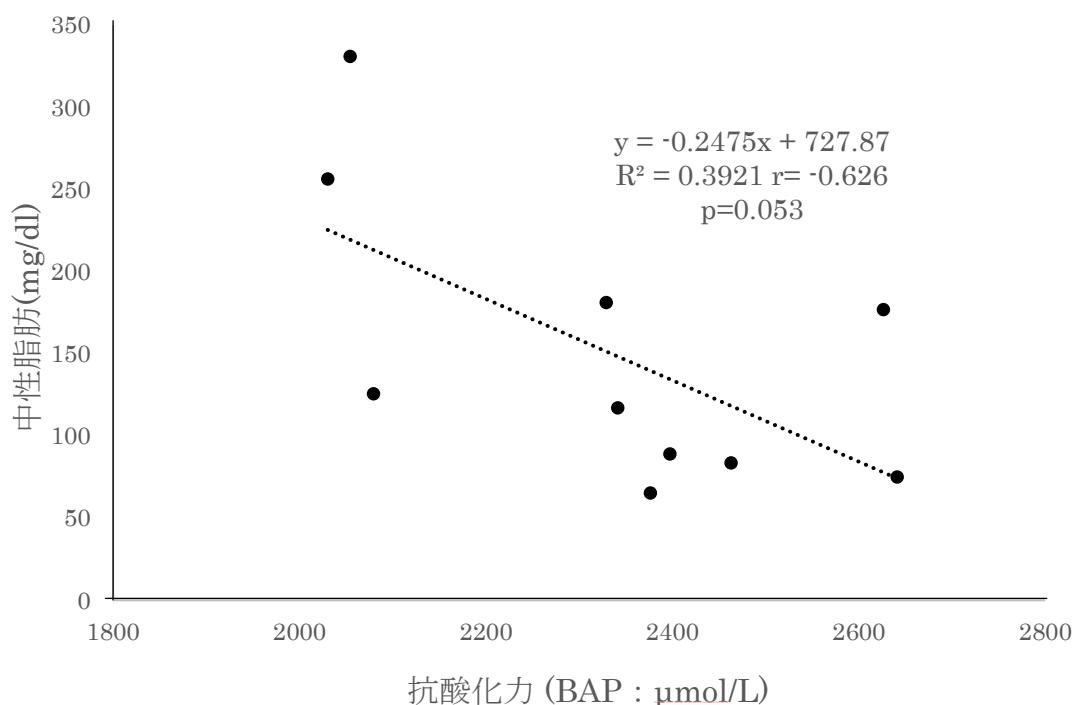


図5 安静試行における生体抗酸化能 (BAP) と中性脂肪との関連

(N=10：中性脂肪の初期値のカットオフ値を300mg/dl以下としたため)

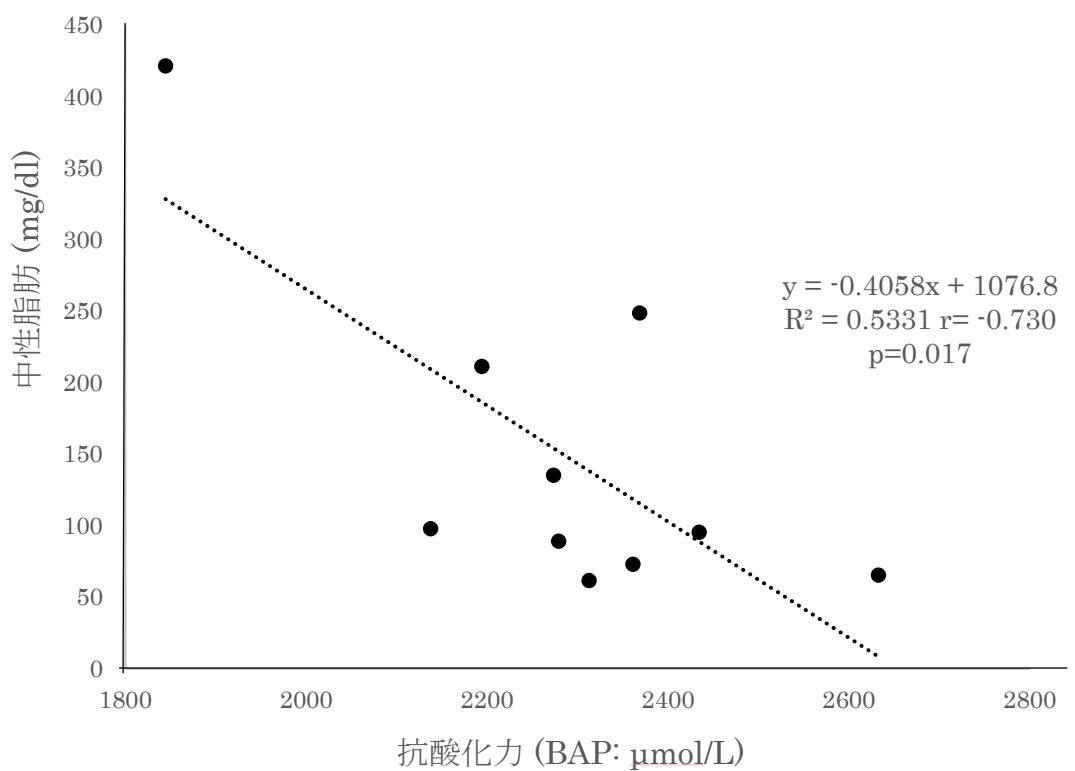


図 6 断続性歩行試行における生体抗酸化能 (BAP) と中性脂肪との関連

(N=10 : 中性脂肪の初期値のカットオフ値を 300mg/dl 以下としたため)

3-4 酸化ストレスマーカー初期値と血液組成の変化率との関連性

安静試行と断続性歩行試行において、9時の開始時と17時の終了時の血液組成変化率には有意な差は認められなかつたが、白血球数のみが両試行とともに変化率が上昇していた（表3）。

表3 試行間の血液組成の変化率

	安静試行	断続性歩行試行	p ¹
赤血球数変化率 (%)	- 3.06±3.66	- 3.79±3.57	0.500
白血球数変化率 (%)	20.79±11.85	28.82±21.90	0.179
血小板数変化率 (%)	- 0.63±5.13	- 2.46±3.48	0.177
ヘマトクリット変化率 (%)	- 3.24±4.24	- 4.33±3.62	0.377

N=11、平均値±標準偏差 ¹t検定における統計解析

（両試行共に9時と17時の変化率）

安静試行と断続性歩行試行の2試行間において、白血球数変化率に統計的な差が認められなかつた。

安静試行において、d-ROMs 初期値と白血球数上昇率との相関係数は $r=0.087$ であり、関連性は認められなかつた ($p=0.799$) (図7)。BAP 初期値と白血球数変化率との相関係数は $r= - 0.614$ であり、負の相関を示した ($p=0.045$) (図8)。Redox Index 初期値と白血球数の増加率との相関係数は $r= - 0.349$ であり、関連性は認められなかつた ($p=0.293$) (図9)。

断続性歩行試行において、d-ROMs 初期値と白血球数上昇率との相関係数は $r=0.477$ であり、関連性は認められなかつた ($p=0.138$) (図10)。BAP 初期値と白血球数変化率との相関係数は $r= - 0.393$ であり、関連性は認められ

なかつた ($p=0.232$) (図 11)。Redox Index 初期値と白血球数の増加率との相関係数は $r= -0.663$ であり負の相関を示した ($p=0.026$) (図 12)。

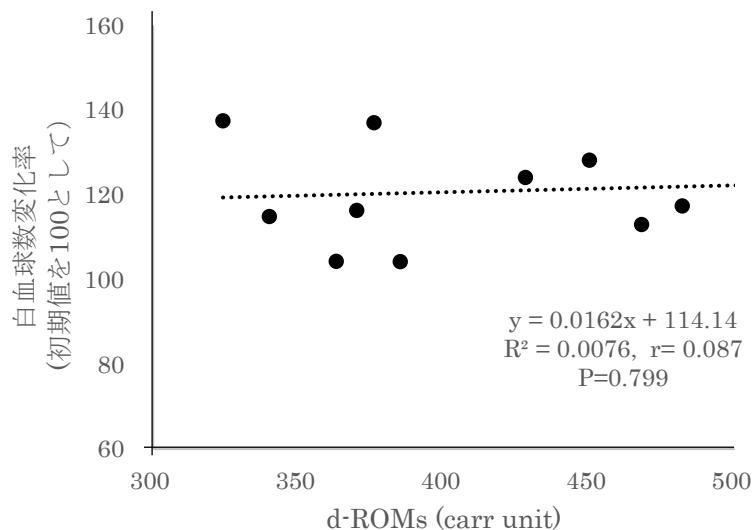


図 7 安静試行：活性酸素代謝物 (d-ROMs) 初期値と白血球数変化率との関連
(N=11)

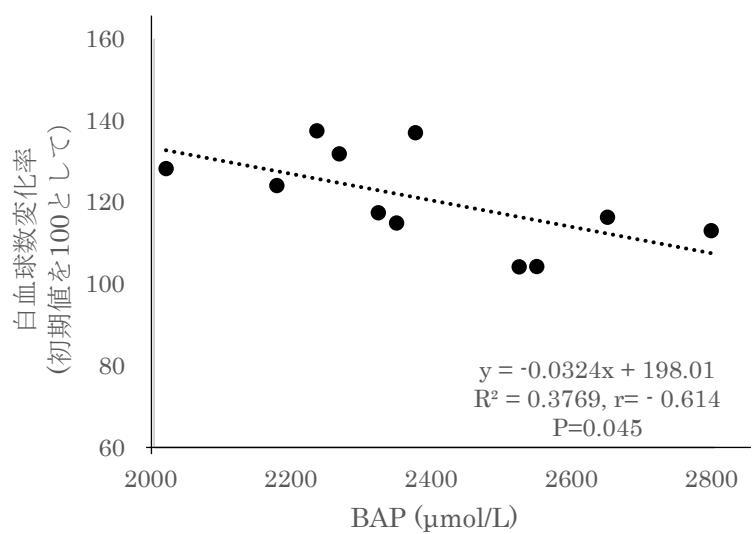


図 8 安静試行：生体抗酸化能 (BAP) 初期値と白血球数変化率との関連
(N=11)

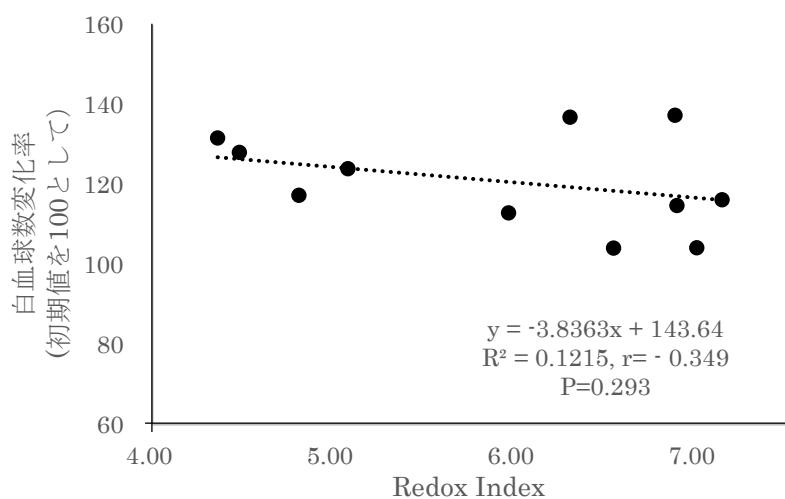


図 9 安静試行：酸化還元指数（Redox Index）初期値と白血球数変化率との関連

(N=11)

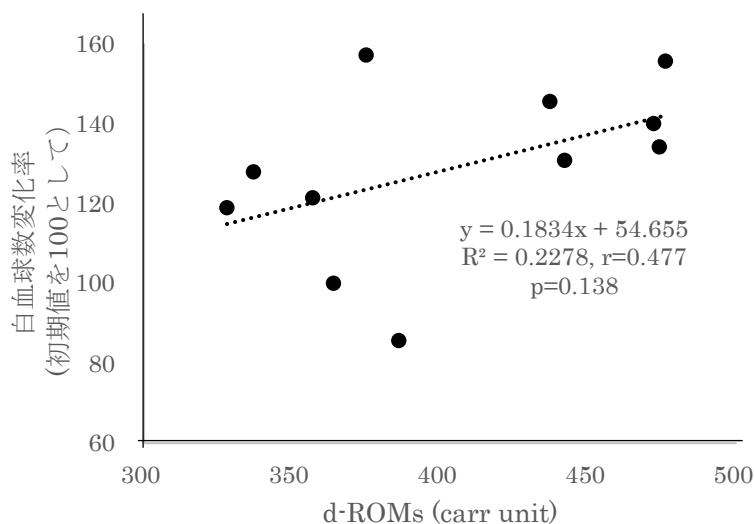


図 10 断続性歩行試行：活性酸素代謝物（d-ROMs）初期値と白血球数変化率との関連

(N=11)

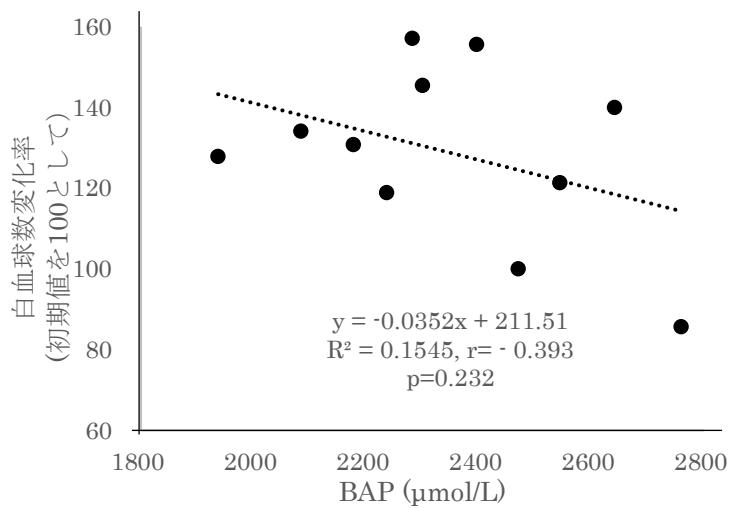


図 11 断続性歩行試行：生体抗酸化能（BAP）初期値と白血球数変化率との関連

(N=11)

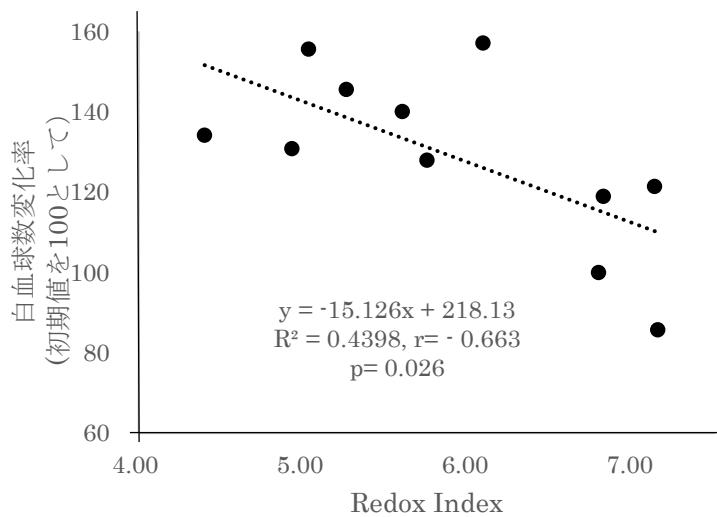


図 12 断続性歩行試行：酸化還元指数（Redox Index）初期値と白血球数変化率との関連

(N=11)

d-ROMs 初期値が 400 carr unit 未満の群 (N=6) と 400 carr unit 以上の群 (N=5) との 2 つの群において、白血球数の変化率を比較検討したところ、d-ROMs 初期値が 400 carr unit 未満の群において、安静試行での白血球上昇率は 19%、断続性歩行試行での白血球上昇率は 19% と両群に差が認められなかった ($p=0.939$) (図 13)。しかし、d-ROMs 初期値が 400 carr unit 以上の酸化ストレスが亢進している群では、安静試行での白血球数上昇率は 23% に対して、断続性歩行試行での白血球数上昇率は 41% であり、断続性歩行試行において白血球数の上昇率が高い傾向を示した ($p=0.072$) (図 14)。

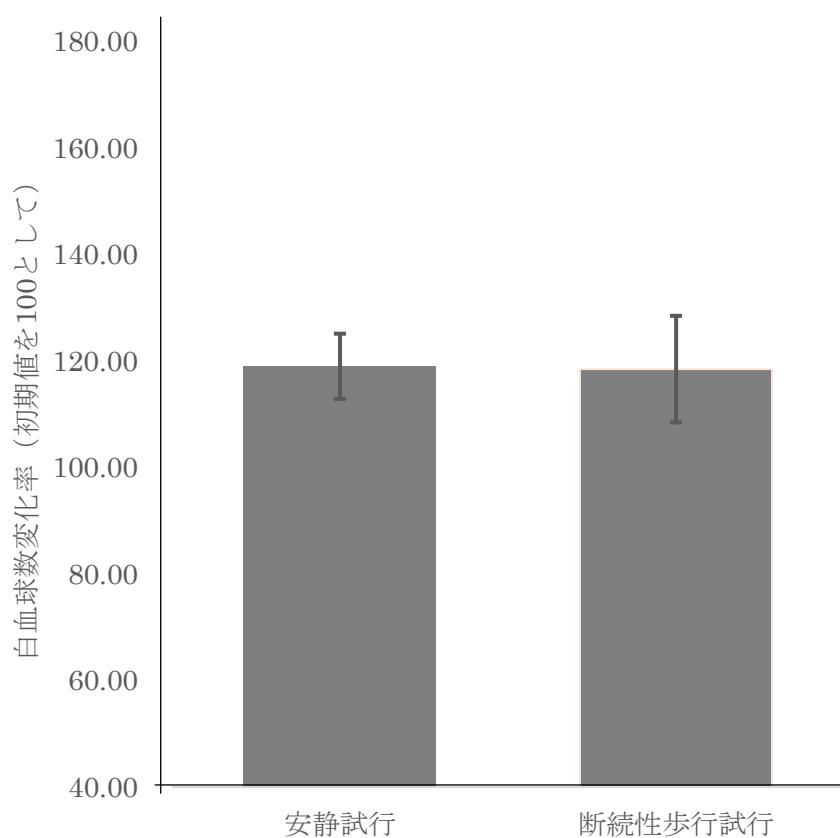


図 13 活性酸素代謝物 (d-ROMs) が 400 未満の群の白血球数変化率

(N=6、平均土標準誤差、t 検定における統計解析 : $p=0.939$)

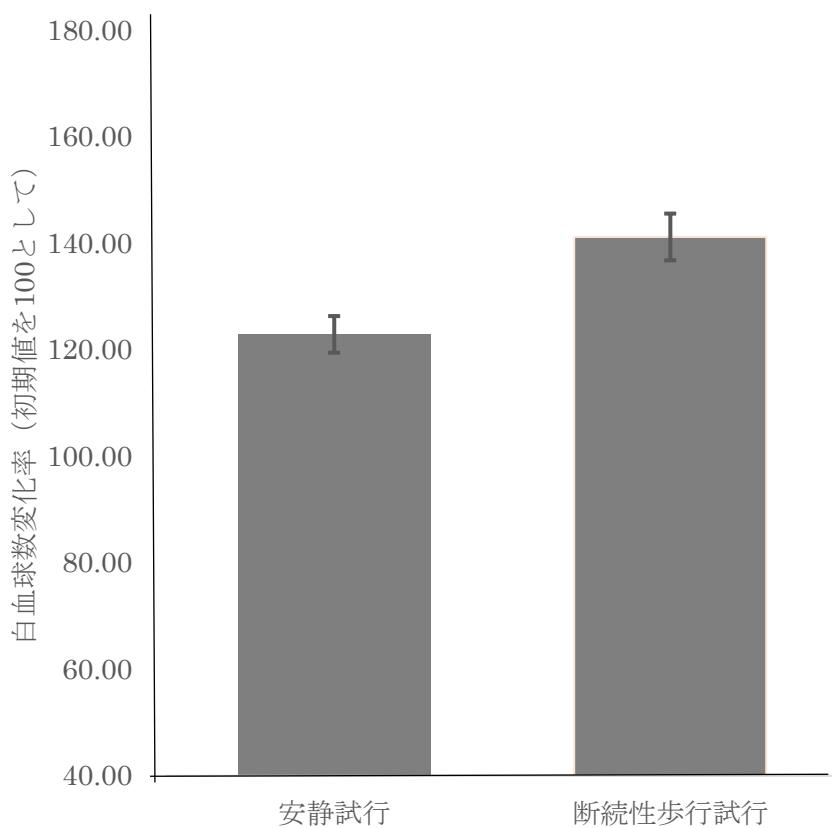


図 14 活性酸素代謝物 (d-ROMs) が 400 以上の群の白血球数変化率

(N=5、平均±標準誤差、t 検定における統計解析 : p=0.072)

第4章 考察

本研究は、閉経後女性に対して1回1.5分という短時間の細切れ歩行を15分おきに20回、一日累計30分行う身体活動が酸化・還元バランスにどのような影響を与えるのかを検討する目的で行われた。歩行の速さは、事前の測定より得られた被験者自身が早歩きと感じる速さの歩行運動($4.2 \pm 1.2 \text{ km/h}$)で行った。心拍数について、安静時の平均は $67 \pm 7 \text{ bpm}$ 、断続性歩行時の平均は $87 \pm 23 \text{ bpm}$ であり、断続性歩行時は約 20 bpm の上昇であることから、本研究の運動負荷は軽度の運動強度であったことが確認できた。

4-1 初期値の酸化ストレスマーカーの状態

d-ROMs 初期値平均（両試行の平均、N=22、 $407 \pm 59 \text{ carr unit}$ ）は標準値の300 carr unitよりも36%高かった。一般的に加齢とともにd-ROMs値は高値を示すが[4][17]、11名の被験者中、5名が400 carr unitを越えており、酸化ストレス状態が亢進していた。

BAP 初期値平均（両試行の平均、N=22、 $2366 \pm 230 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ）は標準値の $2200 \text{ } \mu\text{mol/L}$ よりも8%高かった。これは、亢進している酸化状態から生体を守るための抗酸化防御機能が働いている状態と考えられた。

BAP 値を d-ROMs 値で除して得られる酸化・抗酸化バランス指標である酸化・還元指数の Redox Index 初期値平均（両試行の平均、N=22、 5.93 ± 1.0 ）は基準値の7.33（7.33以上は酸化・還元バランスが良い、未満は悪い）よりも19%低かった。抗酸化指標の BAP は基準値よりも高いが、亢進状態の酸化ストレスを軽減するまでの抗酸化能は有していないことが示された。しかし、加齢と酸化ストレスマーカー値の関係を示す先行研究[4][17]と比較し、本研究の被験者の酸化・還元バランスは年齢相応の状態であったと考えられる。

4-2 酸化ストレスマーカーの 1 日の経時変化

d-ROMs の 1 日の経時変化について、両試行における試行および試行と時間による交互作用に有意差はなかった。安静試行と断続性歩行試行とともに、9 時の開始時間から 13 時の昼食後まで緩やかに下がり、その後 17 時の終了まで緩やかに上昇した。両試行共に d-ROMs の初期値を 17 時まで越えることはなかった。本研究の歩行は運動誘発性酸化ストレスを起こさない身体活動であった。歩行中の心拍は安静時よりも約 30% 上昇していることから、断続性歩行試行では明らかに安静試行よりも酸素摂取量が増加しており、活性酸素・フリーラジカルの体内発生は僅かながらも増加していたと考えられる。しかし、断続性歩行試行で d-ROMs 値が最後まで初期値を越えなかったのは、被験者は断続性歩行で増加した ROS を消去するだけの抗酸化防御機能を有していたからと考えられる。

BAP の 1 日の経時変化について、両試行における試行および試行と時間による交互作用に差はなかった。運動誘発性の酸化ストレスレベルが上昇する運動負荷をえた場合、BAP の経時変化は d-ROMs の経時変化と同じパターンを描き BAP 値も同時に上昇し、d-ROMs 値が下降すれば BAP 値も下降することが報告されている[32][33][34]。これは Nrf2 シグナル伝達による DNA が関与した抗酸化物質産生の生体防衛機能が、必要に応じて即座に稼働するゆえの変動パターンである[14]。本研究の断続性歩行は軽度の身体活動であり、運動誘発性酸化ストレス状態が起らなかったために BAP が上昇しなかつたと考えられる。しかし、断続性歩行試行では d-ROMs 平均値は 15 時から 17 時で 2.2% 上昇しているが、BAP 平均値は同じタイミングで 4.1% 減少している。安静試行では同じタイミングで BAP 平均値は減少していない。d-ROMs 値と BAP 値の変動パターンについて、疲労に関する先行研究では、疲

労は d-ROMs と BAP の変動パターンから急性疲労、亜急性疲労、慢性疲労の 3 種類に分類されるとしている[33]。急性疲労の場合は一過性に d-ROMs 値が上昇するが抗酸化の BAP 値も同時に上昇する。このように、抗酸化防御機能が即座に稼働することで、酸化・還元バランスが保たれている。亜急性疲労では d-ROMs 値の増加に対して BAP 値は増加しないが減少もしない状態であり、抗酸化防御機能の働きが鈍った状態のために、酸化・還元バランスは酸化型に傾く。しかし、慢性疲労では d-ROMs 値が上昇に対しても、抗酸化防御機能が働くかず、BAP 値は反対に減少してしまうと報告されている[35]。断続性歩行において、15 時から 17 時の BAP 値の減少は、有意差のある減少ではないが、被験者の僅かな疲労状態が BAP 値の減少につながったものと考えられる。

Redox Index の 1 日の経時変化について、両試行における試行と試行と時間による交互作用に差はなかった。安静試行では Redox Index 値が 9 時の初期値平均と 13 時の平均では変化していないのに対して、断続性歩行試行では 9 時の初期値平均と比較し、13 時の平均では約 4%高い数値を示し、15 時まで初期値を上回っている。この増加率には統計的に有意性はなかったが、15 時までの断続性歩行は酸化・還元バランス改善の方向に働いたと考えられる。

閉経後女性においても継続的な身体活動が心血管機能、心肺機能、脂質プロファイルの改善および酸化ストレス軽減に有用であることが報告されている[36]。また、低強度運動の身体活動を 1 週あたり 90 分（1 回に 30~60 分を 1 週に 2 回）を 12 週間継続した結果、閉経後女性の酸化・還元バランスを向上させたことが報告されている[20]。しかし、本研究では、継続的な身体活動による酸化・還元バランスの変化ではなく、1 日の経時変化の検討であったために、前述の先行研究のように酸化・還元バランスが改善された結果は得

られなかつたが、1日における断続性歩行は閉経後女性の酸化・還元バランスを悪化させないことが示された。

4-3 抗酸化力と中性脂肪

緒言で述べた如く、閉経後女性を対象とした研究では、1.5分間の歩行を20セット行う断続性歩行が食後の中性脂肪濃度を低下させることが報告されている[28][29]。この断続性歩行（1.5分間の歩行を15分間隔で20回の積算30分）と連続性歩行（1回に連続30分）は食後の中性脂肪濃度の低減効果が同等であったことが示されている[29]。本研究では、先行研究と同じ断続性歩行を行ったため、中性脂肪と酸化ストレスマーカーの関連性を検討した。中性脂肪の1日の平均値と酸化ストレスマーカーとの関連では、抗酸化力指標のBAP値と中性脂肪との関連性が明らかになった。安静試行において、中性脂肪値が高いほどBAP値が低く、負の相関傾向が示された。また、断続性歩行試行ではこの傾向がさらに顕著に表れ、有意に負の相関を示した。これらの結果から、中性脂肪は抗酸化力に影響する因子の一つであること、そして、中性脂肪の増加は抗酸化物質の産生を阻害する可能性が示唆された。

中性脂肪と抗酸化力（BAP値）とが負の相関関係にあることは先行研究[37]において示されている。しかし、本研究の断続性歩行でより顕著にその傾向が表れるということは、本研究による新しい知見であると考えられる。中性脂肪が高い場合において、なぜ抗酸化力が低くなるのかという、その機序については明らかではないが、中性脂肪が高くなることで末梢への血流障害が起り、それが何らかの要因となって内因性の抗酸化剤産生が抑制されてしまう可能性も考えられる。この機序の解明は今後の課題である。

4-4 酸化・還元バランスと白血球数

血液組成の中で白血球数のみが 1 日の中で朝の 9 時よりも夕方の 17 時で上昇していた。白血球数は安静状態を保っていても、1 日の中では緩やかに上昇する傾向にあり、特に運動後は白血球数が有意に上昇することが報告されている[38]。白血球数の上昇は活性酸素の体内産生を増加させ、炎症反応を誘起する。しかし、本研究の断続性歩行試行と安静試行との 2 試行間には、白血球数の上昇率に差は認められなかった。ところが興味深いことに、酸化ストレスマーカー初期値と白血球の上昇率との関連性では、安静試行群において、BAP 初期値と負の相関を示した。これは抗酸化力が高い場合は白血球数の上昇を抑制できる可能性があると考えられる。また、断続性歩行試行においては酸化・還元指数の Redox Index 初期値と白血球数の上昇率と負の相関を示した。これは運動による白血球数の上昇率は、酸化ストレスと抗酸化の両面の影響を受けていることを示しており、酸化・抗酸化バランスが良い状態では、運動負荷による白血球数の上昇を抑制できる可能性が示唆された。また、酸化ストレスマーカーは運動後の白血球数上昇の予測因子となることも示唆された。これら酸化ストレスマーカーと白血球数上昇率との関連性は本研究による新しい知見であるため、この機序については明らかでない。しかし、この機序の解明により、酸化・還元バランス悪化の真因の解明に繋がる研究となるため、さらなる研究が期待される。

また、本研究で d-ROMs 初期値が 400 carr unit（閉経後女性としては中程度の酸化ストレスレベルと考えられる）以上の被験者は 11 名中 5 名であった。本研究にて、高感度 C 反応性蛋白 (hsCRP) を計測していないが、hsCRP と d-ROMs は正相関を示すことが散見されている[4][39][40]。d-ROMs 初期値が 400 carr unit 以上の被験者は、元々、何らかの慢性的な炎症を有してい

る可能性があることから、本研究の軽度な身体活動により、運動誘発による白血球数の上昇が認められるか否かを検討した。その結果、400 carr unit 以上の被験者において、白血球の上昇率が安静試行では 23%に対し、断続性歩行試行では 41%と安静試行よりも、かなり高い上昇傾向を示した。これに対し、d-ROMs 初期値が 400 carr unit 未満の被験者は、安静試行と断続性歩行試行の白血球数の上昇率は共に 19%と同じであった。このように、d-ROMs 初期値が 400 carr unit 以上の群では断続歩行試行で白血球数は上昇傾向を示した。白血球数の上昇は酸化ストレスを誘発する可能性は高いが、前述（考察 4-2 酸化ストレスマーカーの 1 日の経時変化）の如く、1 日の中で d-ROMs 平均値は初期値を越えることは無く、それは d-ROMs 初期値が 400 carr unit 以上の白血球数の上昇が高かった群においても d-ROMs 値の上昇は認められず、酸化ストレス状態は悪化していなかった。中高齢者が健康維持を目的とした中等度強度以下の持久性運動後に好中球や単球が活性化され ROS 代謝が促進されることで、種々の炎症反応に関与する可能性が報告されている [41]が、本研究では d-ROMs 値の上昇が認められないことから、最大酸素摂取量の 50%以下の軽い運動強度では好中球による ROS 産生能の増加は生じにくいという先行研究[42]を支持する結果となった。以上から、本研究で実施した断続性歩行は、酸化ストレスが潜在的に高い被験者に対しても酸化ストレスを悪化さない運動であることが確認された。

厚労省が 2015 年に作成した認知症施策推進総合戦略（新オレンジプラン）によると、わが国の認知症高齢者数は急速に増加しており、2025 年には約 700 万人（65 歳以上の高齢者の 5 人に 1 人）に達するという。認知症の原因として、酸化ストレスが重要な因子である可能性は高い。認知症予防の視点からも高齢者の身体活動の推進は、重要性を増している。

今後の健康寿命延伸に向けた「高齢者の身体活動プログラムの開発」には、従来の脂質代謝、腎機能、筋損傷、糖代謝、骨代謝指標などに加えて、酸化ストレスマーカー、血液組成の変化率、炎症マーカーや炎症に関わる脂肪酸などの評価を行い、酸化・還元バランスの改善を考慮した身体活動プログラムを検討して行くことが重要と考えられる。

第 5 章 結論

本研究では、断続性歩行が閉経後女性の酸化還元バランスに及ぼす影響を検討した。その結果、断続性歩行は閉経後女性の酸化・還元バランスを悪化させないことが示唆された。

また、酸化ストレスマーカーと副次評価項目との関連性から以下のことが示唆された。

- ・閉経後女性は中性脂肪値が高いほど抗酸化力が低い傾向にあり、その関連性は断続性歩行でより顕著に表れる。
- ・抗酸化力が高く酸化・還元バランスが良い状態であるほど、1日の中で白血球数の上昇を抑制できる。

参考文献

- [1] 厚生労働省: 平成 26 年厚生労働白書 健康長寿社会の実現に向けて～健康・予防元年～. 2014.
- [2] WHO (世界保健機構) . World Health Statistics (世界保健統計) 2018.
- [3] 厚生労働省保険局医療課以後連携政策課. 生活習慣病対策に関する最新の動向. 2017
- [4] 山門實. 総説－生活習慣病は活性酸素病. 人間ドック, 2014; 29: 465-470.
- [5] 永田勝太郎, 長谷川拓也, 広門靖正, 喜山克彦, 大槻千佳: 生活習慣病と酸化ストレス防御系. 心身医学, 2008;48(3):177-183.
- [6] Shiraishi Y, Kujiraoka T, Hakuno D, Masaki N, Tokuno S, Adachi T. Elevation of derivatives of reactive oxygen metabolites elevated in young “Disaster Responders” in hypertension due to Great East Japan Earthquake. Int Heat J, 2016;57(1):61-66.
- [7] Dall-Donne I, Rossi P, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarker of oxidative damage in human disease. Clin Chem, 2006;52(4):601-623.
- [8] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free Radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007; 39(1):44-84.
- [9] Higdon A, Diers AR, Oh JY, Landar A, Darley-Usmar VN. Cell signaling by reactive lipid species - new concepts and molecular mechanisms. Biochem J. 2012; 442: 453-464.
- [10] 井上正康. 活性酸素と生物の生存戦略－生物進化から生老病死を診る. 学術の動向, 2012; 7: 44-51.

- [11] Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. FEBS lett. 2008; 582(13): 1783-1787.
- [12] Kapitulnik J. An endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. Mol Pharmacol. 2004; 66(4): 773-779.
- [13] Kang DH, Ha SK. Uric acid puzzle – dual role as anti-oxidant and pro-oxidant. Electrolyte Blood Press. 2014; 12(1): 1-6.
- [14] Donna DZ. Mechanistic study of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. Drug Metab Rev. 2006; 38: 769-789.
- [15] Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen consumption and usage during physical exercise - the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. Antioxid Redox Signal, 2013; 18(10):1208-1246.
- [16] 丸岡弘ら：心肺運動負荷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, 2005;35(5):283-288.
- [17] Komatsu F, Kudoh H, Kagawa Y. Evaluation of oxidative stress and effectiveness of low-dose glucocorticoid therapy on exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. J of Gerontol Med Sci, 2007; 62A(4): 459-464.
- [18] Kendall B, et al: Exercise-induced muscle damage and the potential protective role of estrogen. Sports Med, 2002; 32: 103-123. Sports Med, 2002; 32: 103-123.
- [19] Takahashi M, Miyashita M, Park JH, Kim HS, Nakamura Y, Sakamoto S, Suzuki K. The association between physical activity and sex-specific

- oxidative stress in older adults. *J Sports Sci Med*, 2013; 12(3): 571-578.
- [20] Takahashi M, Miyashita M, Park JH, Kawanishi N, Bae SR, Nakamura Y, Sakamoto S, Suzuki K. Low-Volume Exercise Training and Vitamin E Supplementation Attenuates Oxidative Stress in Postmenopausal Women. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2013; 59: 375-383.
- [21] 日本動脈学会：動脈硬化症疾患予防のための脂質異常症診療ガイド. 2018.
- [22] 厚生労働省：平成 28 年度国民健康・栄養調査報告. 2017.
- [23] 綾部誠也ら：エクササイズガイド 2006 充足者の日常身体活動の継続時間ならびに頻度. *体力科学*, 2008; 57(5): 577-586.
- [24] Milanovic Z, Pantelic S, Trajkovic N, Sporis G, Kostic R, James N. Age-related decrease in physical activity and functional fitness among elderly men and women. *Clin Interv Aging*, 2013; 8: 549-555.
- [25] Murphy MH, Nevill AM, Hardman AE. Different patterns of brisk walking are equally effective in decreasing postprandial lipemia. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000; 24(10): 1303-1309.
- [26] Altena TS, Michaelson JL, Ball SD, Thomas TR. Single Sessions of Intermittent and Continuous Exercise and Postprandial Lipemia. *MSSE*, 2004; 36(8): 1364-1371.
- [27] Miyashita M, Burns SF, Stensel DJ. Exercise and postprandial lipemia: effect of continuous compared with intermittent activity patterns. *The Am J of Clin Nutri*, 2006; 83(1): 24-29.
- [28] Miyashita M, Edamto K, Kidokoro T, Yanaoka T, Kashiwabara K, Takahashi M, Burns SF. Interrupting Sitting Time with Regular

- Walks Attenuates Postprandial Triglycerides. Int J of Sports Med, 2016; 37(2): 97-103.
- [29] Kashiwabara K, Kidokoro T, Yanaoka T, Burns SF, Stensel DJ, Miyashita M. Different Patterns of Walking and Postprandial Triglycerides in Older Women. MSSE, 2018; 50(1): 79-87
- [30] 関泰一. d-ROMs テストによる酸化ストレス総合評価. 生物試料分析, 2009; 32:301-306.
- [31] Iorio EL. The BAP test and the global assessment of oxidative stress in clinical practice. A short review of International Observatory of Oxidative Stress, 2008.
- [32] 種本翔, 藤野雅広, 山下裕之, 西本哲也, 児玉拓, 長尾光城. 漸増運動負荷に伴う酸化ストレス度および抗酸化力の変化. 川崎医療福祉学会誌, 2013; 22(2): 214-217.
- [33] 琉子友男, 小松崎禎行, 田中博史. 定期的な酸化ストレス測定は駅伝選手の有効なコンディショニング指標になる. 運動とスポーツの科学, 2014; 20(1): 31-39.
- [34] 丸岡弘, 小牧宏一, 木戸聰史, 井上和久. 運動負荷試験が酸化ストレス防御系におよぼす影響について. 専門リハビリ, 2011; 10: 36-41.
- [35] 倉恒弘彦. 筋痛性脳髄膜炎/慢性疲労症候群 (ME/CFS) における最近の知見. 第 15 回酸化ストレス・抗酸化セミナー, 2017:93-95.
- [36] Lin YY, Lee SD. Cardiovascular benefits of exercise training in postmenopausal hypertension. Int J of Mol Sci, 2018; 19(9): 2523.
- [37] 川上知子, 由良明彦, 小川勝利, 稲垣昌博, 小口勝司, 東風平秀博, 岩井信市, 龍家圭, 三邊武彦. 血中における酸化ストレスと脂質の相関性.

昭和学士会誌, 2014; 74(4): 403-412.

- [38] 鈴木克彦、佐藤英樹、遠藤哲、長谷川裕子、望月充邦、中路重之、菅原和夫、戸塚学、佐藤光毅. スポーツ選手における最大運動負荷の血中白血球数と好中球活性酸素産生能に及ぼす影響. 体力科学, 1996; 45: 451-460.
- [39] Kotani K, Sakane N. C-reactive protein and reactive oxygen metabolites in subjects with metabolic syndrome. J Int Med Res, 2012; 40(3): 1074-1081.
- [40] Fukui T, Yamauchi K, Maruyama M, Yasuda T, Kohno M, Abe Y. Significance of measuring oxidative stress in lifestyle-related diseases from the viewpoint of correlation between d-ROMs and BAP in Japanese subjects. Hypertens Res, 2011; 34: 1041-1045.
- [41] 高橋将記, 鈴木克彦, 的場秀樹, 佐竹昌之, 坂本静男, 小原繁. 中等度強度以下の持久性運動が血中の活性酸素生成および白血球活性化マーカーに及ぼす影響. 2011; 日本補完代替医療学会誌, 2011; 8(1): 25-28.
- [42] Suzuki K, Totsuka M, Nakaji S, et al. Endurance exercise cause interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. J Appl Physiol, 1999; 87: 1360-1367.

謝辞

本修士論文の作成にあたりましては、終始丁寧なご教導を賜りました本研究科の宮下政司准教授に深甚なる感謝の意を申し上げます。ならびに副査をご快諾下さり、貴重なご意見を賜りました鈴木克彦教授、川上諒子講師に心より感謝の意を表します。

多くのご支援、ご助言を頂き、実験の実施にご協力下さいました宮下研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。また、私の業務を常にサポートしてくれました会社の皆様に御礼申し上げます。

最後に修士課程へ進むにあたり、大きな後押しをしてくれた妻の久仁子、子供達夫婦、そして、亡き両親に深く感謝致します。