

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：12612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500659

研究課題名（和文）高所・低酸素環境での身体運動が引き起こす酸化ストレスの定量的解明

研究課題名（英文）Quantitative elucidation of the oxidative stress induced by physical exercise in hypobaric-hypoxia.

研究代表者

長澤 純一（NAGASAWA JUNICHI）

電気通信大学・情報理工学研究科・准教授

研究者番号：40228002

研究成果の概要（和文）：生体内で生じたラジカルの大部分はラジカル消去系によって除去されるが、除去されきれずに残ったラジカルは DNA やタンパク質、脂質などに傷害を与える。本研究では、富士登山中の抗酸化剤摂取の有用性、酸化ストレスに対する加齢の影響、および HIF-1 α mRNA の応答について調査した。

研究成果の概要（英文）：Most radicals which occurred during exercise are removed by antioxidant system, but some radicals will damage protein, lipids and DNA. This study investigated availability of the antioxidant during Fuji mountain climbing, effect of the aging on oxidative stress and responsiveness of HIF-1 α mRNA expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 応用健康科学

キーワード：スポーツ医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 酸素濃度の高い環境で飼育された小動物は寿命が著しく短いことなど、酸素による生体組織障害の危険性は古くから知られている。酸素の引き起こす酸化ストレス障害は、がん、脳・心筋梗塞、潰瘍、高血圧、アトピー性皮膚炎、糖尿病から痴呆に至るまで、生活習慣病を中心に病気の大半に深くかかわっているとされており、酸化ストレスに対する防御の重要性は論を待たない。

(2) 身体運動によっても酸化ストレスは増加することはよく知られている。この機序の説明として、有酸素代謝亢進によって筋への酸

素流量が上昇するため、ミトコンドリア電子伝達系での電子リークが増加して酸素ラジカルをより多く生成するというロジックはわかりやすい。しかし奇妙なことに、低酸素環境でも酸化ストレスが増大するとの報告もみられるようになってきた。低酸素環境下での酸化ストレスの増大メカニズムについては、白血球の増加や下図のような虚血-再還流にともなうキサンチンオキシダーゼ(XO)の活性化などが関与している可能性が指摘されているが、メカニズムのみならず、酸化ストレスの影響、程度においても、現状では有用な情報が集積されていない。

2. 研究の目的

高所では酸素が少ないにもかかわらず酸化ストレスが増大するが、メカニズムは必ずしも明らかになっていない。本研究は、実際の富士登山時の生体応答について、酸化ストレスの程度を生理・生化学的に検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)酸化ストレスおよび抗酸化剤の効果

一般中高年者を対象に、旧富士山測候所までの登山時、測候所滞在時および下山時において、経時的に酸化ストレスを評価した。抗酸化剤には(Oligonol: アミノアップ社製)を摂取させた。総合的な酸化ストレスマーカーであるd-ROMs、DNAの酸化損傷マーカーである尿中8-OHdGを測定した。食事内容は全被験者で同等とし、水は自由摂取とした。

(2)加齢の影響

学生5名(年齢 22.0 ± 0.5 歳)および、一般高齢者5名(年齢 66.0 ± 3.8 歳)の登山に対する応答を比較した。高齢者(n=6, 64.5 ± 3.3 歳)および大学生(n=6, 21.8 ± 0.5 歳)を対象に、2泊3日の行程で富士登山を行い、登山前2合目、1日目山頂到着直後、山頂1泊後の夕方、およびその翌日下山直後に採血および採尿を行った。酸化ストレスの指標として、血清ヒドロペルオキシド濃度(d-ROMs法)、血清MDA-LDL濃度(ELISA法)および尿中8-OHdG(イムノクロマト法)を測定した。なお、8-OHdGはクレアチン濃度で補正し8-OHdG/CREとして評価した。また、抗酸化力の指標として血漿の鉄還元能(FRAP法)を定量した。採取した血漿は、電子スピン共鳴法(ESR法)を用いてヒドロキシルラジカル発生量を測定した。酸化ストレスは、乳酸(LA)/ピルビン酸(PA)比(酵素法)を指標として評価した(解糖系を持続的に進めるために必要なNAD⁺を生成するには、NADHが酸化される必要があり、この過程で水素の授受をとまう酸化還元反応が起こる。この反応はピルビン酸の還元による乳酸生成と共役して行われることから、LA/PA比はNADH/NAD⁺比を反映し、組織の酸化還元状態の推定が可能であるとされている。)また、登山前2合目と山頂到着時までの差分を登山局面(ASC)、山頂1泊後と下山時2合目までの差分を下山局面(DES)として、登山と下山という運動携帯および環境の影響を評価した。

(3)身体的低酸素応答

高所登山という運動形態は、複合的に体内に低酸素環境を生じさせる。本研究では、HIF-1(低酸素誘導因子)に着目し、富士登山による低酸素ストレス応答として、HIF-1 α mRNAとエリスロポエチンの産生が促進されるか否かを明らかにすることとした。被験者として、大学生男子5

名(年齢 22.0 ± 0.5 歳)を対象に2泊3日の富士登山を行った。低酸素によって誘導される転写因子であるHIF-1 α は、エリスロポエチン調節の主要な制御因子であることから、HIF-1 α のmRNA発現量を白血球中のHIF-1 α mRNAとしてreal-time RT-PCR法で測定した。なお測定値の算出は平地の値を基準とした $\Delta\Delta Ct$ 法によった。

4. 研究成果

(1)酸化ストレスおよび抗酸化剤の効果

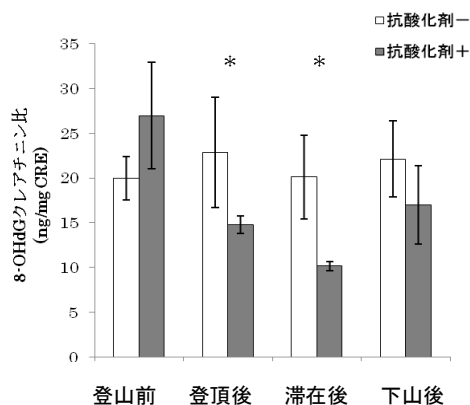


図1 尿中8-OHdG濃度

登頂後における8-OHdGの増加は、抗酸化剤一群22.88 ng/mg CREに対し抗酸化剤+群14.80 ng/mg CRE、山頂滞在後の減少は抗酸化剤一群20.10 ng/mg CREに対し抗酸化剤+群10.15 ng/mg CREと抗酸化剤摂取の方が有意に低い値を示し($p < 0.05$)、抗酸化剤の持続的な摂取は、酸化ストレスの低減に有効であると考えられた。

(2)加齢の影響

ヒドロキシルラジカル生成量は、学生は、登山中常にヒドロキシルラジカルを低減した一方、高齢者では、登頂後に低減したものの、山頂翌日・夕方、下山後では登山前とほぼ同等の生成量であり、登頂後から山頂翌朝・夕方、及び下

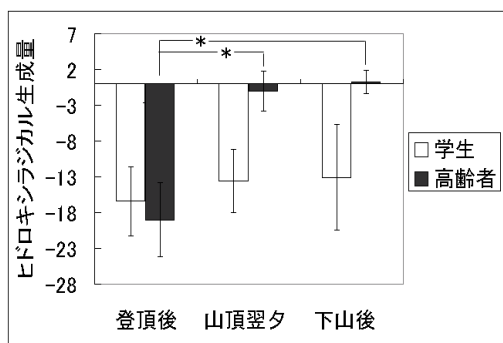


図2 血中ヒドロキシルラジカル生成量(差分)

山後に有意に増加した($p < 0.05$)。血漿乳酸/ピルビン酸濃度比では、下山後において学生と高

年齢の間に有意差が認められ($p < 0.01$, 図 2)、LA/PA 比の結果(図 3)からも、高齢者では、登山中、組織が酸性に傾いているものと考えられた。

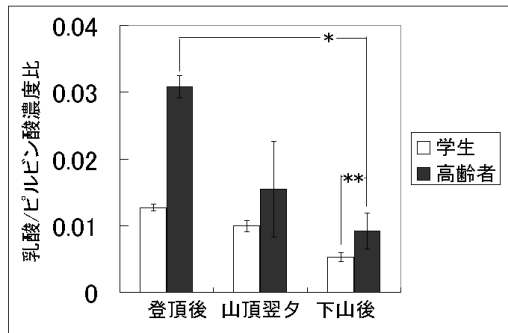


図 3 血漿乳酸/ピルビン酸比 (差分)

血漿ヒドロペルオキシド濃度は、大学生群が ASC において -24.0 ± 44.0 U.CARR、DES で -12.0 ± 16.3 U.CARR、高齢者群では ASC: -24.5 ± 19.3 U.CARR および DES: -17.5 ± 19.7 U.CARR であった。8-OHdG/CRE は大学生群で ASC: 7.0 ± 4.2 および DES: 1.5 ± 2.5 、高齢者群で ASC: 0.1 ± 3.9 および DES: 2.0 ± 1.2 となり、これらの値には有意差は認められなかった。鉄還元能は、学生群が ASC: -233.7 ± 198.9 、DES: -275.0 ± 103.8 で、高齢者群が ASC: 48.3 ± 45.4 、DES: -181.0 ± 96.4 となった。登行の影響を評価するために登山前 2 合目と山頂到着時までの差分を登行局面 (ASC)、山頂 1 泊後と下山時 2 合目までの差分を下山局面 (DES) とした。血清 MDA-LDL 濃度は ASC では大学生群が -6.3 ± 5.0 mIU/ml、高齢者群が 2.0 ± 6.5 mIU/ml で有意差は認められなかったものの、DES では学生群の 14.2 ± 3.2 mIU/ml に対し、高齢者群は 28.7 ± 7.7 mIU/ml となった(図 4)。以上より、登行時よりも下山時において酸化ストレスが高くなる可能性のあることが示された。

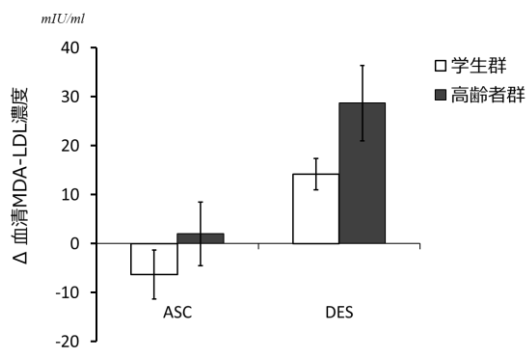


図 4 登行時(ASC)および下山時(DES)における血清 MDA-LDL 濃度の変動

(3) 身体の低酸素応答

HIF-1 α mRNA の相対発現量は登山前 0.052 ± 0.010 、登頂後 0.047 ± 0.014 、山頂翌朝 0.042 ± 0.004 、山頂翌夕 0.044 ± 0.005 、下山後 0.049 ± 0.001 で有意な変動は見られなかった(図 5)。他方、血漿エリスロポエチン濃度は登山前 16.1 ± 0.4 mIU/ml、登頂後 37.8 ± 6.2 mIU/ml、山頂翌朝 86.8 ± 9.6 mIU/ml、山頂翌夕 106.0 ± 17.3 mIU/ml、下山後 82.0 ± 23.3 mIU/ml で、登山前と山頂翌朝($p < 0.01$)、山頂翌夕($p < 0.01$)、下山後($p < 0.05$)、登頂後と下山後($p < 0.05$)でそれぞれ有意な増加が見られた(図 6)。

以上のように、富士登山では HIF-1 α mRNA 発現に大きな変動を示さなかったものの、エリスロポエチンには明らかな低酸素ストレス応答が示された。HIF-1 は、常酸素下で活性酸素によりエリスロポエチン遺伝子の転写活性因子を不活性化している。富士登山におけるこれらの結果は、HIF-1 自体の変動よりも、過酸化水素産生が減少することによって、エリスロポエチン転写を高めたのではないかと考えられた。

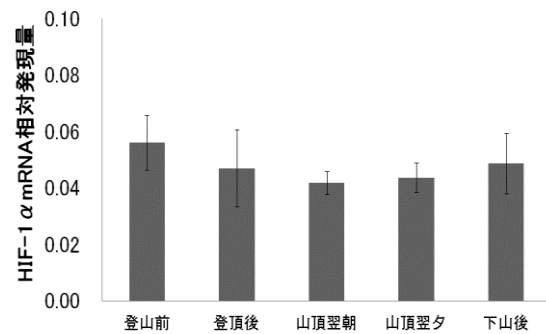


図 5 富士登山における HIF-1 α mRNA 相対発現量

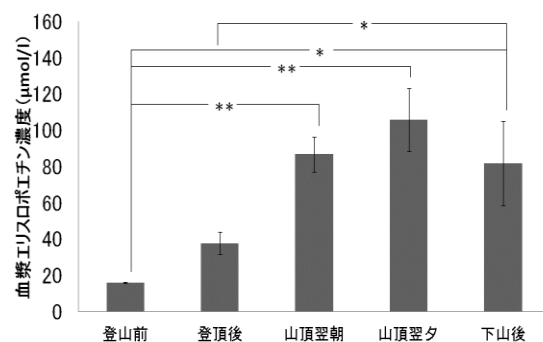


図 6 富士登山における血漿エリスロポエチン濃度

これらの結果より、①一回の富士登山では、年齢にかかわらず、身体の抗酸化機構を大きく破綻させる結果とはならない、②抗酸化剤は酸化ストレスを有意に低下させる。③大学生年代よりも高齢者において酸化ストレスは高めに推移することなどが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

長澤純一、内藤祐二郎、杉山康司、笹尾真美、曾我部健、新美敬太、野口いづみ、芳賀脩光、石橋義永、木崎節子、大野秀樹. 富士登山時の自律神経応答と身体の電気伝導率. 登山医学 31 巻 2011, 145-152. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

高橋達彦、長澤純一、笹尾真美、野口いづみ、佐藤章悟、大野秀樹. 富士登山時の酸化ストレスに対する年齢の影響. NPO法人富士山測候所を活用する会第6回成果報告会講演予稿集. 2013年1月27日. 東京大学小柴ホール.

[図書] (計 1 件)

長澤純一. 酸化ストレス・抗酸化力. 土器屋, 佐々木(編)よみがえる富士山測候所 2005-2011. 成山堂書店, 東京 2012. pp. 163-166.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長澤 純一 (NAGASAWA JUNICHI)
電気通信大学・大学院情報理工学研究科・
准教授
研究者番号: 40228002

(3) 連携研究者

大野 秀樹 (OHNO HIDEKI)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号: 00133819

杉山康司 (SUGIYAMA KOJI)
静岡大学・教育学部・教授
研究者番号 (10206443)

鈴木康弘 (SUZUKI YASUHIRO)
国立スポーツ科学センター・研究員
研究者番号 (00392697)

内丸仁 (UCHIMARU JIN)
仙台大学・体育学部・講師
研究者番号 (40398665)