

特集 I

「活性酸素の基礎と臨床」

(臨床環境 5 : 48~54, 1996)

物理環境と酸化ストレス大野 秀樹¹⁾ Zsolt Radák^{2,3)} 大石 修司¹⁾
大河原 知水¹⁾ 木崎 節子¹⁾ 浅野 勝己³⁾

1)防衛医科大学校衛生学教室

2)Laboratory of Exercise Physiology, University of Physical Education-Budapest

3)筑波大学体育科学系

Physical environment and oxidative stressHideki Ohno¹⁾ Zsolt Radák^{2,3)} Shuji Oh-ishi¹⁾
Tomomi Ookawara¹⁾ Takako Kizaki¹⁾ Katsumi Asano³⁾

1)Department of Hygiene, National Defense Medical College

2)Laboratory of Exercise Physiology, University of Physical Education-Budapest

3)Institute of Health and Sport Sciences, University of Tsukuba

要約

運動はフリーラジカルを発生し、生体に酸化ストレスを生じることはよく知られている。加えて、種々の病的状態、例えば癌、虚血性疾患、白内障、糖尿病なども酸素ラジカルと明らかな関係をもつという証拠が増加している。本稿では、物理環境、とくに低圧低酸素および温度のラット抗酸化酵素システムへの影響を概説する。同じく、両物理環境ともに酸化ストレスと何らかの関連性をもつことが示唆されている。

Abstract

It has been well known that physical exercise imposes oxidative stress on the body due to oxygen free radical generation. In addition, there is growing evidence that various pathologic conditions, such as cancer, ischemia, cataract, and diabetes, have definite links to oxygen radicals. In the current review, we outline in brief the effects of physical environment, especially hypobaric hypoxia and temperature, on the antioxidant enzyme system in rats and also suggest that both physical conditions bear some relationship to oxidative stress.

《Key words》 oxidative stress, hypobaric hypoxia, temperature, superoxide dismutase isoenzymes, lipid peroxide

別刷請求宛先：大野秀樹

〒359 所沢市並木3-2 防衛医科大学校衛生学教室

Reprint Requests to Hideki Ohno, Department of Hygiene, National Defense Medical College, 3-2, Namiki, Tokorozawa, Saitama 359 Japan

I. はじめに

活性酸素とは、広義には酸素を含む反応性の高い化合物、すなわち大気中の通常の酸素 ($^3\text{O}_2$) よりも活性な状態にある酸素種のすべてをさす。しかし、一般には生体と関連して、スーパーオキシドアニオン (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル (HO^\cdot)、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の4種を活性酸素としている。フリーラジカルとは、最外軌道に不対電子を有する分子である。例えば、 H_2O_2 や $^1\text{O}_2$ 生成の前駆体である HOCl^- は不対電子をもたないため、フリーラジカルとはいわないように、大部分の活性酸素種はフリーラジカルであるが、ラジカルではない活性酸素種も存在する。

活性酸素は、正常の細胞でも、例えばミトコンドリアの電子伝達系、ミクロソームのシトクロムP-450電子伝達系、細胞質のキサントキシダーゼ (XO) 系などで、安静時でさえ常に発生している^{1,2)}。つまり、活性酸素は、酸素を利用している生体现象のあらゆる相に常時存在している。活性酸素による障害を防ぐために、生体にはさまざまな抗酸化物質と抗酸化酵素が存在する。酸化的ストレスとは、活性酸素とこれらの防御システムのバランスの破綻、すなわち、前者の優位な状態を意味する。現在、活性酸素は、脂質、タンパク質、核酸、炭水化物、生物学的活性物質など生体の種々の分子を標的に、多くは非特異的に反応する。そのため、活性酸素は、ほぼすべての疾患に関与しているといわれている³⁻⁵⁾。

本稿では、低圧低酸素、高温、低温という物理環境における酸化的ストレスに焦点を合わせ、筆者らの研究を中心にそれらを紹介したい。

II. 低圧低酸素環境と酸化的ストレス

1. 間歇的低圧低酸素曝露⁶⁾

オスWistar系ラット (4カ月齢) に4,000mの高度にシミュレートした低圧チャンバーで、夜間12時間、6回/週、計6カ月間の低圧低酸素曝露を行い、ヒラメ筋 (赤筋優位)、脛骨筋 (白筋優位) のチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) および抗酸化酵素 [Mn-スーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD)、Cu,Zn-SOD、グルタチオンペル

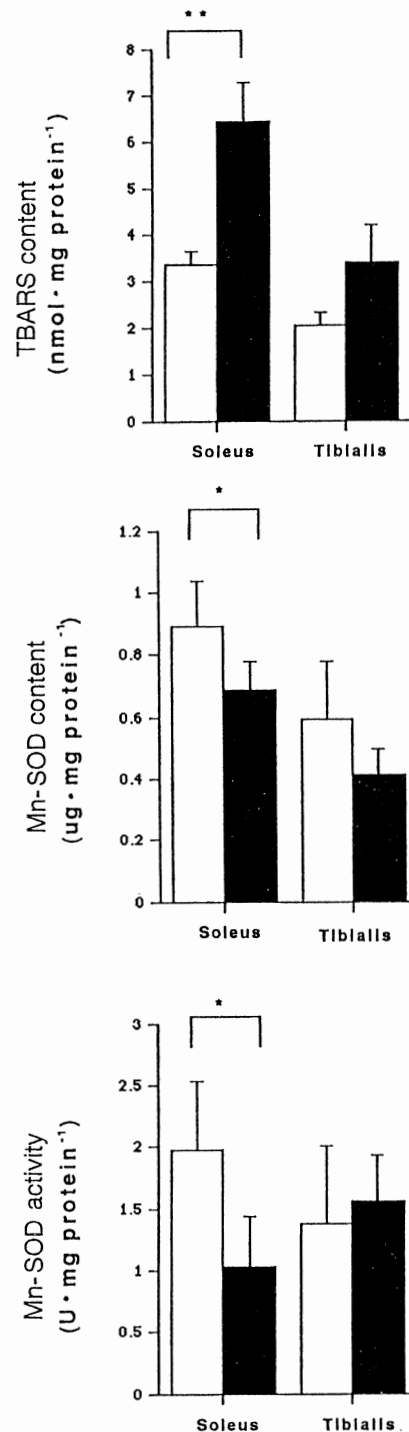


Fig. 1 Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) content, immunoreactive mitochondrial superoxide dismutase (Mn-SOD) content, and Mn-SOD activity in soleus and tibialis muscles⁶⁾.

Values are means \pm S.D. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.
 □=control rats; ■=hypobaric-hypoxic rats.

オキシダーゼ (GPX)、カタラーゼ (CAT)] への影響を検討した。

その結果、ヒラメ筋のTBARS濃度は、間歇的低圧低酸素曝露群の方が常圧で飼育した対照群と比べて有意に高値を示し、酸化ストレスの存在が示唆された (Fig.1)。このTBARS濃度の上昇の一部は、酸素利用能の高いミトコンドリアに局在するMn-SOD酵素量と活性の低下 (Fig.1) によって推定された。Mn-SODの減少は、低酸素環境下でミトコンドリアの酸素利用能が低下し、電子伝達系の複合体IとIIIのステップでの O_2^- 産生が減少したため、と考えられた。その理由のひとつは、 O_2^- はSODの誘導作用をもつからである。

TBARSの増加は、他に間歇的な低圧低酸素曝露自身に由来しているかもしれない。組織が急速に再酸素化されると、血管内皮や組織に浸潤した白血球から活性酸素種を大量に産生する (例えば、急性心筋梗塞の再灌流障害)。つまり、間歇的低酸素曝露は、視点を変わると、一種の"reperfusion" (再酸素化) の繰り返しのように見える。

一方、脛骨筋のTBARS、Mn-SODには有意の変動が認められなかった。さらに、Cu, Zn-SOD、GPXあるいはCAT活性は、両骨格筋とも間歇的低圧低酸素曝露の影響を受けなかった。

GPX、CAT活性が変動しなかったのは、両SODアイソザイム活性が上昇せず、その生成物である H_2O_2 がおそらく増加しなかったから、と考えられた。これらの結果から、間歇的低圧低酸素曝露の抗酸化酵素システムへの影響は、好気筋と嫌気筋によって異なることが示唆された。

シェルパ、強力、山岳ガイドなど、低圧低酸素曝露を日常的に繰り返しているヒトは、酸化ストレスをより強く受ける危険性がある。後述するように、ビタミンE、Cなどの抗酸化物質の服用や紫外線 (高所では、最も生物作用が著しいUV-Bがとくに増大する⁷⁾) を防ぐなどの予防処置を講じる必要がある^{7,8)}。

2. 連続低圧低酸素曝露⁹⁾

オスWistar系ラット (8週齢) に5,500mの高度 (約1/2気圧) にシミュレートした低圧チャンバ

ーを利用して、低圧低酸素曝露実験を行った。負荷12時間、1、3、5、7、14、および21日後に血液、心筋、肺、肝臓、腎臓、骨格筋 (腓腹筋) を採取し、TBARS濃度、Mn-SOD酵素量、GPXとCAT活性を測定した。加えて、肝臓のMn-SOD mRNAの発現を検索した。

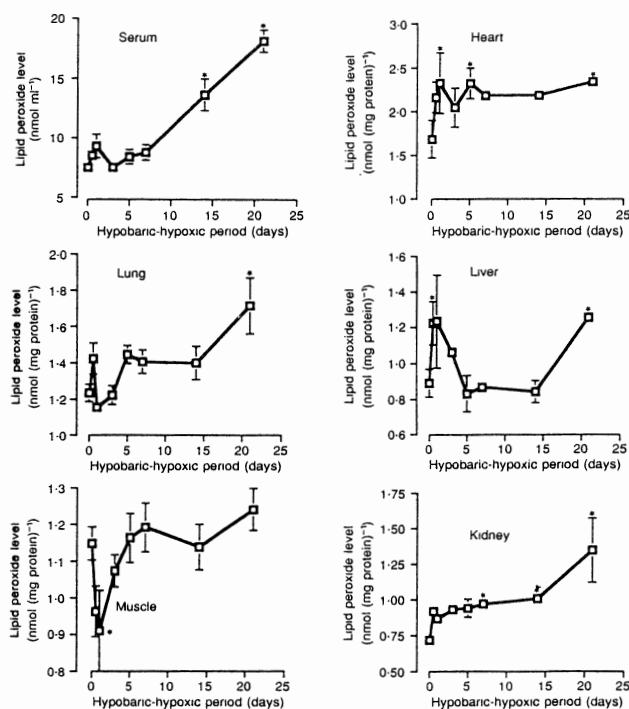


Fig. 2 The concentration of lipid peroxides, expressed as the level of malondialdehyde, in serum and major organs under hypobaric hypoxia⁹⁾.

*Significantly different from control group ($P < 0.05$). Here and in the subsequent figure, where error bars are not shown they have been obscured by symbol.

その結果、TBARS濃度は、骨格筋を除いたすべての組織で曝露前値よりも有意に上昇した (Fig.2)。とくに、血清ではほぼ直線的に、肝臓では2相性にTBARS濃度は増加した。Mn-SOD量は、血清で上昇、肺、肝臓で減少した (Fig.3)。血清と肝臓では、ほぼ直線的な対照的な変化を示した。GPX活性は、心筋、肺で上昇し、肝臓で低下した。肝GPX活性は、概ねMn-SODと平行した変動を示した。CAT活性は、減少傾向を示した肝臓を除いて、ごく小さい変動にとどまった。肝Mn-SOD mRNAの発現は、曝露12時間後から増大

し、それは実験終了まで持続した (Fig.4)。最初の3日間には、とくに強い発現が認められた。

血清の過酸化脂質濃度は、それぞれの組織に発生した酸化的ストレスの総合的な量と考えられる。Fig.2から、過酸化脂質は曝露後急速に発生するのではなく、徐々に週の単位で増加するように思われた。一方、血清Mn-SOD量の増加は、Fig.3に示したように、曝露12時間後の心筋を除いてすべてのケースで組織中のMn-SODが上昇せず、加えて、赤血球にはMn-SODが存在しないため、その由来は明らかではない。肝臓のMn-SOD量が最も減少したのは血中に逸脱したためという考えは、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼとアラニンアミノトランスフェラーゼ両活性に実験期間中有意の上昇がみられなかったことから否定できる。

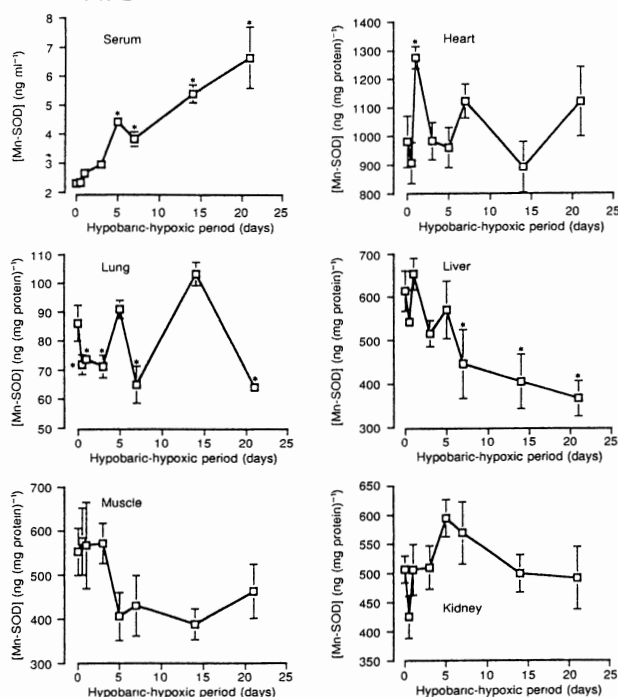


Fig. 3 The concentration of Mn-SOD in serum and major organs under hypobaric hypoxia⁹⁾.

*Significantly different from control group (P<0.05).

肝臓のMn-SOD量、GPX、CAT活性の減少は、とりわけこの臓器が低圧低酸素曝露中に酸化的ストレスの影響を受けやすいことを示唆する。Mn-

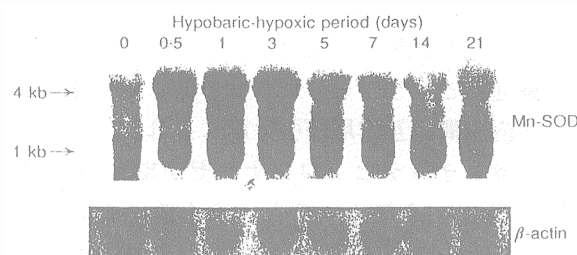


Fig. 4 The expression of Mn-SOD mRNA in the liver under a hypobaric-hypoxic environment, as detected by Northern blotting and hybridization using β -actin, a rat Mn-SOD cDNA probe⁹⁾.

SOD mRNAの初期の強い発現は急速に増加した過酸化脂質によって、後半14日間の上昇は減少したMn-SODのフィードバック機構によっていと推定された。Mn-SOD mRNAの発現と酵素量の変動が一致しなかったのは、Mn-SODの翻訳調節、あるいはその後のステップの障害があったためかもしれない。

以上の結果は、高度5,500m相当の低圧チャンバー内で35日間、ラットに低圧低酸素曝露させたCosta¹⁰⁾の、肝SOD、GPX、CAT活性のいずれも曝露によって有意に減少したという報告と一致した。他方、Liuら¹¹⁾は、マウスを8-10週間、PO₂が50-60 Torrのチャンバーで飼育し、観察された脳と肺のSOD活性の低下は、減少した酸素利用能のためと推測している。

Simon-Schnass⁷⁾は、実際のエベレストやK2登山で5,000mの高度に2週間滞在すると、呼気中ペンタン（脂質過酸化物の一種）や赤血球TBARSが著明に上昇することを認め、活性酸素の発生が増加することを示唆した。山行2週間前からビタミンE（300-400 mg/日）を服用していたグループには、ペンタンやTBARSの増加がみられなかった。低酸素状態にもかかわらず活性酸素が増加するメカニズムはまだよく解明されていない。Simon-Schnass⁷⁾は、好中球-血管内皮細胞相互作用が原因のひとつではないかと推定している。すなわち、低酸素状態で白血球（とくに好中球）が活性化され、白血球自身がすでに述べ

たXO系によってO₂を産生するが、これに加えて、好中球、内皮細胞上に接着因子を発現し、粘着、血管壁通過というローリングから始まる一連の好中球-内皮間相互作用が引き起こされる。その結果、キサンチンデヒドロゲナーゼがXOに変換され、大量のO₂を発生するというものである。実際に、Simon-Schnass⁷⁾は高所での白血球（とくに顆粒球）の著明な増加を確認している。

3. 低圧低酸素下での運動トレーニング¹²⁾

オスWistar系ラット（6週齢）に常圧下で4週間（27m/分、1時間/回、6回/週、傾斜10%）、4,000mの高度にシミュレートした低圧チャンバーで同じく4週間（15m/分、1時間/回、6回/週、傾斜0%）、それぞれトレッドミルを用いたランニングトレーニングを行った。大腿四頭筋の深部（赤筋優位）と表層部（白筋優位）を採取し、TBARS、脂質ヒドロペルオキシド、抗酸化酵素とタンパク質・カルボニル群を測定した。

活性酸素によってタンパク質アミノ酸残基からタンパク質・カルボニル群が生成される¹⁾。本研究では、いずれの運動トレーニングでも、両骨格筋のTBARS、脂質ヒドロペルオキシド濃度とCu,Zn-SOD、GPX、CAT活性には変動がみられなかったが、常圧トレーニングでは白筋部のMn-SOD活性が、低圧低酸素トレーニングでは両骨格

筋のMn-SOD活性およびカルボニル基レベルが有意に上昇した（Table 1）。これらの結果から、アミノ酸は多不飽和脂肪酸よりも酸化的ストレスの影響を受けやすく、さらに、両者の発生機序は異なっていることが示唆された。筆者らは、カルボニル群はおそらくアクチン由来であると考えている（未発表データ）。低圧低酸素トレーニングでのカルボニル群の上昇は、両タイプの骨格筋のMn-SOD活性は高まったがGPX、CAT活性が上昇しなかったことからH₂O₂の蓄積が生じ、Fenton反応（H₂O₂+Fe²⁺→HO·+OH·+Fe³⁺）によって反応性が非常に高く有害なHO·が生じたため、と推定された。つまり、H₂O₂は、脂質過酸化物の誘導よりもタンパク質の酸化的ダメージにより強く影響するようにみえる。このように、酸化的ストレスの評価には、脂質過酸化物に加えてタンパク質・カルボニル群を測定することが有用であると考えられた。

Ⅲ. 温度環境と酸化的ストレス

筆者ら¹³⁾は、オスWistar系ラットに28日間の暑熱（35℃）あるいは寒冷（5℃）曝露を行った。曝露後1、7、14、28日目に血液、肝臓、腎臓、骨格筋（腓腹筋）を採取し、TBARS濃度、Mn-SOD量、GPX活性を検索した。

Table 1 Lipid peroxidation and reactive carbonyl derivative levels, and SOD isoenzyme activities in white (WQ) and red (RQ) portion of quadriceps muscle of rats¹²⁾

Group (n=6)	TBARS (nmol·mg protein ⁻¹)		Lipid hydroperoxides (nmol·min ⁻¹ ·mg·protein ⁻¹)		Reactive carbonyl derivative (nmol carbonyl·mg protein ⁻¹)		Cu,Zn-SOD (U·mg protein ⁻¹)		Mn-SOD (U·mg protein ⁻¹)	
	WQ	RQ	WQ	RQ	WQ	RQ	WQ	RQ	WQ	RQ
Control	0.34 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.52 ± 0.06	0.58 ± 0.09	0.75 ± 0.31	0.90 ± 0.11	9.06 ± 0.7	11.5 ± 0.5	5.24 ± 0.5	8.18 ± 0.3
Sea level-trained	0.38 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.62 ± 0.08	0.61 ± 0.09	1.10 ± 0.15	0.94 ± 0.11	9.16 ± 0.4	14.9 ± 1.1	8.31 ± 0.7*	10.3 ± 0.8
High altitude-trained	0.41 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.57 ± 0.05	0.56 ± 0.06	2.42 ± 0.14*	2.67 ± 0.38*	9.46 ± 0.6	13.5 ± 1.3	8.48 ± 0.6*	11.9 ± 1.1*

Values are means ± S.E.M. P < 0.05 vs. control group.

TBARS濃度は、3つの臓器では両負荷とも実験期間中有意の変動を示さなかった。一方、血漿TBARS濃度は、暑熱曝露で7、14日目に有意に上昇し酸化ストレスの存在が示唆されたが、一転して28日目には、対照群(25℃で飼育)の5分の1以下に著減した。寒冷曝露時の血漿TBARSは、14、28日目に対照群の約半分に低下した。暑熱曝露28日目に血漿TBARSが著減したのは、血漿Mn-SOD濃度の著増と裏表の関係になっていた。寒冷曝露では、測定した3つの臓器のMn-SOD量は負荷1日目から上昇傾向を示し、温度ストレスに対する馴化は寒冷曝露群の方が暑熱曝露群よりも早いように思われた。

しかし、例えばRamasarma¹⁴⁾は、ラットを低温(0-5℃)で飼育すると、肝細胞ミトコンドリア電子伝達系のユビキノンの部位でのH₂O₂の生成が高まり、逆に、高温(38-39℃)に曝露するとH₂O₂の生成が約半分に低下する、と報告している。このように、温度環境と活性酸素については、一定の見解がなく情報も限られている^{1,15,16)}。Ramasarma¹⁴⁾は、肝ミトコンドリアで生成されるH₂O₂は動物の体温維持(発熱)に寄与していると主張している。

IV. おわりに

すでに述べたとおり、種々の物理環境と酸化ストレスの関係は、まだたくさんの疑問が残されたままである。その原因のひとつは、TBARSが必ずしも脂質過酸化に特異的な物質ではないように、酸化ストレスを評価するための信頼できる指標がまだ存在していないことである。活性酸素の寿命はごく短い¹⁷⁾。そのため、in vivoのリアルタイムのデータが実際上不可欠である。新しい測定機器の開発を期待したい。

最後に、再び低圧低酸素環境下でも決して無視できない酸化ストレスが発生することに触れておきたい。激しい運動は、骨格筋¹⁸⁾にも肝臓¹⁹⁾にも大量の活性酸素を発生させる。つまり、高地トレーニング²⁰⁾や高所登山⁸⁾は、低圧低酸素、激運動という活性酸素発生源の相乗状態であり、抗酸化ビタミンの積極的補給や肝機能のチェックな

ど、酸化ストレスに対する予防・対策の必要性を強調したい。

文献

- 1) 大野秀樹、大石修司、他：運動と活性酸素。化学と生物33：520-527、1995
- 2) 大野秀樹、谷口直之：活性酸素と運動：スーパーオキシドジスムターゼ。最新医学51：326-331、1996
- 3) Taniguchi N: Clinical significance of superoxide dismutases: Changes in aging, diabetes, ischemia, and cancer. *Adv Clin Chem* 29: 1-59, 1992
- 4) Ohno H, Suzuki K, et al.: Superoxide dismutases in exercise and disease. Sen CK, Packer L, et al (eds): *Exercise and oxygen toxicity*. Elsevier Science BV, Amsterdam, 1994, pp127-161
- 5) 大野秀樹、木崎節子、他：酸化ストレスと栄養・運動。臨床スポーツ医学13(臨時増刊)：166-170、1996
- 6) Radák Z, Lee K, et al: Oxidative stress induced by intermittent exposure at a simulated altitude of 4000m decreases mitochondrial superoxide dismutase content in soleus muscle of rats. *Eur J Appl Physiol* 69: 392-395, 1995
- 7) Simon-Schnass I: Risk of oxidation stress during exercise at high altitude. Sen CK, Packer L, et al (eds): *Exercise and oxygen toxicity*. Elsevier Science BV, Amsterdam, 1994, pp191-210
- 8) 大野秀樹、木崎節子、他：高所における生理学。臨床スポーツ医学13：613-617、1996
- 9) Nakanishi K, Tajima F, et al: Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *J Physiol (Lond)* 489: 869-876, 1995
- 10) Costa LE: Hepatic cytochrome P-450 in rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *Am J Physiol* 259: C654-C659, 1990
- 11) Lie J, Simon LM, et al: Superoxide dismutase (SOD) activity in hypoxic mammalian systems. *J Appl Physiol* 42: 107-110, 1977
- 12) Radák Z, Asano K, et al: High altitude training increases reactive carbonyl derivatives but not

- lipid peroxidation in skeletal muscle of rats. *Free Rad Biol Med* 22: in press, 1997
- 13) Ookawara T, Kizaki T, et al: Changes in immunoreactive manganese-superoxide dismutase content in rat tissues under heat or cold environment. *Pathophysiology* 2: 161-166, 1995
 - 14) Ramasarma T: Generation of H₂O₂ in biomembranes. *Biochim Biophys Acta* 694: 69-93, 1982
 - 15) Ohno H, Tanaka J, et al: Effects of acute or chronic exposure to cold on the lysosomal system in rat tissues. *Pathophysiology* 3: 181-185, 1996
 - 16) Ohno H, Gasa S, et al: Effects of exercise stress and cold stress on glutathione and γ -glutamyltransferase in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1033: 19-22, 1990
 - 17) 大野秀樹、大石修司、他：スポーツとフリーラジカル。佐藤祐造（編）：からだの科学増刊－スポーツ療法の新知識、日本評論社、1995、pp 52-57
 - 18) Radák Z, Asano K, et al: Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 79: 129-135, 1995
 - 19) Ohno H, Kayashima S, et al: Changes in immunoreactive manganese-superoxide dismutase concentration in human serum after 93h strenuous physical exercise. *Clin Chim Acta* 215: 213-219, 1993
 - 20) 大野秀樹、木崎節子、他：スポーツと赤血球増加症。日常診療と血液6：1305-1311, 1996