

早稲田大学審査学位論文

博士（スポーツ科学）

酸化ストレスに及ぼす疲労困憊運動と
水素摂取の影響

Effects of exhaustive exercise and
molecular hydrogen intake on oxidative stress

2018年1月

早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科

河村 拓史

KAWAMURA, Takuji

研究指導教員： 村岡 功 教授

目次

第1章 研究の背景と目的	1
第2章 文献考証	
1. 安静時における酸化ストレス	6
1) 活性酸素種およびフリーラジカルの産生	6
2) 酸化防御システム	7
3) 酸化ストレスの定義と疾患	8
4) 酸化ストレスの測定法	9
2. 運動誘発性酸化ストレス	11
1) 一過性の運動と酸化ストレス～ヒト試験～	11
2) 一過性の運動と酸化ストレス～動物実験～	12
3) ヒト試験および動物実験の長所と短所	14
3. 運動誘発性酸化ストレスに対する抗酸化物質摂取の効果	14
1) 運動誘発性酸化ストレスに対する抗酸化物質摂取の効果～ヒト試験～	14
2) 運動誘発性酸化ストレスに対する抗酸化物質摂取の効果～動物実験～	16
3) 運動トレーニングによる生理的適応に及ぼす抗酸化物質摂取の影響	17
4. 新たな抗酸化物質としての水素	17
1) 疾患に対する水素摂取の効果	17
2) 運動に対する水素摂取の効果	18
3) 水素の利点およびその摂取方法	18
第3章 研究課題の設定と詳細	
1. 研究課題の設定	19
2. 研究課題の詳細	20
1) 研究課題 1 強度の異なる疲労困憊運動がラット血漿および骨格筋の酸化ストレスに及ぼす影響	20
a) 緒言	20
b) 方法	21
b-1) 実験動物	22
b-2) 実験プロトコル	22
b-3) 血液および組織のサンプリング	23
b-4) 乳酸濃度および酸化ストレス指標の測定	23
b-5) 組織グリコーゲン含量の測定	24
b-6) 統計処理	24

c)	結果	-----	24
c-1)	ラットの体重および運動パフォーマンス	-----	24
c-2)	ラット血漿における乳酸濃度および酸化ストレス指標	-----	25
c-3)	ラット骨格筋における酸化ストレス指標	-----	26
c-4)	ラット骨格筋および肝臓におけるグリコーゲン含量	-----	27
d)	考察	-----	28
e)	結論	-----	32
2)	研究課題 2 2 週間の水素水摂取がラットの運動誘発性酸化ストレスおよび組織グリコーゲン含量ならびに持久的パフォーマンスに及ぼす影響	-----	34
a)	緒言	-----	34
b)	方法	-----	35
b-1)	実験動物	-----	35
b-2)	水素水の調製と投与方法	-----	36
b-3)	実験プロトコル	-----	36
b-4)	血液および組織サンプリング	-----	37
b-5)	酸化ストレス指標の測定	-----	37
b-6)	組織グリコーゲン含量および血中エネルギー基質の測定	-----	38
b-7)	統計処理	-----	38
c)	結果	-----	38
c-1)	ラットの体重, 給水量, 給餌量および運動パフォーマンス	-----	39
c-2)	ラット血漿および骨格筋における酸化ストレス指標	-----	39
c-3)	ラットの組織グリコーゲン含量および血中エネルギー基質	-----	41
c-4)	各測定項目の変化量	-----	41
d)	考察	-----	43
e)	結論	-----	46
3)	研究課題 3 ダウンヒル運動後の酸化ストレスおよび遅発性筋痛に及ぼす水素入浴の効果	-----	47
a)	緒言	-----	47
b)	方法	-----	49
b-1)	被験者	-----	49
b-2)	最大酸素摂取量の測定	-----	49
b-3)	実験プロトコル	-----	50
b-4)	入浴の方法	-----	52
b-5)	血液生化学的分析	-----	53
b-6)	統計処理	-----	53
c)	結果	-----	54

c-1) ダウンヒル運動時の運動強度および入浴温度	54
c-2) 遅発性筋痛および筋損傷ならびに血中乳酸濃度	54
c-3) 酸化ストレスおよび炎症指標	55
d) 考察	58
e) 結論	62
第4章 総合討論および今後の課題	63
1. 各研究課題の総括	63
2. 総合討論および今後の課題	64
1) 疲労困憊運動の強度の違いが生体の酸化ストレスに及ぼす影響	64
2) 運動誘発性酸化ストレスおよびその関連指標に及ぼす水素摂取の影響	65
3. 結語	69
参考文献	70
謝辞	85

略語・略号一覧

略語	英語	日本語
BAP	biological antioxidant potential	生物学的抗酸化能
CAT	catalase	カタラーゼ
CBB	coomassie brilliant blue	クマシーブリリアントブルー
CPT I	carnitine palmitoyltransferase I	カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I
d-ROMs	derivatives of reactive oxygen metabolites	活性酸素代謝産物
ESR	electron spin resonance	電子スピン共鳴
GPX	glutathione peroxidase	グルタチオンペルオキシダーゼ
GSH	reduced glutathione	還元型グルタチオン
GSSG	oxidized glutathione	酸化型グルタチオン
IL	interleukin	インターロイキン
MDA	malondialdehyde	マロンジアルデヒド
MPO	myeloperoxidase	ミエロペルオキシダーゼ
NAC	N-acetylcysteine	N-アセチルシステイン
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PC	protein carbonyl	カルボニル化タンパク質
ROS	reactive oxygen species	活性酸素種
RNS	reactive nitrogen species	活性窒素種
SOD	superoxide dismutase	スーパーオキシドディスムターゼ
TAC	total antioxidant capacity	総抗酸化能
TBARS	thiobarbituric acid reactive substance	チオバルビツール酸反応性物質
8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosine	8-ヒドロキシデオキシグアノシン
XO	xanthine oxidase	キサンチンオキシダーゼ

第1章 研究の背景と目的

ヒトをはじめとする好気性生物は、大気中に存在する酸素 (O_2) を体内に取り込み、これを利用してエネルギーを生み出し、日々の生命活動を営んでいる。このように、酸素は多くの生物にとって必要不可欠な物質であるが、体内に取り込まれた酸素の一部は、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素 (H_2O_2) およびヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) などの活性酸素種 (以下 ROS) および不対電子を有するフリーラジカルに変換されることが知られている (Finaud & Filaire, 2006, Halliwell & Gutteridge, 2007)。これらの ROS およびフリーラジカルは、免疫反応や細胞内のシグナル伝達など、生体の恒常性維持 (ホメオスタシス) において重要な役割を果たす一方で、脂質、タンパク質および核酸などの生体分子を酸化傷害するという負の作用も同時に持ち合わせている (Valko *et al.*, 2007)。

対照的に、生体には、スーパーオキシドディスムターゼ (以下 SOD)、カタラーゼ (以下 CAT) およびグルタチオンペルオキシダーゼ (以下 GPX) などの酵素的抗酸化物質 (Enzymatic antioxidants) と、ビタミン C、ビタミン E および還元型グルタチオン (以下 GSH) などの非酵素的抗酸化物質 (Non-enzymatic antioxidants) から構成される抗酸化防御機構が備わっており、ROS およびフリーラジカルによる負の作用を抑止するための仕組みを自らが保有している (Finaud & Filaire, 2006; Powers & Jackson, 2008)。しかしながら、これら生体の保有する抗酸化防御能を上回る量の ROS およびフリーラジカルが産生された場合には、細胞内の酸化 - 抗酸化平衡の不均衡が生じ、その結果として酸化ストレスが誘導されることとなる (Sies & Jones, 2007)。酸化ストレスの慢性化は、糖尿病、がん、循環器疾患、神経障害などの疾患の発症、およびその進行に深く関わっており、老化過程への関与も示唆されている (Harman, 2006; Valko *et al.*, 2007)。

健康・スポーツ科学の分野では、一過性の持続的運動により生体内の ROS およびフリーラジカルの産生が増加し、酸化ストレスが誘導されることが 30 年以上も前から報告されて

いる (Dillard *et al.*, 1978; Brady *et al.*, 1979; Davies *et al.*, 1982) . 一般的に, 運動誘発性酸化ストレスは, 運動強度や時間といった運動負荷の影響を強く受けることが報告されており (Alessio *et al.*, 1988; Koz *et al.*, 1992; Bloomer *et al.*, 2007a; Lamprecht *et al.*, 2008) , 酸素を大量に消費する有酸素性運動だけでなく, 短時間の無酸素性運動 (*e.g.* スプリント運動およびレジスタンス運動など) によっても引き起こされることが明らかにされている (Alessio *et al.*, 1988; Marzatico *et al.*, 1997; McBride *et al.*, 1998) . このように, 運動強度または運動時間の違いが生体の酸化ストレスに及ぼす影響を検討した論文はいくつか存在するものの, 疲労困憊運動の強度の違いが生体の酸化ストレスに及ぼす影響は未だ明らかにされていない.

ところで, 運動による過剰な ROS およびフリーラジカルの産生は, 生体分子の酸化傷害だけではなく, 生体に様々な負の作用をもたらすことが報告されている. Reid *et al.* (1994) は, 非酵素的抗酸化物質である GSH を増加させるはたらきを持つ N-アセチルシステイン (以下 NAC) を静脈投与することで, 低周波電気刺激による前脛骨筋の疲労が抑制されることを明らかにした. また, Medved *et al.* (2004) は, NAC の静脈投与により最大下自転車運動における持続的パフォーマンスが改善されることを報告しており, 運動により産生される過剰な ROS およびフリーラジカルは, 局所的な筋疲労に加えて, 全身性の持続的パフォーマンスの低下にも関与しているものと考えられる. 実際に, ROS およびフリーラジカルが筋疲労あるいは持続的パフォーマンスの低下に関与していることを示すエビデンスは, ヒトおよび動物実験を問わず多数存在している (Novelli *et al.*, 1990, 1991; Shindoh *et al.*, 1990; McKenna *et al.*, 2006) .

ROS およびフリーラジカルが筋疲労ならびに持続的パフォーマンスの低下を引き起こすメカニズムについては未だ不明な点が多いが, 筋のカルシウム感受性の低下や (Andrade *et al.*, 2001) , 筋内のカリウム平衡の攪乱 (McKenna *et al.*, 2006) に ROS およびフリーラジカルが関与している可能性がこれまでに示されている. さらに, Aoi *et al.* (2008) は,

ROS およびフリーラジカルが骨格筋における脂質代謝を抑制し、結果として筋グリコーゲンの利用率を高める可能性を示している。骨格筋におけるグリコーゲン含量は、持久的パフォーマンスを規定する重要な因子であることから (Bergström *et al.*, 1967; Bergström & Hultman, 1967) , 過剰な ROS およびフリーラジカルの産生は、筋内におけるエネルギー基質の利用動態を変化させることで、間接的に持久的パフォーマンスを低下させる可能性があるといえる。実際に, Aoi *et al.* (2008) は、抗酸化物質であるアスタキサンチンの摂取によりマウスの持久的パフォーマンスが向上することを報告している。これらのことから、運動による過剰な ROS およびフリーラジカルの産生は、筋グリコーゲンの利用率増加やその他の要因により筋疲労および持久的パフォーマンスの低下を引き起こすものと考えられる。

筋疲労や持久的パフォーマンスの低下に加え、ROS およびフリーラジカルは筋損傷にも関与することが示唆されている。伸張性筋収縮を伴う筋損傷性運動 (Muscle-damaging exercise) では、その回復過程において食細胞 (*e.g.* 好中球およびマクロファージ) の組織への浸潤が促進され、食食時の呼吸バースト (Respiratory burst) により相当量の ROS およびフリーラジカルが放出されると考えられている (Brickson *et al.*, 2003; Tidball, 2005) 。これら一連の生理的現象は、筋の修復や再生において必要不可欠である一方で、二次的な筋損傷を引き起こす要因となりうることが示されている (Brickson *et al.*, 2003; Tidball, 2005) 。筋損傷は、遅発性筋痛、筋力および関節可動域の低下、ならびに筋膨張などの症状を介して運動パフォーマンスを一時的に低下させることから (McGinley *et al.*, 2009; Nikolaidis *et al.*, 2008) , ROS およびフリーラジカルは筋損傷性運動後に生じる一時的な運動パフォーマンスの低下にも部分的に関与しているものと思われる。

以上のように、運動時あるいは運動後に生じる過剰な ROS およびフリーラジカルの産生は、筋疲労、持久的パフォーマンスの低下および筋損傷など、生体に様々な負の作用をもたらすといえる。そのため、これらの負の作用を抑制するための補助的な抗酸化物質摂取の

効果について、これまでに膨大な数の研究が行われている。実際に、ビタミン C, ビタミン E をはじめとする抗酸化物質の摂取が、筋疲労 (Shindoh *et al.*, 1990; Barclay & Hansel, 1991; Reid *et al.*, 1992, 1994; Travaline *et al.*, 1997) , 持久的パフォーマンスの低下 (Novelli *et al.*, 1990, 1991; Medved *et al.*, 2004; McKenna *et al.*, 2006; Aoi *et al.*, 2008) および筋損傷 (Van Der Meulen *et al.*, 1997; McBride *et al.*, 1998; Sacheck *et al.*, 2003) に対し有効であることがヒトおよび動物実験において報告されている。

近年, 新たな抗酸化物質として水素分子 (以下水素) に注目が集まっている。水素は, 最小かつ高い可燃性を有する無色, 無味, 無臭のガス状分子である (Huang *et al.*, 2010) 。水素は, 生体内において不活性ガスとして挙動するものと長年考えられてきたが, 2007 年, Ohsawa *et al.* は, 水素がヒドロキシラジカルおよびペルオキシナイトライト (ONOO^-) を選択的に還元し, 細胞を効率的に保護することを報告した。また, この先行研究では, 水素ガスを吸入することで, 虚血 - 再灌流後のラットの脳損傷が著しく抑制されることも明らかにしている。以来, 水素の抗酸化作用に大きな関心が寄せられることとなり, 現在までに, がん, 糖尿病, 心血管疾患および神経変性疾患などの様々な疾患に対して水素が有効であることが報告されている (Huang *et al.*, 2010; Ohta, 2011) 。さらに, これらの疾患の予防・改善効果は, 抗酸化作用のみで説明できるものではなく, 抗炎症作用, 神経保護作用, 抗代謝異常作用など, 水素が様々な生理作用を併せ持つことがこれまでに明らかにされている (Huang *et al.*, 2010; Ohta, 2011) 。

このように, 疾患に対する水素の有効性は数多く報告されている一方で, 運動誘発性酸化ストレスおよびその関連指標に対する水素摂取の効果についてはほとんど明らかにされていない。水素は, ガス状分子であることから摂取方法が多彩であり (e.g. 水素ガスの吸入, 水素水の飲用および水素入浴など) , また, その化学的特性から, 細胞膜を容易に通過し, ミトコンドリアなどの細胞小器官に急速に拡散することができるという利点を有している (Huang *et al.*, 2010; Ohta, 2011) 。そのため, このような利点を有する水素が, 運動

誘発性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は極めて重要であると考えられる。

以上のことから、本研究では、疲労困憊運動の強度の違いが生体の酸化ストレスに及ぼす影響を明らかにすることを第1の目的とした（研究課題1）。また、水素水の飲用あるいは水素入浴という2つの摂取方法を用いて、運動誘発性酸化ストレスおよびその関連指標に及ぼす水素摂取の影響についても併せて検討することとした（研究課題2および3）。本研究の課題は以下の3つである。

【研究課題1・動物実験】

強度の異なる疲労困憊運動がラット血漿および骨格筋の酸化ストレスに及ぼす影響

【研究課題2・動物実験】

2週間の水素水摂取がラットの運動誘発性酸化ストレスおよび組織グリコーゲン含量ならびに持久的パフォーマンスに及ぼす影響

【研究課題3・ヒト実験】

ダウンヒル運動後の酸化ストレスおよび遅発性筋痛に及ぼす水素入浴の効果

第2章 文献考証

1. 安静時における酸化ストレス

1) 活性酸素種およびフリーラジカルの産生

ヒトをはじめとする好気性生物では、通常の代謝プロセスの一部として恒常的に ROS およびフリーラジカルが産生されている (Finaud & Filaire, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007) . フリーラジカルは、原子または分子軌道に 1 つないし複数の不対電子を有する分子または分子断片として定義されており、その中で酸素から派生するものを ROS と呼称している (Finaud & Filaire, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007) . しかし、ROS には、フリーラジカルだけでなくノンラジカルも含まれており、また、ROS は他のフリーラジカルファミリーである活性窒素種 (RNS) などとも密接に関わり合っている (Finaud & Filaire, 2006, Halliwell & Gutteridge, 2007, Table 2-1) .

生体内で最初に生成される ROS およびフリーラジカルは、スーパーオキシドおよび一酸化窒素 (NO^{\cdot}) であり、次いで過酸化水素、ヒドロキシラジカル、ペルオキシナイトライト および次亜塩素酸 (HOCl) などに続く連鎖反応が開始される (Finaud & Filaire, 2006, Halliwell & Gutteridge, 2007) . これらの ROS およびフリーラジカルは、免疫反応や細胞内のシグナル伝達などにおいて好ましい効果 (Positive effect) を発揮するものの、脂質、タンパク質および核酸などを酸化傷害するという負の効果 (Negative effect) も発揮することが知られている (Finaud & Filaire, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007) . 実際には、先行研究では、安静時における ROS およびフリーラジカルの産生が生体内のあらゆる組織 (e.g. 肝臓, 腎臓, 心臓, 骨格筋など) で行われていることや、これらの組織において常に一定レベルの酸化傷害が引き起こされていることなどが報告されている (Nikolaidis *et al.*, 2012) .

Table 2-1. Classification of free radicals (Finaud & Filaire, 2006)

Free radical	Contraction	Half-life
Reactive oxygen species	ROS	
Superoxide anion	$O_2^- \cdot$	10^{-5} sec
Ozone	O_3	Stable
Singlet oxygen	1O_2	1 μ sec
Hydroxyl radical	$\cdot OH$	10^{-9} sec
Hydrogen peroxide	H_2O_2	Stable
Hypochlorous acid	$HOCl$	Stable
Alkoxy radical	$RO \cdot$	10^{-6} sec
Peroxy radical	$ROO \cdot$	7 sec
Hydroperoxy radical	$ROOH \cdot$	
Reactive nitrogen species	RNS	
Nitric oxide	$NO \cdot$	
Nitric dioxide	$NO_2 \cdot$	1^{-10} sec
Peroxynitrite	$ONOO^-$	0.05^{-1} sec

2) 抗酸化防御システム

生体には, ROS およびフリーラジカルによる有害な影響から細胞を保護するための抗酸化防御システムが備わっている. 抗酸化防御システムは, SOD, CAT および GPX を含む酵素的抗酸化物質と, ビタミン C, ビタミン E および GSH 含む非酵素的抗酸化物質から構成されており, 細胞内外において基質の酸化を遅らせたり, またはそれを防止する役割を担っている (Finaud & Filaire, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007, Table 2-2) . 一般的に, 抗酸化システムの能力は栄養摂取量 (*e.g.* ビタミンおよびミネラルなど) の影響を受けるものの, ヒトを除く多くの哺乳類では生体内で自らビタミン C を合成することができる点に注意が必要である (Chatterjee *et al.*, 1973) .

Table 2-2. The major antioxidants in biological systems (Finaud & Filaire, 2006)

Enzymatic antioxidant	Non-enzymatic antioxidant
Mn-SOD	Vitamin E (tocopherol)
Cu-Zn-SOD	Vitamin A (retinol)
CAT	Vitamin C (ascorbic acid)
GPX	GSH
	Uric acid
	Flavonoids
	Other antioxidants (<i>e.g.</i> bilirubin, coenzyme Q ₁₀ , thioredoxin, glutaredoxin)

3) 酸化ストレスの定義と疾患

上述したように、生体内では、複雑な調節メカニズムのもとで常に酸化 - 抗酸化平衡が一定に保たれているものの、何らかの生理的刺激 (*e.g.* 放射線, アルコールおよび運動) が加わることでこれが酸化方向に傾き、酸化ストレスが誘発される (Fig. 2-1)。酸化ストレスは、当初「酸化 - 抗酸化平衡が攪乱され酸化方向に傾くこと」と定義されていたが (Sies & Cadenas, 1985), その後の研究の発展により、「酸化 - 抗酸化の不均衡により酸化に傾き、レドックスシグナル伝達およびその制御の混乱およびあるいは分子傷害が引き起こされること」と再定義されている (Sies & Jones, 2007)。酸化ストレスの慢性化は、糖尿病, がん, 循環器疾患および神経障害などの疾患の発症やその進行に深く関わっており、老化への関与も懸念されている (Harman, 2006; Valko *et al.*, 2007)。そのため、酸化 - 抗酸化平衡を維持することは、生物の生存と健康において極めて重要であると考えられる。

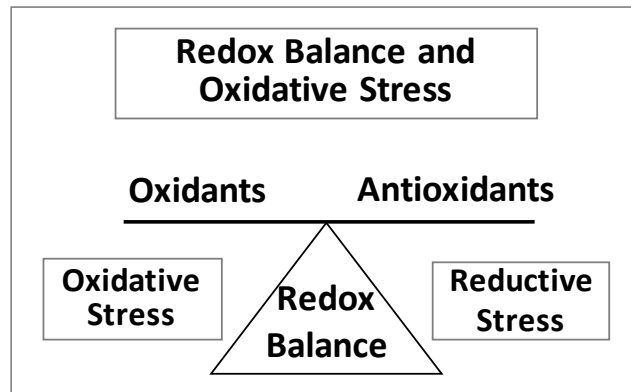


Fig. 2-1. Cellular redox balance between oxidants and antioxidants, and concept of oxidative stress (Powers *et al.* 2004)

4) 酸化ストレスの測定法

Powers & Jackson (2008) は、自身の総説の中で、生体内の酸化ストレスを反映する生体指標（酸化ストレス指標）を大きく4つに分類している（Fig. 2-2）。1つ目は、ROSおよびフリーラジカルなどの酸化体（Oxidants）を検出する方法である。ROSおよびフリーラジカルの多くは反応性が高く、半減期が極めて短いことから直接測定することが困難であるものの、蛍光プローブやスピントラップ剤といった外因性分子を用いて発光または安定化させた後に測定することが可能である。しかし、上述したように、生体の酸化ストレスは酸化-抗酸化平衡によって決定されるため、酸化体の測定だけでは酸化ストレスを厳密に評価することはできないといわれている（Powers & Jackson, 2008）。

2つ目は、組織における抗酸化レベルを測定する方法である。抗酸化レベル（濃度または活性）は、それぞれの組織によって異なるものの、酸化ストレスに曝露されることで上昇あるいは減少する。抗酸化レベルの測定は、酸化ストレスを反映する有用な指標であるが、栄養状態が測定結果に影響を及ぼす危険性を孕んでいる。

3つ目は、酸化生成物（Oxidation products）を測定する方法である。この酸化生成物には、タンパク質酸化の指標であるカルボニル化タンパク質（以下PC）、脂質酸化の指標で

ある F₂-イソプロスタン, マロンジアルデヒド (以下 MDA) , DNA 酸化の指標である 8-ヒドロキシグアノシン (以下 8-OHdG) などが含まれている. これら酸化生成物の測定は, 酸化ストレスを評価するうえで最も重要であると考えられているが (Powers & Jackson, 2008) , 酸化ストレス期においても微量にしか存在しないため, しばしば測定が困難となる.

4つ目は, 酸化還元 (レドックス) 平衡を測定する方法である. 最も頻繁に用いられているレドックス指標は, 還元型グルタチオン・酸化型グルタチオン比 (以下 GSH/GSSG 比) である. レドックス指標は, 生体内の酸化 - 抗酸化平衡を両面から評価できるため, 非常に有用な酸化ストレス指標であるが, その反面, 他の方法と同様に, 組織の抽出やサンプル処理を行う際の手技が結果に影響する可能性が指摘されている (Powers & Jackson, 2008) .

以上のように, それぞれの酸化ストレス指標には長所と短所が共存していることから, 生体内の酸化ストレスを評価する最良の指標は今のところ存在しないといえる. そのため, 単一の酸化ストレス指標を測定するのではなく, 複数の酸化ストレス指標を測定することにより生体の酸化ストレス状態を評価する方法が広く推奨されている (Halliwell & Gutteridge, 2007; Powers *et al.*, 2010) .

Markers of oxidative stress

<u>Oxidants</u>	<u>Antioxidants</u>
Superoxide anions Hydroxyl radical Hydrogen peroxide Other radicals	Glutathione Ascorbate Alpha-tocopherol Total antioxidant capacity
<u>Oxidation products</u>	<u>Antioxidant/Pro-oxidant balance</u>
Protein carbonyls Isoprostanes Malondialdehyde 8-OH-dG	GSH/GSSG ratio Other?

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

2. 運動誘発性酸化ストレス

1) 一過性の運動と酸化ストレス～ヒト試験～

Dillard *et al.* (1978) は、最大酸素摂取量（以下 $\dot{V}O_2\max$ ）の 50%強度での自転車エルゴメーター運動を 60 分間行うことにより、脂質過酸化の指標である呼気ペンタン濃度が増加することを報告した。この先行研究は、ヒト実験、動物実験を問わず、運動が生体内の酸化ストレスを高めることを示唆した最初の研究であった。その後、一過性の有酸素性運動による酸化ストレスレベルの増加は、血液においても同様に観察されている（Lovlin *et al.*, 1987; Gohil *et al.*, 1988）。

これら 1970 年代後半から 1980 年代までに行われたいくつかの先行研究を契機として、運動誘発性酸化ストレスに関する研究が盛んに行われるようになり、現在までに、生体の酸化ストレス指標に及ぼす一過性の有酸素性運動の影響について膨大な数の報告がなされている。これらの先行研究を整理すると、対象者は健常な若年男性が最も多く、研究毎に異なるトレーニング状況（Training status）を有する被験者が選定されているようである。運動様式としては、自転車エルゴメーター運動またはトレッドミル運動が最も多く、実験室（人工気象室）内において最大あるいは最大下運動を 10～90 分間行わせている事例が多く見受けられる。また、一部の研究では、ダウンヒル運動など、伸張性筋収縮を伴う運動様式が採用されている。分析対象となる生体試料（サンプル）には、血液が用いられることが圧倒的に多く、それ以外の生体サンプル（*e.g.* 呼気、骨格筋および尿）を対象とした研究はかなり限られる。これらの生体サンプルを用いた酸化ストレスの評価には、脂質、タンパク質、DNA などの酸化生成物（*e.g.* MDA, PC および 8-OHdG）の測定が広く用いられており、組織中の抗酸化レベルやレドックス平衡の測定なども頻繁に用いられている。

1990 年代以降に行われた先行研究では、一過性の有酸素性運動が生体内における脂質（Kanter *et al.*, 1993; Sen *et al.*, 1994b; Alessio *et al.*, 1997; Leaf *et al.*, 1997; Ashton *et al.*, 1998; Michailidis *et al.*, 2007）、タンパク質（Alessio *et al.*, 2000; Goldfarb *et al.*,

2005b; Bloomer *et al.*, 2006, 2007a; Michailidis *et al.*, 2007) および DNA (Hartman *et al.*, 1994; Niess *et al.*, 1996; Morillas-Ruiz *et al.*, 2005) の酸化傷害指標を増加させることが報告されている。同様に、一過性の有酸素性運動が生体内の抗酸化レベルやレドックス平衡に影響を及ぼすことも数多く報告されている (Sastre *et al.*, 1992; Viguie *et al.*, 1993; Sen *et al.*, 1994b; Laaksonen *et al.*, 1996; 1999; Alessio *et al.*, 2000; Quindry *et al.*, 2003; Medved *et al.*, 2004; Goldfarb *et al.*, 2005b; Michailidis *et al.*, 2007) 。その一方で、一過性の有酸素性運動が ROS およびフリーラジカルなどの酸化体を増加させることを直接的に示したエビデンスは極めて限定的である (Ashton *et al.*, 1998, 1999) 。このように、一過性の有酸素性運動は生体の酸化ストレスを誘発する生理的刺激の一つであると考えられているが、その一方で、一部の酸化ストレス指標または全ての酸化ストレス指標において、運動による影響が認められていない先行研究も一定数存在している (Alessio *et al.*, 2000; Quindry *et al.*, 2003; Bloomer *et al.*, 2005, 2006) 。

ところで、運動誘発性酸化ストレスは、有酸素性運動だけではなく、無酸素性運動によっても惹起されることが先行研究において示唆されている。具体的には、スプリント走の繰り返し (Marzatico *et al.*, 1997) , ウィンゲートテスト (Groussard *et al.*, 2003a, 2003b) , 全身性 (McBride *et al.*, 1998; McNulty *et al.*, 2005) および局所性 (Lee *et al.*, 2002; Bloomer *et al.*, 2005, 2007b; Hudson *et al.*, 2008) のレジスタンス運動が血中の酸化ストレスを高めることが報告されている。また、いくつかの先行研究では、筋バイオプシー法を用いて、局所性のレジスタンス運動が骨格筋の酸化ストレスを高めることを報告している (Child *et al.*, 1999; Radak *et al.*, 1999; Bailey *et al.*, 2007) 。

2) 一過性の運動と酸化ストレス～動物実験～

Brady *et al.* (1979) は、ラットに対し、体重の 2%重量の重りを負荷した水泳運動を疲労困憊に至るまで行わせた結果、後肢骨格筋および肝臓における TBARS レベルが増加する

ことを明らかにした。同様に, *Davies et al.* (1982) は, 動物用トレッドミルを用いて, ラットに漸増負荷による疲労困憊運動を行わせた結果, 後肢骨格筋および肝臓における TBARS レベルが増加することを明らかにしている。重要なことに, この先行研究では, 後肢骨格筋および肝臓におけるフリーラジカルレベルが疲労困憊運動により増加することを ESR 法により明らかにしている。この研究は, 一過性の持久的運動が組織内におけるフリーラジカル産生を高めることを直接的に証明した最初のエビデンスであり, 運動誘発性酸化ストレスの研究における大きな転換点となった。

これまでの先行研究を概観すると, 実験動物を対象とした研究の多くは, 有酸素性運動のプロトコルとして水泳運動またはトレッドミル運動を行わせている。被験動物には, 運動不足 (Sedentary) の個体を用いることが多く, 事前に数日間の予備運動を行わせた後に本運動を行なわせる方法が広く用いられている。分析対象となる生体サンプルは, 血液を主な対象とするヒト研究とは異なり, 骨格筋をはじめとする生体組織が頻繁に用いられている。また, 酸化ストレスの評価には, ヒト研究と同様に, 酸化生成物, 抗酸化レベルおよびレドックス平衡などの測定が用いられる事例が多く見受けられる。加えて, 一部の研究では, 組織学的方法を用いた酸化ストレスの評価も実施されている。

実験動物を対象とした研究では, 一過性の有酸素性運動が血中の酸化ストレスだけでなく, 骨格筋, 脳, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓などの各組織における酸化ストレスを高めることが示唆されている (*Kumar et al.*, 1992; *Leeuwenburgh & Ji*, 1995; *Radak et al.*, 1996; *Bejma et al.*, 1999; *Liu et al.*, 2000; *Kruger et al.*, 2009; *Dalla Corte et al.*, 2013) 。また, 注目すべきことに, *Liu et al.* (2000) は, 一過性の有酸素性運動に対する酸化ストレス応答は, 組織特異的であることを明らかにしている。この先行研究では, 運動後の抗酸化レベル (*e.g.* ビタミン C, ビタミン E およびグルタチオンなど) が各組織によって異なる応答を示していたことから, 一過性の有酸素性運動に対する酸化ストレス応答は, 各組織およびその抗酸化レベルに応じて異なるものと考えられる。

ヒトを対象とした研究と同様に、実験動物を対象とした研究においても無酸素性運動による酸化ストレスの増加が観察されている。動物モデルでは、トレッドミルを用いた高強度運動 (Alessio *et al.*, 1988; Kayatekin *et al.*, 2002) や、電気刺激による筋収縮の繰り返し (Jackson *et al.*, 1985) によって活動筋の酸化ストレスが高まることが報告されている。また、このような無酸素性運動による酸化ストレスの増加は、骨格筋以外の組織 (*i.e.* 肺) においても同様に観察されていることから (Radak *et al.*, 1998) , 無酸素性運動による酸化ストレスは、有酸素性運動と同様に様々な組織において生じているものと推測される。

3) ヒト試験および動物実験の長所と短所

ヒト試験および動物実験の長所ならびに短所をまとめると、ヒトを対象とした研究では、酸素摂取量 (以下 $\dot{V}O_2$) や心拍数などの生理的指標を用いて運動強度を厳密に設定できるという利点を有しているものの、骨格筋やその他の組織における酸化ストレスを評価することは、高い侵襲性を伴うことから困難である。一方、実験動物を対象とした研究では、運動様式が極めて限定され、また、方法論的に不可能ではないものの、運動の強度設定を個別に行うことは非常に困難である。しかし、動物実験ではあらゆる生体組織を分析対象とすることができ、さらには、遺伝的要因や環境的要因による影響をある程度排除できる点などを利点として挙げることができる。

3. 運動誘発性酸化ストレスに対する抗酸化物質摂取の効果

1) 運動誘発性酸化ストレスに対する抗酸化物質摂取の効果～ヒト試験～

運動誘発性酸化ストレスに対する抗酸化物質摂取の効果については、1970年代後半から現在に至るまで膨大な数の研究が行われてきた。これらの先行研究を概観すると、抗酸化物質にはビタミンC、ビタミンEを筆頭に、 β -カロテン、コエンザイムQ₁₀、 α -リポ酸、NAC、ケルセチン、レスベラトロール、ポリフェノール類など、多種多様なサプリメントが用いら

れており、これらの複合摂取による効果も検討されている。また、その摂取期間は短期 (*i.e.* 単回～数日間) から長期 (*i.e.* 1週間～数ヶ月) に至るまで実に様々であり、投与のタイミング (運動前、運動時および運動後) やその摂取量も研究毎に異なっている。その他、対象者、運動プロトコル (*i.e.* 運動様式、強度および時間)、分析対象となる生体サンプルおよび酸化ストレスの評価方法については、一般的な運動誘発性酸化ストレスの研究とほぼ同様である (p.11 参照)。

先行研究では、ビタミン C (Alessio *et al.*, 1997; Ashton *et al.*, 1999; Goldfarb *et al.*, 2005b)、ビタミン E (Dillard *et al.*, 1978; Sumida *et al.*, 1989; Itoh *et al.*, 2000)、およびその複合摂取 (Kanter *et al.*, 1993; Mastaloudis *et al.*, 2004a, 2004b; Bloomer *et al.*, 2006; Davison *et al.*, 2007; Goldfarb *et al.*, 2005a, 2007) が運動誘発性酸化ストレスの抑制に効果的であることが報告されている。また、その他の抗酸化物質においても、運動誘発性酸化ストレスに対する有効性が数多く報告されている (Sen *et al.*, 1994a, 1994b; Sumida *et al.*, 1997; Morillas-Ruiz *et al.*, 2005)。

加えて、運動誘発性酸化ストレスの抑制によってもたらされる生理的影響についても同様に検討が行われている。これまでに、ビタミン C やビタミン E をはじめとする抗酸化物質の補助的な摂取が、筋疲労 (Reid *et al.*, 1994; Travaline *et al.*, 1997)、持久的パフォーマンスの低下 (Medved *et al.*, 2004; McKenna *et al.*, 2006) および筋損傷 (McBride *et al.*, 1998; Sacheck *et al.*, 2003; Bloomer *et al.*, 2004; Bryer & Goldfarb, 2006) の抑制に有効であることが報告されている。さらに、筋損傷に付随して起こる二次的な酸化ストレス (Thompson *et al.*, 2001b; Bryer & Goldfarb, 2006; Close *et al.*, 2006)、炎症反応 (Cannon *et al.*, 1990, 1991; Thompson *et al.*, 2001b; Phillips *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004) および遅発性筋痛 (Kaminski & Boal, 1992; Thompson *et al.*, 2001b; Bryer & Goldfarb, 2006) に対する抗酸化物質摂取の有効性についても報告がなされている。

2) 運動誘発性酸化ストレスに対する抗酸化物質摂取の効果～動物実験～

ヒトを対象とした研究とは異なり、実験動物を対象とした研究では、骨格筋に代表される生体の各組織における運動誘発性酸化ストレスに対する抗酸化物質摂取の効果が検討されている。事実、抗酸化物質摂取による運動誘発性酸化ストレスの抑制効果は、骨格筋をはじめ、心臓、肝臓および腎臓などの生体各組織において観察されている (Brady *et al.*, 1979; Kumar *et al.*, 1992; Reznick *et al.*, 1992; Sastre *et al.*, 1992; Radak *et al.*, 1996; Khanna *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2009) .

また、他方では、ヒト研究と同様に筋疲労 (Shindoh *et al.*, 1990; Barclay & Hansel, 1991; Reid *et al.*, 1992; Diaz *et al.*, 1994; Khawli & Reid, 1994; Supinski *et al.*, 1997) , 持続的パフォーマンスの低下 (Novelli *et al.*, 1990, 1991; Asha Devi *et al.*, 2003; Aoi *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013) および筋損傷 (Van Der Meulen *et al.*, 1997; Kyparos *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012) に対する抗酸化物質摂取の有効性を示すエビデンスは数多く存在している。

ヒト試験および動物実験の結果をまとめると、補助的な抗酸化物質の摂取は、運動誘発性酸化ストレスおよびその負の作用に対して一定の効果を発揮するものと考えられる。しかし、その一方で、運動誘発性酸化ストレスおよびその負の作用に対する抗酸化物質摂取の有効性について否定的な見解を示した先行研究 (Warren *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 2001a; Beaton *et al.*, 2002; Nieman *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2003, 2004; Connolly *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2009) や、反対に、酸化ストレスを助長する危険性を指摘した先行研究 (Childs *et al.*, 2001; Nieman *et al.*, 2004) も散見される。これら結果の不一致を生む要因として、運動プロトコル (*e.g.* 運動様式, 強度および時間) , 実験対象 (*e.g.* 年齢, 栄養摂取量およびトレーニング状況) および抗酸化物質の摂取プロトコル (*e.g.* 種類, 用量, 期間, タイミング) の違いなどが影響している可能性が考えられる。

3) 運動トレーニングによる生理的適応に及ぼす抗酸化物質摂取の影響

Gomez-Cabrera *et al.* (2008) は、ビタミン C の長期的かつ過剰な投与が持久的トレーニングによる骨格筋の適応を阻害し、トレーニング効果を減弱させる可能性を報告している。この先行研究を契機として、抗酸化サプリメントの摂取が運動トレーニングによる骨格筋の生理的適応に負の影響を及ぼすのか否かについて多くの関心が寄せられることとなった。いくつかの反証論文が存在するものの (Wadly *et al.*, 2010; Yfanti *et al.*, 2010; Higashida *et al.*, 2011) , 抗酸化サプリメントの摂取はトレーニングによる骨格筋の生理的適応を阻害する危険性があることから (Ristow *et al.*, 2009; Strobel *et al.*, 2011; Paulsen *et al.*, 2014) , 長期的かつ過剰な抗酸化物質の摂取には注意を要する。

4. 新たな抗酸化物質としての水素

1) 疾患に対する水素摂取の効果

水素は、最小かつ高い可燃性を有する無色、無味、無臭のガス状分子である (Huang *et al.*, 2010) 。ヒトを含む哺乳類動物は、水素の触媒 (*i.e.* ヒドロゲナーゼ) を持たないため、哺乳類動物の細胞内において水素は不活性ガスとして挙動するものと長年考えられてきた。しかし、2007年になって、Ohsawa *et al.* (2007) は、水素がヒドロキシラジカルおよびペルオキシナイトライトを選択的に還元し、細胞を効率的に保護することを報告した。また、この先行研究では、水素ガスの吸入により、虚血 - 再灌流後のラットの脳損傷が著しく抑制されることも示されている。以来、水素の医療応用に向けた研究が盛んに行われるようになり、これまでに、がん、糖尿病、心血管疾患および神経変性疾患などの様々な疾患に対する水素の有効性が示されている (Huang *et al.*, 2010; Ohta, 2011) 。水素によるこれらの有益な効果は、直接的な抗酸化作用だけではなく、遺伝子発現調節による間接的な抗酸化作用も影響していることが報告されている (Huang *et al.*, 2010; Ohta, 2011) 。また、水素は、抗酸化作用だけでなく、抗炎症作用、神経保護作用および抗代謝異常作用など、

様々な生理作用を介して疾患の改善に寄与することも明らかにされている (Huang *et al.*, 2010; Ohta, 2011) .

2) 運動に対する水素摂取の効果

Aoki *et al.* (2012) は、男子大学サッカー選手 10 名を対象として、75% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度での自転車エルゴメーター運動を 30 分間、および 100 回の等速性膝伸展運動を行わせ、水素水摂取の影響を検討した。その結果、水素水を摂取させた群では、血中乳酸濃度の抑制やピークトルクの改善が認められたものの、血中の酸化ストレス指標 (*i.e.* 活性酸素代謝産物濃度 以下 d-ROMs; 生物学的抗酸化能 以下 BAP) に対する効果は観察されなかった。また、その他の研究では、水素が運動による血液 pH の低下を抑制する可能性が示されている

(Ostojic, 2012) . しかし、疾患に対する水素摂取の効果については数多くの報告がなされているものの、運動に対する水素摂取の効果についてはほとんど報告がなされていない。

3) 水素の利点およびその摂取方法

水素は、他の抗酸化物質とは異なるいくつかの長所を有する。まず、水素はその化学的特性から、細胞膜を容易に通過しミトコンドリアなどの細胞小器官に急速に拡散することができる点を挙げることができる。また、水素はガス状分子であることから、水素ガスの吸入、水素水の経口摂取、水素生理食塩水の静脈投与、水素の直接的な吸収 (*e.g.* 水素入浴) および腸内水素を増加させるサプリメントの摂取など、摂取方法が多彩である点も利点の一つといえる (Ohta, 2011) . 先行研究では、余剰分の水素は呼気中から排出されるために高濃度の摂取であっても副作用はないことが報告されており (Ohta, 2011) , 摂取方法の違いが生体内の水素濃度変化に及ぼす影響についても徐々に明らかにされつつある

(Liu *et al.*, 2014) .

第3章 研究課題の設定と詳細

1. 研究課題の設定

文献考証に記述した通り、運動誘発性酸化ストレスは運動の強度と時間の影響を受ける。しかし、これらの先行研究では、強度の異なる運動を一定の時間行わせるか、あるいは同一強度での運動を異なる時間行わせており、疲労困憊に至るまで運動を継続させていない。そこで、研究課題1では、疲労困憊運動の強度の違いが生体の酸化ストレスに及ぼす影響を明らかにするために、ラットに対して低強度運動、高強度インターバル運動、漸増負荷運動の3つの異なる疲労困憊運動を負荷し、血漿および骨格筋における酸化生成物ならびに抗酸化レベルを変化させるのか否かを観察することとした。なお、ここでの研究課題設定は、研究課題2での運動様式を選択することと深く関わっている。

研究課題2では研究課題1で決定した運動様式を用いて、運動誘発性酸化ストレスおよびその関連指標に及ぼす水素摂取の影響を検討した。近年では、新たな抗酸化物質としての水素に注目が集まっているものの、運動誘発性酸化ストレスに対するその影響は未だ明らかにされていない。そこで、ここでは、ラットに対して水素水またはミネラルウォーターのいずれかを2週間に亘り摂取させ、疲労困憊運動を行った際の酸化ストレスおよび組織グリコーゲン含量ならびに持続的パフォーマンスに及ぼす影響を検討した。

研究課題3では、一般的な持続的運動（非筋損傷性運動）とは異なる酸化ストレス応答を示す筋損傷性運動を用いて、水素摂取による影響を検討した。実験動物を対象とした研究と同様に、運動誘発性酸化ストレスに対する水素摂取の影響は、ヒトにおいてもほとんど明らかにされていない。そこで、ここでは、ヒトを対象として、平地走行時の75~85% $\dot{V}O_2\text{peak}$ に相当する速度での30分間のダウンヒル運動（傾斜-8%）を行わせ、運動後の酸化ストレスおよび遅発性筋痛に及ぼすマグ水素を用いた1週間の水素入浴の影響を検討した。

2. 研究課題の詳細

1) 研究課題 1 「強度の異なる疲労困憊運動がラット血漿および骨格筋の酸化ストレスに及ぼす影響」

a) 緒言

一過性の持久的運動がスーパーオキシド、過酸化水素およびヒドロキシラジカルなどの ROS およびフリーラジカルを増加させることは広く知られている (Powers & Jackson, 2008) . ROS およびフリーラジカルは、免疫反応や細胞内シグナル伝達経路の調節、および遺伝子発現の制御など、生体の恒常性維持において必要不可欠な役割を果たす一方で、脂質、タンパク質および核酸などの生体分子に傷害を与えることが知られている (Valko *et al.*, 2007) . そのため、生体内での過剰な ROS およびフリーラジカルの産生は、糖尿病、がん、循環器疾患、神経障害などの疾患の進行だけでなく、老化過程にも関与することが示唆されている (Harman, 2006; Valko *et al.*, 2007) . また、スポーツ科学の分野では、筋収縮に伴う過剰な ROS 産生が筋力の低下や筋疲労に関与する可能性が示されている (Shindoh *et al.*, 1990; Reid *et al.*, 1994; Andrade *et al.*, 1998) .

対照的に、生体には酵素的 (*e.g.* SOD, CAT および GPX など) および非酵素的な抗酸化物質 (*e.g.* GSH, 尿酸およびビリルビンなど) から構成される抗酸化防御機構が備わっており、ROS およびフリーラジカルによる悪影響を抑制するはたらきを担っている (Powers & Jackson, 2008) . しかしながら、高強度あるいは長時間の運動では、抗酸化防御能を上回る量の ROS およびフリーラジカルが体内で産生され、その結果、細胞内の酸化 - 抗酸化平衡の不均衡が生じ、酸化ストレスが誘導されることとなる (Sies & Jones, 2007) . 実際には、一過性の持久的運動は、血中および骨格筋において、TBARS, PC, 8-OHdG などの酸化ストレス指標を増加させることが多くの先行研究で明らかにされている (Alessio *et al.*,

1988; Alessio, 1993; Kanter *et al.*, 1993; Michailidis *et al.*, 2007; Malaguti *et al.*, 2009) .

一般的に、酸化ストレスの程度は運動の強度および継続時間に依存すると考えられている (Alessio *et al.*, 1988; Koz *et al.*, 1992; Bloomer *et al.*, 2007a; Lamprecht *et al.*, 2008) . Alessio *et al.* (1988) は、高強度運動によるラット骨格筋の TBARS レベルの増加は、中強度運動と比べてより大きくなることを報告した。また、Koz *et al.* (1992) は、水泳運動の継続時間の違いがラット骨格筋の TBARS レベルに及ぼす影響を検討し、その結果、骨格筋の TBARS レベルは運動時間の延伸に伴い増加していくことを報告している。同様に、ヒトを対象とした、Lamprecht *et al.* (2008) の研究では、若年の男性鍛錬者を対象として、70, 75 および 80% $\dot{V}O_2\text{max}$ の自転車エルゴメーター運動をそれぞれ 30 分間ずつ行わせたところ、80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度でのみ血漿 PC レベルが増加することを報告している。また、Bloomer *et al.* (2007a) は、トレーニング習慣を有する若年男女を対象に、70% $\dot{V}O_2\text{peak}$ の自転車エルゴメーター運動を 30, 60 および 120 分間ずつ行わせた結果、運動時間に依存して血漿の PC レベルが上昇することを報告している。

以上のように、運動の強度または継続時間が生体の酸化ストレス指標に及ぼす影響を検討した論文はいくつか存在するものの、われわれの知る限りでは、強度の異なる疲労困憊運動が酸化ストレス指標に及ぼす影響を検討した論文は未だ存在しない。健康増進を目的とした運動とは異なり、アスリートは競技パフォーマンスを向上させるために日々過酷なトレーニングを行わなければならないため、疲労困憊運動の強度の違いが生体の酸化ストレス指標に及ぼす影響について基礎的なエビデンスを得ることは極めて重要であると思われる。そこで、本研究では、強度の異なる疲労困憊運動がラット血漿および骨格筋の酸化ストレスに及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

b) 方法

b-1) 実験動物

本実験では、体重が 280～320 g の雄性 Sprague-Dawley 系ラット（日本クレア）24 匹を用いた。ラットは、12 時間 - 12 時間の明暗サイクル（暗期 21:00～9:00）で、かつ温度制御された室内（温度 22～23°C, 湿度 60 ± 5%）にて飼育し、標準的な固形飼料（CE-2, 日本クレア）および水道水を自由摂取させた。ラットは、3 日間の予備飼育終了後に、対照群（CON 群, n = 6）、低強度運動群（LE 群, n=6）、高強度インターバル運動群（HE 群, n = 6）、漸増負荷運動群（IE 群, n = 6）の 4 群にランダムに振り分けた。なお、本実験は、早稲田大学動物実験倫理委員会の承認を得た上で実施された（承認番号 2015A-096）。

b-2) 実験プロトコル

ラットは、3 日間の予備飼育終了後、動物用トレッドミル（夏目製作所）に慣れさせる目的で 10～30 m/min, 傾斜 0°での予備走行運動を 1 日 10 分間, 3 日間連続して行わせた。予備運動最終日の翌日, LE, HE, IE 群のラットには、運動前の計量を行った後にそれぞれ異なる運動プロトコルにて疲労困憊運動を行わせた。疲労困憊の基準は、①電気刺激を与えたにも関わらず、走行スピードを維持することができなくなった時、②ラットを仰向けにした時に即座に立ち直り反射を行えなくなった時、の 2 点とした（Copp *et al.*, 2009）。

LE 群のラットには、傾斜 6°, 速度 20 m/min での運動を維持させた。HE 群のラットには、傾斜 0°, 40 m/min の運動を 30 秒間, 間に 60 秒間の休息を挟んで繰り返させた。IE 群のラットには、傾斜 6°, 速度 15 m/min から走行を開始させ、その後 5 分毎に 5 m/min ずつ速度を上昇させた。本実験で使用した運動プロトコルは、それぞれが先行研究に基づくものであった（Brooks & White, 1978; Liu *et al.*, 2005; Malaguti *et al.*, 2009）。また、CON 群を含む全てのラットは疲労困憊運動の前日から一晩（12 時間）絶食させた。疲労困憊運動により得られたデータから、以下の数式を用いて総仕事量を算出し、運動パフォーマンスの指標とした。

$$\text{総仕事量 (J)} = [(\text{体重}_{(\text{kg})} \cdot 9.80665_{(\text{g})} \cdot \sin\theta) + (\text{体重}_{(\text{kg})} \cdot 9.80665_{(\text{g})} \cdot \text{走行距離}_{(\text{m})})]$$

b-3) 血液および組織のサンプリング

疲労困憊運動の直後、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与（50～100 mg/kg 体重）による完全麻酔下にて下大静脈から採血を行った。血液採取後、右後肢の腓腹筋および肝臓を迅速に摘出した。CON 群のラットは、疲労困憊運動を行わせた他の 3 群と同じ時間帯に同様の手順で解剖した。血液サンプルは、抗凝固剤（ヘパリン）入りの真空採血管（Terumo）に採取し、4°C、1,000 g で 10 分間遠心分離をして血漿を得た。骨格筋および肝臓サンプルは、リン酸緩衝生理食塩水（以下 PBS）により血餅を除去した後に、液体窒素中に浸漬したトンクを用いて瞬間凍結した。血漿、骨格筋および肝臓サンプルは、更なる分析まで -80°C のフリーザー内に保管した。

b-4) 乳酸濃度および酸化ストレス指標の測定

血漿サンプルでは、L-lactate assay kit, TBARS assay kit, Protein carbonyl colorimetric assay kit, Antioxidant assay kit（全て Cayman chemical）を用いて、乳酸、TBARS, PC および総抗酸化能（以下 TAC）を測定した。骨格筋サンプルは、液体窒素にて冷却した乳鉢内で乳棒を用いて粉碎した。その後、粉状になった筋サンプルは、プロテアーゼ阻害剤（Sigma Aldrich）を添加した氷冷ホモジナイズバッファー（50 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM sodium chloride, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate および 1.0% NP-40 を含有）にて電動ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。また、SOD 分析用の骨格筋ホモジネートの作製は、プロテアーゼ阻害剤を加えずに同様のホモジナイズバッファーを用いて行った。以上の手順で得られた筋ホモジネートは、4°C、10,000 g で 10 分間遠心分離をした後に上清を回収した。筋ホモジネートの上清は、クマシ

ーブリリアントブルー（以下 CBB）溶液（ナカライテスク）を用いてタンパク質濃度を調整した後に、血漿と同様の方法にて TBARS, PC, TAC の測定を行った。また、筋ホモジネートの上清では、Superoxide dismutase assay kit, Catalase assay kit, Glutathione peroxidase assay kit (全て Cayman Chemical) により、SOD, CAT および GPX 活性を測定した。

b-5) 組織グリコーゲン含量の測定

骨格筋および肝臓サンプルは Murat & Serfaty (1974) の方法に従って調製した。簡潔に述べると、粉末状にした組織サンプルを氷冷したクエン酸バッファー (25 mM citrate (pH 4.2), 2.5 g/L sodium fluoride) にてホモジナイズした後に、4°C, 14,000 *g* で 5 分間遠心分離をしてから上清を回収した。得られた上清は、Glycogen assay kit (BioAssay Systems) を用いてグリコーゲン含量の測定を行った。

b-6) 統計処理

解析結果は全て平均値 ± 標準誤差で示した。群間の比較には、一元配置の分散分析を用い、多重比較検定には Tukey 法を用いた。統計処理は、SPSS (SPSS ver.22 for windows) を用いて行い、統計学的有意水準は危険率 5 %未満とした。

c) 結果

c-1) ラットの体重および運動パフォーマンス

体重および運動パフォーマンスの結果を Table 3-1-1 に示した。飼育終了時、すなわち疲労困憊運動開始時の体重は、4 群間で有意差は認められなかった。走行時間は、HE および IE 群と比べて LE 群において有意に長く ($P < 0.05$)、また、走行距離および総仕事量は、

IE 群と比較して LE 群で有意に高い値を示した（走行距離： $P < 0.05$ ，総仕事量： $P < 0.01$ ）。

Table 3-1-1. Body weight and exercise performance parameters in rats

	CON	LE	HE	IE
Body weight (g)	355 ± 3	352 ± 1	341 ± 4	351 ± 4
Running time (min)		91.2 ± 2.9 *†	39.8 ± 4.1	44.9 ± 1.4
Running distance (m)		1824 ± 58 †	1590 ± 164	1086 ± 49
Total work (J)		6939 ± 207 ††	5195 ± 510	4073 ± 153

Data are presented as the mean ± standard error of mean values (SEM) of six animals per group. * indicate a significant difference from HE group at a level of $P < 0.05$. † and †† indicate a significant difference from IE group at a level of $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. CON, control; LE, low-intensity exercise; HE, high-intensity interval exercise; IE, incremental exercise.

c-2) ラット血漿における乳酸濃度および酸化ストレス指標

血漿乳酸濃度および酸化ストレスの結果を Table 3-1-2 に示した。LE, HE および IE 群の血漿乳酸濃度は CON 群と比べて有意に上昇したものの（それぞれ $P < 0.05$ ），運動を実施した 3 群の間に有意な差は認められなかった。血漿 TBARS レベルでは，LE, HE および IE の各群と CON 群との間に有意差は認められなかったものの，LE 群のそれは HE 群と比較して有意に高い値を示した（ $P < 0.05$ ）。血漿 TBARS レベルがいずれの運動によっても増加しなかった一方で，IE 群の血漿 PC レベルは CON 群と比べて有意に高い値を示した（ $P < 0.05$ ）。また，血漿 TAC レベルにおいても，IE 群では CON 群と比べて有意

に高い値が示された ($P < 0.05$)。しかしながら、各運動群の血漿の PC レベルおよび TAC には、有意差は認められなかった。

Table 3-1-2. Lactate concentration and oxidative stress markers in rat plasma

	CON	LE	HE	IE
Lactate (mM)	0.6 ± 0.03	11.8 ± 0.81*	5.9 ± 0.42 *	13.9 ± 1.08 *
TBARS (μM)	2.7 ± 0.07	3.2 ± 0.10 §	2.4 ± 0.05	2.7 ± 0.08
PC (nmol/mg protein)	1.4 ± 0.10	2.1 ± 0.07	2.5 ± 0.18	3.7 ± 0.31 *
TAC (mM Trolox)	1.9 ± 0.04	2.6 ± 0.08	2.7 ± 0.10	3.1 ± 0.16 *

Data are presented as the mean ± standard error of mean values (SEM) of six animals per group. * indicates a significant difference from the CON group at a level of $P < 0.05$. § indicates a significant difference from HE group at a level of $P < 0.05$. CON, control; LE, low-intensity exercise; HE, high-intensity interval exercise; IE, incremental exercise; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; PC, protein carbonyl; TAC, total antioxidant capacity.

c-3) ラット骨格筋における酸化ストレス指標

ラット骨格筋における酸化ストレス指標の結果を Table 3-1-3 に示した。ラット血漿における酸化ストレス指標の結果とは異なり、骨格筋の TBARS, PC レベルおよび TAC では、各運動群と CON 群との間にいずれも有意差は認められなかった。同様に、骨格筋における SOD, CAT および GPX 活性には、各運動群と CON 群との間に有意差は認められなかった。一方で、HE 群の骨格筋における SOD 活性は、IE 群と比較して有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。

Table 3-1-3. Oxidative stress markers in rat skeletal muscle

	CON	LE	HE	IE
TBARS (nM/mg protein)	210.6 ± 6.9	218.9 ± 13.2	230.0 ± 13.0	221.5 ± 15.8
PC (nmol/mg protein)	0.6 ± 0.03	0.6 ± 0.01	0.7 ± 0.03	0.6 ± 0.01
TAC (μM Trolox/mg protein)	30.0 ± 1.4	29.3 ± 0.9	34.3 ± 0.5	32.0 ± 0.6
SOD activity (U/mg protein)	5.7 ± 0.19	5.5 ± 0.11	7.1 ± 0.29 *	5.3 ± 0.08
CAT activity (nmol/min/mg protein)	8.6 ± 0.31	9.0 ± 0.36	9.4 ± 0.36	8.2 ± 0.17
GPX activity (nmol/min/mg protein)	22.2 ± 1.11	20.5 ± 0.56	20.4 ± 0.57	20.5 ± 0.85

Data are presented as the mean ± standard error of mean values (SEM) of six animals per group.

presented as means ± SEM. * indicates a significant difference from the IE group at a level of $P < 0.05$.

CON, control; LE, low-intensity exercise; HE, high-intensity interval exercise; IE, incremental exercise; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; PC, protein carbonyl; TAC, total antioxidant capacity; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPX, glutathione peroxidase.

c-4) ラット骨格筋および肝臓におけるグリコーゲン含量

ラット骨格筋および肝臓におけるグリコーゲン含量の結果を Table 3-1-4 に示した。骨格筋および肝臓のグリコーゲン含量は, LE, HE および IE 群において CON 群と比べて有意に低い値を示した (骨格筋:それぞれ $P < 0.001$, 肝臓:それぞれ $P < 0.05$)。また, 各運動群の比較では, IE 群の筋グリコーゲン含量は LE 群と比較して有意に高い値を示したものの ($P < 0.05$) , 肝グリコーゲン含量では各運動群の間に有意差は認められなかった。

Table 3-1-4. Glycogen contents in rat skeletal muscle and liver

	CON	LE	HE	IE
Muscle glycogen ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	33.4 ± 0.37	5.8 ± 0.97 ***	10.8 ± 0.96 ***	16.5 ± 0.91 *** #
Liver glycogen ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	8.4 ± 0.62	1.6 ± 0.04 *	2.1 ± 0.05 *	1.6 ± 0.07 *

Data are presented as the mean \pm standard error of mean values (SEM) of six animals per group. * and *** indicate a significant difference from the CON group at a level of $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively. # indicates a significant difference from the LE group at a level of $P < 0.05$. CON, control; LE, low-intensity exercise; HE, high-intensity interval exercise; IE; incremental exercise.

d) 考察

本研究では、強度の異なる疲労困憊運動がラットの血漿および骨格筋における酸化ストレスに及ぼす影響を検討した。本研究の結果から、漸増負荷による疲労困憊運動はラットの血漿 PC レベルおよび TAC を増加させることが明らかとなった。一方で、ラット骨格筋の酸化ストレス指標は、いずれの疲労困憊運動によっても変化しなかった。

一過性の持久的運動が血中および骨格筋の酸化ストレス指標を増加させることは広く知られている (Alessio *et al.*, 1988; Alessio, 1993; Kanter *et al.*, 1993; Michailidis *et al.*, 2007; Malaguti *et al.*, 2009)。運動誘発性酸化ストレスの程度は、運動の強度および継続時間に依存することがこれまでに報告されているものの (Alessio *et al.*, 1988; Koz *et al.*, 1992; Bloomer *et al.*, 2007a; Lamprecht *et al.*, 2008)、疲労困憊運動の強度の違いが生体の酸化ストレス指標に及ぼす影響は明らかにされていない。アスリートは、競技パフォーマンスの向上のために日々過酷なトレーニングを行う必要があるため、疲労困憊運動が生体の酸化ストレス指標に及ぼす影響を明らかにすることは極めて重要である。さらに、長期的な視点に立つと、中等度強度の運動によって産生された適度な ROS およびフリーラジカルは骨格筋をはじめとする各組織の生理的適応過程において重要な役割を果たすものの、

疲労困憊運動などの強い生理的刺激によって産生された過剰な ROS およびフリーラジカルは、反対に生理機能を低下させ、オーバートレーニングを引き起こす可能性が指摘されている (Radak *et al.*, 2008) . それゆえ、疲労困憊運動の強度の違いが生体の酸化ストレス指標に及ぼす影響を明らかにすることは、短期的なトレーニングだけでなく、長期的なトレーニング計画を考えるうえでも極めて重要であると考えられる.

本研究において、各疲労困憊運動直後の骨格筋の酸化ストレス指標には、いずれも CON 群と比較して有意な変化が認められなかった (Table 3-1-3) . 一般的に、持久的運動時における ROS およびフリーラジカルの主要産生源は骨格筋であるとみなされているが、骨格筋内における ROS およびフリーラジカルの産生部位については現在も議論が続いている (Powers & Jackson, 2008) . これまでに、酸素摂取の急激な増加に伴うミトコンドリアからの電子漏出、血流配分の変化に起因する XO 系の活性化、および筋損傷後に生じる免疫細胞 (*i.e.* 好中球およびマクロファージ) の浸潤などが、骨格筋内における ROS およびフリーラジカル産生に寄与しているものと考えられている (Powers & Jackson, 2008) . このように、骨格筋内における ROS およびフリーラジカルの主要産生源は未だ特定されていないものの、ESR 法を用いた先行研究では、一過性の持久的運動が骨格筋の ROS およびフリーラジカルレベルを増加させることが直接的に明らかにされている (Davies *et al.*, 1982; Bailey *et al.*, 2007) . また、上述したように、一過性の持久的運動が骨格筋の酸化ストレス指標を増加させることもこれまでに数多く報告されている (Alessio *et al.*, 1988; Alessio, 1993; Kanter *et al.*, 1993; Michailidis *et al.*, 2007; Malaguti *et al.*, 2009) .

現時点では、全ての実験状況に適用できる最良の酸化ストレス指標が存在しないことから、われわれは先行研究のガイドラインに基づき複数の酸化ストレス指標を測定した (Powers *et al.*, 2010) . しかしながら、先行研究の結果とは対照的に、本研究における骨格筋の酸化ストレス指標はいずれも有意な変化を示さなかった (Table 3-1-3) . その理由の一つとして、本研究で用いた疲労困憊運動のプロトコルは、抗酸化防御システムによる

作用のため、健常な若齢ラットの骨格筋に対して酸化ストレスを引き起こすには不十分であった可能性が考えられる。

本研究では、骨格筋の総抗酸化能といくつかの抗酸化酵素活性を測定したものの、GSH、尿酸、ビリルビンなどの非酵素的抗酸化物質を個々に測定していない。これらの非酵素的抗酸化物質は、骨格筋における ROS およびフリーラジカルを即座に還元することにより酸化ストレス指標の増加を抑制した可能性がある。考えられる他の要因としては、先行研究において持久的運動に対する酸化ストレス応答およびそのピークポイントは各活動筋で異なることが示唆されていることから (Deminice *et al.* 2012) , 生体試料のサンプリング時間や被験筋の選択が研究結果に影響を及ぼした可能性も排除できない。しかしながら、本研究において、骨格筋の酸化ストレス指標が全ての運動群で変化しなかった理由は依然として不明である。

興味深いことに、本研究では、LE および HE 群の血漿酸化ストレス指標にはいずれも有意な変化は認められなかったものの、IE 群の血漿 PC レベルおよび TAC は CON 群と比べて有意に増加することが示された (Table 3-1-2) 。本研究で用いた疲労困憊運動のプロトコルは、先行研究を基に設定しており (Brooks & White, 1978; Liu *et al.*, 2005; Malaguti *et al.*, 2009) , 結果として、各運動群の筋および肝グリコーゲン含量を著しく減少させるものであった (Table 3-1-4) 。一方で、各群の運動パフォーマンス関連指標を比較すると、走行時間、走行距離および総仕事量においては、LE 群が最も高い値を示した (Table 3-1-1) 。IE 群は、低速度 (15 m/min) から走行を開始したため、運動開始時の運動強度は HE 群よりも低かったといえる。しかしながら、IE 群の最終的な平均走行速度は 35 m/min (傾斜 6°) であったことから、傾斜 0°で実施された HE 群よりも運動終了時の運動強度が高かったものと予想される。実際に、統計学的な有意差は認められなかったものの、疲労困憊運動直後の平均血中乳酸濃度は IE 群で最も高かった。それゆえ、疲労困憊運動終了時点での運動強度もまた IE 群で最も高かったと考えることができ、このことが IE 群の血漿 PC レ

ベルおよび TAC の増加に関与したものと思われる。事実、先行研究において、乳酸がフェントン反応を介してヒドロキシラジカル産生を増加させることが示唆されている (Ali *et al.* 2000)。

骨格筋の酸化ストレス指標が増加しなかったことを考慮すると、IE 群における血漿 PC および TAC の増加は、骨格筋以外の臓器に由来していた可能性が考えられる。Liu *et al.* (2000) は、持久的運動に対する酸化ストレス指標の応答は、組織特異的であることを報告している。また、持久的運動は、骨格筋に加えて、脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓および肺など、様々な臓器における酸化ストレス指標を増加させることが報告されている (Davies *et al.*, 1982; Kumar *et al.*, 1992; Radak *et al.*, 1996; Kruger *et al.*, 2009; Dalla Corte *et al.*, 2013)。さらに、各組織と循環血流との間に位置する血管内皮細胞および血管平滑筋細胞もまた運動時の ROS およびフリーラジカル産生の増加に関与することが示唆されている (Nikolaidis & Jamurtas, 2009)。従って、これら骨格筋以外の部位から産生された ROS およびフリーラジカルが、結果として IE 群における酸化ストレス指標を変化させたものと考えられる。

IE 群の酸化ストレス指標を変化させた要因として、他に、赤血球および白血球における ROS およびフリーラジカル産生が影響した可能性も考えられる (Nikolaidis & Jamurtas, 2009)。赤血球における ROS およびフリーラジカルの主要産生源は、酸素運搬タンパク質として知られるヘモグロビンであり、これが自動酸化を受けることでスーパーオキシドを産生するものと考えられている (Cimen, 2008)。ヘモグロビンは赤血球中に豊富に含まれていることから、少量の自動酸化であっても結果として多量の ROS およびフリーラジカルを放出する可能性がある。一方、白血球では、主に好中球の膜上に局在する NADPH オキシダーゼの活性化によってスーパーオキシドが産生されることが考えられている

(Halliwell, 2006)。先行研究では、筋損傷性運動だけではなく非筋損傷性運動においても運動直後から数時間後に好中球からのスーパーオキシド産生が増加することが明らかに

されている (Ookawara *et al.* 2003) . また, 白血球は, アスコルビン酸や α -トコフェロールなどの抗酸化物質を豊富に含んでおり, その濃度は血漿よりも高いことが報告されている (Tauler *et al.* 2008) . さらに, 白血球に含まれるアスコルビン酸は血漿中に放出されることも報告されている (Cannon & Blumberg, 2000) . これらの知見から, 赤血球および白血球は, IE 群における血漿の酸化ストレス指標の変化に関与していた可能性があるといえよう.

しかしながら, 本研究では, ラット血漿および骨格筋以外の部位における酸化ストレスの指標を測定しなかった. そのため, 今後は, 他の組織 (e.g. 肝臓, 心臓および血管平滑筋) およびまたは血液細胞 (*i.e.* 赤血球および白血球) の酸化ストレス指標を測定することにより, 漸増負荷による疲労困憊運動後のラット血漿 PC レベルおよび TAC の増加にどのようなメカニズムが関与したのかを明らかにする必要がある. また, 骨格筋以外の部位 (e.g. 肝臓, 心臓, 血管平滑筋および血液細胞) における ROS およびフリーラジカルの産生が運動強度に依存するの否かは明らかでないため, この点についても更なる検討が必要であろう. さらに, 本研究では, 動物実験により基礎的なエビデンスを得ることができたものの, 強度の異なる疲労困憊運動がヒトにも適用可能かどうか不明であり, 今後, ヒトの血液および骨格筋における酸化ストレス指標に及ぼす影響について明らかにしていく必要がある.

e) 結論

本研究では, 強度の異なる疲労困憊運動がラット血漿および骨格筋の酸化ストレスに及ぼす影響を検討した. その結果, ラット骨格筋の酸化ストレス指標はいずれの疲労困憊運動においても変化しなかったものの, 漸増負荷による疲労困憊運動はラット血漿の PC レベルおよび TAC を増加させることが明らかとなった. これらの知見から, 漸増負荷による

疲労困憊運動は、骨格筋の酸化ストレス指標の変化を伴わずに血中の酸化ストレス指標を
変化させることが示唆された。

2) 研究課題 2 「2 週間の水素水摂取がラットの運動誘発性酸化ストレスおよび組織グリコーゲン含量ならびに持久的パフォーマンスに及ぼす影響」

a) 緒言

ヒトを含む多くの生物は、大気中の酸素を体内に取り込み、ミトコンドリア内で利用することでエネルギーを生成し、日々の生命活動を営んでいる。しかしながら、体内に取り込まれた酸素の一部は、通常の代謝過程においてスーパーオキシド、過酸化水素およびヒドロキシラジカルなどの ROS およびフリーラジカルを形成することが知られている

(Finaud & Filaire, 2006, Halliwell & Gutteridge, 2007) . スーパーオキシドおよび過酸化水素は、低～中程度の濃度では重要な生理的役割を果たすものの、高濃度の過酸化水素は、より高い反応性および細胞傷害性を有するヒドロキシラジカルへと変換されることにより、脂質、タンパク質および核酸に酸化的傷害を引き起こすと考えられている (Valko *et al.*, 2007) . 生体には、酵素的および非酵素的抗酸化物質から成る酸化防御機構が備わっているにも関わらず、ROS およびフリーラジカルの過剰産生は、結果として酸化ストレスを誘発することとなる (Sies & Jones, 2007) .

これまでの先行研究により、持久的運動が酸化ストレスを誘発する生理的刺激の一つであることは広く知られている (Powers & Jackson, 2008; Fisher-Wellman & Bloomer 2009) . 実際に、持久的運動は様々な臓器における酸化ストレス指標を増加させることが報告されている (Nikolaidis *et al.*, 2012) . このように、運動誘発性酸化ストレスは、持久的運動の結果として生じる生化学的応答であるが、それと同時に、持久的パフォーマンスを低下させる因子となりうることも示唆されている (Novelli *et al.*, 1990; Medved *et al.*, 2004; Aoi *et al.*, 2008) . そのメカニズムは未だ解明されていないものの、骨格筋における ROS およびフリーラジカルの過剰産生が筋グリコーゲンの消耗速度を早め、結果として持久的パフォーマンスに悪影響を及ぼす可能性が指摘されている (Aoi *et al.*, 2008) . 組織グリコーゲン含量、とりわけ筋グリコーゲン含量は持久的パフォーマンスと密接に関わっ

ているため (Bergström *et al.*, 1967; Bergström & Hultman, 1967) , 運動時における組織グリコーゲン利用の抑制は, 持久的パフォーマンスを改善するためには極めて重要であると考えられる.

近年, 新たな抗酸化物質として水素が大きな注目を集めている. Ohsawa *et al.* (2007) は, 水素がヒドロキシラジカルとペルオキシナイトライドの選択的還元により酸化的傷害を抑制することを報告した. それ以来, 水素が, がん, 糖尿病, 心血管疾患, 神経変性疾患など, 様々な疾患の改善に有効であることが基礎研究および臨床研究において明らかにされている (Ohta, 2014; Ichihara *et al.*, 2015) . 水素によるこれらの有益な効果は, 直接的な抗酸化作用だけではなく, 遺伝子発現調節による間接的な抗酸化作用によってもたらされる (Ohta, 2014; Ichihara *et al.*, 2015) . さらに, 水素は抗酸化作用だけでなく, 抗炎症作用, 神経保護作用および抗代謝異常作用を有することも報告されている (Ohta, 2014; Ichihara *et al.*, 2015) . これらのことから, 水素は抗酸化を含む様々な生理作用を介して疾患の改善に寄与するものと考えられる.

このように, 疾患に対する水素の有効性はこれまでに数多く報告されているものの, 運動誘発性酸化ストレスおよびその関連指標に対する水素摂取の影響についてはほとんど明らかにされていない. 上述したように, ROS およびフリーラジカルは筋グリコーゲン利用を促進する可能性があることから, 運動時における組織グリコーゲン利用および持久的パフォーマンスに対する水素摂取の影響を明らかにすることは重要であると考えられる. そこで, 本研究では, 2 週間の水素水摂取がラットの運動誘発性酸化ストレスおよび組織グリコーゲン含量ならびに持久的パフォーマンスに影響を及ぼすのか否かを検討することとした.

b) 方法

b-1) 実験動物

本実験では、体重 270~300 g の雄性 Sprague-Dawley 系ラット（日本クレア）32 匹を用いた。ラットは、温度 22~23°C、湿度 60 ± 5%、12 時間 - 12 時間の明暗サイクル（暗期 21:00~9:00）に設定された温度制御室にて飼育し、固形飼料（CE-2、日本クレア）および水道水を自由摂取させた。なお、本実験は、早稲田大学動物実験倫理委員会（承認番号 2016A-100）の承認を得た後に、日本学術会議の「動物実験の適切な実施のためのガイドライン」を遵守したうえで実施された。

b-2) 水素水の調製と投与方法

水素水は、水素水 7.0（エコモインターナショナル）を用いて先行研究に従って調製した（Liu *et al.* 2014）。調製された水素水は、給水管内に 2 つのベアリングボールを備えた密閉ガラス容器に移すことで脱気を防いだ（Nagata *et al.*, 2009）。しかしながら、水素濃度はラットへの給水に伴い徐々に減少していくことから、水素水は 24 時間毎に新しいものを補充し直した。また、先行研究の方法に基づき、補充から 24 時間後の水素濃度が 0.1~0.2 mM の範囲内に維持されることを事前に確認した。

b-3) 実験プロトコル

ラットは、対照水摂取群（CON 群, n = 8）、対照水摂取+運動群（CON + Ex 群, n = 8）、水素水摂取群（H₂, n = 8）、および水素水摂取+運動群（H₂ + Ex 群, n = 8）の 4 群に無作為に振り分けた。ラットには、ミネラルウォーターまたはミネラルウォーターに水素を加えた水素水のいずれかを 2 週間自由摂取させ、1 日当たりの給水量を給餌量とともに記録した。CON および H₂ 群を含む全てのラットには、動物用トレッドミル（夏目製作所）を用いて、速度 15~30 m/min（傾斜 0°）での予備走行運動を 1 日 10 分間行わせた。3 日間の予備走行運動を終えた翌日には、CON + Ex および H₂ + Ex 群のラットに対し運動パフォーマンステストを実施した。運動テストは、研究課題 1 の漸増負荷運動（IE）と同

様のプロトコルを用いて、傾斜 6°に設定した動物用トレッドミルにて、速度 15 m/min から走行を開始させ、その後 5 分毎に 5 m/min ずつ速度を上昇させることでラットを疲労困憊に至らしめるものであった。疲労困憊の判定は、電気刺激を与えても走行を再開できなくなった時、および即座に立ち直り反射を行えなくなった時、の 2 点から行った (Copp *et al.*, 2009)。なお、全ての群のラットは、運動パフォーマンステスト前日に一晩 (12 時間) 絶食させた。

b-4) 血液および組織サンプリング

ラットは、運動パフォーマンステストの直後にペントバルビタールナトリウム (50 mg ~100 mg/kg 体重) を腹腔内に投与し、完全麻酔下にて解剖を行った。まず、下大静脈から採血を行い、抗凝固剤 (ヘパリン) 入りあるいは抗凝固剤なしの採血管 (Terumo) へと血液を移した。次に、血液サンプルは、4°C, 1,000 g で 10 分間遠心分離をして血清および血漿を回収した。得られた血清および血漿は分析まで -80°C のフリーザーで保管した。採血後、右後肢の腓腹筋ならびに肝臓を迅速に摘出した。摘出した腓腹筋および肝臓は、PBS 内で血餅を洗い流し、液体窒素中に浸漬したトングを用いて速やかに凍結させた。得られた組織サンプルは、血清および血漿と同様に、次の分析まで -80°C で保管した。なお、CON および H₂ 群のラットは、運動パフォーマンステストを行わせた両群 (CON + Ex および H₂ + Ex 群) と同じ時間帯に同様の手順で解剖した。

b-5) 酸化ストレス指標の測定

骨格筋サンプルは、液体窒素にて冷却した乳鉢内で乳棒を用いて粉砕した。粉状になった筋サンプルは、プロテアーゼ阻害剤 (Sigma Aldrich) を加えた氷冷ホモジナイズバッファー (50 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM sodium chloride, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate および 1.0% NP-40 を含有) にて電動ホモジナイザーを用

いてホモジナイズした。筋ホモジネートは、4°C、10,000 *g*で10分間遠心分離し、上清を回収した後にCBB溶液（ナカライテスク）を用いてタンパク質濃度を調整した。タンパク質濃度を調整した筋ホモジネートの上清および血漿については、TBARS assay kit, Protein carbonyl colorimetric assay kit, Antioxidant assay kit（Cayman Chemical）を用いてTBARS, PC および TAC の測定を行った。

b-6) 組織グリコーゲン含量および血中エネルギー基質の測定

グリコーゲン含量を測定するために、Murat & Serfaty (1974) の方法に従って骨格筋および肝臓サンプルを調製した。簡潔に記述すると、粉末状にした組織サンプルを氷冷したクエン酸バッファー（25 mM citrate (pH 4.2), 2.5 g/L sodium fluoride）にてホモジナイズした。続いて、組織ホモジネートを4°C、14,000 *g*で5分間遠心分離し、得られた上清を各測定に使用した。グリコーゲン含量は、Glycogen assay kit (BioAssay Systems) を用いて測定した。

血中エネルギー基質、すなわち血漿グルコース、血清遊離脂肪酸および血清トリグリセリドは、外部機関（SRL）に測定を依頼した。また、血漿乳酸濃度は、市販のアッセイキット（Cayman Chemical）を用いて測定を行った。

b-7) 統計処理

データは、全て平均値 ± 標準誤差で示した。群間の比較には、対応のないt検定（各測定項目の変化量の比較）、一元配置（対応なし、給水量および給餌量の比較）あるいは二元配置（対応なし、運動×水素水）の分散分析をそれぞれ用いた。統計処理は、SPSS（SPSS ver.22 for windows）を用いて行い、統計学的有意水準は危険率5%未満とした。

c) 結果

c-1) ラットの体重, 給水量, 給餌量および運動パフォーマンス

全てのラットの飼育開始時における平均体重は 290 ± 0.3 g であり, 運動パフォーマンス実施前における平均体重は 388 ± 0.5 g へと有意に増加した ($P < 0.001$)。しかしながら, 飼育開始時および運動パフォーマンス実施前の体重には 4 群の間に有意差は認められなかった。給餌量および給水量は, 対照水を摂取させた両群 (CON および CON + Ex 群) と水素水を摂取させた両群 (H_2 および $H_2 + Ex$ 群) との間に有意な差は認められなかった。各群の走行時間は, CON + Ex 群が 39.0 ± 1.4 分, $H_2 + Ex$ 群が 41.1 ± 0.7 分であり, 両群の間に有意差は認められなかった (Fig. 3-2-1)。

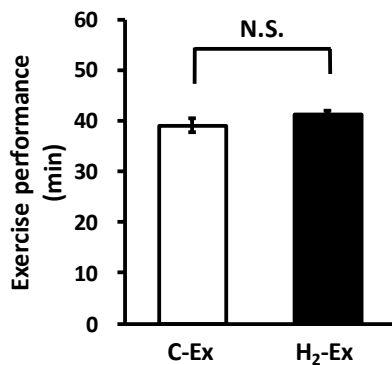


Fig. 3-2-1. Effect of 2 weeks of H_2 water intake on endurance performance measured after incremental exhaustive exercise in rats. Data are presented as the mean \pm standard error of mean values (SEM) of eight animals per group.

c-2) ラット血漿および骨格筋における酸化ストレス指標

ラット血漿および骨格筋における酸化ストレス指標の結果を Fig. 3-2-2 に示した。二元配置の分散分析の結果, 血漿 TAC において運動による主効果が観察され ($P < 0.001$, Fig. 3-2-2, C), 血漿 TBARS レベルでは運動による主効果に有意な傾向が認められた ($P = 0.070$, Fig. 3-2-2, A)。しかしながら, 血漿 PC レベルには運動による主効果は認められなかった (Fig. 3-2-2, B)。また, いずれの血漿酸化ストレス指標 (*i.e.* TBARS, PC および TAC) においても, 水素水摂取による主効果および交互作用 (運動 \times 水素) は観察されなかった。

骨格筋の酸化ストレス指標では、TBARS および PC レベルにおいて運動による主効果は観察されなかったものの (Fig. 3-2-2, D, E) , 骨格筋 TAC においては運動による主効果が認められた ($P < 0.001$, Fig. 3-2-2, F) . しかしながら、血漿の酸化ストレス指標と同様に、骨格筋の酸化ストレス指標においても水素水摂取による主効果および交互作用 (運動×水素) は認められなかった。

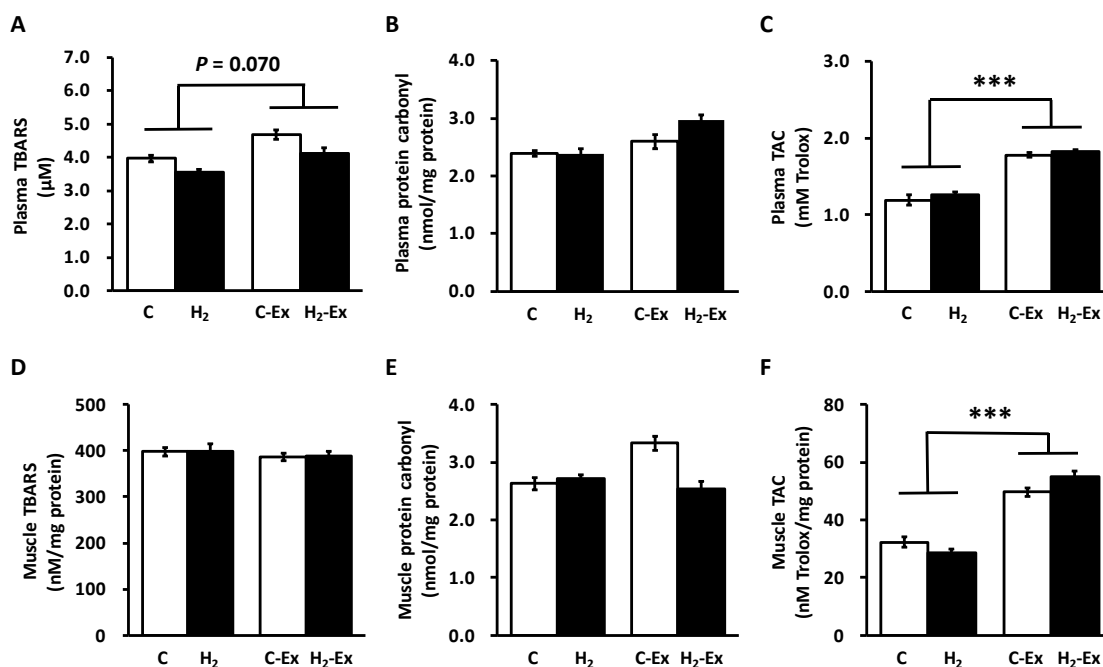


Fig. 3-2-2. Effect of 2 weeks of H₂ water intake on oxidative stress markers in rat plasma and skeletal muscle immediately after exhaustive exercise in rats. (A) Plasma thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels, (B) plasma protein carbonyl levels, (C) plasma total antioxidant capacity (TAC), (D) Muscle TBARS levels, (E) Muscle protein carbonyl levels, (F) muscle TAC. Data are presented as the mean ± standard error of mean values (SEM) of eight animals per group. *** indicate a main effect of exercise on each biomarker at a level of $P < 0.001$. □: animals that were provided with mineral water; ■: animals that were provided with H₂ water.

c-3) ラットの組織グリコーゲン含量および血中エネルギー基質

ラットの組織グリコーゲン含量および血中エネルギー基質の結果を Fig. 3-2-3 に示す。グリコーゲン含量に関しては、骨格筋および肝臓のいずれにおいても運動による主効果が認められた（それぞれ $P < 0.001$, Fig. 3-2-3, A, B）。しかしながら、両組織のグリコーゲン含量において水素水摂取による主効果および交互作用（運動×水素）は観察されなかった。

血中エネルギー基質では、血漿乳酸（ $P < 0.001$, Fig. 3-2-3, C）、血漿グルコース（ $P < 0.001$, Fig. 3-2-3, D）、血清遊離脂肪酸（ $P < 0.05$, Fig. 3-2-3, E）および血清トリグリセリド（ $P < 0.001$, Fig. 3-2-3, F）の全ての測定項目において運動による主効果が認められた。しかしながら、いずれの血中エネルギー基質においても水素水摂取による主効果および交互作用（運動×水素）は観察されなかった。

c-4) 各測定項目の変化量

CON および H₂ 群の安静値の違いによる影響を排除するため、安静群の値をベースライン値として、各測定項目における運動テスト前後での変化量を求めた。骨格筋の酸化ストレス指標では、デルタ（以下 Δ ）TAC は C + Ex 群で $17.4 \pm 1.7 \mu\text{M Trolox/mg protein}$, H₂ + Ex 群で $26.3 \pm 2.0 \mu\text{M Trolox/mg protein}$ であり、H₂ + Ex 群において上昇傾向を示した（ $P = 0.056$ ）。一方で、 ΔTBARs および ΔPC においては群間に有意差は認められなかった。また、血漿酸化ストレス指標の変化量（*i.e.* ΔTBARs , ΔPC および ΔTAC ）においても群間に有意な差は認められなかった。

筋グリコーゲン含量においては、 Δ 筋グリコーゲン含量が C + Ex 群で $-28.6 \pm 0.8 \text{ nmol/mg protein}$, H₂ + Ex 群で $-22.1 \pm 0.4 \text{ nmol/mg protein}$ であり、H₂ + Ex 群において筋グリコーゲンの減少が有意に抑制された（ $P < 0.05$, Fig. 3-2-4, A）。同様に、 Δ 肝グリコーゲン含量は、C + Ex 群で $-7.0 \pm 0.1 \text{ nmol/mg}$, H₂ + Ex 群で $-3.0 \pm 0.1 \text{ nmol/mg}$ であり、

H₂ + Ex 群において肝グリコーゲンの減少が有意に抑制された ($P < 0.001$, Fig. 3-2-4, B) . しかしながら, 血中エネルギー基質では, Δ 血漿乳酸, Δ 血漿グルコース, Δ 血清遊離脂肪酸, Δ 血清トリグリセリドのいずれの測定項目においても水素水摂取の影響は観察されなかった.

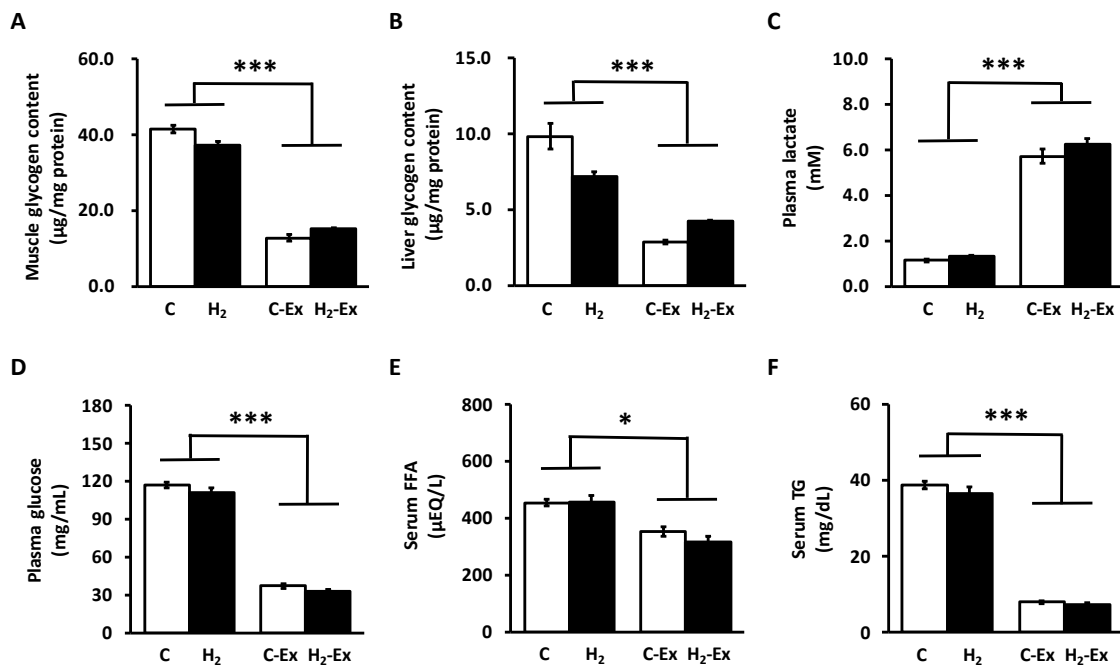


Fig. 3-2-3. Effect of 2 weeks of H₂ water intake on tissue glycogen contents and blood energy substrates immediately after exhaustive exercise in rats. (A) Muscle glycogen contents, (B) liver glycogen contents, (C) plasma lactate level, (D) plasma glucose level, (E) serum free fatty acid (FFA) level, (F) serum triglyceride (TG) level. Data are presented as the mean \pm standard error of mean values (SEM) of eight animals per group. * and *** indicate a main effect of exercise on each biomarker at a level of $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively. □: animals that were provided with mineral water; ■: animals that were provided with H₂ water.

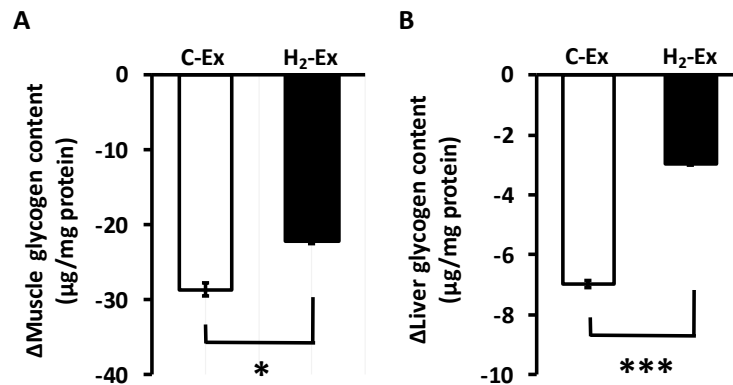


Fig. 3-2-4. Effect of 2 weeks of H₂ water intake on Δ tissue glycogen contents immediately after exhaustive exercise in rats. (A) Δ muscle glycogen content, (B) Δ liver glycogen content. Data are presented as the mean \pm standard error of mean values (SEM). * and *** indicate a significant difference between the groups at a level of $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively.

d) 考察

本研究の結果から、2週間の水素水摂取は運動時におけるラットの筋および肝グリコーゲンの利用を抑制することが示唆された。一方で、ラットの血漿および骨格筋における酸化傷害指標、ならびに持続的パフォーマンスに対する水素摂取の影響は観察されなかった。

水素は、可燃性が高く、大気中にはほとんど存在しない無色、無味、無臭の気体である (Huang *et al.*, 2010)。水素は、抗酸化およびまたは他の生理作用を介して様々な疾患の改善に寄与することが多くの先行研究において報告されている。しかし、運動誘発性酸化ストレスおよびその関連指標に対する水素摂取の効果はこれまでほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では、いくつかの水素摂取法の中で最も簡便かつ安全な方法の一つである水素水の飲用が、運動誘発性酸化ストレスおよび組織グリコーゲン含量ならびに持続的パフォーマンスにいかなる影響を及ぼすかを検討した。これらを明らかにすることで、スポーツ科学分野におけるエルゴジェニックエイドとしての水素の利用可能性を示すことができることから、本研究の意義は極めて高いように思われる。

本研究の結果から、2週間の水素水摂取はラットの骨格筋および肝臓におけるΔグリコーゲン含量を有意に抑制することが示された (Fig. 3-2-4)。本研究は、水素が運動時の筋および肝グリコーゲン利用を抑制することを明らかにした初めての研究である。Aoi *et al.* (2008) は、脂肪酸のミトコンドリア内への取り込みにおいて重要な役割を果たす骨格筋カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I (以下 CPT I) の機能を ROS およびフリーラジカルが部分的に制限することにより、結果として筋グリコーゲン利用を促進することを報告した。実際に、いくつかの先行研究では、抗酸化剤 (*e.g.* アスタキサンチンおよびポリフェノール) を用いて ROS およびフリーラジカルの過剰形成を抑制した結果、運動時における筋グリコーゲンの利用が抑制され、持続的パフォーマンスが向上することを明らかにしている (Murase *et al.*, 2006; Aoi *et al.*, 2008)。これらの先行研究に基づき、われわれは抗酸化剤としての水素摂取が運動誘発性酸化ストレスを軽減し、組織グリコーゲン利用を抑制することで持続的パフォーマンスが向上するとの仮説を立てた。

しかしながら、本研究では、血中および骨格筋の全ての酸化傷害指標 (*i.e.* TBARS および PC) において水素摂取の影響は観察されなかった (Fig. 3-2-2, A, B, D, E)。これらの研究結果は、水素が抗酸化以外の生理作用を介して運動時の組織グリコーゲン利用を抑制することを示唆している。これまでに報告された水素による疾患の改善効果は、抗酸化作用だけでは説明ができないため、水素の他の生理作用について数多くの研究が行われている。実際に、水素は抗酸化作用だけではなく、抗炎症作用、神経保護作用および抗代謝異常作用を有することが先行研究により明らかにされている (Ohta, 2014; Ichihara *et al.*, 2015)。

エビデンスは限られるものの、スポーツ科学分野においては、水素が運動時の血中代謝指標 (*i.e.* pH および乳酸濃度) に影響を及ぼす可能性も示されている (Aoki *et al.*, 2012; Ostojic, 2012)。しかし、本研究では、遊離脂肪酸やトリグリセリドなどの血中エネルギー基質において水素摂取の影響がみられなかった (Fig. 3-2-3, C, D, E, F)。このことから、

血中脂質の優先的利用は運動時における筋グリコーゲン利用の抑制には関与していないものと思われる。従って、本研究で観察された運動時の筋グリコーゲン利用の抑制効果は、骨格筋内のトリグリセリド利用が水素摂取によって増加したために引き起こされたと考えるのが妥当であろう。今後は、水素が運動時の組織グリコーゲン利用を抑制するメカニズムについて更なる研究が必要である。

本研究では、組織グリコーゲン利用が抑制されたにも関わらず、ラットの持続的パフォーマンスに対する水素摂取の影響はみられなかった (Fig. 3-2-1)。その理由の一つとして、運動パフォーマンステスト前に実施した一晚 (12 時間) の絶食が影響していた可能性が考えられる。本研究では、摂食状態におけるラットの筋および肝グリコーゲン含量の測定を行っていないものの、これら両組織のグリコーゲン含量、とりわけ肝グリコーゲン含量は、一晚絶食により著しく減少することが報告されている (Brooks *et al.*, 1973)。そのため、運動パフォーマンステスト開始時における両組織のグリコーゲン含量は極めて低かったと推測でき、本研究で観察された水素による組織グリコーゲン利用の抑制は、絶食ラットの持続的パフォーマンスを改善するには不十分であったと考えられる。

その他の理由として、運動パフォーマンステストの強度設定が研究結果に影響を及ぼした可能性も考えられる。本研究で使用した運動プロトコルは、先行研究に基づくものであり、 $\dot{V}O_2\max$ 付近での有酸素性能力を高い再現性のもとで評価できるものの (Copp *et al.*, 2009)、低～中強度で有酸素性運動を継続するための能力を評価することはできない可能性がある。それゆえ、今後は、摂食ラットを対象として、水素が低～中強度運動時の持続的パフォーマンスに及ぼす影響について検討する必要がある。

上述したように、水素水の飲用は、最も簡便かつ安全な水素摂取法であり、摂取後数分以内に各組織 (e.g. 血液、骨格筋および肝臓など) の水素濃度を上昇させることが報告されている (Liu *et al.*, 2014)。また、水素は最小の分子であることから、細胞膜を容易に通過し、ミトコンドリアなどの細胞小器官に急速に拡散すると考えられている (Ohsawa *et al.*,

2007) . 各組織の水素濃度は、水素水摂取後およそ 30 分間でベースライン値に戻ってしまうものの (Liu *et al.*, 2014) , 水素は遺伝子発現を調節することにより間接的に様々な生理作用を発揮することが明らかにされている (Ohta, 2014; Ichihara *et al.*, 2015) . さらに、水素水は低濃度であっても有効であることや、水素水の自由摂取は水素ガスの連続的または間欠的投与よりも有効であることなどが先行研究において示唆されている

(Kamimura *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2012) . これらの知見に基づき、本研究では運動パフォーマンステスト前の 2 週間、水素水をラットに自由摂取させることとした。しかしながら、水素摂取の最適なプロトコルは未だ確立されていないことから、水素の摂取プロトコルの違い (*e.g.* 摂取方法, タイミング, 用量, 期間, 頻度および濃度など) が運動誘発性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ために更なる研究が求められる。

e) 結論

本研究では、2 週間の水素水摂取がラットの運動誘発性酸化ストレスおよび組織グリコーゲン含量ならびに持続的パフォーマンスに及ぼす影響を検討した。その結果、2 週間の水素水摂取は運動時におけるラットの筋および肝グリコーゲンの利用を抑制することが示唆された。一方で、2 週間の水素水摂取は、運動時のラットの血漿および骨格筋の酸化傷害指標、ならびに持続的パフォーマンスには影響しないことが示された。これらのことから、水素は抗酸化以外の生理作用を介して運動時における筋および肝グリコーゲンの利用を抑制することが示唆された。

3) 研究課題 3 「ダウンヒル運動後の酸化ストレスおよび遅発性筋痛に及ぼす水素入浴の効果」

a) 緒言

定期的な運動は、生活習慣病の予防や改善効果だけでなく、生活の質（QOL）向上にも貢献することは広く知られている。しかしながら、運動時には ROS およびフリーラジカルの産生量が増加することがヒト（Ashton *et al.*, 1998; Bailey *et al.*, 2004）および動物実験（Davies *et al.*, 1982; Bejma & Ji, 1999）により明らかにされている。ROS およびフリーラジカルは、免疫細胞による異物除去反応や細胞内の情報伝達分子としての働きを有する一方で、脂質、タンパク質および核酸などの生体分子に傷害を与えることで、糖尿病やがん、神経疾患などの疾病および老化を引き起こすと考えられている（Harman, 2006; Valko *et al.*, 2007）。また、伸張性筋収縮を伴う運動や、不慣れな運動を行うと遅発性筋痛が生じることは広く知られているが（Clarkson *et al.*, 1992）、その要因として、筋および結合組織の損傷、乳酸や炎症の関与だけでなく、ROS およびフリーラジカルが関与している可能性も示されている（Close *et al.*, 2005）。

このように、一過性運動に対する生理応答として、ROS およびフリーラジカルの産生量が増加するものの、生体には、酸化傷害によるリスクを減らすための抗酸化防御機構が備わっている。抗酸化防御機構は、GSH、尿酸およびビリルビンなどの非酵素的な抗酸化物質と、SOD, CAT, GPX などの酵素的な抗酸化物質とに分類することができる（Powers & Jackson, 2008）。通常時には、これらの非酵素的および酵素的な抗酸化物質のはたらきにより、生体内の酸化 - 抗酸化平衡が維持されるものの、激運動時には、抗酸化防御能を上回る量の ROS およびフリーラジカルが発生し、酸化ストレスが誘導される。そのため、ビタミン C（Ashton *et al.*, 1999）やビタミン E（Meydani *et al.*, 1993）、ポリフェノール類（Chang *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2014）などの抗酸化サプリメントを用いた酸化ストレスの軽減策が数多く検討されている。

近年、新たな抗酸化物質として水素に注目が集まっている。水素は、無味・無臭・無色の高い可燃性を有するガス状分子であり、地球の大気中にはほとんど含まれていない

(Huang *et al.*, 2010) . Ohsawa *et al.* (2007) は、水素が ROS およびフリーラジカルの中で最も細胞毒性の強いヒドロキシラジカルを選択的に還元し、効果的に細胞を保護することを明らかにした。また、この先行研究では、水素ガスの摂取により虚血-再灌流による酸化ストレス傷害および脳傷害を抑制できることも明らかにしている (Ohsawa *et al.*, 2007) . さらに、現在までに、心血管疾患、脳血管障害、アルツハイマー病、糖尿病やがんなどの疾患に対する水素の有効性が示されており (Ohta, 2011; Dixon *et al.*, 2013; Ohta, 2014) , 既に臨床研究も行われ始めている (Kajiyama *et al.*, 2008) . しかしながら、水素が運動時における酸化ストレスに及ぼす影響についてはほとんど研究が行われていない。Aoki *et al.* (2012) の行った研究では、水素水の摂取により血中乳酸レベルの抑制およびピークトルクの改善が認められたものの、酸化ストレス指標への影響は観察されなかった。そのため、著者らは、水素の効果を最大限に引き出すための摂取プロトコルの検討が必要であると考察している。

水素はガス状の分子であり、摂取方法が多彩であるというメリットを有する。これまでに、水素ガスや水素水、水素点眼薬や水素飽和生理食塩水などを用いた研究が行われており (Ohta, 2011; Dixon *et al.*, 2013; Ohta, 2014) , さらに、水素発生剤 (二水素化マグネシウム, 以下マグ水素) を用いた水素入浴の効果が検討されている。水素入浴剤を用いる利点として、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点が挙げられる。それゆえ、このような特徴を持つ入浴による水素摂取は、飲用量に限界がある経口摂取と比べて、より多くの水素を生体内に供給することが可能であり、その効果を検討することは重要であると思われる。水素は分子量が最も小さく、水溶性かつ脂溶性であるという特徴を有することから、容易に皮膚から吸収され、その後血液を介して速やかに全身に配分される (Ohta, 2011) . 実際に、呼気中

の水素濃度の測定結果から、水素入浴のわずか 10 分後には水素が全身に行き渡るものと考えられている (Ohta, 2011) .

そこで、本研究では、ダウンヒル運動後の酸化ストレスおよび遅発性筋痛に及ぼすマグネシウムを用いた 1 週間の水素入浴の影響を明らかにすることを目的とした。

b) 方法

b-1) 被験者

被験者は、年齢 20 歳から 30 歳の健康かつ活動的な男性 9 名であり、自宅に家庭用風呂を持ち、毎日入浴する習慣のある者であった。被験者は、実験の前に実験の目的、内容および予想される危険について十分な説明を受けた後に、同意書に署名したうえで実験に参加した。本実験の実施の前には、スクリーニングテスト (*i.e.* 身長、体重、体脂肪率、安静時 12 誘導心電図、血圧および質問票による既往歴と症状の調査) を行い、健康面に問題がないことを確認したうえで、本実験における運動強度を決定するための $\dot{V}O_2\max$ の測定を行った。なお、本研究は、早稲田大学の「人を対象とする研究に関する倫理委員会」の承認を得て行われた (承認番号 2013-016) .

b-2) 最大酸素摂取量の測定

本実験での運動負荷強度を決定するために、室温 20°C、湿度 50% に設定された実験室において、トレッドミルを用いた漸増負荷運動を疲労困憊まで行わせた。運動負荷は、傾斜 +1% に設定した状態で、140 m/min のスピードから開始し、2 分毎に 20 m/min ずつ速度を増加させた。疲労困憊の判定は、検者の叱咤激励にもかかわらずランニングスピードを維持できなくなった時点とした。また、運動時には、Borg スケールによる主観的運動強度および心拍数の記録を 2 分毎に行うとともに、被験者の安全確保のために運動開始時から運動終了時まで心電図のモニタリングを行った。心拍数および心電図の測定は、双極誘導法に

よりモニター心電計（BSM-2401, 日本光電）を用いて行い、 $\dot{V}O_2$ は、エネルギー代謝分析器（エアロモニタ AE-310S, ミナト医科学社）により測定し、 $\dot{V}O_{2max}$ であるかどうかの判断は行わず、得られた $\dot{V}O_2$ の最高値を $\dot{V}O_{2peak}$ とした。被験者の身体的特徴を Table 3-3-1 に示す。

Table 3-3-1. Characteristics of subjects

Age (yrs)	25 ± 3
Height (cm)	174.0 ± 3.3
Body weight (kg)	66.0 ± 6.7
Body fat (%)	15.3 ± 4.2
BMI (kg/m ²)	21.7 ± 2.0
Seated SBP (mmHg)	110 ± 8
Seated DBP (mmHg)	80 ± 6
$\dot{V}O_{2peak}$ (mL/min)	3566 ± 437
$\dot{V}O_{2peak}$ (mL/kg/min)	54.4 ± 7.3

Data are presented as the mean ± standard deviation (SD).

BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; $\dot{V}O_2$, oxygen uptake.

b-3) 実験プロトコル

本研究の実験プロトコルを Fig. 3-3-1 に示す。本研究では、水素入浴試行（以下実験試行）およびプラセボ入浴試行（以下コントロール試行）の2試行を単盲検法によるクロスオーバー比較試験にて行った。

実験1日目は、来室2時間前にバランス栄養食品（400 kcal）を水（330 mL）とともに摂取させた。来室後、1時間の安静状態を保ち、その後主観的な筋肉痛の指標（Visual

analogue scale; 以下 VAS) を測定した後に、医師あるいは看護師により肘前静脈から採血を行った。VAS の測定は、脚 (*i.e.* 大腿部, 下腿部) の痛みを、全く痛みがない状態を左端、耐えられない痛みを右端として、現在の痛みが 100 mm の直線上のどの位置にあるかを記入させた (Kanda *et al.*, 2013) 。また、筋を圧迫しない状態を VAS 1, 被験者本人が大腿前部および下腿部を手で強く圧迫した状態を VAS 2 とした。VAS の測定および採血の終了後、事前に測定した傾斜+1%走行時の $\dot{V}O_2\text{peak}$ の 75~85%に相当する速度での 30 分間のダウンヒル運動 (傾斜-8%) を行わせた。

運動終了後、15 分間の休憩を挟み、水素入浴あるいはプラセボ入浴を行わせ、出浴 5 分後および出浴 60 分後の時点で再度 VAS の測定および採血を実施した。なお、被験者の安全性を確保するために、運動開始 30 分前、運動終了直後および出浴直後に飲料水をそれぞれ 200 mL ずつ摂取させた (Fig. 3-3-1, A) 。

実験 2 日目は、実験 1 日目と同様に、来室 2 時間前にバランス栄養食品 (400 kcal) を水 (330 mL) とともに摂取させ、来室後 30 分間の安静を挟んで VAS の測定および採血を行った。実験 3 日目、4 日目、8 日目には、実験 2 日目と同様のプロトコルにて VAS の測定および採血を行った。なお、各被験者には、実験 2~7 日目 (最終採血前日) まで入浴を継続させた (Fig. 3-3-1, B) 。全ての被験者は、8 日目の最終測定終了後、少なくとも 1 週間以上の間隔 (日数間隔の平均 22 ± 14 日 (mean \pm SD)) を空けたうえで、もう一方の試行を行った。

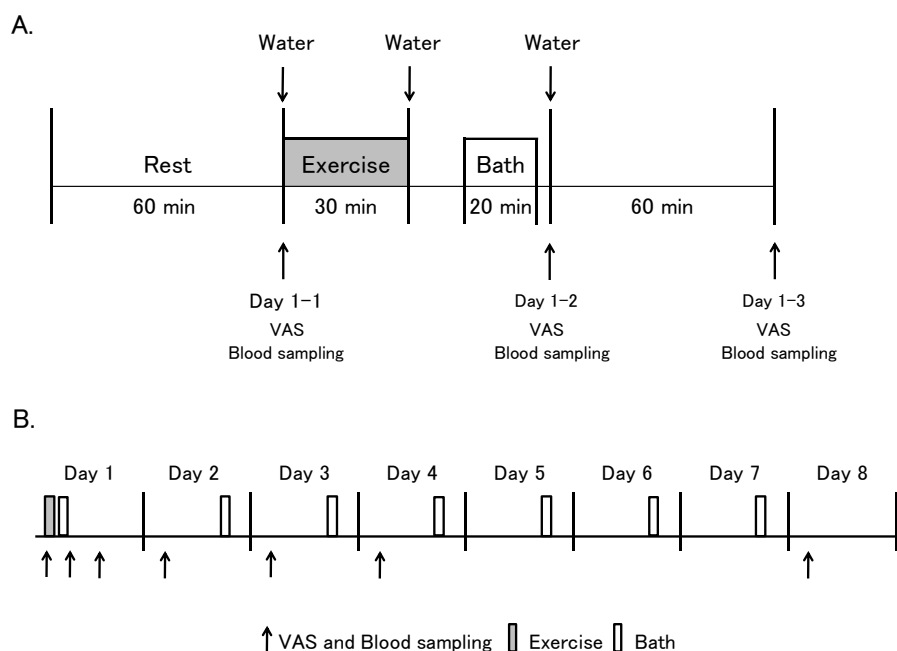


Fig. 3-3-1. Experimental protocol of exercise day (A) and whole 7 days (B). The measurements are as follows; VAS 1, VAS 2, and blood sample analyses.

b-4) 入浴の方法

入浴は、2.5 g の MgH_2 剤（実験試行）あるいは Mg を等量とした 5.5 g の $Mg(OH)_2$ 剤（コントロール試行）を全身浴が可能な湯量（約 200 L）に溶解した家庭用風呂にて、合計 20 分間（10 分間の入浴を、間に 3 分間の休息を挟んで 2 回）行わせた。入浴は、実験初日のみ実験室にて行い、実験 2 日目から 7 日目は各被験者の自宅にて行わせた。自宅での入浴に際し、被験者には事前に MgH_2 剤あるいは $Mg(OH)_2$ 剤を手渡し、入浴剤を入浴開始 10 分前に投入すること、全身浴を行うこと、入浴温度は被験者の任意とするが入浴時の湯温を測定することを口頭にて指示した。なお、実験 1 日目の入浴は、体温上昇や皮膚血管拡張に伴うトラブルに配慮し、運動終了後 15 分間の休息を挟んでから行った。

b-5) 血液生化学的分析

採血により得られた血液は、血中乳酸測定器（ラクテートプロ LT-1730, アークレイ）を用いて乳酸濃度の測定を行った後に、速やかに 4°C, 3000 回転で 10 分間遠心分離をして血漿および血清を得た。得られた血漿および血清は分析まで -80°C 以下にて冷凍保存した。分析項目は、酸化ストレス指標として血漿 TBARS および MPO 濃度と血清 d-ROMs および BAP の測定を行った。また、炎症の指標として血漿インターロイキン（以下 IL）-6, IL-17a の測定を行い、筋損傷の指標として血清 CK 活性およびミオグロビン濃度の測定を行った。酸化ストレスおよび炎症指標の分析は、TBARS assay kit（Cayman Chemical）, MPO ELISA kit（Hycult）, d-ROMs・BAP test kit（Diacron）, IL-6 ELISA kit（R&D）, IL-17A ELISA kit（Diaclone）を用いて原則一回としたが、異常と思える値が出た場合には再測定を行い値の正しさを確認した。また、血清の CK 活性およびミオグロビン濃度の分析は、外部機関（BML, INC.）に依頼し、Creatine kinase kit（Nittobo Medical）および Myoglobin kit（Siemens Healthcare Diagnostics）を用いて行った。なお、外注した 2 項目の同時再現性係数（Intra-assay CV）および日差再現性係数（Inter-assay CV）は、CK で 1.1% および 1.6%, ミオグロビンで 2.4% および 4.7% であった。また、酸化ストレス指標として用いた d-ROMs と BAP の Intra-assay CV（d-ROMs ; 1.9%, BAP ; 3.9%）および Inter-assay CV（d-ROMs ; 14.8%, BAP ; 5.9%）は先行研究とほぼ同程度であった（Fatouros *et al.*, 2004）。

b-6) 統計処理

解析結果は全て平均値 ± 標準偏差で示した。両試行間における 30 分間運動中の運動強度および入浴温度の比較には、対応のある t 検定を用いた。また、各試行間における測定値の比較には、繰り返しのある二元配置の分散分析（試行×時間）を行った。統計処理は、

SPSS (SPSS ver.20 for windows) を用いて行い、統計学的有意水準は危険率 5%未満とした。

c) 結果

c-1) ダウンヒル運動時の運動強度および入浴温度

ダウンヒル運動中の運動強度を Table 3-3-2 に示した。運動中の $\dot{V}O_{2peak}$ は、コントロール試行および実験試行ともにおよそ 56%であり、試行間に有意差は認められなかった。同様に、ランニングスピード、 $\dot{V}O_2$ 、心拍数においてもコントロール試行と実験試行との間に有意差は認められなかった。また、1 週間の平均入浴温度は、実験試行で $39.1 \pm 1.2^\circ\text{C}$ 、コントロール試行で $38.9 \pm 1.0^\circ\text{C}$ であり、両試行間に有意な差は認められなかった。

Table 3-3-2. Exercise intensity during downhill running

	Control	Trial
Running speed (m/min)	206 ± 34	205 ± 34
$\dot{V}O_2$ (mL/min)	2003 ± 320	2028 ± 316
$\% \dot{V}O_{2peak}$ (%)	56.0 ± 3.2	56.7 ± 3.4
HR (bpm)	154 ± 10	154 ± 11

Data are presented as the mean ± standard deviation (SD). $\dot{V}O_2$, oxygen uptake; HR, heart rate.

c-2) 遅発性筋痛および筋損傷ならびに血中乳酸濃度

ダウンヒル運動に対する 1 週間の水素入浴が、遅発性筋痛、筋損傷および血中乳酸濃度に及ぼす影響に関する測定結果を Table 3-3-3 に示した。遅発性筋痛の指標においては、VAS 1, VAS 2 とともに時間による主効果が認められた (VAS 1 : $P=0.003$, VAS 2 : $P=$

0.001). また, VAS 1 では試行による主効果および交互作用は認められなかったが, VAS 2 では試行による主効果は認められなかったものの交互作用が確認され ($P=0.033$), 実験 2 日目および実験 3 日目の値が実験試行では有意に抑制された (Fig. 3-3-2). 筋損傷指標である血清 CK 活性およびミオグロビン濃度では, 血清 CK 活性において時間による主効果が観察され ($P=0.003$), 血清ミオグロビン濃度においては時間による主効果に有意傾向が認められた ($P=0.058$). 一方, 血清 CK 活性およびミオグロビン濃度ともに試行による主効果および交互作用は認められなかった. 血中乳酸濃度では, 時間・試行による主効果および交互作用は認められなかった.

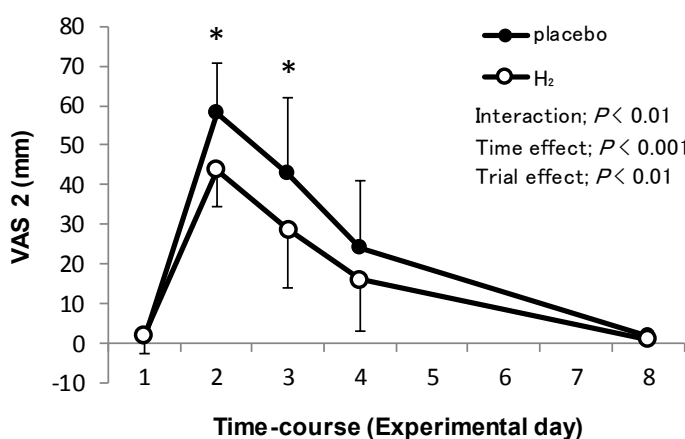


Fig. 3-3-2. Effect of weekly molecular hydrogen bathing on delayed-onset muscle soreness following downhill running. Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD). * indicate a significant difference between the groups at the same point ($P < 0.05$).

c-3) 酸化ストレスおよび炎症指標

ダウンヒル運動に対する 1 週間の水素入浴が, 酸化ストレスおよび炎症指標に及ぼす影響に関する測定結果を Table 3-3-4 に示した. 酸化ストレス指標では, 血漿 MPO において時間による主効果が観察され ($P=0.041$), 血清 BAP においては試行による主効果が認められた ($P=0.039$). 一方, 血漿 TBARS および血清 d-ROMs においては, 有意な差は認められなかった. 炎症指標では, 血漿 IL-6 において時間による主効果が観察されたものの ($P=0.028$), 血漿 IL-17a に有意差は認められなかった.

Table 3-3-3. Effect of weekly molecular hydrogen bathing on delayed-onset muscle soreness, muscle damage markers and lactate

		Time-course							Main effect		Interaction
		Day 1-1	Day 1-2	Day 1-3	Day 2	Day 3	Day 4	Day 8	Time	Trial	
VAS 1	Control	0.4 ± 0.7	19.0 ± 26.2	22.6 ± 23.5	50.9 ± 16.7	37.0 ± 19.5	22.1 ± 17.3	1.1 ± 1.1	0.003	NS	NS
(mm)	Trial	0.7 ± 1.7	19.1 ± 18.0	18.6 ± 14.3	37.4 ± 11.4	31.3 ± 12.7	14.7 ± 13.8	1.0 ± 1.1			
VAS 2	Control	1.1 ± 2.3	19.1 ± 23.3	21.6 ± 23.6	57.9 ± 12.7	42.7 ± 19.4	23.8 ± 17.2	1.9 ± 2.3	0.001	0.140	0.033
(mm)	Trial	2.1 ± 4.9	21.0 ± 19.3	22.0 ± 15.3	43.7 ± 9.1	28.6 ± 14.8	16.1 ± 13.0	1.0 ± 1.3			
CK	Control	132 ± 32	164 ± 39	171 ± 47	327 ± 249	208 ± 130	145 ± 60	147 ± 89	0.003	NS	NS
(U/L)	Trial	156 ± 96	189 ± 110	197 ± 115	320 ± 321	215 ± 156	168 ± 108	198 ± 157			
Mb	Control	33.4 ± 4.1	148.0 ± 105.9	133.0 ± 92.4	37.4 ± 17.8	30.3 ± 7.2	32.2 ± 7.6	33.6 ± 9.4	0.058	NS	NS
(ng/mL)	Trial	32.4 ± 8.7	129.2 ± 59.8	112.3 ± 52.0	38.1 ± 12.0	32.5 ± 10.9	32.9 ± 10.7	34.7 ± 10.1			
Lactate	Control	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.3	NS	NS	NS
(mmol/L)	Trial	0.9 ± 0.2	1.3 ± 0.7	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2			

Data are presented as the mean ± standard deviation (SD). Day 1-1, before exercise (baseline); Day 1-2, 5 minutes after the end of bathing; Day1-3, 60 minutes after the end of bathing; VAS, visual analogue scale; CK, creatine kinase; Mb, myoglobin.

Table 3-3-4. Effects of weekly molecular hydrogen bathing on oxidative stress and inflammatory markers

		Time course							Main effect		Interaction
		Day 1-1	Day 1-2	Day 1-3	Day 2	Day 3	Day 4	Day 8	Time	Trial	
TBARS	Control	0.42 ± 0.21	0.32 ± 0.08	0.31 ± 0.08	0.33 ± 0.07	0.30 ± 0.05	0.33 ± 0.07	0.33 ± 0.08	NS	NS	NS
(µM)	Trial	0.35 ± 0.08	0.32 ± 0.06	0.32 ± 0.05	0.31 ± 0.07	0.33 ± 0.07	0.29 ± 0.04	0.31 ± 0.09			
d-ROMs	Control	425 ± 51	419 ± 60	424 ± 76	401 ± 41	399 ± 44	419 ± 45	403 ± 56	NS	NS	NS
(U.CARR.)	Trial	421 ± 64	425 ± 61	426 ± 53	389 ± 52	406 ± 53	398 ± 54	380 ± 39			
BAP	Control	2631 ± 145	2665 ± 231	2685 ± 174	2691 ± 274	3063 ± 518	2813 ± 228	3164 ± 524	NS	0.039	NS
(µM)	Trial	2747 ± 156	2600 ± 226	2804 ± 372	2769 ± 353	2832 ± 447	2691 ± 262	3052 ± 483			
MPO	Control	116.8 ± 98.9	103.9 ± 28.8	116.9 ± 21.6	107.4 ± 36.1	105.8 ± 33.7	100.4 ± 25.1	78.5 ± 14.9	0.041	NS	NS
(ng/mL)	Trial	115.7 ± 61.6	107.8 ± 30.1	112.9 ± 28.5	107.3 ± 27.0	122.4 ± 39.5	97.0 ± 23.1	91.9 ± 25.7			
IL-6	Control	0.40 ± 0.15	0.91 ± 0.34	0.86 ± 0.37	0.34 ± 0.13	0.36 ± 0.17	0.39 ± 0.18	0.48 ± 0.48	0.028	NS	NS
(pg/mL)	Trial	0.35 ± 0.12	0.78 ± 0.20	0.83 ± 0.47	0.36 ± 0.15	0.29 ± 0.09	0.33 ± 0.16	0.38 ± 0.23			
IL-17a	Control	17.4 ± 44.8	17.0 ± 44.0	19.5 ± 51.5	16.2 ± 42.6	19.1 ± 51.7	19.2 ± 51.7	19.2 ± 51.7	NS	NS	NS
(pg/mL)	Trial	14.9 ± 37.2	16.9 ± 42.8	19.6 ± 51.5	16.1 ± 42.6	19.0 ± 51.2	19.1 ± 51.7	19.2 ± 51.7			

Data are presented as the mean ± standard deviation (SD). Day 1-1, before exercise (baseline); Day 1-2, 5 minutes after the end of bathing; Day1-3, 60 minutes after the end of bathing; MDA, malondialdehyde; d-ROMs, derivatives of reactive oxygen metabolites; BAP, biological antioxidant potential; MPO, myeloperoxidase; IL-6, interleukin-6; IL-17a, interleukin-17a.

d) 考察

本研究では、健康かつ活動的な若年男性 9 名を対象とし、ダウンヒル運動後の酸化ストレスおよび遅発性筋痛に及ぼすマグ水素を用いた 1 週間の水素入浴の影響を検討した。本研究で得られた主な知見は、マグ水素を入浴剤として用いた運動後一週間の入浴は、運動による酸化ストレスに対する有効性は認められなかったものの、遅発性筋痛を軽減する可能性が示されたことである。

伸張性収縮を伴う運動や、不慣れな運動を行う際には、運動後 24 時間から 72 時間をピークとして遅発性筋痛が引き起こされることは広く知られている (Clarkson *et al.*, 1992)。遅発性筋痛のメカニズムは未だ解明されていないものの、その要因の一つとして ROS およびフリーラジカルが関与している可能性が指摘されていることから (Close *et al.*, 2005)、抗酸化サプリメントを用いた遅発性筋痛の抑制策がこれまでに検討されている (Kaminski & Boal, 1992; Bryer & Goldfarb, 2006; McGinley *et al.*, 2009)。近年、新たな抗酸化物質として水素が注目されているものの、その多くが疾病に対する効果を検討したものであり、運動による酸化ストレスおよび遅発性筋痛に及ぼす影響は明らかにされていない。

本研究では、マグ水素を用いた一週間の入浴により遅発性筋痛のピークとされる運動後 24 および 48 時間の VAS 2 の値が有意に抑制され、水素入浴が遅発性筋痛の軽減に有効であることが示唆された (Table 3-3-3, Fig. 3-3-2)。しかしながら、本研究では、遅発性筋痛を引き起こす主要因とされる筋損傷指標をはじめ、酸化ストレス指標、炎症指標および血中乳酸濃度において試行による主効果は認められなかった (Table 3-3-3, Table 3-3-4)。先行研究によると、遅発性筋痛の程度と血中の筋損傷指標の変化は必ずしも一致しないことが明らかにされており (Nosaka *et al.*, 2002)、筋および結合組織の損傷だけで遅発性筋痛を説明することはできない。また、筋損傷に付随して起こる炎症や酸化ストレスといった二次的な生理変化や、血中乳酸の蓄積が遅発性筋痛に及ぼす影響についても未だ明白

な根拠は示されていないのが現状である。このように、遅発性筋痛のメカニズムは未だ不明瞭な点が多く、本研究における遅発性筋痛の軽減効果は、他の理由によりもたらされた可能性も考えられる。遅発性筋痛を生じさせる他の要因として、筋温上昇や筋痙攣 (Close *et al.*, 2005) などが挙げられているものの、本研究ではこれらの測定は行っておらず、水素入浴がどのようなメカニズムにより遅発性筋痛を抑制したのかを明らかにすることは困難であり、今後更なる研究が必要である。

本研究では、BAP を除く他の酸化ストレス指標において試行による主効果は認められなかった (Table 3-3-4) 。これまでに、水素が運動による酸化ストレスに及ぼす影響についてはほとんど研究が行われていない。Aoki *et al.* (2012) は、男子大学サッカー選手を対象として、水素水またはプラセボ水を摂取させ、75% $\dot{V}O_2$ max 強度の自転車エルゴメーター運動および 100 回の等速性膝伸展運動を行わせ、運動による酸化ストレスに及ぼす影響について検討を行っている。その結果、水素水を摂取させた群では、血中乳酸濃度の抑制やピークトルクの改善が認められたものの、酸化ストレス指標に対する効果は観察されなかった。これらのことから、著者らは、水素水のより適切な摂取方法を確立する必要があると述べている。

この先行研究の結果を受け、本研究ではより多くの水素を生体に供与するためにマグ水素を用いた水素入浴の効果を検討した。これまでに、水素入浴が運動による酸化ストレスに及ぼす影響について検討した論文は存在せず、本研究は初めての試みであった。また、この方法は、日常的に入浴を行う日本人に適合する方法であると考えられた。しかしながら、本研究では、Aoki *et al.* (2012) の先行研究と同様に、血漿 TBARS、血清 d-ROMs、血漿 MPO などの酸化ストレス指標に対する水素入浴の影響は観察されなかった。一方で、血液中の抗酸化能力を示す血清 BAP では、試行による主効果が観察され、水素入浴試行で有意に低い値を示した (Table 3-3-4) 。この理由は明らかではないが、血清 BAP は、血液中に存在する抗酸化物質の総合的な能力を反映する指標であり、GSH、尿酸およびビタミン

C などの影響を受ける。そのため、今後、各抗酸化物質の測定を行うことで、水素入浴が血中のどの因子に影響を及ぼしたのかを明らかにしていく必要がある。

本研究において、血清 BAP を除く酸化ストレス指標に対し水素入浴の効果が認められなかった理由としては、まず、入浴のタイミングが適切でなかった可能性を挙げることができる。一般的に、運動直後の入浴は、体温上昇や皮膚血流量の増大など、安全面および骨格筋における血流量確保の観点から、運動終了後一定の時間を置くことが必要であるといわれている。従って、本研究では、運動後 15 分のタイミングで入浴を行わせた。しかしながら、生体内で最初に産生されるスーパーオキシドは、体内の抗酸化防御システムの働きにより、過酸化水素、ヒドロキシラジカルを経て、素早く水へと変換される。このことから、ミトコンドリアおよびその他の経路から ROS およびフリーラジカルが生じるタイミングで水素を供与する必要があると考えられるが、本研究では 15 分のタイムラグが生じていた。そのため、運動時の酸素消費量の増大や、血流量の急激な変化によってもたらされる一次的な酸化ストレスに対し、水素が十分に作用しなかった可能性がある。

近年の Cai *et al.* (2013) の研究では、水素が抗酸化酵素活性を改善し、間接的に酸化ストレスを抑制する可能性が示唆されている。この研究は、培養細胞を用いたものであることから単純に比較はできないものの、運動前に水素を供与することが酸化ストレスの抑制においてより重要である可能性は否定できない。しかし、水素の生体内動態や作用メカニズムについては未だ十分なエビデンスが得られているとは言い難く、今後の更なる研究が待たれる。なお、本研究における 30 分間のダウンヒルランニングでは十分な酸化ストレスを誘導することができなかったものの、本研究の結果だけで、水素入浴が運動後の酸化ストレスに効果がないと結論を下すことはできないようにも思われる。

運動後に顕著な酸化ストレスが生じなかった要因として、運動負荷が不十分であった可能性が挙げられる。本研究では、事前に測定した $\dot{V}O_{2peak}$ のデータを基に運動強度の設定を行った。当初、ダウンヒル運動では、平地走行時よりも運動強度が低くなることは想定し

ていたものの、実際の運動強度は $\dot{V}O_{2peak}$ の56%程度であった (Table 3-3-2) . この運動強度は、我々が運動条件を設定する際に参考にした Peake *et al.* (2005) の用いた強度 (60% $\dot{V}O_{2max}$) よりもやや低いものであった。また、この先行研究では、長距離ランナーおよびトライアスロン選手といった持久系アスリートを対象としているものの、ダウンヒル運動を45分間実施しており、本研究よりも運動時間が長かった。さらに、この研究では、筋損傷指標である血清CK活性およびミオグロビン濃度の上昇率が本研究のコントロール試行よりも著しく高かった (CK 235% vs 420%, Mb 426% vs 1800%) . これらのことから、本研究で用いた運動負荷 (強度・時間) では、筋損傷の程度が低く、結果として二次的な酸化ストレスを十分に誘導できなかったものと考えられる。今後は、運動の強度設定をより厳密に行うとともに、運動時間の延長を検討する必要がある。

本研究では、水素入浴の影響を調査するための副次的な評価項目として、炎症マーカー (血漿 IL-6, IL-17a) の測定を行った。しかしながら、これらの項目において、試行による主効果は観察されなかった (Table 3-3-4) . 先行研究によると、水素は抗酸化作用だけでなく抗炎症作用を有することが明らかにされている (Gharib *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2009) . しかし、これらの先行研究では、炎症反応の誘導機序が本研究とは異なっており、水素の摂取方法も異なる。そのため、酸化ストレスと同様に、炎症反応を抑制するための効果的な水素入浴条件や水素摂取方法について、今後、更なる検討が必要であると言える。

本研究で用いた、水素入浴時間は20分間、入浴温度の平均は約39°Cであった。これらの入浴条件は、一般によく用いられるなどの実用性を考慮し、誰でも容易に実践できるものとした。また、入浴日数は、本研究で用いた各測定項目の値がベースラインに戻るであろう1週間後までとした。水素は、大気条件下 (室温) において0.8 mMまで水に溶けることができる (Ohta, 2011) . 本研究における入浴温度では、水素濃度が0.7 mM前後であったと考えられ、継続的に生体内に供給されることを考えると十分な水素濃度であったと思われる。しかしながら、本研究では生体内の水素濃度の変化を測定しておらず、どの程度の

水素が体内に取り込まれたのかは不明である。また、影響は小さいと考えられるものの、入浴温度の違いが遅発性筋痛、酸化ストレスおよび炎症指標に及ぼす影響についても今後検討が必要であろう。

本研究の限界として、ダウンヒル運動の繰り返しによる筋損傷の軽減効果、すなわち繰り返し効果 (McHugh *et al.*, 1999) が生じていたことが挙げられる。本研究では、筋損傷指標として血清 CK 活性およびミオグロビン濃度の測定を行ったが、試行間に有意差は認められなかったものの、これらの指標の最大値は 2 回目の運動時に有意に抑制されていた (CK 442 U/L vs 205 U/L, 実験 2 日目 ($P < 0.05$); Mb 179.9 ng/mL vs 97.2 ng/mL, 出浴直後 ($P < 0.05$))。一方で、遅発性筋痛、酸化ストレスおよび炎症指標においては運動 1 回目と 2 回目の間に有意な差は認められなかった。本研究では、途中で被験者 1 名が脱落したために被験者数が 9 名と奇数となった。筋損傷指標の結果にはこのことが一部関わっていた可能性も考えられる。今後は、繰り返し効果の影響を極力排除できるような実験デザインを用いて研究を行う必要がある。また、酸化ストレスおよび抗酸化能は、加齢やトレーニング状況、ならびに栄養状態の影響を強く受けることから、不活動者や高齢者を対象にした実験や、実験動物を用いた基礎的な研究を行っていくことも検討しなければならない。

e) 結論

本研究では、ダウンヒル運動後の酸化ストレスおよび遅発性筋痛に及ぼすマグ水素を用いた一週間の水素入浴の影響を検討した。その結果、マグ水素を入浴剤として用いた一週間の入浴は、運動後の酸化ストレスに対する効果は認められなかったものの、遅発性筋痛の軽減に有効であることが示唆された。

第4章 総合討論および今後の課題

1. 各研究課題の総括

【研究課題1・動物実験】

研究課題1では、若齢ラットを対象とし、強度の異なる疲労困憊運動がラット血漿および骨格筋の酸化ストレスに及ぼす影響を検討した。その結果、ラットの骨格筋における酸化ストレス指標はいずれの疲労困憊運動においても変化しなかったものの、漸増負荷による疲労困憊運動はラットの血漿PCレベルおよびTACを増加させることが明らかとなった。これらの知見から、漸増負荷による疲労困憊運動は、骨格筋の酸化ストレス指標の変化を伴わずに血中の酸化ストレス指標を変化させることが示唆された。

【研究課題2・動物実験】

研究課題2では、若齢ラットを対象として、2週間の水素水摂取がラットの運動誘発性酸化ストレスおよび組織グリコーゲン含量ならびに持続的パフォーマンスに及ぼす影響を検討した。その結果、2週間の水素水摂取は運動時におけるラットの筋および肝グリコーゲンの利用を抑制することが示唆された。一方で、2週間の水素水摂取は、運動時のラットの血漿および骨格筋における酸化傷害指標、ならびに持続的パフォーマンスには影響しないことが示された。これらの知見から、水素は抗酸化以外の生理作用を介して運動時における筋および肝グリコーゲンの利用を抑制することが示唆された。

【研究課題3・ヒト実験】

研究課題3では、健常かつ活動的な若年男性9名を対象とし、ダウンヒル運動後の酸化ストレスおよび遅発性筋痛に及ぼすマグ水素を用いた1週間の水素入浴の影響を検討した。

その結果、マグ水素を用いた1週間の入浴は、運動後の酸化ストレスに対する効果は認められなかったものの、遅発性筋痛の軽減に有効であることが示唆された。

2. 総合討論および今後の課題

1) 疲労困憊運動の強度の違いが生体の酸化ストレスに及ぼす影響（目的1）

運動誘発性酸化ストレスは、運動強度やその継続時間の影響を受けるといわれており、事実、運動強度の増加や運動時間の延伸によって血中あるいは骨格筋の酸化ストレス指標が増加することが報告されている（Alessio *et al.*, 1988; Koz *et al.*, 1992; Bloomer *et al.*, 2007a; Lamprecht *et al.*, 2008）。しかしながら、疲労困憊運動の強度の違いが生体の酸化ストレスに及ぼす影響についてはこれまでに報告がなされていない。そこで、本研究では、強度の異なる疲労困憊運動がラットの血漿および骨格筋の酸化ストレスに及ぼす影響を検討した（研究課題1）。アスリートは、競技力向上のために日々過酷なトレーニングを行う必要があるため、短期的あるいは長期的な視点において、疲労困憊運動の強度の違いが生体の酸化ストレスに及ぼす影響を把握することは極めて重要であると思われた。

本研究で得られた主な知見は、漸増負荷による疲労困憊運動は、骨格筋の酸化ストレス指標の変化を伴わずに血中の酸化ストレス指標を変化させることを示した点である

（Table 3-1-2, Table 3-1-3）。運動時のROSおよびフリーラジカル産生は主に骨格筋で行われるという考え方のもと、運動誘発性酸化ストレスは長年、骨格筋を中心とした視点で解釈されてきた。しかし、近年では、血液自体もROSおよびフリーラジカルの産生源であるとの考え方が整理されつつあり、血漿、赤血球および白血球においてROSおよびフリーラジカルが産生される可能性が報告されている（Nikolaidis & Jamurtas, 2009）。また、運動後における血中の酸化ストレス指標の変化は、必ずしも骨格筋の酸化ストレス指標の変化とは一致しないことや、肝臓あるいは心臓といった他の組織の酸化ストレス指標の変化と一致する事例もあることなどが報告されている（Veskoukis *et al.*, 2009）。

これらのことから、本研究の漸増負荷運動群で観察された酸化ストレス指標（*i.e.* PC および TAC）の増加は、骨格筋以外の組織（*e.g.* 血液、肝臓および心臓など）に由来したと考えるのが妥当である。しかしながら、今後は、漸増負荷による疲労困憊運動が骨格筋以外の組織における酸化ストレス応答に及ぼす影響だけではなく、それらの組織における酸化ストレス応答が運動強度に依存するの否かを明らかにしていく必要があると考えられる。さらに、近年では、一過性の持久的運動に対する血中の酸化ストレス応答は、ラットとヒトでほぼ同様の傾向を示すことが報告されているものの（Veskoukis *et al.*, 2016）、本研究の結果がヒトでも同様に再現されるの否かを明らかにする必要がある。

2) 運動誘発性酸化ストレスおよびその関連指標に及ぼす水素摂取の影響（目的 2）

上述したように、一過性の持久的運動は生体内の酸化 - 抗酸化平衡の不均衡を生じさせ、結果として酸化ストレスを誘発することは広く知られている（Powers & Jackson, 2008; Fisher-Wellman & Bloomer 2009）。このような、運動によって引き起こされる一時的な酸化ストレス、すなわち運動誘発性酸化ストレスは、運動の結果として生じる生化学的応答であるが、それと同時に生理機能を低下させる誘因となることも示唆されている。具体的には、非筋損傷性運動時における筋疲労や持久的パフォーマンスの低下、ならびに筋損傷性運動時における二次的な筋損傷や遅発性筋痛への関与がこれまでに報告されている（Reid *et al.*, 1994; Close *et al.*, 2004; Medved *et al.*, 2004; Tidball, 2005）。それゆえ、これら運動誘発性酸化ストレスによってもたらされる負の作用を抑制するための抗酸化サプリメント摂取の効果について、これまでに数多くの研究が行われてきた（Powers *et al.*, 2004; McGinley *et al.*, 2009）。そこで、本研究では、新たな抗酸化物質として近年注目されている水素を用いて、運動誘発性酸化ストレスおよびその関連指標に及ぼす影響を検討した（研究課題 2 および 3）。

本研究で得られた主な知見は、(1) 2週間の水素水摂取により運動時の筋および肝グリコーゲン利用が抑制される可能性が示されたこと (Fig. 3-2-4) , (2) ダウンヒル運動後に行う1週間の水素入浴により遅発性筋痛が軽減される可能性が示されたこと (Fig. 3-3-2) , の2点である。しかしながら、いずれの研究課題においても酸化傷害指標に対する水素摂取の影響は認められなかったことから (Fig. 3-2-2, Table 3-3-4) , これら水素摂取による有益な効果は、抗酸化以外の生理作用によってもたらされたことが示唆される。

そこで、以下に、本研究で得られた結果の重要性と今後の課題について最新の知見も交えながら考察することとする。

研究課題2では、2週間の水素水摂取が運動時におけるラットの Δ 筋グリコーゲン含量および Δ 肝グリコーゲン含量を有意に抑制することが示された (Fig. 3-2-4) 。前述したように、本研究は水素摂取が運動時の筋および肝グリコーゲン利用を抑制することを示した初めての研究である。しかしながら、われわれの仮説に反して、血中および骨格筋の酸化傷害指標には水素摂取の影響は観察されず、また、血中エネルギー基質においても同様の結果が示された (Fig. 3-2-2, Fig. 3-2-3, C, D, E, F) 。これらのことから、本研究で観察された運動時の組織グリコーゲン利用の抑制効果は、水素が抗酸化以外の作用メカニズムを介して筋内のTG利用を増加させた結果生じたものであると考えられた。

これまでに、水素が肝臓における脂質代謝関連遺伝子 (e.g. CPT I および線維芽細胞増殖因子 21 (FGF21) など) の発現を増加させ、肝臓ならびに全身の脂質代謝を改善することが糖尿病モデルマウス (db/db マウス) において報告されている (Kamimura *et al.*, 2011, 2016) 。しかし、運動時の筋脂質代謝に及ぼす水素摂取の影響については報告がなされていない。水素水の摂取後、骨格筋の水素濃度が上昇することは既に確認されているものの (Liu *et al.*, 2014) , 水素が運動時の筋脂質代謝に及ぼす影響については、今後、基礎的なエビデンスをさらに蓄積していく必要がある。加えて、水素による組織グリコーゲ

ンの抑制が持続的パフォーマンスに及ぼす影響についても、異なる研究デザインを用いて再検討する余地があるように思われる。

研究課題 3 では、マグ水素を入浴剤として用いた 1 週間の水素入浴が、ダウンヒル運動後 24 時間および 48 時間の遅発性筋痛 (*i.e.* VAS 2) を有意に抑制することが示された

(Fig. 3-3-2) . 遅発性筋痛は、運動習慣を有していない一般人から高い身体能力を有する競技アスリートまで、誰もが一度は経験したことのある生理現象であり、スポーツ科学の分野において長年に亘って研究対象とされてきた (Cheung *et al.*, 2003; Close *et al.*, 2005) . しかしながら、遅発性筋痛を引き起こすメカニズムについては未だ不明な点が多く残されており、明確な結論を得るには至っていない。本研究課題では、遅発性筋痛の主要因とされる筋損傷指標をはじめ、酸化ストレス指標、炎症指標および血中乳酸濃度の測定を行ったものの、水素摂取による影響は認められなかった (Table 3-3-3, Table 3-3-4) .

そのため、本研究で観察された遅発性筋痛の軽減効果は、筋温上昇や不随意的な筋痙攣などの他の誘導メカニズム (Close *et al.*, 2005) に対して、水素が作用したことによってもたらされた可能性があると考えられた。また、近年では、動物モデルにおいて遅発性筋痛を評価する方法が確立されつつあり、伸張性筋収縮時に骨格筋から分泌される神経成長因子 (NGF) が遅発性筋痛に関与している可能性も示されている (Mizumura & Taguchi, 2016) . これらのことから、今後は、水素がどのような生理メカニズムを介して遅発性筋痛を抑制したのかを明らかにしてゆく必要があるものの、水素入浴という汎用性の高い方法を用いて遅発性筋痛の軽減効果を明らかにしたという点において本研究の意義は極めて高いように思われる。

ところで、研究課題 2 および 3 では、生体内に水素を供給する方法として、水素水の経口摂取あるいは水素入浴という 2 つの方法を用いた。これらの方法は、水素ガスの吸入および水素生理食塩水の静脈投与といった他の水素摂取方法と比べて、実用性あるいは安全性に優れた方法であると考えられる。水素水の経口摂取は、最も一般的かつ簡便な水素摂取

方法であり、場所やタイミングを問わずに短時間のうちに水素を摂取できる点が最大の利点である。一方で、本研究における水素入浴は、マグ水素を入浴剤として用いることにより水素を発生させたが、水素入浴剤を用いる利点として、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点などを挙げることができる。

先行研究では、いずれの方法においても生体内の水素濃度が上昇することが報告されているが (Ohta, 2011; Liu *et al.*, 2014) , 水素水の飲用では経口的に水素が取り込まれるのに対し、水素入浴では主として経皮的に水素が取り込まれるという違いが存在する。また、水素入浴では、水素水の飲用と比べて体内における水素濃度の上昇時間がより長くなると推測される。このように、2つの方法では水素の摂取経路や曝露時間が異なるために、その作用メカニズムにも違いが生じるとも考えられる。そのため、これらの摂取方法の違いが生体に及ぼす影響については更なる研究が求められるとともに、水素の効果を最適化するための摂取プロトコルについての検討も必要である。

最後に、研究課題 2 および 3 では、水素が血中あるいは骨格筋の抗酸化能力に影響を及ぼす可能性は示されたものの、酸化傷害指標に対する影響は認められなかった (Fig. 3-2-2; Table 3-3-4) 。それゆえ、本研究で観察された水素による遅発性筋痛の軽減、および運動時の組織グリコーゲンの抑制効果は、抗酸化以外の生理作用によってもたらされたものと考えられた。しかしながら、研究課題 2 および 3 で用いた運動プロトコルにおいて十分な酸化ストレスを誘導できなかったことを考慮すると、水素が運動誘発性酸化ストレスに対し効果がないと断言することはできないようにも思われる。従って、運動誘発性酸化ストレスに対する水素摂取の効果については、より負荷の高い運動プロトコルを用いて検討を行うべきである。さらに、水素が生体組織における抗酸化能力に及ぼす影響を明らかにするためにも、GSH およびビタミン C などの抗酸化物質を個別に測定する必要があるといえよう。

3. 結語

本研究の目的は、疲労困憊運動の強度の違いが生体の酸化ストレスに及ぼす影響を明らかにすること（目的1）、ならびに運動誘発性酸化ストレスおよびその関連指標に及ぼす水素摂取の影響を明らかにすること（目的2）、の2点であった。その結果、漸増負荷による疲労困憊運動は、骨格筋の酸化ストレス指標の変化を伴わずに血中の酸化ストレス指標を変化させることが示唆された。また、実験対象（ラットまたはヒト）、摂取方法（水素水の飲用または水素入浴）、摂取期間（7日間あるいは14日間）および摂取タイミング（運動前あるいは運動後）などが異なるものの、水素が運動時の筋および肝グリコーゲン利用の抑制や、ダウンヒル運動後の遅発性筋痛の軽減に有効であることが示唆された。

参考文献

- Alessio, H.M., Goldfarb, A.H., and Cutler, R.G. (1988) MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am. J. Physiol.* **255**: C874-877.
- Alessio, H.M. (1993) Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**: 218-224.
- Alessio, H.M., Goldfarb, A.H., and Cao, G. (1997) Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. *Int. J. Sport Nutr.* **7**: 1-9.
- Alessio, H.M., Hagerman, A.E., Fulkerson, B.K., Ambrose, J., Rice, R.E., and Wiley, R.L. (2000) Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**: 1576-1581.
- Ali, M.A., Yasui, F., Matsugo, S., and Konishi, T. (2000) The lactate-dependent enhancement of hydroxyl radical generation by the Fenton reaction. *Free Radic. Res.* **32**: 429-438.
- Andrade, F.H., Reid, M.B., Allen, D.G., and Westerblad, H. (1998) Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J. Physiol.* **509**: 565-575.
- Andrade, F.H., Reid, M.B., and Westerblad, H. (2001) Contractile response of skeletal muscle to low peroxide concentrations: myofibrillar calcium sensitivity as a likely target for redox-modulation. *FASEB J.* **15**: 309-311.
- Aoi, W., Naito, Y., Takanami, Y., Ishii, T., Kawai, Y., Akagiri, S., Kato, Y., Osawa, T., and Yoshikawa, T. (2008) Astaxanthin improves muscle lipid metabolism in exercise via inhibitory effect of oxidative CPT I modification. *Biochem Biophys Res Commun* **366**: 892-897.
- Aoki, K., Nakao, A., Adachi, T., Matsui, Y., and Miyakawa, S. (2012) Pilot study: Effects of drinking hydrogen-rich water on muscle fatigue caused by acute exercise in elite athletes. *Med. Gas Res.* **2**: 12.
- Asha Devi, S., Prathima, S., and Subramanyam, M.V. (2003) Dietary vitamin E and physical exercise: I. Altered endurance capacity and plasma lipid profile in ageing rats. *Exp. Gerontol.* **38**: 285-290.
- Ashton, T., Rowlands, C.C., Jones, E., Young, I.S., Jackson, S.K., Davies, B., and Peters, J.R. (1998) Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **77**: 498-502.
- Ashton, T., Young, I.S., Peters, J.R., Jones, E., Jackson, S.K., Davies, B., and Rowlands, C.C. (1999) Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J. Appl. Physiol.* **87**: 2032-2036.

- Bailey, D.M., Young, I.S., McEneny, J., Lawrenson, L., Kim, J., Barden, J., and Richardson, R.S. (2004) Regulation of free radical outflow from an isolated muscle bed in exercising humans. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**: H1689-1699.
- Bailey, D.M., Lawrenson, L., McEneny, J., Young, I.S., James, P.E., Jackson, S.K., Henry, R.R., Mathieu-Costello, O., McCord, J.M., and Richardson, R.S. (2007) Electron paramagnetic spectroscopic evidence of exercise-induced free radical accumulation in human skeletal muscle. *Free Radic. Res.* **41**: 182-190.
- Barclay, J.K., and Hansel, M. (1991) Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **69**: 279-284.
- Beaton, L.J., Allan, D.A., Tarnopolsky, M.A., Tiidus, P.M., and Phillips, S.M. (2002) Contraction-induced muscle damage is unaffected by vitamin E supplementation. *Med. Sci. Sports Exerc.* **34**: 798-805.
- Bejma, J., and Ji, L.L. (1999) Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **87**: 465-470.
- Bergström, J., Hermansen, L., Hultman, E., and Saltin, B. (1967) Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol. Scand.* **71**: 140-150.
- Bergström, J., and Hultman, E. (1967) A study of the glycogen metabolism during exercise in man. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **19**: 218-228.
- Bloomer, R.J., Goldfarb, A.H., McKenzie, M.J., You, T., and Nguyen, L. (2004) Effects of antioxidant therapy in women exposed to eccentric exercise. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* **14**: 377-388.
- Bloomer, R.J., Goldfarb, A.H., Wideman, L., McKenzie, M.J., and Consitt, L.A. (2005) Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J. Strength. Cond. Res.* **19**: 276-285.
- Bloomer, R.J., Goldfarb, A.H., and McKenzie, M.J. (2006) Oxidative stress response to aerobic exercise: comparison of antioxidant supplements. *Med. Sci. Sports Exerc.* **38**: 1098-1105.
- Bloomer, R.J., Davis, P.G., Consitt, L.A., and Wideman, L. (2007a) Plasma protein carbonyl response to increasing exercise duration in aerobically trained men and women. *Int. J. Sports Med.* **28**: 21-25.
- Bloomer, R.J., Fry, A.C., Falvo, M.J., and Moore, C.A. (2007b) Protein carbonyls are acutely elevated following single set anaerobic exercise in resistance trained men. *J. Sci. Med. Sport* **10**: 411-417.
- Brady, P.S., Brady, L.J., and Ullrey, D.E. (1979) Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat. *J. Nutr.* **109**: 1103-1109.
- Brickson, S., Ji, L.L., Schell, K., Olabisi, R., St Pierre Schneider, B., and Best, T.M. (2003) M1/70 attenuates blood-borne neutrophil oxidants, activation, and myofiber damage following stretch injury. *J. Appl. Physiol.* **95**: 969-976.

- Brooks, G.A., Brauner, K.E., and Cassens, R.G. (1973) Glycogen synthesis and metabolism of lactic acid after exercise. *Am. J. Physiol.* **224**: 1162-1166.
- Brooks, G.A., and White, T.P. (1978) Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* **45**: 1009-1015.
- Bryer, S.C., and Goldfarb, A.H. (2006) Effect of high dose vitamin C supplementation on muscle soreness, damage, function, and oxidative stress to eccentric exercise. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **16**: 270-280.
- Cai, W.W., Zhang, M.H., Yu, Y.S., and Cai, J.H. (2013) Treatment with hydrogen molecule alleviates TNFalpha-induced cell injury in osteoblast. *Mol. Cell. Biochem.* **373**: 1-9.
- Cannon, J.G., Orencole, S.F., Fielding, R.A., Meydani, M., Meydani, S.N., Fiatarone, M.A., Blumberg, J.B., and Evans, W.J. (1990) Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. *Am. J. Physiol.* **259**: R1214-1219.
- Cannon, J.G., Meydani, S.N., Fielding, R.A., Fiatarone, M.A., Meydani, M., Farhangmehr, M., Orencole, S.F., Blumberg, J.B., and Evans, W.J. (1991) Acute phase response in exercise. II. Associations between vitamin E, cytokines, and muscle proteolysis. *Am. J. Physiol.* **260**: R1235-1240.
- Cannon, J.G., and Blumberg, J.B. (2000) *Acute phase immune responses in exercise*: New York: Elsevier.
- Chang, W.H., Hu, S.P., Huang, Y.F., Yeh, T.S., and Liu, J.F. (2010) Effect of purple sweet potato leaves consumption on exercise-induced oxidative stress and IL-6 and HSP72 levels. *J. Appl. Physiol.* **109**: 1710-1715.
- Chatterjee, I.B. (1973) Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science* **182**: 1271-1272.
- Cheung, K., Hume, P., and Maxwell, L. (2003) Delayed onset muscle soreness: treatment strategies and performance factors. *Sports Med.* **33**: 145-164.
- Child, R., Brown, S., Day, S., Donnelly, A., Roper, H., and Saxton, J. (1999) Changes in indices of antioxidant status, lipid peroxidation and inflammation in human skeletal muscle after eccentric muscle actions. *Clin. Sci.* **96**: 105-115.
- Childs, A., Jacobs, C., Kaminski, T., Halliwell, B., and Leeuwenburgh, C. (2001) 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.* **31**: 745-753.
- Cimen, M.Y. (2008) Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta* **390**: 1-11.
- Clarkson, P.M., Nosaka, K., and Braun, B. (1992) Muscle function after exercise-

- induced muscle damage and rapid adaptation. *Med. Sci. Sports Exerc.* **24**: 512-520.
- Close, G.L., Ashton, T., Cable, T., Doran, D., and MacLaren, D.P. (2004) Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayed onset muscle soreness: the role of reactive oxygen species. *Eur. J. Appl. Physiol.* **91**: 615-621.
- Close, G.L., Ashton, T., McArdle, A., and MacLaren, D.P. (2005) The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **142**: 257-266.
- Close, G.L., Ashton, T., Cable, T., Doran, D., Holloway, C., McArdle, F., and MacLaren, D.P. (2006) Ascorbic acid supplementation does not attenuate post-exercise muscle soreness following muscle-damaging exercise but may delay the recovery process. *Br. J. Nutr.* **95**: 976-981.
- Connolly, D.A., Lauzon, C., Agnew, J., Dunn, M., and Reed, B. (2006) The effects of vitamin C supplementation on symptoms of delayed onset muscle soreness. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* **46**: 462-467.
- Copp, S.W., Davis, R.T., Poole, D.C., and Musch, T.I. (2009) Reproducibility of endurance capacity and VO₂peak in male Sprague-Dawley rats. *J. Appl. Physiol.* **106**: 1072-1078.
- Dalla Corte, C.L., de Carvalho, N.R., Amaral, G.P., Puntel, G.O., Silva, L.F., Retamoso, L.T., Royes, L.F., Bresciani, G.B., da Cruz, I.B., Rocha, J.B., Barrio Lera, J.P., and Soares, F.A. (2013) Antioxidant effect of organic purple grape juice on exhaustive exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **38**: 558-565.
- Davies, K.J., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A., and Packer, L. (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**: 1198-1205.
- Davis, J.M., Murphy, E.A., Carmichael, M.D., and Davis, B. (2009) Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296**: R1071-1077.
- Davison, G., Gleeson, M., and Phillips, S. (2007) Antioxidant supplementation and immunoendocrine responses to prolonged exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **39**: 645-652.
- Deminice, R., and Jordao, A.A. (2012) Creatine supplementation reduces oxidative stress biomarkers after acute exercise in rats. *Amino Acids* **43**: 709-715.
- Diaz, P.T., Brownstein, E., and Clanton, T.L. (1994) Effects of N-acetylcysteine on in vitro diaphragm function are temperature dependent. *J. Appl. Physiol.* **77**: 2434-2439.
- Dillard, C.J., Litov, R.E., Savin, W.M., Dumelin, E.E., and Tappel, A.L. (1978) Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* **45**: 927-932.

- Dixon, B.J., Tang, J., and Zhang, J.H. (2013) The evolution of molecular hydrogen: a noteworthy potential therapy with clinical significance. *Med. Gas Res.* **3**: 10.
- Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Villiotou, V., Pouliopoulou, S., Fotinakis, P., Taxildaris, K., and Deliconstantinos, G. (2004) Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Med. Sci. Sports Exerc.* **36**: 2065-2072.
- Finaud, J., Lac, G., and Filaire, E. (2006) Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* **36**: 327-358.
- Fischer, C.P., Hiscock, N.J., Penkowa, M., Basu, S., Vessby, B., Kallner, A., Sjoberg, L.B., and Pedersen, B.K. (2004) Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. *J. Physiol.* **558**: 633-645.
- Fisher-Wellman, K., and Bloomer, R.J. (2009) Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn. Med.* **8**: 1.
- Gharib, B., Hanna, S., Abdallahi, O.M., Lepidi, H., Gardette, B., and De Reggi, M. (2001) Anti-inflammatory properties of molecular hydrogen: investigation on parasite-induced liver inflammation. *C. R. Acad. Sci. III* **324**: 719-724.
- Gohil, K., Viguie, C., Stanley, W.C., Brooks, G.A., and Packer, L. (1988) Blood glutathione oxidation during human exercise. *J. Appl. Physiol.* **64**: 115-119.
- Goldfarb, A.H., Bloomer, R.J., and McKenzie, M.J. (2005a) Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **37**: 234-239.
- Goldfarb, A.H., Patrick, S.W., Bryer, S., and You, T. (2005b) Vitamin C supplementation affects oxidative-stress blood markers in response to a 30-minute run at 75% VO₂max. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **15**: 279-290.
- Goldfarb, A.H., McKenzie, M.J., and Bloomer, R.J. (2007) Gender comparisons of exercise-induced oxidative stress: influence of antioxidant supplementation. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **32**: 1124-1131.
- Gomez-Cabrera, M.C., Domenech, E., Romagnoli, M., Arduini, A., Borrás, C., Pallardo, F.V., Sastre, J., and Vina, J. (2008) Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**: 142-149.
- Groussard, C., Machefer, G., Rannou, F., Faure, H., Zouhal, H., Sergent, O., Chevanne, M., Cillard, J., and Gratas-Delamarche, A. (2003a) Physical fitness and plasma non-enzymatic antioxidant status at rest and after a wingate test. *Can. J. Appl. Physiol.* **28**: 79-92.
- Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Vincent, S., Sergent, O., Cillard, J., and Gratas-Delamarche, A. (2003b) Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **89**: 14-20.

- Halliwell, B. (2006) Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends. Biochem. Sci.* **31**: 509-515.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press.
- Harman, D. (2006) Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1067**: 10-21.
- Hartmann, A., Plappert, U., Raddatz, K., Grunert-Fuchs, M., and Speit, G. (1994) Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* **9**: 269-272.
- Higashida, K., Kim, S.H., Higuchi, M., Holloszy, J.O., and Han, D.H. (2011) Normal adaptations to exercise despite protection against oxidative stress. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **301**: E779-784.
- Huang, C.S., Kawamura, T., Toyoda, Y., and Nakao, A. (2010) Recent advances in hydrogen research as a therapeutic medical gas. *Free Radic. Res.* **44**: 971-982.
- Hudson, M.B., Hosick, P.A., McCaulley, G.O., Schrieber, L., Wrieden, J., McAnulty, S.R., Triplett, N.T., McBride, J.M., and Quindry, J.C. (2008) The effect of resistance exercise on humoral markers of oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* **40**: 542-548.
- Ichihara, M., Sobue, S., Ito, M., Ito, M., Hirayama, M., and Ohno, K. (2015) Beneficial biological effects and the underlying mechanisms of molecular hydrogen - comprehensive review of 321 original articles. *Med. Gas Res.* **5**: 12.
- Ito, M., Hirayama, M., Yamai, K., Goto, S., Ito, M., Ichihara, M., and Ohno, K. (2012) Drinking hydrogen water and intermittent hydrogen gas exposure, but not lactulose or continuous hydrogen gas exposure, prevent 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. *Med. Gas Res.* **2**: 15.
- Itoh, H., Ohkuwa, T., Yamazaki, Y., Shimoda, T., Wakayama, A., Tamura, S., Yamamoto, T., Sato, Y., and Miyamura, M. (2000) Vitamin E supplementation attenuates leakage of enzymes following 6 successive days of running training. *Int. J. Sports Med.* **21**: 369-374.
- Jackson, M.J., Edwards, R.H., and Symons, M.C. (1985) Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **847**: 185-190.
- Kajiyama, S., Hasegawa, G., Asano, M., Hosoda, H., Fukui, M., Nakamura, N., Kitawaki, J., Imai, S., Nakano, K., Ohta, M., Adachi, T., Obayashi, H., and Yoshikawa, T. (2008) Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr. Res.* **28**: 137-143.
- Kamimura, N., Nishimaki, K., Ohsawa, I., and Ohta, S. (2011) Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing hepatic FGF21 and stimulating energy metabolism in db/db mice. *Obesity* **19**: 1396-1403.

- Kamimura, N., Ichimiya, H., Iuchi, K., and Ohta, S. (2016) Molecular hydrogen stimulates the gene expression of transcriptional coactivator PGC-1alpha to enhance fatty acid metabolism. *NPJ Aging Mech. Dis.* **2**: 16008.
- Kaminski, M., and Boal, R. (1992) An effect of ascorbic acid on delayed-onset muscle soreness. *Pain* **50**: 317-321.
- Kanda, K., Sugama, K., Hayashida, H., Sakuma, J., Kawakami, Y., Miura, S., Yoshioka, H., Mori, Y., and Suzuki, K. (2013) Eccentric exercise-induced delayed-onset muscle soreness and changes in markers of muscle damage and inflammation. *Exerc. Immunol. Rev.* **19**: 72-85.
- Kanter, M.M., Nolte, L.A., and Holloszy, J.O. (1993) Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J. Appl. Physiol.* **74**: 965-969.
- Kayatekin, B.M., Gonenc, S., Acikgoz, O., Uysal, N., and Dayi, A. (2002) Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur. J. Appl. Physiol.* **87**: 141-144.
- Khanna, S., Atalay, M., Laaksonen, D.E., Gul, M., Roy, S., and Sen, C.K. (1999) Alpha-lipoic acid supplementation: tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise. *J. Appl. Physiol.* **86**: 1191-1196.
- Khawli, F.A., and Reid, M.B. (1994) N-acetylcysteine depresses contractile function and inhibits fatigue of diaphragm in vitro. *J. Appl. Physiol.* **77**: 317-324.
- Koz, M., Erbas, D., Bilgihan, A., and Aricioglu, A. (1992) Effects of acute swimming exercise on muscle and erythrocyte malondialdehyde, serum myoglobin, and plasma ascorbic acid concentrations. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **70**: 1392-1395.
- Kruger, K., Frost, S., Most, E., Volker, K., Pallauf, J., and Mooren, F.C. (2009) Exercise affects tissue lymphocyte apoptosis via redox-sensitive and Fas-dependent signaling pathways. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296**: R1518-1527.
- Kumar, C.T., Reddy, V.K., Prasad, M., Thyagaraju, K., and Reddanna, P. (1992) Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Mol. Cell. Biochem.* **111**: 109-115.
- Kyparos, A., Sotiriadou, S., Mougios, V., Cheva, A., Barbanis, S., Karkavelas, G., Arsos, G., Albani, M., and Matziari, C. (2011) Effect of 5-day vitamin E supplementation on muscle injury after downhill running in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* **111**: 2557-2569.
- Laaksonen, D.E., Atalay, M., Niskanen, L., Uusitupa, M., Hanninen, O., and Sen, C.K. (1996) Increased resting and exercise-induced oxidative stress in young IDDM men. *Diabetes Care* **19**: 569-574.
- Laaksonen, D.E., Atalay, M., Niskanen, L., Uusitupa, M., Hanninen, O., and Sen, C.K. (1999) Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise-

- induced oxidative stress in young men. *Redox Rep.* **4**: 53-59.
- Lamprecht, M., Greilberger, J.F., Schwabegger, G., Hofmann, P., and Oettl, K. (2008) Single bouts of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups on plasma protein of trained men in a workload-dependent manner. *J. Appl. Physiol.* **104**: 1611-1617.
- Leaf, D.A., Kleinman, M.T., Hamilton, M., and Barstow, T.J. (1997) The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med. Sci. Sports Exerc.* **29**: 1036-1039.
- Lee, J., Goldfarb, A.H., Rescino, M.H., Hegde, S., Patrick, S., and Apperson, K. (2002) Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med. Sci. Sports Exerc.* **34**: 443-448.
- Lee, S.P., Mar, G.Y., and Ng, L.T. (2009) Effects of tocotrienol-rich fraction on exercise endurance capacity and oxidative stress in forced swimming rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* **107**: 587-595.
- Leeuwenburgh, C., and Ji, L.L. (1995) Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**: 941-949.
- Liu, J., Yeo, H.C., Overvik-Douki, E., Hagen, T., Doniger, S.J., Chyu, D.W., Brooks, G.A., and Ames, B.N. (2000) Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl. Physiol.* **89**: 21-28.
- Liu, C.C., Huang, C.C., Lin, W.T., Hsieh, C.C., Huang, S.Y., Lin, S.J., and Yang, S.C. (2005) Lycopene supplementation attenuated xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in skeletal muscle tissues of rats after exhaustive exercise. *Br. J. Nutr.* **94**: 595-601.
- Liu, C., Kurokawa, R., Fujino, M., Hirano, S., Sato, B., and Li, X.K. (2014) Estimation of the hydrogen concentration in rat tissue using an airtight tube following the administration of hydrogen via various routes. *Sci. Rep.* **4**: 5485.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., and Flohe, L. (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* **42**: 68-72.
- Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M., and Belcastro, A.N. (1987) Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **56**: 313-316.
- Malaguti, M., Angeloni, C., Garatachea, N., Baldini, M., Leoncini, E., Collado, P.S., Teti, G., Falconi, M., Gonzalez-Gallego, J., and Hrelia, S. (2009) Sulforaphane treatment protects skeletal muscle against damage induced by exhaustive exercise in rats. *J. Appl. Physiol.* **107**: 1028-1036.
- Margaritelis, N.V., Kyparos, A., Paschalis, V., Theodorou, A.A., Panayiotou, G., Zafeiridis, A., Dipla, K., Nikolaidis, M.G., and Vrabas, I.S. (2014) Reductive stress after exercise: The issue of redox individuality. *Redox Biol.* **2**: 520-528.
- Marzatico, F., Pansarasa, O., Bertorelli, L., Somenzini, L., and Della Valle, G. (1997)

- Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* **37**: 235-239.
- Mastaloudis, A., Morrow, J.D., Hopkins, D.W., Devaraj, S., and Traber, M.G. (2004a) Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic. Biol. Med.* **36**: 1329-1341.
- Mastaloudis, A., Yu, T.W., O'Donnell, R.P., Frei, B., Dashwood, R.H., and Traber, M.G. (2004b) Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic. Biol. Med.* **36**: 966-975.
- McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., Nieman, D.C., Morrow, J.D., Utter, A.C., and Dumke, C.L. (2005) Effect of resistance exercise and carbohydrate ingestion on oxidative stress. *Free Radic. Res.* **39**: 1219-1224.
- McBride, J.M., Kraemer, W.J., Triplett-McBride, T., and Sebastianelli, W. (1998) Effect of resistance exercise on free radical production. *Med. Sci. Sports Exerc.* **30**: 67-72.
- McGinley, C., Shafat, A., and Donnelly, A.E. (2009) Does antioxidant vitamin supplementation protect against muscle damage? *Sports Med.* **39**: 1011-1032.
- McHugh, M.P., Connolly, D.A., Eston, R.G., and Gleim, G.W. (1999) Exercise-induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect. *Sports Med.* **27**: 157-170.
- McHugh, M.P. (2003) Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **13**: 88-97.
- McKenna, M.J., Medved, I., Goodman, C.A., Brown, M.J., Bjorksten, A.R., Murphy, K.T., Petersen, A.C., Sostaric, S., and Gong, X. (2006) N-acetylcysteine attenuates the decline in muscle Na⁺,K⁺-pump activity and delays fatigue during prolonged exercise in humans. *J. Physiol.* **576**: 279-288.
- Medved, I., Brown, M.J., Bjorksten, A.R., Murphy, K.T., Petersen, A.C., Sostaric, S., Gong, X., and McKenna, M.J. (2004) N-acetylcysteine enhances muscle cysteine and glutathione availability and attenuates fatigue during prolonged exercise in endurance-trained individuals. *J. Appl. Physiol.* **97**: 1477-1485.
- Meydani, M., Evans, W.J., Handelman, G., Biddle, L., Fielding, R.A., Meydani, S.N., Burrill, J., Fiatarone, M.A., Blumberg, J.B., and Cannon, J.G. (1993) Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *Am. J. Physiol.* **264**: R992-998.
- Michailidis, Y., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Fatouros, I.G., Koutedakis, Y., Papassotiropoulos, I., and Kouretas, D. (2007) Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* **39**: 1107-1113.

- Mizumura, K., and Taguchi, T. (2016) Delayed onset muscle soreness: Involvement of neurotrophic factors. *J. Physiol. Sci.* **66**: 43-52.
- Morillas-Ruiz, J., Zafrilla, P., Almar, M., Cuevas, M.J., Lopez, F.J., Abellan, P., Villegas, J.A., and Gonzalez-Gallego, J. (2005) The effects of an antioxidant-supplemented beverage on exercise-induced oxidative stress: results from a placebo-controlled double-blind study in cyclists. *Eur. J. Appl. Physiol.* **95**: 543-549.
- Murase, T., Haramizu, S., Shimotoyodome, A., Tokimitsu, I., and Hase, T. (2006) Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**: R1550-1556.
- Murat, J.C., and Serfaty, A. (1974) Simple enzymatic determination of polysaccharide (glycogen) content of animal tissues. *Clin. Chem.* **20**: 1576-1577.
- Nagata, K., Nakashima-Kamimura, N., Mikami, T., Ohsawa, I., and Ohta, S. (2009) Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology* **34**: 501-508.
- Nieman, D.C., Henson, D.A., McAnulty, S.R., McAnulty, L., Swick, N.S., Utter, A.C., Vinci, D.M., Opiela, S.J., and Morrow, J.D. (2002) Influence of vitamin C supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon. *J. Appl. Physiol.* **92**: 1970-1977.
- Nieman, D.C., Henson, D.A., McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., Morrow, J.D., Ahmed, A., and Heward, C.B. (2004) Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship. *Med. Sci. Sports Exerc.* **36**: 1328-1335.
- Niess, A.M., Hartmann, A., Grunert-Fuchs, M., Poch, B., and Speit, G. (1996) DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int. J. Sports. Med.* **17**: 397-403.
- Nikolaidis, M.G., Jamurtas, A.Z., Paschalis, V., Fatouros, I.G., Koutedakis, Y., and Kouretas, D. (2008) The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.* **38**: 579-606.
- Nikolaidis, M.G., and Jamurtas, A.Z. (2009) Blood as a reactive species generator and redox status regulator during exercise. *Arch. Biochem. Biophys.* **490**: 77-84.
- Nikolaidis, M.G., Kyparos, A., Spanou, C., Paschalis, V., Theodorou, A.A., and Vrabas, I.S. (2012) Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues. *J. Exp. Biol.* **215**: 1615-1625.
- Nogueira, L., Ramirez-Sanchez, I., Perkins, G.A., Murphy, A., Taub, P.R., Ceballos, G., Villarreal, F.J., Hogan, M.C., and Malek, M.H. (2011) (-)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *J. Physiol.* **589**: 4615-4631.

- Nosaka, K., Newton, M., and Sacco, P. (2002) Delayed-onset muscle soreness does not reflect the magnitude of eccentric exercise-induced muscle damage. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **12**: 337-346.
- Novelli, G.P., Bracciotti, G., and Falsini, S. (1990) Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice. *Free Radic. Biol. Med.* **8**: 9-13.
- Novelli, G.P., Falsini, S., and Bracciotti, G. (1991) Exogenous glutathione increases endurance to muscle effort in mice. *Pharmacol. Res* **23**: 149-155.
- Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., Katsura, K., Katayama, Y., Asoh, S., and Ohta, S. (2007) Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* **13**: 688-694.
- Ohta, S. (2011) Recent progress toward hydrogen medicine: potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic applications. *Curr. Pharm. Des.* **17**: 2241-2252.
- Ohta, S. (2014) Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacol. Ther.* **144**: 1-11.
- Ookawara, T., Haga, S., Ha, S., Oh-Ishi, S., Toshinai, K., Kizaki, T., Ji, L.L., Suzuki, K., and Ohno, H. (2003) Effects of endurance training on three superoxide dismutase isoenzymes in human plasma. *Free Radic. Res.* **37**: 713-719.
- Ostojic, S.M. (2012) Serum alkalization and hydrogen-rich water in healthy men. *Mayo Clin. Proc.* **87**: 501-502.
- Paulsen, G., Cumming, K.T., Holden, G., Hallen, J., Ronnestad, B.R., Sveen, O., Skaug, A., Paur, I., Bastani, N.E., Ostgaard, H.N., Buer, C., Midttun, M., Freuchen, F., Wiig, H., Ulseth, E.T., Garthe, I., Blomhoff, R., Benestad, H.B., and Raastad, T. (2014) Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: a double-blind, randomised, controlled trial. *J. Physiol.* **592**: 1887-1901.
- Peake, J.M., Suzuki, K., Wilson, G., Hordern, M., Nosaka, K., Mackinnon, L., and Coombes, J.S. (2005) Exercise-Induced Muscle Damage, Plasma Cytokines, and Markers of Neutrophil Activation. *Med. Sci. Sports Exerc.* **37**: 737-745.
- Phillips, T., Childs, A.C., Dreon, D.M., Phinney, S., and Leeuwenburgh, C. (2003) A dietary supplement attenuates IL-6 and CRP after eccentric exercise in untrained males. *Med. Sci. Sports. Exerc.* **35**: 2032-2037.
- Pinheiro, C.H., Vitzel, K.F., and Curi, R. (2012) Effect of N-acetylcysteine on markers of skeletal muscle injury after fatiguing contractile activity. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **22**: 24-33.
- Powers, S.K., DeRuisseau, K.C., Quindry, J., and Hamilton, K.L. (2004) Dietary antioxidants and exercise. *J. Sports Sci.* **22**: 81-94.

- Powers, S.K., and Jackson, M.J. (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* **88**: 1243-1276.
- Powers, S.K., Smuder, A.J., Kavazis, A.N., and Hudson, M.B. (2010) Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **20**: 2-14.
- Quindry, J.C., Stone, W.L., King, J., and Broeder, C.E. (2003) The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* **35**: 1139-1145.
- Radak, Z., Asano, K., Inoue, M., Kizaki, T., Oh-Ishi, S., Suzuki, K., Taniguchi, N., and Ohno, H. (1996) Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhausting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **72**: 189-194.
- Radak, Z., Nakamura, A., Nakamoto, H., Asano, K., Ohno, H., and Goto, S. (1998) A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lungs of rats. *Pflugers Arch.* **435**: 439-441.
- Radak, Z., Pucso, J., Mecseki, S., Csont, T., and Ferdinandy, P. (1999) Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 1059-1063.
- Radak, Z., Chung, H.Y., Koltai, E., Taylor, A.W., and Goto, S. (2008) Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res. Rev.* **7**: 34-42.
- Reid, M.B., Haack, K.E., Franchek, K.M., Valberg, P.A., Kobzik, L., and West, M.S. (1992) Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J. Appl. Physiol.* **73**: 1797-1804.
- Reid, M.B., Stokic, D.S., Koch, S.M., Khawli, F.A., and Leis, A.A. (1994) N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. *J. Clin. Invest.* **94**: 2468-2474.
- Reid, M.B. (2001) Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med. Sci. Sports Exerc.* **33**: 371-376.
- Reznick, A.Z., Witt, E., Matsumoto, M., and Packer, L. (1992) Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 801-806.
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Kloting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C.R., and Bluher, M. (2009) Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 8665-8670.
- Sacheck, J.M., Milbury, P.E., Cannon, J.G., Roubenoff, R., and Blumberg, J.B. (2003) Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic. Biol. Med.* **34**: 1575-1588.

- Sastre, J., Asensi, M., Gasco, E., Pallardo, F.V., Ferrero, J.A., Furukawa, T., and Vina, J. (1992) Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am. J. Physiol.* **263**: R992-995.
- Sen, C.K., Atalay, M., and Hanninen, O. (1994a) Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *J. Appl. Physiol.* **77**: 2177-2187.
- Sen, C.K., Rankinen, T., Vaisanen, S., and Rauramaa, R. (1994b) Oxidative stress after human exercise: effect of N-acetylcysteine supplementation. *J. Appl. Physiol.* **76**: 2570-2577.
- Sen, C.K. (1999) Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements. *Mol. Cell. Biochem.* **196**: 31-42.
- Shindoh, C., DiMarco, A., Thomas, A., Manubay, P., and Supinski, G. (1990) Effect of N-acetylcysteine on diaphragm fatigue. *J. Appl. Physiol.* **68**: 2107-2113.
- Sies, H., and Cadenas, E. (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **311**: 617-631.
- Sies, H., and Jones, D.P. (2007) *Oxidative stress*: Elsevier.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., and Brand, M.D. (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* **277**: 44784-44790.
- Strobel, N.A., Peake, J.M., Matsumoto, A., Marsh, S.A., Coombes, J.S., and Wadley, G.D. (2011) Antioxidant supplementation reduces skeletal muscle mitochondrial biogenesis. *Med. Sci. Sports Exerc.* **43**: 1017-1024.
- Sumida, S., Tanaka, K., Kitao, H., and Nakadomo, F. (1989) Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation. *Int. J. Biochem.* **21**: 835-838.
- Sumida, S., Doi, T., Sakurai, M., Yoshioka, Y., and Okamura, K. (1997) Effect of a single bout of exercise and beta-carotene supplementation on the urinary excretion of 8-hydroxy-deoxyguanosine in humans. *Free Radic. Res.* **27**: 607-618.
- Supinski, G., Nethery, D., Stofan, D., and DiMarco, A. (1997) Effect of free radical scavengers on diaphragmatic fatigue. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**: 622-629.
- Takahashi, M., Suzuki, K., Kim, H.K., Otsuka, Y., Imaizumi, A., Miyashita, M., and Sakamoto, S. (2014) Effects of curcumin supplementation on exercise-induced oxidative stress in humans. *Int. J. Sports Med.* **35**: 469-475.
- Tauler, P., Ferrer, M.D., Sureda, A., Pujol, P., Drobic, F., Tur, J.A., and Pons, A. (2008) Supplementation with an antioxidant cocktail containing coenzyme Q prevents plasma oxidative damage induced by soccer. *Eur. J. Appl. Physiol.* **104**: 777-785.

- Teixeira, V.H., Valente, H.F., Casal, S.I., Marques, A.F., and Moreira, P.A. (2009) Antioxidants do not prevent postexercise peroxidation and may delay muscle recovery. *Med. Sci. Sports. Exerc.* **41**: 1752-1760.
- Thompson, D., Williams, C., Kingsley, M., Nicholas, C.W., Lakomy, H.K., McArdle, F., and Jackson, M.J. (2001a) Muscle soreness and damage parameters after prolonged intermittent shuttle-running following acute vitamin C supplementation. *Int. J. Sport.s Med.* **22**: 68-75.
- Thompson, D., Williams, C., McGregor, S.J., Nicholas, C.W., McArdle, F., Jackson, M.J., and Powell, J.R. (2001b) Prolonged vitamin C supplementation and recovery from demanding exercise. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **11**: 466-481.
- Thompson, D., Williams, C., Garcia-Roves, P., McGregor, S.J., McArdle, F., and Jackson, M.J. (2003) Post-exercise vitamin C supplementation and recovery from demanding exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **89**: 393-400.
- Thompson, D., Bailey, D.M., Hill, J., Hurst, T., Powell, J.R., and Williams, C. (2004) Prolonged vitamin C supplementation and recovery from eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **92**: 133-138.
- Tidball, J.G. (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **288**: R345-353.
- Tiidus, P.M. (2000) Estrogen and gender effects on muscle damage, inflammation, and oxidative stress. *Can. J. Appl. Physiol.* **25**: 274-287.
- Travaline, J.M., Sudarshan, S., Roy, B.G., Cordova, F., Leyenson, V., and Criner, G.J. (1997) Effect of N-acetylcysteine on human diaphragm strength and fatigability. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **156**: 1567-1571.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **39**: 44-84.
- Van Der Meulen, J.H., McArdle, A., Jackson, M.J., and Faulkner, J.A. (1997) Contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats: the role of vitamin E. *J. Appl. Physiol.* **83**: 817-823.
- Veskoukis, A.S., Nikolaidis, M.G., Kyparos, A., and Kouretas, D. (2009) Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radic. Biol. Med.* **47**: 1371-1374.
- Veskoukis, A.S., Goutianos, G., Paschalis, V., Margaritelis, N.V., Tzioura, A., Dipla, K., Zafeiridis, A., Vrabas, I.S., Kyparos, A., and Nikolaidis, M.G. (2016) The rat closely mimics oxidative stress and inflammation in humans after exercise but not after exercise combined with vitamin C administration. *Eur. J. Appl. Physiol.* **116**: 791-804.
- Viguie, C.A., Frei, B., Shigenaga, M.K., Ames, B.N., Packer, L., and Brooks, G.A. (1993)

Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J. Appl. Physiol.* **75**: 566-572.

Wadley, G.D., and McConell, G.K. (2010) High-dose antioxidant vitamin C supplementation does not prevent acute exercise-induced increases in markers of skeletal muscle mitochondrial biogenesis in rats. *J. Appl. Physiol.* **108**: 1719-1726.

Warren, J.A., Jenkins, R.R., Packer, L., Witt, E.H., and Armstrong, R.B. (1992) Elevated muscle vitamin E does not attenuate eccentric exercise-induced muscle injury. *J. Appl. Physiol.* **72**: 2168-2175.

Wu, R.E., Huang, W.C., Liao, C.C., Chang, Y.K., Kan, N.W., and Huang, C.C. (2013) Resveratrol protects against physical fatigue and improves exercise performance in mice. *Molecules* **18**: 4689-4702.

Yfanti, C., Akerstrom, T., Nielsen, S., Nielsen, A.R., Mounier, R., Mortensen, O.H., Lykkesfeldt, J., Rose, A.J., Fischer, C.P., and Pedersen, B.K. (2010) Antioxidant supplementation does not alter endurance training adaptation. *Med. Sci. Sports Exerc.* **42**: 1388-1395.

Zheng, X., Mao, Y., Cai, J., Li, Y., Liu, W., Sun, P., Zhang, J.H., Sun, X., and Yuan, H. (2009) Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Free Radic. Res.* **43**: 478-484.

謝辞

本博士論文は、筆者が早稲田大学スポーツ科学研究科修士課程および博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。

本研究の遂行にあたり、終始懇切なる御指導ならびに御校閲を賜りました本研究科の村岡功教授に深甚なる感謝の意を表します。村岡先生には、大学院への進学を決意した私を温かく研究室に迎え入れて戴き、物事を本質的に考えることの重要性を教えて戴きました。

本研究科の坂本静男教授、樋口満教授、鈴木克彦教授には、快く副査を引き受けて戴き、本論文に対する貴重なコメントを賜りました。ここに心から感謝の意を表します。

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所研究員の丸藤祐子博士、日本大学スポーツ科学部の原怜来助教、早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所次席研究員の高橋将記博士には、研究課題1の遂行にあたり、多大なる御指導ならびに御助言を賜りましたことを深謝致します。

滋賀県立大学の東田一彦准教授には、研究課題2および3の実施にあたり、動物実験の基礎から生体試料の分析方法に至るまで、温かい御指導ならびに御助言を戴きました。ここに心から感謝の意を表します。また、China Institute of Sport Scienceの李茜博士には、動物実験の実施に際して御協力を賜りましたことを感謝致します。

野中利子博士、駿河台大学大森一伸教授ならびに横浜商科大学池村司専任講師には勉強会などを通じて貴重な御意見を賜りました。ここに感謝の意を表します。

また、本論文は、日頃多くの時間を共にした村岡研究室のメンバーの協力なくして完成を迎えることはありませんでした。ここに改めて感謝の意を表します。

最後に、社会人生活に一度終止符をうち、大学院へ進学するという決断をした私に深い理解を示してくれた妻の友里恵とその両親、そして私の両親にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。