

漸増的運動負荷時の血液性状の変動に及ぼす電解還元水摂取の影響

Effect of electrolyzed-reduced water ingestion on the changes of biochemical markers under the graded exercise test

村松成司、藤原健太郎、伊藤 幹、藤田幸雄、服部洋児、服部祐児
MURAMATSU Shigeji, FUJIWARA Kentaro, ITO Motoki,
FUJITA Yukio, HATTORI Yoji, HATTORI Yuji

要旨 本研究は活性酸素・フリーラジカルを消去し、酸化ストレスに伴う障害を抑制する働きを有することが報告されている電解還元水の摂取が運動時の生体酸化ストレスに与える影響について検討したものである。大学運動部所属の健康な男子6名を対象とした。自転車エルゴメーターを用い、漸増的運動負荷試験を実施した。試験飲料として電解還元水と水道水を使用し、摂取量はそれぞれ500mlとし、運動30分前に摂取させた。飲料摂取前、運動直前、運動負荷直後、運動負荷30分後の血液性状の変動および運動負荷時の酸素摂取量を測定した。血清尿酸、過酸化脂質、遊離脂肪酸、乳酸等の変動から、電解還元水摂取が酸化ストレス状態の改善、脂質代謝の亢進、乳酸除去作用の促進などの可能性が伺われた。

I. 緒言

近年の日本においては平均寿命の著しい伸長に象徴されるように医療や科学技術の進歩と共に国民の健康水準が目覚ましい向上を見せている一方で、糖尿病、がん、心臓病、脳卒中等に代表される生活習慣病の増加等が大きな問題となっている。平成19年版厚生労働白書¹⁾によれば、2004（平成16）年度における糖尿病等生活習慣病にかかる医療費は国民医療費の約3割を、糖尿病等生活習慣病による死者数は死因別死亡割合の約6割をも占めている。また、他の先進諸国に視点を移してみても、生活習慣病に分類される疾病による死亡割合は各国共に軒並み5割を超える統計結果が出ている。このように生活習慣病患者が増加した背景には、メタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）があることも指摘されており、2005（平成17）年の調査²⁾では、40～74歳では男性の2人に1人、女性の5人に1人が、メタボリックシンドロームが強く疑われる者又は予備群と考えられる者だと言われている。そうした中、2005（平成17）年に厚生科学審議会地域保健健康増進栄養部会で取りまとめられた「今後の生活習慣病対策の推進について（中間とりまとめ）」においては、今後の生活習慣病対策として「1に運動、2に食事、しっかり禁煙、最後にクスリ」というスローガンが打ち出された。これは、これまで進められてきた早期発見、早期治療といった2次予防から、運動習慣の形成や健康的な食生活といった生活習慣の是正による1次予防への転換を意味している。こうした動きの背景には、運動が生活習慣病を始めとした種々の疾病に対する予防・治療に効果があること⁴⁾⁵⁾や習慣的な運動が死亡率を低下させることなどが明らかにされてきたこと³⁾⁴⁾、時代の変化と共に人々の健康志向が強まってきたこと、更には環境の変化に伴いその重要性が見直されるようになってきた

ことなどが挙げられる。このように、現代においては、競技力向上を目指したアスリートのための運動のみならず、従来の 2 次予防としての運動療法、近年注目され始めた 1 次予防としての健康増進や体力向上のための運動など、日常生活の中に広く運動が取り入れられてきている。こうした運動のプラス面が脚光を浴びる一方で、そのマイナス面として、運動に伴う酸化ストレス障害の問題が挙げられている。

通常、生体内で産生された活性酸素・フリーラジカルは、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やカタラーゼ (Cat)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) などの抗酸化酵素や、アスコルビン酸、トコフェロール類などの抗酸化物質により消去され、両者の均衡が保たれている⁶⁾。しかしながら、酸化反応の促進、あるいは抗酸化反応の抑制により、十分に消去できない過剰な活性酸素・フリーラジカルが発生することがある。その結果として、生体内が酸化ストレスに曝されることになる。また、酸化反応の促進及び抗酸化反応の抑制には様々な原因が考えられる。例えば、酸化反応促進の原因としては運動⁷⁾や紫外線による影響が指摘されており、反対に抗酸化反応抑制の原因としては老化⁸⁾や抗酸化物質の欠乏⁹⁾などが指摘されている。このうち、本研究においては運動に焦点をあてることにした。

我々が摂取した酸素は、通常ミトコンドリア内で 2 電子還元されて代謝水となる。しかしながら、ミトコンドリアの電子伝達系においては、ミトコンドリア内膜の NADH デヒドロゲナーゼとセミキノンラジカルから生じた 1 電子が電子伝達系から漏出し、酸素分子を 1 電子還元し、スーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) が生成される。安静時の心臓ミトコンドリアにおいて酸素消費量のうち 2 % 相当が 1 電子還元を受け $O_2^{\cdot-}$ となる¹⁰⁾ ことが報告されていることから、安静時に比べ酸素消費量が著しく増大する運動時には、活性酸素・フリーラジカルの産生量が増加すると考えられる。また、運動に伴い好中球数の増加が見られ、同時にその活性酸素産生能が亢進する。更に、高強度運動時には、肝、腎、消化管の血流が低下し、運動後に再灌流障害が起こる可能性も指摘されている⁷⁾。さらに、高強度運動時には、組織内が低酸素状態になることでアデニンヌクレオチドの分解が生じ、それに続く IMP の脱リン酸化が進行する結果として Hypoxanthine が生成される。その後、高強度運動からの回復時に供給される酸素と低酸素状態で活性化した Xanthine-oxidase により Hypoxanthine が尿酸 (UA) へと転化される過程において、 $O_2^{\cdot-}$ 及び過酸化水素 (H_2O_2) が生じる。これらの経路を経て産生された活性酸素・フリーラジカルにより、DNA、蛋白質、脂質などに酸化障害がもたらされることが示唆されている⁸⁻¹⁷⁾。このことは、本来健康の維持増進のために行われる運動がその方法によっては活性酸素・フリーラジカルの過剰発生を経て、健康を害す危険性も含んでいることを意味している。

最初に述べたように運動は健康維持において重要であり、高血圧、肥満、頸肩腕症など、運動不足症と言われる疾患が問題視される現代においては特に運動実践を促進していく必要がある。また、同時に、運動が生体の抗酸化能を高めるという報告も見られることから、生体を酸化ストレスに曝す危険性だけではなく、その危険性から生体を守る力を向上させていく効果もあると考えられ⁶⁾、酸化ストレスから生体を守るためにも習慣的に運動を行うことが必要であると言える。しかしながら、酸化ストレスや活性酸素・フリーラジカルが、老化や高血圧、動脈硬化、癌発生など多くの疾患の原因とされており⁷⁾、運動に伴い

産生される過剰な活性酸素・フリーラジカルにより生体内が酸化ストレス状態にさらされていることは無視できない。そこで、運動によるプラス面を享受しながらもマイナス面である酸化ストレスを抑え、それに伴う生体内の障害を予防していくことが必要であると考えられる。その1つの方法として、運動と共に積極的に抗酸化食品の摂取が挙げられる。

白畑らは、還元力を持った機能水のことを還元水として定義している¹⁹⁾。ここでさす機能水とは特定の機能を持った活性水のことである。水の活性化法には様々なものがあり、その一例として、電気分解、磁化処理、電子処理、超音波処理、鉱石・ミネラル処理などが挙げられる。これらの還元水の中でも、最も良く知られているものは、電気分解により生成される電解還元水である。電解還元水とは、電気分解により、陰極側から得られるアルカリ性の水であり、別名アルカリイオン水²¹⁾²²⁾とも呼ばれ、田代らの行った二重盲検臨床試験結果より、胃腸内異常発酵、胃酸過多、消化不良、慢性下痢、制酸、便秘に効能があることが確認されている²³⁾。また白畑は、 $O_2^{\cdot-}$ 及び H_2O_2 を消去したことより、電解還元水がSOD様活性及びCat様活性を示すことを報告している¹⁸⁾¹⁹⁾。更に、その機序として、白畑は活性水素還元水説を提言し、同仮説内で、活性水素を1つのモデルとして以下のように説明している。電気分解の際に、陰極側では、金属イオンが電子を受け取り、金属ミクロクラスターを形成する。同時に、 H^+ が電子を受け取り、 H_2 が発生する途中で中間体として原子状の水素が生成される。水素原子は、多くの金属とM-H結合をつくり、多くの遷移金属は室温でも長時間にわたって吸着状態を維持することが出来ることより、電気分解の際に生成された水素原子は、金属ミクロクラスターに吸着され、その後、金属内部に拡散し、吸蔵されることで水素化金属ミクロクラスターを形成する。この金属ミクロクラスターはnmスケールと極めて小さいため、水中コロイドとして長時間安定に存在し、還元性を示す。更に、ガン細胞の増殖速度の低下とガン細胞のテロメア短縮及び細胞老化、転移・浸潤能力の低下、血管新生の抑制等から、還元水が細胞内の活性酸素を消去し、ガン形質を正常化することを示唆すると共に、還元水が糖尿病マウスの耐糖能障害を改善し、血糖値を低下させることを報告している¹⁹⁾²⁰⁾²⁶⁾²⁷⁾。

以上のことを踏まえて本研究では、活性酸素・フリーラジカルを消去し、酸化ストレスに伴う障害を抑制する機能を有することが報告されている電解還元水の摂取が運動時の酸化ストレスに与える影響を検討することにした。

II. 方法

1. 対象

本実験は、大学運動部所属の健康な男子6名を対象として実施した。被験者の身体的特性は、年齢 19.2 ± 0.898 歳、身長 173 ± 3.54 cm、体重 63.6 ± 2.99 kg、BMI 21.2 ± 1.50 であった。なお、被験者に対しては事前に実験の内容を十分に説明し、了解を得た。

2. 運動負荷条件

本実験では、自転車エルゴメーター（ハイパワーエルゴメーター TTK1254a、竹井機器工業）を用い、漸増的的最大運動負荷試験（all out 運動）を午前中に実施した。すなわち、

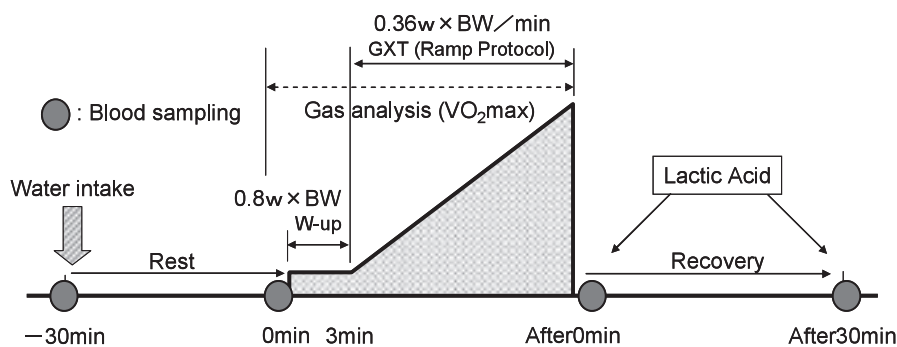


Fig. 1. Exercise protocol and blood sampling. (GXT; Graded Exercise Testing)

各自準備体操を行った後、最初の3分間は $0.8W \times BW$ （体重）とし、それ以降は $0.36W \times BW/\text{min}$ の割合で負荷を漸増した。なお、回転速度は常に60RPMで一定とした。サイクリング運動は、各被験者の自覚的継続不能状態にて停止し、その際の作業時間を記録した。換気特性諸パラメータは、肺運動負荷モニタリングシステム（AE-280、ミナト医科学）を用い測定した（Fig. 1）。

3. 試験飲料摂取条件

本実験では、試験飲料として電解還元水（ERW：Electrolyzed-Reduced Water）と水道水（TW：Tap Water）を使用した。電解還元水は水道に接続したアルカリイオン水生成器（エナジーアクア、NIKKEN）により得た。また、水道水は千葉市の上水を用いた。摂取量はそれぞれ500mlとし、被験者に対しては運動30分前に摂取するように指示した。なお、実験は飲料をクロスすることで2回行い、飲料を摂取する順番はランダムに決定した。

4. 採血および血液検査

飲料摂取前（-30min）、運動開始直前（0min）、運動終了直後（After 0min）、運動終了30分後（After 30min）に、肘正中皮静脈より採血を行った（Fig. 1）。採取した血液は、株式会社ファルコバイオシステムズに分析委託した。なお、分析項目は過酸化脂質（LPO）、クレアチンキナーゼ（CK）、尿酸（UA）、遊離脂肪酸（FFA）、白血球数（WBC）、好中球数の計6項目とした。また、運動終了直後（After 0min）、運動終了30分後（After 30min）に、指尖部より採血を行い、簡易血中乳酸測定器（ラクテートプロ LT-1710、アークレイ株式会社）を用いて、血中乳酸濃度（LA）の測定を行った（Fig. 1）。

5. 統計処理

測定結果は、すべて平均値 $\pm$ 標準誤差（SE）で表した。経時的变化に関しては、まず二元配置分散分析で有意確率を求めた後、Holm補正を用いたstudentのt検定により各測定値間の対比較を行った。また、飲料の摂取条件間の比較に関しては対応のあるt検定を用いた。いずれも危険率5%未満を有意とした。

Ⅲ. 結果

1. 尿酸 (UA)

飲料摂取前の値を基準とした血清 UA の相対変化を Fig. 2 に示した。ERW 摂取時には、飲料摂取前に対し、運動終了直後に $0.167 \pm 0.291\text{mg/dl}$ の有意な低下を示した。また、運動終了直後から安静回復 30 分後にかけて、ERW 摂取時には $1.73 \pm 0.228\text{mg/dl}$ の上昇、TW 摂取時には $1.45 \pm 0.246\text{mg/dl}$ の上昇を示し、ともに有意な変化であった。その結果として、安静回復 30 分後には、ERW 摂取時 $1.57 \pm 0.242\text{mg/dl}$ 、TW 摂取時 $1.43 \pm 0.239\text{mg/dl}$ となり、飲料摂取条件に関わらず、他の経時的水準に対し、有意に高値を示した。ERW 摂取時は、飲料摂取前から運動終了直後にかけて血清 UA レベルが有意に低下したことにより、運動終了直後の時点で、TW 摂取時に対し相対的に低い値を示した。

2. 過酸化脂質 (LPO : Lipid peroxide)

飲料摂取前の値を基準とした血清 LPO の相対変化を Fig. 3 に示した。ERW 摂取時には、飲料摂取前 $2.78 \pm 0.490\text{nmol/ml}$ に対して、運動開始直前 $1.70 \pm 0.327\text{nmol/ml}$ へと、飲料摂取後の 30 分間で値が $1.08 \pm 0.541\text{nmol/ml}$ の低下を示し、その後実験終了まで、飲料摂取前と比較して相対的に低い値を維持した。しかしながら、ERW 摂取時、TW 摂取時ともに経時変化に対して有意な差は見られなかった。ERW 摂取時には、飲料摂取 30 分後以降、血清 LPO の値が初期値に対して相対的に低値を示したことより、TW 摂取時

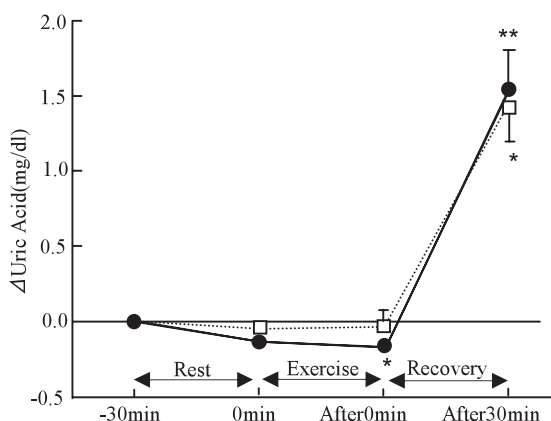


Fig. 2. Changes in serum uric acid from -30min at 0min, After 0min, and After 30 min of Electrolyzed-Reduced Water intake (ERW; ●, solid line) and Tap Water intake (TW; □, dotted line). Values are means $\pm$ SE; n = 6 subjects. *p<0.05, **p<0.01, significantly different from -30min.

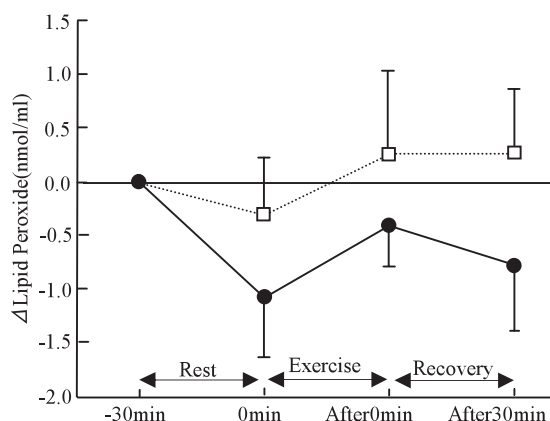


Fig. 3. Changes in serum lipid peroxide from -30min at 0min, After 0min, and After 30 min of Electrolyzed-Reduced Water intake ((ERW; ●, solid line) and Tap Water intake (TW; □, dotted line). Values are means $\pm$ SE; n = 6 subjects.

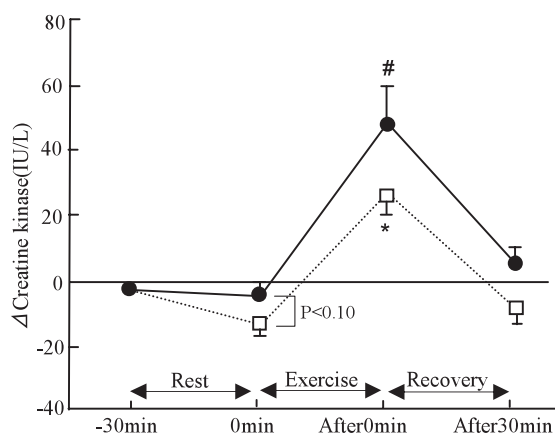


Fig. 4. Changes in creatine kinase from -30min at 0min, After 0min, and After 30 min of Electrolyzed-Reduced Water intake (ERW; ●, solid line) and Tap Water intake (TW; □, dotted line). Values are means $\pm$ SE; $n=6$ subjects. # $p<0.10$, tendency to differ from -30min. * $p<0.05$, significantly different from -30min.

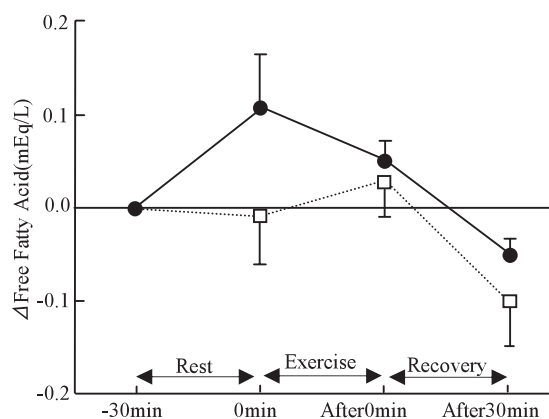


Fig. 5. Changes in free fatty acid from -30min at 0min, After 0min, and After 30 min of Electrolyzed-Reduced Water intake (ERW; ●, solid line) and Tap Water intake (TW; □, dotted line). Values are means $\pm$ SE; $n=6$ subjects.

に対しても相対的に低値を維持した。両条件間における有意な差は見られなかった。

3. クレアチンキナーゼ (CK)

飲料摂取前の値を基準としたCKの相対変化をFig. 4に示した。両飲料摂取条件ともに運動終了直後に上昇を示し、その後の安静回復30分間で低下を示した。ERW摂取時には、運動終了直後に基準値に対し 50.7 ± 12.2 IU/Lの上昇を示し、基準値である飲料摂取前、ならびに運動開始直前の値に対して10%レベルで上昇傾向にあった。しかしながら、安静回復30分後には 8.33 ± 4.93 IU/Lとなり、基準値に向かって10%レベルで低下していく傾向が見られた。一方TW摂取時には、運動終了直後に基準値に対し 29.2 ± 6.03 IU/Lの上昇を示し、基準値である飲料摂取前、ならびに運動開始直前の値に対して5%レベルで有意な高値となった。しかしながら、安静回復30分後には -5.67 ± 4.47 IU/Lとなり、基準値に向かって有意に低下した。また、TW摂取時は、ERW摂取時に比べ相対的に低い値で推移する様子が見られた。飲料摂取条件間で有意な差はなかったが、運動開始直前の時点では、TW摂取時のCKレベルが10%レベルで低い傾向にあった。

4. 遊離脂肪酸 (FFA)

飲料摂取前の値を基準とした血中FFAの相対変化をFig. 5に示した。ERW摂取時には、飲料摂取前から運動開始直前にかけて 0.107 ± 0.594 mEq/Lの上昇を示した後、運動を挟んで値が低下する様子が見られた。運動終了直後から安静回復30分後にかけては5%

レベルで有意な低下を示し、安静回復 30 分後には飲料摂取前に対して $0.0500 \pm 0.0176 \text{mEq/L}$ の低下が見られた。一方、TW 摂取時には、運動終了直後から安静回復 30 分後にかけて 10% レベルで低下する傾向を示し、安静回復 30 分後には飲料摂取前に対して $0.100 \pm 0.0499 \text{mEq/L}$ の低下が見られた。また、ERW 摂取時は、TW 摂取時に対して、より大きな増加量を、あるいはより小さな減少量を示した。

5. 白血球 (WBC)

飲料摂取前の値を基準とした WBC の相対変化を Fig. 6 に示した。ERW 摂取時には、運動終了直後に $2270 \pm 128 \text{cells}$ を示し、飲料摂取前、運動開始直前に対し、0.1% レベルで有意な増加が見られた。その後、安静回復 30 分間において 0.1% レベルで有意な減少が見られ、安静回復 30 分後には $-400 \pm 186 \text{cells}$ と安静レベルまで回復した。一方 TW 摂取時には、飲料摂取前に対し、運動開始直前では 5% レベルで WBC の減少が見られ $-483 \pm 166 \text{cells}$ を示した。運動終了直後には、ERW 摂取時と同様に WBC の増加が見られ、 $2483 \pm 264 \text{cells}$ と飲料摂取前および運動開始直前に対し有意に高値を示した。その後、安静回復 30 分間において 0.1% レベルで有意な減少が見られ、安静回復 30 分後には $-917 \pm 233 \text{cells}$ を示し、飲料摂取前および運動開始直前に対しても有意に低値となった。また、その結果として、安静回復 30 分後における TW 摂取時の WBC が、ERW 摂取時のそれに対し、1% レベルで低値となった。

6. 好中球 (Neutrophil)

飲料摂取前の値を基準とした好中球数の相対変化を Fig. 7 に示した。ERW 摂取時には、運動終了直後に $867 \pm 102 \text{cells}$ を示し、飲料摂取前、運動開始直前に対し、1% レベルで有意な増加が見られた。その後、安静回復 30 分間において 5% レベルで有意な減少が見られ、安静回復 30 分後には $179 \pm 133 \text{cells}$ と安静レベルまで回復した。TW 摂取時にも、運動終了直後に $893 \pm 124 \text{cells}$ を示し、飲料摂取前、運動開始直前に対し有意な増加が見られた。その後、安静回復 30 分間において、5% レベルで有意な減少が見られ、安静回復 30 分後には $-37.2 \pm 155 \text{cells}$ と安静レベルまで回復した。また、安静回復 30 分後における ERW 摂取時の好中球数が、TW 摂取時のそれに対し、5% レベルで高値を示した。

7. 乳酸 (LA)

運動終了直後および安静回復 30 分後における血中乳酸濃度を、飲料摂取条件別に Fig. 8 に示した。ERW 摂取時、TW 摂取時ともに、運動終了直後から安静回復 30 分後にかけて 0.1% レベルで有意に乳酸値が低下を示した。また、飲料摂取条件間で有意な差は見られなかったが、安静回復 30 分後においては、TW 摂取時に対して、ERW 摂取時の乳酸値が低い様子が見られた。Fig. 9 は、安静回復期 30 分間の乳酸除去率を表したものである。TW 摂取時に対し、ERW 摂取時の除去率が高値を示した。ただし、飲料摂取条件間における有意な差は見られなかった。

8. 作業能力

運動開始 (w-up を含む) から、各対象者の自覚的継続不能状態により、運動を終了す

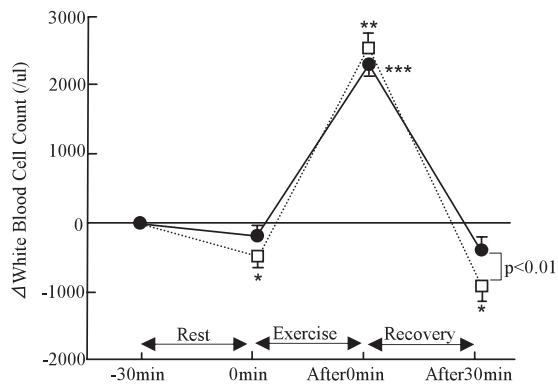


Fig. 6. Changes in white blood cell counts from -30min at 0min, After 0min, and After30min of Electrolyzed-Reduced Water intake (ERW; ●, solid line) and Tap Water intake (TW; □, dotted line). Values are means $\pm$ SE; $n = 6$ subjects. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from -30min.

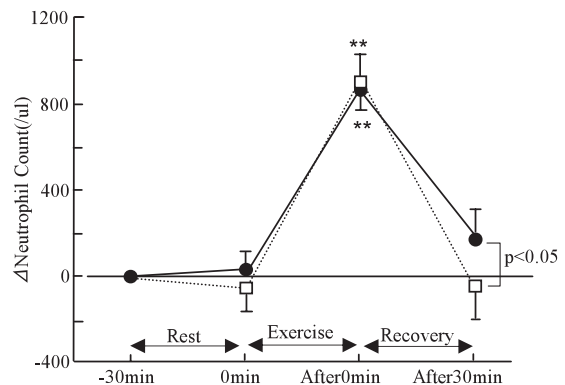


Fig. 7. Changes in neutrophil counts from -30min at 0min, After 0min, and After 30 min of Electrolyzed-Reduced Water intake (ERW; ●, solid line) and Tap Water intake (TW; □, dotted line). Values are means $\pm$ SE; $n = 6$ subjects. ** $p < 0.01$, significantly different from -30min.

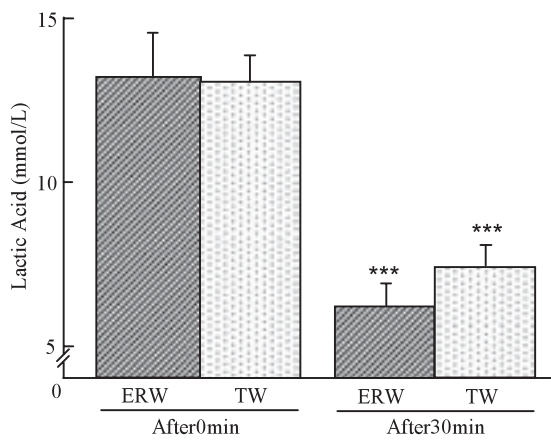


Fig. 8. Lactic acid at After0min, and After30min of Electrolyzed-Reduced Water intake (ERW; ▨, diagonal) and Tap Water intake (TW; ▤, dot). Values are means $\pm$ SE; $n = 6$ subjects. *** $p < 0.001$, significantly different from After0min.

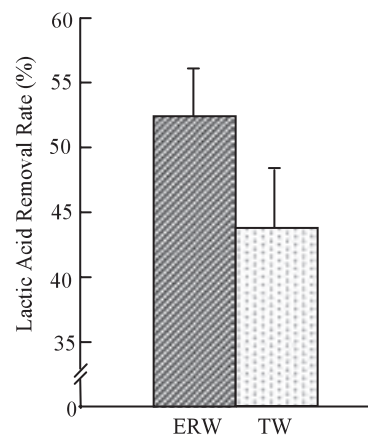


Fig. 9. Lactic acid removal rate during recovery from exhaustive cycling exercise at the time of Electrolyzed-Reduced Water intake (ERW; ▨, diagonal) and Tap Water intake (TW; ▤, dot). Values are means $\pm$ SE; $n = 6$ subjects. Lactic acid removal rate (%); (After 0 min [LA] - After 30min [LA])/After 0min [LA] $\times$ 100.

るまでの作業時間は、ERW 摂取時 $17.2 \pm 0.473\text{min}$ 、TW 摂取時 $17.1 \pm 0.714\text{min}$ であり、飲料摂取条件間で有意な差は見られなかった。安静時酸素摂取量は ERW 摂取時と TW 摂取時との間に有意な差は見られなかった。w-up 時は ERW 摂取時 $941 \pm 106\text{ml/min}$ 、TW 摂取時 $911 \pm 86.7\text{ml/min}$ となり、ERW 摂取時が TW 摂取時に比べ高い傾向にあったが、有意な差ではなかった。最大負荷運動時の酸素摂取量は ERW 摂取時 ($2830 \pm 120\text{ml/min}$)、TW 摂取時 ($2830 \pm 103\text{ml/min}$) の間に全く差が見られなかった。漸増的的最大負荷運動時における $\text{VO}_{2\text{peak}}$ は、ERW 摂取時 $2830 \pm 120\text{ml/min}$ 、TW 摂取時 $2830 \pm 103\text{ml/min}$ であり、飲料摂取条件間において有意な差は見られなかった。

考察

運動時には、その影響により活性酸素・フリーラジカルの生成量が増加する。しかしながら、その発生機序は単一ではなく、器官・組織の働き、細胞の生理的代謝条件や運動負荷条件によって、異なった複数の生成機構が働いていると考えられている²⁸⁾。一般的に運動中ならびに運動後における活性酸素・フリーラジカルの主な生成機構としては、1) ミトコンドリアの電子伝達系、2) Hypoxanthine-Xanthine oxidase System (HX-XOD System)、3) 好中球等の食細胞の活性化、4) 諸酵素の活性化、などが挙げられ、これらが複合的に関与している²⁸⁾。この関与の結果として、生体が酸化ストレスに曝され、生体の構成成分（脂質、たんぱく質、DNA 等）に酸化傷害を発生させる。

本実験においては、酸化ストレスマーカーとして血清過酸化脂質を、また筋・臓器損傷の指標としてクレアチンキナーゼを測定した。血清過酸化脂質は、有意ではないものの、両飲料摂取条件ともに運動前後で上昇を示した。クレアチンキナーゼは、運動の前後で、電解還元水摂取時に上昇傾向を、また水道水摂取時には有意な上昇を示した。

過酸化脂質とは、細胞膜リン脂質が酸化的損傷を受け、形成されたものであり、活性酸素・フリーラジカルによる酸化傷害の指標として用いられている²⁹⁾。本実験において、運動の前後で上昇を示したことを考えると、漸増的的最大負荷運動中において、活性酸素・フリーラジカルが発生し、生体が酸化ストレスに曝されていた可能性がある。

一方、クレアチンキナーゼとは、ATP-PC 系に係る重要な酵素であり、骨格筋、心筋、脳、平滑筋などに多量に存在している。通常、血中にはほとんど存在しないが、クレアチンキナーゼを含む骨格筋や臓器が損傷を受けることで、その漏出が見られるため、血中のクレアチンキナーゼは、骨格筋および臓器等の傷害を推測する指標として用いられている³⁰⁾。また、傷害の原因としては、メカニカルストレスに加え、活性酸素・フリーラジカルによる酸化傷害も考えられる。本実験におけるクレアチンキナーゼの上昇は、運動直後における一過性のものであったため、その原因は運動によるメカニカルストレスである可能性が高い。しかしながら、Hartmann, A ら³¹⁾ が、運動時の DNA の酸化損傷とクレアチンキナーゼ変動の一致を示唆していることも考慮し、本実験の運動中におけるクレアチンキナーゼの上昇は、過酸化脂質の変動が酸化ストレスの影響によるものであるという可能性も考えられる。

次に、活性酸素・フリーラジカルの生成経路に関して検討を行う。本実験では、電解還元水摂取時および水道摂取時においてそれぞれ、安静時酸素摂取量 $293 \pm 5.75\text{ml/min}$ 、

293 ± 14.7ml/min、最高酸素摂取量 2830 ± 120ml/min、2830 ± 103ml/min を示した。両飲料摂取条件共に、運動負荷とともに酸素摂取量の亢進が見られ、Peak 時で 9.66 倍にも達した。ミトコンドリア電子伝達系においては、CoQ が 1 電子還元を受けて CoQ[•] が生じる。更に CoQ[•] はラジカルであるため、ミトコンドリア内に存在する酸素分子と反応し、1 電子還元することで O₂[•] を生じさせる。酸素消費量が著しく増大する運動時には活性酸素・フリーラジカルも増加することが指摘されており、酸素摂取量の著しい増大を見せた本実験においてもミトコンドリア電子伝達系を経由した活性酸素・フリーラジカルの生成量は増加を示したものと考えられる。

鈴木ら¹¹⁾は、最大運動負荷試験に伴い、短時間であっても高強度であれば毒性の高い活性酸素・フリーラジカルを生成しやすい好中球が血中に増加することを観察することにより、運動中に分泌されたカテコールアミンの影響による、壁在プール由来の成熟好中球の遊離 (washout)、および運動後の持続的動員という複数の機序により運動後の好中球数が増加するとともに、その好中球は、MPO 脱顆粒による活性酸素種の代謝促進を生じやすい状態にあり、生体の組織傷害を発現する可能性があることを報告している。本実験においても、運動終了直後に、運動前に対し、好中球数の有意な増加が見られた。このことより、先行研究同様、運動に対する早期反応により、運動中に washout が生じ、壁在プール由来の好中球が動員されたものと推察できる。ただし、先行研究において、運動 1 時間後においても好中球増多が維持されたのに対し、本実験においては、安静回復 30 分後において増多が見られなかった。そのため、運動後において、好中球に起因する組織傷害が引き起こされた可能性は低いと考えられる。また、短時間高強度の運動負荷に伴って、好中球数は二峰性の変動を示すことも報告されている。一峰目は既述の壁在プール由来の好中球動員であり、二峰目は骨髓予備プール由来の好中球動員である³²⁾³³⁾。骨髓予備プール由来の好中球は、運動に対する後期反応としてコルチゾールの影響により動員されるものである。先行研究によると、この後期反応は、運動開始 3 時間後程度遅れて発現する。つまり、運動開始から 45 分程度の追跡しか行っていない本実験においては、骨髓予備プール由来の好中球による影響は含まれていないものと考えられる。同時に、実験終了後において、生体に対して何らかの作用をもたらした可能性も考えられる。

先行研究によると、短時間で疲労困憊に至る最大負荷運動に伴う酸化ストレスには、激運動時の細胞内低酸素状態に起因した活性酸素生成経路である HX-XOD system の関与が指摘されている¹³⁾。HX-XOD System とは、低酸素状態によるアデニンヌクレオチドの分解、酸素再供給による転化を経て、最終的に尿酸が生成される過程において O₂[•] が発生するというものである。本実験においては、両飲料摂取条件ともに、飲料摂取前、運動開始直前、運動終了直後に対し、安静回復 30 分後で血清尿酸レベルの有意な上昇が見られた。これは、漸増的 maximum 負荷運動時における細胞内低酸素状態により分解されたアデニンヌクレオチドが、運動終了後の安静回復 30 分間で尿酸へと転化されたものと考えられる。すなわち、安静回復期において HX-XOD System 由来の活性酸素・フリーラジカルが発生していた可能性が挙げられる。

さらに、運動中においては、酸素消費量の増加に伴い、ミトコンドリア電子伝達系由来の活性酸素・フリーラジカルの産生増大および、壁在プール由来の好中球数動員による活性酸素種代謝の亢進という 2 つの機序に基づき、生体の酸化ストレスが増大していたこと

が推察できる。また、それに伴い、運動終了直後において、過酸化脂質の相対的上昇およびクレアチンキナーゼの有意な上昇が見られたものとする。しかしながら、酸化ストレスマーカーとして用いた過酸化脂質においては相対的な上昇にとどまり、有意な変動は見られなかった。先行研究において、全身持久力と過酸化脂質動態との関連性が示唆されるとともに、全身持久力の優れた集団では運動中の過酸化脂質の増加が見られないことが報告されている⁶⁾¹²⁾¹³⁾。また、鍛錬者と非鍛錬者の比較においては、両者の抗酸化能の相違に伴い、非鍛錬者対し鍛錬者で運動中の過酸化脂質増大が抑制される可能性が示されている¹²⁾³⁴⁾。本実験における対象は、高校以前より継続的に運動部に所属し、定期的にトレーニングを積んできたものであった。そのため、本実験における過酸化脂質の変動に対しても、先行研究同様に対象者の鍛錬度およびそれに伴う抗酸化能が影響した可能性が考えられる。

次に、運動終了後においては、運動終了に伴う酸素消費の低下が推察されるとともに、飲料摂取条件に関わらず好中球数の有意な低下が見られた。更に安静回復 30 分後において血清尿酸レベルが有意に上昇した。これらのことより、主な活性酸素・フリーラジカルの生成経路がミトコンドリア電子伝達系および好中球の活性化から HX-XOD System へと徐々に移行していったものと考えられる。しかしながら、安静回復 30 分間において、水道水摂取時では過酸化脂質に変動は見られず、電解還元水摂取時に至っては低下が見られた。クレアチンキナーゼに関しては、両飲料摂取条件ともに低下が見られた。この結果より、発生した活性酸素・フリーラジカルが生体組織と反応する前に、抗酸化機構により消去された可能性が考えられる。前述の通り、本実験の対象者が鍛錬者であったこともその可能性を支持している。また、HX-XOD System において生成された尿酸は、反応性の高い $\text{HO}\cdot$ のスカベンジャーとしても知られている⁷⁾。そのため、活性酸素・フリーラジカル生成により蓄積した尿酸によりラジカルが消去された可能性も考えられる。安静回復 30 分後における血清尿酸レベルは、水道水摂取時に対し、電解還元水摂取時において有意に高値を示していた。安静回復 30 分間における血清過酸化脂質の変動に相対的な差が見られたことも考慮すると、電解還元水摂取が尿酸生成に何らかの影響を及ぼし、結果的に酸化ストレス軽減に寄与した可能性も考えられる。ただし、運動後の血中尿酸濃度の上昇は、フリーラジカルの上昇に寄与するものであり、フリーラジカルの除去との関連性は不明であるという意見⁷⁾もあり、可能性の 1 つとして今後の研究における更なる検討が必要である。

花房ら¹³⁾は、HX-XOD System 由来の活性酸素・フリーラジカルは尿酸の生成よりも前に発生するものであるにも関わらず、疲労困憊運動後において血清過酸化脂質のピークが血清尿酸のピークよりも遅延して現れることを報告している。その理由として、発生した活性酸素・フリーラジカルにより脂質が徐々に過酸化されることを挙げている。本実験においては、運動終了直後では血清尿酸レベルに変化は見られず、安静回復 30 分後に両飲料摂取条件ともに有意な上昇を示した。しかしながら、安静回復期における測定を 30 分後でしか行っていない本実験においては血清尿酸レベルのピークが安静回復 30 分後までに現れていたのか確かめることは出来ず、同時に HX-XOD System 由来の活性酸素・フリーラジカルの影響が遅延して現れることを考慮すると、安静回復 30 分までの追跡では、その影響が反映されていない可能性も高い。つまり、HX-XOD System 由来の活性酸素・

フリーラジカルの影響は、安静回復30分後以降に現れたと考えられる。

また、脂質の過酸化においてしばしば自動酸化の問題が取り上げられる。脂質の自動酸化は活性酸素種によって酸化損傷を受けた細胞膜リン脂質からアルコキシラジカルやペルオキシラジカルが生成され、それがまた脂質過酸化反応の開始剤になることで反応が自動的に進んでいく²⁹⁾。安静回復30分後以降においてHX-XOD Systemの影響を受け、過酸化脂質が生成されたと仮定するならば、脂質の自動酸化の影響は更に遅延して現れることが推察される。いずれにしても、運動に伴う酸化ストレスを正確に捉え、それに対する電解還元水摂取の影響を検討していく上で、安静回復30分以降も追跡していく必要がある。

これまで、電解還元水が活性酸素・フリーラジカルを消去することが報告されている。化学発光を用いた測定では、電解還元水が、HX-XOD System由来の $O_2^{\cdot -}$ 発光を抑制したこと、およびFenton反応由来の $HO\cdot$ 発光を抑制したことより、電解還元水がこれらのフリーラジカルを消去することが示されている²⁰⁾。また、電解還元水がHX-XOD System由来の H_2O_2 を消去し、その蓄積を抑制することも示されている¹⁸⁾。更に、in vitroにおいて、活性酸素・フリーラジカルを消去することにより、酸化傷害を抑制する効果も示されている。白畑らによると、アスコルビン酸と $Cu(II)$ の混合物によって引き起こされるDNAの単鎖切断に対して、電解還元水が有意にその切断を抑制した¹⁸⁾。

以上の報告より、本実験においても、運動開始までの安静30分間における血清過酸化脂質の低下に対し、電解還元水の摂取が影響していた可能性が考えられる。電解還元水摂取時の飲料摂取前における血清過酸化脂質は臨床基準値を超える高値を示していたことから、実験開始前の時点において、対象者が既に酸化ストレスに曝されていたことが推察される。そのため、電解還元水摂取が、生体内の酸化ストレスを改善したことで、安静において血清過酸化脂質の低下がもたらされたと考えられる。同時に、運動後の安静回復期における低下に関しても、前述した尿酸代謝を経た影響のほかに、電解還元水が直接活性酸素・フリーラジカルに作用した結果であるとも考えることも出来る。

血中遊離脂肪酸レベルは、運動前の安静30分間で、電解還元水摂取時に上昇を示し、結果的に運動開始直前の時点では、電解還元水摂取時の値が水道水摂取時に対して高値を示す傾向にあった。この2条件下における変動の相違の原因として以下の2つが考えられる。すなわち、電解還元水摂取による脂肪酸放出の促進および水道水摂取による脂肪酸放出の阻害である。まず前者に関しては、電解還元水による酵素への刺激を経て、脂肪組織から遊離脂肪酸の放出を促進したということが考えられる。電解還元水が、細胞内の活性酸素を消去した上で、インスリン同様、シグナル伝達系に作用し、細胞内への糖取り込みを促進することや、その結果として、耐糖能障害を伴うⅡ型糖尿病モデルマウスを用いた一過性高血糖に対する耐糖能試験において、電解還元水摂取による改善効果が見られたことが報告されている¹⁹⁾²⁰⁾。つまり、電解還元水が脂質代謝に係るシグナル伝達系に作用した可能性がある。同時に、インスリンは遊離脂肪酸の放出に関連する酵素であるため、電解還元水が示したインスリン様活性が、遊離脂肪酸の変動にも影響したことが考えられる。一方、本実験は、採血の影響上、空腹時に実施しているが、それが安静時の脂質代謝に影響していることも考えられる。絶食下においては血中遊離脂肪酸が上昇するため、電解還元水摂取時の血中遊離脂肪酸上昇は、電解還元水による影響ではなく、空腹という実験条件に係る変化であった可能性がある。ただし、水道水摂取時には血中遊離脂肪酸の変動が

見られなかったことから、この場合、何らかの理由により水道水摂取による脂肪酸放出阻害が生じた可能性が残された。

いずれの理由にしても、水道水摂取時に対して、電解還元水摂取時において高値を示したことから、それに続く運動における脂肪酸の分解が期待される。そこで、呼吸交換比によるエネルギー代謝の検討を行った。運動開始直前、すなわち電解還元水摂取時が危険率10%未満で高値を示した時点においては、水道水摂取時に対し、電解還元水摂取時が相対的低値を示し、わずかに脂質の代謝が促進されていた可能性が見られた。しかしながら、w-up 時の呼吸交換比は、電解還元水摂取時において相対的高値を示し、期待された運動時の脂質代謝亢進は見られなかった。運動終了時には、両飲料摂取条件ともに、呼吸交換比は 1.16 を示し、血中遊離脂肪酸も低下した。安静回復期においても、血中遊離脂肪酸の更なる低下が見られた。換気諸パラメータの測定は行っていないが、酸素負債の影響により、糖質由来のエネルギー代謝亢進が継続した結果ではないかと推察される。また、安静回復 30 分後において、再度電解還元水摂取時の血中遊離脂肪酸が、水道水摂取時のそれに対し高値を示したことは興味深く、脂質代謝の亢進が認められる運動における電解還元水摂取が、血中遊離脂肪酸および呼吸交換比の変動に対してどのように影響するか検討する必要がある。

運動終了直後および安静回復 30 分後に測定した血中乳酸濃度においては、両飲料摂取条件ともに安静回復を通して有意な低下を示したが、電解還元水摂取時にその低下幅が相対的に大きくなり、結果的に乳酸除去率が高い様子が示された。その機序として、血管内皮機能との関連が考えられる。血管内皮機能には、一酸化窒素の活性化が関与している。また、一酸化窒素は血管内皮における弛緩因子であり、血流量の増加をもたらす。しかしながら、活性酸素・フリーラジカルの産生が増加すると産生された活性酸素・フリーラジカルは一酸化窒素を捕捉し、不活性させることが知られている⁷⁾³⁵⁾。すなわち、本実験においては、電解還元水摂取が、運動由来の活性酸素・フリーラジカルを消去することで、一酸化窒素の活性を維持し、血管内皮機能、血流量等が維持されたものと推察される。その結果として、生体内での乳酸の循環が促進され、除去率が向上した可能性がある。更に、乳酸は O_2^- をより反応性の高い $HO\cdot$ へと転換することも指摘されている³⁶⁾。つまり、電解還元水摂取により、活性酸素・フリーラジカルが消去されたことで乳酸除去率が向上し、乳酸除去率が向上したことで酸化ストレスのリスクが低減されるという二重の効果がもたらされたことが予想された。

本実験においては、最大負荷運動時の酸化ストレスに及ぼす電解還元水の影響を検討したが、対照条件下でも運動に起因する血清過酸化脂質の顕著な上昇は得られず、生体に対する酸化ストレスの負担があまり大きくなかったことが伺える。先行研究においては、自転車エルゴメーターを用いたサイクリング運動、トレッドミルを用いたランニングともに All Out に至るまで継続することで酸化ストレスの発現が見られている。それらを参考にし、今回、生体に係る酸化ストレスに対する電解還元水摂取の影響を検討するために自転車エルゴメーターを用いた漸増的的最大負荷運動を採用したが、期待された運動の影響が認められなかった。その結果、酸化ストレスに対する電解還元水の影響も顕著に現れなかったものと推察される。そのため、運動時酸化ストレスに及ぼす電解還元水の影響を明らかにするため、運動終了後の追跡時間延長の必要性、対象の属性の影響、運動の様式・強度

の設定等、本実験の考察を踏まえ、更なる検討が必要であると思われる。

参考文献

- (1) 厚生労働省：我が国の保健医療の現状と課題，平成19年度版厚生労働白書，28-66，2007.
- (2) 厚生労働省健康局．国民健康・栄養調査：2007.
- (3) 森岡聖次，橋本勉：身体活動度と総死亡率の関連，医学のあゆみ，179(7)，458-459，1996.
- (4) 浦田秀則：規則的な運動習慣による高血圧患者の心血管系死亡率低下，血圧，6(10)，1042-1043，1999.
- (5) ACSM. ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription, Sixth Edition: 2000.
- (6) 森河亮，稲水惇，小笠原忍：運動がスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）と血中過酸化脂質に及ぼす影響，臨床スポーツ医学，17(11)，1372-1377，2000.
- (7) 大野秀樹，跡見順子，伏木亨 編：活性酸素と運動，杏林書院，1998.
- (8) 畑尾英一，大石修司，伊藤昌之，柳生久永，中村博幸，松岡健：老化ラット横隔膜における急性運動誘発性酸化ストレスの影響，東医大誌，63(2)，162-169，2005.
- (9) 三上俊夫：ビタミンEの摂取状態が運動トレーニング時の肝過酸化脂質に及ぼす影響，日本未病システム学会雑誌，7(1)，118-120，2001.
- (10) Chance B, Sies H, and Boveris A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.*, 59, 527-605, 1979.
- (11) 鈴木克彦，佐藤英樹，遠藤哲，長谷川裕子，望月充邦，中路重之，菅原和夫，戸塚学，佐藤光毅：スポーツ選手における最大運動負荷の血中白血球数と好中球活性酸素産生能に及ぼす影響，体力科学，45，451-460，1996.
- (12) 角田聡，田中喜代次，喜多尾浩代，渡辺一志，中塘二三生，増原光彦：血清過酸化脂質に及ぼす最大運動と最大下長時間運動の影響，デサントスポーツ科学，8，231-239，1987.
- (13) 花房祐輔，川口浩太郎，大成浄志：漸増的最大負荷による血清過酸化脂質濃度の変動と全身持久力との関連性，広島大学保健学ジャーナル，1(1)，85-89，2001.
- (14) 長岡功，蓬田伸，豊島博，平光正典，三枝裕昭：高脂血症ラットに運動負荷した際に見られる血液生化学、血液流動性の変化に及ぼすレモンポリフェノールの影響，日本未病システム学会雑誌，12(1)，86-88，2006.
- (15) 中島早苗，韓一栄，蒲原聖可，中野優，大野誠：一過性の運動負荷による尿中8-OHdG排泄量の変動，慈恵医大誌，120，153-159，2005.
- (16) 後藤力，東幸仁，西岡健司，日域大輔，梅村隆史，上田佳子，吉栖正生：運動強度の違いが酸化ストレスに与える影響，理学療法学，32，589，2005.
- (17) 十枝内厚次，宮崎裕美，小関迪，大石修司，木崎節子，大野秀樹，芳賀脩光：中球活性化による脂質過酸化におよぼす一過性最大運動の影響，体力科学，47(6)，964，1998.
- (18) Shirahata. S, Kabayama. S, Nakano. M, Miura. T, Kusumoto. K, Gotoh. M, Hayashi. H, Otsubo. K, Morisawa. S, Katakura. Y.: Electrolyzed-Reduced Water Scavenges Active Oxygen Species and Protects DNA from Oxidative Damage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234(1), 269-274, 1997.
- (19) 白畑實隆：活性酸素消去能をもつ還元水の科学と医療への応用，九州大学中央分析センター センターニュース，19(3)，7-21，2002.
- (20) 白畑實隆：還元水による動物細胞の機能制御と医療への応用，日本農芸化学会誌，74(9)：994-998，2000.
- (21) 北洞哲治：アルカリイオン水の効用検証，電解水ガイド2001，86-87，2001.
- (22) 小久見善八，菊地憲次：アルカリイオン水の性質と安全性，電解水ガイド2001，88-89，2001.
- (23) 田代博一，北洞哲治，藤山佳秀，馬場忠雄，糸川嘉則：アルカリイオン水の臨床的検討，電解水ガイド2001，90-91，2001.
- (24) 吉川敏一，内藤裕二，近藤元治：胃粘膜傷害に対するアルカリイオン水の有効性の検討，電解水ガイド2001，92-93，2001.
- (25) 早川亨志ほか：アルカリイオン水の腸内発酵への影響について，電解水ガイド2001，94-95，2001.
- (26) Katakura Y, Yamamoto K, Miyake O, Yasuda T, Uehara N, Nakata E, Kawamoto S, Shirahata S.: Bidirectional Regulation of Telomerase Activity in a Subline Derived from Human Lung Adenocarcinoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 237, 313-317, 1997.
- (27) Katakura Y, Nakata E, Miura T, Shirahata S.: Transforming Growth Factor b Triggers Two Independent- Senescence Programs in Cancer Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255, 110-115,

- 1999.
- (28) 角田聡：運動と活性酸素，臨床スポーツ医学，21(4)，327-334，2004.
 - (29) 藤田直：活性酸素，過酸化脂質，フリーラジカルの生成と消去機構並びにそれらの生物学的作用，薬学雑誌，122(3)：203-218，2002.
 - (30) 高木康，安原努，五味邦英：クレアチンキナーゼ（CK），臨床病理レビュー特集，116，52-61，2001.
 - (31) Andreas. H, Ulla. P, Klaus. R, Martina. G. F, Giinter. S.: Does physical activity induced DNA damage?, *Mutagenesis*, 9(3), 269-272, 1994.
 - (32) 望月充邦，鈴木克彦，白石正彦，菅原和夫，戸塚学，佐藤光毅：スポーツ選手の年間の非特異的免疫能に及ぼす運動の影響，日衛誌，50：211，1995.
 - (33) 鈴木克彦，長沼慎二，望月充邦，白石正彦，中路重之，菅原和夫，戸塚学，佐藤光毅：異なる持久性運動条件による血中白血球数の数的・構成的変動パターンの比較，日衛誌，50，631-636，1995.
 - (34) 花房祐輔ほか：運動による過酸化脂質動態について（第二報）～鍛錬者・非鍛錬者における運動による脂質過酸化反応の相違について～，体力科学，47(6)，964，1998.
 - (35) 大野秀樹，中野法彦，桜井拓也，石橋義永，木崎節子：運動と活性酸素：人体におけるその代謝と疾病，臨床スポーツ医学，23(1)，13-18，2006.
 - (36) 沖田孝一：運動と酸化ストレス，医学のあゆみ，218(1)，105-110，2006.