

運動の日常化と虚血再灌流酸化ストレス傷害の予防

京都府立医科大学 青 井 渉
(共同研究者) 同 内 藤 裕 二
同 吉 川 敏 一

Chronic Exercise and Protection of Oxidative Damage Induced by Ischemia-Reperfusion

by

Wataru Aoi, Yuji Naito, Toshikazu Yoshikawa
Kyoto Prefectural University of Medicine

ABSTRACT

It is thought that chronic exercise increases the antioxidative capacity in body, and raises oxidative stress tolerance. The purpose of this study was to investigate the effect of exercise training on the oxidative stress tolerance in liver using ischemia-reperfusion (I/R) model. Sprague Dawley rats of 10 wk old were divided into groups: rested-sham, exercised-sham, rested-I/R, and exercised-I/R. Running exercise was carried out 5 day/wk in the exercise groups. After 4 wk, I/R consisting from 30 min of ischemia and 3 hr of reperfusion was performed by regulated blood flow in hepatic artery and portal vein in the I/R groups. Glutamic-oxaloacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase and lipid peroxide concentration in serum increased by ischemia-reperfusion while the significant change by exercise training was not seen. Although 4-hydroxy-2-nonenal modified protein in liver was increased by I/R, it was blunted by training. In the exercise group, the level of glutathion peroxidase in liver was significantly increased after ischemia-reperfusion. These results show that the oxidative injury in liver induced by I/R is attenuated by training, resulting from exercise training increases the induction of antioxidant enzymes on oxidative stress.

The present study suggests that chronic exercise has beneficial effect as preconditioning against oxidative stress.

要 旨

慢性運動は生体内の抗酸化能力を増大させ、酸化ストレス耐性を向上させると考えられている。本研究では、肝臓虚血再灌流モデルを用いて運動トレーニングが肝臓の酸化ストレス耐性に及ぼす影響について検討した。10週齢のSprague Dawley系ラットを4群（安静・擬手術群、運動・擬手術群、安静・虚血再灌流負荷群および運動・虚血再灌流負荷群）に分けた。運動群には週5回ランニング運動を負荷して飼育し、4週間後に虚血再灌流実験を行った。虚血再灌流は肝動脈および門脈左枝を30分虚血した後、3時間再灌流することにより行った。血清 glutamic-oxaloacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase および過酸化脂質濃度は虚血再灌流負荷により増大したが、運動トレーニングによる有意な変動は見られなかった。肝臓における4-hydroxy-2-nonenal 修飾蛋白生成量は虚血再灌流により増大したが、運動群では有意に抑制された。肝臓 glutathion peroxidase 濃度は虚血再灌流後、運動群において有意な増大がみられた。以上のことから、肝臓虚血再灌流による肝臓過酸化脂質生成は運動トレーニングにより抑制されることが示された。これは酸化ストレスに対する抗酸化酵素の誘導感受性がトレーニングにより亢進したことに起因する可能性がある。本結果は運動の日常化が酸化ストレスに対する preconditioning としての有用性を示唆するものである。

緒 言

日常的運動習慣は抗酸化能力を増大させ、体内で生じた活性酸素種を消去する能力が高まることが知られている^{4,8,11}。運動トレーニングによる抗

酸化能力の向上は superoxide dismutase (SOD) や glutathion peroxidase (GPx), catalase などの抗酸化酵素の量や活性が増大することに起因すると考えられている^{4,8,11}。これら抗酸化酵素の誘導は骨格筋だけでなく心筋や肝臓などにもおよぶことが報告されており^{7,13}、トレーニングは内臓組織においても抗酸化能力を増大させる可能性がある。

本研究では、運動トレーニングが肝臓の抗酸化能力に及ぼす影響について人工的虚血再灌流による酸化ストレス負荷モデル^{3,6,10}を用いて検討した。組織が虚血状態に陥るとキサンチンデヒドロゲナーゼがキサンチンオキシダーゼに変換され、さらにプリン代謝によりヒポキサンチンが高濃度に蓄積する。ここに再灌流が起こり酸素が供給されると大量の O_2^- が発生する^{6,14}。さらに、サイトカインや接着分子などの炎症メディエータの生傷害によって食細胞の凝集、浸潤が起こり組織障害を遷延させる¹⁴。本研究では虚血再灌流により生じた活性酸素種あるいは活性窒素種による肝臓酸化障害を、不飽和脂肪酸の酸化生成物およびチロシンニトロ化を定量することにより評価した。また、一般に抗酸化能力は栄養状態が一定の場合、組織中の抗酸化酵素の働きによって規定される。したがって、代表的な抗酸化酵素である Mn-SOD および GPx の濃度がトレーニングや虚血再灌流ストレスにより肝臓において誘導されるか否かについても同時に検討した。

1. 研究方法

1.1 飼育条件および虚血再灌流実験

環境に順応させた10週齢のSprague-Dawley系雄性ラット（清水実験材料）を安静・擬手術群（S-C）、運動・擬手術群（E-C）、安静・虚血再灌

表1 Parameters of liver damage in blood

		S-C	E-C	S-I/R	E-I/R
GOT	(U/L)	88 ± 7.5	96 ± 18.5	4430 ± 685*	4823 ± 968**
GPT	(U/L)	61 ± 10.4	65 ± 8.5	4130 ± 795*	4038 ± 910**
LPO	(nmol/ml)	0.43 ± 0.11	0.41 ± 0.13	1.83 ± 0.41*	1.61 ± 0.28**

Values are shown as mean ± SE. *: p<0.05 vs S-C, **: p<0.05 vs E-C

流負荷群 (S-I/R) および運動・虚血再灌流負荷群 (E-I/R) の4群 (n=7) に分けて4週間飼育した。運動群にはトレッドミルランニング運動を25m/分、登り傾斜5度、60分の強度まで4週間かけて漸増させる方法で負荷した。最終運動48時間後、虚血再灌流実験を行った。虚血再灌流負荷は麻酔下に腹部切開後、門脈左枝をクリップで30分止めて虚血を行い、その後クリップをはずして再灌流を行った。麻酔下に安眠させた状態で3時間再灌流を行った後、血液および肝臓左葉を摘出した。一方、コントロール群には擬手術として門脈虚血再灌流以外の同作業を同時に行った。

1. 2 肝臓障害の評価

血清 glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) および glutamic-pyruvic transaminase (GPT) 濃度を Reinmen-Frankle 法¹²⁾ により測定した。血清過酸化脂質濃度 (lipid peroxidase : LPO) を TBA 法²⁾ により測定した。また肝臓から蛋白を抽出し、4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) 修飾蛋白 (抗体; 老化制御研究所) および 3-nitro-L-tyrosine (抗体; シグマ社) に対する抗体を用いて western-blotting を行った。NIH image を用いて各泳動レーンごとに検出されたバンドを累計することにより酸化生成物を定量化した。

1. 3 抗酸化酵素濃度の測定

肝臓における Mn-SOD (抗体; Upstate 社) および GPx (抗体; Biogenesis 社) 濃度を western-blotting および enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によりそれぞれ測定した。

1. 4 統計処理

結果は平均値±標準誤差で表示した。データの統計処理は、ANOVA と Tukey's HSD を用い、有意差水準は5%以下とした。

2. 実験結果

2. 1 肝臓障害

血清 GPT, GOT および過酸化脂質濃度は虚血再灌流負荷により有意に増大したが、運動トレーニングによる影響は見られなかった (表1)。肝臓 4-HNE 修飾蛋白生成量は虚血再灌流により有意に増大したが、E-I/R 群は S-I/R 群に比べて有意な減少がみられた (図1)。3-nitro-L-tyrosine の生成は4群ともに検出されなかった。

2. 2 抗酸化酵素蛋白含量

肝臓における Mn-SOD 濃度は4群間で有意な変動はみられないものの、運動群において安静群と

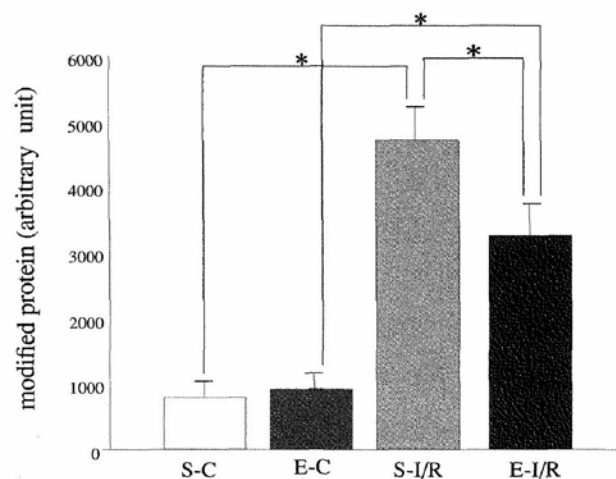


図1 4-HNE modified protein concentration in liver
*p<0.05

比べて増大傾向がみられた (図2.A). GPx 濃度は E-I/R 群において S-I/R 群と比較して有意な増量が見られた. また, E-C 群において S-C 群と比べて増大傾向がみられた (図2.B).

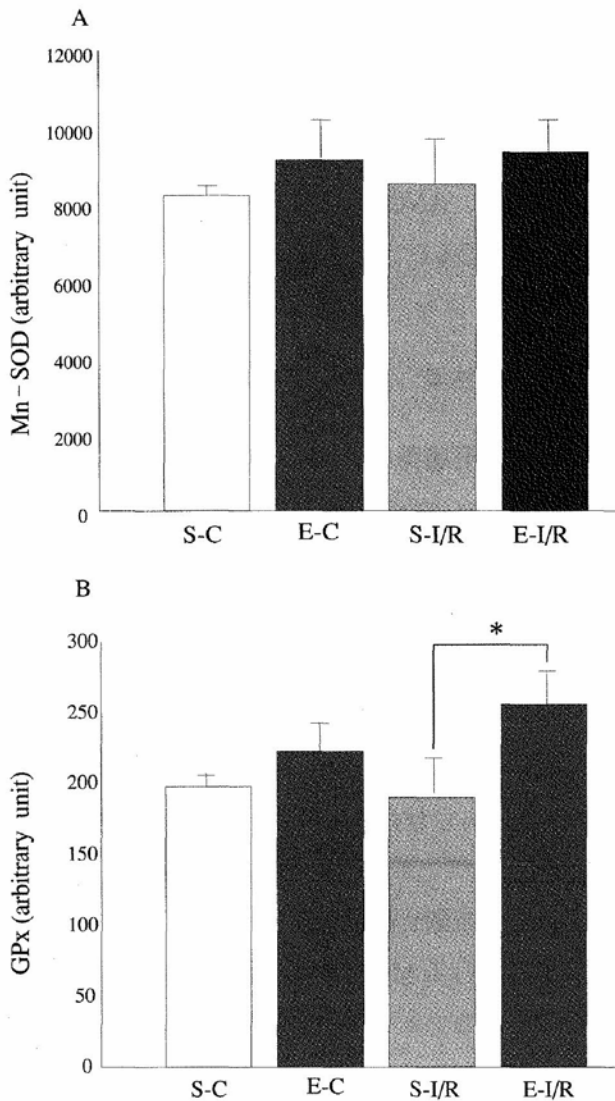


図2 Antioxidant enzymes concentration in liver
A: Mn-SOD, B: GPx *p<0.05

3. 考 察

本研究では, 虚血再灌流モデルを用いて肝臓に人工的酸化ストレスを負荷することにより, 酸化ストレス耐性におよぼす運動トレーニングの影響を検討した. 虚血再灌流障害は時間経過とともに早期障害と遅発性障害の2相に大きく分けられる¹⁴⁾. 前者は主にキサンチンオキシダーゼを触媒と

して血管内皮などから産生される $O_2^{\cdot-}$ による酸化障害で再灌流3~6時間後起こる. 後者は酸化ストレスシグナルなどを受けて発現したサイトカイン, ケモカインおよび接着分子によって凝集する食細胞の浸潤を伴う炎症反応で再灌流12~24時間後にみられる. 本研究では組織障害のなかでも特に酸化ストレスによる傷害が多くを占めるであろう早期障害について検討するために再灌流3時間後において評価した.

本研究では構成成分の酸化生成物である4-HNE修飾蛋白質および3-nitro-L-tyrosineを測定することにより酸化障害を評価した. n-6系不飽和脂肪酸の酸化障害マーカーである4-HNE修飾蛋白質の生成は虚血再灌流負荷により顕著にみられた. 一方, ONOO⁻に代表される活性窒素種による酸化障害指標である3-nitro-L-tyrosineの生成は虚血再灌流負荷により検出されなかった. 血管内皮から産生されているNOは虚血再灌流により生じた $O_2^{\cdot-}$ と反応して攻撃性の高いONOO⁻を生成すると予想された. ところが, 近年iNOSおよびeNOS欠損マウスを用いた実験では肝臓虚血再灌流後の障害は増大することが示されており³⁾, NOはむしろ肝臓保護に役立っていることが示唆されている. 本実験では過酸化脂質の蓄積は見られたもののニトロ化障害は見られなかったことから, 生じた $O_2^{\cdot-}$ はNOと反応していないのではないかと推察される.

4-HNE修飾蛋白質の生成はE-I/R群においてS-I/R群と比較して有意な減少をみた. 一方, 肝臓中の酵素であるGOTおよびGPTの逸脱はS-I/RとE-I/Rの間で差がなかった. これらより, 運動トレーニングは特に酸化ストレスから肝臓を保護する作用があることが考えられる. 本研究では抗酸化酵素であるMn-SODおよびGPxの濃度はS-C群と比較してE-C群において増大傾向が見られたものの有意な変動はみられなかった. ところが, 興味深いことにE-I/R群においてS-I/Rと比較してGPx

の有意な増大がみられた。GPxは還元型のグルタチオンの酸化に共役し、過酸化水素やその他過酸化物を還元し水酸化物を生ずる反応を触媒する酵素である。肝臓虚血再灌流に誘発される4-HNE修飾蛋白生成のトレーニングによる抑制効果はGPxの誘導が一因となる可能性がある。このことに関連して、Peraltaらはpreconditioningとして肝臓にあらかじめ軽度の虚血を行うことにより虚血再灌流障害を軽減できることを報告している¹⁰⁾。この時、本来虚血再灌流により低下する肝臓内のグルタチオンレベルがpreconditioningを施行したラットにおいて維持された。運動時には活動筋に血流が動員され、内臓組織は軽度の虚血状態になることが確認されており¹⁾、虚血preconditioningに類似した現象が起きている可能性がある。活性酸素種は過剰に生じると酸化障害を引き起こすが、一方でセカンドメッセンジャーとして様々な生理的なシグナル伝達に関与しており生体恒常性維持のために不可欠なものでもある⁵⁾。定常状態では抗酸化酵素状態に変動ないものが酸化ストレスを与えたときに誘導されるという現象のメカニズムは不明であるが、日々のトレーニングにより内臓組織に軽度の酸化ストレスが加わることが深く関与しているかもしれない。また、ヒトにおいてもトレーニングを行った群では一過性運動負荷後の血中SODレベルが増大することが報告されており⁹⁾本研究の結果を支持している。以上、本研究により運動の日常化は肝臓における酸化ストレス耐性を向上させることが示され、このことは運動の日常化が酸化ストレスに対するpreconditioningとして有用であることを示唆するものである。

総括

運動トレーニングが肝臓の酸化ストレス耐性におよぼす影響について虚血再灌流酸化ストレス負荷モデルを用いて検討した。その結果、トレーニングさせたラットでは虚血再灌流後の肝臓酸化障

害が抑制された。このことに抗酸化酵素GPxが虚血再灌流後に誘導されたことが関与していると推察された。本結果は、運動の日常化が酸化ストレスに対するpreconditioningとしての有用性を示唆するものである。

謝辞

本研究に対して、研究助成を頂いた財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝の意を表します。また、本実験に多大なるご協力を頂いた徳田春邦先生（生化学教室）、坂元直之先生（第一内科学教室）に心から謝意を表します。

文献

- 1) Andersen K.L.; The cardiovascular system in exercise, *In: Exercise Physiology, Academic press*, New York, p102 (1968)
- 2) Buege J.A., Aust S.D.; Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.*, 52, 302-310 (1987)
- 3) Hines I.N., Kawachi S., Harada H., Pavlick K.P., Hoffman J.M., Bharwani S., Wolf R.E., Grisham M.B.; Role of nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury, *Mol. Cell Biochem.*, 234-235 (1-2), 229-237 (2002)
- 4) Laughlin M.H., Simpson T., Sexton W.L., Brown O.R., Smith J.K., Korthuis R.J.; Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training, *J. Appl. Physiol.*, 68 (6), 2337-2343 (1990)
- 5) 増谷 弘, 中村 肇, 淀井淳司; シグナル伝達とレドックス制御 一総論一, 淀井淳司編, 別刷・医学のあゆみ: 生体応答学の新展開, 医歯薬出版, 東京, 184-188 (1999)
- 6) Matsui N., Satsuki I., Morita Y., Imaizumi K., Kasajima K., Kanoh R., Fukuishi N., Akagi M.; Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species activate nuclear factor kappa B during hepatic ischemia in rats, *Jpn. J. Pharmacol.*, 84 (3), 363-366 (2000)
- 7) Navarro-Arevalo A., Sanchez-del-Pino M.J.; Age and exercise-related changes in lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in liver and soleus

- muscle tissues of rats. *Mech. Ageing. Dev.* 104 (1), 91-102 (1998)
- 8) Ohishi S., Kizaki T., Nagasawa J., Izawa T., Komabayashi T., Nagata N., Suzuki K., Taniguchi N., Ohno H.; Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 24, 326-332 (1997)
- 9) 大河原知水, 木崎節子, 大石修司, 芳賀脩光, 宮崎裕美, 佐藤祐造, 中尾千登世, 大野秀樹; 運動トレーニングと酸化ストレス: トレーニング効果の個人差とスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の関係について, *小野スポーツ科学*, 7, 11-21 (1999)
- 10) Peralta C., Bulbena O., Xaus C., Prats N., Cutrin J.C., Poli G., Gelpi E., Rosello-Catafau J.; Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion, *Transplantation*, 73 (8), 1203-1211 (2002)
- 11) Pereira B., Costa Rosa L.F., Safi D.A., Medeiros M.H., Curi R., Bechara E.J.; Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats, *Physiol. Behav.*, 56 (5), 1095-1099 (1994)
- 12) Reitman S., Frankel S.; A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Pathol.*, 28, 56-63 (1957)
- 13) Somani S.M., Husain K.; Exercise training alters kinetics of antioxidant enzymes in rat tissues. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 38 (3), 587-95 (1996)
- 14) Zwacka R.M., Zhang Y., Halldorson J., Schlossberg H., Dubus L., Engelhardt J.F.; CD4+ T-lymphocytes mediate ischemia-reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver, *J Clin. Invest.*, 100, 279-289 (1997)