

【原著】

運動負荷に伴う酸化ストレスマーカー8-oxo-dG 及び 炎症関連マーカー血清 MMPs の経時的変動 ～血清・唾液・尿検体の有用性の検討～

富士泰世*¹ 中村歩美*² 白戸佑貴*³ 田中健登*³ 伊藤拓也*³ 野沢祐貴*³
井瀧千恵子*⁴ 真里谷靖*^{4,5}

(2016年12月8日受付, 2017年2月20日受理)

要旨: 本研究の目的は、酸化ストレス増大の一因となり得る運動負荷を実施し、血清、唾液、新鮮尿中の酸化ストレスマーカー8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG)及び炎症関連マーカーMatrix metalloproteinases (MMP-9, MMP-2)の経時的変動の観察・解析から生体内の酸化ストレスを鋭敏に反映する検体及び手法について検討することである。対象者は健康な男子学生7人、運動負荷として1kmあたり6分の設定で6km走を実施し、運動強度は10メッツ(metabolic equivalents)とした。各サンプルは運動1時間前、運動1時間後、運動24時間後に採取した。8-oxo-dGの分析は免疫測定法で行い、MMP-9及びMMP-2の分析はゼラチンザイモグラフィで行った。血清及び唾液中8-oxo-dGでは、3時点における有意な変動はなかった。一方、尿中8-oxo-dGは、運動1時間後に有意に増加し、運動24時間後には、運動1時間前と同等の値まで有意に減少した。MMP-9においても尿中8-oxo-dGと同様の変化が認められた。運動が惹起する生体内の酸化ストレスを鋭敏に反映するサンプルは新鮮尿であることが示唆された。

キーワード: 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン、酸化ストレス、運動負荷、尿、マトリックスメタロプロテアーゼ

I. はじめに

人間の生命維持には酸素が必要であり、エネルギー産生系で酸素が利用されている。その過程で数%の酸素は、反応性が高い活性酸素に変化する¹⁾。生理的な状態で絶えず活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)が発生する他、喫煙や激しい運動、放射線、紫外線、大気汚染物質などの要因によっても発生する。ROSは、生体内で細菌などの異物除去や殺菌、シグナル伝達物質の役割を担っており²⁾、癌治療にも応用されている。癌治療の一つである放射線療法は、DNA近傍でROSを発生させ、がん細胞を殺すものである³⁾。ROSは生体防御や抗腫瘍効果をもたらす一方、DNA、脂質、蛋白質、酵素などの生体高分子と反応し、生体に障害を与えるという二面性をもっている^{4, 5)}。生体内

にはROSを消去する抗酸化ネットワークが存在しているが⁶⁾、ROSと抗酸化ネットワークのバランスが崩れ、ROSが上回ることで酸化ストレスの上昇を引き起こし、老化や癌などの様々な疾患の発生、促進の要因となる。

ROSによる生体内の影響を反映するマーカーの一つに、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG)があり、近年注目されている。8-oxo-dGはDNAを構成する塩基の一つdeoxyguanosine(dG)の8位がヒドロキシル化された構造を持つDNA酸化ストレスマーカーであり、dGはROSによる酸化を受けやすいことが知られている。そのため、dGの主要な酸化生成物である8-oxo-dGはROSによる生体への影響を鋭敏に反映すると考えられており、血清、尿など、多様なサンプルを対象に生体内酸化ストレスを評価することができる⁷⁾。8-oxo-dGは、産生後に酵素によって細胞外へ放出され、血中へ移行する。そのため、血清や尿検体だけでなく血漿成分を元につくられ、非侵襲的に採取できる唾液を検体としても測定が可能であると考えた。しかし、唾液中8-oxo-dGの酸化ストレスマーカーとしての有用性について検討した報告は現時点では少ない。また、一般的に8-oxo-dGの測定は尿検体を材料としてELISA法を用いに行われているが、尿および血清でも測定可能な臨床検査用の測定器が開発され、簡便迅速に結果を得ることが可能となった。これまで尿や血清、唾液の成分の比較やこれらサンプルに含まれる酵素などの比較検討がなされているが、どのようなサンプルが8-oxo-dGを鋭敏に反映するかについて検討した研究は、ほとんど見られていない。サンプルの種類によるマーカーの動態の違いを把握することは、正

*1 弘前大学大学院保健学研究科博士課程
Hirosaki university graduate school of health sciences doctoral course
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-33-5111
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan

*2 弘前大学大学院保健学研究科修士課程
Hirosaki university graduate school of health sciences master's course
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-33-5111
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan

*3 弘前大学医学部保健学科
Hirosaki university school of health sciences
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-33-5111
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan

*4 弘前大学大学院保健学研究科
Hirosaki university graduate school of health sciences
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-33-5111
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan

*5 むつ総合病院
Mutsu general hospital
〒035-8601 青森県むつ市小川町 1-2-8 TEL:0175-22-4439
1-2-8, Kogawamachi, Mutsu-shi, Aomori, 035-8601, Japan

Correspondence Author h15gg606@hirosaki-u.ac.jp

確な生体内酸化ストレス評価に繋がると考える。

先行研究で白血球の DNA 損傷が運動後に有意に増加したことが報告されていることから⁸⁾、本研究では、酸化ストレス増大の一因となり得る運動負荷を実施し、血清、唾液、新鮮尿の 8-oxo-dG を経時的に観察、解析した。さらに身体影響の評価に対する有用性及び 8-oxo-dG を鋭敏に反映するマーカーの選択についても検討した。また、炎症関連マーカーである、Matrix metalloproteinases (MMPs) の検討も併せて行った。

MMPs はプロテアーゼに属し、細胞外マトリックス (Extracellular matrix: ECM) の分解が主要な機能とされる。現在では 28 種類の MMPs が確認されており、皮膚や骨形成、創傷治癒、炎症やがん組織などで、MMPs の作用と ECM の代謝・変化により起こり得る種々の現象の関連が注目されている。また、MMPs はその機能や構造により大きく 5 群に分類される。MMP-9 と MMP-2 はその中でゼラチナーゼ群に属し、基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンの分解を行うことにより、骨格筋の筋繊維を活性化させることに大きく関わっている。最近の研究で、骨格筋中の MMP-9、MMP-2 の活性が運動により変化すると報告されているが、十分な検討はなされていない。このため、運動による MMP-9、MMP-2 の活性の変化についての解析も併せて行った。

II. 方法

1. 対象

健康な男子学生 7 人とした。血清 8-oxo-dG 濃度及び血清 MMPs の対象者は男子学生 6 人であり、平均年齢は 23.2 ± 1.5 歳であった。唾液中及び尿中 8-oxo-dG 値の対象者は男子学生 7 人であり、23.0 ± 1.4 歳であった。

2. 運動負荷

1km あたり 6 分の設定で 6km 走を実施した。運動強度は 10 メッツ (metabolic equivalents) とした⁹⁾。

また、飲食による影響を抑えるため、運動負荷 5 時間前から運動負荷 1 時間後まで絶食とし、水のみ自由摂取とした。運動時は水分摂取も禁止とした。

3. サンプル採取・測定

血液、唾液、尿サンプルは、運動 1 時間前、運動 1 時間後、運動 24 時間後に採取した。

1) 血液サンプルの測定

SST 採血管を使用し、各時点で採血をした。合計 18 個のサンプルとした。血液検体は 400G × 30min で遠心、血清分離し、-80℃ で保存した。血清 8-oxo-dG 濃度は、以前に報告された手順^{10, 11, 12)}で ELISA 法にて測定した。ELISA キット (Health Biomarkers Sweden AB, Stockholm, Sweden) を用い、以前に報告された手順に則って¹³⁾、800 μl の血清を C18 固相抽出フィルター (Varian, Lake Forest, CA, USA) に

通し不純物を除去した。プレート毎に 0.01-10 ng/ml の 8-oxo-dG 標準液を用い標準曲線を作成し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で 450 nm における吸光度を測定した。得られた吸光度から検量線を作成し、血清 8-oxo-dG 濃度を算出した。各サンプル 3 つの平均値と標準偏差を求め、この平均値を測定値とした。

2) 唾液サンプルの測定

唾液サンプルを採取する際、数回の含嗽実施後にサンプルを採取することを依頼した。合計 21 個のサンプルとした。ペプシンを使用して唾液の粘性を処理した。唾液 8-oxo-dG 濃度は、血清 8-oxo-dG 濃度の測定と同様に ELISA キットを使用して ELISA 法にて測定し、その後、吸光度を測定した。得られた吸光度から検量線を作成し、唾液 8-oxo-dG 濃度を算出した。各サンプル 3 つの平均値と標準偏差を求め、この平均値を測定値とした。

3) 尿サンプルの測定

尿中 8-oxo-dG 値の測定は、尿中酸化ストレスマーカー測定システムリーダー ICR-001 (Techno Medica) によって行った。この専用測定システムでは、8-oxo-dG にはイムノクロマト法、クレアチニンには Jaffe 法が用いられている。

尿サンプルは、随時尿の中間尿を採取することを依頼し、採取後は速やかに測定を行った。合計 21 個のサンプルとした。同システムのプロトコールに従い、サンプルは超純水で 2 倍希釈し、その上で随時尿に対処するため、8-oxo-dG 値はクレアチニン値で補正をした。各サンプルの 3 回の測定値の平均と標準偏差を求め、この平均値を測定値とした。

4) MMP-9、MMP-2 の活性の測定

MMP 群の検出には、酵素活性検出法であるゼラチンゼイモグラフィ法を用いた。血液サンプルは 400G × 30min で遠心、血清分離を行い、-80℃ で保存した。凍結融解した血清は、酵素量が多く反応が大きすぎるため、サンプルバッファー (PBS) で 10 倍希釈を行った。ゼラチンを最終濃度 1mg/ml で含む均一濃度ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、蛋白質を分離した。泳動条件は、泳動装置 1 つ・ゲル 2 枚では 150V, 30A, 120 分で行った。泳動後のゲルは、洗浄後に 37℃ で 6 時間静置して、インキュベーションを行った。反応終了後にゲルを染色し、その後、脱色を行った。ゲルはスキャナでバンドを検出し、バンドの濃度はフリーソフトの ImageJ を用いて定量した。各対象者それぞれ、運動 1 時間前の酵素濃度を基準 (100%) とした。運動 1 時間前の酵素濃度と運動 1 時間後、運動 24 時間後の酵素濃度との比を算出し、これをゼラチンゼイモグラフィにおける MMP 濃度とした。以下に作成したゼラチンゼイモグラフィの 1 例を示す (図 1)。

4. 統計解析

分析には、統計ソフト IBM SPSS Statistics 22 を用いた。各サンプルの運動 1 時間前、運動 1 時間後、運動 24 時間後の 3 時点の比較は repeated measure ANOVA 及び Tukey-HSD

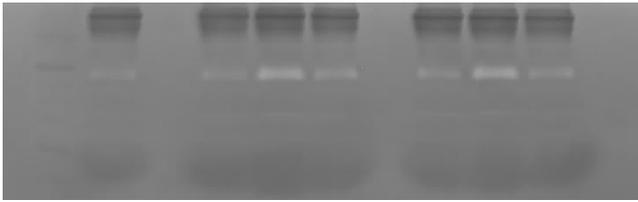


図 1 ゼラチンザイモグラフィーの 1 例
MMP-9(上)及び MMP-2(下)のバンドが各レーンにみられる。
左端のレーンはマーカーである。

検定を行った。さらに、尿中 8-oxo-dG と炎症関連マーカー MMP-9 の変化量の相関をみるため、相関分析を行った。MMP-9 の活性の変化量は、ImageJ で定量した値から算出した。いずれも有意水準は 5%未満とした。

5. 倫理的配慮

本研究は、弘前大学大学院保健学研究科倫理委員会の承認のもとに実施された(2014-001)。全ての対象者からインフォームドコンセントにより同意が得られた後、検体採取時及び運動負荷前に対象者の体調を確認した。

III. 結果

1. 対象者背景

喫煙習慣のある学生はいなかった。また、運動習慣のある学生は 1 名であった。表 1 に対象者の背景を示す。

表 1 対象者背景 (n=7)

対象	年齢	BMI	喫煙	運動習慣	測定サンプル
#1	25	34.3	なし	なし	血液・唾液・尿
#2	22	23.2	なし	なし	血液・唾液・尿
#3	23	19.4	なし	有り	血液・唾液・尿
#4	21	22.7	なし	なし	血液・唾液・尿
#5	24	23.4	なし	なし	血液・唾液・尿
#6	24	22.0	なし	なし	血液・唾液・尿
#7	22	24.1	なし	なし	唾液・尿

2. 血清 8-oxo-dG 値

図 2 に各測定ポイントにおける血清 8-oxo-dG 値の経時的変動を示す。血清 8-oxo-dG 値は、運動 1 時間前 0.38±0.13 ng/ml、運動 1 時間後 0.35±0.10 ng/ml、運動 24 時間後 0.35±0.16 ng/ml であった。3 時点における、血清 8-oxo-dG 値

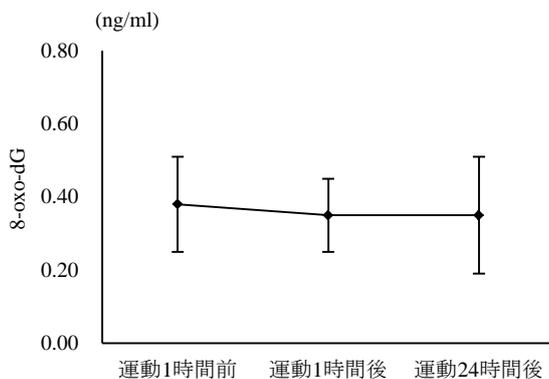


図 2 血清 8-oxo-dG の経時的変化

の有意な変動はなかった。図 3 に対象者別のグラフを示す。

3. 唾液中 8-oxo-dG 値

図 4 に各測定ポイントにおける唾液中 8-oxo-dG 値の経時的変動を示す。唾液中 8-oxo-dG 値は、運動 1 時間前 0.39±0.30 ng/ml、運動 1 時間後 0.47±0.30 ng/ml、運動 24 時間後 0.49±0.31 ng/ml であった。3 時点における、唾液中 8-oxo-dG 値の有意な変動はなかった。図 5 に対象者別のグラフを示す。

4. 尿中 8-oxo-dG / CRE 値

図 6 に各測定ポイントにおける尿中 8-oxo-dG / CRE 値の経時的変動を示す。尿中 8-oxo-dG / CRE 値は、運動 1 時間前 17.9±4.1 ng/mgCRE、運動 1 時間後 43.0±14.1ng/mgCRE、運動 24 時間後 22.1±13.8 ng/mgCRE であった。運動 1 時間前に比べ運動 1 時間後に尿中 8-oxo-dG / CRE 値が有意に上昇していた($p<0.01$)。また、運動 1 時間後に比べ運動 24 時間後には尿中 8-oxo-dG / CRE 値が有意に減少していた($p<0.01$)。運動 1 時間前と運動 24 時間後では、有意な変動はなかった。図 7 に対象者別のグラフを示す。

5. MMP-9 及び MMP-2 の活性

1) MMP-9 の活性

図 8 に各測定ポイントにおける血清 MMP-9 の経時的変動を示す。データは運動 1 時間前を 100%とした。その結果、運動 1 時間後 338.2%±115.1%、運動 24 時間後 121.8%±28.7%であった。MMP-9 の 3 時点の比較において、MMP-9 の活性は、運動 1 時間前に比べ運動 1 時間後に有意に上昇していた($p<0.01$)。また、運動 1 時間後に比べ運動 24 時間後には有意に減少していた($p<0.01$)。運動 1 時間前と運動 24 時間後において、有意な変動はなかった。図 9 に対象者別のグラフを示す。

2) MMP-2 の活性

図 10 に各測定ポイントにおける血清 MMP-2 の経時的変動を示す。MMP-2 においても運動 1 時間前を 100%とした。運動 1 時間後 111.3%±8.2%、運動 24 時間後は 105.1%±8.5%であった。3 時点の比較において、MMP-2 の活性は運動 1 時間前に比べ運動 1 時間後に有意に上昇していた($p<0.01$)。しかし、運動 1 時間後と運動 24 時間後及び運動

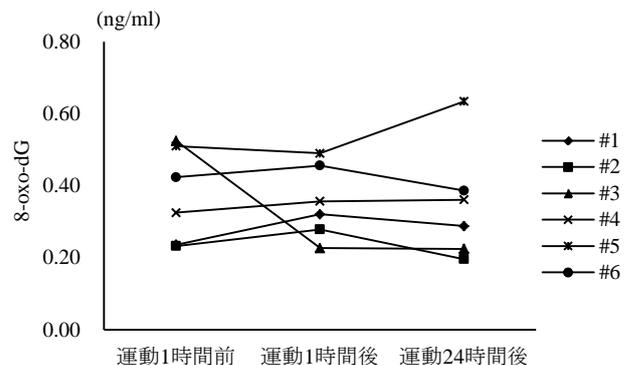


図 3 血清 8-oxo-dG の経時的変化(対象者別)

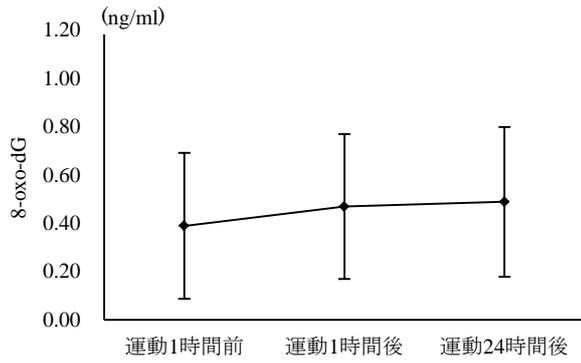


図 4 唾液中 8-oxo-dG の経時的変化

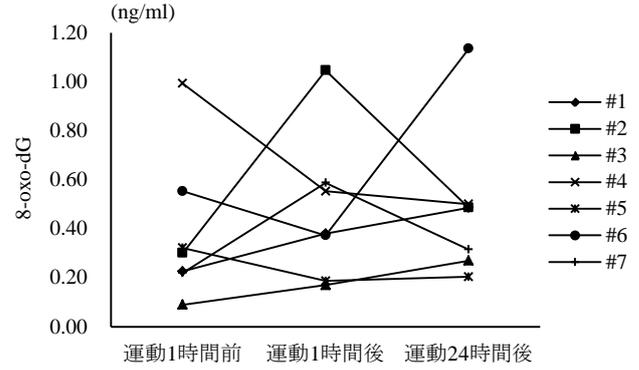


図 5 唾液中 8-oxo-dG の経時的変化(対象者別)

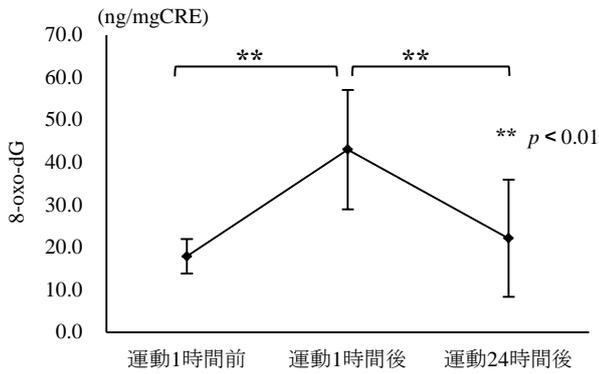


図 6 尿中 8-oxo-dG の経時的変化

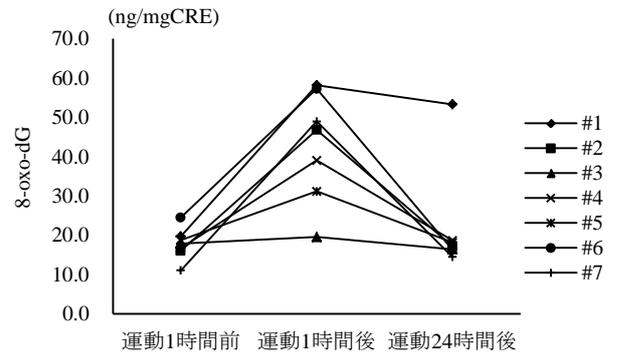


図 7 尿中 8-oxo-dG の経時的変化(対象者別)

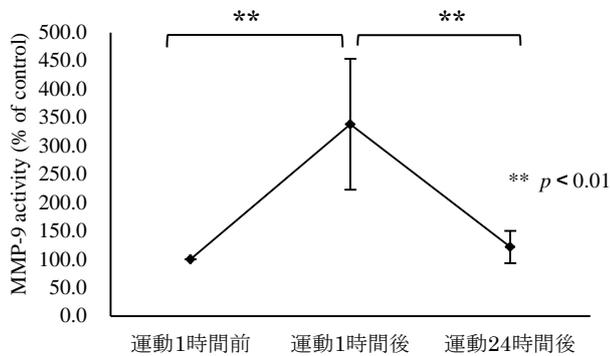


図 8 MMP-9 の経時的変化

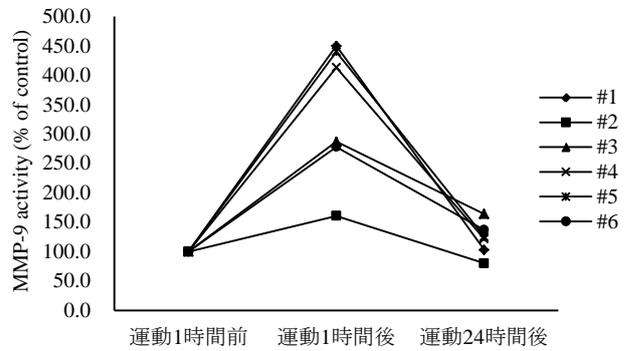


図 9 MMP-9 の経時的変化(対象者別)

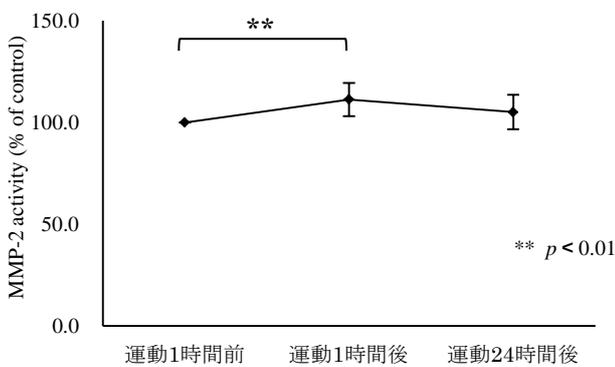


図 10 MMP-2 の経時的変化

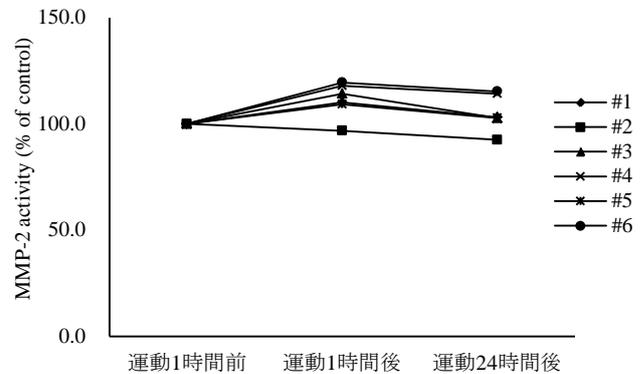


図 11 MMP-2 の経時的変化(対象者別)

1時間前と運動24時間後において、有意な変動はなかった。図11に対象者別のグラフを示す。

6. 尿中 8-oxo-dG と MMP-9 の相関

尿中 8-oxo-dG と MMP-9 の運動前から運動1時間後の変化量の相関は、相関係数 $r=0.20$ であり、有意の相関はみられなかった。また、運動1時間後から24時間後の変化量は相関係数 $r=-0.198$ であり、有意の相関はみられなかった。

IV. 考察

健康な男子学生を対象に6km走の運動負荷を加え、運動前後及び運動24時間後に血清、唾液、尿を採取し、各サンプル中の 8-oxo-dG 値の経時的変動を観察した。また、炎症関連マーカーとして、MMP-9 及び MMP-2 の変動を観察した。

1. 血清サンプル

血清 8-oxo-dG 値は、運動1時間前、運動1時間後、運動24時間後で明らかな経時的変化は認められなかった。対象者別で血清 8-oxo-dG 値の経時的変化をみると、ほとんどの対象者は運動前後で変化が認められず、一部の対象者は、運動24時間後に血清 8-oxo-dG 濃度が上昇、又は運動直後に減少しており、個人間のばらつきが目立った。8-oxo-dG は年齢、運動習慣、代謝機能、喫煙、肥満、ストレスや生活習慣などによって個人差が生じるとされるが、今回の結果は、これらを反映していた可能性がある。Mats ら¹⁰⁾は、最大心拍数 80% の高強度の運動負荷を 20 分間実施し、その結果、血清 8-oxo-dG レベルが有意に上昇したことを報告している。しかし、本研究で同様の変化が認められたのは、6例中4例(#1, #2, #4, #6)であった。残り2例のうち1例に関しては、8-oxo-dG の産生増大、代謝機能低下などの可能性があるが、運動直後に大きな低下をみた1例にはこの考えが適合せず、解釈が難しい。本研究で実施した運動負荷において、対象者の中には途中歩いてしまった学生もいた。そのため、十分な運動負荷ではなかった可能性がある。血清 8-oxo-dG 値による酸化ストレスを評価する場合、高強度の運動負荷を十分かつ出来るだけ均等に行うことが必要と考えられた。

2. 唾液サンプル

唾液中 8-oxo-dG 値も、血清と同様に運動1時間前、運動1時間後、運動24時間後の3時点における明らかな経時的変化は認められなかった。しかし、血清に比べ唾液中 8-oxo-dG 値は高値を示した。

唾液は主に腺房細胞で産生される。一部の唾液成分は、副交感神経終末から分泌されるアセチルコリンが唾液腺細胞の基底側膜のムスカリン性受容体に結合することで、血漿中の水が唾液として分泌される^{14, 15)}。人体は交感神経と副交感神経の二重支配を受けているが、採血が実施された1時間後では、交感神経支配が次第に減弱し副交感神経優位となり、その影響により、血漿成分を元に作られる唾液

中では血清中の 8-oxo-dG 値が濃縮されている可能性が考えられる。このことは、酸化ストレスマーカーとして唾液は、血清に比べて酸化ストレスをより反映している可能性を示す。血清の経時的変化とは異なり、運動1時間後及び24時間後にも唾液中 8-oxo-dG 値が上昇する傾向が認められた。

中島らは、Hartmann らが行った、非鍛錬者を対象にした疲労困憊までの運動の実施による DNA 損傷の変化について、DNA 損傷がピークに達するには、一過性の運動後かなりの時間が必要と考えている。また、一過性の運動負荷後にみられる酸化ストレスの程度とその回復に要する時間は、運動負荷の強度と深く関わっていることが示唆された事を報告している¹⁶⁾。今回実施した6km走では、DNA 損傷がピークになるまでに時間を要し、24時間後の唾液中 8-oxo-dG 値上昇に関連した可能性はある。対象者別で見た場合、血清と同様に個人間のばらつきが目立った。

一部の対象者には、運動後に唾液中 8-oxo-dG 値が上昇し、24時間後には唾液中 8-oxo-dG 値が減少する傾向が認められた。これは、酸素消費量の増加に伴い、活性酸素の生成が促進され、DNA の酸化的損傷が促進されたこと、及び生体内に備わる抗酸化システムによる修復の影響であると考えられる。また、全体の結果と同様、運動1時間後より運動24時間後に唾液中 8-oxo-dG 値が上昇する傾向が認められた。これは、前述のように DNA 損傷がピークになるまでに時間がかかった可能性があり、また、修復レベルの個人差により、回復が間に合わず、減少しなかった可能性もあると考えられる。

一方、運動1時間前に比べて運動1時間後に唾液中 8-oxo-dG 値が減少した理由として、運動誘発性発汗による汗への排泄の可能性がある。唾液は耳下腺・顎下腺・舌下腺と多数の小唾液腺から漿液と粘液が分泌され、交感神経と副交感神経の二重支配を受けており、副交感神経が優位に働くと、水やイオンが多い唾液が分泌される¹⁴⁾。汗も唾液同様、血漿を元に作られているため、運動中の汗に 8-oxo-dG が排泄されたことで血中 8-oxo-dG 値が減少し、その血液から唾液中 8-oxo-dG 値が作られた可能性があると考えられる。さらに、発汗量に水分摂取量の違いが影響を与えた可能性もある。運動時の水分摂取と発汗に関する先行研究では、運動時に水分を摂取した群は非摂取群に比較し、発汗量が多かったことを報告している¹⁷⁾。今回、運動時の水分摂取は禁止としたため、運動時の水分摂取による発汗量への影響は少ないと考えられる。しかしながら、運動負荷前の水分摂取は自由であったため、少なからず発汗量に影響を与えた可能性が考えられる。運動後の水分摂取については、水分を多く摂取した対象者は、体液量が増加し、尿量の増加に繋がった可能性がある。そのため、運動1時間後の唾液採取までに尿排泄量が多かった対象者は、尿中に 8-oxo-dG が排泄されたことも考えられる。

田中らは、唾液分泌量、粘度、組成などの変動や個人差が大きく、唾液採取前のうがいによっても唾液を希釈して濃度変化が生じる点、それらを補正する成分が確立されていない点に留意する必要があると述べている¹⁸⁾。これらの留意点に加え、発汗による唾液中 8-oxo-dG 値の排泄の可能性を踏まえると、酸化ストレス増大の一因となり得る運動負荷の身体影響評価における唾液検体の利用に関しては、未だ検討すべき因子が多いといえる。

3. 尿サンプル

尿中 8-oxo-dG / CRE 値は運動 1 時間前に比べ運動 1 時間後で有意に上昇し、運動 24 時間後には運動 1 時間前と同程度まで有意に減少していた。尿中 8-oxo-dG 値は運動負荷により増加することが知られており^{16, 19, 20, 21, 22)}、今回の結果は、先行研究と同様の結果であった。この変動は、唾液中 8-oxo-dG 値で述べたように、運動による酸化ストレスの上昇と考える。また、運動 24 時間後に尿中 8-oxo-dG / CRE 値が減少したことも、前述の通り、生体内に備わる抗酸化システムによる修復の影響と考える。

対象者別で見た場合、対象者の中には運動前後の尿中 8-oxo-dG / CRE 値の変動がほとんど認められない人や運動 1 時間後から運動 24 時間後の変動が小さい人がいた。しかし、血清や唾液サンプルで認められたような、運動負荷後の 8-oxo-dG の低下は尿サンプルで認められなかった。尿中 8-oxo-dG 排泄量は男性では年齢による差がないとされていることから^{16, 23)}、個人差が生じた要因として運動習慣や食生活、運動による消費カロリー、抗酸化システムによる修復レベルの低下などが関係していると考えられ、今回の結果はこれらに矛盾しないものであった。今回、尿中 8-oxo-dG 値を測定するにあたり、新鮮尿を採取後、速やかに測定を行った。運動前後で有意な変動が見られた理由としては、測定した尿検体は凍結保存していないため、検体の保存状態が与える測定結果への影響が少なかったこと、値の安定性が得られたことが考えられる。また、8-oxo-dG は修復酵素系異物として切り出され、代謝されずに血液を経て尿に排泄される^{2,16)}ことも、安定性の要因の一つと考えられる。以上のことから、新鮮尿は血清及び唾液に比較し、酸化ストレスの程度を鋭敏に反映することが示唆された。

4. MMP-9 及び MMP-2

MMP-9 の経時的変化について、運動前と運動 1 時間後の間で MMP-9 の活性は有意な増加を示した。これは、運動負荷により血液中の好中球が増加、活性化され、それに伴い MMP-9 の活性も増大した可能性があると考えられる^{24, 25)}。運動 24 時間後には、ほぼ運動前のレベルまで回復し、その増加は一過性であった。MMP-9 は一過性の運動負荷による生体内の現象を反映することが確認された。しかし本実験では、血液中の好中球数やその機能の変化を確認していない。MMP-9 増加の機序については今後の検討課題とし

たい。

MMP-2 の経時的変動については、MMP-9 と比較するとやや目立たなかったものの、運動前後の活性の変動については、同様の結果が得られた。MMP-2 の発現は、主に由来する線維芽細胞が運動刺激により活性化されたためと考えられるが、これについては増加をみないとする報告もあり²⁶⁾、今後さらに詳しい検討が必要と考えられた。

5. 運動習慣と 8-oxo-dG の関係

運動習慣のある学生 1 名は、その他の学生よりも、尿中 8-oxo-dG の変動が小さかった。適度な運動や日常的にトレーニングをしている者は、抗酸化能力の働きが高くなるということが明らかにされつつある。また、異なる強度の持久的運動における生理的応答と酸化ストレス度及び抗酸化力との関係を調べた研究では、運動強度の増加に伴い、抗酸化力が高まり酸化ストレス度の増加を軽減していることが示唆されている²⁷⁾。したがって、運動習慣のある学生は、抗酸化能力が高かったため、8-oxo-dG の増加が軽減され、また修復能も強かったため、変動が小さかったと考えられる。

6. 尿中 8-oxo-dG と MMP-9 の関係

尿中 8-oxo-dG と MMP-9 では何れも運動負荷後に有意な増加を示し、24 時間後には有意な減少を示したが、運動負荷前後の変化量に対して行った Spearman の順位相関分析、及び運動 1 時間後から 24 時間後の変化量に対して行った Pearson の相関分析では、有意の相関はなかった。相関が示されなかったことは、対象者数が少なかったことが要因としてあげられる。しかしながら、よく合致した経時的変化を示したことから、好中球由来の酵素である MMP-9 の活性の変化は、同様に好中球から発生する活性酸素などにより誘発される酸化ストレスと関連する可能性が高いと考えられた。

7. 本研究の限界と課題

本研究では血清、唾液、尿サンプルを用いて、運動負荷に伴う酸化ストレスマーカー、8-oxo-dG の経時的変動及び MMP の変動を観察し、身体的影響の評価に有用なサンプルの検討を行った。6km 走の運動負荷を加えた際、最後まで走りきった学生も居れば、途中で歩いてしまった学生も居り、また 1km あたり 6 分のペースから遅れ、6 分半～7 分のペースになった学生もいた。運動負荷におけるばらつきがみられたことは本研究における限界と言え、運動負荷の内容については今後検討する必要がある。また対象者数も十分とは言えず、より多くの対象を用いての研究を検討すべきであろう。

一方、放射線被ばくによって実験動物の生体内 ROS 産生が過剰となり、それに伴う酸化ストレスの増大がみられることが報告されている²⁸⁾。8-oxo-dG を指標とした酸化的損傷量評価やリアルタイム PCR 法を用いた DNA 損傷の定量化などが試みられていることから²⁹⁾、今後は放射線治療

患者など臨床例における 8-oxo-dG の変動についても検討していきたい。

V. おわりに

複数の手法による酸化ストレスマーカー8-oxo-dG の測定を行った結果, 新鮮尿サンプルを用いて測定し, CRE 補正を加えた尿中 8-oxo-dG の経時的変動が炎症関連マーカー血清 MMP-9 の変動とよく合致していた。運動に伴う身体的影響の評価におけるサンプルとして, 新鮮尿の有用性が示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり, ご協力いただきました本学医学部保健学科学生の皆さんに深く感謝いたします。

利益相反

本論文について他者との利益相反はありません。

引用文献

- 1) 馬島秀行: 酸化ストレス及び放射線障害における細胞内ミトコンドリアの役割. 鹿児島大学歯学部紀要, 22: 15-23, 2002.
- 2) 江口裕伸, 藤原範子, 他: 酸化ストレスと健康. 生物試料分析, 32(4): 247-256, 2009.
- 3) 西川学, 井上正康: 酸化ストレスと癌治療. 医学のあゆみ, 214(11): 953-956, 2005.
- 4) 片山善章: 酸化ストレス. 生物試料分析, 32(4): 245-246, 2009.
- 5) 吉川敏一: フリーラジカルの科学. pp3-42, 講談社, 東京, 1997.
- 6) Yuji N, Masaichi-Chang-il L, et al: Oxidative Stress Markers. *Anti-Aging Medicine*, 7 (5): 36-44, 2010.
- 7) 酒井一雄, 越智大倫, 他: 酸化ストレスマーカー8-OHdG. 生物試料分析, 32(4): 297-300, 2009.
- 8) Hartmann A, Nieß AM, et al: Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutat Res*, 346: 195-202, 1995.
- 9) 改訂版『身体活動のメッツ(METs)表』
http://www0.nih.go.jp/eiken/programs/program_kenko.html (2016-11-21)
- 10) Harms-Ringdahl M, Jenssen D, et al: Tomato juice intake suppressed serum concentration of 8-oxodG after extensive physical activity. *Nutr J*, 11: 29, 2012.
- 11) Haghdoost S, Czene S, et al: Extracellular 8-oxo-dG as a sensitive parameter for oxidative stress in vivo and in vitro. *Free Radic Biol Med*, 39(2): 153-162, 2005.
- 12) Haghdoost S, Sjölander L, et al: The nucleotide pool is a significant target for oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 41: 620-626, 2006.
- 13) Haghdoost S, Svoboda P, et al: Can 8-oxo-dG be used as a predictor for individual radiosensitivity?. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 50(2): 405-410, 2001.
- 14) 杉谷博士: 唾液分泌のメカニズム. 日本口腔外科学会雑誌, 57(4): 182-186, 2011.
- 15) 三橋百合子, 植田伸夫: 唾液の成分(血清との比較). 帝京短期大学紀要, 17: 115-120, 2012.
- 16) 中島早苗, 韓 一榮, 他: 一過性意の運動負荷による尿中8-OHdG 排泄量の変動. 東京慈恵会医科大学雑誌, 120(4): 153-159, 2005.
- 17) 丹羽健市, 中井誠一, 他: 運動時の環境温度と飲水量・発汗量及び体温に関する実態調査. 体力科学, 45:151-158, 1996.
- 18) 田中喜秀, 脇田慎一: ストレスと疲労のバイオマーカー. 日本薬理学雑誌, 137(4): 185-188, 2011.
- 19) 小河原はつ江, 櫻井仁美, 他: 運動負荷による尿中8-ヒドロキシ2'-デオキシグアノシン(8-OHdG)値の変動. *Kitakanto Med J*, 52: 351-356, 2002.
- 20) 神林勲, 石村宣人, 他: 短時間の高強度間欠的運動は尿中8-OHdG 含有量を増加させる. 日本運動生理学雑誌, 11(2): 61-67, 2004.
- 21) Okamura K, Doi T, et al: Effect of Repeated Exercise on Urinary 8-Hydroxy-deoxyguanosine Excretion in Humans. *Free Radic Res*, 26(6): 507-514, 1997.
- 22) Inoue T, Mu Z, et al: Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn J Cancer Res*, 84(7): 720-5, 1993.
- 23) Nakano M, Kanishi Y, et al: Oxidative DNA damage (8-hydroxydeoxyguanosine) and body iron status: a study on 2507 healthy people. *Free Radic Biol Med*, 35(7): 826-832, 2003.
- 24) 松本徳子, 森谷梨: 総説・身体運動と免疫機能との関連. 北海道大学教育学部紀要, 第75号: 149-158, 1998.
- 25) 五之治行雄: ヒト線維肉腫(HT 1080)細胞由来 matrix metalloproteinase 9(92KDa ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ)の性質と活性化機構. 金沢大学十全医学会雑誌, 100(5): 933-947, 1991.
- 26) Rullman E, Norrbom J, et al: Endurance exercise activates matrix metalloproteinases in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 106(3): 804-12, 2009.
- 27) 谷口耕輔, 杉田正明: 異なる強度の持久的運動における生理的応答と酸化ストレス及び抗酸化力との関係. トレーニング科学, 26(3): 155-168, 2015.
- 28) 金子崇, 後藤準, 他: 放射線照射後のラットにおける酸化ストレス値の経時的変化. 山形大学紀要(自然科学), 17(2): 31-39, 2011.
- 29) 清水喜久雄, 中嶋隆登, 他: リアルタイム PCR 法を用いた DNA 損傷の定量化とその放射線量評価表への応用. 日本放射線安全管理学会誌, 15(1): 52-58, 2016.

【Original article】

**Serial changes of oxidative stress marker
8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and inflammation-related markers
matrix metalloproteinases induced by exercise load
~A usability study on serum, saliva and urine samples~**

YASUYO FUKUSHI^{*1} AYUMI NAKAMURA^{*2} YUKI SHIROTO^{*3} KENTO
TANAKA^{*3} TAKUYA ITO^{*3} YUKI NOZAWA^{*3} CHIEKO ITAKI^{*4}
YASUSHI MARIYA^{*4,5}

(Received December 8, 2016 ; Accepted February 20, 2017)

Abstract : The purpose of this study was to analyze serial changes of an oxidative stress marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) employing serum, saliva and urine and serum matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) related to inflammation, which were induced by exercise load, and to determine appropriate samples and tools reflecting oxidative stress in vivo based on the results. Seven healthy male volunteers ran 6 km at a rate of pace with 1 km in six minutes, of which the exercise intensity was corresponded to 10 metabolic equivalents. All samples were collected at 1 hour before, 1 hour after and 24 hours after the exercise and analyzed by immunoassay for 8-oxo-dG or gelatin zymography for MMP-2 and -9. No significant changes in the values of serum and salivary 8-oxo-dG were observed at the three points. However, the value of urinary 8-oxo-dG significantly increased 1 hour after exercise, and then significantly decreased 24 hours after exercise to the same level 1 hour before exercise. The level of MMP-9 activity showed the similar serial change with that for urinary 8-oxo-dG. It appeared that exercise-induced oxidative stress in vivo could be detected by urinary 8-oxo-dG.

Keywords: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), oxidative stress, exercise load, urine, matrix metalloproteinase