



血流制限下の下肢閉鎖的運動連鎖が全身の酸化還元反応に与える影響

大川康隆 (東海大学体育学部武道学科) 宮崎誠司 (東海大学体育学部武道学科)

丹治史弥 (東海大学体育学部競技スポーツ学科) 永縄太一 (東海大学大学院体育学研究科)

The effects of lower body training with vascular occlusion on the oxidation-reduction reaction in vivo.

Yasutaka OHKAWA, Seiji MIYAZAKI, Fumiya TANJI and Taichi NAGANAWA



Abstract

The purpose of this study was to examine the effects of lower body training with vascular occlusion on the oxidation-reduction reaction in vivo. The biomarkers such as diacron-reactive oxygen metabolites (d-ROMS) and biological antioxidant potential (BAP) was measured and oxidation stress index (OSI) was calculated by the following formula: $OSI = 8.85 \times (d-ROMS / BAP)$. The results suggest that vascular occlusion itself does not affect d-ROMS, BAP and OSI.

(Tokai J. Sports Med. Sci. No. 35, 53-60, 2023)

I. 緒言

筋力トレーニングの目的として、運動能力向上、筋肥大があげられている。筋肉の中でも、横紋筋の大部分は骨に付着し関節を動かす骨格筋である¹⁾。骨格筋は、身体動作を司る運動器としての役割のみならず、代謝臓器としても重要な役割を果たしている。また、骨格筋力はヒトの健康にとって重要であり、筋力と筋サイズは運動能力の主要な要素であることがわかっている²⁾。骨格筋組織の肥大は、筋線維の肥大と数の増加により起こる。筋線維、すなわち筋細胞は生後その数を増加させることなく成長する¹⁾。筋線維そのものの数の増加ではなく、その細胞内基質の量 (volume) としての増加により成長してゆく¹⁾。この結果、

発達に伴って筋の厚みが増し、筋力は増強されると考えられている¹⁾。最近では、mammalian target of rapamycin (mTOR) を活性化する様々な因子によりタンパク合成が活性化することで筋肥大を起こすという説が中心となっている^{3,4)}。mTOR 経路を促進するための代表的なトリガーとして、筋線維の緊張、ホルモン・サイトカインなど内分泌因子、筋損傷から修復作用があげられている。筋線維の緊張を起こすには、力学的刺激が必要のため高負荷のトレーニングを行う必要がある。しかし、身体状況によっては必ずしも高負荷のトレーニングができない場合がある。高負荷のトレーニングができない状況でも筋肥大、すなわち筋線維増大を目的に、低負荷強度での筋肥大を目的とした血流制限トレーニングが行われている。血流制限トレーニングの過去の報告では、

30-50%1RM 肘関節屈曲運動を血流制限トレーニングにて行ったところ、上腕二頭筋の筋断面積と筋力が平均で20%増加し、高強度（80%1RM）のトレーニングと同等の効果が示されている⁵⁾。10-20%1RM の下肢の膝伸展運動を血流制限トレーニングで行った研究では、20%1RM の負荷強度でも筋断面積の増加と筋力増強が起こるという報告もされている⁶⁾。血流制限トレーニング後の内分泌性変化やサイトカインなどの液性因子の変化をみた報告では、低強度（20%1RM）の血流制限トレーニングでは、その直後に血中の成長ホルモン値が著しく上昇すること、運動後数時間のオーダーで血中インターロイキン6（IL-6）の増加が起こるとされている¹⁰⁾。しかしながら、血流制限のみでは筋たんぱく増加・筋線維肥大が起こるとは言い難く、血流制限下でのトレーニングにおいては、低負荷の機械的刺激と共に内分泌性や液性の反応が相互に起こってからそのような反応が起こっている可能性が推察される。血流制限トレーニングにおける生体の反応は成長ホルモン（GH）やインターロイキン6（IL-6）のようなサイトカインの上昇が報告されるにとどまり、これらがなぜ上昇するのかについての研究はみられず、結果として内分泌作用、炎症性サイトカインの上昇による、筋たんぱく合成増が起こることしかわかっていない。これらの内分泌性や筋修復に伴う炎症反応は二次的の反応であると考えられるが、血流制限トレーニングにおける局所の反応を見ているわけではない。

一般的な血流制限による生体反応として、肝虚血再灌流障害において、再灌流時に好中球が活性化し、活性化好中球から活性酸素が生産されると報告がある⁷⁾。また、虚血や低酸素により還元状態になったところへ血流再開などにより酸素が導入される時に多量の活性酸素が発生すると報告されている⁸⁾。この様に、活性酸素の生成源として、生体では虚血-再灌流の際に起こる⁹⁾ことから、四肢の血流制限トレーニングにおいても局所または全身性に活性酸素が発生していると考えられる。

また、運動時には酸化ストレスが上昇し、それ

に合わせるかのように還元（抗酸化）反応が上昇するという報告がある。さらに、生体の酸化ストレス並びに抗酸化（還元）反応の測定は、2000年にCarratelliらが開発したdROMsテスト（Diacron社 Reactive Oxygen Metabolite：活性酸素代謝物テスト）を皮切りに測定ができるようになったが、活性酸素・フリーラジカルは、短い寿命と高い反応性のために、直接の測定は難しく、血液中の酸化レベル及び抗酸化力の測定は非常に困難であった。しかし、今では酸化マーカーであるd-ROMsテスト、抗酸化マーカーであるBAPテストが1項目約5分で可能になった。このように測定が可能になったものの、活性酸素が増加しうる血流制限下における運動時の酸化還元反応の推移を検討した研究は散見されない。

そこで本研究では、血流制限トレーニングが生体の酸化還元反応に与える影響について検討した。

Ⅱ．方法

1．対象

対象は健康状態に異常の認められない男性10名（年齢：21±1歳、身長：171.4±4.5cm、体重80.2±10.8kg）である。被験者の中に喫煙習慣や、薬やサプリメントを服用している人はいなかった。被験者には、測定前日の飲酒、激しい運動や飲酒は控えるように指示をした。なお測定当日は、全員朝食を摂ったのち、午前10時から測定を行った。測定中は水分（水）の摂取のみ可とした。服装については、膝より丈の短いズボンを着用し、実施した。

また本研究は、東海大学「人を対象とする研究」に関する倫理委員会の承認を受け実施した。（承認番号：22175）

2．方法

1）試技

20%1RM という比較的低負荷強度の下肢閉鎖的運動連鎖（スクワットトレーニング）を血流制

限あり、血流制限なしの双方の条件で20回5セット行った。セット間のrestは30秒に設定した。

2) プロトコール

酸化度 (d-ROMs テスト)、抗酸化力 (BAP テスト) の測定を、安静時、0 分、15 分、30 分、60 分、120 分、180 分に測定した。血流制限あり、血流制限なしの双方に同じ条件下で実施した。検体は被験者の指尖から毛細管血を採取し、その後、遠心分離機に2分間かけ、血液から血球成分を取り除いた血漿のみを使用し測定を行った。

3) 血流制限の方法

日本加圧協会公認の加圧マスタープロ (加圧ジャパン株式会社) を使用し、大腿部の基部左右二箇所に空圧式加圧ベルトを装着し、320mmHg の圧を加えた。(図1) 血流制限なしでの加圧は0 mmhg とした。



図1 血流制限ベルト装着時
Fig. 1 Placing vascular occlusion bands

4) 分析項目

(1) 酸化度の測定 (Diacron-Reactive Oxygen Metabolites : 以下 d-ROMs)

D-ROMs の測定は4.8PH の酢酸緩衝液にサンプルを混合し、鉄イオンの存在下で過酸化物をラジカルに戻し、そのラジカルと反応する呈色液 (N, N-ジエチルパラフェニレンジアミン) を混合し、その濃度をフリーラジカル解析装置 (REDOXLIBRA : WISMERLL 社製) で測定した。

(2) 抗酸化力の測定 (Biological Antioxidant Potential : 以下 BAP)

BAP の測定は三価鉄塩 FeCl_3 と無色のチオシアン酸塩を反応させ三価鉄 Fe^{3+} イオンとして赤く呈色をさせる。そこにサンプルを添加し、サンプル中の抗酸化物質の作用で二価鉄 Fe^{2+} イオンに還元され赤色が脱色する。その色の変化をフリーラジカル解析装置で計測し、還元力を抗酸化力として評価した。

(3) 酸化ストレス指数の測定 (Oxidative Stress Index : 以下 OSI)

d-ROMs テストによる酸化ストレス値と BAP テストによる抗酸化力値の測定を実施し、両者のバランス比である相対的酸化ストレス度を「 $\text{OSI} = \text{d-ROMs} \div \text{BAP} \times \text{補正係数}$ 」で求めた。補正係数 (8.85) は絶対的健常人の OSI の平均値が1.00 になるように設定した¹¹⁾。本研究では $\text{OSI} = 8.85 \times (\text{d-ROMs}/\text{BAP})$ で算出した。

5) 測定方法

フリーラジカル解析装置 (REDOXLIBRA : WISMERLL 社製) を使用し測定値を参照した。

6) 分析方法

得られたデータの分析は、SPSS 統計分析ソフト (SPSS Statistics 28) を使い、二元配置分散分析を行った。

Ⅲ. 結果

1) 酸化度 (d-ROMs)

酸化度 (d-ROMs) において、血流制限と時間の要因間で有意な交互作用は認められなかった。また、血流制限あり群と血流制限なし群を比較したところ、群間の要因には有意な主効果が認められた。また運動前 (安静時)、運動直後 (0分)、運動15分後、運動30分後、運動60分後、運動120分後、運動180分後を比較したところ、時間による群の要因には有意な主効果は認められなかった。

有意差のあった群間の要因に対して多重比較を行ったところ運動直後 (0分) のみ有意差を認めた (図2)。

2) 抗酸化力 (BAP)

抗酸化力 (BAP) において、血流制限と時間の要因間で有意な交互作用は認められなかった。また、血流制限あり群と血流制限なし群を比較したところ、群間の要因には有意な主効果が認められなかった。また運動前 (安静時)、運動直後 (0分)、運動15分後、運動30分後、運動60分後、運動120分後、運動180分後を比較したところ、時間による群の要因に有意な主効果が認められた。

有意差のあった血流制限ありなしの時間の要因に対して多重比較を行ったところ、血流制限ありなしの両群とも運動前後に有意差を認めなかったが、両群ともに運動直後 (0分) と運動15分後、運動30分後、運動60分後、運動120分後、運動180分後との間に有意差を認めた (図3)。

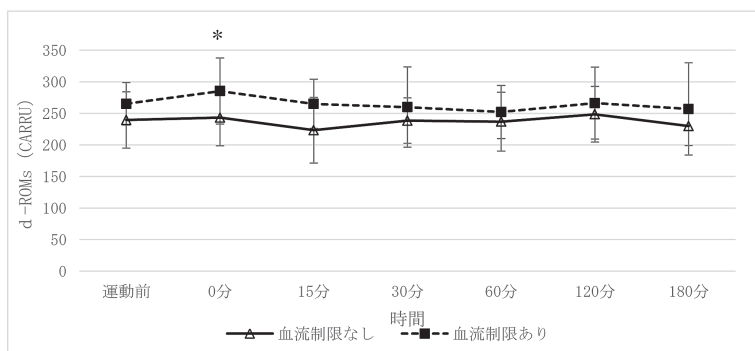


図2 血流制限下および血流制限なしでの運動における酸化度 (d-ROMs) の経時的変化
* $P < 0.05$ 血流制限あり vs 血流制限なし

Fig. 2 Chronological change in d-ROMs with and without vascular occlusion

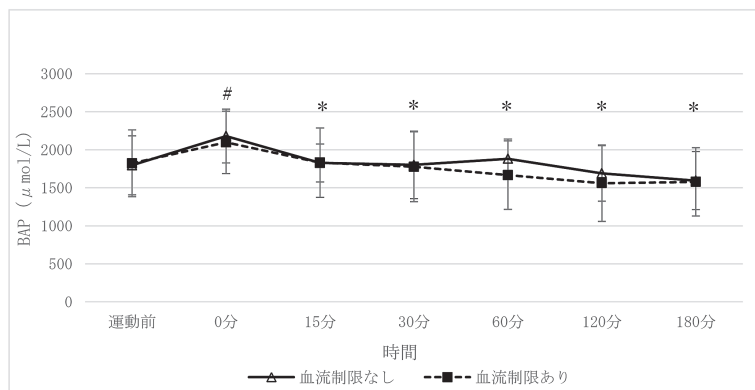


図3 血流制限下および血流制限なしでの運動における抗酸化力 (BAP) の経時的変化
$P > *P$ 0.05 0分 vs 15分、30分、60分、120分、180分

Fig. 3 Chronological change in BAP with and without vascular occlusion

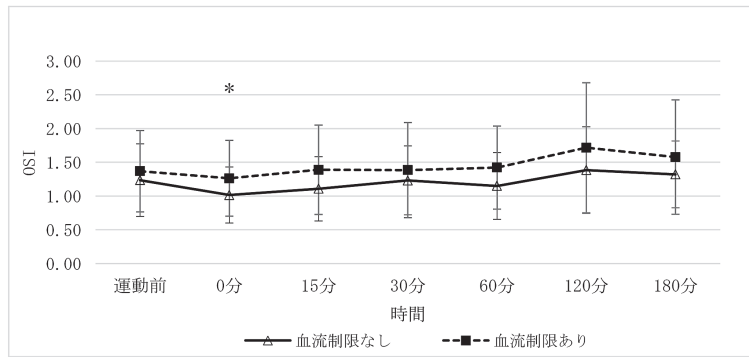


図4 血流制限ありおよび血流制限なしでの運動における酸化ストレス指数 (OSI) の経時的変化

* $P < 0.05$ 血流制限あり vs 血流制限なし

Fig. 4 Chronological change in OSI with and without vascular occlusion

3) 酸化ストレス指数 (OSI)

酸化ストレス指数 (OSI) において、血流制限と時間の要因間で有意な交互作用は認められなかった。また、血流制限あり群と血流制限なし群を比較したところ、群間の要因には有意な主効果が認められた。また運動前 (安静時)、運動直後 (0 分)、運動15分後、運動30分後、運動60分後、運動120分後、運動180分後を比較したところ、時間による群の要因には有意な主効果は認められなかった。

有意差のあった血流制限ありなしの群間の要因に対して多重比較を行ったところ運動直後 (0 分) のみ有意差を認めた (図4)。

($\text{HO}\cdot$) などの活性酸素や一酸化窒素 (NO) などのフリーラジカル産生による障害、各種サイトカイン、エンドセリン、アラキドン酸など各種ケミカルメディエータ産生による障害、活性化好中球と血管内皮細胞の相互作用に基づく障害などの機序が考えられている。四肢の血流制限トレーニングにおいても、同様のことが起きるのではないかと考え、血流を制限された状態での運動がホルモンや代謝物質の分泌を促している原因として、酸化ストレスが局所に発生し、全身性の酸化ストレスを増加させこれらの反応が起きているのではないかと仮説を立て血流制限下でのトレーニング時の酸化度 (d-ROMs)、抗酸化 (還元) 能力 (BAP) を測定した。

IV. 考察

虚血状態にある臓器、組織に血液再灌流が起きた際に、その臓器・組織内の微小循環において種々の毒性物質の産生が惹起され引き起こされる。この虚血再灌流障害は McCord により報告された虚血・再灌流理論が最初である¹²⁾。虚血の時間と程度、臓器の種類などにより障害の程度は異なるが、再灌流により血管内皮細胞傷害、微小循環障害をきたし、臓器障害に進展すると考えられている。障害を引き起こす機序として、スーパーオキシド (O_2^-) やヒドロキシラジカル

1) 酸化度 (d-ROMs)

本実験では、d-ROMs テストにおいては、運動前後の有意な変化は認めなかった。また、血流制限ありなしの要因についても、実験直後の群間の差こそ認められたが、交互作用がないため、それぞれ有意な変化と認められない。

これまでに運動に関連して、Radák らは、下肢の筋肉痛を引き起こすような急性運動で骨格筋の 8-OHdG が増加することを報告している¹⁴⁾。また、渡辺らは運動強度が上がるにつれて、酸化度および抗酸化反応が上昇すると報告しているが¹⁵⁾、通常の運動強度では、抗酸化力が十分に存在してい

る為に体に損傷を来すほどの酸化ストレスを生じることはない¹⁶⁾ という報告もあり、運動と酸化ストレスの関係はまだ不明な点も多い。d-ROMsは、酸化ストレス度のマーカーであるヒドロペルオキシド (ROOH) を初めとした血清・血漿中の総合的な酸化度を定量化するため、生体に発生する総酸化量の測定ではなく還元力を減算した値を指しているとしても、今回行った血流制限トレーニングにより生体に起きる酸化ストレスは変化がないといえる。ただし、これらの反応は、個体差があり日常的なトレーニングの継続を行っている場合では酸化ストレスを発症させるような負荷にならなかった可能性は排除できない。鍛錬された運動競技者や運動トレーニングされた動物では、非鍛錬者 (動物) と比較して、急性運動負荷後の脂質過酸化反応物の上昇が認められないか軽度のことが多い¹⁷⁾ と言われていることは、本研究の結果と相違ない。

2) 抗酸化力 (BAP)

本実験で、BAP テストにおいては、運動前後の有意な変化は認めなかった。また、血流制限ありなしの要因についても有意な差を認めなかった。運動直後とその後における BAP 値の差は認められたが血流制限トレーニングを行っていない群も同様の変化をしているため血流制限トレーニングの影響はないと考えられる。

急性運動は、活性酸素の生成を通して生体のさまざまな分子と反応し、組織に酸化的損傷を与える。一方、生体には、この活性酸素ストレスに対抗する防御メカニズムが備わっており、とくに主要な抗酸化酵素である SOD や CAT、GSH-Px は重要であるといわれている。

これまでの研究では、組織中の主要な抗酸化酵素は、急性運動後に上昇して対応するといわれている。たとえば、Ji は、消耗性運動によるラット大腿外側広筋の SOD、GPX および CAT 活性の増加を報告している¹⁸⁾。Ohishi¹⁹⁾ でも、急性運動がラットの後肢ヒラメ筋の Cu、Zn-SOD、GPX と CAT 活性を上昇させたことを確認している。

運動強度を考慮した Khassaf らの研究では、ヒトに消耗性ではあるが筋損傷をおこさない有酸素運動をさせて外側広筋の SOD 活性を経時的に測定したところ、3 日後にピークに達したと報告されている²⁰⁾。運動強度により抗酸化酵素の応答には差があるが、急性運動は抗酸化酵素の活性を高める方向に作用し、急性運動によって増加する活性酸素ストレスに対する適応現象であると思われる。本研究においては、d-ROMs に表される酸化ストレスの上昇がみられなかったため BAP 値の変化も認めなかったといえるだろう。しかしながら、単回運動による応答では急性運動で増大する酸化ストレスを処理しきれないようなこともある²¹⁾。

今回の結果においては、血流制限あるなしに関わらず運動直後から BAP 値の減少がみられた。これは有意ではない上昇後の低下が正常に戻ったとも考えられるが、トレーニング後の open window theory として運動セッションの後、一定期間 (通常 3 ~ 72 時間) 免疫応答が減少するとされる¹¹⁾ ため、運動による急な上昇の後の一過性の減少反応と同様な反応である可能性とも考えられる。これについては今後の詳細な研究が必要になりうる。

3) 酸化ストレス指数 (OSI)

酸化ストレス指数 (OSI) は、酸化ストレス値 (d-ROMs) を抗酸化力値 (BAP) で割って係数 8.85 を乗じた指数である。酸化と抗酸化のバランスを示した比率であり、値が低い方が、酸化ストレスが低く良いとされる。日本人ではその係数が 8.85 とすることで OSI を 1 にするとして係数が決められているが、本研究の OSI は運動前から 1.2 ~ 1.3 の値を示しており、一般的な平均とは異なる値である。

本実験では、OSI においては、運動前後の有意な変化は認めなかった。また、血流制限ありなしの要因についても、実験直後群間の差こそ認められたが、交互作用はないため、それぞれ有意な変化と認められない。

これらのことから本研究結果の d-ROMs、BAP、

OSI を総合的に見ても、血流制限トレーニングが全身の酸化ストレス・還元反応に影響を与えているとは言えなかった。他の研究を見ても運動そのものが影響している報告もあれば trained（鍛錬された）subject は影響ないという報告も存在する。酸化ストレスだけでは局所の変化を見ることもあるかもしれないが、もしこの反応が生体の中で日々変化する生体の反応を見ているのであれば、可逆性を考え漸進性が必要といったトレーニングの負荷をどうするかという被験者の反応の変動を表しているともいえるのではないだろうか。

4) 本研究の限界

本研究では、被験者が普段から運動習慣があり、保持する筋力が比較的高い人を対象とした。その影響から、20%1RM という低負荷の下肢閉鎖的運動を行った際に低い負荷しかかかっていない可能性が考えられる。

また、本実験のプロトコールでは運動前後から時間で区切り血液採取を行ったが、運動間での酸化還元反応の影響については、明らかになっていない。そのため、血液の採取のタイミングが運動時間の中で、その変動をうまくとらえることができなかった可能性が考えられる。

V. 結語

血流制限下での下肢閉鎖性運動連鎖を低負荷で行い、血液中の酸化還元反応を検討した。本研究では、血流制限トレーニングを用いての低負荷の下肢閉鎖的運動連鎖における生体の酸化還元反応への影響は認めなかった。

参考文献

- 1) 北野利夫 (2008) 筋肉・関節の成長・発達：バイオメカニズム学会誌, 32(2); 61-64.
- 2) Robert Morton, Lauren Colenso-Semple, and Stuart M Phillips; Training for Strength and Hypertrophy (2019) An Evidence-based Approach. Current Opinion in Physiology, 10: 90-95.
- 3) 坂本多穂 (2017) 加圧トレーニング—骨格筋の虚血プレコンディショニング—. 日薬理誌, 150; 201-203.
- 4) Gustavo A Nader, Thomas J McLoughlin, and Karyn Esser (2005) mTOR function in skeletal muscle hypertrophy: increased ribosomal RNA via cell cycle regulators. American Journal of physiology-cell physiology. 589: 1457-1465.
- 5) Yudai Takarada, Haruo Takazawa, Yoshiaki Sato, Shigeo Takebayashi, Yasuhiro, and Naokata Ishii (2000) Effects of resistance exercise combined with moderate vascular occlusion on muscular function in humans. Journal of Applied physiology, 88: 2097-2106.
- 6) Yudai Takarada, Tomomi Tsuruta, and Naokata Ishii (2004) Cooperative Effects of Exercise and Occlusive Stimuli on Muscular Function in Low-Intensity Resistance Exercise with Moderate Vascular Occlusion. Japanese Journal of physiology, 54: 585-592.
- 7) 小川達也・藤原利夫・小森俊昭・小林謙之・土岡丘 (2002) 肝虚血再灌流障害におけるウリナスタチン (UTI) 投与の有用性について—温阻血肝障害および同所性全肝移植モデルを用いて. 日本外科学系連合学会誌, 27(1); 88-96.
- 8) 今田伊助・佐藤英介・井上正康 (1999) 生体における活性酸素・フリーラジカルの生産と消去. 科学と生物, 37(6); 411-419.
- 9) 吉川敏一 (2011) フリーラジカルの化学. 120; 381-391.
- 10) Yudai Takarada, Yutaka Nakamura, Seiji Aruga, Tetsuya Onda, Seiji Miyazaki, and Naokata Ishii (2000) Rapid increase in plasma growth hormone after low-intensity resistance exercise with vascular occlusion. Journal of Applied Physiology, 88; 61-65.
- 11) Junzo Nojima, Yukari Motoki, Hidehiro Tsuneoka, Hirohiko Kuratsune, Tomohiro Matsui, Misa Yamamoto, Masashi Yanagihara, Yuji Hinoda Kiyoshi Ichihara (2011) 'Oxidation stress index' as a possible clinical marker for the evaluation of non-Hodgkin lymphoma; British Journal of Haematology. 155(4): 528-530.

- 12) McCord JM (1985) Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury, *The New England Journal of Medicine*, 312: 159-163.
- 13) 関泰一 (2009) d-ROMS テストによる酸化ストレス総合評価. *生物試料分析*, 4, 32.
- 14) Radák Z, Pucsok J, Mecseki S et al (1999) Muscle soreness increases nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. *Free radical Biology and Medicine*, 27: 69-74.
- 15) 渡辺慶太・宮崎誠司・遠藤慎也 (2021) 運動による生体内の酸化還元反応の変化と水素ガス吸入による酸化ストレス軽減の試み. *体育学研究*, 東海大学スポーツ医科学雑誌, 33; 31-36.
- 16) 大石修司 (2015) 運動と酸化ストレス. 活性酸素と抗酸化防御のバランスの重要性. *医療*, 69: 317-324.
- 17) Ohishi S et al (2000) Role of Lipid and Lipoprotein Oxidation. In Radák Z, *Free Radicals in Exercise and Aging*.
- 18) Ji LL (1993) Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Medicine Science in Sports Exercise*, 25: 225-231.
- 19) Ohishi S, Kizaki T, Nagasawa J et al (1997) Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content, and mRNA expression in rat muscle. *Clinical Experimental Pharmacology Physiology*, 34: 326-332.
- 20) Khassaf M, Child RB, McArdle A et al (2001) Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. *Journal of Applied Physiology*, 90: 1031-1035.
- 21) 大石修司 (2015) 運動と酸化ストレス：活性酸素と抗酸化防御のバランスの重要性. *Japanese journal of National Medical Services*, 69(7): 317-324.