

〔学術奨励賞〕
〔原 著〕

水素ガス吸入が運動負荷試験中の酸素摂取量に及ぼす影響

堀 天 (中部大学大学院生命健康科学研究科)

尾方 寿好 (中部大学生命健康科学部)

近藤 孝晴 (中部大学生命健康科学部)

堀田 典生 (中部大学生命健康科学部)

Effects of Inhalation of Hydrogen Gas on Oxygen Uptake during Exercise Test in Humans

Amane HORI¹⁾, Hisayoshi OGATA²⁾, Takaharu KONDO²⁾ and Norio HOTTA²⁾

【Abstract】

The purpose of this study was to investigate the effects of molecular hydrogen (H₂) gas inhalation on the oxygen uptake during an incremental exercise test performed on a cycle ergometer. This study was designed as a single-blind, randomized, controlled trial. Eight men and one woman volunteered to perform an incremental cycling exercise test while inhaling one of two kinds of gases: 1% H₂ gas (H₂ trial) or air (control trial). In both trials, the workload was gradually increased by 20 W every minute until volitional fatigue set in. Respiratory parameters were measured during the test using a breath-by-breath gas analyzer. Blood samples were collected from the subjects' fingertips before, during, and immediately after the end of the exercise to evaluate the systemic redox status. We found that: 1) the H₂ trial significantly augmented oxygen uptake (VO₂) response to exercise after 20 W as compared with that observed in the control trial; 2) the H₂ trial significantly increased peak oxygen uptake (VO_{2peak}) as compared with that of control trial; and 3) the H₂ trial also significantly shifted to a reduced state in the systemic redox balance, immediately after the exercise ended as compared with the control trial, suggesting the H₂ trial reduced oxidative stress. In conclusion, inhalation of H₂ gas significantly increased the VO₂ response and VO_{2peak} during incremental exercise. These results may suggest that inhalation of H₂ gas improves mitochondrial function during exercise.

Keyword : oxidative stress, systemic redox status, peak oxygen uptake, oxygen uptake response, mitochondrial function

キーワード : 酸化ストレス, 酸化還元状態, 最高酸素摂取量, 酸素摂取応答, ミトコンドリア機能

1) Graduate School of Life and Health Sciences, Chubu University

2) College of Life and Health Sciences, Chubu University

I. 序論

運動の実施は、心身ともに多くの好ましい効果を与え、生活の質を向上させることは周知の事実である。我が国においても、厚生労働省が、健康づくりのための身体活動基準 2013 を策定することで、国民に運動を行うことを推進していることから（厚生労働省、2013）、健康的で豊かに過ごすために運動は必要不可欠なものであることは広く知られている。

一方で、運動には好ましくない影響が生じてしまうこともある。その一つとして、活性酸素種（reactive oxygen species : ROS）の過剰産生による酸化ストレスの増大があげられる（Ashton et al., 1999; Reid, 2016; Westerblad and Allen, 2011）。酸化ストレスとは、生体内の ROS による酸化能力と抗酸化物質による還元能力のバランス（酸化還元状態）が前者に傾いた状態と定義されている（Finkel and Holbrook, 2000; 奥津・山田, 2018; Sies, 1997）。さらに、酸化ストレスの増大は、タンパク質の変性、DNA や細胞の損傷、脂質過酸化等を引き起こし、生体にとって悪影響を及ぼすことが知られている（Aruoma, 1998; Dalle-Donne et al., 2006; Dorn., 2015; Ďuračková, 2010; Finkel and Holbrook, 2000; Mankowski et al., 2015; 奥津・山田, 2018; Sies, 1997）。酸化ストレスの原因である ROS は、体内で日常的に産生されており（Aruoma, 1998）、運動によってその産生量は増加する（Ashton et al., 1999; Dillard et al., 1978; Fisher-Wellman and Bloomer, 2009; Julien et al., 2006; Mankowski et al., 2015）。

このような ROS による損傷から生体を守るために、生体は抗酸化機能を有しており（Fisher-Wellman and Bloomer, 2009）、ROS を消去することで酸化還元状態を正常に保つために働く。しかしながら、高強度の運動では ROS の過剰産生に抗酸化機能が追い付かなくなり、結果として酸化ストレスが増大する（Ashton et al., 1999; Fisher-Wellman and Bloomer, 2009; Julien et al., 2006）。ROS の主な産生場所はミトコンドリアであるが（Aon et al., 2014; Dorn, 2015）、ミトコンドリア自身も ROS により障害を受けることが報告されている（Aon et al., 2014; Ichikawa et al., 2008）。そのため、酸化系を担うミトコンドリアは酸化ストレスにより障害されることで、ミトコンドリア

からのエネルギー出力が低下すると予想され得る（Verbruggen et al., 2007）。

近年、分子状水素（以下水素）は、細胞毒性の強い ROS を選択的に消去し、酸化ストレスに対して、細胞防御機能を有する新たな抗酸化剤になり得ることが示唆されている（Ohsawa et al., 2007）。実際に、Chuai ら（2012）はマウスに約 0.6 mmol/L の水素水を投与したところ、細胞毒性の強い ROS の一種であるヒドロキシラジカルを中和させることを報告している。

水素の体内動態について、体内に摂取された水素は生体膜を通過し、細胞質に拡散するため、血管内にも拡散によって入り、血流によって全身へ移動すると考えられている（Ohta, 2014）。実際に、Ono ら（2012）はヒトに 3% または 4% の水素ガスを吸入させたところ、血中の水素濃度は急激に増加し、約 10-20 $\mu\text{mol/L}$ でプラトーに達することを報告している。また、Shimouchi ら（2013）はヒトを対象に、およそ 160 ppm（ppm は parts per million の略で 1/1000000 の濃度を示す単位）の水素ガスを吸入させたところ、体内での水素消費率は、体重当たり約 16.3 nmol/min/kg であることを報告している。従って、ヒトにおいても水素摂取が生体内の酸化ストレスの低下に関与し得ることが考えられる。

以上より、水素を摂取しながら運動を実施することで、運動誘発性酸化ストレスによるミトコンドリア障害を抑え、酸化系を担うミトコンドリアのエネルギー出力を増大させることが出来るのではないかと考えられる。そこで本研究では、ヒトを対象に、運動負荷試験中の水素ガス吸入が酸素摂取量に及ぼす影響を検討することを目的とした。我々は水素摂取が運動中のミトコンドリア機能を改善させ、結果的に酸素摂取量が増加するとの仮説を立てた。

II. 方法

1. 被検者

本研究には、健康な男性 8 名、女性 1 名、合計 9 名が参加した。被検者の身長、年齢、体重は、 169.4 ± 8.0 cm, 22.4 ± 5.5 歳, 体重 64.9 ± 9.8 kg（平均値 \pm 標準偏差）であった。全ての被検者に、本研究の目的、方法について十分に説明した後に、研究に参加することの同意を得た。本研究は、中

部大学倫理委員会の承認の下で行われた。

2. 研究デザイン

各被検者に対して、2試行の自転車エルゴメーターを用いた漸増運動負荷試験を実施した。1つは約1%濃度の水素ガス、他方は空気を吸入する試行であった。この2試行はシングルブラインドかつランダムオーダーにて実施された。本研究では、運動負荷試験における試行間の最高負荷、最高酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2peak}$) の違い及び、その他の生理学的応答の変化の違いを比較した。

3. 実験プロトコル

被検者に本実験の運動負荷試験や呼吸マスク等に慣れてもらうために、実験当日までに練習セッションを1回実施した。本実験の運動負荷試験には、自転車エルゴメーター (Aerobike 75XLIII, コンビウエルネス) を用いた。この運動負荷試験の流れを図1に示した。呼気ガス分析を行うための呼吸マスク装着後、5分間の座位安静の後にウォーミングアップとして0Wでの空こぎを3分間実施した。その後、1分間ごとに20Wずつ負荷が直線的に漸増するランプ負荷法を用いた運動を実施した。自転車エルゴメーターの回転数を60rpmに制限し、検者からの激励にも関わらず回転数が50rpmを下回った時点で運動終了とし、回復としてクーリングダウンと安静に移った。

また、運動開始前の安静時、運動中、運動終了直後の3点において指先から採血を実施し、酸化ストレス及び酸化還元状態を評価した。

4. 呼吸・心拍応答及び自覚的運動強度の測定

呼気ガス分析装置 (エアロモニタ AE-310S, ミナト医科学) を用いて、酸素摂取量 ($\dot{V}O_2$)、

二酸化炭素排出量 ($\dot{V}CO_2$)、毎分換気量 (\dot{V}_E)、心拍数 (HR) を1呼吸ごとに測定した。呼吸交換比 (RER) は、 $\dot{V}O_2$ と $\dot{V}CO_2$ の比より求めた。1呼吸ごとの $\dot{V}O_2$ のデータを、値のばらつきを抑えるために、20秒ごとに平均し、その中の最高値を本実験の $\dot{V}O_{2peak}$ とした。また、運動終了時の負荷を最高負荷とした。さらに、運動中は1分毎にBorgスケールによる自覚的運動強度 (RPE) を記録した。運動中の各指標の応答の検討のために1分毎に平均値を求めた。

5. 吸入用ガスの供給法

本実験中に被検者が吸入したガスは、水素ガスボンベ(水素約1%、酸素21.0%、二酸化炭素0.0%、窒素バランス) (名古屋興酸)、または、対照として用いた圧縮空気ガスボンベ (名古屋興酸) から供給した。ガスボンベから供給されたガスは、一度、200Lのダグラスバッグにて緩衝した後に、蛇管と三方活栓 (ハンズドルフ) 及び呼吸マスク (ミナト医科学) を介して被検者へ送った。また、三方活栓の呼気側に蛇管を付け、その末端に呼気ガス分析用の熱線流量計と、酸素及び二酸化炭素濃度測定用サンプルチューブ (エアロモニタ AE-310S, ミナト医科学) を装着した。また、被検者は安静開始から実験終了までの間、約1%濃度の水素が含まれたガス (水素試行) または対照の空気 (空気試行) のどちらか一方を吸入し続けた。

6. 酸化ストレス及び酸化還元状態の評価のための測定

本実験では、安静時、運動150W時、運動終了時に指先から血液を約300 μ L採取し、酸化ストレス及び酸化還元状態の評価のための測定を実施した。採血した血液を遠心分離にかけた後、得られた血漿成分を用いて、フリーラジカル解析装置 (FREE Carrio Duo, ウイスマー) にて diacron reactive oxygen metabolites (d-ROMs) テスト及び biological anti-oxidant potential (BAP) テストの2種類の測定を実施し、酸化還元状態を評価した (Miyazaki et al., 2014, 2015; Yahata et al., 2011)。

d-ROMs テストとは、ROSの作用によって産生されるヒドロペルオキシドの血中の濃度を測定することで生体の酸化ストレス度を評価する方法である (Cesarone et al., 1999; Ishizaka et al., 2013; Miyazaki et al., 2014, 2015; Nakayama et al.,

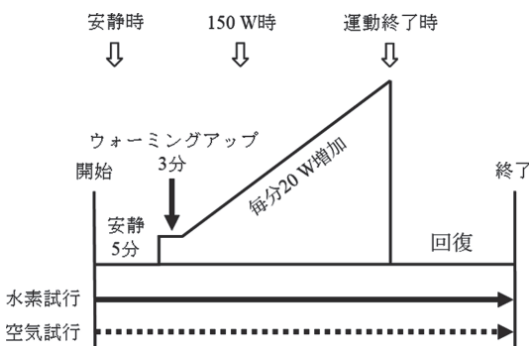


図1 実験プロトコル

↓は採血したタイミングを示す。

2007). d-ROMs テストで得られる酸化ストレスの基準値は、正常:200-300 UCARR, 境界範囲:301-320 UCARR, 低レベル酸化ストレス:321-340 UCARR, 中レベル酸化ストレス:341-400 UCARR, 高レベル酸化ストレス:401-500 UCARR, 非常に高度の酸化ストレス:>501 UCARR とされる (Miyazaki et al., 2014). UCARR は本研究で用いたフリーラジカル解析装置独自の単位で、1 UCARR=0.08 mg/dL H₂O₂ に相当する (Yahata et al., 2011).

BAP テストは、生体内の血中の抗酸化能力を評価するものである (Ishizaka et al., 2013; Miyazaki et al., 2014, 2015; Nakayama et al., 2007). このテストでは、血漿中の還元性物質が試薬内の鉄イオン (Fe³⁺) を Fe²⁺ に還元することで溶液が変色し、この色調の変化強度から抗酸化能力を評価する (Miyazaki et al., 2014; Nakayama et al., 2007). BAP テストで得られる抗酸化能力の基準値は、最適値:>2200 μmol/L, 境界値:2200-2000 μmol/L, 軽度の欠乏状態:2000-1800 μmol/L, 欠乏状態:1800-1600 μmol/L, 重度の欠乏状態:1600-1400 μmol/L, 非常に重度の欠乏状態:<1400 μmol/L とされる (Miyazaki et al., 2014).

さらに、本研究では、酸化還元状態を評価する指標として、BAP テストの値 (以下 BAP) を d-ROMs テストの値 (以下 d-ROMs) で除した値 (以下 BAP/d-ROMs) を求めた (Faenza et al., 2012; Iimura et al., 2014; Kaneko et al., 2012). 永田ら (2008) は、日本人健常者の BAP/d-ROMs は 7.541 ± 0.978 以上が望ましい値と提案している。

7. 統計

VO₂, VCO₂, V_E, HR, RPE, d-ROMs, BAP, 及び BAP/d-ROMs の経時変化の検討には、繰り返しのある 2 要因の分散分析を行った。被検者間要因は試行 (水素試行と空気試行) とした。被検者内要因は負荷であり、血液の分析では、安静、150 W, 運動終了とし、呼吸、心拍、自覚的運動強度の分析では、安静及び 20 W ごとの負荷とした。交互作用または主効果が認められた場合には、Bonferroni 法にて多重比較を行い、有意差が認められるポイントを特定した。

VO_{2peak}, 最高負荷、後述する運動前後における BAP, d-ROMs, BAP/d-ROMs の変化の度合いについては、試行間で比較するために、対応のあ

る t 検定を行った。

値は平均値と標準誤差で示した。危険率を 5% とし、統計解析には、SPSS (24.0 for windows) ソフトウェア及び StatView 5.0 ソフトウェアを用いた。

Ⅲ. 結果

1. 水素ガス吸入が運動負荷試験中の呼吸・心拍応答及び RPE に及ぼす影響

図 2 は呼吸・心拍応答及び RPE の経時変化を示している。本研究に参加した被検者の最高負荷の最低値は 184 W であった。そこで、1 分毎の平均値にて、160 W までを統計解析の対象にした。すべての指標において負荷の主効果が認められた [VO₂: F(8, 64) = 959.01, p < 0.01, VCO₂: F(8, 64) = 159.78, p < 0.01, RER: F(8, 64) = 2.57, p < 0.05, V_E: F(8, 64) = 64.58, p < 0.01, RPE: F(7, 56) = 32.67, p < 0.01, HR: F(8, 64) = 38.53, p < 0.01]. VO₂ と VCO₂ では、すべての負荷において安静時と比べて有意に増加した (図 2a, b). V_E では、安静時と比べて 60 W 以上の負荷で有意に増加した (図 2d). RER においては安静時と比べて有意に変化したポイントは見られなかった (図 2c). RPE では 20 W 時と比べて 100 W 以上の負荷で有意に増加し (図 2e), HR では、安静時と比べて 40 W 以上の負荷で有意に増加した (図 2f).

RER, RPE 及び HR においては、試行の主効果は認められず [RER: F(1, 8) = 2.60, p = 0.15, RPE: F(1, 8) = 0.02, p = 0.89, HR: F(1, 8) = 0.35, p = 0.57], 交互作用も認められなかった [RER: F(8, 64) = 0.59, p = 0.79, RPE: F(7, 56) = 0.79, p = 0.60, HR: F(8, 64) = 0.78, p = 0.63].

特筆すべき結果は、VO₂, VCO₂, V_E では、有意な試行の主効果が認められ [VO₂: F(1, 8) = 24.20, p < 0.01, VCO₂: F(1, 8) = 10.98, p < 0.05, V_E: F(1, 8) = 9.27, p < 0.05], 交互作用も有意であったことである [VO₂: F(8, 64) = 5.43, p < 0.01, VCO₂: F(8, 64) = 4.14, p < 0.01, V_E: F(8, 64) = 3.56, p < 0.01]. 水素試行における VO₂ は空気試行のそれと比べて、運動時 20 W から 160 W のすべてのポイントにおいて有意に高かった (図 2a). VCO₂ と V_E では、40 W, 120 W, 140 W, 160 W の 4 ポイントにおいて、水素試行が空気試

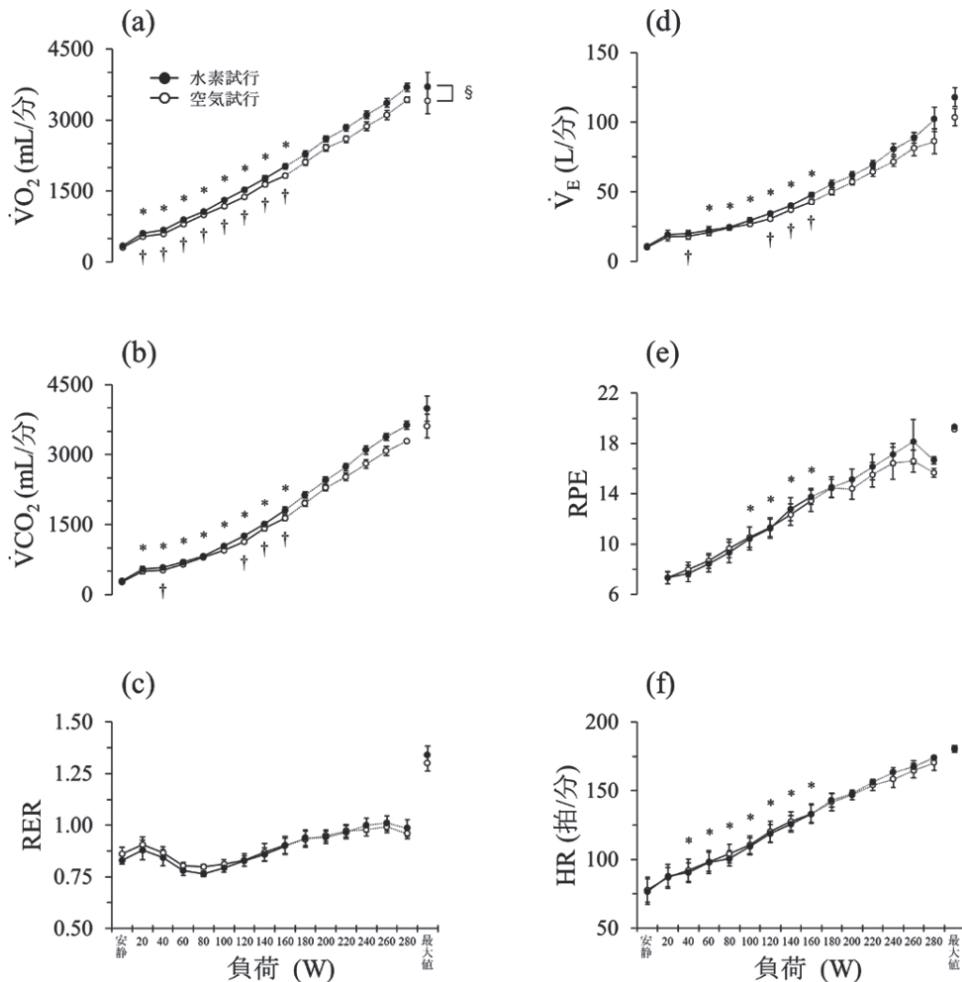


図 2 運動負荷試験による呼吸・心拍 (HR) 応答及び自覚的運動強度 (RPE) の変化

$\dot{V}O_2$, $\dot{V}CO_2$, RER 及び \dot{V}_E はそれぞれ酸素摂取量, 二酸化炭素排出量, 呼吸交換比及び毎分換気量を示している. 統計解析は, 実線で示されている安静から 160 W までを対象とした. 160 W 以降から 280 W までの破線で示されている部分は, その時点でも運動を継続できている被検者のみの値で示した. アスタリスク (*) と短剣符 (†) はそれぞれ, 安静 (RPE は 20 W) と比べて有意に増加したこと ($p < 0.05$) と試行間で有意差が認められたことを示す ($p < 0.05$). セクション (§) は $\dot{V}O_2$ の最大値 ($\dot{V}O_{2peak}$) に対して対応のある t 検定を行い, 試行間で有意差が認められたことを示す ($p < 0.01$). 値は平均値 \pm 標準誤差.

行と比較して有意に高い値を示した (図 2b, 2d).

2. 水素ガス吸入が最高酸素摂取量及び最高負荷に及ぼす影響

本研究では 20 秒毎の $\dot{V}O_2$ の平均値の最大値を $\dot{V}O_{2peak}$ とした. $\dot{V}O_{2peak}$ は水素試行が空気試行に比べて有意に高かった (水素試行: 3705 ± 303 mL/分, 空気試行: 3399 ± 265 mL/分) (図 2a). 最高負荷については, 試行間で有意な差はみられ

なかった (水素試行: 283 ± 19 W, 空気試行: 280 ± 19 W).

3. 水素ガス吸入が運動負荷試験中の酸化ストレス及び酸化還元状態の変化に及ぼす影響

表 1 は, d-ROMs, BAP, BAP/d-ROMs の経時変化を試行ごとに示している. d-ROMs, BAP 及び BAP/d-ROMs における負荷の主効果は有意であった. そこで, 多重比較を行った結果, d-ROMs と BAP においては, 安静に比べて運動

表 1 運動負荷試験による diacron reactive oxygen metabolites (d-ROMs), biological anti-oxidant potential (BAP), 酸化還元状態 (BAP/d-ROMs) の変化

	d-ROMs(UCARR)		BAP($\mu\text{mol/L}$)		BAP/d-ROMs	
	水素試行	空気試行	水素試行	空気試行	水素試行	空気試行
安静	257 \pm 19	262 \pm 20	1867 \pm 134	2128 \pm 116	7.3 \pm 0.1	8.7 \pm 1.0
150 W	288 \pm 10	300 \pm 11	2104 \pm 57	2175 \pm 83	7.3 \pm 0.1	7.3 \pm 0.4
運動終了	303 \pm 12	* 320 \pm 14	2542 \pm 78	* 2556 \pm 58	8.5 \pm 0.3	8.2 \pm 0.5
試行の主効果	F(1,8)=0.90, p=0.37		F(1,8)=1.69, p=0.23		F(2,16)=0.53, p=0.49	
負荷の主効果	F(2,16)=15.5, p<0.01		F(2,16)=20.6, p<0.01		F(2,16)=3.80, p<0.05	
交互作用	F(2,16)=0.14, p=0.87		F(2,16)=1.43, p=0.27		F(2,16)=3.59, p=0.05	

d-ROMs, BAP はそれぞれ酸化ストレス度, 抗酸化能力の指標とされる (Cesarone et al., 1999; Ishizaka et al., 2013; Miyazaki et al., 2014, 2015; Nakayama et al., 2007). 繰り返しのある 2 要因の分散分析 [被検者間要因 (水素試行と空気試行), 被検者内要因 (安静, 150 W, 運動終了)] を行った. アスタリスク (*) は安静と比べて有意に増加したことを示す ($p < 0.05$). 値は平均値 \pm 標準誤差.

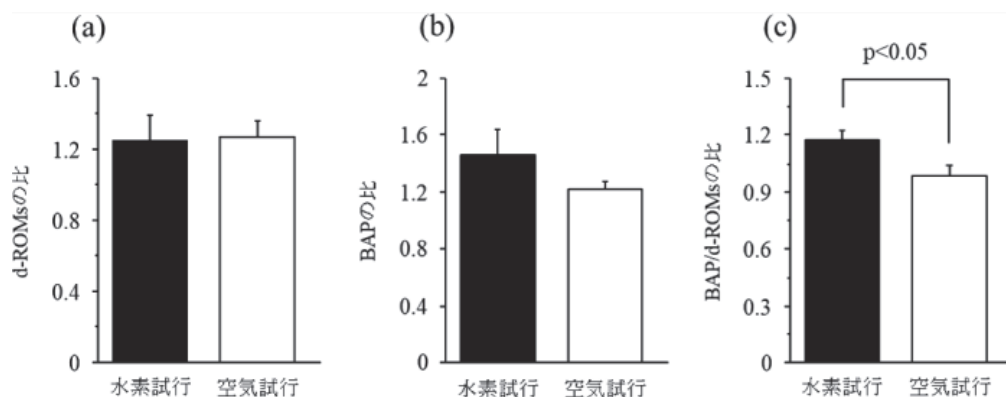


図 3 各試行の diacron reactive oxygen metabolites (d-ROMs), biological anti-oxidant potential (BAP), 酸化還元状態 (BAP/d-ROMs) の運動終了の値を安静の値で除した比
d-ROMs, BAP はそれぞれ酸化ストレス度, 抗酸化能力の指標とされる (Cesarone et al., 1999; Ishizaka et al., 2013; Miyazaki et al., 2014, 2015; Nakayama et al., 2007). 値は平均値 \pm 標準誤差.

終了時が有意に増加したが, BAP/d-ROMs では, 安静に比べて有意に増加したポイントはみられなかった. d-ROMs, BAP 及び BAP/d-ROMs における, 試行の主効果は有意ではなかった. また, 交互作用においては, d-ROMs と BAP では有意ではなかったが, BAP/d-ROMs においては傾向がみられた.

さらに, 本研究では, 運動前後における水素試行と空気試行の酸化ストレス及び酸化還元状態の変化の度合いを比較するため, 運動終了時の値から運動前の安静の値を除いた比(運動終了/安静)を算出した(図3). 図3aはd-ROMsの結果を示

している. d-ROMs は試行間に有意な差はみられなかった(水素試行: 1.25 \pm 0.14, 空気試行: 1.27 \pm 0.09, $p = 0.94$). BAP においても, 試行間に有意な差はみられなかった(水素試行: 1.46 \pm 0.18, 空気試行: 1.22 \pm 0.05, $p = 0.24$) (図3b). しかし, BAP/d-ROMs においては水素試行が空気試行に比べて有意に高い値を示した(水素試行: 1.17 \pm 0.05, 空気試行: 0.99 \pm 0.06) (図3c).

IV. 考察

運動負荷試験に対する, 水素ガス吸入の効果を明らかにしようとした本研究の主な結果は, 以下

の通りである。(1) 生体の酸化還元状態の指標として用いたBAP/d-ROMsにおいて、水素摂取は還元方向にシフトさせた。この結果は、先行研究と一致した (Chycki et al., 2017; Nakao et al., 2010)。(2) 水素摂取は、 $\dot{V}O_2$ 、 $\dot{V}CO_2$ 及び \dot{V}_E の運動に対する応答を増強させた。(3) 水素摂取は最高負荷を有意に変化させなかったが、 $\dot{V}O_{2peak}$ を増加させた。我々の知る限り、本研究により (2) と (3) を新たに明らかにした。

1. 水素ガス吸入が運動負荷試験中の酸化還元状態の変化に及ぼす影響

本研究では、酸化ストレスの程度を示し得るd-ROMsは運動によって有意に増加した。このことから、運動によりROSの産生量が増加したことが示された。この結果は先行研究と一致している (Ashton et al., 1999; Dillard et al., 1978; Fisher-Wellman and Bloomer, 2009; Julien et al., 2006; Mankowski et al., 2015)。一方、Ohsawaら (2007) は、水素は、細胞毒性の強いROSを選択的に消去し、酸化ストレスを低下させることを報告している。事実、Nogueiraら (2018) は、ラットを用いた実験で、水素摂取により急性の運動誘発性炎症及び酸化ストレスを低下させることを報告している。ここでの議論的的は、ヒトを対象とした本研究においても水素ガス吸入により、運動誘発性酸化ストレスを軽減できたかである。

本研究で用いたBAP/d-ROMsは、抗酸化能力と酸化ストレス度の平衡を示すものであり (丸岡・藤井, 2012)、その値が大きくなることは、生体が還元方向へシフトしていると考えられる。また、酸化ストレスは、生体内のROSによる酸化能力と抗酸化物質による還元能力のバランス (酸化還元状態) が前者に傾いた状態と定義されている (Finkel and Holbrook, 2000; 奥津・山田, 2018; Sies, 1997)。従って、BAP/d-ROMsの値は、ROSの産生の程度を間接的に評価し得るd-ROMsのみや、抗酸化能力を評価し得るBAPのみを測定するよりも、より詳細に酸化ストレスの程度を評価していると考えられる。事実、関 (2009) もd-ROMsとBAPの両方から測定することで、より正確な酸化ストレスの総合評価ができると述べている。本研究では、水素摂取により、酸化ストレス及び酸化還元状態の指標として用いたBAP/d-ROMsの運動前後の変化の度合いは、水素によ

り有意に増大した。以上より、本研究の水素摂取方法により運動誘発性酸化ストレスを低下 (還元方向へシフト) させたことが示唆される。

2. 水素ガス吸入が運動負荷試験中の呼吸・心拍応答に及ぼす影響

本研究では、 $\dot{V}O_{2peak}$ のみならず、水素摂取により運動負荷試験中の $\dot{V}O_2$ 、 $\dot{V}CO_2$ 及び \dot{V}_E の応答が増強した。最大下の漸増負荷運動中は、活動筋の酸化系の亢進によって $\dot{V}O_2$ は増加すると考えられる (Poole and Jones, 2012)。従って、 $\dot{V}O_2$ 応答の増強は、酸化系エネルギー供給の賦活によるものと考えられる。 $\dot{V}CO_2$ の応答の増強は、増加した $\dot{V}O_2$ に見合って増加し、それに伴う体液的調節を受けたことによる換気の増大で、 \dot{V}_E も増加したと考えられる。 $\dot{V}O_2$ に影響を与える要因として、運動強度があるが、運動強度 (外的仕事) に対する $\dot{V}O_2$ 応答は基本的に同じとされる (柳堀ほか, 1991)。また、ペダル回転数の違いなどの内的仕事にも $\dot{V}O_2$ は影響されるが (Formenti et al., 2015)、本研究ではペダル回転数を一定にしたので、その影響は考えにくい。それではなぜ本研究では、酸化系のエネルギー供給の賦活が水素摂取によりもたらされたのか。

当初、私たちは酸化系のエネルギー供給が賦活する理由は、水素によるミトコンドリア内のROSの直接的な消去によるミトコンドリア機能の改善によるものと予想した。なぜなら、ROSは酸化系の副産物として産生されるが (Aon et al., 2014; Dorn, 2015)、酸化系を担うミトコンドリアはその内膜に酸化されやすい不飽和脂肪酸を多量に含んでいるため (Perez-Campo et al., 1998)、ROSにより障害を受けてしまうと考えられるからである。事実、急性の酸化ストレスによりミトコンドリアが障害されることが報告されている (Ichikawa et al., 2008)。本研究では、水素摂取により酸化ストレス応答を有意に還元方向にシフトさせている。従って、ROSが増えるような高強度では、この作用の関与が予想し得る。

しかし、 $\dot{V}O_2$ 応答は水素摂取により、20 Wほどの低負荷より増加しており、ミトコンドリア機能を抑制するほどの量のROSが、そのような低負荷時において産生されたとは考えにくい (Lovlin et al., 1987)。そのため、少なくとも低負荷時の $\dot{V}O_2$ 応答の増強の根拠を、水素によるROSの直

接的な消去のみに依存することは難しい。

水素には、抗酸化作用以外の効果もいくつか示されており (Ichihara et al., 2015), Murakami ら (2017) は、水素が、弱い酸化ストレスを誘発することで細胞内の ROS に対する適応を惹起し、ミトコンドリアの酸化的リン酸化によるエネルギー出力が増大する可能性を示唆している。また、Kamimura ら (2011) は糖尿病モデルマウスに水素を摂取させることで、肝臓由来の内分泌因子である、Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) と呼ばれるタンパク質を誘発し、脂肪酸やグルコース消費を賦活化させて肥満を改善させることを示唆している。従って、低強度における $\dot{V}O_2$ 応答の増大は、水素によるホルミシス効果やシグナル調節などのミトコンドリア内の ROS の直接的消去とは別の働きの関与を無視できないだろう。

安静においては、 $\dot{V}O_2$ 応答の増強に対する水素の効果はみられなかった。本研究では、安静の時間を5分しか設けておらず、さらに、安静開始と同時に水素ガスの吸入を開始したという時間の問題により、水素の影響を検出できなかった可能性もある。本研究と同様に健康なヒトを対象にして、水素の効果を検討した先行研究は、運動への水素の影響を報告するものは存在したが (Aoki et al., 2012; 河村ほか, 2016; Ostojic et al., 2011), 安静時における水素の急性効果を観察した研究は、我々の知る限り見当たらない。安静時の代謝応答に対する水素の急性効果については今後の課題である。

3. 水素ガス吸入が有酸素性作業能力に及ぼす影響

本研究では、水素摂取により、 $\dot{V}O_2$ 応答の増強や $\dot{V}O_{2peak}$ の増加がみられた。前述の通り、負荷に対する必要なエネルギー量は同じであるため、酸化系のエネルギー供給の増大により、解糖系のエネルギー代謝への寄与は押し下げられたと予想される。実際に、Aoki ら (2012) は運動中の血中乳酸濃度 (解糖系が働いたことの証拠) は運動前の水素摂取により低下することを報じている。乳酸により筋組織の pH は低下し (Fitts, 1994), pH の低下は筋張力の低下をもたらす得ることが知られている (Fitts, 1994; Horita and Ishiko, 1987; 和田ほか, 2006)。従って、乳酸の運動に対する負の影響 (Fitts, 1994; Horita and

Ishiko, 1987; 和田ほか, 2006) は減弱されたものと予想された。

また、Reid ら (2016) は、ROS は筋疲労と関係し、抗酸化物質の摂取により筋疲労を軽減できることを示唆している。本研究から水素摂取により酸化ストレスは軽減されていたものと考えられることから、筋疲労も抑制されたことが考えられた。しかしながら、本研究では、これらの予想と反して最高負荷の有意な増加や RPE の有意な減弱は観察できなかった。

今後、乳酸を測定したり、運動負荷試験の運動様式を筋力の影響を受けにくい走運動にて実施したりするなどの課題が残される。

4. 本研究の意義

本研究の結果から、水素摂取に伴う運動中の $\dot{V}O_2$ 応答の増強は、運動パフォーマンスの増強には結びつかないエネルギー消費である可能性がある。しかし、同じ強度の運動でエネルギー消費が増大するのであれば、運動中の水素摂取がダイエットに効果的である可能性が考えられる。

アメリカスポーツ医学会は、成人に対して、健康の維持・増進のためには、中強度の有酸素性運動を1日30分以上で週に5回以上実施することを推奨しており (Garber et al., 2011), これを達成するためには習慣的な運動時間の確保が必要となる。しかし、運動の実施の問題点の一つとして、運動を行うための時間確保が不十分であるとの問題が挙げられる。スポーツ庁が実施した、平成29年度の「スポーツの実施状況等に関する世論調査」では、運動実施の阻害要因で最も割合が高かったものは、男女ともに、「仕事や家事が忙しいから」であり (スポーツ庁, 2018), 運動時間の確保は容易ではないことがうかがえる。そのため、同じ運動でも水素を摂取することで脂質代謝が促進されるのであれば、短時間で効果的な運動となり得、仕事や家事で忙しい人々の助力となり得るかもしれない。

また、酸化ストレスはメタボリックシンドロームを誘発する原因の一つと考えられており (Roberts and Shidhu, 2009), 水素は酸化ストレスを低下させ得る。さらに、脂質代謝を担う酸化系の賦活によって脂質代謝が促進し得ることから、運動中の水素ガス吸入は、生活習慣病の予防や改善に貢献する可能性も秘めていると言える。

一方で、過度な抗酸化により、運動の好ましい効果が抑制されるとの報告もあることも注視しなければならぬ (Ristow et al., 2009).

5. 研究の限界

本研究では、水素による $\dot{V}O_2$ 応答の増強の根拠をミトコンドリア機能の改善にのみおいている。しかしながら、運動中の $\dot{V}O_2$ 応答はミトコンドリアでの酸素の利用のみならず、心臓・血管系や肺機能などによる酸素供給の影響も受ける (Poole and Jones, 2012)。本研究では、水素が心臓・血管系や肺機能などに与える影響は検討されておらず、議論の対象にはできなかったことを認める。

水素は、直接的に ROS を消去することにより、酸化ストレスを低下させると考えられている (Ohsawa et al., 2007)。しかし、近年、水素が様々なシグナル伝達を調節することによって、間接的に酸化ストレスを低下させることも報告されており (Ichihara et al., 2015; Kamimura et al., 2011; Kawamura et al., 2013; Murakami et al., 2017; Noda et al., 2014)、現在に至るまで、水素が酸化ストレスを低下させる詳細な機序は不明のままである。本研究の考察は、そのような機序解明に向けた議論が継続されている中で行われているという制限がある。

本研究の結果から、水素摂取が運動時の脂質代謝を促進させ得ると考察したが、RER では試行間に有意な差はみられなかったため、本研究の結果からだけでは、実際に水素ガス吸入が脂質代謝を促進させたかは不明である。また、酸化系のエネルギー供給の増大により、解糖系のエネルギー代謝への寄与が押し下げられたと推察した。しかし、RER に変化はみられず、乳酸の測定も行わなかったため、実際に、そのような現象が起こったかも不明である。

本研究では、同一負荷に対する必要なエネルギー量は同じであるはずにもかかわらず、水素ガスを摂取することにより、 $\dot{V}O_2$ 応答の増強がみられた。しかし、本研究からそのエネルギーが何のために消費されているかは明らかにすることは出来なかった。Kurita ら (2014) は、水素発生剤を用いた水素入浴が、水素の含まれていない温水への入浴と比較して、深部体温を上昇させることを報告している。従って、本研究で水素摂取に

より増加した $\dot{V}O_2$ 応答の増強は、熱産生のためのエネルギー消費の可能性があるが、さらなる研究が必要である。

V. 結論

漸増負荷自転車運動中の約 1% 濃度の水素ガスの吸入は酸素摂取量の応答を増強させる。

謝辞

堀内裕斗氏 (医療法人 宏友会 竹内整形外科・内科クリニック) の多大な協力に感謝致します。

文献

- 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 (1) : 12. doi:10.1186/2045-9912-2-12.
- Aon, M. A., Bhatt, N., and Cortassa, S. C. (2014) Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. *Front. Physiol.*, 5: 282. doi:10.3389/fphys.2014.00282.
- Aruoma, O. I. (1998) Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75 (2) : 199-212.
- 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 (6) : 2032-2036.
- Cesarone, M., Belcaro, G., Carratelli, M., Cornelli, U., De Sanctis, M., Incandela, L., Barsotti, A., Terranova, R., and Nicolaidis, A. (1999) A simple test to monitor oxidative stress. *Int. Angiol.*, 18 (2) : 127-130.
- Chuai, Y., Gao, F., Li, B., Zhao, L., Qian, L., Cao, F., Wang, L., Sun, X., Cui, J., and Cai, J. (2012) Hydrogen-rich saline attenuates radiation-induced male germ cell loss in mice through reducing hydroxyl radicals. *Biochem. J.*, 442 (1) : 49-56.
- Chycki, J., Zajac, T., Maszczyk, A., and Kurylas,

- A. (2017) The effect of mineral-based alkaline water on hydration status and the metabolic response to short-term anaerobic exercise. *Biol. Sport*, 34 (3) : 255-261.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., and Milzani, A. (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.*, 52 (4) : 601-623.
- 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.*, 45 (6) : 927-932.
- Dorn, G. W. (2015) Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change. *EMBO Mol. Med.*, 7 (7) : 865-877.
- Đuračková, Z. (2010) Some current insights into oxidative stress. *Physiol. Res.*, 59: 459-469.
- Faienza, M. F., Francavilla, R., Goffredo, R., Ventura, A., Marzano, F., Panzarino, G., Marinelli, G., Cavallo, L., and Di Bitonto, G. (2012) Oxidative stress in obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. *Horm. Res. Paediatr.*, 78 (3) : 158-164.
- Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408: 239-247.
- Fisher-Wellman, K., and Bloomer, R. J. (2009) Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn. Med.*, 8 (1) : 1-25.
- Fitts, R. H. (1994) Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol. Rev.*, 74 (1) : 49-94.
- Formenti, F., Minetti, A. E., and Borrani, F. (2015) Pedaling rate is an important determinant of human oxygen uptake during exercise on the cycle ergometer. *Physiol. Rep.*, 3 (9) : e12500. doi:10.14814/phy2.12500.
- Garber, C. E., Blissmer, B., Deschenes, M. R., Franklin, B. A., Lamonte, M. J., Lee, I.-M., Nieman, D. C., and Swain, D. P. (2011) Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 43 (7) : 1334-1359.
- Horita, T., and Ishiko, T. (1987) Relationships between muscle lactate accumulation and surface EMG activities during isokinetic contractions in man. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 56 (1) : 18-23.
- 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. doi:10.1186/s13618-015-0035-1.
- Ichikawa, J., Tsuchimoto, D., Oka, S., Ohno, M., Furuichi, M., Sakumi, K., and Nakabeppu, Y. (2008) Oxidation of mitochondrial deoxy-nucleotide pools by exposure to sodium nitroprusside induces cell death. *DNA Repair*, 7(3): 418-430.
- Imura, Y., Agata, U., Takeda, S., Kobayashi, Y., Yoshida, S., Ezawa, I., and Omi, N. (2014) Lycopene intake facilitates the increase of bone mineral density in growing female rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 60 (2) : 101-107.
- Ishizaka, Y., Yamakado, M., Toda, A., Tani, M., and Ishizaka, N. (2013) Relationship between estimated glomerular filtration rate, albuminuria, and oxidant status in the Japanese population. *BMC Nephrol.*, 14 (1) : 191. doi:10.1186/1471-2369-14-191.
- Julien, F., Lac, G., and Filaire, E. (2006) Oxidative stress relationship with exercise and training. *Sport. Med.*, 36 (4) : 327-358.
- 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 (7) : 1396-1403.
- Kaneko, K., Takahashi, M., Yoshimura, K., Kitao, T., Yamanouchi, S., Kimata, T., and Tsuji, S. (2012) Intravenous immunoglobulin counteracts oxidative stress in Kawasaki disease. *Pediatr. Cardiol.*, 33 (7) : 1086-1088.
- 河村拓史, 丸藤祐子, 高橋将記, 原怜来, 鈴木克

- 彦, 村岡功. (2016) 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剤を用いた入浴の効果. *体力科学*, 65 (3) : 297-305.
- Kawamura, T., Wakabayashi, N., Shigemura, N., Huang, C.-S., Masutani, K., Tanaka, Y., Noda, K., Peng, X., Takahashi, T., Billiar, T. R., Okumura, M., Toyoda, Y., Kensler, T. W., and Nakao, A. (2013) Hydrogen gas reduces hyperoxic lung injury via the Nrf2 pathway in vivo. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 304 (10) : L646-L656.
- 厚生労働省. (2013) 運動基準・運動指針の改定に関する検討会 報告書. <https://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000002xple-att/2r9852000002xppb.pdf> (参照日 2019年2月2日)
- Kurita, Y., Umeda, K., Ikeda, S., Urushibata, O., and Okouchi, S. (2014) Effects of Magnesium Hydride as a Reductive Bath Additive on the Skin. *J. Hot Spring Sci.*, 63: 317-327.
- 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 (3) : 313-316.
- Mankowski, R. T., Anton, S. D., Buford, T. W., and Leeuwenburgh, C. (2015) Dietary antioxidants as modifiers of physiologic adaptations to exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 47 (9) : 1857-1868.
- Miyazaki, T., Takagi, K., Mine, M., Yamasaki, N., Tsuchiya, T., Matsumoto, K., Hatachi, G., Izumino, H., Doi, R., Machino, R., and Nagayasu, T. (2014) Video-assisted thoracic surgery attenuates perioperative oxidative stress response in lung cancer patients: a preliminary study. *Acta Med. Nagasaki*, 59 (1) : 19-25.
- Miyazaki, T., Yamasaki, N., Tsuchiya, T., Matsumoto, K., Takagi, K., Izumino, H., and Nagayasu, T. (2015) Infectious episodes lead to the oxidative stress response after lung transplantation. *Am. J. Case Rep.*, 16: 255-258.
- Murakami, Y., Ito, M., and Ohsawa, I. (2017) Molecular hydrogen protects against oxidative stress-induced SH-SY5Y neuroblastoma cell death through the process of mitohormesis. *PLoS One*, 12 (5) : e0176992. doi:10.1371/journal.pone.0176992.
- 丸岡弘, 藤井健志. (2012) 老化促進モデルマウスにおける還元型コエンザイム Q10 と運動トレーニングが老化や運動能力, 酸化ストレス防御系におよぼす影響. *日本補完代替医療学会誌*, 9 (2) : 97-105.
- 永田勝太郎, 長谷川拓也, 広門靖正, 喜山克彦, 大槻千佳. (2008) 生活習慣病と酸化ストレス防御系. *心身医学*, 48 (3) : 177-183.
- Nakao, A., Toyoda, Y., Sharma, P., Evans, M., and Guthrie, N. (2010) Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome—an open label pilot study. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 46(2): 140-149.
- Nakayama, K., Terawaki, H., Nakayama, M., Iwabuchi, M., Sato, T., and Ito, S. (2007) Reduction of serum antioxidative capacity during hemodialysis. *Clin. Exp. Nephrol.*, 11(3): 218-224.
- Noda, M., Fujita, K., Ohsawa, I., Ito, M., and Ohno, K. (2014) Multiple effects of molecular hydrogen and its distinct mechanism. *J Neurol Disord*, 2 (6). doi:10.4172/2329-6895.1000189.
- Nogueira, J. E., Passaglia, P., Mota, C. M. D., Santos, B. M., Batalhão, M. E., Carnio, E. C., and Branco, L. G. S. (2018) Molecular hydrogen reduces acute exercise-induced inflammatory and oxidative stress status. *Free Radic. Biol. Med.*, 129: 186-193.
- Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., Katsura, K. I., Katayama, Y., Asoh, S., and Ohta, S. (2007) Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.*, 13 (6) : 688-694.
- Ohta, S. (2014) Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen

- medicine. *Pharmacol. Ther.*, 144 (1) : 1-11.
- 奥津光晴, 山田麻未. (2018) 骨格筋の恒常性維持に関する最新知見. *体力科学*, 67 (3) : 245-249.
- Ono, H., Nishijima, Y., Adachi, N., Sakamoto, M., Kudo, Y., Kaneko, K., Nakao, A., and Imaoka, T. (2012) A basic study on molecular hydrogen (H₂) inhalation in acute cerebral ischemia patients for safety check with physiological parameters and measurement of blood H₂ level. *Med. Gas Res.*, 2 (1) : 21. doi:10.1186/2045-9912-2-21.
- Ostojić, S. M., Stojanović, M. D., Calleja-Gonzalez, J., Obrenović, M. D., Veljović, D., Medjedović, B., Kanostrevac, K., Stojanović, M., and Vukomanović, B. (2011) Drinks with alkaline negative oxidative reduction potential improve exercise performance in physically active men and women: Double-blind, randomized, placebo-controlled, cross-over trial of efficacy and safety. *Serbian J. Sport. Sci.*, 5 (3) : 83-89.
- Perez-Campo, R., López-Torres, M., Cadenas, S., Rojas, C., and Barja, G. (1998) The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.*, 168 (3) : 149-158.
- Poole, D. C., and Jones, A. M. (2012) Oxygen uptake kinetics. *Compr. Physiol.*, 2 (2) : 933-996.
- Reid, M. B. (2016) Reactive oxygen species as agents of fatigue. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 48 (11) : 2239-2246.
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C. R., and Blüher, M. (2009) Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106 (21) : 8665-8670.
- Roberts, C. K., and Sindhu, K. K. (2009) Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.*, 84: 705-712.
- 関秦一. (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*, 32 (4) : 301-306.
- Shimouchi, A., Nose, K., Mizukami, T., and Che, D. (2013) Molecular hydrogen consumption in the human body during the inhalation of hydrogen gas. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 789: 315-321.
- Sies, H. (1997) Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, 82 (2) : 291-295.
- スポーツ庁. (2018) 平成 29 年度「スポーツの実施状況等に関する世論調査」について. http://www.mext.go.jp/sports/b_menu/houdou/30/02/_icsFiles/afieldfile/2018/05/02/1401750_01.pdf (参照日 2019 年 1 月 28 日)
- Verbruggen, S. C. A. T., Joosten, K. F. M., Castillo, L., and van Goudoever, J. B. (2007) Insulin therapy in the pediatric intensive care unit. *Clin. Nutr.*, 26 (6) : 677-690.
- 和田正信, 三島隆章, 山田崇史. (2006) 筋収縮における乳酸の役割. *体育学研究*, 51 (3) : 229-239.
- Westerblad, H., and Allen, D. G. (2011) Emerging roles of ROS/RNS in muscle function and fatigue. *Antioxid. Redox Signal.*, 15 (9) : 2487-2499.
- Yahata, T., Suzuki, C., Hamaoka, A., Fujii, M., and Hamaoka, K. (2011) Dynamics of reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential in the acute stage of Kawasaki disease. *Circ. J.*, 75 (10) : 2453-2459.
- 柳堀朗子, 青木和夫, 鈴木洋児, 郡司篤晃. (1991) トレーニングの運動強度の違いが呼吸循環機能と血清脂質に及ぼす効果. *日本衛生学雑誌*, 46 (3) : 777-787.