体力科学 第69巻 第2号 211-220 (2020)
DOI：10.7600/jspfsm.69.211

原　著

最大下運動に対する呼気イソプレン排出応答と酸化ストレス応答の関連性

堀 天[1*]，水上 健一[2]，尾方 寿好[2]，馬場 礼三[2]，近藤 孝晴[2]，堀田 典生[2]

Relationship between breath isoprene excretion and oxidative stress responses to submaximal exercise

Amane Hori[1*], Kenichi Suijo[2], Hisayoshi Ogata[2], Reizo Baba[2], Takaharu Kondo[2] and Norio Hotta[2]

[1]中部大学大学院生命健康科学研究科，〒487-8501 愛知県春日井市松本町1200 ***(Graduate School of Life and Health Sciences, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai-shi, Aichi 487-8501, Japan)***
[2]中部大学生命健康科学部，〒487-8501 愛知県春日井市松本町1200 ***(College of Life and Health Sciences, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai-shi, Aichi 487-8501, Japan)***

Received: August 17, 2019 / Accepted: December 3, 2019

Abstract The physiological functions of expiratory isoprene, which is abundantly contained in human breath, are not well known. Recently, breath isoprene has been proposed to be related to oxidative stress, although no direct evidence has been reported. Therefore, the purpose of this study was to investigate the relationship between breath isoprene and oxidative stress status. Ten healthy male subjects performed a 20-min submaximal step-load cycling exercise, the intensity of which corresponded to a 60% peak oxygen uptake after a 10-min rest. Breath isoprene excretion during the exercise was calculated from the product of minute ventilation and isoprene expiratory concentration. To evaluate the oxidative stress, we collected blood samples from the subject's fingertips before and immediately after the end of the exercise, and then diacron reactive oxygen metabolites (d-ROMs), which is an index of oxidative stress level, and biological antioxidant potential (BAP), which is an index of antioxidant potential, were measured. The breath isoprene concentration at the rest was significantly positively correlated with the ratio from BAP to d-ROMs (BAP/d-ROMs), which is an index of latent antioxidant potential ($r = 0.63$, $P < 0.05$). Furthermore, the change in breath isoprene excretion from before to after the exercise was significantly negatively correlated with the change in d-ROMs ($r = -0.73$, $P < 0.05$) and positively correlated with the change in BAP/d-ROMs ($r = 0.88$, $P < 0.01$). These results suggest that isoprene might play a role in the control of oxidative stress.

Jpn J Phys Fitness Sports Med, 69(2): 211-220 (2020)

Keywords : volatile organic compounds, exercise-induced oxidative stress, antioxidant potential, skeletal muscles, mevalonate pathway

緒　言

ヒトの呼気にはアセトン，エタノール，メタノール等の多様な内在性の揮発性有機化合物が含まれていることが知られおり，イソプレンはその中の１種である[1,2]．イソプレンとは，化学式C_5H_8で示される，34℃の沸点を有する不飽和炭化水素で，2-メチル-1,3-ブタジエン（CAS登録番号78-79-5）としての名前でも知られている[3]．1950年代半ばに植物の葉から放出される生物起源の炭化水素として発見され[4]，それ以降の研究により微生物や動物，ヒトからも排出されることが判明した[5,6]．Kushchら[7]は健康な成人の安静時の呼気にはおよそ5.8 ppbから274.9 ppbのイソプレンが含まれることを報告している．

生体におけるイソプレンの産生機序はいまだ不明な点が多いが，ラットにおいては，肝臓内のアセチルCoAからコレステロールを産生するメバロン酸経路においてイソプレンが産生されることが報告されている[5]．線維化が進んだ慢性肝疾患患者においては，健康な者と比べて呼気中のイソプレン濃度が低いことも報告されており[8]，ヒトにおいても同様の経路で産生されると考えられている[5,9,10]．

体内で産生されたイソプレンは，拡散に従い静脈血から肺に移動し，その一部が呼気として排出される[10]．呼気イソプレン排出に与える影響として，新生児の呼気中からは検出されないことが報告されているが[11]，年齢と

*Correspondence: amane199679@gmail.com

の関係は未だ議論中である[7,10-14]．その他のイソプレンに対する影響として，食事や体格指数は呼気イソプレン濃度に影響しないことが報告されている[7,15]．性別においては，男性の方が女性よりも呼気イソプレン濃度が高いと報告されている[15]．一方で，性別との関係はみられなかったと報告している先行研究もあり[7,14]，一致した結果は得られていない．

イソプレンの生理学的役割は不明であるが，現在に至るまで，イソプレンが酸化ストレスと関係し得ることが予想されている[16-18]．酸化ストレスとは，生体内の活性酸素種（Reactive Oxygen Species, 以下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が崩れた状態と定義されている[19]．イソプレンと酸化ストレスとの関係について，植物ではイソプレンにROSからの保護作用があることが想定されており[20]，ヒトにおいても同様の役割を有することが予想されている[16]．実際に，酸化ストレスの増大がみられる心不全患者[21]や急性呼吸促迫症候群患者[22]においては，健康な者と比べて呼気イソプレン濃度が有意に低いという報告がされている[17,18]．しかし，ヒトにおけるイソプレンが酸化ストレスと関係するという直接的な証拠は，我々が知る限り報告されていない．そこで，本研究では，健常なヒトを対象に，安静時における呼気イソプレンと酸化ストレスとの関連性を検討することを第一の目的とした．

運動によってROSの産生量は増加し，そのROSの過剰産生に抗酸化機能が追い付かなくなると，酸化ストレスが増大することが知られている[19]．そのため，イソプレンが酸化ストレスや酸化還元状態の制御に関係するのであれば，運動による呼気イソプレン排出応答と酸化ストレスの変化との間にも関連性がみられるのではないかと考えられた．そこで，第二の目的として，運動に対する呼気イソプレン排出応答と酸化ストレス応答との関連性を検討することにした．

方　法

被検者　競技スポーツ選手ではない健康な男性10名が本研究に参加した．被検者の年齢，身長，体重及び体格指数（BMI）は，Table 1に示した．被検者全員に本研究の目的，方法を説明した後に本研究への参加の同意を得た．本研究は，中部大学倫理委員会の承認の下で行われた（承認番号300065）．

研究の手順　被検者は，インフォームドコンセント取得以外に，3回の測定に参加した．1回目では，自転車エルゴメーターを用いた漸増運動負荷試験に慣れるための練習を行った．2回目では，先の運動負荷試験によって被検者の最高酸素摂取量を測定した．3回目には，座位安静の後に，2回目の運動負荷試験の結果をもとに算出された負荷強度で，20分間の最大下自転車運動を実施した．この試験中に呼気を採取し，安静時および運動中の呼気イソプレン濃度の変化を観察した．さらに，運動前の安静時と運動終了直後に採血を実施し，酸化ストレスの評

Table 1. Characteristics of study subjects.

Subjects	Age (years)	Height (cm)	Body mass (kg)	BMI	$\dot{V}O_{2peak}$ (mL/min)	isoprene $_{BL}$ (ppb)
a	22	169.6	53.8	18.7	1625	146.5
b	21	169.3	55.4	19.3	2527	142.4
c	20	169.4	67.4	23.5	2767	177.3
d	21	180.6	83.3	25.5	3299	103.0
e	38	172.6	65.2	21.9	2971	70.2
f	21	181.7	70.1	21.2	3029	148.9
g	19	177.0	66.8	21.3	2545	66.0
h	21	177.5	68.5	21.7	3655	136.2
I	18	183.5	72.9	21.6	3153	157.1
J	20	163.2	70.9	26.6	3450	84.6
Mean	22	174.4	67.4	22.1	2902	123.2
SE	2	2.1	2.7	0.8	183	12.4

BMI: body mass index
$\dot{V}O_{2peak}$: peak oxygen uptake
isoprene $_{BL}$: isoprene concentration at rest before the start of the exercise

価をした．また，これら３回の測定は全て別日に行った．

最高酸素摂取量（$\dot{V}O_{2peak}$）の測定　後述する20分間の最大下運動の負荷の設定のために，$\dot{V}O_{2peak}$を自転車エルゴメーター（Aerobike 75XLIII, コンビウェルネス）を用いたランプ負荷法によって測定した．５分間安静にした後，３分間の０Ｗ空こぎの予備運動後に１分間に20 Ｗずつ直線的に漸増させた．自転車エルゴメーターの回転数を60 rpmに制限し，検者の激励にもかかわらず回転数が50 rpmを下回り，60 rpmに戻せないと判断した時点で運動中止とした．酸素摂取量（$\dot{V}O_2$）は呼気ガス分析装置（エアロモニタ AE-310S, ミナト医科学）を用いて，１呼吸毎に測定した．データは20秒平均し，その$\dot{V}O_2$の最高値を本実験の$\dot{V}O_{2peak}$とした．

20分間の最大下運動及び呼気イソプレンの測定　実験プロトコルをFig. 1に示した．被検者は本試験開始前までに13時間の絶食を行った．測定は，午前9：00から11：00の間に実施した．被験者は実験室に来室し，充分な休息をとった後，10分間の座位安静に続いて20分間の最大下運動を行った．その後，自転車エルゴメーターに乗った状態のまま５分間の安静回復をした．

最大下運動は，先の運動負荷試験と同じ自転車エルゴメーターを用いた．負荷は$\dot{V}O_{2peak}$の60％に相当するステップ状負荷とし，回転数は60 rpmとした．座位安静開始時から純空気（酸素21％, 二酸化炭素０％, 窒素バランス）を吸入させた．その理由は，イソプレン測定のための校正過程で，イソプレンの標準ガスが実験室内に漏れ，それを被検者が吸入する可能性を無くすためであった．純空気はガスボンベ（名古屋興酸）から供給し，200 Ｌのダグラスバックにて緩衝した後に，蛇管と三方活栓（ハンズルドルフ社）と呼吸マスク（ミナト医科学）を介して被検者へ送った．

呼気は，三方活栓から蛇管を介して呼気回収用に準備した50 Ｌのダグラスバックに集められた．そして，呼気に含まれるイソプレン濃度をガスクロマトグラフ法にて測定した（半導体式微量ガス計測装置, VOC1号機, フィガロ技研）．毎分換気量（$\dot{V}_E$）は，呼気回収用のダグラスバックの直前にて，熱線流量計（エアロモニタ AE-310S, ミナト医科学）を用いて30秒から１分毎に計測した．

呼気採取のポイントはFig. 1に示すように，安静10分の最後の１分と，運動開始から５分後までは１分毎，その後は，７，10，15，20分，運動終了後２分と５分の計12ポイントとした．安静10分の最後の１分間，それ以外の測定ポイントでは30秒間呼気をダグラスバックに集めた．

また，安静時と運動終了直後には，指尖により血液を約300 μL採取し，酸化ストレスの評価のための分析を行った．

本研究では，運動前の安静値をベースライン，運動後の安静値（運動終了２分と５分後）をリカバリーと呼ぶこととした．

酸化ストレス度（d-ROMs）と抗酸化能力（BAP）の測定　上述にて採取した血液を遠心分離し，得られた血漿からフリーラジカル解析装置（FREE Carrio Duo, ウイスマー）を用いて酸化ストレスを評価した．この解析装置では, diacron reactive oxygen metabolites（d-ROMs）テスト及びbiological antioxidant potential（BAP）テストの２種類の測定が可能である．

d-ROMsテストは，ROSの作用によって産生された血中のヒドロペルオキシドの濃度を測定し，生体の酸化ストレス度を評価する[23-27]．d-ROMsテストで得られる酸化ストレス度の基準値は，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

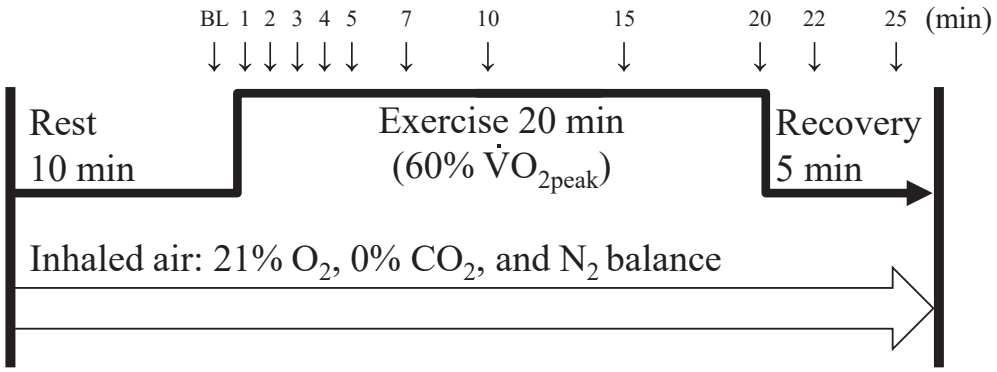

Fig. 1　Experimental protocol of the submaximal exercise testing.
BL（Baseline）: rest before the start of the exercise
↓: collection timing of exhaled breath
The exercise load was a 60% $\dot{V}O_{2peak}$ of each subject.

酸化ストレス：>501 UCARRとされている[25]．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 H_2O_2に相当する[28]．

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[24-27]．血漿中の抗酸化物質が試薬内の鉄イオンをFe^{3+}からFe^{2+}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生体の抗酸化能力を評価する．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とされている[25]．さらに，本研究では，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）を算出し[29-31]，酸化ストレス度と抗酸化能力の平衡を示す潜在的抗酸化能とした[32]．永田ら[33]は，日本人健常者のBAP/d-ROMsの値は7.54±0.98以上が望ましい値と提案している．

呼気イソプレン排出応答の解析　本研究では，呼気イソプレン濃度の測定のみならず，運動時の呼気イソプレン濃度と$\dot{V}_E$の積により算出したものを呼気イソプレン排出量として求めた．そして，酸化ストレスの各指標との関連性を検討するための運動に対する呼気イソプレン排出応答として，本研究では四つの排出量の指標を算出した．運動に対する呼気イソプレン排出の評価に濃度ではなく，排出量を用いた理由は，$\dot{V}_E$の急激な増加による希釈効果によって呼気イソプレン濃度が低下し[34]，運動中の呼気イソプレンの評価を低く見積もってしまうことを避けるためであった．

本研究では，運動開始直後に呼気イソプレンが急激に増加するような反応がみられた（Fig. 3）．そこで，一つ目の指標として，呼気イソプレン排出量の最大値（運動開始2分または3分）からベースライン（運動開始前の安静）の差とし，Δisoprene $_{Max-BL}$と定義した（BLはBaseline, ベースライン, の略）．絶対値ではなく，ベースラインからの差による数値を用いた理由は，ベースラインの呼気イソプレン濃度の個人差（SD＝39.16 ppb, CV＝0.32）を考慮して運動に対する応答を判断するためであった．

二つ目は，20分間の運動全体における呼気イソプレン排出応答を評価するために，運動開始から運動終了までの呼気イソプレン排出量の時間曲線下面積（Area Under the Curve: AUC）を算出し，isoprene AUCと定義した．

呼気イソプレン排出量は一度急増した後，指数関数様に低下するという振る舞いを示した（Fig. 3C）．そこで，運動開始から呼気イソプレン排出量が運動中に収束するまでの時間（最大値に至るまでの時間とそれ以降指数関数でフィッティングした際の時定数の和）を算出し，呼気イソプレン排出量の収束応答時間（Convergent Response Time: CRT）とし，isoprene CRTと定義して三つ目の指標とした．

四つ目の指標として，運動前後の筋収縮していない安静状態において，呼気イソプレン排出量がどの程度変化したのかを検討するために，ベースラインからリカバリー2分目の差を算出し，Δisoprene $_{BL-Rec}$とした（RecはRecovery, リカバリー, の略）．

統計　実験中の呼気イソプレン濃度と，呼気イソプレン排出量，$\dot{V}_E$の変化の解析には一要因分散分析を行った．主効果に有意差が認められた場合は，ベースラインの値に対して有意差が認められるポイントをBonferroni法による多重比較によって特定した．

運動による酸化ストレスの変化を検討するため，ベースラインと運動終了直後のd-ROMs，BAP，BAP/d-ROMsの比較には，対応のあるt検定を行った．

運動前後で酸化ストレスがどの程度変化したのかを評価するために，d-ROMs，BAP，BAP/d-ROMsの運動終了時の値から安静時の値の差を算出し，それぞれ，Δd-ROMs，ΔBAP，ΔBAP/d-ROMsとした．そして，それらと運動に対する呼気イソプレン排出応答の四つの指標（Δisoprene $_{Max-BL}$, isoprene AUC, isoprene CRT, Δisoprene $_{BL-Rec}$）との関連性をピアソンの相関係数を用いて検討した．また，ベースラインの呼気イソプレン濃度（以下isoprene $_{BL}$）と酸化ストレスの指標との関連性も同様に検討した．

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StatView5.0及びSPSS（24.0 for windows）ソフトウェアを用いた．

結　果

被検者の特徴　各被検者の身体的特徴と$\dot{V}O_{2peak}$，isoprene $_{BL}$の平均値及び標準誤差をTable 1に示した．Kushchら[7]は，205名の健常な成人における安静時の呼気イソプレン濃度は5.8 ppbから274.9 ppbの範囲であったと報告している．本研究の全被検者のそれもその範囲内であった．

安静時の呼気イソプレン濃度（isoprene $_{BL}$）と酸化ストレスとの関連性　isoprene $_{BL}$と，安静時のd-ROMs及びBAPとの間には有意な相関関係はみられなかった（Fig. 2A, B）．しかし，それらは統計的には有意ではないものの，isoprene $_{BL}$が大きいほどd-ROMsの値は小さく，BAPの値は大きくなる傾向であった．その結果，BAP/d-ROMsとの間には有意な正の相関関係が認められた

(Fig. 2C).

20分間の最大下運動実験中の呼気イソプレン排出応答　Fig. 3は$\dot{V}_E$と，呼気イソプレン濃度，$\dot{V}_E$と呼気イソプレン濃度の積より算出された呼気イソプレン排出量の経時変化を示している．一要因分散分析の結果，運動により三つの指標とも有意な変化を示した（$P<0.01$）．多重比較の結果，$\dot{V}_E$はベースラインに比べて運動開始1分以外の運動時の測定ポイントにおいて有意に増加した（Fig. 3A）．呼気イソプレン濃度は運動開始直後より急増し，運動開始1分後に最大をむかえた（Fig. 3B）．運動開始2分以降は指数関数的に低下し，やがてベースラインを下回るような変化を示した．この呼気イソプレン濃度の一定負荷運動に対する応答は，先行研究とよく一致した応答であった[10,35,36]．多重比較の結果，運動開始1，2分で有意な増加が認められた．運動7分以降は，ベースラインと比べて低い値となったが有意な差はみられなかった．呼気イソプレン排出量も，呼気イソプレン濃度と同じような応答を示した（Fig. 3C）．ベースラインと比べて，運動開始1，2，3，4，5分において有意に増加したが，やがてベースラインに近づいた．

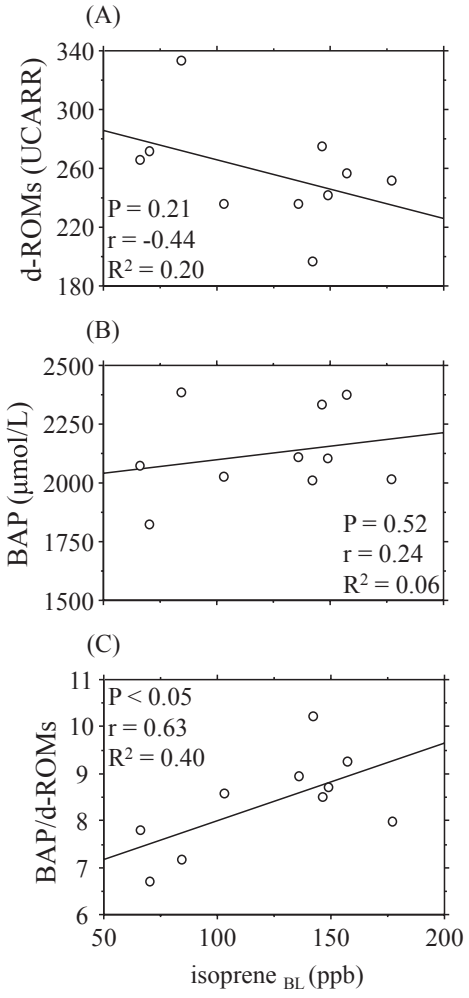

Fig. 2　Relationships between isoprene $_{BL}$ and d-ROMs（A），BAP（B）or BAP/d-ROMs（C）at rest.
isoprene $_{BL}$: isoprene concentration at rest before the start of the exercise
d-ROMs（diacron reactive oxygen metabolites), BAP（biological antioxidant potential）and BAP/d-ROMs（latent antioxidant potential）are the values at rest before the start of the exercise.
r: correlation coefficient
R^2: coefficient of determination

運動による酸化ストレスの変化　運動によるd-ROMs，BAP，BAP/d-ROMsの変化の結果をTable 2に示した．d-ROMs及びBAPは，運動により有意に増加した．しかし，BAP/d-ROMsは，有意な変化を示さなかった（$P=0.13$）．

運動に対する呼気イソプレン排出応答と酸化ストレスとの関連性　運動に対する呼気イソプレン排出応答と酸化ストレス応答との関連性の検討のために，呼気イソプレン排出量の指標とΔd-ROMs，ΔBAP，ΔBAP/d-ROMsとの相関係数を求めた．Δisoprene $_{Max-BL}$及びisoprene AUCは，酸化ストレス応答の指標との有意な相関関係は認められなかった（Table 3）．

すべての被検者におけるisoprene CRTは20分以前（6.7±1.3分（運動開始時を0分とした），$R^2\geq0.93$）であった．また，運動中の呼気イソプレン排出量は，一名を除いて，減少が収束した後もベースラインを下回らなかった．isoprene CRTとΔd-ROMs，ΔBAP，ΔBAP/d-ROMsとの関係をTable 3に示した．isoprene CRTにおいても酸化ストレス応答の指標と有意な相関関係はみられなかった．

また，運動前後により呼気イソプレン排出量がどの程度変化したかを評価するために，Δisoprene $_{BL-Rec}$を求め，酸化ストレス応答の指標との相関関係を検討した．Δd-ROMsとは有意な負の相関関係を示し（Fig. 4A），ΔBAPとは正の相関関係の傾向がみられた（Fig. 4B）．そして，それらの相反する関係より，ΔBAP/d-ROMsでは有意な正の相関関係がみられた（Fig. 4C）．

考　察

本研究は，安静時における呼気イソプレンと酸化ストレスとの関連性を検討することを目的とした．また，第二の目的として，運動に対する呼気イソプレン排出応答と酸化ストレス応答との関連性を検討することにした．本研究の主な結果は，以下の通りである．（1）安静時の呼気イソプレン濃度と潜在的抗酸化能の指標としたBAP/d-ROMsとの間に有意な正の相関関係がみられた．（2）20分の最大下運動により，呼気イソプレン濃度及び呼気イソプレン排出量は有意な変化を示した．その

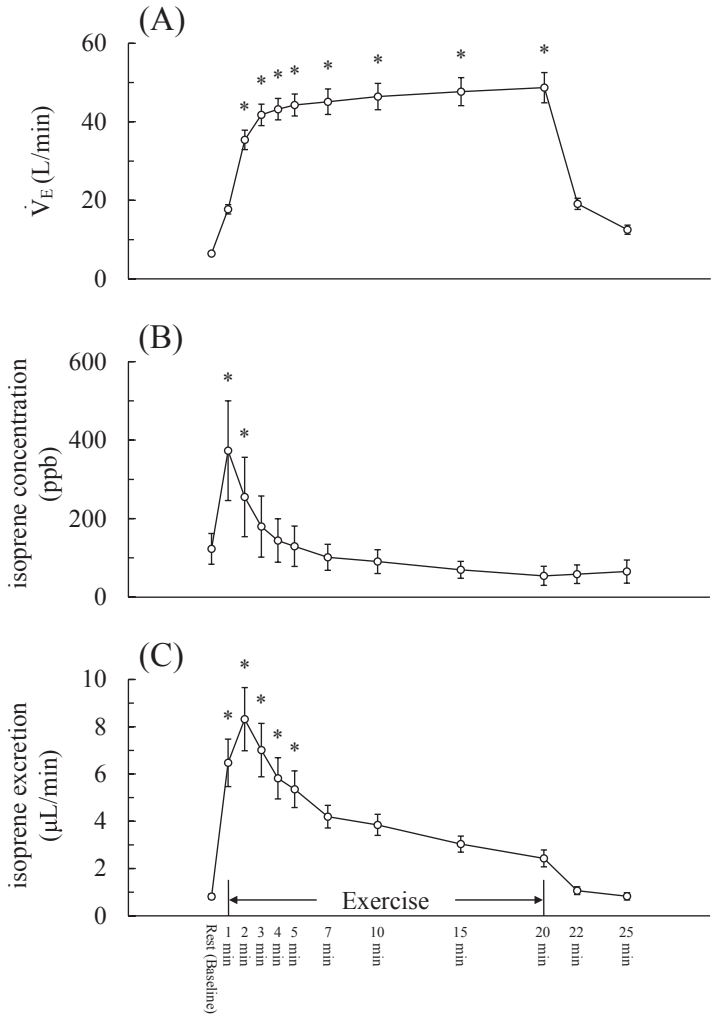

Fig. 3 Time course of minute ventilation ($\dot{V}_E$) (A), isoprene concentration (B), and isoprene excretion (C) before, during and after the submaximal exercise testing.
Values are means ± SE (n = 10).
*: significant difference vs. Rest (Baseline) ($P < 0.0001$)
Isoprene excretion (C) was calculated from the product of $\dot{V}_E$ (A) and isoprene concentration (B).

Table 2. d-ROMs, BAP and BAP/d-ROMs before and after the submaximal exercise testing.

	Before	After
d-ROMs (UCARR)	257±11	285±15*
BAP (μmol/L)	2125±58	2475±70*
BAP/d-ROMs	8.4±0.3	8.9±0.6

Values are means ± SE (n = 10).
*: significant difference vs. Before ($P < 0.01$)
d-ROMs: diacron reactive oxygen metabolites
BAP: biological antioxidant potential
BAP/d-ROMs (the ratio between BAP and d-ROMs): latent antioxidant potential

変化の仕方は，運動開始直後に有意に増加し，ピークを迎えた後は，指数関数的に低下した．この呼気イソプレン濃度及び排出量の一定負荷の運動に対する応答は，先行研究のそれとよく一致した[10,35,36]．（3）運動前後の筋収縮のない状態における呼気イソプレン排出量の変化（Δisoprene $_{BL-Rec}$）と運動による酸化ストレス度の変化の指標としたΔd-ROMsとは有意な負の相関が認められた．さらに，抗酸化能力の変化を示すΔBAPとは正の相関関係の傾向がみられ，潜在的抗酸化能の変化の指標としたΔBAP/d-ROMsとは有意な正の相関関係を示した．我々の知る限り，本研究により，新たに（1）と（3）を明らかにした．

安静時における呼気イソプレン排出と酸化ストレスとの関連性　安静時の呼気イソプレン濃度とBAP/d-ROMsにて評価した潜在的抗酸化能との間には正の相関関係がみられた．潜在的抗酸化能は，酸化ストレス度と抗酸化能力のバランスを示しており，高値であるほど酸化ストレスが小さいことを示唆する．従って，本結果から，安静時では呼気イソプレン濃度が大きいほど酸化ストレスが小さいことが考えられた．

Table 3. Relationships between Δisoprene $_{Max-BL}$, isoprene AUC or isoprene CRT and Δd-ROMs, ΔBAP or ΔBAP/d-ROMs.

	Δisoprene $_{Max-BL}$		isoprene AUC		isoprene CRT	
	r	P	r	P	r	P
Δd-ROMs	-0.18	0.63	0.03	0.93	-0.25	0.49
ΔBAP	-0.05	0.89	-0.15	0.70	-0.05	0.89
ΔBAP/d-ROMs	0.11	0.77	-0.10	0.78	0.43	0.29

Δisoprene $_{Max-BL}$: isoprene excretion calculated as difference between rest before the start of the exercise and maximum value at onset of the exercise
isoprene AUC: area under the curve of the isoprene excretion during the exercise
isoprene CRT: convergent response time of the isoprene excretion to the exercise
Δd-ROMs (diacron reactive oxygen metabolites), ΔBAP (biological antioxidant potential) and ΔBAP/d-ROMs (latent antioxidant potential) were calculated as differences between the values of rest before the start of the exercise and the exercise-end.
r: correlation coefficient

酸化ストレスの増大がみられる心不全患者[21]や急性呼吸促迫症候群患者[22]においては，健常者に比して安静時の呼気イソプレン濃度が低いことが報告されており[17,18]，これらの報告と本結果は一致し得る．植物生理学分野では，イソプレンには共役二重結合系を介した直接的なROSの消去の働きがあるという仮説が立てられている[20]．実際に，大気中では，イソプレンはヒドロキシラジカルやオゾンといったROSと反応することが報告されている[37]．そのため生体内でも同様な働きによってROSを消去しているのかもしれない．

以上より，ヒトにおけるイソプレンの生理学的役割として，酸化ストレスの抑制に関与する可能性を示した．

20分間の最大下運動に対する酸化ストレス応答　最大酸素摂取量の50％や60％に値する中強度以上の運動によって酸化ストレスが増大することが報告されていることから[38,39]，本研究においても，酸化ストレスの増大が予想される20分間の60％ $\dot{V}O_{2peak}$ に相当する負荷を選択した．事実，本自転車運動によりd-ROMsは有意に増加したため，酸化ストレスを増大させるのに十分な運動であったと考察できる．また，運動後のBAPの値も有意に増加したことから，運動により抗酸化能力も増大したことが示唆された．これは，酸化ストレスの増大による酸化的損傷を抑制するための生体の抗酸化機構の応答によるものと考えられた[19]．

運動時の呼気イソプレン排出と最大下運動との関連性
呼気イソプレン排出量は運動開始２分で最大をむかえた後，徐々に減少した．この運動開始直後の一過性の急増は，全身に拡散されていたイソプレンが運動開始直後の静脈還流増加により一遍に呼気として排出されたことがその理由の一部として考えられた．

一方，骨格筋量の少ない筋ジストロフィー症患者の呼気イソプレン濃度が低いことから，イソプレンは骨格筋組織にプールされているというコンセプトが提案されている[16]．このコンセプトは，筋量の多い下肢の運動の方が筋量の少ない上肢の運動に比べて，呼気イソプレン排出が増えることからも支持されている[40]．また，Kingら[35]は，２回の同一強度の自転車運動において，２回目の運動を比較的短い休憩の後実施した場合と，比較的長い休憩の後実施した場合では，どちらも１回目に比べて運動開始直後の呼気イソプレン排出が減るが，後者の方が前者に比べて回復していることを示している．この結果もイソプレンは骨格筋組織にプールされているというコンセプトを支持し得る．従って，骨格筋組織にプールされていたイソプレンが筋血流の増加により拡散が促進された結果，運動開始直後に呼気より急激に放出され，徐々に枯渇に向かっていったものと考えられた．

ここで疑問となるのは，骨格筋にてイソプレンの“産生”が生じた，あるいは，増えたかである．運動中は血流再配分により，主なイソプレンの産生場所と考えられている肝臓への血流量が減少すると考えられる[41]．事実，肝臓の血流量の測定に使用されるインドシアニングリーン試験[42]を用いて，運動時の内臓への血流量を検討した先行研究では，本研究と同一の60％ $\dot{V}O_{2peak}$ に相当する強度の運動中に内臓への血流量が有意に低下することを明らかにしている[43]．そのため，肝臓由来のイソプレンが減少し，運動後半では骨格筋内に貯蔵されていたイソプレンも枯渇してしまい，呼気イソプレン排出量はベースラインに比べ低下すると考えられた．しかし，本研究では，すべての被検者の呼気イソプレン排出量の減少は運動終了前に収束していたにも関わらず，一名以外は運動終了までベースラインを下回らなかった．

イソプレン産生経路としてメバロン酸経路が考えられているが[5,9,10]，骨格筋内にも同経路が存在することが知られている[44]．運動による筋血流増加によりメバロン酸

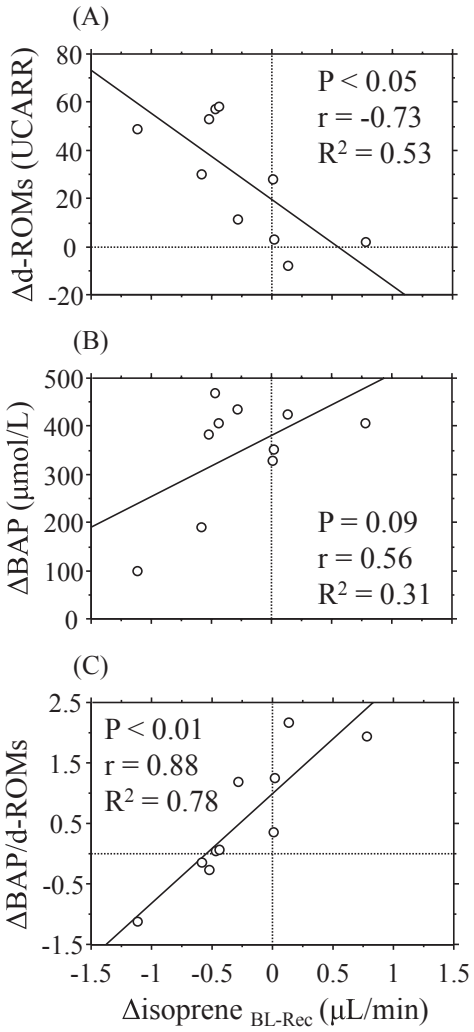

Fig. 4 Relationships between isoprene $_{BL\text{-}Rec}$ and Δd-ROMs (A), ΔBAP (B) or ΔBAP/d-ROMs (C).
Δisoprene $_{BL\text{-}Rec}$: isoprene excretion calculated as difference between before and after the exercise
Δd-ROMs (diacron reactive oxygen metabolites), ΔBAP (biological antioxidant potential) and ΔBAP/d-ROMs (latent antioxidant potential) were calculated as differences between the values of rest before the start of the exercise and the exercise-end.
r: correlation coefficient
R^2: coefficient of determination

経路の反応が亢進した結果，骨格筋においてイソプレンの産生を増やしたのかもしれない．この予想は先行研究の推察[16]とも符合するが，我々の知る限り，実際に骨格筋内のメバロン酸経路においてイソプレンが産生されたという証拠は，これまでのところ示されていない．

運動に対する呼気イソプレン排出応答と酸化ストレス応答との関連性　本研究では，運動による酸化ストレスの変化との関連性を検討するために，呼気イソプレン排出応答の四つの指標を用いた．

Δisoprene $_{Max\text{-}BL}$は，運動中の呼気イソプレン排出量の最大値（運動開始２分または３分）からベースライン（運動開始前の安静）の差である．前述の通り，運動開始時の呼気イソプレン排出の急増は，骨格筋への血流量増加に伴い，静脈へ大量の骨格筋由来のイソプレンが移行し，結果として呼気中へ排出されたためと考えられ[40]，その評価に本指標を用いた．しかし，本研究では，Δisoprene $_{Max\text{-}BL}$と酸化ストレスの指標との間に有意な相関関係はみられなかった．従って，一過性の呼気イソプレン排出の急増と酸化ストレス応答に関連性があるとは考えにくい．

isoprene AUCは，運動開始から運動終了までの呼気イソプレン排出量の時間曲線下面積である．この指標は，体内にプールされていると予想されるイソプレンおよび運動中に産生・排出されたイソプレンの総量を示すと考えられる．一方，呼気イソプレンの収束応答を示すisoprene CRTはイソプレン排出速度と運動中のイソプレン産生量のバランスで決まると考えられる．しかし，これらの指標と酸化ストレス応答の指標間に有意な相関関係は認められなかった．従って，運動中の呼気イソプレン排出応答と酸化ストレス応答に関連性があるとは言えない．

Δisoprene $_{BL\text{-}Rec}$は，筋収縮によるイソプレン放出がない状態において，運動前後の呼気イソプレン排出量の変化を検討するための指標とした．本結果から，運動後の呼気イソプレン排出量が，運動前に比べて低値であるほど酸化ストレス応答も低値であることが示された．

呼気イソプレン排出量は生体内のイソプレン量を反映し得るため，呼気イソプレン排出量が減少しているのであれば，生体内のイソプレン量も減少していると考えられる．これは，イソプレンが運動により増大したROSを，共役二重結合を介して直接的に消去したことによって[20]，イソプレン自体も減少した可能性が考えられた．また，抗酸化作用を担うコエンザイムQやスクアレンはポリイソプレンの一種であるため[45,46]，イソプレンはこれらの合成に関与する可能性が考えられている[16]．従って，酸化ストレスを低下させるために，それらの抗酸化物質を体内で産生する過程でイソプレンの消費は増大し，その結果，運動後のイソプレンが減少したと考えられた．以上より，運動時においては，イソプレンが運動誘発性酸化ストレスの抑制に関与する可能性が考えられた．

本研究の体力科学分野における意義　酸化ストレスの過度な増大が運動パフォーマンスに対して負の影響を与えることが考えられているため[47]，運動指導の現場において酸化ストレスを測定することは重要であると考えられる．しかし，それを測定するためには，採血や採尿をする必要があり，被測定者の身体・精神的負担になり得る．もし，呼気イソプレン排出応答と酸化ストレス応答

との関係が明らかになれば，酸化ストレス測定を非侵襲的かつ簡易な呼気イソプレン測定で代用出来る可能性がある．今後，呼気イソプレンと酸化ストレスとの関係について，さらなる検討が必要である．

本研究の限界　現在に至るまで，ヒトにおけるイソプレンの正確な産生機序や，生理学的役割は不明のままである．本研究はそれらの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．

本研究では，運動による酸化ストレスの変化を検討したが，運動中の酸化ストレス動態は不明である．そのため，運動中の酸化ストレスの変化と呼気イソプレン排出応答との関連性は明らかにできなかった．また，呼気イソプレン排出応答と酸化ストレスの直接的な関係性や因果関係について，本研究では明らかに出来なかった．しかし，本研究は，生体内のイソプレンが酸化ストレスの抑制に関与し得るという証拠を提示したという点でそれ以上の価値を持つものと考えられる．

結　論

本研究では，安静時および運動時の呼気イソプレン排出と酸化ストレスとの関連性を検討することを目的とした．その結果，安静時においては，呼気イソプレン濃度が高いほど潜在的抗酸化能が高いことを示した．さらに，運動においても，運動前後の呼気イソプレン排出量の差が大きいほど潜在的抗酸化能が高いことを示した．以上より，生体内のイソプレンは，酸化ストレスの増大の抑制に関与する可能性が示唆された．

謝　辞

増田稜太氏（中部大学生命健康科学部）の多大なご協力に心から感謝致します．

利益相反自己申告：申告すべきものはない．

引 用 文 献

1) Gelmont D, Stein RA, Mead JF. Isoprene – the main hydrocarbon in human breath. *Biochem Biophys Res Commun* 99: 1456–1460, 1981.
2) Fenske JD, Paulson SE. Human breath emissions of VOCs. *J Air Waste Manage Assoc* 49: 594–598, 1999.
3) Dahl AR, Birnbaum LS, Bond JA, Gervasi PG, Henderson RF. The fate of isoprene inhaled by rats: Comparison to butadiene. *Toxicol Appl Pharmacol* 89: 237–248, 1987.
4) Sanadze G. Nature of gaseous substances from the Robinia pseudoacacia leaves. *Rep Akad Nauk GruzSSR* 19: 83–85, 1957.
5) Deneris ES, Stein RA, Mead JF. Acid-catalyzed formation of isoprene from a mevalonate-derived product using a rat liver cytosolic fraction. *J Biol Chem* 260: 1382–1385, 1985.
6) Kuzma J, Nemecek-Marshall M, Pollock WH, Fall R. Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene. *Curr Microbiol* 30: 97–103, 1995.
7) Kushch I, Arendacká B, Štolc S, Mochalski P, Filipiak W, Schwarz K, Schwentner L, Schmid A, Dzien A, Lechleitner M, Witkovský V, Miekisch W, Schubert J, Unterkofler K, Amann A. Breath isoprene – aspects of normal physiology related to age, gender and cholesterol profile as determined in a proton transfer reaction mass spectrometry study. *Clin Chem Lab Med* 46: 1011–1018, 2008.
8) Alkhouri N, Singh T, Alsabbagh E, Guirguis J, Chami T, Hanouneh I, Grove D, Lopez R, Dweik R. Isoprene in the exhaled breath is a novel biomarker for advanced fibrosis in patients with chronic liver disease: A pilot study. *Clin Transl Gastroenterol* 6: e112, 2015. doi: 10.1038/ctg.2015.40.
9) Stone BG, Besse TJ, Duane WC, Dean Evans C, DeMaster EG. Effect of regulating cholesterol biosynthesis on breath isoprene excretion in men. *Lipids* 28: 705–708, 1993.
10) Karl T, Prazeller P, Mayr D, Jordan A, Rieder J, Fall R, Lindinger W. Human breath isoprene and its relation to blood cholesterol levels : new measurements and modeling. *J Appl Physiol* 91: 762–770, 2001.
11) Nelson N, Lagesson V, Nosratabadi AR, Ludvigsson J, Tagesson C. Exhaled isoprene and acetone in newborn infants and in children with diabetes mellitus. *Pediatr Res* 44: 363–367, 1998.
12) Mendis S, Sobotka PA, Euler DE. Pentane and isoprene in expired air from humans: gas-chromatographic analysis of single breath. *Clin Chem* 40: 1485–1488, 1994.
13) Taucher J, Hansel A, Jordan A, Fall R, Futrell JH, Lindinger W. Detection of isoprene in expired air from human subjects using proton-transfer-reaction mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 11: 1230–1234, 1997.
14) Smith D, Španěl P, Enderby B, Lenney W, Turner C, Davies SJ. Isoprene levels in the exhaled breath of 200 healthy pupils within the age range 7–18 years studied using SIFT-MS. *J Breath Res* 4: 017101, 2010.
15) Kinoyama M, Nitta H, Watanabe A, Ueda H. Acetone and isoprene concentrations in exhaled breath in healthy subjects. *J Heal Sci* 54: 471–477, 2008.
16) King J, Mochalski P, Unterkofler K, Teschl G, Klieber M, Stein M, Amann A, Baumann M. Breath isoprene: muscle dystrophy patients support the concept of a pool of isoprene in the periphery of the human body. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 526–530, 2012.
17) McGrath LT, Patrick P, Silke B. Breath isoprene in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 3: 423–427, 2001.
18) Schubert J, Muller W, Benzing A, Geiger K. Application of a new method for analysis of exhaled gas in

critically ill patients. *Intensive Care Med* 24: 415-421, 1998.
19) Koyama K. Exercise-induced oxidative stress: A tool for "hormesis" and "adaptive response". *J Phys Fitness Sports Med* 3: 115-120, 2014.
20) Vickers CE, Gershenzon J, Lerdau MT, Loreto F. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nat Chem Biol* 5: 283-291, 2009.
21) Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18: 655-673, 2000.
22) Metnitz PGH, Bartens C, Fischer M, Fridrich P, Steltzer H, Druml W. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 25: 180-185, 1999.
23) Cesarone MR, Belcaro G, Carratelli M, Cornelli U, De Sanctis MT, Incandela L, Barsotti A, Terranova R, Nicolaides A. A simple test to monitor oxidative stress. *Int Angiol* 18: 127-130, 1999.
24) Ishizaka Y, Yamakado M, Toda A, Tani M, Ishizaka N. Relationship between estimated glomerular filtration rate, albuminuria, and oxidant status in the Japanese population. *BMC Nephrol* 14: 191, 2013.
25) Miyazaki T, Takagi K, Mine M, Yamasaki N, Tsuchiya T, Matsumoto K, Hatachi G, Izumino H, Doi R, Machino R, Nagayasu T. Video-assisted thoracic surgery attenuates perioperative oxidative stress response in lung cancer patients: a preliminary study. *Acta Med Nagasaki* 59: 19-25, 2014.
26) Miyazaki T, Yamasaki N, Tsuchiya T, Matsumoto K, Takagi K, Izumino H, Nagayasu T. Infectious episodes lead to the oxidative stress response after lung transplantation. *Am J Case Rep* 16: 255-258, 2015.
27) Nakayama K, Terawaki H, Nakayama M, Iwabuchi M, Sato T, Ito S. Reduction of serum antioxidative capacity during hemodialysis. *Clin Exp Nephrol* 11: 218-224, 2007.
28) Yahata T, Suzuki C, Hamaoka A, Fujii M, Hamaoka K. Dynamics of reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential in the acute stage of Kawasaki disease. *Circ J* 75: 2453-2459, 2011.
29) Faienza MF, Francavilla R, Goffredo R, Ventura A, Marzano F, Panzarino G, Marinelli G, Cavallo L, Di Bitonto G. Oxidative stress in obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. *Horm Res Paediatr* 78: 158-164, 2012.
30) Iimura Y, Agata U, Takeda S, Kobayashi Y, Yoshida S, Ezawa I, Omi N. Lycopene intake facilitates the increase of bone mineral density in growing female rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 60: 101-107, 2014.
31) Kaneko K, Takahashi M, Yoshimura K, Kitao T, Yamanouchi S, Kimata T, Tsuji S. Intravenous immunoglobulin counteracts oxidative stress in Kawasaki disease. *Pediatr Cardiol* 33: 1086-1088, 2012.
32) 松本純一, 丸岡 弘, 金村尚彦, 村田健児, 石神昭人：マウス下肢虚血が酸化ストレス防御系に及ぼす影響, 理学療法 - 臨床・研究・教育, 22: 16-20, 2015.
33) 永田勝太郎, 長谷川拓也, 広門靖正, 喜山克彦, 大槻千佳：生活習慣病と酸化ストレス防御系, 心身医学, 48: 177-183, 2008.
34) de Lacy Costello B, Amann A, Al-Kateb H, Flynn C, Filipiak W, Khalid T, Osborne D, Ratcliffe NM. A review of the volatiles from the healthy human body. *J Breath Res* 8: 014001, 2014.
35) King J, Kupferthaler A, Unterkofler K, Koc H, Teschl S, Teschl G, Miekisch W, Schubert J, Hinterhuber H, Amann A. Isoprene and acetone concentration profiles during exercise on an ergometer. *J Breath Res* 3: 027006, 2009.
36) King J, Koc H, Unterkofler K, Mochalski P, Kupferthaler A, Teschl G, Teschl S, Hinterhuber H, Amann A. Physiological modeling of isoprene dynamics in exhaled breath. *J Theor Biol* 267: 626-637, 2010.
37) Jacob DJ, Wofsy SC. Photochemistry of biogenic emissions over the Amazon forest. *J Geophys Res* 93: 1477-1486, 1988.
38) Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 45: 927-932, 1978.
39) Toshinai K, Haga S, Miyazaki H, Takemasa T, Nomura T, Kizaki T, Ohno H. Effects of different intensity and duration of exercise with the same oxygen consumption on the ability of neutrophils to generate superoxide anion radicals in humans. *Adv Exerc Sport Physiol* 6: 91-95, 2000.
40) Koc H, King J, Teschl G, Unterkofler K, Teschl S, Mochalski P, Hinterhuber H, Amann A. The role of mathematical modeling in VOC analysis using isoprene as a prototypic example. *J Breath Res* 5: 1-9, 2011.
41) 大橋俊夫. 循環系の基本的性質, 標準生理学（第 7 版), 小澤瀞司, 福田康一郎, 医学書院, 東京, 538-541, 2009.
42) Grainger SL, Keeling PWN, Brown IMH, Marigold JH, Thompson RPH. Clearance and non-invasive determination of the hepatic extraction of indocyanine green in baboons and man. *Clin Sci* 64: 207-212, 1983.
43) Kenney WL, Ho CW. Age alters regional distribution of blood flow during moderate-intensity exercise. *J Appl Physiol* 79: 1112-1119, 1995.
44) Sewright KA, Clarkson PM, Thompson PD. Statin myopathy: incidence, risk factors, and pathophysiology. *Curr Atheroscler Rep* 9: 389-396, 2007.
45) Stein RA, Mead JF. Small hydrocarbons formed by the peroxidation of squalene. *Chem Phys Lipids* 46: 117-120, 1988.
46) Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q - biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun* 396: 74-79, 2010.
47) Morales-Alamo D, Calbet JA. Free radicals and sprint exercise in humans. *Free Radic Res* 48: 30-42, 2014.