

## 運動時の唾液酸化還元電位の変化

塩田正俊・上野紘司\*・松原 茂\*\*・松尾絵梨子\*\*・鈴木政登\*\*\*

Change of salivary oxidation-reduction potential (sORP) during cycling exercise

SHIOTA Masatoshi, UENO Kouji, MATSUBARA Shigeru, MATSUO Eriko,  
and SUZUKI Masato

(Received September 27, 2013)

### Abstract

**Purpose:** There is little information concerning the changes which occur in salivary compositions in response to exercise. Therefore, we investigate that the changes in markers of salivary oxidation-reduction status.

**Methods:** Seven healthy males completed the exercise by bicycle ergo-meter of 70%HR reserve for 30 min. Saliva samples were collected before, immediately after, and 1, 6 and 24 h after exercise.

**Results and Discussion:** Although the interaction effect is significant in salivary secretion rate, amylase and lysozyme activities, there were uncertain whether or not the changes in salivary markers are affected by exercise. Salivary ORP gradually decreased after exercise, and salivary peroxidase (Pox) and uric acid were no changes by exercise. There is a positive correlation between the salivary pH and the peroxidase ( $r=0.633$ ,  $p < 0.01$ ), and the uric acid ( $r=0.559$ ,  $p < 0.01$ ). Uric acid, the most important antioxidant molecule in saliva, contribute approximately 70% of the total salivary antioxidant capacity, and peroxidase catalyzed the reaction to the hypothiocynous acid from thiocynate which is the electron-donating component. These results suggest that exercise in this experiment conditions is not affected on the oxidation-reduction status in saliva.

**Key Words:** Saliva, salivary ORP, pH, peroxidase, uric acid

### はじめに

ヒトが生命活動を営む上で、呼吸活動は必要不可欠のものであるが、利用される酸素のうち4～5%がスーパーオキシドなどの活性酸素として生成される (Clarkson and Thompson, 2000)。この活性酸素は多くの疾患や老化の原因となり、ヒトが健康を維持するうえで、酸化ストレスのコントロールは重要な要因の一つになる。しかし一方では、生体防御の視点からは、細菌などの病原微生物の侵入に対しては白血球などで産生される活性酸素が重要な役割を担っ

---

\* 山口大学教育学部スポーツ健康科学卒業生 \*\* 日本大学薬学部健康・スポーツ科学  
\*\*\* : 東京慈恵会医科大学臨床検査医学

ている。また、健康の維持増進に良いとされる身体活動では酸素需要量の増加に伴い多くの活性酸素が生成される。一方で、生体内では発生した活性酸素を消去すべく、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、ペルオキシダーゼ (Pox) など多くの活性酸素消去酵素や、野菜や果物などのビタミン類に代表される低分子抗酸化物質により活性酸素は消去される。このように生体内は種々の酸化還元因子によって、常に酸化状態と還元状態とを変動していると考えられ、これらの酸化状態と還元状態を明らかにすることは、ヒトが健康を維持・増進させるうえで重要である (Schneider and Reischak de Oliveira, 2004)。Nagler ら (2002) は、ヒトの耳下腺分泌液、顎下腺および舌下腺分泌液、そして全唾液中の抗酸化物質等について検討し、抗酸化物質などの酸化防御系物質は顎下腺および舌下腺と比較して耳下腺で多く分泌され、一方、免疫物質 (sIgA) やリゾチームなどの生体防御系物質の分泌は耳下腺だけでなく、顎下腺および舌下腺からの分泌も増加しており、口腔内の酸化防御系と免疫防御系は異なる機序であることを指摘している。最近になって、身体活動と酸化防御系に関する研究のうち、特に運動と抗酸化物質との関係が検討されるようになってきたが、これに関する報告は少ない (Cavas and Yurdakoc, 2005; Guerrero et al., 2009; Damirchi et al., 2010; Nazari et al., 2012)。

Lee ら (2004) は、ORP-pH system による酸化還元電位 (Oxidation-Reduction Potential: ORP) 測定方法と既存の抗酸化容量を計測する ORAC (oxygen radical absorbance capacity) 法および FRAP (ferric reducing ability of plasma) 法との関係を検討し、いずれの方法との関係においても高い相関関係が得られたことから、ORP-pH system による酸化還元電位測定方法はより簡便で正確な酸化還元容量を測定する方法であると報告している。しかし、運動時の唾液 ORP (sORP) や唾液 pH (spH)、抗酸化物質である唾液ペルオキシダーゼ (sPox) や唾液尿酸 (sUA) との関係については明らかでない。

そこで、本研究では、70%HR reserve 強度の自転車運動時の唾液中の sORP および spH、sPox 活性および sUA などを測定し、運動時の酸化還元状態の変化について、また、酸化還元電位と抗酸化物質との関連について明らかにすることを目的とした。

## 方法

### 1. 被験者

被験者は、健康で現在、歯科治療を行っていない健康な男子大学生 7 名 (年齢: 21.0±1.0 歳、身長: 169.9±4.3 cm、体重: 64.6±5.1 kg) を対象とした。なお、本実験を行うにあたり、ヘルシンキ宣言 (1964 年、2008 年改定) にある倫理的原則に基づき、本研究の目的、方法および運動負荷に伴う不快感などを被験者に説明し、同意の上で実験に参加してもらった。

### 2. 実験方法

被験者には、実験当日午前 7 時 30 分に実験室に入室させ、ハートレートモニター (ポラー社、RS 400) を装着させた。心拍数の計測を開始後、途中途中で心拍数を目視し、最低心拍数を確認した。15 分間の安静保持後に、被験者は蒸留水を用いて口腔内を 30 秒間すすぎ、これを 3 回繰り返した後に、さらに 5 分間の座位安静をとった。その後、運動前の唾液アミラーゼ測定および唾液採取を行った。運動前の測定および採取終了後、8 時から自転車運動を開始した。

運動負荷強度は 70% $\dot{V}O_2$ max に相当する心拍数をカルボーネンの式から求め、運動中はその目標心拍数 ± 5 拍 / 分になるように負荷量を調節した。自転車運動は 60 回転で 30 分間行った。

$$\text{目標心拍数} = \{(220 - \text{年齢}) - \text{運動前心拍数}\} \times 0.7 + \text{運動前心拍数}$$

唾液採取時間は、運動負荷実験および対照実験において運動前、運動直後（運動負荷実験のみ測定、採取）、1時間後、6時間後に行った。

なお、朝に運動を行うため、運動1時間前に食事（軽食）を済ませること、運動前日は早めに夕食を取り、早めに就寝すること、また、飲酒やコーヒーなどの刺激物は飲食しないこと、などに注意させた。

実験期間中の平均温度および平均湿度は、 $22.9 \pm 1.9^{\circ}\text{C}$ 、 $48.0 \pm 6.2\%$ であった。

### 3. 唾液採取方法

まず、蒸留水を用いて口腔内を30秒間すすぎ、これを3回繰り返した後に、5分間の椅座位安静をとった。その後、唾液採取器具（アシスト社：サリベット）を用いて、1秒に1回のペースで唾液採取器内の綿を60回噛み（1分間）、唾液を綿に染み込ませる方法で唾液を採取した。採取した唾液は遠心分離機を用いて分離させ、後日一括して測定するまで $-80^{\circ}\text{C}$ の温度で冷凍保存した。

### 4. 測定項目および測定方法

#### (1) 唾液酸化還元電位

唾液中の酸化還元電位は、酸化還元電位計（佐藤商事、ORP-meter; YK-23RP-ADV）を用いて、遠心分離した唾液の中に ORP-meter の電極を浸し酸化還元電位を測定した。なお、ORP-meter の酸化還元電位計の電位確認には、ORP チェック液（佐藤商事、白金電極、OR-CK20）を用いて ORP-meter が正常に作動しているかどうかを確認した。

唾液酸化還元電位、pH および唾液比重については運動負荷実験終了後に直ちに室温( $22.9 \pm 1.1^{\circ}\text{C}$ )の状態で測定を行った。

#### (2) 唾液ペルオキシダーゼ (Pox) 活性値の測定

唾液 Pox の測定は、 $0.4 \text{ mM}$  の  $\alpha$ -ジアニシジン（和光純薬） $1.0 \text{ ml}$  に唾液 $0.25 \text{ ml}$  を混和し、さらに pH5.7 に調整した酢酸緩衝液を $3.75 \text{ ml}$  添加し攪拌した。そこに $0.1 \text{ M}$  の過酸化水素水を $0.1 \text{ ml}$  添加し、攪拌後30分間室温（約 $25^{\circ}\text{C}$ ）で放置した。それを $520 \text{ nm}$  の波長で吸光度を求めた。また、検量線の作成には、Horse-Radish peroxidase（和光純薬）を用いて、 $0 \sim 5.0 \text{ ng/ml}$  の範囲の検量線を作成し、その検量線を元に求めた唾液試料の吸光度から唾液 Pox 活性値を求めた。

#### (3) 唾液 pH および比重の測定

唾液 pH の測定は、pH メーター（HORIBA、F-22）を用いて、唾液中に浸し測定した。唾液比重の測定は、HAND REFRACTOMETER (ATAGO、URICON-S) を用い、屈折法により求めた。

#### (4) 唾液アミラーゼ活性値の測定方法

唾液アミラーゼ活性値の測定は、唾液アミラーゼモニター用チップ（ニプロ社）を舌下に入れてくわえ、30秒間唾液を染み込ませた後に唾液アミラーゼモニター（ニプロ社）を用いて測定した。

#### (5) 唾液中リゾチーム濃度の測定方法

唾液リゾチーム濃度は、比濁法を用いて測定した。*Micrococcus lysodeikicus*（和光純薬）の乾燥菌体 $120 \text{ mg}$  をリン酸緩衝液 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $5.80 \text{ g}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$   $8.64 \text{ g}$ 、pH 6.6)  $500 \text{ ml}$  に懸濁させ、2～3日冷蔵保存し、基質液として作成した。検量線の作成は、結晶卵白リゾチーム（和光純薬）をリン酸化緩衝液で希釈し、 $25 \mu\text{g/ml}$  の基準液を作成した。標準

液は25  $\mu$  g/ml 濃度の基準液を2、4、6、8 ml 採取し、リン酸緩衝液で全容量を10 ml として、各濃度が、5、10、15、20  $\mu$  g/ml 濃度になるように調節した。これらの標準液を用い、検量線を作成した。次に、試験管に基質液3 ml を取り、これにそれぞれの唾液試料を50  $\mu$  l ずつ試験管に加え、37°Cで10分間保温した。その後、正確に10分後に分光光度計（日立、HITACHI 7010型）を用い、600 nm の波長で吸光度を読み取った。求めた検量線から唾液検体のリゾチーム濃度をそれぞれ求めた。

なお、この比濁法から求めたリゾチーム濃度は、リゾチーム活性値に相当する方法として用いられている（仁科ら、1973）。

## 5. 統計処理方法

各測定項目の値は、平均値 $\pm$ 標準偏差（Mean  $\pm$  SD）で示した。運動負荷実験については、一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合には Turkey 法による多重比較検定を行った（Free JSTAT）。運動による IL-6 濃度の変化と各測定項目の相関関係については、ピアソンの積率相関係数を求め有意差の検定を行った（Stat View）。有意水準はいずれも危険率5%未満とした。

## 結果

### 1. 運動時の心拍数および主観的運動強度（RPE）の変化

運動時の目標心拍数は156.6 $\pm$ 2.8拍/分となった。その目標心拍数到達までの自転車負荷量は脚の負担からくる疲労を考慮し、徐々に増加させた。その結果、運動中の心拍数は運動15分～30分にかけて153～156拍/分の範囲を示した。また、運動中の RPE は16から17点の範囲にあった。

### 2. sORP、spH、sUA および sPox の変化

図1に、運動前後の sORP、spH、sUA 濃度および sPox 活性値の変化について示した。

sORP は、一元配置分散分析の結果が有意（ $p < 0.05$ ）であり、多重比較検定（Turkey 法）の結果、運動前値に比べ1時間後および6時間後の値が有意に減少した（いずれも  $p < 0.05$ ）。spH は、運動後に上昇傾向にあったが、有意（ $p=0.0688$ ）ではなかった。sUA 濃度は、分散分析の結果が有意（ $p < 0.05$ ）であり、多重比較検定（Turkey 法）の結果、運動前値に比べ1時間後の値が有意に増加した（ $p < 0.05$ ）。

sPox 活性値には有意な変化は認められなかった。

### 3. 唾液分泌量、唾液アミラーゼ活性値およびリゾチーム活性値の変化

図2に、運動前後の唾液分泌量、唾液アミラーゼ活性値、リゾチーム活性値および唾液比重の変化について示した。

唾液分泌量は、一元配置分散分析の結果が有意（ $p < 0.05$ ）であり、多重比較検定（Turkey 法）の結果、運動直後と1時間後の値に有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた。

唾液アミラーゼ活性値は、分散分析の結果が有意（ $p < 0.05$ ）であり、多重比較検定の結果、運動直後と6時間後の値に有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた。

唾液リゾチーム活性値には、有意な変化は認めなかった。

唾液比重は運動後に上昇傾向にあったが、有意（ $p=0.0660$ ）ではなかった。

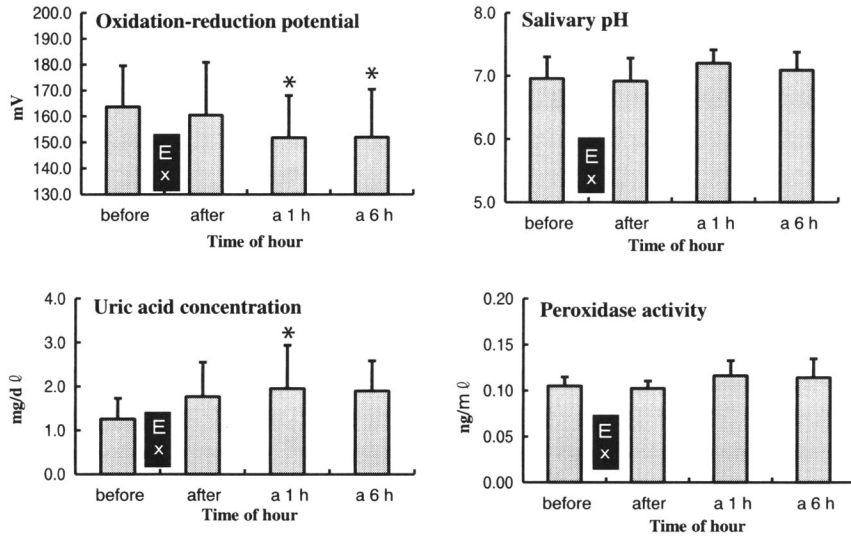


Fig1. Changes of salivary ORP, pH, uric acid concentration and peroxidase activity before and after exercise  
\* : p < 0.05 from before exercise

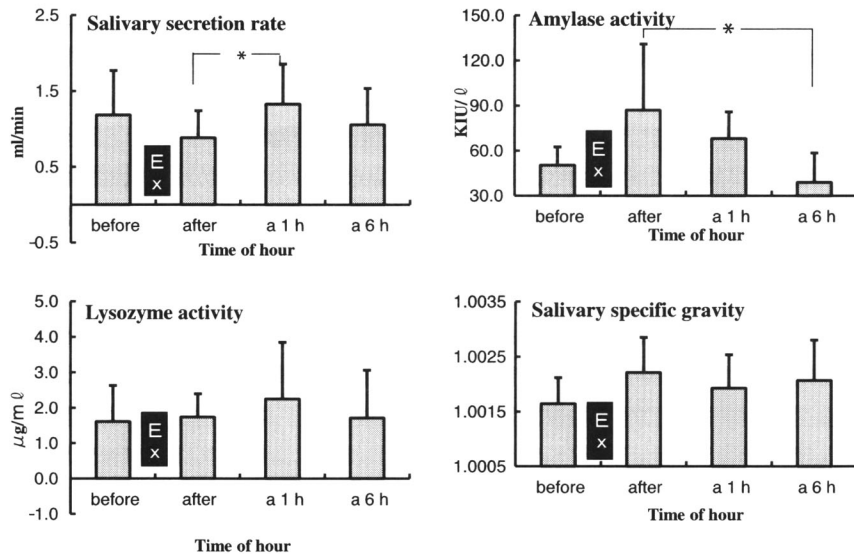


Fig2. Changes of salivary secretion rate, amylase and lysozyme activities, and specific gravity before and after exercise at 70%HR reserve  
Ex: Exercise, a1h: 1hour after exercise, a6h: 6hours after exercise  
\* : p < 0.05 after vs. a1h

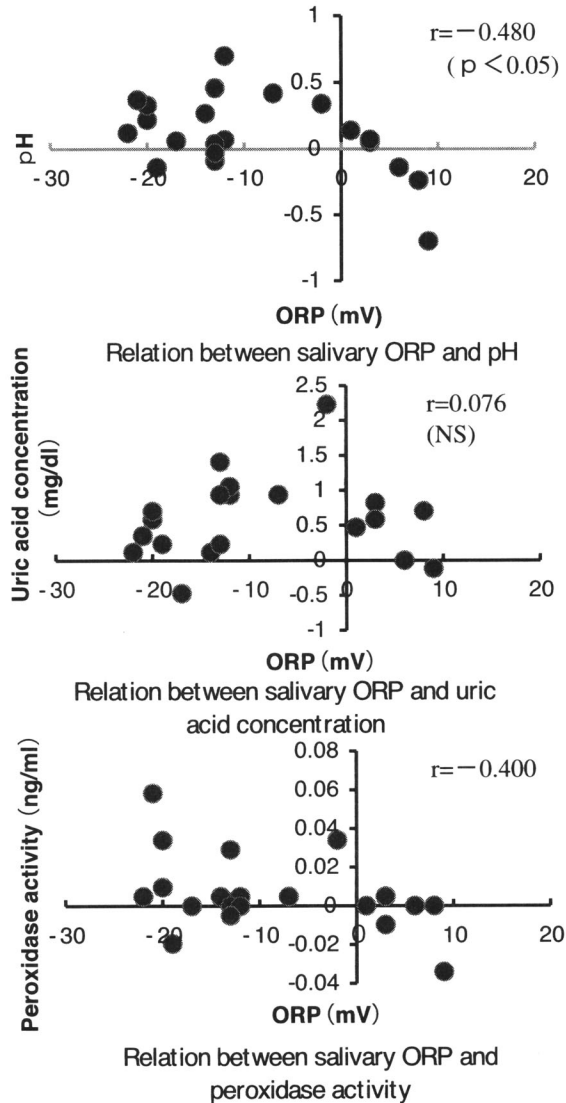


Fig3. Relation between ORP, pH, uric acid concentration, and peroxidase activity in human saliva

#### 4. sORP と spH および抗酸化物指標との関係

図3に、sORP と spH、sUA 濃度および sPox 活性値との関係について、運動前値からの変化量で示した。

sORP 値と spH との間には  $r = -0.480$  ( $p < 0.05$ ) の有意な負の関係が示された。しかし、sORP 値と sUA 濃度および sPox 活性値との間には有意な関係は認めなかった。また spH と sUA 濃度 ( $r = 0.495$ ,  $p < 0.05$ ) および sPox 活性値 ( $r = 0.641$ ,  $p < 0.01$ ) との間には有意な関係が認められた。しかし、sUA 濃度と sPox 活性値とには有意な関係は認めなかった。

## 考察

### 1. 運動負荷による sORP 値の変化について

sORP は、運動前値に比べ1時間後および6時間後の値が有意に減少した(いずれも  $p < 0.05$ )。この結果は、70%HR reserve 強度の自転車運動により、生体が酸化状態から還元状態へと移行したことを示唆する。また、spH は運動後に上昇傾向 ( $p=0.0688$ ) にあり、運動により生体内の水素イオン濃度が減少し、酸化状態 (acidosis) からアルカリ状態 (alkalosis) へと移行する傾向にあったことが示唆される。

酸化還元電位測定と水素イオン濃度測定との違いは、水素イオン濃度は酸・アルカリの尺度として pH で示され、その時の酸性状態およびアルカリ性状態を示す。一方、酸化還元電位は酸化力、還元力という尺度で、水素イオン濃度を含むあらゆる元素や化合物の酸化力、還元力を計る指標と考えられる (HORIBA)。したがって、酸化還元電位と水素イオン濃度は逆の反応を示すと考えられる。

本研究で、運動後の sORP が低下し、spH が上昇傾向を示したのは、運動により生体内の水素イオン濃度が低下し(還元され)、酸化還元電位は水素イオン濃度の減少とその他の抗酸化物の増加 (sUA 濃度は増加、sPox 活性は変化なし) に伴い還元力が増加し、sORP は低下したと考えられる。sORP と spH との間には  $r = -0.480$  ( $p < 0.05$ ) の有意な負の相関関係が認められた。しかし、sORP と sUA 濃度については有意な相関関係は見られなかったことから、運動後の sORP の減少には、運動に伴う水素イオン濃度の低下が大きく関係していた可能性がある。

運動に伴う sORP の変化について検討した報告は見られないようである。sORP 測定については、岡崎 (2009) が健常者と各種疾患患者との sORP 値を調べ、疾患患者の sORP 値は高く、健常者の sORP 値は低値を示すこと、摂取食品、飲料によっても sORP の反応が異なること、などを報告している。この報告に基づけば、運動に伴う sORP 値の低下は、生体内が酸化状態から還元状態へと移行し、体調が改善されたことを示唆する。

### 2. 運動負荷による抗酸化物質の変化について

sPox 活性値は高い運動強度で運動直後に増加し、1時間後には低下すると報告されている (Damirchi et al., 2010)。Cavas ら (2005) は、2時間の柔道トレーニング前後に抗酸化水準の指標 (free sialic acid) の上昇と唾液抗酸化酵素 (Superoxide dismutase: SOD、catalase: CAT および Glutathione peroxide: GSH-Px) の増加を認めたことから、抗酸化水準の上昇は CAT および GSH-Px による過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) の除去効果によると考えている。Nazari ら (2012) は、時速 8 km の速度から負荷漸増法によるトレッドミル走を疲労困憊まで行い、運動後に唾液尿酸濃度の減少と唾液 SOD の上昇を観察している。また、Guerrero ら (2009) は、トライアスロン競技前後の総抗酸化活性の上昇と唾液尿酸濃度の増加および過酸化脂質濃度の減少を報告している。いずれの研究者たちも、これらの抗酸化物がスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ ) の除去、過酸化水素の除去およびヒドロキシラジカル ( $HO^{\cdot}$ ) の除去に貢献した結果、抗酸化水準や総抗酸化活性の上昇が認められたと考えている。これらの報告で、抗酸化物質の増加が認められた運動条件としては1~2時間にわたる長時間の運動か、疲労困憊に至る運動であった。本研究では70%HR reserve 強度の運動で運動時間は30分間であった。抗酸化物の変化を認めた報告に比べると運動強度が低く、また運動時間も短く、このため顕著な sPox や sUA の変化を認めなかった可能性がある。

激運動では、いわゆる活性酸素、Superoxide radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) が発生するが、これはSODにより過酸化水素 (Hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ ) へ変換され、産生された過酸化水素はCATやGSH-Pxなどによって水と酸素へと還元される (図4)。本研究で測定したsPoxは、過酸化水素をThiocyanate ( $SCN^-$ ) と水素イオンとともに還元させる働きがあり (式1) (Ihalinら、2005)、また、UAはヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) の消去反応に関与し、水素イオンとともに還元する (式2) (大野ら、1998)。本研究においては、sUA濃度に有意な上昇が認められたことから、ヒドロキシラジカルの消去が促進されたことが考えられるが、sORPとsUA濃度のは相関関係が認められず、本研究の結果からは、sORPと抗酸化物との関係は明確ではなかった。

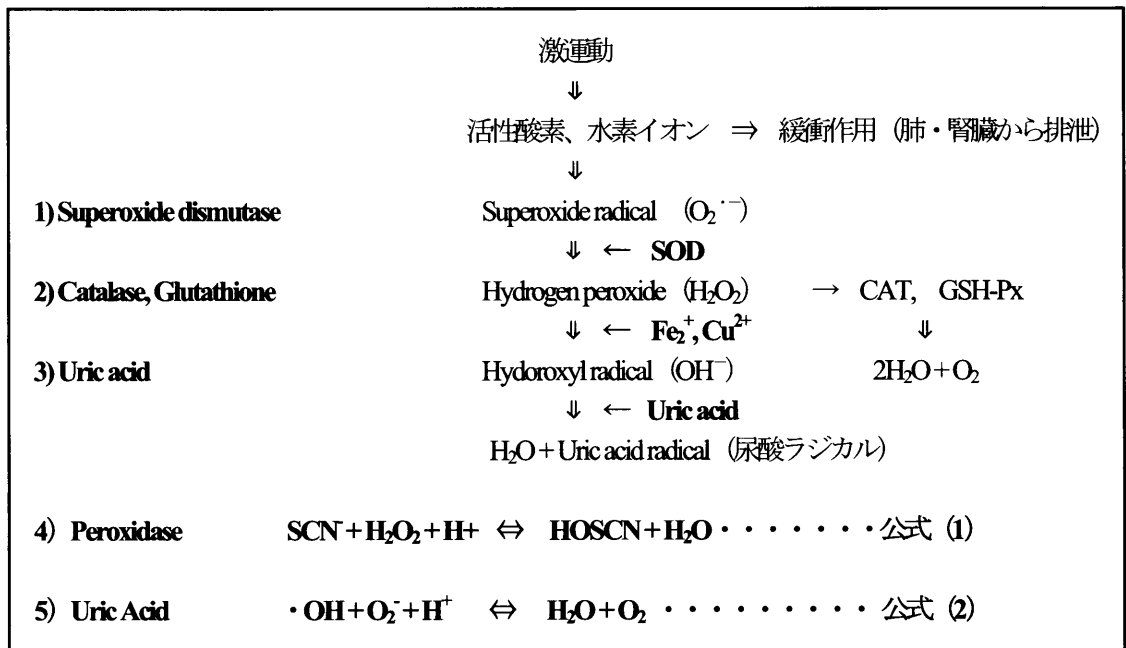


Fig4.Responses of exercise-induced oxidative stress and antioxidants in human saliva

まとめ

70%HR reserve 強度の自転車運動時のsORP および spH、sPox 活性および sUA 濃度などから、運動時の酸化還元状態、抗酸化物質との関連性について検討した。

その結果、

1. 70%HR reserve 強度の運動後のsORP値は有意に低下した ( $p < 0.01$ )。また、sUA濃度は上昇し ( $p < 0.05$ )、spHは上昇傾向を示した ( $p = 0.0688$ )。
2. 運動前値からの変化量から求めた、sORP値とspHとの間に  $r = -0.480$  ( $p < 0.05$ ) の有意な負の相関関係が認められた。

以上の結果から、sORP値は運動時の生体内酸化還元電位を示す指標としての可能性が示唆された。しかし、唾液抗酸化物質であるsPoxやsUA濃度との関係は明らかではなかった。



## 文献

1. Clarkson PM and Thompson HS: Antioxidants: what role do they play in physical activity and health ? *Am J Clin Nutr* 72 (Suppl) : 637S -646S, 2000
2. Schneider CD and Reischak de Oliveira A: Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev Bras Med Esporte* 10(4): 314-318, 2004
3. Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N and Reznick AZ: Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radical Biology Medicine* 32(3): 268-277, 2002
4. Cavas L, Arpinar P, and Yurdakoc K: Possible interreactions between antioxidant enzymes and free sialic acids in saliva: Apreliminary study on elite Judoists. *Int J Sports Med* 26: 832-835, 2005
5. Guerrero J, Gonzalez D, Marquina R, Zambrano JC, Rodriguez-Malaver AJ, and Reyes RA: Exhaustive physical exercise causes a decrease in oxidative stress and an increase in salivary total antioxidant activity of elite triathlete. *Rev Fac Rarm* 51(1) : 2 -7, 2009
6. Damirchi A, kiani M, Jafarian V, and Sariri R: Response of salivary peroxidase to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol* 108: 1233-1237, 2010
7. Nazari Y, Damirchi A, Sariri R, and Taheri M: response of salivary antioxidants to intense exercise in non-athlete men. *J Exerc Physiol* 15(3) : 1 -9, 2012
8. 仁科甫啓、武藤良知、山口潜：リゾチームの測定とその臨床的意義．*臨床病理*21: 37-42、1973
9. 岡崎美江子：唾液の ORP 数値を限定して” 体調度 “を確認．*臨床検査* 53(7) : 767-777、2009
10. Ihalin R, Loimaranta V, and Tenovuo J: Origen, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445: 261-268, 2006
11. 大野秀樹、跡見順子、伏木 享編：活性酸素と運動． 杏林書院 東京 初版第 1 刷：76-77、1998

## 謝辞

本研究を遂行するに当たり、平成25年度 学部長裁量経費（設備更新）「卓上 pH メータ (F-71T) 本体のみ」の補助を得た。記してお礼を申し上げます。また、本研究の一部は第21回日本運動生理学会で報告した。