

令和元年6月23日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01383

研究課題名(和文) 温熱負荷した運動時の活性酸素種とインターロイキン6分泌の関係

研究課題名(英文) The relationship between reactive oxygen species and interleukin6 during exercise in heat stress

研究代表者

伊藤 倫之 (Ito, Tomoyuki)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：90305566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、前研究で明らかになった温熱負荷時のインターロイキン6(IL-6)の上昇に酸化ストレス反応によって発生する活性酸素種がどう関与するかを明らかにするために行った。新しく安価かつ短時間で多数の検体分析が測定できるFe-ROMs法を考案し、酸化ストレスを測定した。この方法で測定した血漿とHDL中のFe-ROMs濃度がほぼ等しく、Fe-ROMs法は酸化HDL濃度を測定していることが明らかになった。次に暑熱環境で自転車エルゴメーター運動を20分間4セット行い、Fe-ROMs法で酸化ストレスを測定した。しかし、運動で、これら酸化ストレスの有意な上昇はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新たに安価かつ短時間で多数の検体分析が測定できるFe-ROMs法が考案できた。この方法では、酸化HDLを測定することが可能であることがわかった。このことにより今まで高価であった酸化ストレスを安価で測定できるようになり、酸化ストレス研究が発展していく可能性が高くなった。特に酸化HDLの動態については、不明な点が多く、運動時、暑熱環境時に酸化LDLとともにどのように変化するのが明らかになっていく可能性がある。また、酸化HDLが人体に及ぼす影響なども明らかになっていくと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated how reactive oxygen species generated by the oxidative stress reaction are involved in the rise of interleukin 6 (IL-6) during thermal stress. We have devised a new Fe-ROMs method to measure oxidative stress. This method is inexpensive and can measure a large number of sample in short time. It was also revealed that Fe-ROMs concentration in plasma and HDL measured by this method was similar. These result suggested that oxidized HDL concentration was measured by Fe-ROMs method. In next study, 4 sets of 20 minutes bicycle ergometer exercise were performed in a hot environment, and the oxidative stress was measured by the Fe-ROMs method. However, exercise did not show any significant increase in oxidative stress.

研究分野：運動生理学 リハビリテーション医学 スポーツ医学

キーワード：酸化HDL Fe-ROMs法 暑熱負荷 運動負荷 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年「Exercise is Medicine」と言われ、生活習慣病をはじめ様々な疾患に運動療法が効果的なことが言われている。運動療法の効果の理由の一つに炎症とは関係なく、骨格筋から運動によって誘発されるサイトカインの一種インターロイキン 6(IL-6)が注目されている。IL-6 は、炎症性サイトカインであり、一般的には「悪」と言われているものだが、運動中に筋から産生される IL-6 は、糖代謝や脂質代謝の活性化に関与すると言われており、糖代謝においてはインスリン抵抗性の原因と言われている腫瘍壊死因子 α (TNF- α)の分泌を抑制し、また、IL-6 は脂肪酸化も誘導すると報告されている(Plomgaard et al. Diabetologia, 2007, Wolsk et al. Am J Physiol, 2010)。

一方、活性酸素種(ROS)は、脂質、タンパク質のみならず、DNA の核酸なども攻撃し、生活習慣病、発ガン、老化の原因と言われている。運動をすることによりこの「悪」ある ROS が発生し、弊害を及ぼす可能性もあるが、近年 ROS は、血管平滑筋の分化等にメッセンジャーとして関与し、特に心血管系において重要な役割をなしていることが報告されている(Vara D & Pula G. Cull Med Moll, 2014)。

これら、本来「悪」とされる IL-6 と ROS であるが、運動と関連することによりいい作用があることが分かってきており、申請者はまず、IL-6 に注目した。しかし、IL-6 を誘発させる運動は高強度であったり、運動時間が長時間で実際の糖尿病や生活習慣病をもつ高齢で運動習慣がない患者には運動療法として応用できないのが現実であった。ところが、温熱を負荷することで同運動強度でも 2 倍の IL-6 増加が見られたと報告がある(Jones et al. Sportiva Medicine, 2010)。研究代表者は、現実的で効率よく運動負荷をかける方法として、運動筋への局所温熱負荷を考え、2015 年度までの基盤研究(C)の「運動筋への局所温熱がインターロイキン 6 分泌に与える影響」において、30 分の負荷(温熱 and/or 運動)終了 2 時間後の IL-6 を比較したところ局所温熱すると安静時でも IL-6 が、さらに局所温熱+運動(30 分の短時間)で約 4 倍に IL-6 が増加した。(Yoshida T et al, in preparation)。これによって、生活習慣病をもつ高齢者の運動療法への応用が可能となった。ROS は、運動中に増加することが知られており、また、Haak et al. (Am J Physiol, 2009)らは温熱負荷が ROS の上昇を誘導することを報告している。一方で ROS は、IL-6 と関係があることが示唆されている(Chang et al. 2010, Tartibian & Maleki, 2012)。よって、局所温熱負荷(安静、運動)によって産生される ROS が、筋へ働き IL-6 誘導に関与している可能性が考えられる。ROS は、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)やカタラーゼ(CAT)等の酵素、グルタチオン、ビタミン C や E などの抗酸化剤により短時間で消去されるため、ROS そのものを測定することが困難であり、その抗酸化マーカーや酸化産物を測定することが一般的であった。新しいスピントラップ剤(Diphenylphosphinoyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrroline N-oxide (DPhPMPO))が開発され(九州保健福祉大佐藤ら)、より正確にまたより ROS そのものに近い形で測定が可能となってきた。

2. 研究の目的

本研究では、前研究で明らかになった温熱負荷時のインターロイキン 6 (IL-6) の上昇に酸化ストレス反応によって発生する活性酸素種が影響しているかを明らかにすることを目的に行った。前述の通り活性酸素種は短時間で消失するため測定することは困難であるが、その代謝産物を測定することが一般的に行われている。本研究では、下記に記す新たな方法を用いて、運動中特に暑熱環境下での運動中の酸化ストレス変化を測定し、IL-6 上昇と関連性を検討した。

3. 研究の方法

【運動時の酸化ストレス (i-Strap 法測定)】

脊髄損傷者 19 名(平均年齢 44.7 歳、体重 59.5kg)の運動前後(ハーフマラソンのレース前後)の酸化ストレスを測定した。採血は、レーススタート前日、ゴール直後およびゴール 1 時間後にいった。

【温熱負荷運動時の酸化ストレス (Fe-ROMs 測定)】

・Fe-ROMs 法

一般的に酸化ストレスの測定方法として用いられている d-ROMs 法では、ヒドロペロオキシドからラジカルを移動するのに鉄を使うが、体内の鉄の量に依存するため、そのラジカル測定が不十分な可能性がある。そのため、Fe-ROMs 法では、十分量の鉄を血漿中に追加することで血漿中の鉄濃度に依存しない形でその反応速度からヒドロペロオキシドを測定した。

・暑熱環境での酸化ストレス

健康男性 7 名(年齢 20.6±0.6 歳、体重 70.4±4.0kg)に最大酸素摂取量の 40%の運動負荷強度で、自転車エルゴメーター運動を行わせた。安静座位で 30 分経過したのち、36°C の暑熱環境下で 20 分の運動を 4 セット行った。セット間は 10 分おいた。Fe-ROMs 法による活性酸素種、酸化 LDL の測定目的で、運動開始前安静、運動 1 セット目終了後、運動 2 セット目終了後、運動 3 セット目終了後、運動 4 セット目終了後、そして、運動終了 1 時間後に採血を行った。

4. 研究成果

今回は、まずその酸化ストレスの測定方法として i-Strap 法 (i-Strap W.B.,global) を用いての測定を試みた。脊髄損傷者 19 名(平均年齢 44.7 歳、体重 59.5kg)の運動前後(ハーフマラソンのレース前後)の酸化ストレスを測定した。また、あわせて標準的に使用されている酸化マーカーである dROMs テストと抗酸化マーカーである BAP テストを測定した。d-ROMs テストと BAP テストはヘパリン血漿を、i-Strap 法は全血を用いて測定を行った。運動前後で d-ROMs の値は、355.6→361.3U.CARR と有意な変化はなかったが、BAP 値は 2182.3→2332.1 と増加傾向が見られた。特に損傷レベルが下位の群では、運動前後で BAP 値に有意差が見られた (Mitsui T, et al. 2017)。一方、全血を使用した i-Strap 法では、0.432→0.473 と有意な抗酸化活性の低下が起きていた。d-ROMs、BAP と i-Strap 法の間には有意な相関は見られなかった。

しかし、i-Strap 法では、測定過程でクロロホルムを使用するが、その使用が困難となり、新しく安価かつ短時間で多数の検体分析が

可能である Fe-ROMs 法を考案し、酸化ストレスを測定した。この方法は、前述の通り新たに鉄を付加して測定する方法であり、d-ROMs 法と $r=0.986$ の有意な正の相関が得られた。また、デキストラン硫酸・マグネシウム法により、HDL を精製し、血漿と HDL 中の Fe-ROMs 濃度と HDL 中の Fe-ROMs 濃度はほぼ等しく、Fe-ROMs 法は酸化 HDL 濃度を測定していることが明らかになった (図 1)。

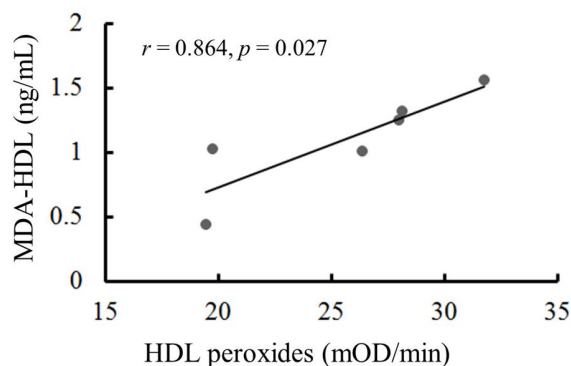


図 1 MDA HDL と Fe-ROMs 法測定結果

Fe-ROMs 法測定結果

次に健常男性 7 名(年齢 20.6±0.6 歳、体重 70.4±4.0kg)に最大酸素摂取量の 40%の運動負荷強度で、自転車エルゴメーター運動を行わせた。安静座位で 30 分経過したのち、36°C の暑熱環境下で 20 分の運動を 4 セット行った。セット間は 10 分おいた。Fe-ROMs 法による活性酸素種、酸化 LDL の測定目的で、運動開始前安静、運動 1 セット目終了後、運動 2 セット目終了後、運動 3 セット目終了後、運動 4 セット目終了後、そして、運動終了 1 時間後に採血を行った。運動前後で 1.6±0.2kg の体重変化がみられた。Fe-ROMs 法で測定した安静時の酸化 HDL は、安静時 28.2±1.3mOD/min であったが、運動で 29.6±1.6 mOD/min となり、運動中の各セット後の酸化 HDL は、それぞれ 29.3±1.2 mOD/min、29.1±0.9 mOD/min、29.4±0.9 mOD/min と 29 台で推移した。統計上、運動でこれら酸化 HDL に有意な上昇はみられなかったが、7 人中 4 人が運動で酸化 HDL の上昇が見られた。運動 1 時間後は、27.0±1.1mOD/min となった。これらの結果から、脱水の見られる暑熱環境下の運動でも酸化ストレスは上昇していない可能性が示唆された。

今回の研究では、同じ運動での IL-6 濃度は測定していないが、これらの結果から暑熱環境下の 60 分の運動では、酸化ストレスは変化は見られず、運動後に上昇する IL-6 に酸化ストレスがトリガーになる可能性は小さいと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Mitsui T, Ito T, Sasaki Y, Kawasaki T, Nakamura T, Nishimura Y, Ibusuki T, Higuchi Y, Hosoe S, Ito F, and Tajima F. Changes in oxidized LDL during half marathon in athletes with spinal cord injuries. Spinal Cord Ser Cases. 11; 3: 17015. 2017.

Ito F, Ito T, Suzuki C, Yahata T, Ikeda K, Hamaoka K. The application of a modified d-ROMs test for measurement of oxidative stress and oxidized high-density lipoprotein. Int J Mol Sci. 18(2), 2017.

Ito F, Sono Y and Ito T. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as oxidative stress biomarkers: Oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. Antioxidants (Basel). 25; 8(3), 2019.

〔学会発表〕(計 4 件)

伊藤文昭、伊藤倫之、鈴木千夏、池田和幸、八幡倫代、濱岡健城、d-ROMs テストを利用した酸化 HDL の測定、第 16 回日本抗加齢医学会、2016

伊藤文昭、伊藤倫之、鈴木千夏、池田和幸、八幡倫代、濱岡健城、第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術総会、2016

伊藤文昭、伊藤倫之、新屋智寛、佐藤圭創、三井利仁、田島文博、全血を用いた酸化ストレスの測定～i-STrap 法および全血測定用 d-ROMs テストの利用～、第 71 回日本体力医学会大会、2016

伊藤倫之、伊藤文昭、三井利仁、馬淵博行、田島文博、脊髄損傷者の酸化ストレスと年齢の関係、第 17 回日本抗加齢医学会総会、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：川邊 哲也

ローマ字氏名：Kawabe Tetsuya

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：60508034

(2)研究協力者

研究協力者氏名：伊藤 文昭

ローマ字氏名：Ito Fumiaki

研究協力者氏名：馬淵 博行

ローマ字氏名：Mabuchi Hiroyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。