

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500850

研究課題名(和文)高齢者における血栓形成関連因子の日内・季節変動の解明

研究課題名(英文)Elucidation of circadian and seasonal variation of thrombosis-related factor in older peoples

研究代表者

石指 宏通 (Ishizashi, Hiromichi)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50260807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：健全な高齢者と男子大学生を対象として、血小板血栓形成において、分子糊として「向」血栓へと作用するVWFとVWFを特異的に切断する働きで「抗」血栓へ作用するADAMTS13をとりあげ、日内変動・季節変動ならびに、それを修飾する老化の影響について検討した。その結果、VWFはすべての季節、時間帯において高齢者で高値を示し、冬季の午前中に最も高くなる傾向がみられた。一方、ADAMTS13は高齢者で低く、とくに冬季の午前中に最も活性が低値を示す傾向がみられた。これらの結果は高齢者において冬季、とくに午前中のスポーツ活動には、より血小板血栓形成の起こりやすい状況をもたらしていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：VWF revealing a thrombophilic action as a molecular glue and ADAMTS13 revealing an antithrombogenic action by the function of specifically cutting VWF were adopted and circadian variation and seasonal variation thereof and senescent influences modifying them were investigated in platelet thrombosis using healthy older peoples and college boys as subjects. As a result, VWF showed high values for older peoples in all seasons and time zones and a tendency of the highest value in the morning in winter was observed. In contrast, ADAMTS13 showed low values for older peoples and a tendency of the lowest value of activity especially in the morning in winter was observed. These results suggest easier incidence of platelet thrombosis in sporting activity in winter, particularly in the morning, for older peoples.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 応用健康科学

キーワード：VWF ADAMTS13 季節変動 日内変動 老化

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病に対するスポーツの効用が強調され、一般市民の間でスポーツが着実に広まってきている。しかしながら、スポーツ実施に伴って突然死を起こす人の数も増えてきているのが現状である。スポーツ中の突然死は、冠状動脈の閉塞を引き起こす循環器系疾患が最も多いことが報告され、その増悪因子として血栓形成の関与が指摘されている。血栓には、出血を止めるための「止血血栓」と臓器障害を引き起こす「病的血栓」があり、後者は血小板とフォンビルブランド因子(von Willebrand factor : VWF)によって形成される血小板血栓と考えられる。我々は、病的血栓形成において「分子糊」として作用する VWF と VWF を特異的に切断し、血栓形成を分解する働きをもつ酵素 ( a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13 : ADAMTS13 ) をとりあげ、これらの血栓形成関連因子と運動時の脱水状態との関連性を検討し、脱水が進行した者ほど、VWF 凝集能が亢進し「向」血栓に傾くことを見出している。また、高齢者では、水分補給の頻度・量の減少に加え、老化による VWF 産生能の変容が起因して、血栓形成による循環器系疾患や突然死を多発させる原因に繋がっている可能性が考えられることから、運動習慣のある 60 歳以上の高齢者を対象に夏季スポーツ活動時の VWF 産生について若年成人と比較検討した。その結果、高齢者において生体を「向」血栓に傾ける VWF が優位に働き、それを抑制する血中の ADAMTS13 が量的・質的に少なく、血栓形成を起こしやすい状態にあること明らかにしてきた。

これまで夏季スポーツ活動時の VWF 産生からみた血栓形成能について、脱水状態、老化の影響を検討してきたが、冬季あるいは各季節への移行期の影響についても、VWF 産生の変動から明らかにすることは血栓形成からみた突然死予防策を考えるうえで重要である。一般に急性心筋梗塞を始めとする虚血性心疾患や心臓突然死の発症は冬季に多く、夏季に少ないという季節変動 (山崎 1973、沢登 2001) および一日のうちでも早朝に多いという概日リズムのある (Marchant1993) ことが報告されている。季節変動には気温の変化が大きく影響し、その発症には交感神経系や血液凝集系の内因性的変化が関与していると考えられている。また、早朝においても覚醒の準備として交感神経系が優位になり、血圧、脈拍を増加させることに加え、血小板の凝集能も亢進することが指摘されているが (Keatinge1984) これら発症の増悪因子としての VWF や ADAMTS13 の関与、および日内・季節変動については全く解明さ

れていない。

また、突然死の多い高齢者を対象に老化が VWF の日内・季節変動いかに修飾するかの研究は全く見当たらない。

## 2. 研究の目的

日本のように四季が認められる地域では、季節の移り変わりに伴い疾患の発症率が異なってくる。高齢者の突然死は冬季に多く、夏季に少ないという季節変動や早朝に多いという概日リズムのあることが報告されている。この要因の一つに血栓形成が指摘されているが、その詳細については明らかにされていない。ヒトには生体防御としての「止血機構」が備わっている。しかしながら、生命の維持に必須の「止血機構」は、時に過剰に機能した場合、致死的な病的血栓症をもたらすことにもなりかねない。近年、微細動脈や毛細血管など、高ずり応力下の病的血栓形成における血小板粘着・凝集過程で「分子糊」として作用するフォンビルブランド因子 (VWF) と VWF を特異的に切断し、血栓成長ストッパーとしての働きをもつ酵素 (ADAMTS13) の作用が解明され、この両者のバランスにより、致死的な動脈閉塞を防衛しつつ、適正な止血血栓形成を司っていることが明らかにされてきている。しかしながら、これらのバランスが季節あるいは概日リズムに対してどのように変化するのか、あるいは老化の影響については明らかにされていない。

そこで本研究では、血栓形成関連因子として VWF と ADAMTS13 をとりあげ、(1) 季節の変化とその老化による修飾、(2) 概日リズムの変化とその老化による修飾について、高齢者と若年成人で比較検討し、血栓形成から見た突然死予防策を提案する。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象者

健常な 65 歳以上の高齢者 12 名と 20 歳前後の男子大学生 12 名を対象とした。

### (2) 血液採取

春季 (5 月)、夏季 (8 月)、秋季 (10 月)、冬季 (12 月、2 月) の各季節の各々午前 7 時と午後 7 時に血液を 5 cc 採取した。血液は速やかに遠心分離し、血漿を -80 で保存した。採血は肘静脈より医師によって行われた。

### (3) 血栓形成関連因子の測定

血栓形成関連因子として、VWF 抗原量・活性量 (「向」血栓) および ADAMTS13 抗原量・活性量 (「抗」血栓) について測定した。また、交感神経系の働きとの関係を検討するためカテコラミン 3 分画 (ドーパミン、アドレナリン、ノルアドレナリン) を測定した。**VWF 抗原量、ADAMTS13 抗原量**および

**カテコラミン3分画**の測定はモノクロナール抗体を用いたサンドイッチ式酵素免疫測定法で行った。抗原量の定量化には吸光光度計を用い、OD492 nm で測定した。正常標準血漿の希釈列から、%換算することによって求めた。**VWF 活性量**はホルマリン固定血小板に一定量のリストセチン溶液を添加し、血小板凝集能測定装置を用い、凝集曲線のスロープを測定した。正常標準血漿の希釈列から標準曲線を求め、%換算し定量化した。**ADAMTS13 活性量**はFuran (1997)の方法を改変して用いる。被験血漿に精製したVWFを直接混和し、VWFMの破壊の程度をSDS-アガロースゲル電気泳動法およびウェスタンプロット法を用い測定した。正常標準血漿の希釈列から標準曲線を求め、%換算し定量化した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 季節の変化とその老化による修飾

VWF 産生はいずれの季節においても高齢者が若年成人に比して高値を示した。季節による影響についてみると、年齢層に関係なく、冬季(2月)で最も高く、秋季(10月)、春季(5月)、夏季(8月)の順で低くなる傾向がみられた(冬季 vs 夏季:  $149.7 \pm 11.5$  (SEM) % vs  $117.6 \pm 7.3$  %)。一方、ADAMTS13 活性はVWF 産生とは逆で、高齢者が若年成人よりも低値を示し、季節変動においても、他の季節に比べて冬季に活性が最も低下する傾向が見られた(冬季 vs 夏季:  $125.5 \pm 7.6$  (SEM) % vs  $113.6 \pm 4.6$  %)。ADAMTS13 はVWFの増加に作用する酵素であり、VWFに対して、ADAMTS13が同等量以上の活性を有することが、血栓形成の誘発を阻止するためのバランスの取れた状態であると考えられる。そこで、VWF/ADAMTS13 (VA比)について季節の影響をみた。若年成人のVA比は、いずれの季節においてもADAMTS13活性がVWF活性より高く維持されているのに対して、高齢者では夏季以外の季節で、ADAMTS13活性がVWF活性を大きく下回る結果を示した。とくに、その傾向は冬季において顕著に認められた。この結果は、高齢者において冬季にVA比のバランスが崩れ、「向」血栓性に傾いていることを推察させるものである。

##### (2) 概日リズムの変化とその老化による修飾

VWF 産生は高齢者、若年成人とも夏季において概日リズムはみられなかったが、その他の季節ではAM値がPM値よりも高く、その変動幅は冬季の高齢者において最も大きい傾向がみられた(AM vs PM:  $149.7 \pm 11.5$  (SEM) % vs  $131.7 \pm 11.6$  %)。一方、ADAMTS13 活性についてみると、若年成人

にはいずれの季節においても日内変動がみられなかったのに対し、高齢者ではPMに活性が低下する傾向がみられ、この傾向は冬季において顕著であった(AM vs PM:  $125.6 \pm 7.6$  (SEM) % vs  $116.1 \pm 8.0$  %)。一般にADAMTS13はVWFの量的・質的增加に対して作用し、一時的に消耗性低下を引き起こすが、その後回復することが知られている。今回、高齢者のPM値にADAMTS13活性の低下がみられたことには、AMにみられたVWF上昇が長時間に及んで継続していることを推察させるものである。また、同時に測定したアドレナリン、ノルアドレナリンの分泌が冬季(2月)に高く、また、午前中に高値を示していることから交感神経系の働きがVWF産生の増加の一因として関与していることも考えられる。

##### まとめ

いずれの季節、時間帯においても高齢者は若年成人に比して、VWF産生が高値を示し、ADAMTS13産生が低い傾向がみられた。これは老化による血管能力の低下がVWF産生能の変容に起因してVWFとADAMTS13の働きにバランスの崩れを生じさせ、「向」血栓性に強く傾いていることを推察させるものと考えられる。このバランスの崩れは、気温が低くなる秋季から冬季にかけて大きくなり、とくに冬季の午前中において、最も顕著にみられた。これらの結果はスポーツ活動に伴うVWF産生の更なる増加を考え合わせた時、高齢者では、より血小板血栓形成の起こりやすい状況をもたらしていることを示唆しており、十分な安全対策の必要性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### 〔雑誌論文〕(計7件)

Inoue Y, Ichinose-Kuwahara T, Funaki C et al.: Sex differences in acetylcholine-induced sweating responses due to physical training. J Physiol Anthropol 2014 (in press)

井上芳光: 子どもや高齢者の暑さの生理学と熱中症: 保健の科学 56(7), 2014 (印刷中)

井上芳光: 高齢者の暑熱耐性と暑熱順化. Geriatric Medicine 52 (5): 541-555, 2014  
Ueda H, Inoue Y. Improved procedure for estimating time-dependent changes in local sweat rates by measuring local sweat volumes. J Ergonomics 3:121. doi10.4172/2165-7556.1000121, 2013

Takaya H, Uemura M, Fujimura Y, Ishizashi H: ADAMTS13 activity may predict the cumulative survival of

patients with liver cirrhosis in comparison with the Child-Turcotte-Pugh score and the Model for End-Stage Liver Disease score. Hepatol. Res. 42(5).459-72.2012.

井上芳光:発汗機能の老化 - 全身的協関の視点から - . 日本民族学雑誌 266, 99 101、2011

Amano T, Ichinose M, Koga S, Inoue Y, Sweating responses and the muscle metaboreflex under mildly hyperthermic conditions in sprinters and distance runners.J.Appl.physiol. 111.524-29.2011

#### 〔学会発表〕(計 6 件)

石指宏通、井上芳光:高齢者におけるスポーツ活動時の血栓形成関連因子の動態、第 69 回日本生理人類学会、京都、2013、10 月

井上芳光:子どもと高齢者の特徴。第 27 回運動と体温の研究会シンポジウム、東京、2013、9 月

井上芳光、東海 美咲、宮川 しており、戸谷 真理子、一之瀬 智子、上田 博之:夏季における高齢者の温熱的生活環境およびそれと体温調節能力との関連性。日本生理人類学会第 68 回大会、金沢、2013、6 月

井上芳光:子どもと高齢者の熱中症予防策。日本生気象学会主催シンポジウム、京都女子大学、2012、6 月

井上芳光、大木 淑恵、安岡 沙紀:高齢者における汗腺機能の季節変化、日本生理人類学会第 65 回大会、大阪、2011、11 月

井上芳光、上田 博之、Chucheepp Praptittaya:タイ人の汗腺機能における老若男女特性、日本生理人類学会第 64 回大会、福岡、2011 年 6 月

#### 〔図書〕(計 0 件)

#### 〔産業財産権〕

##### ○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

##### ○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

石指 宏通(ISHIZASHI Hiromichi)

奈良県立医科大学・医学部・医学科

研究者番号:50260807

##### (2)研究分担者

井上 芳光(INOUE, Yoshimitsu)

大阪国際大学・人間科学部・教授

研究者番号:70144566