

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500862

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患の運動療法と炎症制御および酸化・窒素化ストレスに関する検討

研究課題名(英文)Effects of pulmonary rehabilitation on inflammatory response, oxidative stress, and nitrosative stress in COPD patients

研究代表者

大石 修司(OHISHI, SHUJI)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：00322462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：COPD患者への呼吸リハビリテーション(呼吸リハ)は、呼吸機能は改善しなかったが、運動耐容能を有意に増大させ、酸化ストレスを有意に軽減させた。一方、窒素化ストレスに変化はなく、測定した炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、レプチン)は、いずれも呼吸リハとは関連しなかった。さらに、閉塞性障害の重症群では、運動が酸化ストレスを増大させる可能性が示唆された。

上記より、COPD患者への呼吸リハは、運動耐容能を改善し、酸化ストレスを軽減することが示唆された。しかしながら、運動強度によっては、酸化ストレスを増大させ、尿中8-OH-dGがその指標となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive pulmonary rehabilitation (PR) program used in the current study significantly improved the exercise endurance capacity in COPD patients. And it also decreased the level of serum TBARS, the marker of oxidative stress. However, there was no significant change in any of respiratory function tests between pre- and post-rehabilitation. On the other hand, serum nitrotyrosine, the marker for nitrosative stress, did not alter after PR. Inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, Leptin) did not alter after PR, too. Furthermore, in severe COPD patients, PR may have a risk to induce further oxidative stress.

Taken together above, our findings suggest that PR to COPD patients improves the exercise performance, and it also reduces the oxidative stress. However, PR with heavier exercise intensity might induce more oxidative stress in COPD patients, especially severe COPD patients, seen as the increase of urinary 8-OH-dG.

研究分野：総合領域

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：慢性閉塞性肺疾患 運動療法 酸化ストレス 窒素化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

COPD は、全身性炎症性疾患(Gan et al. Thorax 2004)であり、その発症・進展に酸化ストレスが関与することが知られている。一方、COPD 患者に対する包括的呼吸リハビリテーションの導入は、症状の改善だけでなく、HRQOL(health-related quality of life)の改善、さらには社会活動への復帰も期待されるようになってきており、GOLD(Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease)のガイドラインや日本呼吸器学会の COPD ガイドラインでもその重要性和有効性をもとにその実施が強く勧められている。しかしながら、運動はその種類や強度によっては炎症性メディエーターを介して炎症反応や酸化ストレスを増大させ、生体への酸化的ダメージを引き起こすことになる。すなわち、運動は生体へダメージを与えることもある両刃の剣である。われわれは、これまでに急性運動負荷や運動トレーニングと酸化ストレスに対する生体の応答(Oh-ishi et al. Respi Physiol 1996, Am J Respir Crit Care Med 1997, Clin Exp Pharma Physiol 1997)や老化や骨粗しょう症と運動に関する酸化的応答(Oh-ishi et al. Pflugers Arch 1998; Itoh et al. Am J Physiol 2004, Hatao et al. Mech Ageing Dev 2006)といった運動負荷、運動トレーニング、老化あるいは骨粗しょう症といったさまざまな状況と酸化ストレスについて検討してきた。従来の研究成果から、適切な運動トレーニングは生体の運動耐容能を改善するだけでなく、運動誘発性酸化ストレスを軽減することが示唆された。一方、COPD に対する包括的呼吸リハビリテーションも運動療法を中心としたプログラムであり、運動療法が COPD 患者においても骨格筋の酸化能力を高め、動耐容能の改善につながることを示されている(Maltais et al. Am J Respir Crit Care Med 1996)。しかしながら、COPD に対する運動療法の効果を炎症性メディエーターおよび酸化ストレス・窒素化ストレスの面から検討した報告はいまだ十分ではないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究は、慢性閉塞性肺疾患(COPD)における包括的呼吸リハビリテーション(呼吸リハ)の効果・意義を従来の運動生理学的な解析に、酸化ストレスおよび窒素化ストレスに関連する生体バイオマーカーおよび炎症性サイトカインの解析・検討を加えることにより、全身性炎症性疾患としての COPD への呼吸リハの影響・効果・意義を明らかにすることを目的としている。また、その有効性を確認するための簡便で信頼性のある非侵襲的な指標を確立することも目的と

する。

## 3. 研究の方法

対象：対象患者は、東京医科大学茨城医療センター呼吸器内科で臨床症状、呼吸機能検査、画像診断にて慢性閉塞性肺疾患と診断された患者とする。上記対象者は、医師による十分な説明の後、書面にてインフォームド・コンセントを得た。

方法：(1) 慢性閉塞性肺疾患患者に対して、胸部 X 線検査、呼吸機能検査、一般血液生化学検査を実施した。また、酸化ストレスの指標として血清過酸化脂質(TBARS)、血清ニトロ化チロシン(NO-Tyr)、尿中酸化 DNA(8-ヒドロキシデオキシグアノシン, 8OH-dG)および赤血球中の主要な抗酸化酵素(スーパーオキシドジスムターゼ: SOD, グルタチオンペルオキシダーゼ: GPX, カタラーゼ: CAT)および過酸化脂質濃度を測定し、さらに微量生理活性物質[炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6)およびレプチン]を併せて検討し、酸化・窒素化ストレスおよび炎症関連物質の状態を検討した。

(2) 呼吸リハのプログラムは、リラクゼーション、ストレッチ、呼吸法、20分歩行(6MWDの70%に歩行速度を調整)、上肢・下肢の筋力トレーニングなどからなる運動療法となり、3ヶ月間実施した。開始前および終了時にも上記検討項目を測定し、比較・検討した。酸化ストレスマーカー(血清および赤血球中の抗酸化酵素および酸化物質)を測定し検討した。同時に、その有効性を、臨床症状や身体所見、血液生化学検査、肺機能検査、運動耐容能(6分間歩行試験、シャトルワーク試験(SWT))から評価した。

(3) 酸化・窒素化ストレスマーカーおよび抗酸化酵素の測定：血清 TBARS 濃度は八木法で、血清 NO-Tyr は ELISA 法(Oxis Research, Portland)で、尿中酸化 DNA(8OH-dG)はイムノクロマト法を用いた測定装置(ICR-001 Selista, Tokyo)で測定した。また、赤血球中の抗酸化酵素(SOD, GPX, CAT)は、それぞれの常法により分光光学的に酵素活性を測定し、CuZn-SOD は ELISA 法(Kamiya Biomedical Company, Seattle)により蛋白量も測定した。

(4) サイトカイン測定：TNF- $\alpha$  および IL-6 は化学発光を用いた ELISA 法(R&D, Minneapolis), IL-1 はサンドイッチ ELISA 法(R&D), およびレプチンは RIA 法(LINCO Research, St. Charles)で測定した。

## 4. 研究成果

(1) COPD に対する運動療法の影響 - 酸化ストレス・窒素化ストレス -  
COPD と運動療法に関連した酸化ストレスおよび窒素化ストレスを検討するために、呼吸リハの前後でそれぞれの指標となる血清 TBARS および尿中酸化 DNA、血清 NO-Tyr を測定・

評価した。対象は、安定期 COPD 患者で、これまでに呼吸リハ・プログラムに参加した 14 名の男性（閉塞性換気障害の病期分類で stage II 1 名、stage III 7 名、stage IV 6 名）（最終）で、平均年齢は 66.7 歳であった。リハ前およびリハ後（10～12 週後）に、呼吸機能検査、6 分間歩行距離（6MWD）および酸化・窒素化ストレス・マーカーを測定した。歩行運動の処方、6MWD の 70%とした。呼吸機能検査では、肺活量、努力肺活量、1 秒量、一秒率、% 予測 1 秒量などのパラメーターに呼吸リハ前後で有意な変化は見られなかった。一方、6MWD は、269.9m（リハ前）から（リハ後）320.3 m と平均で約 50m 伸び、有意に歩行距離が伸び、運動耐容能の改善が認められた。血清 TBARS および尿中 8-OH-dG（対 Crea 比）を測定した。血清 TBARS は、4.75nmol/ml（リハ前）から 3.83nmol/ml（リハ後）と有意に低下した。また、同時に測定した血清 NO-Tyr は、リハ前後でそれぞれ 14.1 nmol/ml と 12.5 nmol/ml であり、統計学的には有意な変化は見られなかった。さらに、呼吸リハ前後での検体測定が可能であった 8 名については、尿中 8-OH-dG も検討したが、リハ前後でそれぞれ 14.8 ng/mgCr と 16.8 ng/mgCr であり、有意な変化は見られなかった。COPD 患者への呼吸リハは、呼吸機能の改善なしに運動耐容能を改善するとともに酸化ストレスを軽減することが示唆された。しかしながら、酸化ストレスの標的となる生体内分子あるいは測定試料の相違によって、運動に対する応答が異なる可能性が推測された。

## (2) 炎症性サイトカインの動態

前記検討に引き続いて、炎症性サイトカインとして IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 を、栄養と炎症に関連するマーカーとしてレプチンを測定・評価した。測定した炎症性サイトカインのうち、TNF- $\alpha$  および IL-1 は、多くの検体で、用いた ELISA kit の測定感度以下であった。測定可能であった IL-6 は、運動で増加することが知られているサイトカインであり、リハ前後でそれぞれ  $2.54 \pm 0.71$ pg/ml と  $3.92 \pm 1.48$ pg/ml であったが、統計的には有意差は認められなかった。また、COPD に認められる栄養障害との関連が示唆されるレプチンは、好中球性炎症を惹起することも知られており、COPD に認められる好中球性炎症が運動療法によって活性化されるかを検討したが、リハ前後でそれぞれ  $3.46 \pm 0.57$ ng/ml と  $3.55 \pm 0.42$ ng/ml で有意差はなかった。したがって、今回設定した運動強度での運動療法では、炎症性サイトカインなどの炎症関連分子への影響は認められなかった。

## (3) 運動誘発性酸化ストレスの標的臓器としての赤血球および全身的酸化ストレス指標としての尿中酸化 DNA の検討 - 閉塞性障害の程度に着目して -

対象は、安定期 COPD 患者で、呼吸リハ・プログラムに参加した 18 名の男性である。閉塞性

換気障害の病期分類で stage II/III 群 12 名（平均年齢 71.5 歳）と stage IV 群 6 名（平均年齢 65.7 歳）の 2 群に分けて検討した。歩行運動の処方、SWT の 70%とした。呼吸機能検査では、両群ともに肺活量、努力肺活量、1 秒量、一秒率、% 予測 1 秒量などのパラメーターに呼吸リハ前後で有意な変化は見られなかった。一方、6MWD は、II/III 群で 431.2m（リハ前）から 489.1m（リハ後）と平均で 50m 以上伸び、有意に歩行距離が伸び、運動耐容能の改善が認められた。II/III 群では、SWT も 329.2m（リハ前）から（リハ後）378.2m と有意に改善した。しかしながら、IV 群では、運動耐容能の改善（6MWD : 346.5m 338.7 m ; SWT : 205.0m 233.3m）は見られなかった。

酸化・抗酸化バランスの影響を検討するために、赤血球中の主要な抗酸化酵素（SOD, GPX, CAT）活性を測定したが、群間での差は認められず、また両群ともに呼吸リハ前後で有意な活性の変動は認められなかった。同時に測定した赤血球中の TBARS も群間（II/III vs IV = 1.04 ( $\mu$  M/gHb) vs 0.87) および呼吸リハ前後（II/III: 1.04 0.99; IV = 0.87 0.90）で有意な変化は認められなかった。一方、尿中 8-OH-dG は、stage IV の重症群において、リハ前後で 14.5 ng/mgCr から 24.3 ng/mgCr と有意に上昇したが、stage II/III 群においては 16.7 17.7 と有意差は認められなかった。上記より、より重症度の高い群では、今回用いた運動強度（SWT の 70%）により酸化ストレスが増大した可能性が示唆され、尿中 8-OH-dG はその指標としての有用性が期待される。

まとめ：今回の検討により、COPD 患者への包括的呼吸リハビリテーションは、呼吸機能の改善なしに健康関連 QOL や運動耐容能を改善するとともに酸化ストレスを軽減することが示唆された。しかしながら、重症度の高い症例への運動療法は、運動処方によっては運動耐容能の改善に乏しく、さらに酸化ストレスを増大するリスクが認められ、尿中 8-OH-dG がその指標となりうることを示唆された。上記より、COPD への運動療法の導入は運動耐容能の改善とともに酸化ストレスの軽減が期待されるが、運動処方によっては酸化ストレスを増大させることを念頭に置くことが重要と思われた。

## 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 3 件）

Kenji Nemoto, Shuji Oh-ishi, Masayuki Itoh, Takefumi Saito, Toshio Ichiwata. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine is A Potential Indicator for Estimating Pulmonary Rehabilitation Induced

Oxidative Stress in COPD Patients. Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2014, in press. (査読有)

大石修司、清水谷尚宏、内海健太、一和多俊男：運動時の呼吸循環調節．THE LUNG perspectives 21 (2): 183-187, 2013. (査読無)

根本健司、伊藤昌之、中村博幸、大石修司：COPD 患者に対する運動療法が活性酸素種と活性窒素種へ及ぼす影響に関する検討．東京医科大学雑誌 70: 34-41, 2012. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

Kenji Nemoto, Effect of pulmonary rehabilitation on RBC oxidative markers and urinary 8-OHdG in COPD patients with different severities. 2014ATS International Conference, 2014/5/16-21, San Diego, 2014.

根本健司、気流閉塞の重症度により COPD 症例における運動誘発性酸化ストレスの影響は異なる．第 53 回臨床呼吸生理研究会, 2013/06/22, 東京.

根本健司、COPD 患者への運動療法が酸化ストレスに及ぼす影響-気流閉塞の重症度での比較-. 第 53 回日本呼吸器学会総会, 2013/04/19-21, 東京.

Kenji Nemoto, Effect of pulmonary rehabilitation on erythrocyte oxidative stress and antioxidants in COPD patients. European Respiratory Society Annual Congress 2012, 2012/09/01-05, Vienna (Austria).

根本健司、COPD 患者への運動療法と生体酸化物質への影響に関する検討．第 52 回日本呼吸器学会総会, 2012/04/20-22, 神戸.

根本健司、COPD 患者への運動療法における FRAS4 を用いた酸化ストレス度の測定とその意義に関する検討．第 21 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会, 2011/11/3-4, 松本.

根本健司、COPD 患者への運動療法と赤血球酸化ストレスに関する検討．第 16 回 IRC (Ibaraki Respiration Conference), 2011/0708, つくば.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

大石 修司 (OHISHI, SHUJI)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00322462

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

伊藤 昌之 (MASAYUKI, ITOH)  
東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10419731

仙波 征太郎 (SENBA, SEITARO)

東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10408156

(4) 研究協力者

根本 健司 (KENJI, NEMOTO)  
東京医科大学・医学部・大学院生