

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350900

研究課題名(和文) 運動強度・時間・脱水量と血栓形成発生機序の関連性およびそれに及ぼす老化の影響

研究課題名(英文) The relationship between exercise intensity, time, dehydration and thrombus formation mechanism and the influence of aging on that relationship.

研究代表者

石指 宏通 (Ishizashi, Hiromichi)

奈良県立医科大学・医学部・教育教授

研究者番号：50260807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：運動時にみられる血栓形成に影響を及ぼす因子を定量する目的で、異なる運動強度、運動時間ならびに脱水の程度と血栓形成関連因子(VWF・ADAMTA13)との関連性について検討した。その結果、運動時の血栓傾向を示すVWF・ADAMTA13の比は運動時間よりも運動強度に影響され、55%V02max付近に血栓傾向が著増する「運動強度閾値」のあることが認められた。次に脱水率との関連性についてみると、環境温度の違いによる脱水率の相違はVWF・ADAMTA13の変化には影響を及ぼさなかった。これらの結果は、運動時にみられる血栓傾向は運動強度に起因していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We aimed to quantify factors influencing thrombus formation at the time of sports activities, and compared different exercise intensities, exercise times and the extent of dehydration and thrombosis. The relationship with the formation-related factor (VWF, ADAMTS 13) was also examined. As a result, thrombus formation-related factors (VWF/ADAMTS 13) indicating the tendency of thrombosis during exercise were affected by exercise intensity rather than exercise time. In addition, it was recognized that there was an "exercise intensity threshold" at which the thrombosis tendency increased significantly at about 55%V02max. Finally, considering the relationship between the dehydration rate and thrombus formation-related factors, the difference in the dehydration rate due to the difference in ambient temperature did not affect the change in thrombus formation-related factors. These results suggest that the thrombotic tendency seen during exercise is due to exercise intensity.

研究分野：スポーツ科学

キーワード：運動強度 運動時間 脱水率 血栓形成 VWF ADAMTS13

1. 研究開始当初の背景

スポーツ活動時における突然死の発生機序は未だ十分解明されていないが、微小循環障害は特に注目されており、その一因として病的血栓の形成があげられる。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(VWF)によって形成される血小板血栓と考えられる。

これまで我々は血小板血栓において「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 (ADAMTS13) をとりあげ、男子大学生を対象に、自転車エルゴメータを用いた 60%VO₂max の 60 分間運動を負荷し、負荷前、負荷直後から経時的に 12 時間後まで、血小板数、VWF 抗原量、VWF 凝集能、および ADAMTS13 活性を経時的に測定した。その結果、負荷直後より VWF 抗原量と凝集能は著増し、これらの増加は運動 6 時間後まで検出され、12 時間後には消失した。一方、ADAMTS13 活性は VWF の動態とは異なり、運動負荷前後には酵素活性の変化は認められなかったが、2 時間後以降に減少が認められた。運動負荷による VWF の量的・質的増加は血流量や血圧増加に伴う外傷時の過剰出血に対する防御策の一つと考えられ、血漿中の ADAMTS13 により分解され、同時に同酵素活性の消耗性低下がひき続くものと理解された。次に、高強度時にみられた著増が如何なる要因によるものかを明らかにするため、運動時の発汗による脱水状態に着目し、脱水状態の相違が VWF 産生にどのように影響するのか検討した。その結果、運動終了一時間後の VWF 抗原量と体重当りの脱水率との間には有意な正の相関傾向がみられたことから、運動時における脱水の程度が軽い者ほど、回復

過程における VWF 産生の低下が早期に出現する可能性が示唆された。しかしながら、運動時にみられた VWF の量的・質的増加が脱水それ自体に起因したのか、あるいは高強度運動に起因したのかは明確とは言えない。一般に血管の中を流れる血液の速さは、血管の中央部の早く、血管壁付近では流れが遅い傾向にあり、速度差が生じる。この速度差が「ずり応力」(血球や血漿蛋白を歪ませ、血管壁を擦るような力)を生み、VWF 産生を亢進することが報告されている。この「ずり応力」は血液速度、血管径および血液粘度の影響を受け、血流が速いほど、血管径が狭いほど、また血液粘度が高いほど大きくなることが知られている。この運動時の「ずり応力」を考えたとき、脱水により血液粘度が高くなるだけでなく、強度に依存して血流速度も高くなるのが当然考えられるが、VWF 産生能に影響を及ぼす明確な要因については全く解明されていないのが現状である。また、高齢者では、水分補給の頻度・量の減少に加え、老化による血管内皮細胞の細胞増殖能が低下するため、血管障害が進行し、内皮細胞由来の VWF 産生が更新していることも考慮しなければならない。しかし、運動強度・時間および脱水量が VWF・ADAMTS13 に及ぼす影響が加齢に伴いどのように変化するのか、全く明らかにされていない。

2. 研究目的

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。スポーツ中に発生する突然死は、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病的血栓形成の関与が指摘されている。近年、病的血栓において「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、血栓形成のストッパーとしての働きをもつ酵素(ADAMTS13)の作用が関与していることが解明されているが、「向」血栓性へのトリガーとなる運動に関わる因子については明らかにされていない。

そこで本研究では、異なる運動強度・時間および脱水量と血栓形成関連因子(VWF・ADAMTS13)との関連性を明らかにすることで、スポーツ活動時にみられる血栓形成に影響する因子を定量する。また、これらの関連性について、老化の影響を検討する。

3. 研究方法

(1) 運動強度・時間と血栓形成関連因子の関連性

健常な男子大学生8名を対象にして、自転車エルゴメーターを用いた3種類の運動強度(低強度:40%VO₂max・中強度:55%VO₂max・高強度:65%VO₂max)について、15分・30分・45分間(65%VO₂maxについては15分・30分間)の脚運動を十分な期間を空けて負荷した。設定ごとに運動前後採血し、血中の血栓形成関連因子(VWF,ADAMTS13)の経時的変化を測定するとともに、血栓形成関連因子が大きく増加する強度(強度閾値)ならびに増加の開始時間(時間閾値)について明らかにした。なお、各被験者の40%・55%・65%VO₂max運動時の絶対的運動強度は、最大下負荷漸増法で推定したVO₂maxとその際のVO₂-運動強度(Watts)の対応関係に基づき決定する。また、これらの全ての運動実験は25℃環境下で実施した。

VWF抗原量の測定はモノクローナル抗体を

用いたサンドイッチ式酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)で、抗原量の定量化には吸光光度計(コロナモデルMTP-32)が用い、OD492nm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凝集能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(メバニクス Model PAT-2A)を用い、凝集曲線のスロープを測定する。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活性はFuran(1997)の方法を改変して用いた。被験血漿に精製したVWFを直接混和し、VWF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ブ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。

(2) 脱水量と血栓形成関連因子の関連性

実験1から得られた血栓形成関連因子(VWFおよびADAMTS13)における強度閾値ならびに時間閾値に基づき、同一被験者を対象として、2種類の環境温度(15℃・35℃)下で強度閾値ならびに時間閾値を考慮した運動を負荷し、発汗による脱水の影響と血栓形成関連因子との関連性を検討した。

(3) 加齢の影響

若年成人で明らかにした強度閾値・時間閾値に基づき、その閾値の運動強度・時間を運動負荷として設定した。運動習慣のある中高年者6名を対象にして自転車運動を負荷し、その際の血栓形成関連因子と運動強度・時間・脱水量の関連性に及ぼす加齢の影響について検討した。

4. 研究成果

(1) 運動強度・時間と血栓形成関連因子の関

連性

低強度運動時のVWF値の経時的変化は運動開始から15分までは変化はみられず、30分後に増加するものの、その変化は軽微なものであった（運動前・15分・30分・60分：93.3 ± 18.8%・96.2 ± 21.0%・108.2 ± 17.7%・112.4 ± 20.1%）。血栓化傾向を示すVWF/

ADAMTA13（「向」血栓因子に対する「抗」血栓因子の割合）についてみると、すべての時間帯において「抗」血栓化を示すADAMTS13値が「向」血栓化を示すVWF値を上回り、血栓化は示さなかった（運動前・15分・30分・45分：0.75 ± 0.16・0.79 ± 0.18・0.92 ± 0.2・0.96 ± 0.19）。それに対して中強度運動時では、VWF値の変動は早期に始まり、開始15分後にはすでに増加がみられ、その後、時間経過とともに増加していく傾向がみられた。いずれの時間においても、低強度に比して高値を示し、運動開始15分値で、低強度運動時の60分値を上回る結果であった（運動前・15分・30分・45分：88.4 ± 17.7%・136 ± 22.6%・146.1 ± 19.5%・158.8 ± 16.3%）。また、VWF/ADAMTA13も運動開始から15分後にはVWF（向血栓性）がADAMTS13（抗血栓性）を上回り、血栓化傾向を示す結果であった（運動前・15分・30分・45分：0.74 ± 0.16・1.12 ± 0.20・1.23 ± 0.21・1.29 ± 0.22）。さらに高強度運動時にみられるVWF値、VWF/ADAMTA13値の増加とも中強度運動時よりも大きい傾向がみられ、運動開始から強い血栓化傾向が認められた。これらの結果は運動強度が高い程、より早い段階で血栓形成傾向に陥りやすいことを示し、中強度（55%VO_{2max}）付近に血栓化が著増する閾値が存在することを示唆している。

（2）脱水量と血栓形成関連因子の関連性

2種類の環境温度（15・35）下におい

て運動負荷後の筋疲労の程度を推定する血中アルドラーゼ濃度の変化には差がみられなかった（高温下・低温下：8.39 ± 1.89U/l・8.29 ± 1.69 U/l）。また、高温環境下の体重変動から見た脱水率は1.51 ± 0.26%を示し、低温環境下の脱水率よりも高い値を示した。運動後のVWF値は高温下で151.4 ± 22.1%で、低温下で148.6 ± 21.4%を示した。さらに血栓化傾向を示すVWF/ADAMTS13は高温環境下で1.37 ± 0.27に対して、低温環境下で1.32 ± 0.26を示し、両環境間に有意な差は認められなかった。これらの結果は異なる環境温度条件下における脱水量の相違は血栓形成関連因子の変化に直接的に影響を及ぼさないこと示唆している。

（3）加齢の影響

至適運動強度である軽強度（40%VO_{2max}）における血栓形成関連因子の変化をみると、「向」血栓因子であるVWFは中高年者vs若年者で運動前（102.4 ± 16.2%vs93.3 ± 21.2%）、運動後（118.3 ± 19.6%vs後108.2 ± 23.9%）とも中高年者が高値を示したが、両群間に有意な差は認められなかった。運動前後の変動についても中高年者で15.9%の増加に対して、若年者で14.9%の増加と両群とも15%程度の微動にとどまる結果であった。また、血栓化を示す運動後のVWF/ADAMTA13は両群ともADAMTS13がVWFを上回る結果であり、中高齢者で0.96 ± 0.2、若年者で0.92 ± 0.22と血栓傾向を示すものではなかった。

これらの結果から、運動習慣のある中高年者においては至適強度での運動時にみられる血栓形成には若年者と顕著な相違はみられず、加齢の影響を受けていないことを示唆するであった。

（4）まとめ

スポーツ活動時にみられる血栓形成に影響を及ぼす因子を定量する目的で、異なる運動強度、運動時間ならびに脱水率を設定し、血栓形成関連因子（VWF：「向」血栓因子・ADAMTA13：「抗」血栓因子）との関連性について検討を行った。その結果、運動時の血栓化傾向を示すVWF/ADAMTA13（「向」血栓因子に対する「抗」血栓因子の割合）は運動時間や脱水率よりも運動強度に影響され、血栓傾向が著増する運動強度閾値（55%V02max）の存在することが示唆された。また、運動習慣のある中高年者においては至適強度での運動時にみられる血栓形成には若年者と顕著な相違はみられず、加齢の影響を受けていないことを示唆するであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計5件）

Amano T, Hirose M, Konishi K, Gerrett N, Ueda H, Kondo N, Inoue Y. : Maximum rate of sweat ions reabsorption during exercise with regional differences, sex, and exercise training. *Eur J Appl Physiol.* 117(7)、1317-1327、2017
doi: 10.1007/s00421-017-3619-8.

Amano T, Shitara Y, Fujii N, Inoue Y., Kondo N. : Evidence for α -adrenergic modulation of sweating during incremental exercise in habitually trained males.

*J Appl Physiol*123(1)、182-189、2017
doi:10.1152/jappphysiol.00220.2017.

井上芳光、坂東沙耶、山崎彩佳、戸谷真理子、一之瀬智子、上田博之：夏季日常生活下における温熱環境の性差および年齢差、日本生理人類学会誌22（3）、

135-143、2017

doi:10.20718/jjpa.22.3_135

Inoue Y., Gerrett N, Ichinose-Kuwahara T: Sex differences in age-related changes on peripheral warm and cold innocuous thermal sensitivity.

*Physiol Behav*164、86-92 2016

doi: 10.1016/j.physbeh.2016.05.045.

井上芳光、東海美咲、宮川しおり：夏季における高齢者の温熱的生活環境、日本生理人類学会誌21(1)、11-16、2016

〔学会発表〕（計4件）

天野達郎、藤井直人、井上芳光、近藤徳彦：運動トレーニング者における安静温熱負荷時の発汗反応：一酸化窒素とシクロオキシゲナーゼの影響、第72回日本体力医学会、2017

山下千晶、米波直子、石指宏通：エリートラグビーフットボール選手の内臓脂肪とインスリン抵抗性、第70回日本体力医学会、2015年

石指宏通 井上芳光：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、第71回日本生理人類学会、2014年

井上芳光 山崎彩佳 坂東沙耶 一之瀬智子 上田博之：夏季における温熱的生活環境の性差・年齢差・季節差、第71回日本生理人類学会、2014年

〔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・教育教授

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