

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22500661

研究課題名(和文) 運動及びアルギニン摂取が血小板凝集及び血液凝固・線溶に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of exercise training and L-arginine administration on fibrinolysis

研究代表者

大桑 哲男 (Ohkuwa, Tetsuo)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80115675

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)：高齢ラット、肥満ラット及び糖尿病ラットを対象に運動トレーニング及びL-アルギニン投与が血液の凝固・線溶に及ぼす影響をタンパク質酸化及び脂質過酸化から検討した。本実験においてL-アルギニン摂取と運動トレーニング群のプラスミノゲン活性化因子は正常ラットに比べ有意に増大し、血液凝固マーカー(トロンボキサンB2)は有意に減少した。またL-アルギニン摂取と運動トレーニング群のタンパク質酸化及び脂質過酸化は対照群に比較し有意に減少し、還元型グルタチオン及びグルタチオンレダクターゼ活性は有意に増大した。これらの結果から運動とL-アルギニン摂取は酸化ストレス軽減させ、血栓予防に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study was performed to evaluate the effects of exercise training and L-arginine administration on the fibrinolysis, blood coagulation and oxidative stress in aged, obese and diabetic rats. The plasminogen activated factor (t-PA and u-PA) significantly increased after exercise training and L-arginine administration. Moreover, thromboxane B2 significantly increased after exercise training and L-arginine administration compared with the control rats. The protein oxidation and lipid peroxide significantly decreased, and reduced glutathione (GSH) and glutathione reductase significantly increased after exercise training and L-arginine administration compared with the control rats. This study confirmed that the exercise training and L-arginine administration improved plasminogen activated factor (t-PA and u-PA) and blood coagulation might be due to decrease in oxidative stress in aged, obese and diabetic rats.

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：アルギニン摂取 運動トレーニング 血液凝固 線溶 加齢 肥満 糖尿病 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本人の病気の 70% が心臓病や脳梗塞などの血栓症であるといわれている。血栓を誘導する血管系病気は血液の凝固と線溶のバランスによって生じる。冠状動脈血管症患者は繊維素溶解活性化因子が減少することが知られている (Nilsson ら 1987)。凝固系ではフィブリンが生成され、線溶系ではプラスミンが生成され、凝固系が亢進し、線溶系が抑制されると血栓が生成される。しかし凝固は止血のために重要である。両者は若年者では一定のバランスを保持しているが、加齢に伴い凝固因子が亢進されるようになり動脈硬化が誘導されやすくなる。

これまで若年者を対象に研究がなされ、高齢者や肥満者、糖尿病患者においての報告は非常に少ない。血管壁に破損が生じるとその破損個所に血小板が結合し、その血小板にフィブリノゲンが結合し、血栓が生成される。血栓は動脈硬化の原因であり、心筋梗塞、脳梗塞などの血栓性疾患を誘発する。従って血栓症の早期発見・予防を行うことは生活習慣病予防に極めて重要である。このように加齢、肥満や糖尿病に罹患すると血液の凝固機能が亢進し、線溶機能が低下することにより血栓が生成され血管系病気が発症する。従って血栓予防の検討が極めて必要である。

2. 研究の目的

(1) プラスミノゲン活性化因子 (t-PA: tissue type plasminogen activator, u-PA; urokinase type plasminogen activator) は線溶 (繊維素溶解) に重要な役割を果たしていることを報告してきた (Ohkuwa ら 2004)。t-PA は長時間運動で増大 (Rocker ら 1990) し、運動強度に比例して増大 (Rankin ら 1995) し、運動トレーニング後に増大 (Priscoll ら 1998; Re Raz ら 1992) するが、u-PA は長時間運動後に著しく増大することが報告されてきた (Dooijewaard ら 1991)。

(2) 我々はこれまでにトレッドミルでの最大運動後、血漿 t-PA と u-PA 活性は安静時に比べ有意に増大することを認めてきた (Ohkuwa ら 2004)。運動による t-PA と u-PA 活性増大のメカニズムについて、運動により肝臓での t-PA の除去が抑制されたためと考えられているが (Chandler ら 1992)、一方 u-PA は肝臓から放出しているが (Potter Van Loon ら 1992)、t-PA とは独立した機構で制御されていると考えられており (Van den Burg ら 1994)、一致した知見は得られておらず、現在明らかにされていない。

(3) t-PA 及び u-PA 活性に関して、加齢、肥満、糖尿病患者において運動やトレーニング条件 (強度、持続時間、タイプ) との関係は明らかではない。一方アルギニン摂取は血管内皮細胞の一酸化窒素の生成を増大させ、有酸素的作業能力を高め (Maxwell ら 2001)、血管拡張を改善し、末梢抵抗を減少させる (Bode-Boger ら 1998) ことが報告されてい

る。またアルギニン摂取は脂質過酸化を抑制 (Lubec ら 1997) し、キサンチンオキシダーゼ活性を低下させ、還元型グルタチオンを増大させることにより酸化障害を軽減させることが報告されている (Lin ら 2006)。しかしアルギニン摂取が血液凝固・線溶、抗酸化機構、および乳酸脱水素酵素 (LDH: lactate dehydrogenase) の血中への逸脱に及ぼす影響に関して詳細なメカニズムは明らかになっていない。

(4) 本研究は肥満および糖尿病ラットを対象に運動トレーニングと L-アルギニン摂取が血液凝固と線溶、および LDH とそのアイソザイムパターンに及ぼす影響を明らかにし、血栓予防と LDH 逸脱酵素の抑制に有効であるかどうかを明らかにすることと、その効果の機構を酸化ストレスの観点から明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 高齢ラット、肥満ラット (Zucker-fa/fa) および糖尿病ラット (STZ および Zucker-db/db) を対象に運動トレーニング群、運動トレーニング + L-アルギニン群、L-アルギニン群、対照群 (非運動 + 非 L-アルギニン群) の 4 群に分けた。飼育室の室温は 22 に設定し、ラットは各ゲージに 1 匹ずつ飼育した。照明は 12 時間サイクル (照明時間は 8 時 ~ 20 時) とした。食餌と水分摂取は自由摂取とした。運動トレーニングは 1 週間の練習後、30 分 ~ 45 分間持続性トレッドミル運動とした。L-アルギニン濃度は初期には 6% 濃度に希釈して投与したが、低い効果しか認められなかったことと、ホルミシス効果が示唆される結果が得られたことから、その後 2% 濃度に希釈し自由摂取させた。飼育期間は 42 日間とした。

(2) 血液採取と組織採取およびラットの尾部からの皮膚ガス採取方法に関して、ラットの皮膚ガス採取は血液及び組織採取の 1 週間前に実施した。ラットの尾部にテドラバッグを装着し、密閉した後、窒素ガスにてバッグ内を洗浄し、窒素ガスを 44ml 封入し、10 分間尾部から皮膚ガスを採集し、そのうち 40ml を一酸化窒素分析装置 (ピコパ 株式会社) を用いて一酸化窒素濃度を測定した。ラットにペントバルビタール (50mg/kg body weight) を腹腔内投与し、麻酔下にて下大静脈から血液採取し、抗凝固入りの採血管に採取した。採取した血液は線溶活性測定とトロンボキサン B2 測定のために 3000rpm にて遠心分離し血漿を得、測定まで -80 で冷凍保存した。肝臓、心臓、脳組織は採取後すぐに生理食塩水で洗浄し、液体窒素にて凍結し、測定まで -80 で冷凍保存した。

(3) 線溶活性 (プラスミノゲン活性化因子) は Zymography 法を用いて測定した (Hosomi ら 2001)。トロンボキサン B2 は ELISA kit を用いて測定した。測定波長は 405nm にて Multiscan JX マイクロプレートリーダーを用

いて測定した。血漿及び組織中のタンパク質酸化（カルボニル化タンパク質）は Fogaty(2011)の方法を改善して分光光度法による測定、あるいは OxyBlot 法(Protein Oxydation Detection Kit)を用いて測定した。カルボニル化タンパク質測定波長は 366nm にて、UV mini-1240 を用いて測定した。脂質過酸化はマロンジアルデヒド（MDA）をチオバルビツール酸反応性物質（TBARS）として Kumar ら(2013)の方法を改善して分光光度計により測定した。抗酸化酵素活性（グルタチオンレダクターゼ）は Western Blotting 法を用い、還元型グルタチオン・酸化型グルタチオンは、UG120(Shiseido)カラムを用い、高速液体クロマトグラフを用いて測定した。総乳酸脱水素酵素活性およびアイソザイム測定はアガロース電気泳動法を用いて測定した。統計処理は Stat View を用い解析し、有意水準は $p < 0.05$ とした。

4. 研究成果

(1) 高齢ラット、肥満ラットおよび糖尿病ラットを対象に運動トレーニングおよび L-アルギニン投与が血液の凝固・線溶および血中逸脱酵素に及ぼす影響をタンパク質酸化、脂質過酸化から検討した。6%L-アルギニン摂取群の体重は対照群に比べ有意に減少した。食餌量も 6%L-アルギニン摂取群で減少し、6%L-アルギニンは食事量を抑制する効果があることが考えられる。Hu ら(2013)は Zucker diabetic fatty rat において、アルギニン摂取により体重が有意に減少したと報告している。その減少は主に腹部と精巣上体の脂肪の減少に起因していると述べている。また Lucotti ら(2006)もアルギニン摂取により 2 型糖尿病ラットにおいて脂肪量が減少したことを報告している。その理由としてアルギニンが誘導する一酸化窒素は PGC-1 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1) の発現を増大させ、AMPPK(AMP-activated protein kinase)レベルが増大したことによると報告している。本実験において、L-アルギニン摂取群の皮膚ガス中の一酸化窒素濃度が増大したことから、L-アルギニン投与は一酸化窒素を介した機構が関係していることが伺える。PGC-1 と AMPPK レベルの増大が脂肪組織のエネルギー基質の酸化を増大させ、脂肪組織の脂肪分解を促進させたためと考えられる(Tan ら 2012; Fu ら 2005)。一方運動トレーニング群は食事量が増大し、体重は対照群に比べ有意に高い値であった。運動トレーニング群 + L-アルギニン摂取群は対照群と有意な差は認められなかった。これは食事量が増大したことと運動トレーニングによる骨格筋の肥大(Ishihara ら 1998)とアルギニン摂取による脂肪組織の分解が相殺されたためと考えられる。

(2) 糖尿病ラットにおいて運動トレーニング群の血中グルコース濃度は対照群に比べ

有意に減少したが、6%L-アルギニン摂取群の血中グルコース濃度に有意差は認められなかった。

(3) 運動トレーニングと 6%L-アルギニン摂取がプラスミノゲン活性化因子に及ぼす影響について、6%L-アルギニン摂取は線溶活性を改善させたが、運動トレーニング + L-アルギニン摂取には効果が認められなかった。これらのことから運動トレーニング条件や投与する L-アルギニン濃度条件の検討が必要と考えられる。

(4) 運動トレーニングと L-アルギニン摂取がタンパク質酸化に及ぼす影響について、運動トレーニング負荷と 6%L-アルギニン投与はタンパク質の酸化を抑制したが、運動トレーニング + L-アルギニン摂取は逆にタンパク質の酸化を亢進させた。これは運動トレーニングと L-アルギニン摂取の併用はホルミシス効果を生じさせ、酸化ストレスを亢進させた可能性が高いと考えられる。運動トレーニング + 6%L-アルギニン摂取はタンパク質酸化を亢進することが明らかになったことから、糖尿病ラットの研究においては L-アルギニン濃度は 2%に希釈してラットに投与した。運動トレーニング群の体重は 2%L-アルギニン群に比べ有意に増大した。しかし運動トレーニング + 2%L-アルギニン摂取群の体重は 2%L-アルギニン群のみに比べ有意な差が認められなかった。これらのことから 2%L-アルギニン摂取でも体重を減少させる効果があることが明らかになった。この減少は主に脂肪組織の減少に起因することが考えられる(Pieper ら 1997)。こうしたことから L-アルギニン摂取は生体内の脂肪減少に有用であることが示唆される。

(5) 2%濃度の L-アルギニン摂取群と運動トレーニング群及び運動トレーニング群 + 2%L-アルギニン摂取群のプラスミノゲン活性化因子は対照群に比べ有意な増加が認められた。前年度、6%L-アルギニン摂取 + 運動トレーニング群は対照群に比べプラスミノゲン活性化因子は対照群とは有意な差は認められなかったが、L-アルギニン群に比べ有意に減少したことを報告したが、2%L-アルギニン濃度での L-アルギニン単独投与でも、また運動トレーニングと 2%L-アルギニン摂取群でも血液線溶に良い効果をもたらすことが明らかとなった。

さらに血液凝固への影響について、糖尿病に罹患すると血液凝固は著しく亢進した。また糖尿病ラットに 2%L-アルギニン摂取 + 運動トレーニング及び運動トレーニングを行うと血液凝固は顕著に抑制された。一方、2%L-アルギニン単独投与では血液凝固の指標であるトロンボキサン B2 に有意な差は認められなかった（減少傾向は認められたが）。血液線溶には 2%濃度の L-アルギニン濃度は適切な濃度といえるが、血液凝固に及ぼす影響には異なった濃度の L-アルギニン濃度の検討が必要かもしれない。

(6) 糖尿病ラットにおいて、運動トレーニング及び2%濃度L-アルギニン摂取がカルボニル化タンパク質に及ぼす影響について、運動トレーニング群、L-アルギニン摂取群、運動トレーニング+L-アルギニン摂取群の血漿カルボニル化タンパク質は、対照群に比較しそれぞれ18%、14%、7%の減少が認められた（有意な差は認められなかった）。しかし心臓組織において（左心室部位）運動トレーニング+L-アルギニン摂取群、運動トレーニング群、L-アルギニン摂取群のカルボニル化タンパク質濃度は対照群に比べ、それぞれ35%、30%、31%減少し、いずれも有意な減少であった。これらの結果は運動トレーニングおよび2%L-アルギニン摂取は組織・臓器により応答が異なることも推察される。

(7) 糖尿病ラットにおいて、運動トレーニング及び2%濃度L-アルギニン摂取が脂質過酸化に及ぼす影響について、運動トレーニング+L-アルギニン摂取群、運動トレーニング群、L-アルギニン摂取群の血漿中の脂質過酸化濃度は対照群に比較しそれぞれ60%、42%、42%と有意な減少が認められた。さらに心臓組織において（左心室部位）運動トレーニング+L-アルギニン摂取群、運動トレーニング群、L-アルギニン摂取群のカルボニル化タンパク質濃度は対照群に比べ、それぞれ53%、48%、44%減少し、いずれも有意な減少が認められた。

(8) 糖尿病ラットにおいて、運動トレーニング及び2%濃度L-アルギニン摂取が抗酸化酵素に及ぼす影響について、運動トレーニング+L-アルギニン摂取群、L-アルギニン摂取群の血漿中のグルタチオンレダクターゼ活性は対照群に比較しそれぞれ73%、84%と有意な増加が認められた。さらにL-アルギニン摂取群の血漿中のグルタチオンレダクターゼ活性は運動トレーニング群に比べ52%の有意な増加が認められた。これらの結果から、糖尿病ラットに運動トレーニング、2%L-アルギニンおよび運動トレーニング+2%L-アルギニン投与は抗酸化機能を高め、タンパク質と脂質過酸化を抑制できることが明らかとなった。

糖尿病ラットにおいて、運動トレーニング群のプラスミノゲン活性化因子は対照群ラットに比べ有意に増大し、血液凝固マーカー（トロンボキサンB2）は有意に減少した。またL-アルギニン摂取と運動トレーニング群のタンパク質酸化と脂質過酸化は対照群に比べ有意に減少し、還元型グルタチオン及びグルタチオンレダクターゼ活性は有意に増大した。これらの結果から運動トレーニングと2%L-アルギニン摂取は血栓予防に有効であることが明らかとなった。これは酸化ストレスの抑制が起因しているものと推察される。

(9) 糖尿病ラットにおいて、血漿中の総LDH活性は対照群と比較し有意に増大した。この結果はこれまでの報告と一致している

(Hamden ら 2013)。本研究において運動トレーニング+2%L-アルギニン摂取群、運動トレーニング群、2%L-アルギニン摂取群の血漿LDH活性は対照群に比較し有意に減少した。このことは運動トレーニングやL-アルギニン摂取は抗酸化機能を改善し、肝臓、心臓、骨格筋などの臓器の損傷を軽減させたものと考えられる。これらの報告はGoyal ら(2011)やPatel ら(2011)の結果と一致している。さらに本研究において血漿アイソザイムパターンは糖尿病発症によりLDH-1、-2が減少し、LDH-5が増大した。このことはLDHアイソザイムが好氣的代謝から嫌氣的代謝にシフトしたことを示している。糖尿病に罹患すると血漿中の血中LDHアイソザイムパターンが好氣的代謝から嫌氣的代謝に移行したが、運動トレーニングやアルギニン摂取後では嫌氣的代謝から好氣的代謝に移行し、正常ラットと同じLDHアイソザイムパターンに回復することが明らかとなった。これまでにこのような報告は見当たらず新しい知見といえる。

(10) 糖尿病ラットにおける組織中のLDH活性およびそのアイソザイムに関する報告は少ない。これまでに糖尿病に罹患すると脳LDH-1アイソザイムが減少したことが報告されており(Ahmed ら 2011)、これは本実験結果と一致していた。Ross ら(2010)は脳内でのミトコンドリア機能障害や加齢に伴いLDHアイソザイムは好氣的代謝から嫌氣的代謝に移行すると報告している。本実験において糖尿病ラットに運動トレーニングとL-アルギニン投与は脳でのアイソザイムパターンが嫌氣的から好氣的パターン改善することが観察され、正常ラットのLDHアイソザイムパターンに移行することが明らかとなった。乳酸は脳のアストロサイトで生成され、MCT-1(monocarboxylate transporter-1)によって細胞外に運搬され、MCT-2(monocarboxylate transporter-2)によってニューロンに運搬され、そこでエネルギー基質として利用されることが報告されている(Hashimoto ら 2008; Suzuki ら 2011)。

本研究において脳内でのLDHアイソザイムの変化はこのCell-Cell lactate-shuttleが改善されたことに起因していると考えられる(Hamden ら 2013; Patel ら 2011)。糖尿病ラットにおいて血漿中及び脳のLDHアイソザイムは好氣的代謝から嫌氣的代謝にシフトしたが、運動トレーニングと2%L-アルギニン投与により嫌氣的代謝から好氣的代謝に戻し、正常ラットのLDHアイソザイムパターンに改善することが認められ、この結果は新しい知見といえる。このLDHアイソザイムの変化は抗酸化機能の改善と関係しているものと推察される。

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 2 件)

Kazuaki Yamai, Toshiaki Funada, Tetsuo Ohkuwa, Hiroshi Itoh, Takao Tsuda. Acetone concentration in gas emanating from tails of diabetic rats. Analytical Sciences. 2012; 28: 511-514.

Rin Nakanishi, Jun Ohwaki, Shunsuke Emoto, Toshiaki Mori, Kosuke Mizuno, Takao Tsuda, Hiroshi Itoh, Tetsuo Ohkuwa. Nitric oxide concentrations in gas emanating from the tails of obese rats. Redox Reports. 2013; 18: 233-237.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 2 件)

Tetsuo Ohkuwa, Toshiaki Funada, Takao Tsuda. Acetone response with exercise intensity. Advanced Gas chromatography. 2012, pp.151-160. Mustafa Ali Mohd (Edi)

大桑哲男、伊藤宏 活性酸素除去 身体運動と呼吸・循環機能 2012, pp.180-190. 編集 宮村実晴 新興交易(株)医書出版部 総ページ数は 342 ページ

〔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 1 件)

名称:動物個体の代謝状態の測定及びその装置

発明者:大桑哲男、津田孝雄

権利者:名古屋工業大学、ピコデバイス

種類:特許

番号:特願 2008-249081

取得年月日:平成 25 年 11 月 22 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 大桑哲男 名古屋工業大学大学院工学研究科 物質工学専攻 生命機能分野 生命・物質工学教育類 生物生命プログラム

(教授)

研究者番号: 80115675

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: