

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25350129

研究課題名(和文) 運動誘発性溶血の予防と治療に寄与する栄養療法の開発

研究課題名(英文) Development of nutritional therapy that contributes to prevention and treatment of exercise induced hemolysis

研究代表者

小林 ゆき子 (Kobayashi, Yukiko)

京都府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：10381930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、運動誘発性溶血や鉄欠乏症に起因するスポーツ性貧血の発症メカニズムの検討と運動誘発性溶血に対して有効な栄養成分の探索を中心に検証した。様々な条件下におけるラットの急性および慢性の高強度運動負荷試験を実施し、生理学的変化や鉄代謝変動等を比較検討した結果、運動誘発性溶血モデルラットを作成できることが示された。そして、鉄欠乏性貧血の予防や改善に有用性が示されているウロン酸結合キシロオリゴ糖の摂取によって運動誘発性溶血モデルラットでの乳酸産生や筋損傷などの溶血誘発因子の抑制がもたらされたことから、ウロン酸結合キシロオリゴ糖はスポーツ貧血の予防に寄与できる栄養成分であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the onset mechanism of sports anemia in response to exercise induced hemolysis and iron deficiency and searched for effective nutrients for exercise induced hemolysis. We performed acute and chronic high intensity exercise tolerance tests of rats under various conditions and compared physiological and iron metabolic fluctuations. As a result, it was shown that exercise induced hemolysis model rats can be prepared. Because intake of uronic acid bonded xylooligosaccharide, which has been shown to be useful for prevention and improvement of iron deficiency anemia, has led to suppression of hemolysis inducing factors such as lactic acid production and muscle damage in exercise induced hemolytic model rats, we suggested that uronic acid bonded xylooligosaccharide is one of nutrient components contributing to the prevention of sports anemia.

研究分野：栄養科学、臨床栄養学

キーワード：運動誘発性溶血 スポーツ貧血 鉄代謝 酸化ストレス 運動負荷ラット キシロオリゴ糖 栄養療法

1. 研究開始当初の背景

貧血は、血液中の赤血球あるいは血色素ヘモグロビン量が減少し、血液の酸素運搬能力が低下して組織に酸素が十分に供給されない状態である。主な原因として赤血球の産生と成熟の障害、赤血球破壊の増加や出血などがあげられる。このうち、血球破壊による溶血や赤血球形成に影響する鉄欠乏症に起因するスポーツ性貧血（身体運動誘発性貧血）は運動選手に多発する貧血であり、性別年齢に関わらず多くの競技者が苦しんでいる。その症状は、倦怠感、頭痛、狭心痛、動悸、頻脈や発熱などが生じ、重症化すれば競技パフォーマンスの低下につながるほか、健康的な生活を維持することも困難となるため、その解決は急務である。

スポーツ性貧血の要因としては、足底部での衝撃や血流増加にともなう筋繊維や血管壁との摩擦など、主に運動による血球破壊つまり血管内溶血が関係していると報告されている。また、運動負荷に伴って血液中に増加する乳酸、リゾレチンや酸化ストレスのような障壁によって血球膜が損傷を受けることも要因として挙げられている。さらに、このような血管内溶血の悪化に加え、鉄欠乏状態発症により鉄代謝の制御が崩れた場合、赤血球の産生や成熟が障害されることで重篤な貧血に容易に移行することも分かっている。しかしながら、激しいトレーニングを重ねる競技者の間で貧血が頻発していることから分かるように、運動誘発性溶血の治療や予防方法はまだ十分に確立されておらず、これまで示唆されている上記の要因以外にも、別の要因が溶血を引き起こしている可能性は否めない。

一旦陥った貧血に対する治療法として、一般には鉄剤の投薬や静脈内投与が選択され、また多くの場合これと平行して食事療法が実施される。現在、スポーツ性貧血に対する食事療法は、造血を期待し、鉄サプリメントなどの服用や鉄含有量が高い食材を選択した上で栄養バランスを考慮する手法がとられている。申請者はこれまで鉄欠乏性貧血を改善・予防できる食事療法を開発する基礎研究(平成 19~20 および平成 21~22 年度科学研究補助金(若手研究(B))採択)を遂行し、鉄剤そのものの探索ではなく、食事と共存する栄養成分の有用性を明らかにした。これと同様に、スポーツ性貧血に対する食事療法においても、経口的に運動誘発性溶血を阻止できる栄養成分を同時に摂取できれば、従来の貧血の食事療法と併用することでより効果的な治療が実施できる可能性がある。また、貧血回復に寄与する成分を食事由来素材から見いだすことができれば、鉄剤投与療法において生じうる鉄過剰症など副作用の不安を低減し、鉄摂取量を増やすしか選択できなかった貧血の食事療法を実施する患者の負担をも軽減することが期待できる。

一方、研究代表者は先行研究として、運動

による筋損傷モデルとしてすでに報告されている方法を用いてランニング運動負荷マウスを作成し、貧血に関わる生化学検査項目を検討した。その結果、単回の負荷において、高強度運動 (VO_2 Max 80%相当) では溶血発現が示されたのに対し、中等度運動 (VO_2 Max 60%相当) では認められなかった。さらに、高強度運動負荷では血清鉄濃度が低下傾向を示すなど、運動負荷による貧血に關与する因子の変動を見いだした。加えて、筋肉、肝臓および脾臓で運動負荷による酸化ストレスの増大を確認した。脾臓と肝臓の網内系はマクロファージの貪食で老化または病的赤血球を処理する役割を担う。したがって、過剰な運動負荷により発症した溶血は、脾臓と肝臓での血球破壊処理の急増によって多くの遊離鉄を発生させて臓器に酸化損傷を与えるため、連続した過剰な運動負荷下では臓器が機能不全に陥り、溶血がさらに増大するのではないかと考察した。この結果は、スポーツ性貧血発症の新たな要因のひとつである可能性がある。

2. 研究の目的

もし、スポーツ性貧血の発症が血管内溶血のみならず臓器の酸化損傷に大きく影響を受けるのであれば、抗酸化効果を有する食事成分はスポーツ性貧血の予防や治療に有効な成分として期待できる。さらに、鉄そのものの投与以外に造血に寄与する成分の摂取を併用することができれば、同じくスポーツ性貧血の解決の一助となる。そこで本研究では、スポーツ性貧血に対する新しい栄養療法の確立を目指し、鉄代謝変動や酸化損傷の視点を含めたスポーツ性貧血の発症メカニズムを検討し、運動誘発性溶血に対して有効な栄養成分の治療や予防への応用可能性について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

いずれの試験も京都府立大学実験動物委員会の承認を得て実施された。

A. 高強度ランニング運動負荷による運動誘発性溶血モデル動物の最適化

先行研究において、高強度ランニング運動単回負荷マウスにおいて溶血が認められたことから、様々な条件下における急性および慢性の高強度運動負荷を実施し、生理学的変化、鉄代謝の変動等を比較検討する。

【高強度運動負荷試験・急性試験】

4週齢SD系雄性ラットを2~3日に1度の頻度でトレッドミル装置に慣らした後、30~32m/分で30分間運動を負荷し、運動直後および負荷24時間後に解剖した。生理学的変化や鉄代謝の変動等について運動を負荷しない群と比較検討した。

【高強度運動負荷試験・慢性試験】

4週齢Wistar系雄性ラットを2~3日に1度の頻度でトレッドミル装置に慣らした後、30~32m/分で30分間運動を1日1回7日間連続で負荷し、最終負荷6時間後に解剖した。生理学的変化や鉄代謝の変動等について運動を負荷しない群と比較検討した。

【高強度運動負荷試験・慢性試験】

4週齢Wistar系雄性ラットを2~3日に1度の頻度でトレッドミル装置に慣らした後、30~32m/分で30分間運動を1日1回14日間連続で負荷し、最終負荷24時間後に解剖した。生理学的変化や鉄代謝の変動等について運動を負荷しない群と比較検討した。

B. 運動誘発性溶血の予防や治療に寄与する栄養成分の探索

本研究では、運動誘発性溶血モデル動物に対し、鉄欠乏性貧血への有用性が認められている「ウロン酸結合キシロオリゴ糖」および「セロピオン酸」の摂食がもたらす生理学的変化を観察することで運動溶血に対する効果を検証した。

ウロン酸結合キシロオリゴ糖

キシロオリゴ糖の側鎖にウロン酸が結合した糖鎖平均8~10のオリゴ糖であり、難消化性で高溶解性の特徴を有する。これまでに、摂食によって鉄欠乏性貧血の予防や改善、塗布や摂食によってアトピー性皮膚炎の症状改善などの有用性が示されている。

セロピオン酸

糖カルボン酸の一種で、金属との塩形態で水溶性を示す。これまでに摂食によって鉄欠乏性貧血予防効果などが示されている。

【ウロン酸結合キシロオリゴ糖の有用性の検証】

本検証では、高強度ランニング運動負荷による運動誘発性モデル動物をもちいて、鉄欠乏性貧血の回復や進展防止への有用性が認められている「ウロン酸結合キシロオリゴ糖」の摂食がもたらす生理学的変化を観察することで、運動性溶血に対する効果について検討した。

4週齢SD系雄性ラットを運動負荷直後に解剖するEA群(n=8)、運動負荷翌日に解剖するEB群(n=8)、ウロン酸結合キシロオリゴ糖を与え運動負荷直後に解剖するXA群(n=6)、ウロン酸結合キシロオリゴ糖を与え運動負荷翌日に解剖するXB群(n=6)、安静群(Re群、n=9)に分けた。Re群、EA群およびEB群は20%カゼイン食を、XA群およびXB群には2%ウロン酸結合キシロオリゴ糖混合20%カゼイン食を2週間自由摂食させた。飲料水は蒸留水を自由摂水させた。実験食給餌期間(2週間)にすべてのラットをトレッドミル装置で走行に順応させたのち、Re群は解剖し、Re群

以外の群は30m/分で30分間のランニング運動を負荷した。

【セロピオン酸の有用性の検証】

本検証では、ラットに高強度のランニング運動負荷を与え、かつ造血に必要な栄養素であるタンパク質を欠乏した食事を与えることによって運動誘発性溶血モデル動物を作成し、鉄欠乏性貧血の予防効果が認められている「セロピオン酸」の摂食がもたらす生理学的変化を観察した。

4週齢SD系雄性ラットをトレッドミル装置で走行に順応させたのち、5%カゼイン食を給餌し運動負荷を与えるE群(n=8)、5%セロピオン酸混合5%カゼイン食を給餌し運動負荷を与えるECA群(n=8)、および5%カゼイン食を給餌し運動負荷を与えないS群(n=8)の3群に分けた。すべてのラットは自由摂食、蒸留水を自由摂水とした。E群およびECA群には高強度ランニング運動を継続的に負荷した。すなわち、勾配0のトレッドミル上を最大酸素摂取量80%に相当する30m/分で30分間のランニングを1日2回、14日間連続で実施した。その後、最終運動負荷15時間後に解剖しサンプルを抽出した。

4. 研究成果

A. 高強度ランニング運動負荷による運動誘発性溶血モデル動物の最適化

【高強度運動負荷試験・単回試験】

運動直後では溶血の指標である血清ハプトグロビン濃度が安静時に比べ有意に低値を示し、24時間後には安静時と同程度に回復した。

【高強度運動負荷試験・継続試験】

7日間連続で高強度運動を負荷した結果、運動負荷ラットでは安静時に比べ血清ハプトグロビン濃度が低下傾向を示し、連続的に運動負荷されたのち6時間経過程度では溶血が回復しないことが示された。

【高強度運動負荷試験・継続試験】

14日間連続で高強度運動を負荷した結果、運動負荷ラットでは安静時に比べ血清ハプトグロビン濃度が低下傾向を示し、運動負荷翌日であっても溶血が回復しないことが示された。また、血中酸素分圧が安静時に比べ有意に高く、赤血球等が安静時よりも酸化ストレスを受けやすい状況下にあると考えられた。

以上より、高強度運動負荷によって運動誘発性溶血モデルラットが作成できることが示された。また、複数回継続的な運動負荷を行うことで、スポーツ性貧血モデルラットが作成できる可能性も示唆された。

B. 運動誘発性溶血の予防や治療に寄与する

栄養成分の探索

【ウロン酸結合キシロオリゴ糖の有用性の検証】

運動負荷直後の EA 群および XA 群の血漿ハプトグロビン濃度は安静時に比べ有意に低値を示し溶血が認められた。また、ウロン酸結合キシロオリゴ糖摂取による溶血や鉄代謝への直接的な影響は示されなかった。一方、XA 群の血中乳酸値は EA 群に比べ運動負荷による上昇が抑制されており、ウロン酸結合キシロオリゴ糖の摂取は乳酸の処理能力向上やエネルギー基質としての利用が考えられ、ラットの溶血予防や疲労軽減に貢献する可能性がある。血漿中クレアチンキナーゼ、血漿中乳酸脱水素酵素活性および白血球数は、XA 群では EA 群に比べ運動負荷による上昇が抑制され、ウロン酸結合キシロオリゴ糖摂取による筋損傷および炎症の抑制が示唆された。したがって、ウロン酸結合キシロオリゴ糖は乳酸産生や筋損傷などの溶血誘発因子を抑制することで、スポーツ貧血の予防に寄与できる栄養成分である可能性が示唆された。

【セロピオン酸の有用性の検証】

E 群の摂食量は S 群と比較し低下傾向を示したが、体重増加量および飼料効率に明らかな差は認められず同程度であった。貧血の指標である赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値は S 群と比較して E 群や ECA 群で有意な差を認めるほどではなかった。しかしながら、E 群のトランスフェリン飽和率は S 群と比較し有意に高値を示したことから、鉄需要の増大に至った可能性がある。通常、血漿鉄濃度が減少すると肝臓鉄のような貯蔵されている鉄を利用し血漿鉄を補うが、本プロトコルでは E 群および ECA 群で肝臓 1g あたりの肝臓鉄量は減少しなかった。したがって、本試験におけるタンパク質摂取量の制限では低タンパク栄養状態の運動誘発性貧血モデルラット作成には至らなかった。

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 1 件)

Yukiko Kobayashi, Aki Nakatsuji, Wataru Aoi, Sayori Wada, Masashi Kuwahata and Yasuhiro Kido. Intense Exercise Increases Protein Oxidation in Spleen and Liver of Mice. *Nutrition and Metabolic Insights*, 査読有, 7, 1-6, 2014
DOI:10.4137/NMI.S13668.

〔学会発表〕(計 1 件)

小林ゆき子、南川聖月、桑波田雅士、青井渉、木戸康博. 高強度運動負荷ラットに対するウロン酸結合キシロオリゴ糖摂取の効果.

第 7 回日本スポーツ栄養研究会学術総会, 2013

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 ゆき子 (KOBAYASHI, Yukiko)
京都府立大学・生命環境科学研究科
・助教

研究者番号: 10381930