

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960215

氏名 塚本 敏人

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: 南ウェールズ大学 (国名: 英国)
2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。  
運動誘発性の酸化ストレスと脳機能の生理学的機序の解明
3. 派遣期間: 平成 31 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 3 月 30 日
4. 受入機関名及び部局名  
Faculty of Life Sciences and Education, University of South Wales
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**  
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)  
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

**所期の目的とその遂行状況**

“Exercise is medicine” の概念の元、運動には確かな健康増進効果がある。特に、強度の高い運動は、ブレインヘルスをはじめとする様々な健康増進効果をより引き立たせる。一方、運動をやり過ぎてしまうことで増大・蓄積する酸化ストレスは、生体に対して著しい毒性を示す。つまり、範囲内での適度な運動は、運動強度依存的に健康増進効果を増強させるものの、範囲を超えた過度の運動は、健康増進どころか健康障害を惹起させてしまう可能性がある。中でも、脳は酸化ストレスの影響を受けやすい臓器の一つであるが、過度の運動が誘引する酸化ストレスによる脳への負の生理作用と意義に関して、曖昧な点はまだまだ多い。本研究では、要介護に陥る要因トップ 2 として知られる脳血管疾患と認知症発症の予防のために、運動によって変化する脳機能(脳循環調節機能と認知機能)と酸化ストレスの関係性について深く検証することを所期の目的として設定していたため、主に二つのメインテーマを設けて研究活動に邁進することとしていた。

具体的に 1 年目には、低酸素環境を用いて理論を構築する研究課題を遂行し、2 年目には、1 年目で構築した理論を具現化する研究課題を遂行する予定であったものの、就職活動により派遣期間を 1 年間短縮したため、プランを下記のように訂正して可能な限りの検証を行った。

**研究課題 1****低酸素ストレスを用いて、脳機能に対して負の作用をもたらす酸化ストレスの閾値の検証**

高強度運動が酸化ストレスを過剰に生成してしまう理由として、運動誘発性の代謝亢進に対する酸素供給量不足が招来する低酸素状態が起因である可能性が高い。また、運動は様々な生理指標を変化させる。そこで、本研究のメインテーマは、運動によって変化する脳機能(脳循環調節機能と認知機能)と酸化ストレスの関係性について検証することであるものの、まずは低酸素ストレスを用いて、安静時における低酸素化が誘引する酸化ストレスの増大に対して、生理指標を介して、脳機能がどのような影響をダイレクトに受けるのか検証することとした。具体的には以下に示す 3 つの実験系から検証を行った。

## 1. 低酸素ストレスによる脳機能低下に対する酸化ストレスおよび自律神経の影響を検証

低酸素ストレスは、動的脳循環調節機能（脳を保護するために、血圧の変化を緩衝して脳血流量を一定に保つための機能）や認知機能（実行機能や記憶機能など）などの脳機能を低下させる。これは、主に、酸化ストレスを増大させたり自律神経を乱したりすることにより、生理的なホメオスタシスが崩壊し、結果として低酸素ストレスによる脳機能の低下が誘引される可能性があるものの、これらは未解明な点が多い。

研究1の位置付けとして、まずは、安静時における低酸素ストレスが誘引する脳機能の低下に対して、酸化ストレスおよび自律神経の変化がどの程度、生理的因子として影響しているのかを検証することとした。研究1aでは、抗酸化作用のある Sildenafil を投与し、低酸素ストレスが誘引する脳機能の低下を緩和することができるのか検証した（酸化ストレスの効力を検証）。具体的には、①低酸素+Sildenafil 投与条件、②低酸素+Placebo 投与条件、③常酸素+Sildenafil 投与条件、④常酸素+Placebo 投与条件の4条件を、クロスオーバーデザインのダブルブラインドの実験系にて遂行した。なお、研究の対象者は全て若年健常成人とした。研究1bでは、交感神経遮断薬である Propranolol を投与し、低酸素ストレスが誘引する脳機能の低下を緩和することができるのか検証した（自律神経の影響を検証）。具体的には、①低酸素+Propranolol 投与条件、②低酸素+Placebo 投与条件、③常酸素+Propranolol 投与条件、④常酸素+Placebo 投与条件の4条件を、クロスオーバーデザインのダブルブラインドの実験系にて遂行した。なお、研究の対象者も全て若年健常成人とした。

### < 主要な測定項目 >

#### ・ 静脈血サンプル

非利き手の前腕静脈血管内に点滴用静脈留置針を留置し、この留置針を介して採血を行った。使用した留置針、生理食塩水、消毒液などはすべてディスポーザブルタイプのものを使用した。

採血した静脈血サンプルは、血液の状態でヘマトクリットおよびヘモグロビン濃度の測定に使用した。また、採血直後に遠心分離機を使用して血漿サンプルを分離した。

酸化ストレスの指標としては、血漿中のフリーラジカルを、電子スピン共鳴法を使用して測定した。自律神経の指標としては、血漿中のノルアドレナリンを、ELISA法（2-CATELISA, LDN GmbH & Co, Nordhorn, Germany）により評価した。

#### ・ 動的脳循環調節機能

座位にて5分間、安静時の血圧の変化と脳血流量（中大脳動脈血流速度）の変化をソフトウェア（LabChart version 7.3 and Powerlab; ADInstruments, Bella Vista NSW, Australia）を介して1kHzで記録し、伝達関数解析を用いて周波数毎の動的脳循環調節機能を評価した。血圧は、連続血圧測定装置（Finometer PRO, Finapres Medical Systems, Amsterdam, Netherlands）を用いて、利き手中指から連続的に測定した。中大脳動脈血流速度は、経頭蓋超音波ドプラ法（Multi-Dop X4; DWL Electronic System, Sipplingen, Germany）により、右側頭部から2MHzプローブを使用して連続的に測定した。

また、動的脳循環調節機能は vasomotor の影響を受けやすく、vasomotor は動脈血二酸化炭素分圧の変化に非常に敏感である（CO<sub>2</sub> reactivity）。動脈血二酸化炭素分圧は、呼気ガスを測定することで、呼気終末二酸化炭素分圧から推定することができる。そこで、マウスピースを介して、呼気ガスも同時に採気した。

#### ・ 認知機能

実行機能および短期記憶を測定できるテストをソフトウェア（SuperLab 5, Cedrus Co., San Pedro CA, USA）上にプログラムし、ラップトップPCを用いて専用の反応ボタン（RB-540）に反応する形式を用いて、反応速度および正答率から評価した。

#### ・ ニューロバスキュラーカップリング機能

チェッカーボードを用意し、チェッカーボードを凝視したときに（ビジュアルストレス）、後大脳動脈血流速度（前述した中大脳動脈血流速度と同様に測定）がどの程度増加するか検証した。また、認知課題中の中大脳動脈血流速度も測定し、認知課題に対して増大する脳血流量の変化を評価することで、ニューロバスキュラーカップリング機能を評価した。

## 2. 低酸素ストレス経過時間に伴う酸化ストレスの増大と脳機能の低下の関連性を検証

研究1により、低酸素ストレスによる脳機能の低下に対する酸化ストレスの影響を検証できたため、研究2では、低酸素ストレスレベルのにおいて深刻化する脳機能の低下に対する酸化ストレスレベルを評価し、生体に対して毒性を発揮する酸化ストレスの閾値を推定するための実験を計画した。つまり、低酸素環境に6時間に渡って暴露した際の酸化ストレスおよび脳機能の変化の関連性を、1時間毎に検証した。具体的には、①低酸素+Sildenafil 投与条件、②低酸素+Placebo 投与条件の2条件を、クロスオーバーデザインの実験系にて遂行した。なお、研究の対象者は全て若

年健常成人とした。

研究1と同様に、以下のものを主要な測定項目として評価した。

- ・ 静脈血サンプル
- ・ 動的脳循環調節機能
- ・ 認知機能
- ・ ニューロバスキュラーカップリング機能

## 研究課題2

### 運動による酸素ストレスの増大・蓄積と脳機能低下の関連性の検証

研究課題1(研究1a, 研究1b, 研究2)を遂行したことで得られたデータをもとに、本研究のメインテーマである運動によって変化する脳機能(脳循環調節機能と認知機能)と酸化ストレスの関係性について検証した。これまで、ブレインヘルスケアのための運動として、強度の高い運動がより強い効力を持つことを、急性的な生理指標や認知機能の変化などから提唱してきた。特に、高強度の運動を間断的に実施して行う高強度インターバル運動は、より確かなブレインヘルスケアサプリメントとして機能する可能性がある。一方、高強度運動をインターバル形式でなく、定常的に実施することで脳機能は急性的に低下してしまう。さらに、興味深いことに、高強度インターバル運動であっても、8週間に渡って週3回習慣的に実施すると、ブレインヘルスケアどころか、脳循環調節機能は低下してしまうことが明らかにされている。つまり、一過性の運動がもたらすブレインヘルスケアとしての効力と、習慣的に運動をした場合の脳機能への影響は異なる可能性があり、これに酸化ストレスの蓄積が関与している可能性は高い。

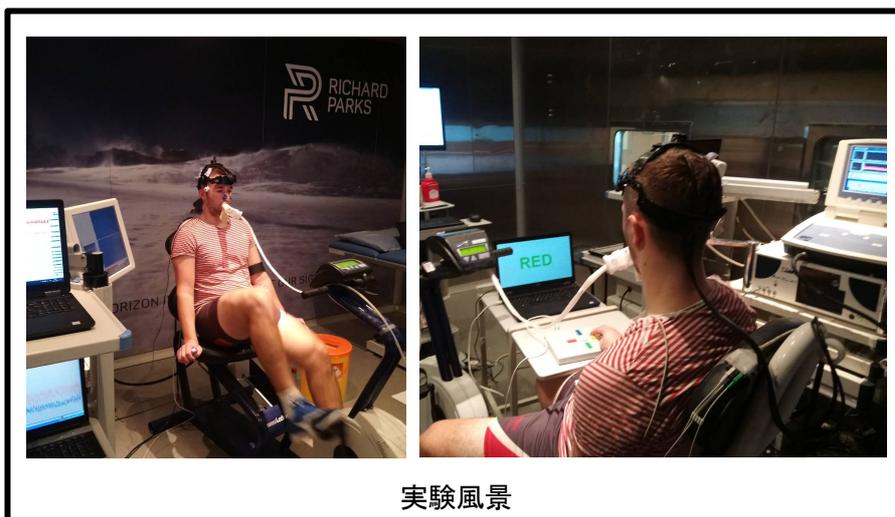
### 3. 一過性の高強度インターバル運動による脳機能の変化に対する酸化ストレスの影響を検証

中強度運動と比較して、一過性の高強度インターバル運動は、運動後に向上する認知機能をより持続させる効力がある。また健康増進のための運動処方として、基本的に運動の仕事量が重要な因子として作用することが報告されているが、ブレインヘルスケアの視座からも同様に、仕事量を増やすと、より効果的に認知機能を高めることができる。しかしながら、中強度運動と比較して、少ない仕事量(50%)で施行する高強度インターバル運動は、認知機能を同じように高めることができる。一方、通常の高強度インターバル運動と比較すると、その効力は劣る。少し複雑になるものの、適度な酸化ストレスは、生体に対してポジティブに作用することが近年盛んに議論されているが、運動の仕事量がもたらす急性的なブレインヘルスケア効果に、酸化ストレスがどの程度影響しているかは明らかにされていない。研究1では、同じ高強度インターバル運動でも、運動の仕事量(すなわち実施時間)が異なると、ブレインヘルスケアのための効力が異なる要因として、酸化ストレスの増加レベルが作用しているという仮説をたて、この仮説を検証することとした。またその際、研究課題1で検証した脳機能低下をもたらすであろう酸化ストレスの閾値と比較検証することとした。具体的には、①高強度インターバル運動条件、②低仕事量の高強度インターバル運動条件、③中強度運動(定常的運動)条件の3条件を、クロスオーバーデザインの実験系にて遂行した。なお、研究の対象者は全て若年健常成人とした。

#### <運動プロトコル>

##### ・高強度インターバル運動条件

高強度運動には、最大酸素摂取量の90%相当の運動(会話はできないが単語なら発せる、数分間のみなら運動を続けられると感じるきつい運動)を施行した。また、動的休息を採用し、その運動強度は、最大酸素摂取量の60%相当の運動(途切れ途切れになるが会話ができる、ややきついと感じるが運動を続けられる程度の運動)に設定した。具体的なプロトコルは、5分間のウォーミングアップ(100W)を行った後に、高強度運動を4分間ずつ、3分間の動的休息を挟みながら合計4セット行う運動様式を採用した。



実験風景

運動終了後には、5分間のクーリングダウンを行った(100W)。この運動プロトコルは、臨床現場向きの運動プロトコルとして利用されることが多い運動プログラムである。なお運動は、セミリカンベントの体位で自転車運動を施行した。

・低仕事量の高強度インターバル運動条件

高強度運動は、高強度インターバル運動条件と同様に、最大酸素摂取量の90%相当の運動とした。また、動的休息は、最大酸素摂取量の30%相当の運動(会話が安静時のようにでき、汗をかかないもしくは軽く汗ばむ程度の運動)に設定した。具体的なプロトコルは、5分間のウォーミングアップ(100W)を行った後に、高強度運動を1分間ずつ、1分間の動的休息を挟みながら合計10セット行う運動様式を採用した。運動終了後には、5分間のクーリングダウンを行った(100W)。なお運動は、同様にセミリカンベントの体位で自転車運動を施行した。

・中強度運動(定常的運動)条件

中強度運動は、5分間のウォーミングアップ(100W)を行った後に、最大酸素摂取量の60%相当の強度で合計40分間、同様に実施した。運動終了後には、5分間のクーリングダウンも行った(100W)。これは、高強度インターバル運動のプロトコルに非常に近い運動の仕事量となり、低仕事量の高強度インターバル運動と比較すると2倍多い仕事量となる。なお運動は、同様にセミリカンベントの体位で自転車運動を施行した。

研究課題1と同様に、以下のものを主要な測定項目として評価した。

- ・静脈血サンプル
- ・動的脳循環調節機能
- ・認知機能
- ・ニューロバスキュラーカップリング機能

#### 4. 習慣的な高強度インターバル運動による脳機能の変化に対する酸化ストレスの影響を検証

研究3に対して、研究4では習慣的に高強度インターバル運動を行った場合、なぜブレインヘルスケアどころか、脳循環調節機能が低下してしまうのか、酸化ストレスとの関連性を踏まえて検証した。具体的には、①高強度インターバル運動条件、②中強度運動(定常的運動)条件、③介入なしコントロール条件の3条件を遂行した。なお、研究の対象者は全て健常成人とした。

介入は、8週間に渡って行い、週3回の頻度で実施した。高強度インターバル運動および中強度運動は、研究3と同様のプロトコルで実施した。しかしながら、リカンベント運動を行う機械は数に限りがあったため、自転車エルゴメータ運動にて介入を行った。

これまでの研究と同様に、以下のものを主要な測定項目として、介入前後で評価した。

- ・静脈血サンプル
- ・動的脳循環調節機能
- ・認知機能
- ・ニューロバスキュラーカップリング機能

#### 研究成果とその発表・関係学会への参加状況等

研究課題1および2ともに全て1年間の派遣期間内に遂行することができた。しかしながら、研究課題2においては時間が足らず、解析を終えるまでには至らなかった。具体的な研究成果は、学術論文において発表する予定(執筆中)であるものの、以下に簡略化して示す。

##### <研究課題1>

- ・先行研究と同様に、低酸素ストレスによって、脳機能は低下した。
- ・自律神経の変化による影響を受けずに、低酸素ストレスによって脳機能は低下した。  
→ 低酸素ストレスが誘引する脳機能の低下に、自律神経の乱れは関与していない可能性が高い。
- ・酸化ストレスの増加を抑えると、低酸素ストレスによって低下する脳機能は緩和される。  
→ 酸化ストレスの増大を起因として、低酸素ストレスが脳機能の低下を誘引している可能性が高い。
- ・6時間の低酸素ストレスによって低下する脳機能は、酸化ストレスの変化レベルに関連している可能性が高い。

##### <研究課題2>

- ・先行研究と同様に、一過性の高強度インターバル運動によって、脳機能は効果的に向上した。
- ・一過性の運動によって、認知課題中に低下するはずの動的脳循環調節機能が改善した。
- ・その他の指標は、これから解析・解釈を行っていく予定である。

派遣期間中には、2つの国際学会において学術発表（口頭1演題，ポスター1演題）を行い，共同研究者として15演題の学術発表に貢献した．また，1編の学術論文を発表した．さらに，著書活動を2編行い，社会へ新たな知を伝える努力をした．