

自律神経機能異常を伴い慢性的な疲労を訴える患者に対する
客観的な疲労診断法の確立と慢性疲労診断指針の作成

ストレス負荷による自律神経機能および抗酸化能の変化に関する研究

研究分担者 局 博一（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻）

研究要旨

肉体的、精神的ストレスは自律神経機能や抗酸化能に影響をもたらすことが考えられる。本研究は、22～23年度にわたって、ラットへのⅠ. 水浸ストレス（深度2cm、水温22℃）負荷、Ⅱ. 環境温度ストレス（24℃→12℃）、およびⅢ. 馬への運動ストレス負荷において心拍変動、体温、活動量、血液の活性酸素・フリーラジカル、抗酸化能に及ぼす影響が生じるかについて明らかにする目的で行われた。上記のⅠおよびⅡの研究では生体反応をテレメトリー法によってリアルタイムに測定した。Ⅲでは、トレッドミルなどを用いて一定の運動負荷を与え運動前後の血液中活性酸素、心拍数などの変化を測定した。

その結果、Ⅰの実験では、水浸負荷時の心拍数は水浸刺激負荷前日およびシヤム負荷（水浸なしの条件）の同じ時間帯における心拍数に比べて明瞭に高い値を示した。また体温は、水浸刺激負荷時に上昇傾向（ストレス性体温上昇）を示し、上昇は2日目、3日目で明瞭であった。一方、活動量には明瞭な差異が観察されなかった。心拍変動解析では、自律神経機能のバランス状態を示すLFパワー／HFパワーの比率が水浸負荷時に上昇傾向を示した。Ⅱでは、寒冷（12℃）刺激中は寒冷刺激前（24℃）に比べて、心拍数の明瞭な増加（ $P<0.001$ ）、心拍変動解析ではトータルパワーの明瞭な低下（ $P<0.001$ ）が観察された。LF/HF比はやや低下傾向があったが有意な変化は示されなかった。Ⅲでは、115% VO_2max 、2分間のトレッドミル運動（全力疾走）によって、運動直後にはd-ROMs値（酸化ストレス指標）およびBAP値（抗酸化能）が有意（ $P<0.05$ ）に上昇したが、運動終了30分目ではBAP値がやや高いもののほぼ運動前のレベルに戻ることが明らかになった。

上記の研究から、水浸ストレスや寒冷ストレスは自律神経活動に明瞭な変化をもたらすが、ストレスが比較的強い場合にはトータルパワー（LF、HF、VLFのすべての帯域を含む周波数領域）が低下する傾向が共通して生じること、運動負荷によって酸化ストレスと抗酸化能が変化し、それらが疲労度や疲労回復の指標になりうることなどが明らかになった。

A. 研究目的

慢性疲労研究では、生体のストレス反応を様々な指標を用いて明らかにすることが求められている。それらのうち心拍変動解析は自律神経機能を比較的簡便に測定する上で有用性が高い方法として注目されている。実験動物においても生体内部情報をテレメトリーシステムによって計測し、データを自動的に取得できる方法が以

前から開発されており、医薬品や食品の安全性試験や効果判定などに広く用いられている。本研究では、心電図、体温、活動量を同時記録することが可能なテレメトリー送信機を用いて、ラットにおける短時間のストレス負荷に対する反応性を調べることを目的とした。また、運動負荷が生体の抗酸化能や自律神経機能に及ぼす影響を及ぼすかについて、運動能力が高いこ

とが知られている馬を用いた実験を行った。

B. 研究方法

I. 水浸ストレス負荷実験

1) 供試動物、心電図記録法

成熟雄ラット (Slc:Wistar;8週齢;9匹) (SPF) をペントバルビタール (ネンブタール) の30-40mg/kgの腹腔内投与による全身麻酔下を施した上で、心電図・体温・活動量計測用テレメトリ送信機本体 (weight=3.9g、volume=1.9cc; TA10ETA-F20、Data Science、St. Paul、MN) をラットの頸背部皮下に外科的に埋入した。本体に接続された記録電極 (リード線の先端) は+側を左後肢大腿部の皮下に、マイナス側を右肩甲部の皮下に設置し、標準肢II誘導の心電図が記録できるようにした。

ラットは1匹ずつ個別のポリカーボネートケージに収容し、照明および温度の制御が可能なインキュベーションチャンバー内 (容積 m^3) で、6匹 (6ケージ) を同時に飼育した。チャンバー内の照明条件は、L (明期) =8:00-12:00、D (暗期) =20:00-8:00の12時間周期とし、温度条件は24℃とした。飼育期間中は自由飲水、自由摂餌とした。

2) ストレス負荷条件および観察プロトコル

供試ラットをテレメーター送信機の埋入手術後1週間以上の回復期間を経たのちに、水浸ストレスの負荷実験に供した。

水浸刺激は、供試ラットのホームケージと同じ条件のポリカーボネート製容器に水深が底面から2cmになるように摂氏22度の水を張り、容器内にラット (1匹) を静かに収容した。水浸刺激は明期の開始から5時間後の13:00から開始し、15:00までの2時間とした。この水浸刺激を3日間にわたって同じ時刻に行った。また、4日目には、上記の容器内に水を入れずに他の条件は等しくした条件下でラットを収容した (シャム)。

3) データ取得、解析方法

テレメーター送信機からの心電図信号は受信ボードに無線で伝送され、受信ボードからA-Dコンバーターを介して、PCに内蔵のソフトウェア (ECG processor analyzing system、SRV2W、Softron SBP2000) を用い解析した。心電図のサンプリングレートは1msecとした。

II. 環境温度ストレス負荷実験

心電図、体温、活動量を同時記録することが可能なテレメーター送信機をWistar系雄ラット (N=6) の皮下に全身麻酔下で埋設し、温度調節プログラムおよび明暗周期調節が施されているチャンバー内で飼育および実験記録を行った。上記のチャンバー内で術後1週間以上を経過した後に対照記録 (24℃) および低温負荷 (12℃) 時の記録を行った。チャンバー内温度を24℃→12℃ (48時間) →24℃ (24時間) →12℃ (48時間) →24℃ (24時間) の順で変化させた。

III. 運動ストレス負荷実験

1) 供試動物: 馬 (サラブレッド、成馬) 5頭を用いた。

2) 実験プロトコル: 馬専用のトレッドミル (傾斜6%) を用いて、一定の運動負荷を与えた。10分間のウォーミングアップ (1.7m/sec →3.5m/sec→1.7m/sec) の後、115%VO₂maxの強度 (走速度11~13.5m/s) で30秒間および2分間の強運動 (キャンター) を負荷した。強運動の直前、直後と強運動終了30分後に頸静脈より採血を行った。

3) 血液の活性酸素および抗酸化能測定

上記の採血で得られた血液から血清中の活性酸素・フリーラジカル量 (d-ROMs試験) および抗酸化能を (BAP試験) をフリーラジカル解析装置 (FREE、ウイスマー社) を用いて調べた。

4) その他の指標の測定

上記の指標のほかに、心拍数、血液ヘマトクリット値、血糖値、乳酸値、クレアチニンキナーゼおよび酸素消費量を測定した。

C. 研究結果

I. 水浸ストレス負荷実験

1) 心拍数、体温、活動量

心拍数、体温、活動量の経時的変化はいずれも明瞭な日周リズムを示した。すなわち、心拍数、体温、活動量は暗期に高く、明期に低い変化を示した。心拍数および体温は水浸刺激の期間中、刺激前の対照およびプラセボに比べて明らかに高い値を示した。

2) 自律神経機能 (心拍変動解析)

交感神経と副交感神経の両方の活動を反映す

るLFパワーは、第1回目～3回目の水浸刺激を通じて明瞭な変化が認められなかった。副交感神経の活動を反映するHFパワーは、水浸刺激時に低下する傾向が示された。自律神経バランスの指標であるLFパワー／HFパワー(LF/HF比)は、第1回目～第3回目の水浸刺激において増大する傾向が示された。一方、トータルパワー(VLF、LF、HFの全体パワー)は3回の水浸刺激のすべてで低下する傾向が示された(図1)。

II. 環境温度ストレス負荷実験

皮下温は寒冷刺激中に明瞭に低下した($P<0.01$) (図2)。心拍数は寒冷刺激中に明瞭に増加した($P<0.001$) (図3)。

心拍変動解析の結果、LF/HF比は寒冷刺激前では 0.74 ± 0.37 (平均 \pm SD)、寒冷刺激中は 0.63 ± 0.46 で有意差がみられなかった。一方、寒冷刺激中はトータルパワーが顕著に低下した($P<0.001$) (図4)。

III. 運動ストレス負荷実験

1) 強運動負荷実験(30秒走、2分走)

馬専用のトレッドミル(傾斜角6°C)を用い、30秒間または2分間の全力疾走($115\%VO_{2max}$)をサラブレッド5頭に負荷させた。30秒走における最高心拍数(平均値 \pm 標準偏差)は 184.2 ± 16.7 、2分走における最高心拍数は 205.8 ± 14.2 であった。30秒走における酸素消費量(平均値 \pm 標準偏差、ml/kg/min)は 129.2 ± 14.7 、2分走における酸素消費量は 159.1 ± 16.7 であった。

酸化ストレスを表すd-ROMs値は30秒走では運動前後を通じて有意な変化は示されなかったが、抗酸化能を表すBAP値(平均値 \pm 標準偏差、 $\mu\text{mol/L}$)は、それぞれ 2682 ± 89.4 、 2876 ± 164.2 、 2596 ± 268.2 を示し、運動終了直後は運動終了後30分目に比べて有意($P<0.05$)に高い値が示された。一方、2分走では、d-ROMs値は、運動前、運動終了直後、運動終了後30分目において、それぞれ 153 ± 34.2 、 178 ± 39.2 、 155 ± 36.4 であり、運動直後は運動前および運動終了後30分目に比べて有意($P<0.01$)に高い値を示した。BAP値は、それぞれ 2638 ± 333 、 3540 ± 258 、 2949 ± 228 を示し、運動直後は運動前および運動終了後30分目に比べて有意($P<0.01$)に高い値を示した。BAP/d-ROMs値は運動前(18.2)に

比べて運動直後(20.7)および運動終了30分目(20.0)でやや高い値が示されたが、有意差ではなかった。

2) 軽運動負荷実験

馬場において周回運動(速歩)を馬に負荷した。d-ROMs値は運動負荷(速歩)によって軽度上昇し、運動終了後30分目には低下する傾向を示したが、これらの変化に有意差はなかった。d-ROMs/BAP値は運動前、運動直後および運動後30分目で有意な変化は示されなかった。

D. 考察

本研究において、ラットへの短時間の水浸刺激によって引き起こされる生理的応答をテレメトリー法によって観察することが可能であることが示された。水浸刺激によって同時に生じた心拍数の増加は交感神経の活動の上昇あるいは副交感神経の活動低下が考えられる。自律神経バランスを反映する指標であるLF/HF比が水浸刺激中に増大する傾向があることから、水浸刺激は自律神経バランスを相対的に交感神経側に強める効果があるものと考えられる。ヒトの慢性疲労患者では、心拍変動解析によって交感神経の緊張性が健常者に比べて上昇することが知られている。しかしながら、自律神経活動の全体を示すトータルパワーは低下したことから、副交感神経系の活動を中心にして自律神経活動の変動(ゆらぎ)が生じにくくなっていることが示唆された。

水浸刺激中には体温の上昇が認められた。この反応は交感神経活動の増大による、いわゆるストレス性体温上昇と推測される。すなわち、交感神経活動が活発になることで筋肉、褐色脂肪組織、肝臓や心臓などの臓器の代謝が亢進し、体温上昇を招いたものと思われる。

寒冷ストレスでは、心拍数の増加と一致してトータルパワーの顕著な低下が観察された。心拍数の増加は交感神経緊張の上昇と副交感神経緊張の低下によるものと推測される。トータルパワーの低下は通常、心拍変動係数(CV_{R-R})の低下と連動することが多く、心拍間隔のゆらぎが小さくなっている際に現れやすい。本研究においてもそれを裏付ける結果が得られている。前述の水浸ストレスの結果と合わせて考えると、ストレス環境下では心拍のゆらぎの低下と自律

神経活動の偏りが生じているものと考えられる。正常な範囲でのゆらぎが存在することは生体の恒常性（ホメオスタシス）が保たれていることの証であり、脳機能の健全性を示すバイタルサインであることから、自律神経活動のパワーの低下や交感神経緊張と副交感神経緊張のアンバランスが長時間にわたって持続することは生体にとって望ましくない状況と思われる。

適度な運動負荷は自律神経機能や血液成分に変化を与えることで、生体機能を高める方向に作用する。本研究では馬を使った実験で運動中の明瞭な自律神経活動の増加と心拍数の増加が認められ、運動終了後は速やかに元のレベルに戻ることが示された。一方、過度な運動負荷やオーバートレーニングは肉体的な慢性疲労状態をもたらし、安静時心拍数の増加や安静時の持続的な交感神経緊張亢進状態をもたらすことが知られている。本研究ではこのような状態のモデル動物を用いて実証することはできなかったが、心拍数や心拍変動解析は有益な指標になりうると思われる。また、生体内に活性酸素やフリーラジカルが増加した状態が長期間にわたって持続することは炎症のような組織傷害、抗病性の低下、慢性疲労、老化の促進など生体に対して好ましくない影響を与えることが示唆されている。本研究では、馬を用いた実験で超最大運動負荷を与えた場合でも、酸化ストレスの増大と同時に抗酸化能が上昇することや、抗酸化能の上昇は運動終了後もしばらく持続することが示されたことから、健康な動物では運動による酸化ストレスが生じても速やかに消去する機能が存在することが明らかになった。

E. 結論

本研究で行われた水浸刺激および寒冷刺激に対する生体反応は急性のストレス反応として捉えることができた。ラットのストレス反応を心電図、体温、活動量を同時記録するテレメトリー法によって追跡することが可能であり、慢性疲労モデル動物への応用の可能性が示唆された。とくに心拍変動解析におけるトータルパワーの低下は生体のストレス評価に有用である可能性が示唆された。さらに、血液の酸化ストレス度を簡便な方法でモニターすることは、神経系の評価と合わせて疲労度、恒常性の維持などの評

価に役立つことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

F. 研究業績

1. 論文発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

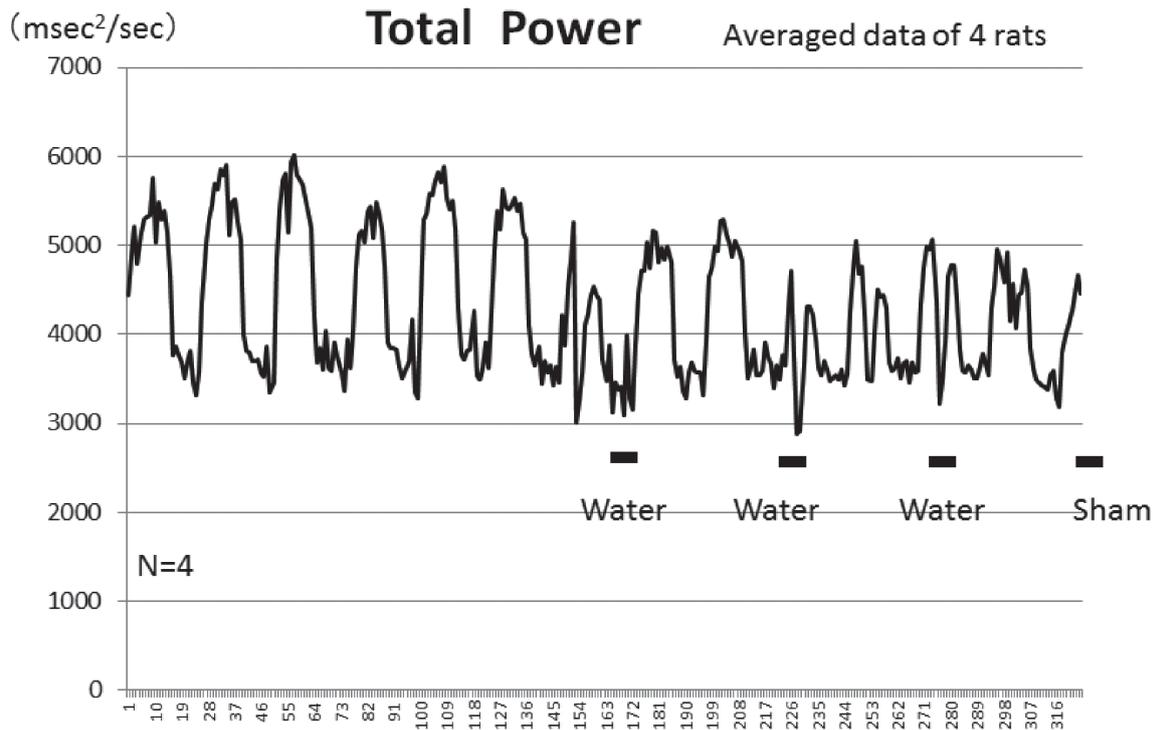


図1. 水浸刺激によるトータルパワーの変化
 ラットを深さ2cmの水 (22℃) を敷いたケージ内に2時間 (13:00-15:00) 入れる刺激を3回行った。

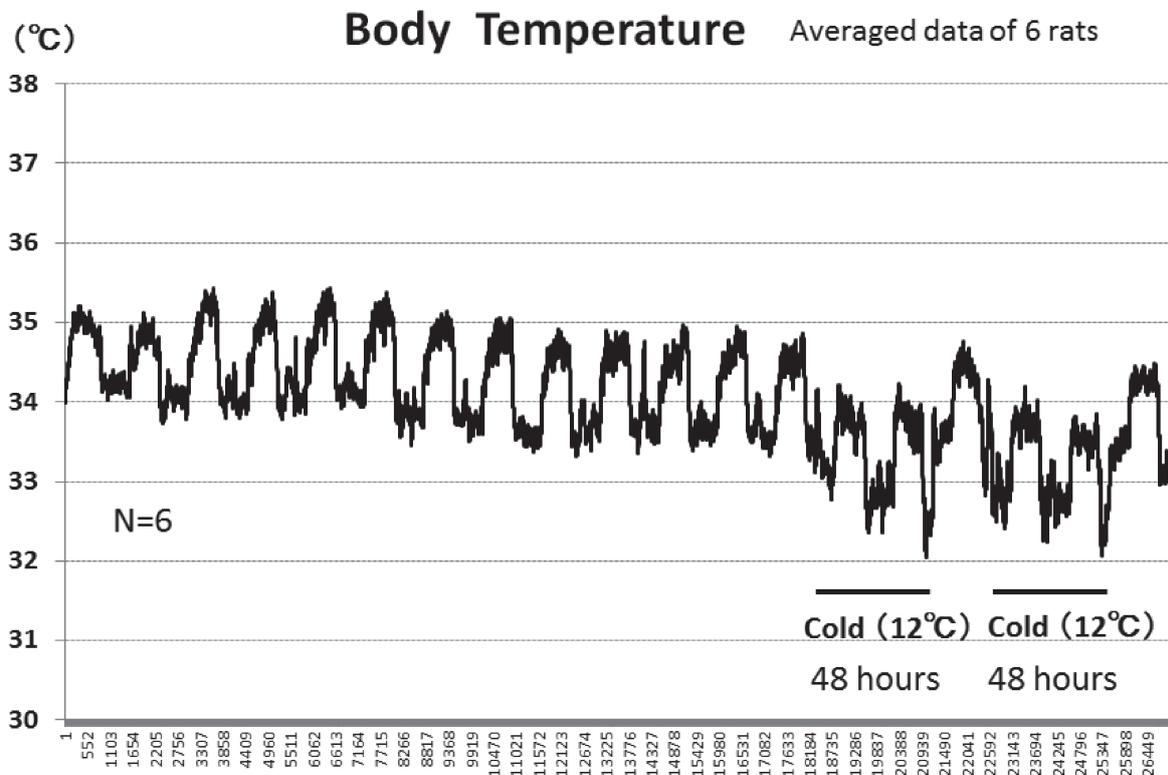


図2. 体温 (皮下温) の変化
 室温 (24℃) で飼育されているラットに48時間の寒冷刺激 (12℃) を2回与えた。

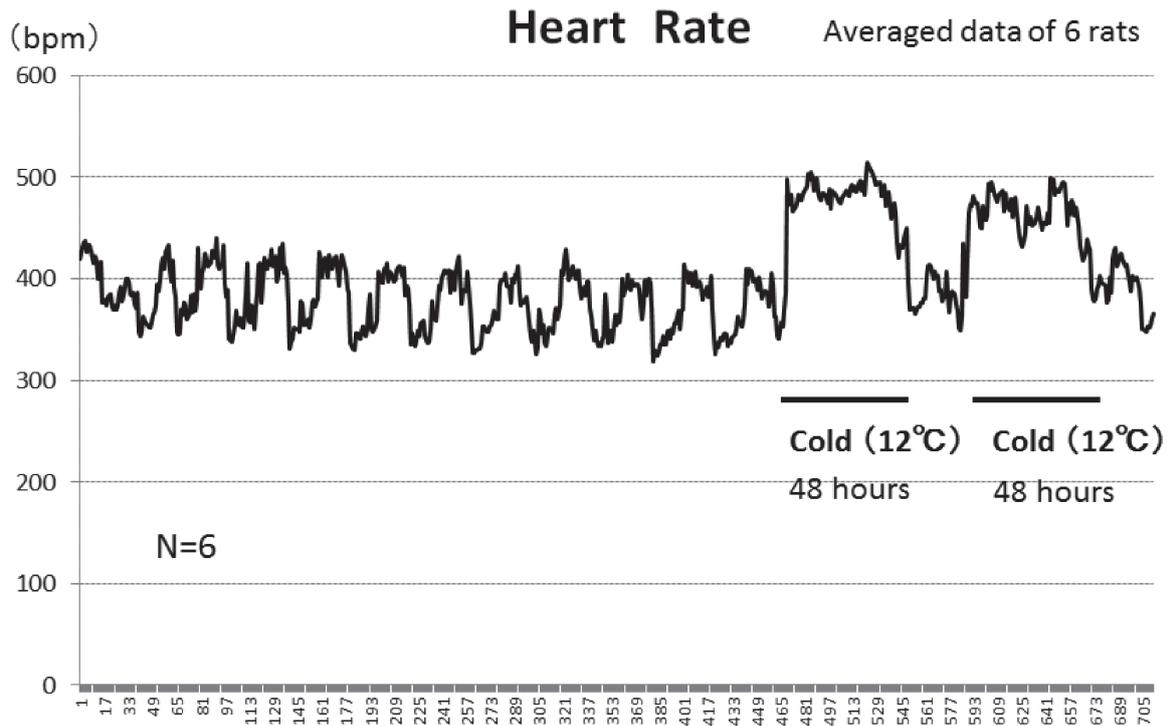


図3. 心拍数の変化
 室温（24℃）で飼育されているラットに48時間の寒冷刺激（12℃）を2回与えた。

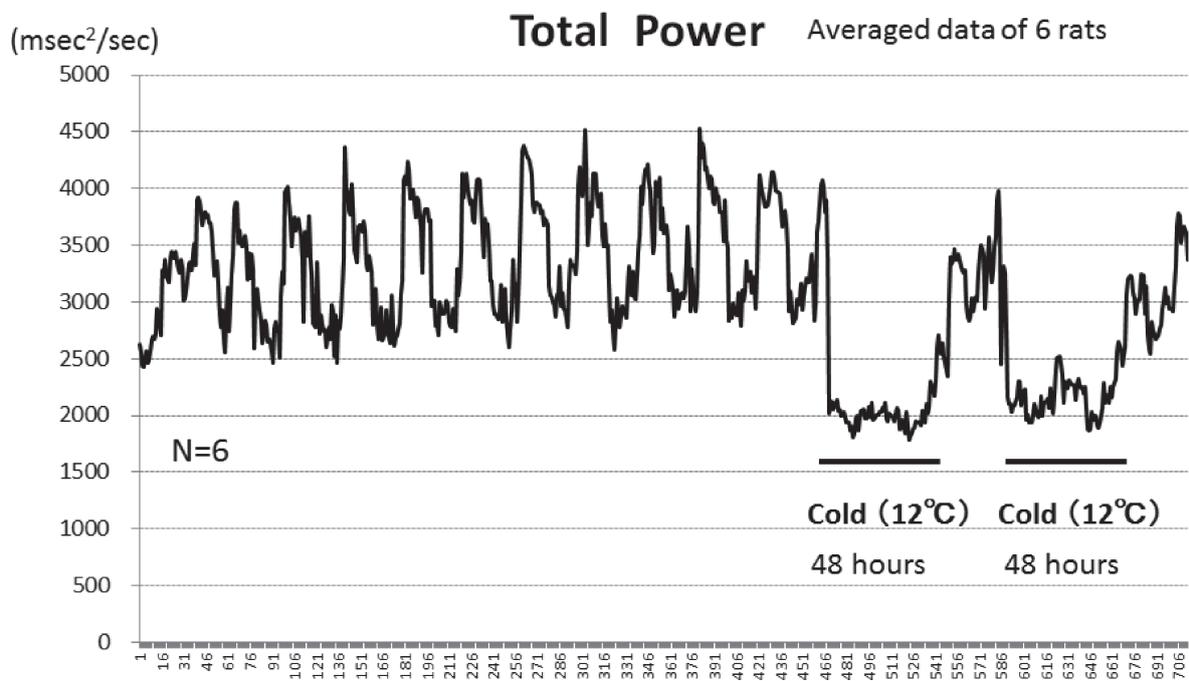


図4. 心拍数（上図）およびトータルパワー（下図）の変化
 室温（24℃）で飼育されているラットに48時間の寒冷刺激（12℃）を2回与えた。