

ストレス負荷モデルを利用した金属含浸素材（アクアメタル）処置の生物学的効果の評価

帯広畜産大学 原虫病研究センター 鈴木宏志

2021.10.20

本研究の意義

一般社会において、多種多様な競技で、競技者がプロアマを問わずアクアメタル製品をトレーニング中または競技中に使用しており、アクアメタルは、一般社会へ深く浸透していることがうかがわれる。

金属を水溶化したアクアメタルの生物学的作用については、筋疲労や関節可動域に関して競技者に有利な変化を認めたとする複数の先行研究 (Hughes et al., 2013; Rowlands et al., 2014a and b; Wadsworth et al., 2010)があり、アクアメタルの介入による生物学的現象がフィジカル面において一つ或いは複数存在する事が考えられる。また、臨床的検討の成績によると、ストレス・自律神経活動を試験項目に含む二重盲検試験により、アクアメタルの QOL への有効性が示されており (Aoi et al., 2012)、フィジカル面だけでなく、メンタルに対しても、アクアメタルが関与する可能性を見ることが出来る。加えて、アクアメタルの生物学的作用には、中枢・末梢の神経系の関与が示唆されており、これまでに、アクアメタルの生物学的作用については、現象からメカニズムに至るまで、多くの科学的知見が蓄積されていると言える。

他方、多岐に渡る先行研究で示されたアクアメタルの生物学的作用の全てが同じメカニズムでもたらされているのか、あるいは未知のメカニズムが存在し、それぞれ異なるプロセスを経ているかについては検討の余地があると思われ、現段階では、メカニズムが複数ある前提に立つのが妥当であると思われる。また、アクアメタルの応用性は広く、その処置経路も接触と非接触の複数が存在すると推察される。

接触処置だけでなく非接触処置によっても生体に変化が引き起こされる為には、可視光・赤外線・磁界などの電磁波・電磁界に類する物理量の介入がなければ説明がつかない。この議論を深める為にはドシメトリ的観点の導入は有効であると考えられる。更に、アクアメタルの作用を、金属粒子とその周囲との関係で議論するか、金属粒子を分散配置した面との関係で議論するかは（アクアメタル製品と人とのサイズ感、アクアメタル機能の最小単位の金属粒子と作用を及ぼす対象とのサイズ感、金属粒子の密度と対象物とのサイズ感など）、アクアメタルの生物学的作用のメカニズムを読み解く際、およびアクアメタルの応用性を検討する際に重要な観点になると思われる。

本研究の概略は以下の通りである。電気刺激を含む物理療法やハーブを含む東洋医学的手法の生物学的作用を評価方法として、電撃や水中保持、閉所拘束、騒音負荷、単独飼育、過密飼育などの様々なストレスに曝された際にマウス体内で起きる内分泌変化の測定が利用されている。筆者らは、非電離放射線 (ELF-電界) の生物学的作用の評価として、拘束により視床下部-下垂体-副腎に起きるストレス応答に対する抑制的効果を再現性高く示す事に成功し、学術的に一定の評価を得ている (Harakawa et al., 2020a; Harakawa et al., 2020b; Hori et al., 2015)。非電離放射線刺激は痛みだけでなく、体表へ刺激がほぼ無いことから、拘束マウスを用いたストレス応答モデルは、比較的弱い刺激の評価に適した系と考えられる。本研究では、アクアメタルの生物学的作用を、金属粒子により生じる「物理量」の作用 (刺

激) ととらえ、上述のストレス評価モデルに適用した。

材料および方法

拘束下におけるアクアメタル処置の装置：

アクアメタルの処置は、拘束用の容器の内側にアクアメタルの塗装を施すことにより、拘束中にアクアメタル処置が同時に行われる様にした (図1)。一方、アクアメタル処置を施さない拘束対照には、拘束中の照度の偏りを防ぐ為、金属粒子を含まない媒体のみを塗装した拘束用容器を使用した。



図1：アクアメタルを塗装した拘束装置（左）、未塗装の遠心管

動物：

8~10 週齢の C57BL/6J マウスを用いた。雌雄ともに各群 8 匹とした。飼育環境は、温度 24°C±1°C、湿度 50%±10%、人工照明 (12 時間：12 時間の明暗サイクル、07:00~19:00 に点灯) として管理された。また、標準的なマウス用飼料 (CE-2; CLEA, Tokyo, Japan) と水は自由摂取とした。

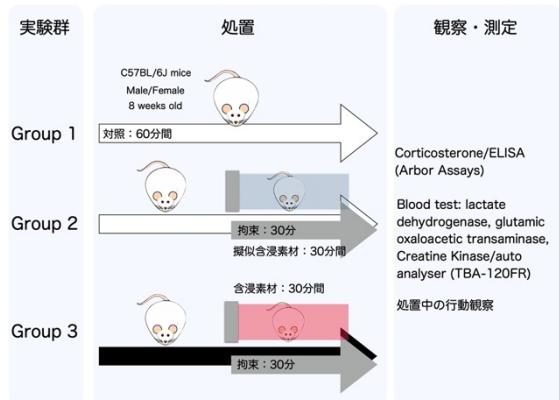


図2：実験のデザイン。実験群：無処置群、拘束単独群、拘束+アクアメタル複合処置群

拘束負荷及びアクアメタルの効果の評価：

実験群は、無処置群、拘束単独群、拘束+アクアメタル複合処置群の三群とした (図2)。拘束または拘束+アクアメタル処置は 9:00~12:00 の間の 30 分間とし、処置後はすみやかに麻酔下にて心採血した。遠心分離にて得られた血漿は測定まで-

80°C で保存した。

評価項目：

評価項目は、コルチコステロン濃度および血液検査 (lactate dehydrogenase; LDH, glutamic oxaloacetic transaminase; GOT, Creatine Kinase; CK) とした。コルチコステロンは ELISA にて測定した (DetectX Corticosterone ELISA, Arbor Assays)。血液検査は臨床化学自動分析装置 (TBA-120FR; Toshiba, Tokyo, Japan) にて行った。

統計解析：

データは中央値±標準誤差 (S.E.) で示した。群間比較は一元配置分散分析および多重比較により行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。すべての統計解析は、Prism Version 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA) を用いて行った。

結果と考察

拘束後 30 分におけるコルチコステロン、LDH、および CK のレベルについて、無処置群と拘束処置群との間に有意な差を観察した (図 3)。これらの成績は雌雄で同様であり、また、拘束処置が目的通りに被検動物にストレス応答を惹起させること、およびストレスによる一定程度の組織損傷が生じたことを示すものであった。

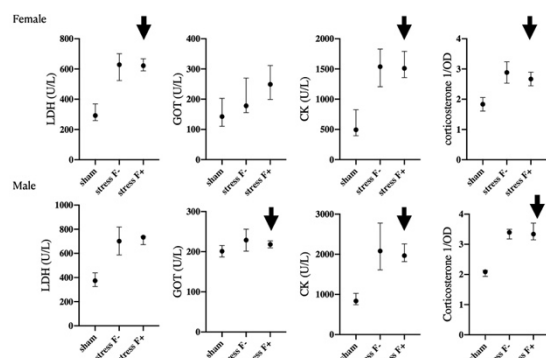


図3. Effect of "aqua-metal" material in increase of plasma LDH, GOT, CPK, and Corticosterone level induced by immobilization in C57BL/6J mice. Median levels of restraint-induced increases in LDH, CK, and corticosterone in males and in GOT, CK, and corticosterone in females were suppressed by the application of aqua metal treatment.

拘束によって増加するコルチコステロンに対するアクアメタル処置の効果については、拘束単独群と拘束+アクアメタル複合処置群との間に、統計学的有意な変化を認めなかったが (図 3)、少なくとも、アクアメタル処置がストレス応答を増強する様な現象は無いと言える成績であった。また、組織損傷や炎症を増悪させる作用も無いと考えられた。

他方、雌の LDH, CK, およびコルチコステロン、雄の GOT, CK, およびコルチコステロンにおいては、拘束により上昇するレベルがアクアメタル処置を加えることによって、中央値を抑制した (図中矢印)。この傾向については、今後、例数を増やすことによって統計学的に有意な差を認めることになると考えられた。また、アクアメタルの処置条件の変更または、マウスの系統の違い、拘束程度の変更によっても新たな発見が得られる可能性があると考えられる。

先行研究 (Aoi et al., 2009) では、ICR 系雄マウスの行動量、および、呼吸代謝機能、自律神経活動、ノルアドレナリンレベルが検討され、アクアメタル処置群の行動量とノルアドレナリンレベルが対照群と比較して有意に低値を示していることから、交感神経系の抑制を根拠にリラクゼーション効果の可能性を示唆している。この報告は、クリアカット

な成績を示しており、今後、本拘束ストレスモデル系を利用することによって、アクアメタル処置による生物学的作用の機序解明が進展する可能性は高いと期待できる。他方、Aoi らの研究は、マウスに精神的または肉体的負荷が無い実験条件であり、本研究の明確なストレス応答条件下でのアクアメタルの効果の検討とは視点が異なる。また、Aoi らの報告で用いられたアクアメタルの金属粒子はチタンであるが、ある種のチタンが近赤外線を遮蔽する性質を有する点は是非確認しておきたい。仮に近赤外線遮蔽機能を有したチタンで、これを分散したシートで動物の周りを囲んだ場合、環境温度が他の群と異なるかもしれないことが危惧される。環境温度が下げれば活動度は下がり、活動度が低ければノルアドレナリンレベルは低値となる。本研究で用いたストレス評価は、30~60 分間の比較的短時間処置で起こる変化を捉えようとしているので、こうした懸念を克服できている点は利点と言えるかもしれない。

上述の工夫、すなわち、例数増加、アクアメタルの処置条件の変更、マウスの系統の違い、拘束程度の変更により、今後、拘束による血中ステロイドホルモン増加に対する軽減 (抑制) が認められた場合は、アクアメタルのストレス応答に対する効果をより直接的に捉えたことになり、追加実験をすることによって、その効果の特徴づけが可能となると思われる。例えば、含浸素材の面積、濃度、含浸物への励起の種類、処置時間、処置時間帯、含浸素材と生体との距離などについての検討である。また、本モデルでは、ステロイドホルモンと組織損傷マーカーおよび炎症マーカーとが正の相関を示すことから、アクアメタルの組織損傷や炎症に対する効果の検討も可能となる。本研究では、アクアメタルがストレスやストレスによる組織損傷を悪化させるような現象を認めなかった。今後、あえてアクアメタルを体内に埋め込んだ場合や内服させた際の変化や毒性を積極的に捉えることで、アクアメタルの安全性についての知見の蓄積が可能と思われる。

参考文献

- Aoi W. et al. *Life Sci* 2009; 85: 408-411.
- Aoi W. et al. *Physiology & Behavior* 2012; 108: 13-18.
- Harakawa, S. et al. *Sci. Rep.* 10, 20930 (2020). a
- Harakawa, S. et al. *Bioelectromagnetics* 41, 156-163 (2020). b
- Hori, T. et al. *Bioelectromagnetics* 36, 302-308 (2015).
- Hughes JD. et al. *Springerplus* 2013; 2: 653.
- Rowlands DS. et al. *J Sci Med Sport* 2014; 17: 134-138. a
- Rowlands DS. et al. *J Funct Biomater* 2014; 5: 1-14. b
- Wadsworth DP. et al. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 42: 2273-2281.