

東海大学大学院平成 30 年度博士論文

疲労回復に対するナノプラチナ
及びナノダイヤモンドを使用した
ハイブリッド(DPV576) 素材含有
繊維の効果とその機序

片野 秀樹

- この学位申請論文は、日本疲労学会誌に掲載された主要公刊論文を基に作成された。
- 日本疲労学会誌に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開することの承諾を得ている。

<総括>

ナノ材料は、洗濯洗剤、撥水スプレーや家電製品など、日常の生活で目にすることが多くなった。しかしながら、ナノ材料の疲労回復に対する効果はほとんど研究されていない。本研究では、アミノ酸・オリゴペプチド還元により製造されたナノプラチナ(粒子直径10-100nm、形状円形)及び起爆性の高い混合物の爆発により合成されたナノダイヤモンド(粒子直径 100-200 nm、形状楕円形)を組み合わせた素材(DPV576)と DPV576 をポリエステル繊維に埋入させた繊維製品を用いて疲労回復に対する効果を検討した。

はじめに、アンケート調査の結果から、DPV576 繊維製品の就寝時着用により疲労回復傾向が確認された。客観的には、サッカー選手が休息時に DPV576 繊維製品を着用した際の自律神経系活動は副交感神経系優位となり、午睡時の着用がその後のパフォーマンスを向上させたことから、良質な休養・睡眠へ導くことで疲労回復に有効であることが示された。次に、暗算課題後のストレスが早期に軽減したことから精神的疲労回復に有効であることが示唆され、脚部トルク試験にて脚部筋疲労が抑制されたことから肉体的疲労回復に

対しても有効であることが示された。次に、ヒト初代表皮培養細胞を用いた実験では、表皮細胞に存在するイオンチャネルの1つである Transient receptor potential vanilloid 4 受容体の発現抑制、細胞内 Ca イオン量の増加、および神経成長因子を増加させる効果を示した。さらに、DPV576 繊維製ブランケットを2週間着用させた後のT細胞およびB細胞の活性が高まったことから、免疫反応を促進させる可能性も示唆された。

以上の結果から、DPV576 繊維製品は自律神経系、免疫系、内分泌系、運動系を介した多面的な疲労回復効果を発揮することが示された。

<研究背景>

日常生活におけるさまざまな外的刺激によって生じるストレス反応の代表例に、疲労が挙げられる。文部科学省疲労研究班の調査では、国民の6割が疲労を感じていると報告している^{1,2)}。疲労蓄積状態時に加わる外的刺激が引き金となり、神経・内分泌・免疫系の変調から脳・神経系の機能障害を生じて疾患を発症させると考えられている。したがって、疲労蓄積予防・疲労回復は、疾病・健康障害防止対策として重要である。

疲労とは、「精神的または肉体的に活動した後に続く、仕事量の減少、遂行の非効率化などを特徴とする常態」と定義され、疲労の経過によって一過性か継続性かによって急性疲労(小休止や休息によって回復する疲労)、日周性疲労(労働やトレーニング後に睡眠を

十分とることで回復する疲労)、蓄積性疲労(蓄積された疲れが継続して簡単に回復しない疲労)に分類される³⁾。

疲労は脳内の神経系に乱れを生じさせ、日中活動期に活発な交感神経は夜になっても鎮まらず、睡眠時に活発になるべき副交感神経は夜になっても休んだままとなる。このため、睡眠障害を引き起こし不眠に陥り、寝ても疲れが抜けない状態になり、免疫力が落ちてしまう。この神経系、免疫系の異常な状態は、内分泌系の働きまで狂わせてしまう⁴⁾。疲労軽減の対策として、森林浴による抗疲労効果⁵⁾、ストレス減少及びNK活性の上昇⁶⁾や、環境音楽の聴取により主観的疲労が軽減され、安心・リラックス感が増強することが報告されている⁷⁾。一方、弾性タイツはポリウレタンの弾力性を応用し、強固な圧迫を与えることで筋ポンプ作用の増強と血液循環の改善により下肢の静脈還流を促すことから運動能力向上や疲労軽減^{8,9)}が報告されている。

本研究では、アミノ酸・オリゴペプチド還元により製造されたナノプラチナ(粒子直径 10-100nm、形状円形)及び起爆性の高い混合物の爆発により合成されたナノダイヤモンド(粒子直径 100-200 nm、形状楕円形)を組み合わせた素材(DPV576)とDPV576をポリエステル繊維に埋入させた繊維製品を用いて、①主観的疲労度の調査 ②自律神経系に対する作用 ③精神的作業負荷後の疲労回復。④肉体的作業負荷による疲労回復 ⑤ヒト初代表皮培養細胞に対する作用、⑥免疫担当細胞に対する作用の多面的解析から DPV576 繊維製品の疲労回復効果を検討した。

<研究方法>

1)DPV576 及び DPV576 繊維の作製方法

DPV576 は、蒸留水 1 mL 当たり $3 \times 10^{-5} \text{g}$ のナノプラチナ(ワインレッドケミカル社、八王子市)および $2 \times 10^{-3} \text{g}$ のナノダイヤモンド(ビジョン開発社、八王子市)を分散させた混合液である。DPV576 繊維は、高分子材料であるポリエステル紡糸原液に DPV576 を 9 : 1 の割合で分散・混合し、常法に従い混合液より紡糸して製造されたポリエステル繊維である。

2)主観的疲労度の調査

主観的疲労度については、DPV576 繊維製 T シャツ・パンツ着用群(実験群)または市販ポリエステル素材製 T シャツ・パンツ着用群(対照群)に対してアンケート調査を実施した。調査の内容を説明し、同意を得た健常成人男性 12 名(43.3 ± 6.8 歳)、成人女性 8 名(43.0 ± 7.6 歳)、計 20 名(平均年齢 43.2 ± 7.1 歳)を被験者とした。これら被験者をランダムに 2 群に分け、うち 10 名に DPV576 繊維製 T シャツ・パンツを日・月・火曜の就寝時から翌朝起床時まで着用させ、他の 10 名に市販ポリエステル素材製 T シャツ・パンツを着用させた。翌週の日・月・火曜の就寝時から翌朝起床時までには、前週とは異なる T シャツ・パンツを着用した。アンケートは、全被験者より T シャツ・パンツ着用前・後(5-10 分)および起床直後にスマートフォンまたはタブレット末端から KOKORO スケール(対立する気分の二次元座標)⁷⁾に入力させた(図 1A)。入力画面は「X 軸：不安(－) - 安心(+)」「Y 軸：やる気がない(－) - やる気がある(+)」と、

「X 軸：疲れ(－) - 元気(+)」 「Y 軸：不快・痛み(－) - 快適・爽快(+)」 の 2 つとした (図 1B)。

3) サッカー練習の休憩前後における自律神経系及び運動能力の測定

休憩時に DPV576 繊維製品を着用した際のサッカー選手の自律神経系に対する効果について、疲労回復の指標である副交感神経活動を用いて検討した。実験内容を説明し、同意を得た大学のサッカー部に所属する合宿中の男子大学生 12 名 (平均年齢 20.6 ± 1.5 歳) を被験者とした。被験者は、午前の練習終了後に練習着からアトランダムに配布された DPV576 繊維製品 (実験群: 6 名) あるいは市販ポリエステル素材製品 (対照群: 6 名) に着替え、午後の練習開始直前に脱衣して練習を終了後に、再び配布済み衣類に着替えた (図 2A)。心拍変動 (HRV: Heart Rate Variability) の測定は、(1) 朝の起床時、(2) 午前練習終了後の 30 分間休憩終了時、(3) 午睡終了時、(4) 午後練習後の 30 分間休憩終了時に、それぞれ安静背臥位で胸部にジェルタイプ電極を装着し 5 分間測定を実施した。HRV の解析は、ハートレートモニター Minicardio システム (Hosand Technologies Srl, Verbania, Italy) を用いた。自律神経活動の評価は、HRV (R-R 間隔) のデータを時間領域解析して行った。時間領域解析による副交感神経緊張強度の指標は、pNN50 (連続した隣接する RR 間隔の差が 50 ms を超える心拍の割合)、RMSSD (連続して隣接する RR 間隔の差の 2 乗の平均値の平方根)、CVI (RR 間隔の時間で描いたローレンツプロット) を用いて評価し、基準値として朝の起床時を 100% とした。また運動能力の測定には、午前・午後の各トレーニング時に敏

捷性を評価するショートドリブルテスト(図 2B)と、方向転換を伴う最大速度と反復能力を評価するカーブスプリントテスト(図 2C)を実施した。

4)精神的作業負荷後の疲労評価

DPV576 繊維製ベッドパット(D-PAD)のストレス軽減効果を、唾液中のストレス指標であるクロモグラニン A(CgA)を測定して検討した。実験内容を説明し、同意を得た健常成人男性 10 名(36.8 ± 7.5 歳)、成人女性 5 名(29.8 ± 6.0 歳)、合計 15 名(平均年齢 34.5 ± 7.8 歳)を被験者とした。30 分間座位安静後に、血圧・脈拍を自動血圧計 HEM-707(オムロン, 京都市)で測定し、同時に唾液を採取した(平常時)。5 分間の暗算課題(P-I 精神負荷用紙・標準型; プリベンショナル・インターナショナル社、都市名)を実施後、唾液を採取し(ストレス時)、背臥位閉眼安静にて D-PAD または市販ポリエステル素材製ベッドパット(C-PAD)のいずれかに 20 分間の休息後に再び唾液を採取した(回復時、図 3)。唾液採取及び CgA 濃度の測定は、Salivette (Salsted, Nuembrecht, Germany)キットを用い、下顎両頬側の唾液を吸着させた脱脂綿を試験管に封入後、冷蔵保存にて矢内原研究所に輸送した。唾液中の CgA 濃度はヒトクロモグラニン A EIA キット YK070(矢内原研究所, 富士宮市)で測定し¹⁰⁾、唾液中総蛋白濃度当たりで表した(CgA 蛋白補正值)。ストレス軽減率は、[ストレス時の唾液中総蛋白濃度－回復時の唾液中総蛋白濃度]÷回復時の唾液中総蛋白濃度×100 により算出した。

5)肉体的作業負荷による疲労評価

DPV576 繊維製タイツ着用による局部筋疲労に対する回復効果を、筋疲労の指標である関節出力トルク及び筋電図を測定して検討した。実験内容を説明し、同意を得た健康成人男性 10 名(平均年齢 21.6 ± 0.97 歳)を被験者とし、タイツ未着用(未着用)群・市販ポリエステル素材製タイツ着用(対照)群・DPV576 繊維製タイツ着用(実験)群の三群に分けた。筋力測定装置(Biodex, Shirley, New York, U)を用いて、毎秒角速度 60 度に設定して膝関節角度完全伸展位(0 度)と屈曲位(90 度)間の膝関節屈曲運動及び膝関節進展運動を 20 回繰り返した際の脚部トルク及び筋電図周波数中央値(MdF:Median Frequency)を測定した。全被験者が 3 群での運動課題を遂行し、各群での測定順はランダムに設定し、かつ十分な休憩を挟んだ。最大伸展運動 2~4 回目の平均値を前半、最大伸展運動 9~11 回目の平均値を中盤、最大伸展運動 17~19 回目の平均値を後半とし、前半の値を基準として中盤と後半の値を正規化して比較した(図 4)。筋電図中央周波数(MdF)の測定は、デジタルフィルター(10-300 Hz)を通してピークトルクを前後 512 msec として高速フーリエ変換法により算出した¹¹⁾。

6) ヒト初代培養表皮細胞に対する作用

1. 受容体発現に対する作用

ヒト新生児表皮角化細胞 NHEK-Neo (Lonza, Basel, Switzerland)を用いて、初めにサイトカインの分泌に対する DPV576 の至適濃度を検討した。DPV576 を 1:10 または 1:100 に希釈し、各々を NHEK-Neo に添加した際に培養上清中に放出されたサイトカインとして、tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β),

prostaglandin E2 (PGE2), nerve growth factor (NGF) の濃度を ELISA にて測定した。このうち、TNF- α と IL-1 β の測定には BD Biosciences (San Jose, CA)、PGE2 測定は Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)、NGF の測定には Biosensis (Biosensis Pty Ltd., Adelaide, Australia) の ELISA キットをそれぞれ用いた。

Transient receptor potential vanilloid (TRPV)1、TRPV3、TRPV4 の発現は、NHEK-Neo の培養液に DPV576 を 1 : 10 の希釈濃度で添加し、16 時間培養後の細胞を回収して各 TRPV に対する FITC 標識抗体 (Bioss Inc., Woburn, MA) を加えて 1 時間培養した後に FACS キャリバー (Becton Dickinson, San Jose, CA) で測定した。解析は、FlowJo (FlowJo, LLC., Ashland, OR) を用いて行った。

2. カルシウムイオン流入に対する作用

NHEK-Neo をカルシウムと DPV576 を添加した培地で 16 時間培養し、細胞内でカルシウムイオンと結合する Fluo-3AM (Invitrogen, Frederick, MD) 10 μ M を加えて 37°C で 15 分間培養後に、フローサイトメトリーを用いて測定した。

7) T 細胞および B 細胞に対する作用

ヒト T 細胞及び B 細胞活性に対する DPV576 の効果を *in vivo* の実験によって検討した。実験内容を説明して同意を得た健常男女 7 名 (平均年齢 44.1 $\pm$ 5.3 歳) を被験者とし、これらの被験者に DPV576 繊維製ブランケットを 1 および 2 週間着用させた。着用前後で採血を行い、Ficoll (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) を用いた密度勾配遠心法により末梢血単核球を分離した。T 細胞および B 細胞を、それぞれを特異的に刺激・誘導する phytohemagglutinin (PHA,

Sigma Chemical)および pokeweed mitogen (PWM, Sigma Chemical)の存在下にそれぞれ3日間培養し、その増殖を³Hチミジン(Perkin Elmer Waltham Inc., Waltham, MA)の取り込みにより測定した。また、T細胞サブセットであるCD3, CD4 および CD8 と、B細胞サブセットのCD19を、各サブセットを認識するPEないしFITC標識抗体(BD Biosciences)を加えて30分間培養した後、FACSscan (BD Biosciences)を用いて評価した。

8) 統計学的処理

検定方法としてはサッカー練習の休憩前後における自律神経系及び運動能力の測定では二元配置分散分析を用い、精神的作業負荷後の疲労評価では対応のあるt-検定及び二元配置分散分析を用いた。肉体的作業負荷による疲労評価、またヒト初代培養表皮細胞に対する作用では対応のあるt-検定を用いた。T細胞およびB細胞に対する作用では、反復測定分散分析を用いた。得られた数値は平均値±標準偏差で表し、 $p < 0.05$ を、統計学的に有意差ありと判定した。

<結果>

1) 主観的疲労度に及ぼす効果

KOKORO スケールの各項目別に被験者全員の入力値から平均値を求め、その推移を検討した。その結果、「不安 - 安心」では、実験群と対照群で差はなかった(図 5A)。「やる気がない - やる気がある」では両群とも日曜の夜は「やる気」が低く、月・火曜の夜の「やる

気」は日曜の夜に比して高くなる傾向が見られた(図 5B)。また、翌朝の「やる気」は実験群が対照群に比して高い傾向を示した(図 5B)。「疲れ - 元気」では、両群とも着用直前より直後、翌朝に「元気」が増加し(図 5C)、翌朝の「元気」は実験群が対照群に比して高い傾向を示した(図 5C)。「不快・痛み - 快適・爽快」では、実験群の「不快・痛み」は日・月曜の夜と比較して火曜の夜が軽減され、「快適・爽快」が高まった(図 5D)。同様に対照群の「不快・痛み」は日曜の夜と比較して、月・火曜の夜が軽減され、「快適・爽快」が高まった。また、両群とも翌朝の「快適・爽快」が日増しに高まる傾向が示された(図 5D)。

2) 自律神経系及び運動能力に及ぼす影響

副交感神経の活動指標である pNN50 値(%)は、実験群では 90%以上の高いレベルを維持していた(図 6A)。対照群の pNN50 値(%)は、午前の練習直後において 50%以下に低下し、午睡終了時にわずかに上昇したが、午後の練習直後では 37%まで低下した(図 6A)。各測定時における pNN50 値(%)は、実験群が対照群に比して統計学的に有意に高かった(図 6A)。同じく副交感神経の活動指標である RMSSD 値(%)および CVI 値(%)は、実験群では朝の起床時に比べ練習終了直後は上昇し、午睡終了時は低下した。このことから朝の起床時に比べ練習終了直後では副交感神経活動が高まり、午睡終了時では副交感神経活動が低下したことが示された(図 6B, C)。一方、対照群の RMSSD 値(%)および CVI 値(%)は、朝の起床時に比べ練習終了直後は低下し、午睡終了時はやや上昇した(図 6B, C)。

運動能力に及ぼす影響としては、ショートドリブルテストの所要

時間は実験群では午前と比較して午後の練習で速度の短縮が見られたが、対照群では午前と午後とで変化は見られなかった(図 7A)。一方、実験群では午後の練習で速度の短縮傾向が見られたが、統計学的な有意差は認められなかった(図 7A)。カーブスプリントテストの所要時間は、両群とも午前と比較して午後の練習では短縮が見られた。また、実験群は対照群に比較して午後の練習で統計学的に有意な短縮が認められた(図 7B)。

3)精神的作業負荷時の疲労回復に及ぼす効果

被験者の唾液中 CgA 濃度を測定したところ、C-PAD 群のストレス時は平常時に比較して CgA 濃度が有意に上昇した(図 8A)。D-PAD 群のストレス時でも平常時に比して CgA 濃度は上昇傾向を示したが、有意差は認められなかった(図 8A)。また、両群ともストレス時に比較して回復時の CgA 濃度は有意に減少することが示された(図 8A)。D-PAD 群のストレス軽減率は、C-PAD 群よりも有意に高値を示した(図 8B)。

4)肉体的作業負荷時の疲労回復に及ぼす効果

未着用群・対照群・実験群における膝関節伸展運動時の最大トルクを比較した結果、実験群では中盤域の最大トルクの減少が、他の2群よりも有意に抑制されていた(図 9A)。また、実験群では後半域の最大トルクの減少についても他の2群よりも抑制傾向を示したが、有意な差は認められなかった。前半域・中盤域・後半域における筋電図中央周波数(MdF)の変化には、3群間で有意な差は認められなかった(図 9B)。

5) ヒト初代培養表皮細胞に対する作用

1 : 10 または 1 : 100 希釈濃度の DPV576 を初代培養表皮細胞に添加した結果、1 : 10 希釈濃度の DPV576 により IL-1 β 、TNF- α 、PGE2 の分泌が有意に増加した (図 10A, B, C)。同様に、炎症¹²⁾、痛み¹³⁾、概日リズム^{14, 15)}の調節を行う NGF にも、有意の誘導が認められた (図 10D)。したがって、1 : 10 希釈濃度の DPV576 を用いて、初代培養表皮細胞の TRPV 受容体の発現に及ぼす影響を検討した結果、TRPV4 の発現を抑制した (図 11A, B, C)。また、DPV576 は初代培養表皮細胞へのカルシウムイオンの流入を増加させた (図 11D)。

6) T 細胞および B 細胞に対する作用

PHA 刺激による T 細胞の増殖は、着用前と比べ着用後 1 週目、2 週目で統計学的な有意差を示さなかった (図 12A)。一方、PWM 刺激による B 細胞の増殖は、着用前と比べ着用後 2 週目に有意に増強した (図 12B)。

< 考察 >

疲労は、疼痛・発熱と並ぶ三大生体アラーム機構である。疼痛や発熱の分子神経学的メカニズムの解明が進んでいる^{16, 17)}一方、疲労のメカニズムに関する研究は少なく¹⁸⁾、疲労回復に関する科学技術やメカニズムの検討・確立はいっそう立ち遅れている。精神的あるいは肉体的な活動後に続く疲労の指標としては、主観的指標である

スケールと、客観的指標である生理学的・生化学的・免疫学的バイオマーカーが挙げられる。

本研究では、ナノプラチナ及びナノダイヤモンドを組み合わせた DPV576 素材及びこの素材で作られた DPV576 繊維製品を用いて、①主観的疲労度に及ぼす効果、②自律神経系及び運動能力に及ぼす影響、③精神的作業負荷時の疲労回復に及ぼす効果、④肉体的作業負荷時の疲労回復に及ぼす効果、⑤ヒト初代培養表皮細胞に対する作用、⑥免疫担当細胞に対する作用について、多面的解析から DPV576 素材及び繊維製品の疲労回復効果を検討した。なお、今回の研究に使用された DPV576 の安全性については、4 週間 DPV576 繊維に接触し続けたマウスの病理組織学的検査(肝臓・脳・肺・脾臓・心臓・胃・小腸・皮膚)の結果、異常は確認できなかった¹⁹⁾。

主観的指標である KOKORO スケールを用いた調査では、DPV576 繊維製品着用群において疲労回復傾向が示された。また、他の主観的指標である気分プロフィール(POMS total mood disturbance)を用いた検討でも、DPV576 繊維製品の睡眠時着用が高強度トレーニング期間における疲労感・筋肉痛・睡眠の質を改善することが示された^{20, 21)}。これらの結果から、DPV576 繊維製品の着用による疲労回復が示唆された。

次に、客観的指標である生理的バイオマーカーを用いて自律神経系及び運動能力に及ぼす影響を検討すると、午睡前の副交感神経活動は DPV576 繊維製品着用群が対照群より有意に高く、午睡後のパフォーマンスについても実験群が対照群より有意に高かった。また、肉体的作業負荷時の疲労回復を検討すると、DPV576 繊維製品着用群は未着用群及び対照群と比して仕事量の減少が抑制された。同様に、

生化学的バイオマーカーを用いて精神的作業負荷時の疲労回復を比較したところ、DPV576 繊維製品使用群の方が対照群より暗算課題による精神的作業負荷後の唾液中 CgA 濃度が有意に低下していた。また、高強度トレーニング期間における睡眠時の DPV576 繊維製品の着用は、対照群と比較して唾液中コルチゾールを有意に低下させた²⁰⁾。

さらに、免疫担当細胞に対する作用を検討したところ、DPV576 繊維製品の着用により PWM 刺激に対する B 細胞の増殖反応が亢進したことから、DPV576 繊維製品の着用による副交感神経を介したリンパ球の活性化²²⁻²⁶⁾が推察された。また、末梢血中の NK 細胞活性も DPV576 繊維製品の着用後 1 週間、2 か月で着用前と比べて有意に増強されことも判明している（未発表データ）。これらの結果から、DPV576 繊維製品は免疫担当細胞にも作用する可能性が示唆された。

TRP チャネルの活動促進は、感覚神経・視床下部を經由し交感神経を活性化する²⁷⁾。皮膚に存在する TRP チャネルは温度感受性、機械刺激感受性、侵害刺激感受性²⁸⁻³²⁾をもつ。そこで本研究では、DPV576 による刺激感受性の変化をヒト初代培養表皮細胞及びその内部 TRP チャネルについて検討した。その結果、DPV576 により TRPV4 受容体の発現抑制を確認した。さらに、DPV576 はヒト初代培養表皮細胞内へのカルシウムイオンの流入を増加させた。このことから、DPV576 による TRPV4 の発現抑制が感覚神経から視床下部への刺激伝達により交感神経の抑制もたらす機序が示唆された。

以上、DPV576 は交感神経系と相反関係にある副交感神経系の亢進を促し、良質な休養・睡眠環境をもたらすとともに、神経系、免疫系、内分泌系の働きを整え、疲労回復につながる可能性が推察され

(図 13)、DPV576 が疲労対策に有効な素材であることが示唆された。

今後は、表皮細胞に対する刺激から副交感神経系に至る経路の解明や、TRPV4 以外の刺激感受経路についても検討を進めるとともに、副交感神経活動を高めることによって疲労に対処する方法を確立するために、さらなる研究が必要と考えられる。

< 結論 >

疲労回復に対するナノプラチナ及びナノダイヤモンドを使用したハイブリッド素材 (DVP576) の効果とその機序について検討した。DPV576 は、自律神経の副交感神経系を亢進させ、副交感神経支配下にある免疫系や内分泌系の働きを整えることで、疲労の蓄積を生じさせない効果を有することが明らかとなった。