

低強度の有酸素運動が乳がんモデルラットに及ぼす影響

—筋萎縮, 貧血, 腫瘍形成に着目して—

近藤史悠・二里明音

要旨

本研究では、低強度の有酸素運動が乳がんモデルラットの筋萎縮、貧血、腫瘍形成に及ぼす影響について検討した。実験動物には5週齢のSprague Dawley系雌系ラットを60匹用い、これらを1)対象群(n=10)、2)非運動群(n=17)、3)低強度群(n=17)、4)中強度群(n=16)の4群に振り分けた。非運動群、低強度群、中強度群の3群にはN-ニトロソNメチル尿素を投与して乳がんを惹起させ、その後、低強度群と中強度群にはトレッドミルによる有酸素運動を4週間行った。実験期間中は腫瘍の計測と採血を継続して行い、実験終了後にヒラメ筋と長趾伸筋を摘出した。結果、骨格筋の相対重量比はヒラメ筋と長趾伸筋のいずれも対照群と比較して低強度群が有意差を認めなかった。赤血球とヘモグロビンは非運動群と比較して低強度群と中強度群が有意に高値を示し、その2群間で有意差を認めなかった。腫瘍の個数と総重量は非運動群と比較して低強度群と中強度群で低値を示し、2群間で有意差を認めなかった。以上のことから、乳がんモデルラットに対する低強度の有酸素運動は筋萎縮の進行抑制、貧血抑制、腫瘍形成の抑制に効果がある可能性が示唆された。

はじめに

がん患者には、腫瘍に由来する炎症や貧血、筋力低下などの様々な身体症状が見られる。加えて、手術療法や化学療法などの治療によって生じる副作用、合併症により、活動量の低下すなわち廃用症候群をまねく。その結果、がん患者の日常生活活動(Activity of daily life:ADL)や生活の質(Quality of life:QOL)、生命予後が低下するリスクは高くなる¹⁾。そのため、がん患者に対しては積極的にリハビリテーションを行うことが推奨されており、具体例には有酸素運動とレジスタンストレーニングを主体とした運動療法が行われている²⁾。

運動療法の効果の1つとして挙げられるのは筋力の維持、向上である。がん患者の筋力低下は頻繁に見られ、その主な原因はがん悪液質や廃用性筋萎縮の影響といわれている³⁾。これに対しての運動療法の効果は、多くの研究で確認

されている^{4,6)}。また、運動療法は貧血にも効果的であるといわれている。がん性貧血は、活動量の低下や倦怠感を引き起こし、活動量を低下させる原因となる¹⁾。Mohamadyら⁷⁾は、がん患者に対する中強度の有酸素運動が、赤血球とヘモグロビンを増加させ、貧血を改善すると報告している。そして近年、運動療法は、筋萎縮や貧血といった身体症状の改善だけでなく、がん自体の予防、進行抑制、治療としての効果を及ぼすことが着目されている。例えば、Richmanら⁸⁾は、前立腺がん患者のうち週3時間以上のウォーキングをしている患者は、運動習慣がない患者よりがんが進行するリスクが57%低いと報告している。また、基礎研究においては、乳がんモデルラットに対する中強度の運動が腫瘍の転移を抑制し、がん細胞のアポトーシスを促進するとの報告がある⁹⁻¹⁰⁾。このように、がん患者に対する運動療法は様々な効果が期待でき、がん治療において重要な位置づけとなっている。

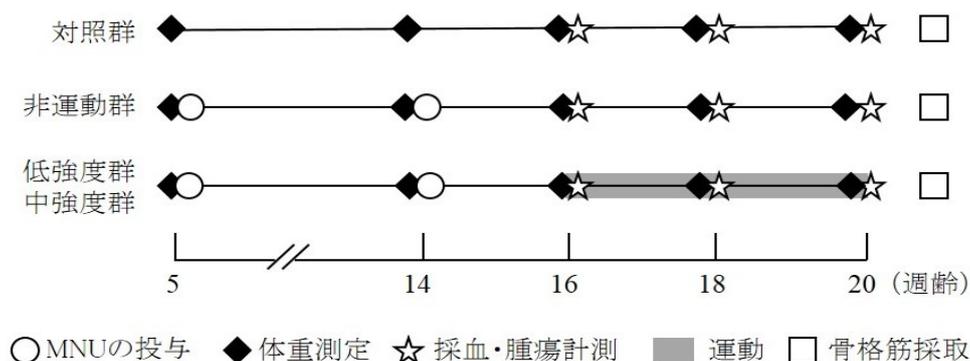


図 1 実験プロトコル

しかしながら、がん患者に対する運動療法に関する先行研究の多くは、中強度以上の運動を対象としている。また、臨床では中強度以上の運動が推奨されている¹⁾が、がん患者は治療の副作用などの問題を抱えており、中強度以上の運動の実施は困難な場合がある。多くのがん患者に実施可能と思われる低強度の運動の効果についての統一した見解は得られていない。

そこで、本研究では、低強度の有酸素運動が乳がんモデルラットの腫瘍と、それに伴う症状に及ぼす影響について多面的に検証することを目的とした。

材料と方法

1. 実験動物

実験動物には5週齢のSprague Dawley系雌性ラット60匹を用い、これらが無作為に1)通常飼育する対照群(n=10)、2)乳がんを惹起させた後、通常飼育する非運動群(n=17)、3)乳がんを惹起させた後、低強度の有酸素運動を負荷する低強度群(n=17)、4)乳がんを惹起させた後、中強度の有酸素運動を負荷する中強度群(n=16)の4群に振り分けた。なお、今回の実験は長崎大学が定める動物実験指針に準じ(許可番号:180424150)、長崎大学先導生命科学支援センター動物実験施設で実施した。

2. 乳がんモデルラットの作成方法

乳がんモデルラットの作成については、Perseら¹¹⁾の方法を参考にし、非運動群、低強度群、

中強度群のラットにN-ニトロソ Nメチル尿素(以下、MNU, 50mg/kg)を5, 14週齢に2回腹腔内投与した。対照群に関しては、疑似処置として上記同様の方法で生理食塩水を腹腔内投与し、全てのラットには餌と水を自由に与えた。

3. 実験プロトコル

実験プロトコルを図1に示す。実験期間は16週齢から20週齢の計4週間とした。5, 14, 16, 18, 20週齢時に体重を測定し、16, 18, 20週齢時に腫瘍の計測と採血を行い、実験終了後に骨格筋を摘出した。

4. 運動方法

小動物用トレッドミル(シナノ製作所製, Model-SN460)を用いて有酸素運動を実施した(図2)。歩行速度を、低強度群は10m/分、中強度群は20m/分とした。運動時間を、低強度群は30分、中強度群は15分とした。なお、介入頻度



図 2 トレッドミルによる運動の様子

は週5回とし、16週齢から20週齢の計4週間実施した¹²⁾。

5. 腫瘍の計測方法

視診および触診にて16, 18, 20週齢時に1匹あたりの腫瘍数を計測した。また、デジタルノギスを用いて腫瘍の長径を皮膚の上から測定し(図3)、先行研究を参考にした下記の式で腫瘍重量の推定値を算出した¹³⁾。

$$\text{腫瘍重量(g)} = \frac{\text{長径}^3 \text{ (cm)}}{2}$$



図3 腫瘍を発生したラット

矢印: 乳部に発生した腫瘍。

6. 解析方法

1) 血液学的解析

採血は16, 18, 20週齢時に、抗凝固剤添加にて尾静脈から行った。そして、チュルク液を添加して赤血球のみを破壊した後、ビルケルチュルク式血球計算盤と顕微鏡を用いて白血球をカウントした。また、20週齢時における全血中の赤血球とヘモグロビンを、自動血球計数装置 thinka CB-1010 (アークレイ株式会社製)を用いて計測した。加えて、20週齢時の血液を遠心分離(1500ppm, 15分)して血漿とし、血漿中の乳酸をラクテート分析装置ラクテート・プロ 2 LT-1730 (アークレイ株式会社製)を用いて計測した。

2) 骨格筋の相対重量比

実験終了後、三種混合麻酔(8.0mg/kg)による麻酔下で、赤筋・遅筋のヒラメ筋と混合筋・速筋の長趾伸筋を摘出した。その後、精密電子秤を用いて筋湿重量を計測し、相対重量比を算出した。

7. 統計解析

今回の実験では、実験開始時の16週齢時の時点で腫瘍が既に2個以上形成されている、もしくは腫瘍の長径が2cm以上であるラットを重症例として除外した。重症例には、非運動群4匹、低強度群4匹、中強度群3匹が該当した。また、実験期間中に非運動群2匹、低強度群2匹、中強度群1匹が病変により死亡した。つまり、今回の解析対象としたのは、対照群10匹、非運動群11匹、低強度群11匹、中強度群12匹である。

全てのデータは平均±標準誤差で表した。統計学的解析には、IBM SPSS (Ver 23.0)を用い、全ての比較において一元配置分散分析(以下、ANOVA)を適用した。ANOVAにて有意差を認めた場合、事後検定としてFisherのPLSD法を適用した。なお、有意水準は5%未満とした。

結果

1. 体重の比較

体重は、14週齢以降、対照群と比較して低強度群、中強度群の3群は低値を示した。16週齢においては、対照群と比較して低強度群と中強度群が有意に低値を示した。18週齢以降は、対照群と比較して非運動群、低強度群、中強度群の3群とも有意に低値を示したが、3群間で有意差を認めなかった(図4)。

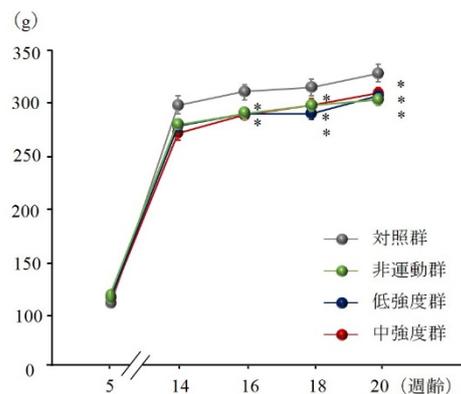


図4 体重の比較

平均±標準誤差, *: 対照群との比較(p<0.05)

2. 乳酸の比較

20週齢時における血漿中の乳酸は、対照群と

比較して中強度群は有意に高値を示したが、非運動群と低強度群は有意差を認めなかった(図5).

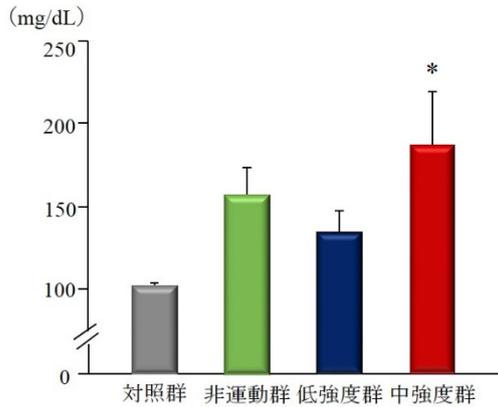


図5 乳酸の比較

平均±標準誤差, *: 対照群との比較 (p<0.05)

3. 骨格筋の相対重量比の比較

ヒラメ筋の相対重量比は、対照群と比較して非運動群と中強度群で有意に低値を示したが、低強度群は有意差を認めなかった。また、低強度群と比較して、非運動群と中強度群は有意差に低値を示した(図6-A)。

一方、長趾伸筋の相対重量比は、対照群と比較して非運動群で有意に低値を示し、低強度群と中強度群は有意差を認めなかった。また、低強度群と中強度群の2群間の有意差を認めなかった(図6-B)。

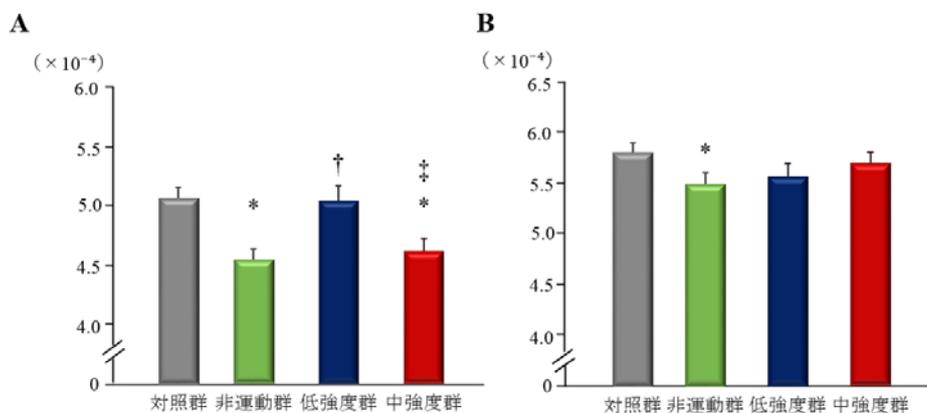


図6 相対重量比の比較

A: ヒラメ筋, B: 長趾伸筋, 平均±標準誤差, *: 対照群との比較 (p<0.05), †: 非運動群との比較 (p<0.05) ‡: 低強度群との比較 (p<0.05)

4. 赤血球およびヘモグロビンの比較

赤血球(図7-A), ヘモグロビン(図7-B)は、いずれも対照群と比較して非運動群は有意に低値を示したが、低強度群と中強度群は有意差を認めなかった。低強度群と中強度群の2群間の有意差は認めなかった。

5. 白血球の比較

白血球は、18週齢までは対照群、非運動群、低強度群、中強度群の4群間で有意差を認めなかった。20週齢になると、対照群と比較して非運動群と中強度群で有意に高値を示したが、非運動群と中強度群の2群間に有意差を認めなかった。これに対して、対照群と比較して低強度群は有意差を認めなかった(図8)。

6. 腫瘍数と腫瘍総重量の比較

腫瘍数は16週齢以降に徐々に増加し、20週齢において、非運動群は73%、低強度群は64%、中強度群は75%の発生率を認めた。腫瘍数は、18週齢までは非運動群、低強度群、中強度群の3群間に有意差を認めなかった。20週齢時の時点では、非運動群と比較して低強度群で有意に低値を示した(図9-A)。

同様に、腫瘍総重量も16週齢以降に徐々に増加した。16週齢までは非運動群、低強度群、中強度群の3群間に有意差を認めなかった。18週齢においては非運動群と比較して低強度群で

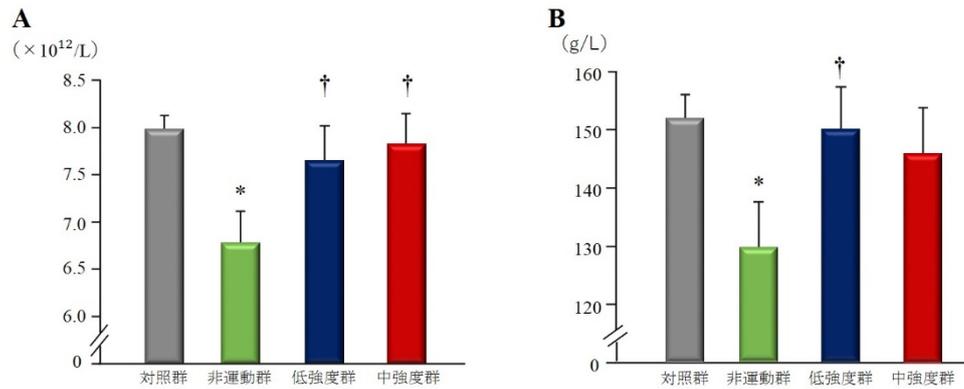


図 7 赤血球およびヘモグロビンの比較

A: 赤血球, B: ヘモグロビン, 平均±標準誤差, *: 対照群との比較 ($p < 0.05$), †: 非運動群との比較 ($p < 0.05$)

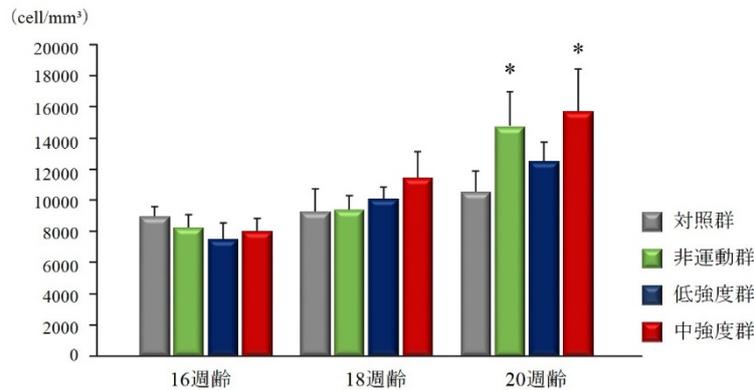


図 8 白血球数の比較

平均±標準誤差, *: 対照群との比較 ($p < 0.05$)

有意に低値を示した。また、20 週齢では、非運動群と比較して低強度群と中強度群が有意に低値を示したが、その 2 群間に有意差を認めなかった(図 9-B)。

考察

本研究では、乳がんモデルラットを用い、低強度の有酸素運動が筋萎縮と貧血、腫瘍の形成に及ぼす影響について検討した。今回は腫瘍に及ぼす影響を検討するために、腫瘍の観察に適した乳がんモデルラットを用いた。

相対重量比の結果、対照群と比較して非運動群のヒラメ筋および長趾伸筋は有意に低値を示

しており、筋萎縮が起きていたと考えられる。

筋萎縮が起きた要因として、がん悪液質と廃用性筋萎縮の影響が挙げられる。がん悪液質とは、腫瘍から分泌される炎症性サイトカインによる、進行性の筋タンパクの異化亢進、筋肉量の減少を特徴とした代謝異常の状態を指す³⁾。今回用いた乳がんモデルラットの非運動群は、体重が減少し、白血球数が増加したことから炎症が起きていることは明らかである。つまり、がん悪液質による筋萎縮が生じたと推測される。また、運動による筋萎縮の進行抑制効果については、ヒラメ筋では低強度群、長趾伸筋では低強度群と中強度群において対照群と有意差を認めなかった。がん患者を対象とした研究でも、低強度の運

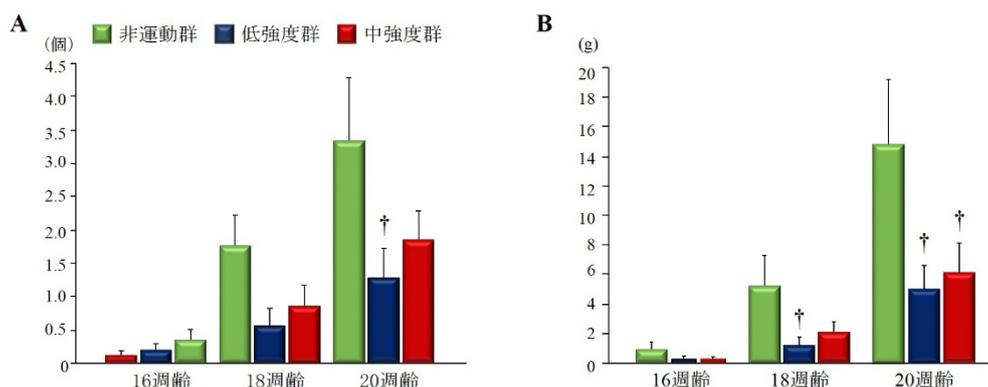


図 9 腫瘍数および腫瘍総重量の比較

A: 腫瘍数, B: 腫瘍総重量, 平均±標準誤差, †: 非運動群との比較 (p<0.05)

動は高頻度に行えば、筋力と筋厚の維持が得られると報告されている¹⁴⁾。したがって、低強度の運動でも筋萎縮の進行抑制効果は得られると推測できる。筋萎縮の進行抑制効果は、一般的には、強度が高いほど、筋萎縮の進行抑制効果が高いといわれている¹⁵⁾。今回設定した中強度群で乳酸値が高値を示したことから、十分な運動負荷が加わっていたといえる¹⁶⁾。しかし、予想に反して、中強度群のヒラメ筋は筋萎縮の進行抑制効果が得られなかった。先行研究では、がん悪液質モデルに対して高強度のレジスタンストレーニングを行うと、筋萎縮の進行抑制効果が得られないとの報告があり¹⁷⁾、がん悪液質が進行した状態では強度が高い運動の効果は得られにくい可能性が指摘されている。したがって、がん悪液質の影響下で運動を実施する際は、強度の検討が必要であると思われる。

次に、貧血の指標である赤血球とヘモグロビンは、対照群と比較して非運動群が有意に低値を示した。これは、非運動群が貧血状態にあることを示している。がんによる貧血の原因は多種多様で、造血機能低下、鉄代謝異常、腫瘍からの出血などが原因といわれている¹⁸⁾。これに対して、低強度群と中強度群では、赤血球、ヘモグロビンともに対照群との有意差がないことから、運動によって貧血が抑制されたといえる。先行研究によると、低強度から中強度の有酸素運動は、血漿量と赤血球数を増加させ、貧血を改善させるとされており¹⁹⁾、今回の実験でも同じ傾向が得られ

たといえる。貧血の改善には、運動によって分泌される成長ホルモンが、造血機能を促進することも関連しているといわれている²⁰⁾。これらの作用により、今回運動によって貧血が抑制されたと考えられる。

運動による腫瘍形成の抑制効果については、多くの報告があるが、詳しいメカニズムについては不明である。現在いくつかの仮説が存在し、Malickaら¹⁰⁾の報告によれば、乳がんモデルラットに対する中強度から高強度の有酸素運動が、ナチュラルキラー細胞による腫瘍細胞のアポトーシスを促進するとされている。また、Shalamzariら²¹⁾は、乳がんモデルマウスに対する有酸素運動が、炎症性サイトカインを減少させ、腫瘍内血管新生を抑制し、腫瘍体積の増加を抑制すると報告している。乳がんにおいては、運動によるエストロゲンなどの性ホルモンの減少が影響しているといわれている²²⁾。今回の結果をみると、腫瘍数と腫瘍総重量は、非運動群と比較して低強度群と中強度群で低値を示した。また、白血球数が、対照群と比較して非運動群と中強度群で有意に高値を示したが、低強度群では有意差を認めなかったことから、低強度群で炎症が抑制された可能性がある。つまり、今回の実験では、運動による腫瘍形成の抑制効果が認められた。運動の強度に関しては、腫瘍形成の進行抑制効果が、中強度以上の運動で得られると多くの先行研究で報告されている^{10, 21, 22)}。しかし、今回の結果より、低強度の運動でも中強度の運動と同等の効果

があることが示唆される。

以上のことから、乳がんモデルラットに対する低強度の有酸素運動は、筋萎縮の進行抑制、貧血の抑制、腫瘍形成の抑制効果が得られる可能性があり、中強度以上の運動が実施困難ながん患者に対して低強度の運動を提供することは有効であると考えられる。ただ、今回の研究では、骨格筋や腫瘍の組織学的解析が不十分であったためさらなる検討が必要であり、今後の課題とする。

謝辞

今回の実験において、ご指導、ご協力をいただきました、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科運動障害リハビリテーション学研究室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 井上順一郎, 神津玲:がんの理学療法. 三輪書店, 東京, 2017, pp. 106-114.
- 2) 石川愛子, 辻哲也:造血幹細胞移植とリハビリテーション. 日本造血細胞移植学会雑誌. 2016; 5: 107-117.
- 3) 片山寛次:がん悪液質の病態と管理. 日本静脈経腸栄養学会雑誌. 2015;30:917-922.
- 4) Winters-Stone KM, Dobek J, et al.: The effect of resistance training on muscle strength and physical function in older, postmenopausal breast cancer survivors: a randomized controlled trial. *J Cancer Surviv.* 2012; 6: 189-199.
- 5) Lira FS, Neto JC, et al.: Exercise training as treatment in cancer cachexia. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014; 39: 679-686.
- 6) Mijwel S, Cardinale DA, et al.: Exercise training during chemotherapy preserves skeletal muscle fiber area, capillarization, and mitochondrial content in patients with breast cancer. *FASEB J.* 2018; 32: 5495-5505.
- 7) Mohamady HM, Elsisy HF, et al.: Impact of moderate intensity aerobic exercise on chemotherapy-induced anemia in elderly women with breast cancer: A randomized controlled clinical trial. *J Adv Res.* 2017; 8: 7-12.
- 8) Richman EL, Kenfield SA, et al.: Physical activity after diagnosis and risk of prostate cancer progression: data from the cancer of the prostate strategic urologic research endeavor. *Cancer Res.* 2011; 71: 3889-3895.
- 9) Alvarado A, Gil da Costa RM, et al.: Effects of exercise training on breast cancer metastasis in a rat model. *Int J Exp Pathol.* 2017; 98: 40-46.
- 10) Malicka I, Siewierska K, et al.: The effect of physical training on the N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis of Sprague-Dawley rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015; 240: 1408-1415.
- 11) Perse M, Cerar A, et al.: N-methylnitrosourea induced breast cancer in rat, the histopathology of the resulting tumours and its drawbacks as a model. *Pathol Oncol Res.* 2009; 15: 115-121.
- 12) Ni GX, Liu SY, et al.: Intensity-dependent effect of treadmill running on knee articular cartilage in a rat model. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:172392. doi: 10.1155/2013/172392, (cited 2018-12-18).
- 13) Anbuselvam C, Vijayavel K, et al.: Protective effect of *Operculina turpethum* against 7,12-dimethyl benz (a) anthracene induced oxidative stress with reference to breast cancer in experimental rats. *Chem Biol Interact.* 2007; 168: 229-236.

- 14) Fukushima T, Nakano J, et al.: Low-intensity exercise therapy with high frequency improves physical function and mental and physical symptoms in patients with haematological malignancies undergoing chemotherapy. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2018; 27: e12922. doi: 10.1111/ecc.12922 (in press).
- 15) 谷口正哲: がん患者のリハビリテーションと栄養. *日本静脈経腸栄養学会雑誌*. 2015; 30: 937-940.
- 16) 中村隆一, 斎藤宏, 他: 基礎運動学(第6版). 医歯薬出版株式会社, 東京, 2015, pp. 327-330.
- 17) das Neves W, Alves CR, et al.: Loss of strength capacity is associated with mortality, but resistance exercise training promotes only modest effects during cachexia progression. *Life Sci*. 2016; 163: 11-22.
- 18) 名倉 英: がん性貧血への対応. *医学のあゆみ*. 1993; 164: 423-426.
- 19) Dolan LB, Gelmon K, et al.: Hemoglobin and aerobic fitness changes with supervised exercise training in breast cancer patients receiving chemotherapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010; 19: 2826-2832.
- 20) Dimeo F, Knauf W, et al.: Endurance exercise and the production of growth hormone and haematopoietic factors in patients with anaemia. *Br J Sports Med*. 2004; 38: e37. doi: 10.1136/bjism.2004.011908, (cited 2018-12-18).
- 21) Shalamzari SA, Agha-Alinejad H, et al.: The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. *Iran J Basic Med Sci*. 2014; 17: 231-258.
- 22) Adraskela K, Veisaki E, et al. Physical exercise positively influences breast cancer evolution. *Clin Breast Cancer*. 2017; 17: 408-417.

(指導教員 中野治郎)