

下肢自転車運動時における
上腕動脈シェアストレスの調節機序の解明とその応用

県立広島大学大学院
総合学術研究科
生命システム科学専攻

博士論文

令和3年3月

(2021年)

三浦 康平

— 目次 —

略号と記号	1
第1章 緒言	5
1-1. 動脈硬化の病因論	6
1-2. 血管内皮細胞の病態生理学的な役割	8
1-3. 運動の抗動脈硬化作用	10
1-4. 運動による血管内皮機能への作用	11
1-5. 血管内皮機能の評価	15
1-6. 下肢運動時における非運動肢のシェアストレス応答	18
1-7. 下肢運動時の上腕動脈のシェアストレス応答が血管内皮機能に与える影響	19
1-8. 下肢運動時における上腕動脈のシェアストレス応答の規定要因	21
1-9. 本研究の目的	23
第2章 実験I 下肢自転車運動中の上腕動脈シェアストレスに対する前腕部および 手部への温冷刺激の影響	24
2-1. 目的	25
2-2. 方法	25
2-2-1. 被験者	25

2-2-2.	実験プロトコル	26
2-2-3.	測定項目	28
2-2-4.	統計処理	30
2-3.	結果	31
2-3-1.	運動開始 20 分までの応答	31
2-3-2.	冷却刺激条件における上腕動脈と皮膚循環の応答	33
2-3-3.	温熱刺激条件における上腕動脈と皮膚循環の応答	35
2-3-4.	温冷刺激による皮膚血管コンダクタンスと平均シェアレートとの間の 変化量の相関	37
2-4.	考察	38

第 3 章 実験II 下肢自転車運動時における前腕部および手部への温冷刺激が

	血管内皮機能に与える効果	42
3-1.	目的	43
3-2.	方法	43
3-2-1.	被験者	43
3-2-2.	実験プロトコル	44
3-2-3.	測定項目	46

3-2-4. 統計処理	47
3-3. 結果	48
3-3-1. 中心循環応答（心拍数，血圧）ならびに皮膚血流応答	48
3-3-2. 上腕動脈のシェアストレス様相および血管応答（血管径， シェアストレスの様相，ならびに OSI)	49
3-3-3. 上腕動脈の血管内皮機能（%FMD)	53
3-3-4. シェアストレス様相ならびに OSI の iAUC と %FMD の変化の 関連性	56
3-4. 考察	58
第4章 総括	63
参考文献	68
謝辞	84

略号と記号

本論文で用いられる主要な略号と記号は以下のとおりである。

BA	: Brachial Artery 上腕動脈
BF	: Blood Flow (mL/min) 血流量
BV	: Blood Velocity (cm/sec) 血流速度
DBP	: Diastolic Blood Pressure (mmHg) 拡張期血圧
EDRF	: Endothelium -Derived Relaxing Factor 内皮由来血管拡張因子
eNOS	: Endothelial Nitric Oxide Synthase 内皮型 NO 合成酵素
FMD	: Flow-Mediated vaso-Dilatation (%) 内皮依存性血管拡張反応
G	: Glabrous 無毛部
HR	: Heart Rate (bpm) 心拍数
iAUC	: incremental Area Under the Curve 上昇曲線下面積

LBNP	: Lower Body Negative Pressure 下半身陰圧負荷
LDL	: Low Density Lipoprotein 低比重リポ蛋白
MAP	: Mean Arterial Pressure (mmHg) 平均血圧
MSNA	: Muscle Sympathetic Nerve Activity 筋交感神経活動
NG	: Non-Glabrous 有毛部
NO	: Nitric Oxide 一酸化窒素
OSI	: Oscillatory Shear Index 振動せん断指数
SBP	: Systolic Blood Pressure (mmHg) 収縮期血圧
SBF	: Skin Blood Flow (a.u.) 皮膚血流
SEM	: Standard Error of the Mean 標準誤差
SD	: Standard Deviation 標準偏差
SR	: Shear Rate (s^{-1}) シェアレート

SS	: Shear Stress シェアストレス
ROS	: Reactive Oxygen Species 活性酸素種
VC	: Vascular Conductance (a.u./mmHg) 血管コンダクタンス

本論文は以下の主参考論文および副参考論文を基に構成されている。

1) 主参考論文

1. **Miura Kohei, Kashima Hideaki, Morimoto Marina, Namura Saki, Endo Yamaoka Masako, Oue Anna, Fukuba Yoshiyuki.** Effects of unilateral arm warming or cooling on the modulation of brachial artery shear stress and endothelial function during leg exercise in humans. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2020, 28, 271-282.

2. **Miura Kohei, Kashima Hideaki, Namura Saki, Morimoto Marina, Endo Yamaoka Masako, Oue Anna, Fukuba Yoshiyuki.** Effects of cooling or warming of the distal upper limb on skin vascular conductance and brachial artery shear profiles during cycling exercise. *Research in Sports Medicine*. 2021. (accepted in press)

2) 副参考論文

1. **Miura Kohei, Kashima Hideaki, Oue Anna, Kondo Ayaka, Watanabe Sachiko, Endo Yamaoka Masako, Fukuba Yoshiyuki.** Effect of sinusoidal leg cycling exercise period on brachial artery blood flow dynamics in humans. *The Journal of Physiological Sciences*. 2020, 70.

第 1 章

緒言

第1章 緒言

1-1. 動脈硬化の病因論

2016年における世界の総死亡者数は5690万人である。主な死因は心血管疾患と脳血管疾患であり約26%（1520万人）を占めている。心血管疾患による死亡者数は2030年までに全世界で年間2330万人まで増加すると予測されている¹⁾。我が国においても、循環器系疾患による死因は全体の約25%を占め、循環器系疾患に関わる医療費は傷病分類の中で最も高額であり、全診断医療費の19.7%を占めている²⁾。つまり、循環器系疾患は我が国における深刻な社会問題であり、医療費抑制の観点からも疾病の発症と重症化の予防は喫緊の課題である。

心血管疾患や脳血管疾患の主要因はアテローム性動脈硬化である。アテローム性動脈硬化とは、動脈硬化症の最も一般的な形態であり、主に冠動脈、頸動脈、脳動脈、大動脈、四肢の主要動脈等、中型および大型動脈の血管壁において発生する。動脈血管の構造は、内膜・中膜・外膜の3層からなる（図1-1）。内膜は、内腔側から血管内皮細胞、血管基底膜と内弾性板、その外側の中膜は平滑筋細胞と細胞外マトリックス、外膜は外弾性板より外側で、コラーゲンなどの細胞外マトリックスや線維芽細胞でそれぞれ構成されており、動脈硬化症は内腔に向かって進展するプラークを特徴としている。その発生機序は、従来、血管壁に脂質が沈着して生じるものと考えられてきたが、その後、血管内皮細胞の傷害とそれに続く血小板の活性化、血小板由来増殖因子による平滑筋細胞の増殖を原因とする「傷害反応仮説」がRossら³⁾によって提唱された。現在では「傷害反応仮説」をさらに発展させた「炎症説」がアテローム性動脈硬化の機序として広く受け入れられている^{4,5)}。

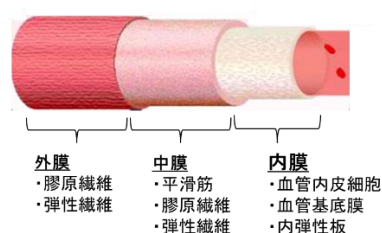


図1-1 動脈血管の基本構造

「炎症説」とは、何らかの理由で血管内皮細胞が障害され、炎症性細胞などが血管壁へ浸潤し、それを契機に中膜の平滑筋細胞が形質転換して内膜へ遊走・増加するという考え方である。具体的には、血液中の低比重リポ蛋白（Low Density Lipoprotein, LDL）が内膜に入り込み、酸化 LDL に変化し、それを処理するために白血球の一種である単球も内膜へと入り込み、マクロファージに変わる。マクロファージは酸化 LDL を取り込み、泡沫細胞に変化すると、各種サイトカインを放出して血管局所での慢性炎症反応を惹起することでアテローム性動脈硬化が発生する。つまり、血管内皮細胞の障害が、動脈硬化発症の引き金となり、動脈硬化の進展から粥種の破綻による心筋梗塞、脳卒中などの血管合併症をきたす。血管内皮は動脈硬化の進展とともに障害され、その障害された血管内皮がさらに動脈硬化を進展させるという悪循環を形成する。重度の動脈硬化は正常な動脈へと戻ることができない（不可逆的である）のに対し、動脈硬化の前段階である血管内皮細胞の軽微な障害は可逆的である（図 1-2）。つまり、動脈硬化症の進展とそれに伴う循環器疾患の発症を予防には、血管内皮機能を正常な状態に保つことが重要となる。

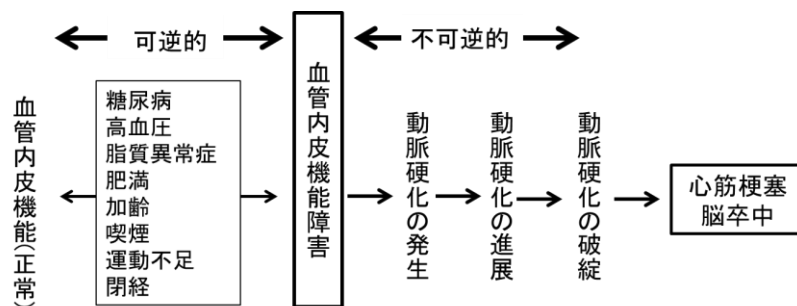


図 1-2 血管内皮機能障害を第一段階とした動脈硬化発症から循環器疾患発症へのプロセス

1-2. 血管内皮細胞の病態生理学的な役割

血管内皮は解剖学的には血管壁の最も内側の内腔側に位置し、血管内皮細胞による一層の細胞層からなっており、血管内腔と血管壁を隔てるバリアーのようなものと考えられていたが、Furchgott らにより内皮由来血管拡張因子 (EDRF) が発見され⁶⁾、さらに Palmer や Ignarro らにより EDRF の本体が一酸化窒素 (nitric oxide, NO) であることが証明された^{7,8)}。その後、NO 以外にも、血管内皮からの血管拡張因子として、プロスタグランジン I₂、C 型ナトリウム利尿ペプチド、内皮由来血管過分極因子、さらに血管収縮因子としてエンドセリン、アンジオテンシン II、プロスタグランジン H₂、トロンボキサン A₂ といった様々な生理活性物質が産生・分泌されることが明らかとなった⁹⁾。これら生理活性物質の中でも、特に NO は、血管平滑筋に作用して血管を拡張させるだけでなく、血液中の血小板や白血球が血管内腔表面に付着することを防ぐ、血栓形成性と線維素溶解性を調節して血栓形成を防ぐ、といった作用を有し、動脈硬化において非常に重要な役割を果たしている。正常な血管内皮細胞は、血管の拡張と収縮、血管平滑筋の増殖と抗増殖、血液の凝固と抗凝固作用、炎症と抗炎症作用、酸化と抗酸化作用などのバランスをうまくとり、血管トーンや血管構造の調節・維持に働いている。しかし、血管内皮細胞が障害され、その機能が低下すると、正常な血管内皮細胞が本来有している動脈硬化作用と抗動脈硬化作用のバランスは崩れ、血管トーンや血管構造の破綻へとつながる。

血管内皮機能異常を惹起するメカニズムは数多く存在するが、そのうち、NO 自体の産生低下、もしくは NO の不活性化 (あるいは両者が同時に存在) が代表的である¹⁰⁾ (図 1-3)。NO 産生低下の機序としては、アゴニストに対する受容体の異常、受容体結合後の情報伝達系の異常、シェアストレス (Shear stress, SS) (後述) の減弱や異常、内皮型 NO 合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) の異常、NO の基質としての L-アルギニンの不足、などが考えられる。また、活性酸素は NO と非常に高い結合親和性を有しており、NO の不活性化に寄与する。さらに、活性酸素は NO と結合することにより非常に強い細胞毒性を有

するペルオキシナイトライトに変換される。これにより、血管壁細胞の直接の障害、さらに血管内皮細胞や血管平滑筋細胞での NO の産生低下と NO の不活性化を生じる。活性酸素が過剰な状態は NO の産生低下と NO の不活性化により血管内皮機能障害に働き、血管内皮機能障害はフィードバックして動脈硬化を進展させる悪循環を形成する。また、そのような状態は血管内皮の機能障害を惹起するとともに、レドックス感受性の血管平滑筋増殖、肥大、アポトーシスを誘導し、血管壁肥厚やリモデリングを惹起し、血管構造自体の変化が二次的に血管内皮機能障害に関与することも考えられる¹¹⁾。

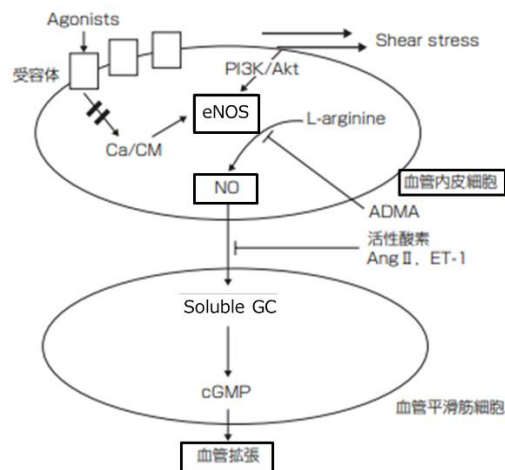


図 1-3 血管拡張のプロセスと血管内皮機能異常の機序（東，2007 の図を改変）

このような血管内皮細胞の機能的な障害は、生活習慣の乱れ（肥満、運動不足、喫煙、塩分の過剰摂取など）や、疾病（高血圧、糖尿病、脂質異常症）により生じることはよく知られている^{11,12)}。先述したように、動脈硬化の前段階である血管内皮細胞の機能的な障害が生じている状態は可逆的であるため、生活習慣の変容や基礎疾患の改善によって、動脈血管の内皮機能を正常、あるいはよりよい状態に保つことは、動脈硬化および心血管性疾患の発症や進展を抑える上で極めて重要となる（図 1-2）。ここでは、動脈血管内皮細胞の機能性と、それへの影響因子の一つである「運動」に焦点をあて研究を行う。

1-3. 運動の抗動脈硬化作用

これまで、動脈硬化に対する運動トレーニング効果、すなわち、定期的な有酸素性運動の実施が、心血管性疾患の発症や進展に対して、優れた防御因子であることは、すでに広く知られている^{14,15)}。これは運動によるインスリン抵抗性、高血圧、脂質代謝異常、肥満などへの直接的な効果を介した、間接的作用が主であると考えられてきて、その背景に想定される種々のメカニズムは、以下のように要約される。運動は、循環血液中、骨格筋、ならびに脂肪組織でのリポ蛋白リパーゼ活性を高めて、脂肪酸の供給と利用を促進させ、骨格筋細胞の脂肪酸の輸送に関与する細胞膜のトランスポーターやミトコンドリア内への流入に関与するカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I 活性や TCA サイクルで重要な役割をもつ α ケトグルタル酸脱水素酵素活性を増加させることにより好氣的代謝を促進させる。また、骨格筋細胞のミトコンドリア内膜には活性酸素を抑制し、脂肪酸の参加を促進させる脱共役蛋白 3 型があり、運動により脱共役蛋白 3 型が増加することが示されている。運動は 5'-AMP 活性化プロテインキナーゼを活性化させ、グルコース輸送体の増加および細胞内でのトランスロケーションの促進、インスリン感受性を高め、アセチル CoA を産生し、さらに核に作用して骨格筋細胞の核内受容体型転写型因子の活性化補助因子である PGC-1 α を刺激する。その結果、運動は糖脂脂肪酸代謝に好影響をもたらす。また、運動により骨格筋細胞

からマイオカインと呼ばれる多数のサイトカインが分泌され、肝臓、脂肪組織に作用し、抗動脈硬化作用を示すことが明らかになっている。さらに、運動により脂肪細胞からもアディポカインと呼ばれるサイトカインが多数分泌され、骨格筋細胞と脂肪組織が肝臓と関連してエネルギー制御機構を担い、慢性炎症・動脈硬化性疾患の発症・予防に関与する。これらの例示したような作用で糖代謝や脂質代謝の改善、肥満の軽減、ひいては降圧などが生じて、結果として心血管リスクの低減につながる。

しかし、このような作用のみだけでは、運動による心血管リスク減少の約 6 割しか説明がつかないことが明らかにされ¹⁶⁾、より直接的な運動の効果があるのではないかと想定されるようになってきた。そのほかの主要な要因として、近年、運動時の血流 (Blood flow, BF) 増加自体が血管内皮細胞に与える直接的な作用の存在を示唆する証拠が積み上げられてきている。

1-4. 運動による血管内皮機能への作用

前項で述べた、心血管リスクの残り 4 割程度を説明する、より直接的な抗動脈硬化作用とは何なのか、ここ 15 年あまり、多くの研究者がその候補として注目してきた要因をこれから説明する。BF 増加に起因する血管内皮細胞への刺激として、BF の有する力学的な刺激が存在し、SS と呼ばれる。血管内腔の血液の流れに応じて生じる SS は、常に血管壁の内皮細胞へ力学的に作用しており、内皮細胞における血管作動性物質の分泌などを調整する、また血管壁の形態や機能に影響すると考えられている¹⁷⁾。SS は、物体のある面の平行方向にすべらせるように作用する物理力のことをさし、血管で置き換えると、BF による血管内腔表面の接線方向に作用し、血液の粘性と BF の速度勾配に比例する物理力で、BF によって生じる内皮細胞を血流方向にゆがませる力 (シェアストレス; 日本語では「ずり応力」と呼ばれる) のことをさす。ある間隙を流れる流体によって生じる SS (τ) は、ニュートンの粘性法則より、流速と間隙径とから算出される速度勾配 (du/dr) (シェアレート (shear rate, SR))

とも呼ばれる) と, そこを通る流体の粘度 (μ)により次の式で表される (式 1-1)。

$$\text{式 1-1 } \tau = \mu(du/dr)$$

また, 血管のような円筒管内では, ポアズイユの法則により, 半径 (r) の血管内を粘度 (μ), 流量 (Q) の血液が, 血流速度 (u) で定常的に流れているときに SS (τ) は次の式で表される (式 1-2)。

$$\text{式 1-2 } \tau = 4\mu Q/\pi r^3$$

上述の式はニュートンの粘性法則からも表すことができ (図 1-4), 血管径 (r) と血流速度 (u) から算出される速度勾配 (du/dr) と血液粘度 (μ) により SS (τ) は次の式で表される (式 1-3)。

$$\text{式 1-3 } \tau = 8\mu(du/dr) \text{ or } 4\mu(du/dr)$$

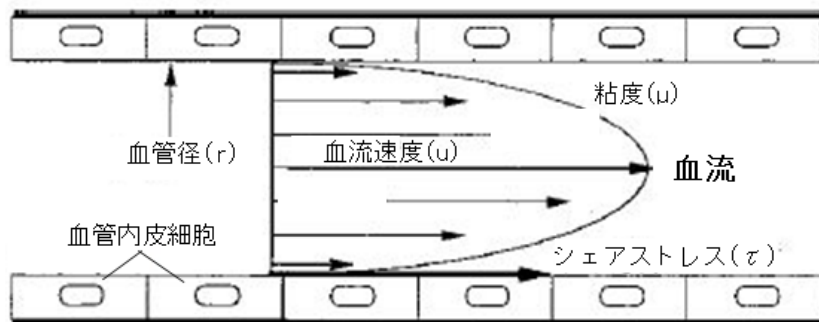


図 1-4 血流により血管内皮細胞に働くシェアストレス

血流速度, 血流量, あるいは血液粘度が増加するとシェアストレスも増大する (安藤, 2002 の図を改変¹⁸⁾)

つまり, ヒトの血管における SS は, 血管径および血流速度と血液粘度から算出することができる。ポアズイユの法則は金属のような剛体円筒管内を仮定しているため, 高い伸展性を有する血管では SS が減少することが報告されており¹⁹⁾, よりヒトの生理的な値に近づけるため, 式 1-3 の後者が, 先行研究では多く用いられている²⁰⁻²³⁾。さらに, 水のような単純

な液体はニュートン流体といい、ある一定の温度の場合には粘度は変わらないため、SS と SR は直線的な関係を示す²⁴⁾ (図 1-5)。一方、血液は非ニュートン流体とされ、赤血球などの状態によって粘度が変化する。赤血球は血流速度および SR に影響を受け、赤血球の変形現象や集合現象が生じる。低 SR の状態では赤血球の変形や集合により粘度は上昇し、逆に高 SR の状態では粘度が減少することが知られている²⁵⁾。したがって、血管における SS と SR は指数関数的な関係を示す²⁴⁾ (図 1-5)。しかしながら、血液粘度の評価には侵襲を伴うことや、厳密な評価ができないことなどの理由から、ニュートン流体同様、SS と SR は直線的な関係として、ヒトにおける SS の評価には、代替指標として SR が多く用いられている^{26,27)}。

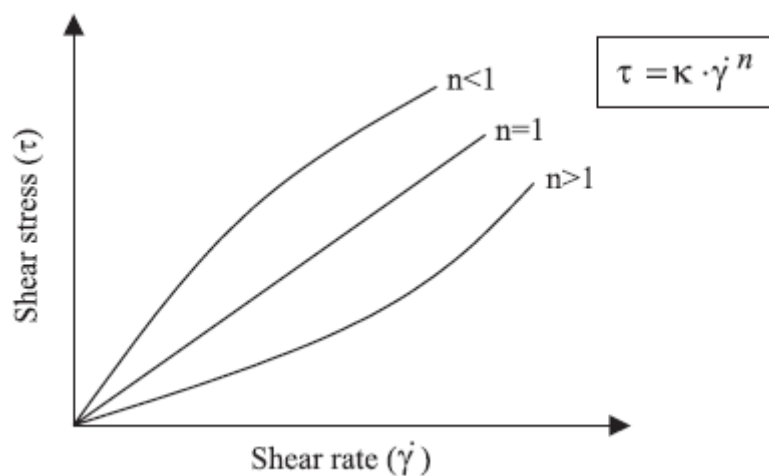


図 1-5 ニュートン流体 ($n=1$) と非ニュートン流体 ($n > 1$ または $n < 1$) におけるシェアレートとシェアストレスの関係 (Papaioannou and Stefanadis, 2005)

生体内の血管では、部位により BF の状態が異なる。BF の速いところと遅いところ、また流れが一定のところと不規則なところが存在する。こうした各所における血管内皮細胞の形態を、病理学的に検討した報告によると、BF が速く一定方向に流れるところでは内皮はやや細長い形になりその長軸は流れの方向と平行に配列している^{28,29)}。一方、血管分岐部など流れの方向が不規則なところでは内皮は類円形で敷石状配列を示している。実験的に内皮の長軸が流れに平行に配列している部分の血管を切除し、長軸が流れと直角になるように移植すると時間の経過とともに長軸が流れに平行になるように再配列する現象が観察されている³⁰⁾。また、内皮細胞に対し培養液を流して一方向的に SS を加えると、不整多角形の内皮細胞は紡錘状に変形するとともに、流れの方向に長軸を一致させて配列する³¹⁾ (図 1-6)。一方、SS がない場合や乱流域に置かれた内皮細胞は、より不整多角形で流れ方向に配列しない。こうした現象は細胞に加わる SS の大きさと作用時間に依存するとされている³²⁻³⁴⁾。また、内皮細胞は SS によって形態を変えると同時に、多数の遺伝子や蛋白の発現を調節していることが明らかになっている^{17,35)}。

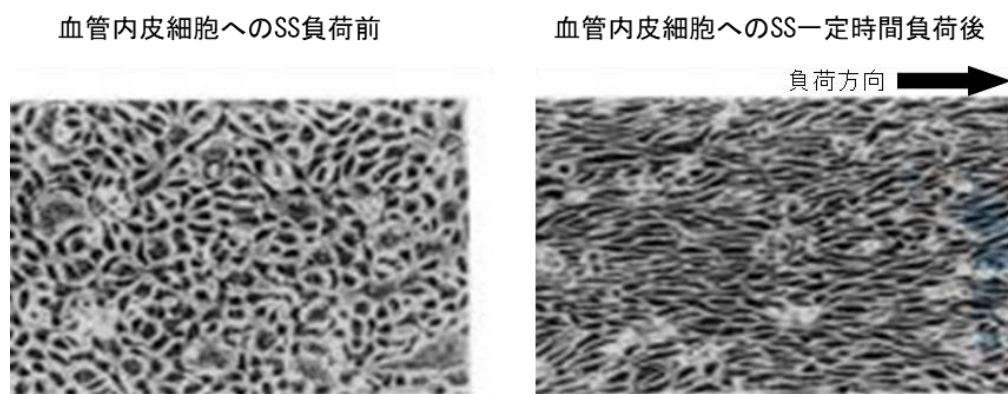


図 1-6 SS による血管内皮細胞の形態変化

血管内皮細胞に SS を一定時間負荷すると形が不整多角形 (左図) から紡錘状 (右図) へと変わり、その流れの方向に対して平行に配列するようになる (Malek らの図²⁷⁾ を改変)。

SS の増大は、細胞を増殖およびアポトーシスを抑制することにより内皮細胞の代謝回転を促進し³⁶⁻³⁸⁾、血管拡張物質や線溶系物質、抗酸化物質の産生増加および遺伝子発現を増大させる^{36,39,40-42)}とともに、血管収縮物質、炎症性メディエーター、酸化ストレス、接着分子などの産生および遺伝子発現を抑制する^{40,43-48)}。つまり、運動により循環系が賦活し、SS 刺激が生じると、ここで述べたような種々の血管内皮機能へのメカニズムを介して、運動による心血管系疾患発症リスク低減の直接的作用となると考えられる。したがって、動脈硬化を中心とした心血管系疾患発症の端緒となる血管内皮細胞の機能低下を運動が防ぐ直接作用が想定されるのであれば、血管内皮細胞の機能性に与える運動の効果を、ヒト対象に検討していく必要がある。そのためには、血管内皮細胞の機能性について、ヒトを対象に適用可能な評価方法が必要となる。そこで、次項では、血管内皮機能の評価法について、特に本研究で採用した方法を中心に説明する。

1-5. 血管内皮機能の評価

血管内皮機能の評価するための方法として、主に臨床研究の領域で、プレチスモグラフィによるBF測定が、古くから用いられてきた。プレチスモグラフィの実際の詳細については、成書⁴⁹⁾を参考にさせていただきたいが、簡単に述べれば、プレチスモグラムを用いて身体部分の容積変化を測定する容積変化記録法である。これまで、臨床で血管内皮機能測定法として用いられているストレインゲージ式プレチスモグラフィは、前腕、下腿といったヒトの四肢を始め、さまざまな部位のBF、あるいはBFの相対的な変化を測定することができるすぐれた方法である。なんらかの人為的な刺激で対象血管に血管拡張が生じれば、結果として流入するBFが増加するので、その増加量の大小で血管内皮機能性の優劣を評価する方法が提案されてきた。プレチスモグラフィを用いた血管内皮機能測定法には、動脈内に直接アセチルコリンといった血管作動性物質を注入してBFの変化を評価する観血的方法と、反応性充血 (reactive hyperemia) による非観血的方法 (この手技は後述) とがあり、共に血管拡

張が生じて BF 量が増加するので、それをプレチスモグラフィで測定する。前者は、血管内皮機能評価としての特異性には優れるが、侵襲的であるために反復して BF 変化を測定する方法としては劣る。後者は、血管内皮機能評価としての特異性ではやや劣るが、非侵襲的であるために反復測定が可能となる。ただし、いずれの方法であっても、プレチスモグラフィ測定には、一定以上の技量と経験が必要である、また数秒に一回毎しか測定できないという時間分解能が低い、といった欠点が存在する。20 年余り前まで、血管内皮機能の測定には上腕動脈 (Brachial artery, BA) を用いたプレチスモグラフィによる侵襲を伴う方法が主体であったの対し、近年では、非侵襲的血管内皮機能検査法として内皮依存性血管拡張反応 (flow-mediated vasodilatation, FMD) が適用されてきている。そこで、FMD の測定・評価法と病態生理学的な背景について概説する。

FMD 法を用いた血管内皮機能検査は、反応性充血前後の BA 血管径の変化を、超音波診断装置を用いて連続的に測定し、血管径の拡張性を直接的に測定する。反応性充血とは、一定時間、BA を阻血し、その後開放すると、前腕の骨格筋および皮膚の微小血管が拡張し前腕 BF 量が一過性に急増する。前項で述べたように、BF 増加による SS が血管内皮細胞へ働くと、血管内皮細胞は、その SS の大きさに応じて、動脈血管を構成している血管平滑筋を弛緩させる物質、いわゆる内皮依存性血管拡張物質を産生、放出し、BA の血管径は拡張する。この生理学的な現象を利用して、血管内皮機能の評価する FMD が Celermajer ら⁵⁰⁾により発案された。反応性充血による BF のインパルス状な増加により、SS が血管内皮に一過性に加わった際に産生される EDRF としては、NO、内皮依存性過分極因子、プロスタサイクリンが報告されている^{6,9)}。BA のような導管血管では、NO が主要な血管拡張物質であり、FMD への貢献度が約 70%前後と報告されている^{20,51)}。FMD は内皮由来 NO 活性を反映した指標であり、内皮機能を中心とした早期血管障害を反映するため、多くの前向き研究で予後予測指標としての FMD の有用性が示されている^{52,53)}。現在、FMD を用いた血管内皮機能検査は、測定の方法・条件等を研究間で統一化するために、国内外でガイドラインの

策定が進みつつある^{49,54-56)}。

FMD 検査による評価方法の具体を説明する。超音波装置を用いて、一般的な測定対象となる BA を描出し、安静時の血管径を測定する。安静時血管径の測定後、動脈血流を完全遮断するため、通常、前腕部へ巻いたカフを収縮期血圧プラス 30～50 mmHg 以上の圧で 5 分間阻血する。5 分後に阻血状態から動脈血流を開放することによって BF の急増（反応性充血）を引き起こし、NO に代表される血管拡張物質が血管内皮細胞から放出され、血管平滑筋に作用することによって開放後ほぼ 60 秒で BA は最大拡張を呈する⁵⁷⁾。この血管拡張率が血管内皮から産生される血管内皮依存性の拡張物質の産生量と相関することを認め、BA の阻血解除後の血管径を正確に測定することで、BA の血管内皮機能性が評価できる。つまり、FMD の評価指標は、安静時血管径に対する最大拡張血管径の比率であり、次式で表される（式 1-4）。

$$\text{式 1-4} \quad \text{FMD}(\%) = \frac{\text{最大拡張血管径} - \text{安静時血管径}}{\text{安静時血管径}} \times 100$$

血管径は血管内腔縁（内腔径）にて決定する。安静時血管径は、カフ加圧前に 1 分間かけて測定する。血管径の決定については 10 心拍以上の測定での平均値を使用する⁵⁸⁾。阻血解放後は速やかに血管径の再測定を開始する。カフ開放により測定部位が安静時の計測位置から外れることがある。安静時径と同じ部位で血管径が測定されていることが望ましく、そのため安静時画像の動脈周辺の画像の特徴を確認しておき、ずれが生じた場合は、そうした画像の特徴を参考に同じ部位で血管径測定が実施されるようにプローブの位置を調節する。一般的に最大拡張血管径は、カフ開放後 60 秒後もしくは反応性充血による最大血流到達の 45～60 秒後に最大になることが多いが、高齢者では最大拡張到達時間が遅く（カフ圧解除後 120 秒以上を要する）なることも報告されている⁵⁹⁾。したがって、血管径は連続的に測定することが望ましく、阻血解除後は、少なくとも 120～180 秒間の計測が必要である。本研究では、この FMD を用いて、血管内皮細胞の機能性を評価することとした。次項では、運動と動脈内皮機能に関する本研究の目的にかかわる具体的な背景について説明する。

1-6. 下肢運動時における非運動肢のシェアストレス応答

ヒトは運動を行うと、活動筋への酸素需要が増加し、その需要に見合った適切なBF再配分が起こる。筋BF量は活動筋の酸素需要に応じて増大する。運動に参画していない組織（非活動筋や内臓、腎、等）のBFは減少することで、活動筋や心臓へのBFの優先配分、ならびに適切な血圧の維持といった役割を担う、といった概念が古くから提唱されてきている⁶⁰⁻⁶³。したがって、運動による抗動脈硬化作用に直接的にかかわる機序を考える上では、運動肢のみならず全身の器官、臓器、組織への動脈血管におけるSS、いいかえるとほぼ同義語なBFの調節がどのようになされているのか、はとても重要な課題となる。上述のように、運動時には、運動を支える活動筋を有する体肢へのBFは、その酸素需要に応じて増加し、これは極めて合理的な応答である^{64,65}。また、抗動脈硬化も含めて健康の維持、増進を目的とした運動は、ウォーキング、ジョギング、サイクリングといった下肢の骨格筋を主に使う運動が推奨される。したがって、運動肢へ至る動脈血管内のBFは増加するので、SSも同様に増大し、その刺激により血管内皮機能が改善する。一方、すでに述べたように、血管内皮の機能性は、一般的に、上肢の前腕部へいたる導管動脈であるBAを対象として評価される。実際、FMDによるBAの血管内皮細胞の機能評価を行った先行研究のほとんどにおいて、歩走行や自転車こぎといった下肢の骨格筋を中心とした運動であっても、%FMDの改善がみられることは、すでに広く認められている^{20,66}。すなわち、抗動脈硬化作用は、運動肢での動脈のみならず、非運動肢の動脈血管内皮細胞に伝播する。では、この機序は、これまで説明してきた直接的な作用、すなわち、BF増加によるSS増大が内皮細胞への刺激となってNOを中心とした血管拡張の機能性を向上する、といった作用と同じものによるのか、あるいは、新たな別な機序が想定されるのであろうか。その意味で、下肢運動時のBAのBF応答は極めて重要となる。

20年余り前までは、すでに上述したように、非活動筋へのBFは、内臓や腎へのBFと同様、低下するというのが一般的なコンセンサスであった。それを示す先行研究では、運動時

間は数分程度の短時間であり、前腕への BF の測定方法はプレチスモグラフィ法によるものであった。しかし、近年、ヒトを対象に、より長い運動時間で、かつ最新の測定手法（超音波パルスドップラー血流測定装置を用いる）を用いた研究結果が蓄積されてくると、下肢による動的運動、いわゆる自転車こぎなどの運動中、非活動組織（例：上肢）への BF（ほぼ SS の動きを反映）は古くから言われていたように減少するのではなく、むしろ増加することが明らかになってきている⁶⁷⁻⁷³。具体的には、一定負荷の下肢自転車運動を継続すると、非運動肢の BA-BF は運動開始直後の 2-5 分あたりで一時的に減少し、その後 10 分程度を経過すると安静時のレベルを上回って BF 量は増加していくといった二相性の応答を示す^{68,71,72}。運動開始直後の BA-BF の減少は、前腕への交感神経の伝達を薬理的遮断すると消失することが報告されていることから、交感神経性の血管収縮反応であることが示唆されている⁷⁴。一方、一定負荷運動継続に伴うその後の BA-BF 増大は、深部体温が上昇して体温調節系が作動することで皮膚血管が拡張し、その BF 増加に起因するものと考えられている⁷⁵⁻⁸⁰。この BA-BF 応答は、運動負荷が高くなると、それに比例した応答であることも確かめられている^{67,73}。したがって現在では、下肢の動的運動時、非運動肢である BA-BF 増大、すなわち BA-SS 増大が、非運動肢である上肢の上腕動脈血管内皮細胞の機能改善をもたらす主要因であることは、すでに関連領域でのコンセンサスになってきている。おそらく、この運動継続に伴う SS の増加が、運動による非運動肢の抗動脈硬化作用の根幹をなしているものと推察される。そこで、次項では、下肢運動時の BA-SS の応答が血管内皮機能に与える急性的な影響について、SS 応答の詳細を加えて、説明する。

1-7. 下肢運動時の上腕動脈シェアストレス応答が血管内皮機能に与える影響

前項で述べたように、動的な自転車こぎ運動が BA の血管内皮機能性に与える恩恵的な効果は、運動による BA-BF の増加とそれに伴う血管に対する SS の上昇に起因する⁸¹⁻⁸³。近年では、SS と血管内皮機能の関連性をヒト生体内で証明するために、急性・慢性の運動以

外にも、電気刺激、カフ圧操作、温冷暴露といった操作方法を用いて、SS を人為的に変容し、血管内皮機能へ与える急性効果を検証する研究が盛んに行われている。平均的な SS 自体の増減に加えて、より詳細なその内容、SS の様相もまた、血管内皮機能へ影響する重要な因子であると考えられるようになりつつある^{20,21,82)}。

そこでまず、SS の様相 (profile) について説明する。冠動脈や BA などの導管動脈の BF パターンは、収縮期に中枢から末梢に向かって流れる順向性血流成分と、拡張初期に末梢から中枢に向かって流れる逆向性血流成分によって特徴付けられ、それぞれ順向 SS および逆向 SS に対応する (図 1-7)。近年、これらの BF パターンに起因する順向 SS および逆向 SS それぞれには、血管内皮機能に対して異なる作用を有することが示唆されている。順向 SS はアテローム性動脈硬化を改善する作用を持つのに対し、逆向 SS はアテローム性動脈硬化を促進させる作用を持つことが、*in vitro*, *in vivo* 共に多くの研究により報告されている^{20,21,82, 84,85)}。ヒトにおける研究では、前腕部や下腿部への温熱刺激などによる一過的な順向 SS の増大は BA や大腿動脈の血管内皮機能を上昇させること^{20,21,84,86)}、逆に、前腕のカフ阻血で一過性的な逆向 SS の増大は BA の血管内皮機能を低下させること^{82,87)} が報告されている。これらの結果から、血管内皮機能を正常に保持あるいは改善させるためには、より詳細な SS 様相として、順向 SS の増大と逆向 SS の減少・消失で特徴づけられる、平均 SS 増大があげられる。すなわち、これまで述べてきた、下肢動的運動中によって BA の内皮機能改善を引き起こす SS の増大とは、順向 SS の増大と逆向 SS の減少・消失による結果であったことになる。実際に、運動時の BA-SS とその様相を詳細に観察した研究^{71,81,83)}によって、それは裏付けられている。

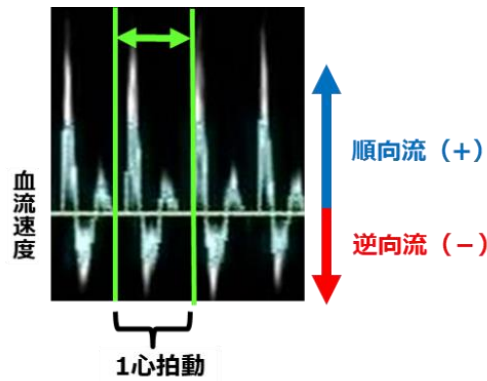


図 1-7 超音波ドップラー法による上腕動脈の血流速度波形

1 心拍動毎の血流の様相は，収縮期に中枢から末梢に向かって流れる順向性血流成分（基線より上）と，拡張初期に末梢から中枢に向かって流れる逆向性血流成分（基線より下）から成る。

先述のとおり，下肢の動的運動（例：自転車こぎ運動）中に肘から先の各組織へ血液供給する BA では，順向 SS 増加と逆向 SS 減少で特徴づけられる様相をもつ平均 SS 増大によって一過性の血管内皮細胞の機能性の改善が惹起される。実学的な観点では，FMD によりその効果は確認されているが，基礎的な視点からは，下肢動的運動による BA-SS 様相がそのように変容する機序，すなわち，BA より先の下流組織の循環応答でどのような変化が起きているか，そのような変容が起きているのかを明らかにする必要がある。そこで，次項では，このことについて，本研究の発端となった先行研究とともに説明する。

1-8. 下肢運動中の上腕動脈のシェアストレス応答の規定要因

1-4 で述べたように，BA の下流域は皮膚と骨格筋に大別される。安静時には，前腕へ流入する血液の約 30%が皮膚に送られており⁸⁸⁾，前腕部の皮膚循環は BA-BF 応答の一部のみを説明することを示している。しかし，下肢自転車運動継続時，前腕部の骨格筋自体への BF は減少することが示されており⁸⁹⁾，軽度から中程度の運動負荷の自転車運動は，前腕への

BF の 75～80%が皮膚循環に向けられるため⁹⁰⁾、BA-BF の増加の主な要因は皮膚血流 (Skin blood flow, SBF) の増加と考えられている。それを巧みな人為的操作で確かめた、最近の興味深い研究がある。Simmons らは、中等度の一定負荷の下肢自転車運動開始後、BA-BF (すなわち BA-SS) は先述の二相性の応答を示し、運動開始から約 15 分程度のちには十分に増加し、その様相は順向 SR の増大と逆向 SR の減少を伴っていたことを示した⁷¹⁾。さらに彼らは、運動遂行中の 30 分目から 10 分間、10°Cの水を循環させる装置を用いて肘から先の全体 (前腕部と手部) を冷やす冷却刺激を行った。そうすると、逆向 SR の増加を伴う平均 SR の低下が生じることを示した。この結果は、下肢自転車運動の継続により非運動肢の BA-BF の増大、すなわち BA-SS の増大が起こること、またその様相は、下流にある流れ込み先として、SBF の関与が大きいことを示唆している。

BA-SS の規定要因として肘から先の SBF が想定され、その増減が非運動肢の抗動脈硬化作用へなんらかの影響を与える可能性があるといえる。BA から血液供給を受ける下流の皮膚組織は、有毛部 (Non-Glabrous, NG) である前腕部・手背部と、無毛部 (Glabrous, G) である手掌部という 2 つの異なる領域があり、それぞれ皮膚血管調節をつかさどる神経支配が違うことが知られている⁹¹⁻⁹³⁾。Simmons らが報告した下肢運動の継続に伴う BA の SR 上昇と、冷却刺激による一過性の低下は、非運動肢での抗動脈硬化作用のメカニズムを明らかにする上では重要な示唆を与えたが、その規定要因が NG 皮膚領域であるのか G 皮膚領域であるのか、あるいはその両者であるのか、については明らかにしていない。さらに、彼らの研究では、冷却刺激については検証したが、逆の操作、温熱刺激による影響について検討はなされていない。温熱刺激自体が、冷却刺激とは逆の作用、すなわち BF および SS を上げて血管内皮機能へ有益な影響を与えることはすでに検証されているが^{20,71,84,94-96)}、冷却刺激の場合と同様で、BA-SS に対して下流の NG と G の両皮膚領域の SBF がどのように関与しているかは、まったくわかっていない。

1-9. 本研究の目的

そこで本研究では、まず Simmons ら⁷¹⁾ が未解明で残した課題に取り組むことを第一の目的とした。すなわち、下肢自転車運動中に肘から先の前腕部と手部への冷却刺激を加えることによって SBF の低下が、BA-SS とその様相へ影響を及ぼしたが、その成因は、下流の皮膚のなかで NG あるいは G 皮膚領域のどちらの SBF による結果であったのかを検討する。具体的には、彼らとほぼ同様な下肢自転車運動中に、手掌部 (G 皮膚領域) のみと前腕部と手部全体 (NG と G の両皮膚領域) それぞれに冷却刺激を行い、SS とその様相 (順向・逆向) にどのような応答が起こるかを検討した。さらに、本研究の新規性として、逆な刺激である温熱刺激も行い、下流の SBF が BA-SS ならびにその様相へどのような影響を与えるかをより包括的に検討することとした。これらを明らかにすることは、運動がもたらす抗動脈硬化の直接的作用のメカニズムをより詳細に理解する一助になるという基礎的な知見を得ることが期待できる。

第一の実験 (実験 I) で得た知見に基づいて応用的、実学的な視点から、第二の実験 (実験 II) を立案した。すなわち、運動中に温冷刺激を前腕部に加えることで、実験 I の結果から予想されるような動脈血管内皮細胞の機能性に変化が起こるかを確かめることとした。具体的には、実験 I と同様な下肢自転車運動中に肘から先の前腕部と手部に温冷刺激を行い、運動のみによる場合と比較して、運動後の FMD にどのような影響が出るのかを検討した。この実学的な検討結果は、抗動脈硬化作用をより効果的に引き出す運動方法の提案へつながる知見を得ることが期待できる。

第 2 章

実験 I 下肢自転車運動中の上腕動脈シェアストレスに対する 前腕部および手部への温冷刺激の影響

第2章 実験Ⅰ 下肢自転車運動中の上腕動脈シェアストレスに対する前腕部および手部への温冷刺激の影響

2-1. 目的

第1章 1-8 で述べたように、運動中の BA-SS 応答には、運動に伴う体温調節系作動による前腕部の皮膚血管における血流調節が関与している可能性が高く、その関与の存在自体は、すでに Simmons らによって報告されている⁷¹⁾。皮膚組織は、NG 皮膚と G 皮膚という2つの異なる血流調節機構を有する皮膚領域に大別される。BA の下流域である肘から先の皮膚は、NG 皮膚領域である前腕部と手背部、ならびに G 皮膚領域である手掌部から構成されている。Simmons らの研究では、運動時に BA-SS 応答に対して、NG と G のどちらの皮膚領域がより大きく関与しているかは明らかにされていない。そこで、実験Ⅰでは、Simmons らの研究で残された課題を明らかにするために、下肢自転車こぎ運動中に、彼らと同様な肘から先の NG と G の両皮膚領域への冷却刺激だけでなく、G 皮膚領域のみへ行う条件を加え、下肢自転車こぎ運動中の BA-SS 応答に対する下流の皮膚血流調節の影響が、主に NG と G のどちらの皮膚領域によって引き起こされているのかを検討することとした。さらに、冷却刺激とは逆な温熱刺激を伴う同様なプロトコルを行い、温冷の両方向の刺激が BA-SS へ及ぼす影響を観察することで、前腕部の皮膚血流と BA-SS の関連性を、より包括的に検討した。

2-2. 方法

2-2-1. 被験者

被験者は、健康な一般成人男女7名（男性3名、女性4名、年齢：23 ± 4 歳、身長：168 ± 9 cm、体重：61 ± 3 kg；平均 ± 標準偏差（mean ± Standard Deviation, mean ± SD））とした。喫煙者、自律神経機能障害、循環器疾患の既往歴がある者、またはそれら疾患の服薬者は被験者から除外した。実験に先立ち、すべての被験者に対して、実験の目的、内容および生じ

うる危険性を口頭および書面にて十分な説明を行い、実験参加の同意を得た。なお、本実験はヘルシンキ宣言を順守して行われ、県立広島大学倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号：18HH001号）。被験者には、実験前日のアルコールおよびカフェインを含有した飲料の摂取、夜更かし、激しい運動を禁止した。また、女性被験者は、性周期の影響を避けるために、卵胞期初期に実験を行った。

2-2-2. 実験プロトコル

本実験の運動負荷を決定するために、セミリカンベント式自転車エルゴメーター（Angio, Lode, The Netherlands）を用いて、半仰臥位の姿勢で漸増負荷運動を行った。具体的には、エルゴメーター上で4分間の安静後、4分間のベースライン運動（10W）を行い、引き続いて、毎分13～17Wずつ運動負荷が増加していく運動を、ペダルの回転数を毎分60回転で維持しながら疲労困憊に至るまで行った。疲労困憊の判断は、自転車エルゴメーターの回転数が50回転を維持できなくなった（下回った）時点とした。得られた各被験者の心拍数・呼気ガス諸変量の測定データを用いて、本実験での運動負荷強度として、運動時の心拍数（Heart rate, HR）が120～130 bpmに相当する強度を算出した。結果として7名の被験者での運動強度は、 76 ± 17 W（mean \pm SD）であった。

本実験当日、被験者は実験開始まで少なくとも3時間は絶食とし、実験日の午後3時頃に実験室を訪問した。被験者は、以下で説明する温冷刺激と、刺激する皮膚部位の両者の組み合わせで設定される4つのプロトコルを、ランダムな順序で、かつ各プロトコル間を少なくとも1週間以上の間隔をあけて行った。実験室内は環境温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $40 \pm 5\%$ に設定した。

本実験の実験プロトコルは、以下のようであった（図2-1）。まずベースラインのデータを測定するために、被験者は実験室内のベッドで仰臥位の安静を30分間保った。その後、被験者は半仰臥位の姿勢に設定された自転車エルゴメーター上で、10分間の安静にした。そ

の後、前述の HR が 120~130 bpm に相当する負荷強度で 60 分間継続する下肢自転車こぎ運動を実施した。自転車エルゴメーターの回転数はプロトコル中を通して、毎分 60 回転になるようメトロノーム音を聞かせることで維持した。被験者は運動開始後 20 分までは、温冷刺激肢である右腕を、恒温水槽の表面を覆った断熱ボード上にリラックスした状態で静置した。運動開始 20 分から 50 分の間に、被験者は右手掌部のみ（無毛部；G），または右腕の前腕部と手部（NG+G）を、冷水（15°C）または温水（42°C）が入った恒温水槽に浸漬することで温冷刺激を行った。したがって、本実験は、冷却刺激あるいは温熱刺激という 2 つの条件と、温冷刺激する皮膚部位が手掌部のみ（G）あるいは前腕部+手部（NG+G）という 2 つの条件の組み合わせで、合計 4 回のプロトコルを行った。

手掌部のみへの刺激の場合、断熱材の一部を外し、恒温水槽内に手掌部のみ浸漬するために、水深が約 5mm になるよう調整し設置した金属製の箱の上に手掌部を置いた。前腕部と手部への刺激の場合には、断熱ボードを全て外し、恒温水槽内に肘から先の全てを浸漬した。恒温水槽内の水温は、攪拌・循環システムを用いて設定温度を維持した（Thermal LOBO TR-S, As One Co., Osaka, Japan）。

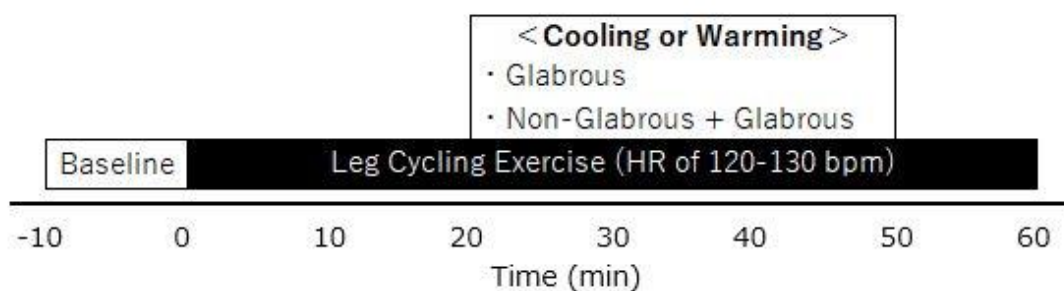


図. 2-1 実験プロトコル

10 分間の安静後、HR120~130 bpm 相当の負荷強度で 60 分間の下肢自転車こぎ運動を実施した。運動開始 20 分から 50 分の間（30 分間）、右手掌部（無毛部（Glabrous; G））のみ、または右腕の前腕部+手部（有毛部+無毛部（Non-Glabrous + Glabrous; NG+G））に対して、15°C の冷水（Cooling）または 42°C の温水（Warming）のいずれかで刺激した。つまり、本実験は、被験者 1 名につき、Cooling と Warming の 2 つの条件と、G と NG+G の 2 つの条件を組み合わせ合わせた合計 4 プロトコルを行った。

2-2-3. 測定項目

HR は、心電図 (DINASCOPE DS8100 System, Fukuda Denshi Co., Tokyo, Japan) を用いてプロトコル中は連続して測定した。収縮期血圧 (Systolic Blood Pressure, SBP) と拡張期血圧 (Diastolic Blood Pressure, DBP) は、水銀血圧計を用いて安静時、および運動中は 5 分ごとにコロトコフ法を用いて測定した。血圧測定は、同じ測定者が被験者の左腕で行った。平均動脈圧 (Mean Arterial Pressure, MAP) は、SBP と DBP の値から算出した (式 2-1)。

$$\text{式 2-1} \quad \text{MAP} = (\text{SBP} - \text{DBP}) \times 1/3 + \text{DBP}$$

SBF は、レーザードップラー血流計 (ALF21; Advance Co., Japan) を 2 台使用して、右上肢の前腕の中央と手掌部の母指球の位置にプローブを装着し、プロトコル中を通して連続的に測定した。事前に、プローブを水中に入れた際の影響の有無を確認するため、まず、空気中で前腕部の皮膚温と SBF を同時に計測し、引き続いて、皮膚温度と同様の水温に前腕部を浸水させ、前腕部の皮膚温と SBF を計測した。空気中と浸水中の SBF は同じ値を示したことから、SBF 測定における浸水の影響はないことが確認された。循環諸変量 (HR と SBF) は、AD 変換デバイスとソフトウェア (CHART : PowerLab, ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA) を使用して 1kHz でデジタルデータに変換して保存され、その後、1 分間隔で平均化した。皮膚血管コンダクタンス (vascular conductance, VC; 血管抵抗の逆数) は、SBF を MAP で除することで算出された。

右腕の BA の血流量は、超音波パルスドップラー法 (PLT-704SBT, Canon Medical Systems, Tochigi, Japan) を使用して、血流速度 (Blood velocity, BV)、および血管径を、プロトコル中に連続測定することで算出された。測定部位は、右上腕の遠位から 3 分の 1 近側の位置での BA とした。プローブは 11 MHz のリニアプローブを使用した。超音波プローブを皮膚表面に留置し、B モードで血管長軸方向のエコー断層像を描画しつつ、同時に PW モードでドップラー法 (プローブから放たれる超音波が血管内に流れる赤血球に反射して生じるドップラー音により血流速度を算出) を用いて血流速度を測定した。血流速度の測定値の信頼性

が担保されるよう、血管に対する超音波ドップラーの入射角度は 60 度以内になるよう設定した。また、BA の血管内径が全て網羅されるように、超音波ドップラーの測定範囲を調節した。B モードエコー画像は、ハードディスクドライブビデオレコーダーを使用してデジタル録画された。血流速度であるドップラーの音声信号は、測定装置内で順向流（心臓から末梢側への流れ）と逆向流（末梢から心臓側への流れ）に分離されているので、その両者の音声信号と、あわせて解析上必要な心電図信号を、AD 変換デバイスとソフトウェア(CHART : PowerLab, ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA)を使用して 20kHz でデジタルデータに変換して保存され、その後の解析に供した。

デジタル録画された BA の断層画像は、毎秒 30 フレームでパソコンにデータ移行し、画像処理汎用ソフト : image-J 内にある自動キャリパー機能を用いて、血管径が算出された。BA の順向流と逆向流の BV（平均 BV = 順向 BV + 逆向 BV）は、当研究室の有する、以下で簡単に説明する解析方法で算出した。方法の詳細は、先行研究に記載されている^{64,97,98}。得られたドップラー音声信号データは、256 ポイント毎に、高速フーリエ変換による周波数解析を行い、血流速度を算出した。算出された速度データは、心電図 RR 間隔から算出された心拍数と併せて、コンピューター内で時系列に 100 Hz で記録されるので、1 心拍毎のデータとして記録された。その後、1 秒毎の順向 BV、逆向 BV、および平均 BV データに変換された。最終的には、BA の BV と血管径は、プロトコル中を通じて 1 分間の平均データとしてまとめられた。BF は、次式によって求めた（式 2-2）。

$$\text{式 2-2 } \text{BF}(\text{ml} / \text{min}) = \text{BV}(\text{cm} / \text{s}) \times [\text{血管径}(\text{cm}) / 2]^2 \times \pi \times 60 \text{ (s)}$$

また、先行研究に従って⁹⁹、シェアストレスの指標である SR は、BV のプロファイル毎（順向、逆向、平均）に、次式によって求めた（式 2-3）。

$$\text{式 2-3 } \text{SR}(\text{s}^{-1}) = \text{BV}(\text{cm}/\text{sec}) / \text{血管径}(\text{cm}) \times 4$$

2-2-4. 統計処理

各測定データは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm Standard Error of the Mean, mean \pm SEM) で示した。測定結果の経時変化の時刻表示は、各 1 分間の範囲の最後の時刻で表示した (たとえば、t = 20 分とは、19~20 分の 1 分間の平均値を示す)。

第一に、温冷刺激 (プロトコル中の 20~50 分間の 30 分間) を行う前の一定負荷運動に対する反応が 4 つのプロトコルの間 (G 皮膚領域への冷却刺激, NG+G 皮膚領域への冷却刺激, G 皮膚領域への温熱刺激, NG+G 皮膚領域への温熱刺激, の合計 4 つ) で同一であるかどうかを確認するために、ベースラインである運動前の安静時を含んで、運動初期 20 分間の全ての測定値の変化を、3 元配置 (因子: 経時時間, 刺激皮膚部位, 温冷刺激) の分散分析を行い、検討した。さらに、運動開始後 20 分以内に諸変量が定常状態に達していたかどうかを確認するために、運動開始から t=15 分と 20 分の両時点の値に対応のある t 検定を行った。第二に、温冷刺激開始直前 (t=20 分) の値と比較して、温冷刺激中 (時間間隔は 15 分) の 30 分間 (運動プロトコルの 20 から 50 分) と回復期 (運動プロトコルの終了時) にどのような変化が生じたかを検討するために、冷却, あるいは温熱刺激条件のそれぞれ別に、2 元配置 (因子: 経時時間, 刺激皮膚部位) の分散分析を行った。因子に有意な効果が検出された場合、時間の場合には温冷刺激直前 (運動開始後 20 分) の値を基準としての変化を Dunnett's test を用いて、刺激皮膚部位間の違いは対応のある t 検定で、それぞれ事後検定を行った。30 分間の温冷刺激によって誘発された手掌部または前腕部の皮膚 VC と平均 SR の変化量 (Δ : 運動プロトコルの 20~50 分の変化量) の関係は、ピアソンの相関係数を用いて分析した。なお、統計的有意水準の判定は 5%未満とし、全ての統計分析は、統計ソフトウェア SPSS PASW 18 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) を使用して行った。

2-3. 結果

2-3-1. 運動開始 20 分までの応答

三元配置分散分析は、運動初期の 20 分間、全ての変数において、有意な時間因子の影響を示した。他の 2 要因については有意な影響が認められなかった。全てのベースライン（運動開始前の安静時）の測定値は、4 つのプロトコル間で同等であった。また、ほぼ全ての測定諸変量において、運動開始後 15 分と 20 分の間で有意差は認められず、運動開始後 20 分の時点までに生体内の状態は、ほぼ定常状態に達したものと判断された（表 2-1）。したがって、本実験では、運動による生理応答が運動開始 20 分目にほぼ定常状態に達したのちに、温冷刺激を課したことになる。

表 2-1 4 プロトコル条件 [温度刺激：冷却刺激 (Cool) および温熱刺激 (Warm), 刺激領域：無毛部 (G) および有毛部+無毛部 (NG + G)] に対する各測定項目のベースラインおよび運動開始から 20 分までの値

			baseline	Leg Cycling Exercise, 120-130 bpm			
				5 min	10 min	15 min	20 min
HR, beats/min	Cool	G	61.5 ± 2.6	114.3 ± 2.6*	117.3 ± 2.9*	119.7 ± 3.2*	120.9 ± 3.1*
		NG + G	62.2 ± 2.2	114.3 ± 2.6*	119.3 ± 2.3*	123.7 ± 4.2*	122.1 ± 2.8*
	Warm	G	63.9 ± 2.1	112.1 ± 2.6*	114.1 ± 2.2*	115.5 ± 2.5*	116.4 ± 2.2*
		NG + G	65.1 ± 3.6	113.6 ± 2.9*	115.6 ± 3.1*	115.7 ± 3.1*	117.9 ± 2.8*
MAP, mmHg	Cool	G	74.9 ± 3.8	91.2 ± 4.1*	89.0 ± 4.7	87.2 ± 3.5	89.5 ± 4.3
		NG + G	77.2 ± 3.7	90.7 ± 5.6	91.0 ± 5.6	88.0 ± 4.9	87.9 ± 4.8
	Warm	G	77.6 ± 2.4	90.1 ± 4.4	84.6 ± 4.2	86.0 ± 3.8	87.0 ± 4.9
		NG + G	78.0 ± 2.9	88.2 ± 4.2	88.4 ± 4.8	86.5 ± 4.1	88.3 ± 4.9
Antegrade SR, s ⁻¹	Cool	G	104.5 ± 14.6	157.1 ± 19.3	209.9 ± 28.6*	211.8 ± 22.4*	220.6 ± 16.5*
		NG + G	126.0 ± 12.4	191.4 ± 31.0	249.5 ± 22.3*	271.1 ± 23.1*	245.2 ± 25.6*
	Warm	G	112.4 ± 13.3	189.9 ± 25.0	218.4 ± 27.1*	245.0 ± 23.4*	243.1 ± 18.2*
		NG + G	104.5 ± 7.5	182.8 ± 19.8*	194.2 ± 21.1*	209.0 ± 12.8*	223.2 ± 15.1*
Retrograde SR, s ⁻¹	Cool	G	-5.6 ± 2.4	-40.7 ± 7.0 *	-24.4 ± 5.3	-28.7 ± 5.5 *	-27.4 ± 5.1*
		NG + G	-5.3 ± 1.8	-39.2 ± 11.7*	-37.7 ± 7.3*	-36.7 ± 6.3*	-37.6 ± 7.0*
	Warm	G	-2.9 ± 1.1	-43.4 ± 10.6*	-41.0 ± 9.7*	-48.9 ± 12.0*	-40.2 ± 10.5*
		NG + G	-6.0 ± 2.2	-44.9 ± 9.7*	-37.0 ± 4.9*	-39.0 ± 6.6*	-35.8 ± 5.5*
Mean SR, s ⁻¹	Cool	G	98.9 ± 14.4	116.3 ± 24.1	185.5 ± 32.4*	183.1 ± 24.9	193.3 ± 17.5*
		NG + G	120.7 ± 13.3	152.2 ± 35.8	211.8 ± 24.0	234.4 ± 25.8*	207.6 ± 29.3
	Warm	G	109.5 ± 13.9	146.4 ± 30.1	177.3 ± 28.7	196.1 ± 28.5	202.9 ± 22.9*
		NG + G	98.6 ± 8.0	138.0 ± 22.8	157.2 ± 20.3	170.0 ± 15.8*	187.3 ± 13.1*
Brachial artery diameter, cm	Cool	G	0.38 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.01
		NG + G	0.38 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.37 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.01
	Warm	G	0.38 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.02
		NG + G	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.02
Palm skin VC, a.u./mmHg	Cool	G	0.27 ± 0.03	0.21 ± 0.04	0.32 ± 0.07	0.29 ± 0.05	0.28 ± 0.05
		NG + G	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.31 ± 0.03
	Warm	G	0.23 ± 0.04	0.26 ± 0.06	0.34 ± 0.07	0.30 ± 0.06	0.30 ± 0.07
		NG + G	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.27 ± 0.04	0.26 ± 0.05
Forearm skin VC, a.u./mmHg	Cool	G	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.02*	0.13 ± 0.02*	0.13 ± 0.02*
		NG + G	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.02*	0.13 ± 0.02*
	Warm	G	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.03*
		NG + G	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.02*	0.13 ± 0.02*

値は、平均 ± 標準誤差で示した。*：各条件でのベースラインとの比較 (P<0.05)

2-3-2. 冷却刺激条件における上腕動脈と皮膚循環の応答

冷却刺激中 30 分間の BA の順向 SR, 逆向 SR, 平均 SR, および血管径に対する刺激皮膚部位の因子の主効果 (NG + G vs. G) が, 二元配置分散分析の結果から明らかになった (図 2-2)。 NG + G 皮膚領域 (前腕部と手部) への冷却刺激により, BA の順向 SR および平均 SR は, 冷却刺激の直前 (t=20 分) と比較して, 刺激中は一貫して大幅に減少した (図 2-2 a, c)。 BA の逆向 SR の値も t = 50 分で有意に増加した。対照的に, G 領域 (手掌部のみ) への冷却刺激では, BA の順向 SR, 逆向 SR, 平均 SR に有意な経時的な変化はなかったが, t=50 分でのみ両刺激皮膚部位間で有意差が認められた (図 2-2 a-c)。 BA の血管径には経時変化がみられなかった (図 2-2 d)。

二元配置分散分析の結果は, 運動中の前腕部皮膚 VC に対する刺激皮膚部位の主効果 (NG + G vs. G) を示したが, 手掌部皮膚 VC では認められなかった (図 2-2 e, f)。手掌部 VC は, NG + G と G の皮膚領域の両方で, 冷却刺激直前 (t = 20 分) と比較して, 刺激中は有意な減少を示した (図 2-2 e)。対照的に, 前腕部皮膚 VC は NG + G 皮膚領域への刺激でのみ有意に減少した (図 2-2 f)。

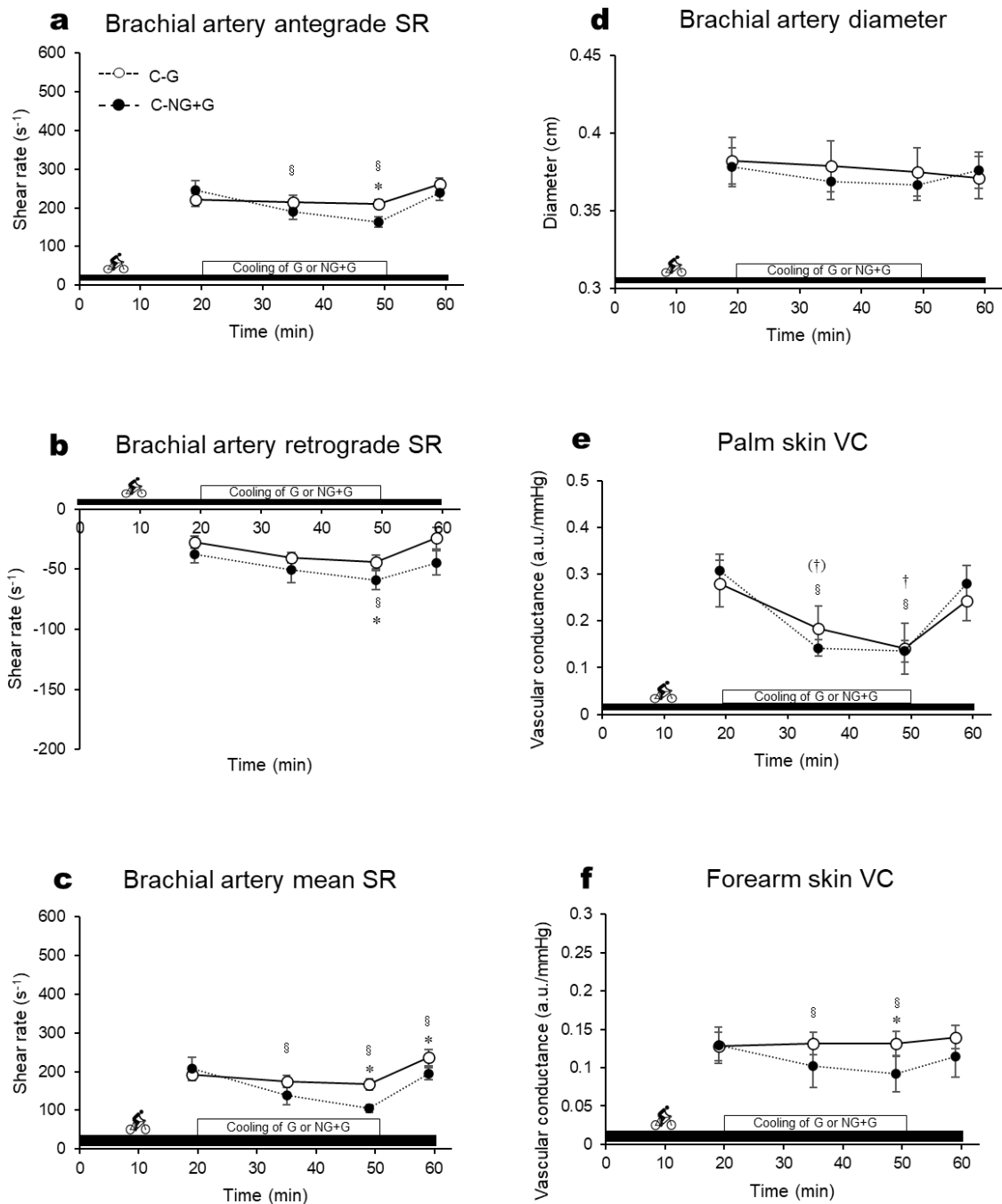


図 2-2 無毛部皮膚領域のみ (G), または無毛部および有毛部皮膚領域 (NG + G) への冷却刺激を伴う (自転車運動開始 20~50 分), 60 分間の運動プロトコル中における上腕動脈の SR (a: 順向, b: 逆向, c: 平均) と直径 (d), 皮膚 VC (e: 手掌部, f: 前腕部) の経時的な変化 (t=20 とは, 冷却刺激直前を示す。値は, 平均 ± 標準誤差で示した。§: NG+G 皮膚領域への刺激における 20 分時点との比較 (P<0.05), †: G 皮膚領域のみへの刺激における 20 分時点との比較 (P<0.05), *: G 皮膚領域のみと NG+G 皮膚領域への刺激間の比較 (P<0.05)。

2-3-3. 温熱刺激条件における上腕動脈と皮膚循環の応答

温熱刺激中の BA の順向 SR, 逆向 SR, 平均 SR, および血管径に対する刺激部位の主効果 (NG + G vs. G) が, 二元配置分散分析の結果から明らかになった (図 2-3)。全体を通して, BA の順向 SR (図 2-3 a), 平均 SR (図 2-3 c), および血管径 (図 2-3 d) の応答は類似した経時変化を示した。NG + G 皮膚領域 (前腕部と手部) への温熱刺激により, BA の順向 SR および平均 SR と血管径は, 温熱刺激の直前 (t = 20 分) と比較して, 刺激中は一貫して有意な増加を示した。BA の逆向 SR も大幅に減少した (図 2-3 b)。対照的に, G 領域 (手掌部のみ) への温熱刺激では, 明確な変化はみられなかったが, t = 50 分で BA の順向および平均 SR がいくらか増加し, 逆向 SR が減少した。これらの結果から, G 領域への刺激に対する応答と比較して, NG + G 領域への刺激に対する応答が大幅に大きくなったことが明らかになった (図 2 a-c)。BA の血管径は, BA の平均 SR と同様な変化を示した (図 2-3 d)。

二元配置分散分析の結果は, 運動中の前腕部 VC 応答における皮膚刺激部位の主効果 (NG + G vs. G) を示したが, 手掌部皮膚 VC では認められなかった (図 2-3 e, f)。手掌部 VC は, NG + G と G の皮膚刺激の両方で, 温熱刺激直前 (t = 20 分) と比較して, 刺激中に有意な変化を示さなかった (図 2-3 e)。対照的に, 前腕部皮膚 VC は NG + G 領域への刺激でのみ有意に増加した (図 2-3 f)。

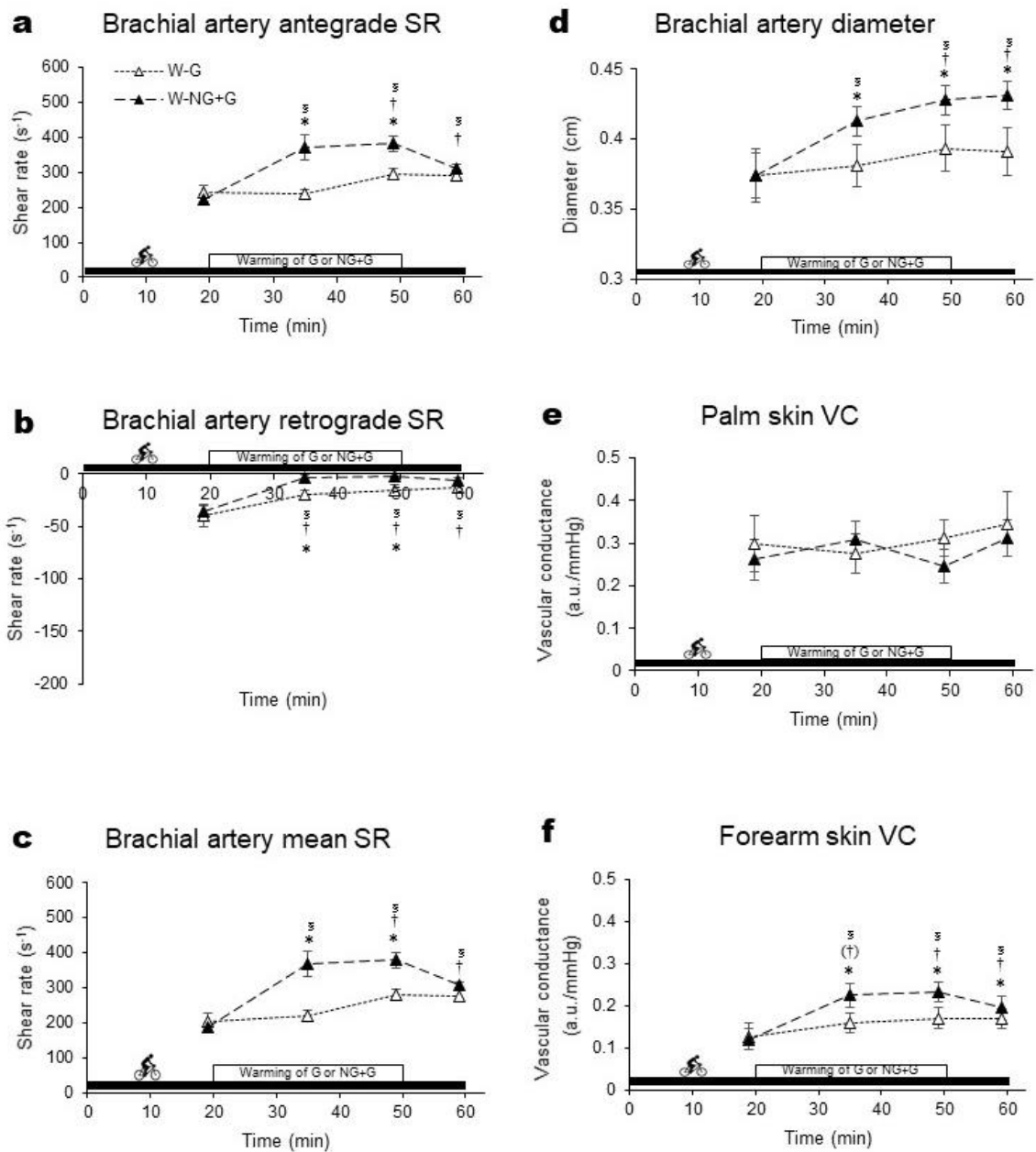


図 2-3 無毛部皮膚領域のみ (G), または無毛部および有毛部皮膚領域 (NG + G) への温熱刺激を伴う (自転車運動開始 20~50 分), 60 分間の運動プロトコル中における上腕動脈の SR (a: 順向, b: 逆向, c: 平均) と直径 (d), 皮膚 VC (e: 手掌部, f: 前腕部) の経時的な変化
 t=20 のデータは, 温熱刺激直前を意味する。値は, 平均 ± 標準誤差で示した。§: NG+G 皮膚領域への刺激における 20 分時点との比較 (P < 0.05), †: G 皮膚領域のみへの刺激における 20 分時点との比較 (P < 0.05), *: G 皮膚領域のみと NG+G 皮膚領域への刺激間の比較。 (P < 0.05)

2-3-4. 温冷刺激による皮膚血管コンダクタンス平均シェアレートとの間の変化量の相関

NG+G と G 皮膚領域における, 30 分間の冷却または温熱刺激による前腕部皮膚 VC の変化量は, その間の平均 SR の変化量と有意な正の相関を示した (冷却刺激: $r=0.494$; $P=0.072$, 温熱刺激: $r=0.767$; $P<0.05$, 図 2-4 b, d)。しかし, 手掌部皮膚 VC の変化量との間には, そのような相関関係は全く認められなかった (冷却刺激: $r=0.140$, 温熱刺激: $r=0.097$; $P>0.1$) (図 2-4 a, c)。これらの結果は, 上流の BA の SR が前腕部皮膚 VC とのみ関連していたことを示している。

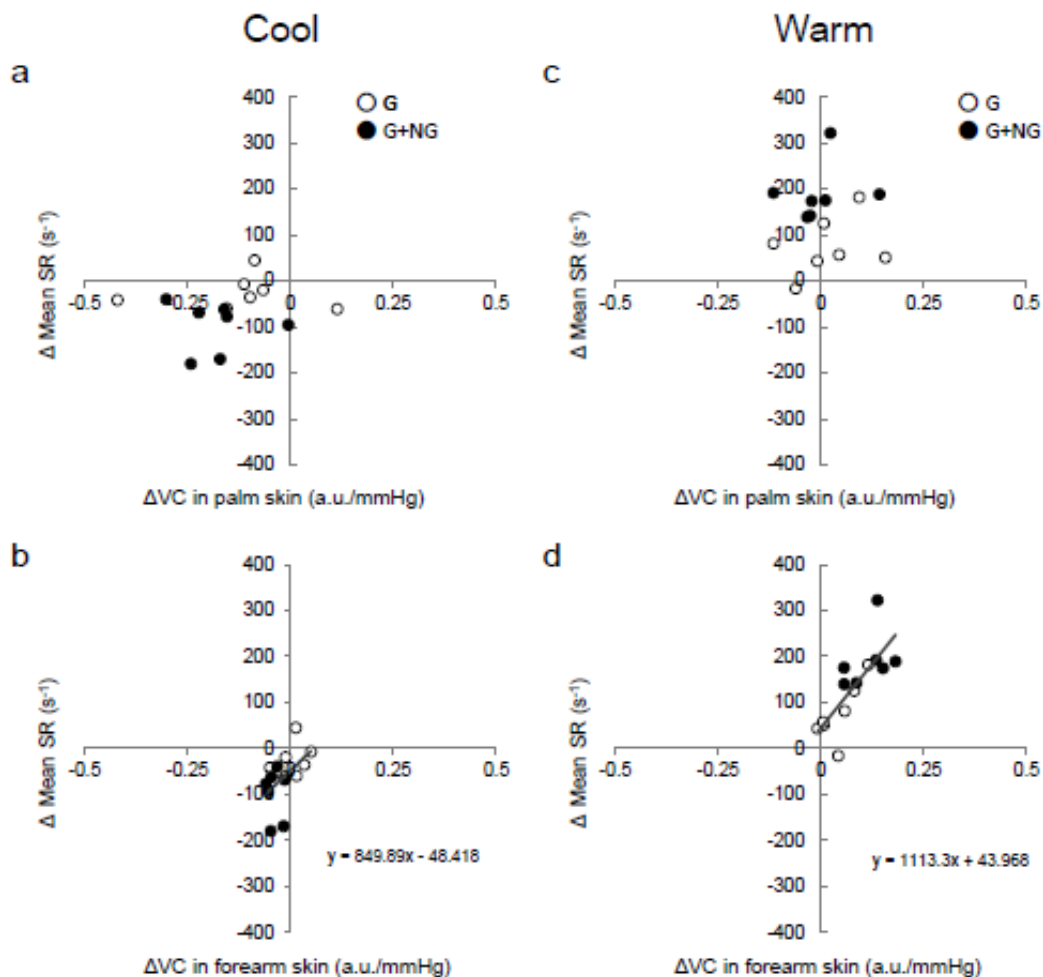


図 2-4 30 分間の温冷刺激による手掌部または前腕部皮膚 VC と SR の変化量の関係
 Δ : 運動プロトコルの開始 20 分から 50 分までの変化量

2-4. 考察

本実験から、以下のような知見が得られた。運動中に NG + G 皮膚領域への冷却刺激を行うと、BA の平均 SR が、刺激直前 (t=20 分) と比較して、有意な減少を示し、それは順向 SR の減少と逆向 SR の増加に起因していた。一方、G 皮膚領域のみへの刺激の場合には、変化が生じなかった。NG + G 皮膚領域への温熱刺激を行うと、冷却刺激の場合とは反対の結果、すなわち、順向 SR の増加、逆向 SR の減少を伴う平均 SR の有意な増加を引き起こした。対照的に、G 皮膚領域のみへの刺激の場合には、目立った変化は見られなかった。また、冷却あるいは温熱刺激によって誘発された平均 SR の変化量は、NG + G 皮膚領域への温冷刺激の場合、前腕部皮膚 VC の変化量と相関していたが、G 皮膚領域のみへの刺激については、そのような関連性は認められなかった。

BA の主要な流れ込み先である皮膚は、有毛部 (NG 皮膚領域：前腕と手背部) と無毛部 (G 皮膚領域：手掌部) から構成される。有毛部の皮膚血管の反射性調節機構は、2 つの交感神経系の経路、ノルアドレナリン作動性血管収縮システムとコリン作動性血管拡張システムによって行われている。一方、無毛部では、ノルアドレナリン作動性血管収縮システムのみによって調節されている^{92,93}。これまでのヒトを対象とした研究において、NG 領域の SBF は運動の継続による体温上昇に伴って増加し、主要な熱放散反応の 1 つであるコリン作動性血管拡張の結果であることが示されている⁷⁵⁻⁸⁰。本実験でも、NG 皮膚領域である前腕部の VC 応答は運動の継続とともに増加し、血管拡張システムにより運動開始から約 20 分後に、その応答はほぼ定常状態に達した。このような熱放散反応が一定になった状態で一定負荷運動を継続中に、本実験では、目的とする冷却あるいは温熱刺激を 30 分間行った。

Simmons らの先行研究によって、一定負荷運動中に、肘から先の遠位部全体を冷却刺激すると、その上流の BA の SR 様相は、順向 SR の減少と逆向 SR の増加を伴う平均 SR の有意な減少を引き起こすことが明らかにされている⁷¹。しかし、BA における SR の様相の変容に下流組織である NG と G のどちらの皮膚が関与するのかわかりませんでした。

た。そこで本実験ではその点を明らかにするために、彼らの研究と同様な操作、肘から遠位の有毛部と無毛部の皮膚領域、すなわち前腕部と手部を冷却刺激するだけでなく、無毛部である手掌部のみへの冷却刺激を行うプロトコルを設定した。このプロトコルを加えたことで、下肢自転車運動中の BA の SR に対する 2 つの異なる皮膚血管調節（すなわち、NG および G 領域）の役割を明らかにすることが可能となった。G 領域のみへの冷却刺激により、手掌部 VC が減少したが、他の諸変量に大きな変化はなかった。つまり、手掌部（G 領域）への冷却刺激は、上流の BA 領域の VC と SR に意味のある影響を与えない可能性がうかがえる。対照的に、肘の遠位の皮膚領域全体（NG および G 領域）への冷却刺激は、前腕部と手掌部両方の皮膚 VC を減少させるとともに、BA の SR の有意な減少を引き起こし、それは順向 SR の減少と逆向 SR の増加を伴っていた。これらの反応は、Simmons らの研究結果⁷¹⁾とほぼ一致したものであった。本実験の結果は、長時間の下肢自転車運動中、肘から先の遠位部全体への一時的な冷却刺激による BA の SR 様相の変容は、主に NG の皮膚 VC の応答に起因していることを明示している。言い換えると、下肢自転車運動時に生じる BA における SR 様相の変化は（BA の順向 SR の増加と逆向 SR の減少＝抗動脈硬化作用を呈す）、主に、熱放散反応によって生じる BA 下流の広い NG の VC 応答に由来していることを意味する。

BA の主要な血流の流れ込み先には、皮膚に加えて骨格筋が挙げられる。骨格筋へ血液を供給する動脈血管系は、筋交感神経活動によって制御されることはすでによく知られている（例えば、Macefield ら、石田らは脚の一部を局所的に冷却すると、全身性の変化にかかわらず、腓骨神経の筋交感神経活動（muscle sympathetic nerve activity, MSNA）が有意に増加したことを報告した^{100,101)}）。Padilla らは、安静時に段階的な下半身陰圧負荷（lower body negative pressure, LBNP）を暴露し、MSNA を増加させると、順向 SR の減少と逆向 SR の増加を引き起こしたことを報告している¹⁰²⁾。これらの知見は、局所的な筋を中心とした冷却刺激が、MSNA の反射的な増加を介して、運動に参加していない骨格筋群の血管収縮を誘発する可能性を示唆している。したがって、本実験では、冷却刺激操作が MSNA を局所的

に活性化し、冷却部位周囲の骨格筋で血管収縮反応が生じた結果、上流の BA-SR が減少した可能性がある。

本実験は、下肢自転車運動中に肘から先の 2 つの異なる皮膚領域へ温熱刺激を人為的に課すことで生じる BA-SR 様相を観察した最初の研究である。下肢自転車運動中に肘から遠位の皮膚領域全体 (NG および G 領域) に温熱刺激を行うと、手掌部 VC は変化しなかったが、前腕部 VC が著しく増加した。加えて、BA の平均 SR が増加し、それは順向 SR の増加と逆向 SR の減少を伴っていた。これらの応答は、冷却刺激時の応答と対照的な結果であった。ほぼ定常状態に達した運動継続中に、肘から遠位の皮膚への局所的な温熱刺激は、おそらく刺激部位の皮膚温度をさらに上昇させ、NG 皮膚領域の血管拡張を伴う SBF が増加したものであると思われる。そのことが、上流の BA における順向 SR の増加と逆向 SR の減少をもたらした (=平均 SR の増加)。一方、手掌部のみを温めた場合、手掌部 VC には有意な変化はなかった。この結果は、G 皮膚領域に利用できる血管拡張システムがないことに起因している^{92,93)}。より詳細に観察すると、前腕部 VC、平均および順向 SR はわずかに増加し、逆向 SR はわずかに減少したが、これらの変化は小さいものでしかなかった。つまり、手掌部皮膚への限定的な加温操作は、加温された静脈還流や未知のメカニズムによって、BA-SR 様相の変容に影響を及ぼす可能性は残るが、実際には極めて限られたものである。したがって、長時間の一定負荷運動時に観察される BA-SR 応答は、冷却刺激により得られた本実験の結果と同様に、温熱刺激においても主に NG 皮膚領域の VC が関与していることが示された。

運動中の NG 皮膚領域への温熱刺激による BA-SR の増加は、冷却刺激同様、骨格筋 VC の上昇によって引き起こされる可能性が挙げられる。Takahashi らは、下腿部を局所的に加温すると、HR や BP といった中心循環が不変であるにもかかわらず、腓骨神経の MSNA が減少することを報告した¹⁰³⁾。Thijssen らは、LBNP 下での MSNA 活性化による BA の逆向 SR の増加は、前腕部への局所的加温によって消失したことを示した⁹¹⁾。また、局所的な温熱刺激による BA-SR 様相の変容には、NG 領域での皮膚 VC の増加に加えて、収縮してい

ない骨格筋 VC の増加に起因する可能性がある。しかし、第 1 章の 1-6 で述べたように、長時間の自転車運動は、上流の BA-BF に対して、非運動肢である前腕部の骨格筋の BF の寄与を減らし、皮膚 BF の役割を高めているので^{75-79,90)}、BA-SR への骨格筋 VC の寄与は小さく、運動中に熱放散反応をつかさどる NG 領域の皮膚 VC がその役割の大部分を占めていると考えられる。以上のことから、運動による血管内皮機能適応をより効果的に導くための方法として、NG 領域（G 領域の手掌部ではなく）である前腕部への温熱刺激が有用であることを示唆している。

本実験の結果は、前腕部の NG 領域の皮膚血管反応が下肢自転車運動中の BA-SR 様相の調節において主要な役割を果たすことを示しているが、以下の問題点が指摘される可能性がある。それは、本実験での操作である、肘から先の前腕部と手部を、その機能性の違いをみるために、NG 皮膚領域（前腕部と手背部）と G 皮膚領域（手掌部）に分けて冷却、温熱刺激をそれぞれ課したが、その刺激皮膚の表面積に大きな差異がある点である。前者である NG+G 条件の刺激面積は明らかに G 条件よりも広い。したがって、両皮膚刺激条件間では、皮膚の機能性の違いに加え、面積依存性の異なった温度刺激を中枢にも末梢にも与えているので、おそらく中枢体温や末梢性の温熱反射に影響していると想定される。このことは、冷却刺激であれ温熱刺激であれ、G 条件（無毛部のみへ）の温冷刺激での手掌部皮膚 VC 応答の大きさは、より広い面積での NG+G 条件の反応よりも小さいはずであるという結果が想定される。本実験の結果は、前腕部の皮膚 VC には、確かにそのような面積依存性の反応の違いが生じていたが（図 2-2 f と 2-3 f）、手掌部の皮膚 VC において、そのような違いは認められなかった（図 2-2 e と 2-3 e）。この結果は、まだ解明されるべきメカニズムの存在を示唆するとともに、上流の BA-SR への NG 皮膚循環調節の意味ある役割があることを示している。したがって、今後、類似の面積にそろえた NG ならびに G 皮膚領域それぞれへの単独刺激と同時刺激、また、刺激温度条件にニュートラル条件を加えるなどといった研究を行っていく必要があると考えられる。

第3章

実験Ⅱ 下肢自転車運動時における前腕部および手部への
温冷刺激が血管内皮機能に与える効果

第 3 章 実験II 下肢自転車運動時における前腕部および手部への温冷刺激が血管内皮機能に与える効果

3-1. 目的

実験Iにおいて、下肢自転車運動中の上腕動脈シェアレート (BA-SR) の応答は、BA の下流域に存在する無毛部の皮膚 (手掌部) 循環応答とは関連せず、NG の皮膚 (前腕部) 循環応答と有意に関連した。このことから、下肢自転車運動時の BA-SR 応答は、主に NG 皮膚循環応答に起因していることが明らかとなった。これらの結果をさらに具体的に説明すると、60 分間の中等度の一定負荷自転車こぎ運動中の 20~50 分にかけての 30 分間、前腕部と手部へ温冷刺激を加えると、BA-SR の応答は、前腕部の皮膚 VC の応答と有意な関連を示した。この時の SR 様相を詳しく観察すると、冷却刺激では、順向 SR の減少、逆向 SR の増加がみられ、催動脈硬化作用を惹起する SR 様相へと変容した。一方、温熱刺激を加えた場合には、冷却刺激とは逆な SR 様相を呈した。したがって、次に検討すべきことは、下肢自転車運動時に BA-SR 様相に変化を与えることが可能な人為的操作、すなわち前腕部と手部へ温冷刺激による BA-SR 様相の変化が、果たして BA の血管内皮機能に、想定されるような影響を与えるのか、という点である。そこで、実験 II では、下肢自転車運動中、肘から先全体に冷却あるいは温熱刺激を行い、BA の下流域である皮膚循環応答を人為的に調節して、その結果として生じる BA-SR とその様相の変容が、BA の血管内皮機能 (FMD) にどのような影響を及ぼすのか、について検討した。

3-2. 方法

3-2-1. 被験者

被験者は、健康で正常血圧の一般成人男女 12 名 (男性 3 名、女性 9 名、年齢 : 21 ± 3 歳、身長 : 162 ± 8 cm、体重 : 56 ± 5 kg ; Mean \pm SD) とした。サンプルサイズは、先行研究に従って決定した¹⁰⁴⁾。喫煙者、自律神経機能障害、循環器疾患、脂質異常症の既往歴がある者、またはそれら疾患の服薬者は除外した。実験に先立ち、すべての被験者に対して、実験の目

的、内容および生じうる危険性を口頭および書面にて十分な説明を行い、実験参加の同意を得た。なお、本実験はヘルシンキ宣言を順守して行われ、県立広島大学倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号：18HH001号）。被験者には、実験前日のアルコールおよびカフェインを含有した飲料の摂取、夜更かし、激しい運動を禁止した。また、性周期の影響を避けるために、女性被験者は卵胞期初期に実験を行った。

3-2-2. 実験プロトコル

本実験の運動負荷を決定するために、事前に、セミリカンベント式自転車エルゴメーター（Angio, Lode, The Netherlands）を用いて、2-2-2で記述した手順で、各被験者に対して漸増負荷運動テストを実施した。得られた各被験者の拍数・呼気ガス諸変量の測定データを用い、本実験での運動負荷強度として、運動時のHRが120～130 bpmに相当する強度を算出した。結果として12名の被験者での運動強度は、 71 ± 19 W（mean \pm SD）であった。

本実験当日、被験者は実験開始まで少なくとも3時間は絶食とし、実験日の午後3時頃に実験室を訪問した。被験者は、以下で説明する3つの条件を、ランダムな順序で、かつ各プロトコル間を少なくとも1週間以上の間隔をあけて行った。実験室内は環境温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $40 \pm 5\%$ であった。

本実験の実験プロトコルは、対照条件（温冷刺激を伴わない運動）、冷却刺激条件（冷却刺激を伴った運動）、温熱刺激条件（温熱刺激を伴った運動）の合計3つのプロトコルを行った（図3-1）。まず、ベースライン時の全ての測定項目データを測定するために、被験者はベッド上で30分間の仰臥位安静を保った。その後、被験者は半仰臥位の姿勢に設定された自転車エルゴメーターへ移動し、5分間の安静を保った後、HRが120～130 bpmに相当する負荷強度で60分間継続する下肢自転車こぎ運動を実施した。自転車エルゴメーターの回転数はプロトコル中を通して、毎分60回転になるようメトロノーム音を聞かせることで維持した。冷却刺激条件、温熱刺激条件においては、運動開始と同時に、被験者は右の肘から先

全体を、冷水（15℃）または温水（42℃）が入った恒温水槽に浸漬し、温冷刺激を 60 分間行った。その方法は、実験 1 の 2-2-2 に記載した方法と同じである。自転車運動後、被験者は速やかにベッドへ移動し、仰臥位で 60 分間の安静を保った。



図 3-1. 実験プロトコル

30 分間の安静後、HR120~130 bpm 相当の負荷強度で 60 分間の下肢自転車こぎ運動を実施した。運動単独と、運動開始とともに前腕に冷水（15℃）または温水（42℃）による温冷刺激を行う 3 条件とした。

3-2-3. 測定項目

本実験中に測定した、HR、MAP、SBF、BA-BV と血管径、またそれから算出される BA-BF と BA-SR（平均 SR、順向 SR、逆向 SR）については、2-2-3 で記述した方法を用いた。加えて、振動せん断指数（oscillatory shear index, OSI）を以下の式で算出した（式 3-1）¹⁰⁵⁾。

$$\text{式 3-1 } \text{OSI} = \text{逆向 SR} / (\text{順向 SR} + \text{逆向 SR})$$

OSI は、SR の順向、逆向の振動性の大きさを表すもので、OSI が増大するような SR 様相は内皮機能障害を惹起することが知られている¹⁰⁶⁾。さらに、平均、順向、逆向の各 SR および OSI の応答の上昇曲線下面積（incremental area under the curve, iAUC）を、運動開始から運動終了後 5 分（t=0 から t=65 分）まで、ならびに運動開始からプロトコル終了（t=0 から t=105 分）までの 2 つの期間において、ベースライン値を超える面積として算出した。

血管内皮機能は、第 1 章 1-5 で述べた FMD 法により評価した。FMD の測定には、その測定に特化した医療機器である専用測定装置（UNEXEF18G; UNEX Co., Nagoya, Japan）を用いた。実験者（M）は本実験を開始する 3 か月前に測定熟練者による指導を受け、延べ 100 例以上の測定経験を経て、その技術を習得した¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾。このシステムを使用した FMD 測定の再現性は、すでに 3 つの先行研究で検討されおり、その変動係数は平均 11.2%¹¹⁰⁾、10.1%¹¹¹⁾、および 4.5%¹¹²⁾ である。

FMD は、図 3-1 に示したように、ベースライン（t=-15 分）、運動終了後 15 分（t=75 分）ならびに 60 分（t=120 分）に、仰臥位の被験者を対象に測定した。測定に使用したシステムには、すでに公表されている手順^{49,54-56)} が半自動的に行えるように組み込まれていた。被験者は仰臥位で、対象となる上腕動脈となる右腕を、水平面上でほぼ真横にリラックスした状態で伸ばした。その前腕部の肘から少し先の位置に専用の加圧用カフを装着した。肘から近位側、5~10 cm の範囲に FMD 測定装置の超音波プローブをセットした。実験者がマニュアルで最も鮮明な BA の長軸横断面画像が得られるプローブ位置をみつけてセットすると、あとは測定システムとして、プローブ位置制御装置が血管を自動追尾しながら、血管径

を連続的に自動計測できる装置である。測定中の1心周期中の血管径の微細な変化は、リアルタイムで装置の画面上に表示された。測定を開始すると、まずカフ加圧前の30秒間のベースライン血管径が自動計測された（ベースライン径）。その後、カフは被験者の収縮期血圧に50mmHg加えた圧に自動加圧された。そのまま駆血が5分経過後、カフ圧が解除されると、一過性でインパルス状な血流の流れ込みの急増が起こり（反応性充血、詳細は1章1-5を参照）、そのSSが刺激となって血管は拡張する。自動血管追尾システムで、カフ圧解除後2分間の血管径の時系列変化が装置内で記録され、血管が最大拡張したタイミングとその値（ピーク径）が求められた。FMDは、基準的な評価指標、%FMDとして、以下の式で算出された（式3-2）。

$$\text{式 3-2} \quad \%FMD = ([\text{ピーク直径} - \text{ベースライン直径}] / \text{ベースライン直径}) \times 100$$

さらに、被験者間に存在する上腕動脈ベースライン径の個体差を補正するために提案されている統計的な手法（allometric scaling 法¹¹³⁾）を%FMDに適用し、その補正後の値を、adjusted %FMDとした。なお、BA-SSの指標である、平均SR（順向SR+逆向SR）は、FMD測定を行っていないプロトコル中に連続して、同じ位置で、第2章の方法で述べた超音波ドップラー法で測定した。

3-2-4. 統計処理

各測定項目は平均値±標準偏差で示した。すべての測定値に対する時間と条件の影響は、2元配置分散分析を用いて検定した。有意な効果が検出されたとき、時間の主効果についてDunnett's testを、試行間の主効果についてはTukey's testを用いて事後検定を行った。ベースラインの%FMDから運動終了後の%FMDの変化（ $\Delta\%FMD$ ）と、運動終了後5分まで、およびプロトコル終了時点までの順向SR、逆向SR、平均SR、OSIのiAUCとの関連性については、ピアソンの相関係数（Pearson's correlation coefficient）を用いて検定した。有意水準の判定は危険率5%未満とした。すべての統計分析は、統計ソフトウェアSPSS PASW 18（SPSS

Inc., Chicago, Illinois) を使用して行った。

3-3. 結果

3-3-1. 中心循環応答（心拍数，血圧）ならびに皮膚血流応答

HR と MAP の運動開始前によるベースライン値は，3 つの条件の間で有意差はなかった。すべての条件で，HR は運動中と運動後 5 分まで，ベースラインと比較して有意に増加した（図 3-2 A）。条件間では，温熱刺激条件の HR よりも冷却刺激条件の方が低かった。また，運動中の 20～60 分で，対照条件よりも温熱刺激条件の HR が高かった。すべての条件で，MAP はベースラインから運動後 5 分に増加した。ただし，条件間で有意差はなかった。

手掌部と前腕部の SBF のベースライン値は，3 つのプロトコル条件の間で有意差はなかった。手掌部 SBF 応答は，対照条件で，ベースラインに対して運動中の 50～60 分に有意に増加した（図 3-2 B）。冷却刺激条件で，ベースラインに対して運動中および運動後 30，45 分で有意に減少した。温熱刺激条件で，ベースラインに対して，運動中および運動後 5，30 分で有意に増加した。条件間の比較では，運動中および運動後にかけて，冷却刺激条件の手掌部 SBF は，対照条件および温熱刺激条件の値よりも低かった。さらに，運動中の 30 分の時点で，対照条件よりも温熱刺激条件の手掌部 SBF が有意に高かった。

前腕部 SBF 応答は，対照条件で，ベースラインに対して運動中の 20～60 分で有意に増加した（図 3-2 C）。冷却刺激条件で，ベースラインに対して，運動中および運動後を通して変化はなかった。温熱刺激条件で，ベースラインに対して，運動中および運動後 5，30 分で有意に増加した。条件間の比較では，運動中の 30～60 分，および運動後の 30 分と 45 分で，対照条件よりも冷却刺激条件の前腕部 SBF が低く，運動中と運動後を通して，温熱刺激条件よりも冷却刺激条件の方が低かった。また，運動中を通して，対照条件よりも温熱刺激条件の前腕部 SBF が高かった。

3-3-2. 上腕動脈のシェアストレス様相および血管応答（血管径，シェアストレスの様相，
ならびに OSI）

BA の血管径，SS の様相（順向 SR，逆向 SR，平均 SR），および OSI のベースライン値は，3 つの条件間で有意差はなかった。BA の血管径は，ベースラインに対して，対照条件では運動開始 50～60 分で拡張，温熱刺激条件では運動中から運動終了後にかけて有意に拡大したのに対し，冷却刺激条件では運動後半から終了後にかけて有意な収縮がみられた（図 3-3 D）。さらに，条件間の比較では，運動開始 30～60 分および運動後 5 分で，3 条件の間に有意差が認められた。すなわち，冷却刺激の血管径よりも対照条件が有意に大きく，さらに温熱刺激条件が対照条件よりも大きかった。

BA の順向 SR 応答は，ベースラインに対して，対照条件では，運動開始 10～60 分および運動後 5 分で有意な増加を，冷却刺激条件では，運動前と運動後 30 分および 45 分で有意な減少を，温熱刺激条件では，運動開始 10～60 分および運動後 5 分で有意な増加をそれぞれ示した（図 3-3 A）。条件間の比較では，運動中を通して，対照条件および温熱刺激条件よりも冷却刺激条件の順向 SR が有意に小さかった。さらに，運動開始 20～60 分および運動後 5，45 分では，対照条件よりも温熱刺激条件の順向 SR が有意に大きかった。

BA の逆向 SR 応答は，ベースラインに対して，対照条件では，運動開始 10～30 分，60 分で有意な増加，冷却刺激条件では，運動中を通じてベースラインから有意な増加を示したのに対して，温熱刺激条件では，運動中または運動後を通して有意な変化はなかった（図 3-3 B）。条件間の比較では，運動開始 30 分から 60 分まで，対照条件よりも冷却刺激条件の方が大きく，運動中を通じて温熱刺激条件よりも冷却刺激条件の方が大きかった。さらに，運動中の 50 分と 60 分で，温熱刺激条件よりも対照条件の方が大きかった。

BA の平均 SR 応答は，ベースラインに対して，対照条件では，運動開始 20～60 分および運動後 5 分で有意な増加，冷却刺激条件では，運動前，運動中，運動後 30 分と 45 分で有意な減少，温熱刺激条件では，運動開始 10～60 分および運動後 5 分で有意な増加を示した（図

3-3 C)。条件間の比較では、運動中および運動後 5 分と 30 分で、対照条件より冷却刺激条件の平均 SR が小さく、運動中から運動後にかけて温熱刺激条件よりも冷却刺激条件の平均 SR が小さかった。また、運動中、運動後 5 分と 60 分で、対照条件よりも温熱刺激条件の平均 SR が大きかった。

OSI は、ベースラインに対して、対照条件では、運動開始 10 分で有意な増加、冷却刺激条件では、運動開始 10～60 分、運動後 30 分、45 分で有意な増加、温熱刺激条件では、運動開始 10～60 分および運動後 5 分で有意な減少を示した (図 3-3 D)。条件間の比較では、運動中および運動後 5 分と 30 分で、対照条件よりも冷却刺激条件の OSI が大きく、運動開始から終了後を通じて温熱刺激条件よりも冷却刺激条件の OSI が大きかった。また、運動中、温熱刺激条件よりも対照条件の OSI が小さかった。

運動中の順向 SR、逆向 SR、および平均 SR の iAUC は、対照条件に比して、冷却刺激条件では小さく、温熱刺激条件では大きかった。加えて、OSI の運動から回復期までの iAUC は、対照条件に比して、冷却刺激条件では大きく、温熱刺激条件では小さかった。

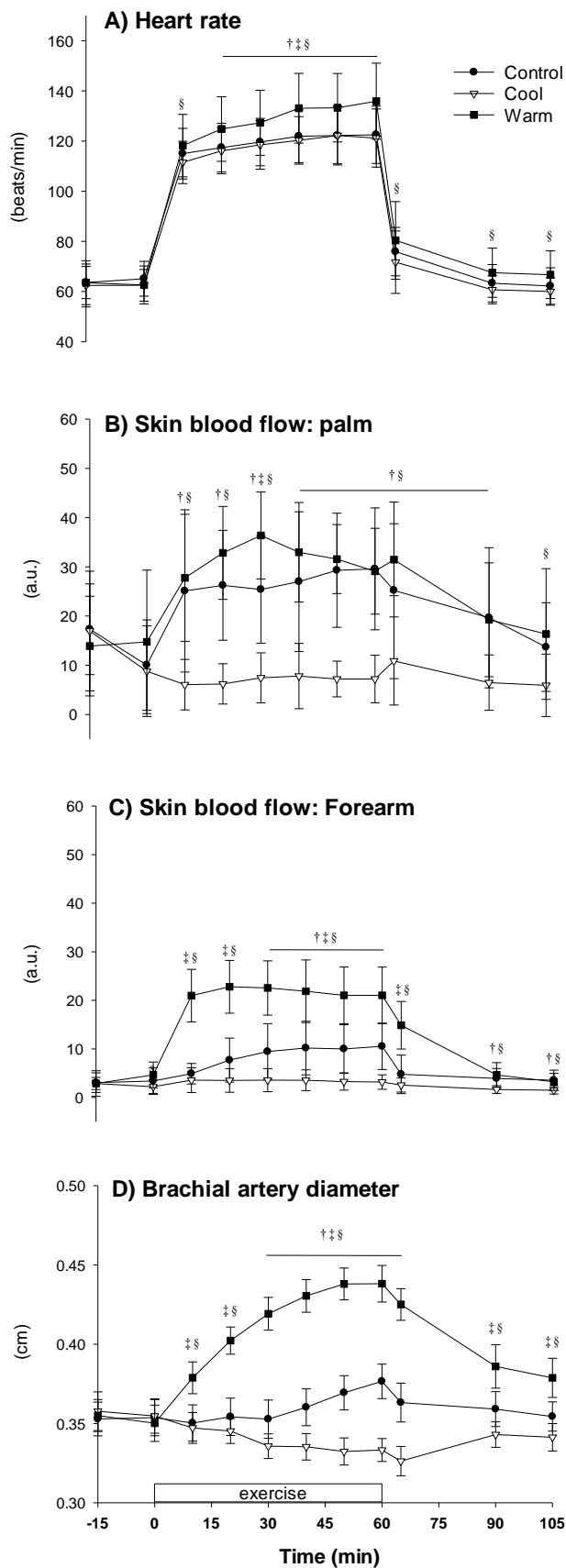


図 3-2. プロトコル中の HR (A), 手掌部 (B) と前腕 (C) の SBF, BA の血管径 (C), BA 直径 (D) 運動は 0 から 60 分まで行われた。値は、平均 ± 標準偏差で示した。†: 冷却刺激条件 vs. 対照条件 (P < 0.05), ‡: 温熱刺激条件 vs. 対照条件 (P < 0.05), §: 冷却刺激条件 vs. 温熱刺激条件 (P < 0.05)。

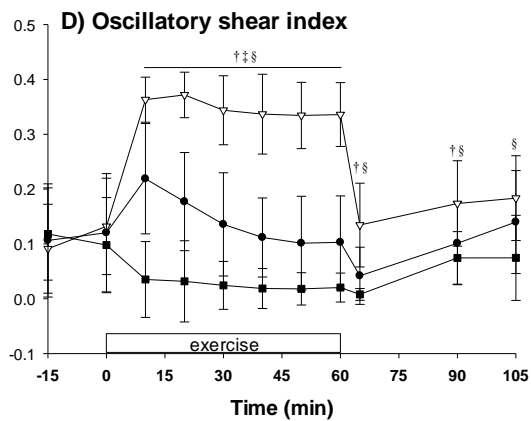
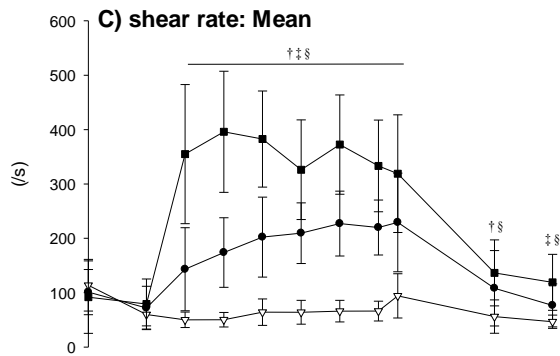
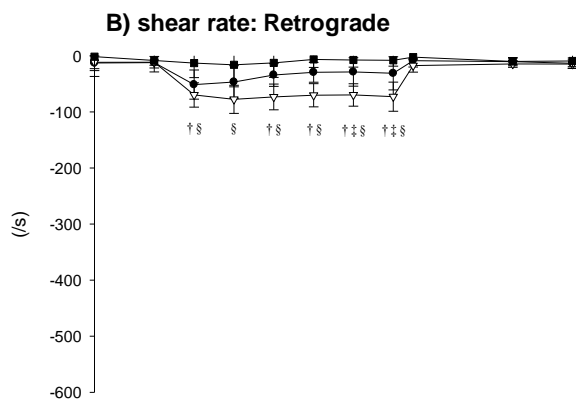
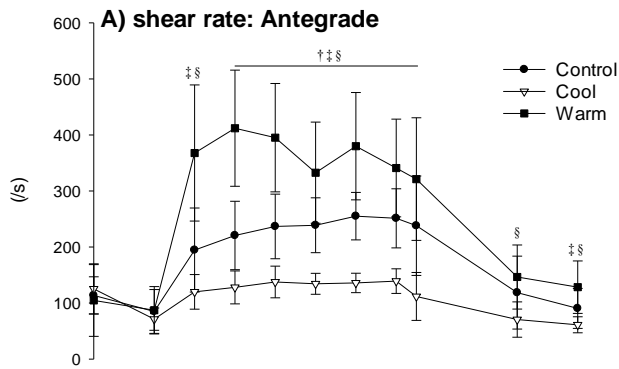


図 3-3. プロトコル中の順向 (antegrade) SR (A), 逆向 (retrograde) SR (B), 平均 (mean) SR (C), と OSI (D)

運動は 0 から 60 分まで行われた。値はすべて平均 ± 標準偏差で示した。†: 冷却刺激条件 vs. 対照条件 ($P < 0.05$), ‡: 温熱刺激条件 vs. 対照条件 ($P < 0.05$), §: 冷却刺激条件 vs. 温熱刺激条件 ($P < 0.05$)。

3-3-3. 上腕動脈の血管内皮機能 (%FMD)

BA における FMD 検査で測定された、血管径のベースライン値 (D-base)、ピーク値 (D-peak)、%FMD、ならびに adjusted%FMD の結果を表 3-1 に示した。また %FMD の 3 条件での運動前後の変化については図 3-4 に示した。

ベースラインでの各測定値には、3 条件間で有意差は認められなかった。対照条件の D-base, D-peak, %FMD は、ベースラインから運動後の全ての期間で有意に変化しなかった。冷却刺激条件では、D-base, D-peak はベースラインから運動終了後 15 分で有意に減少し (Δ D-base, Δ D-peak, Δ %FMD: -0.021 cm, -0.026 cm, -1.12%; $P < 0.05$)、運動終了後 60 分で、%FMD は有意に減少した (Δ %FMD と Δ adjusted%FMD: -2.68 と -2.34%; $P < 0.05$)。温熱刺激条件では、D-base はベースラインから運動終了後 15 分で有意に増加し (+0.073 cm; $P < 0.05$)、D-peak は運動終了後 15 分と 60 分で有意に増加した (+0.081, +0.020 cm; $P < 0.05$)。%FMD は、ベースラインから運動終了後 15 分に増加傾向を示した (+1.65%; $P = 0.08$)。adjusted%FMD は、運動終了後 15 分と 60 分で、ベースラインから増加する傾向がみられた (+1.90, +1.41%; 共に $P = 0.09$)。

表 1. ベースライン (-15 分), 運動終了後 15 分 (75 分), 運動終了後 60 分 (120 分) における血管径のベースライン値 (D-base), ピーク値 (D-peak), %FMD 値ならびに adjusted%FMD 値

Trials	Baseline	After exercise	
	-15 min	15 min (t = 75 min)	60 min (t = 120 min)
D-base (cm)			
Control	0.356 ± 0.03	0.358 ± 0.04	0.353 ± 0.03
Cool	0.359 ± 0.03	0.338 ± 0.03 ^{*,§}	0.353 ± 0.02
Warm	0.353 ± 0.03	0.426 ± 0.04 ^{*,‡}	0.367 ± 0.03
D-peak (cm)			
Control	0.376 ± 0.03	0.382 ± 0.04	0.377 ± 0.03
Cool	0.380 ± 0.03	0.354 ± 0.04 ^{*,†,§}	0.365 ± 0.03 ^{(*),§}
Warm	0.374 ± 0.03	0.455 ± 0.04 ^{*,‡}	0.394 ± 0.03 ^{*,‡}
%FMD			
Control	5.69 ± 1.35	6.74 ± 1.60	6.87 ± 2.49
Cool	5.87 ± 0.70	4.75 ± 1.89 ^{†,§}	3.19 ± 1.82 ^{†,§}
Warm	5.68 ± 1.86	7.33 ± 2.27 ^(*)	7.19 ± 2.06
Adjusted %FMD			
Control	5.67 ± 1.78	6.75 ± 1.78	6.82 ± 1.79
Cool	5.69 ± 1.70	4.39 ± 1.71 ^(*)	3.35 ± 1.67 [*]
Warm	5.47 ± 2.13	7.37 ± 2.45 ^(*)	6.88 ± 1.93 ^(*)

値はすべて平均 ± 標準偏差による表示。* : 各条件でのベースラインとの比較 (P<0.05),
 (*) : 各条件でのベースラインとの比較 (0.05<P<0.1), † : 対照条件 vs. 冷却刺激条件 (P<0.05),
 ‡ : 温熱刺激条件 vs. 対照条件 (P<0.05), § : 冷却刺激条件 vs. 温熱刺激条件 (P<0.05)。

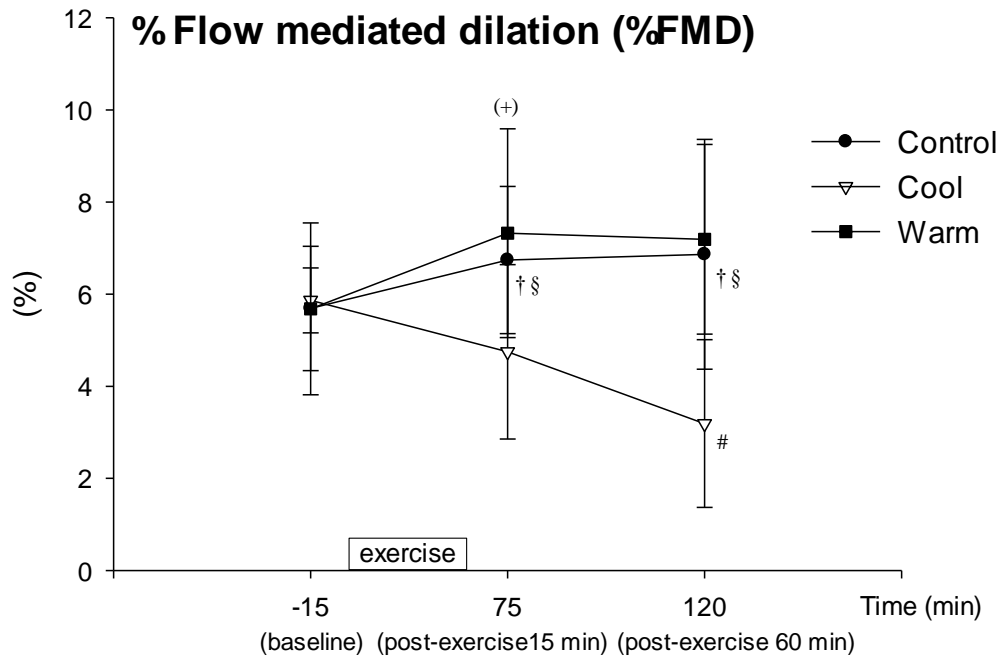


図 3-4. 運動による%FMD の変化

横軸は、ベースライン (-15 分)，運動終了後 15 分 (75 分)，運動終了後 60 分 (120 分) として測定 タイミングを表示。値はすべて平均 ± 標準偏差による表示。

: 冷却刺激条件でのベースラインとの比較 (P<0.05)。 (+) : 温熱刺激条件でのベースラインとの比較 (P=0.08)。 † : 対照条件 vs. 冷却刺激条件 (P<0.05)， § : 冷却刺激条件 vs. 温熱刺激条件 (P<0.05)。

3-3-4. シェアストレス様相ならびに OSI の iAUC と %FMD の変化の関連性

運動中の順向 SR, 逆向 SR, 平均 SR, ならびに OSI の iAUC は, ベースラインから運動終了後 15 分目の %FMD の変化量 (Δ %FMD) との間に有意な相関関係があった (順向 SR, 逆向 SR, 平均 SR, OSI : $r=0.54, 0.54, 0.58, -0.69$; $P<0.05$) (図 3-5)。また, 運動終了後 60 分目 (実験終了) までの Δ %FMD と各 SR 様相の iAUC についての関連性を検討すると, ほぼ同様な結果で, 有意な関連性が認められた (順向 SR, 逆向 SR, 平均 SR, OSI : $r=0.41, 0.47, 0.43, -0.51$; $P<0.05$)。

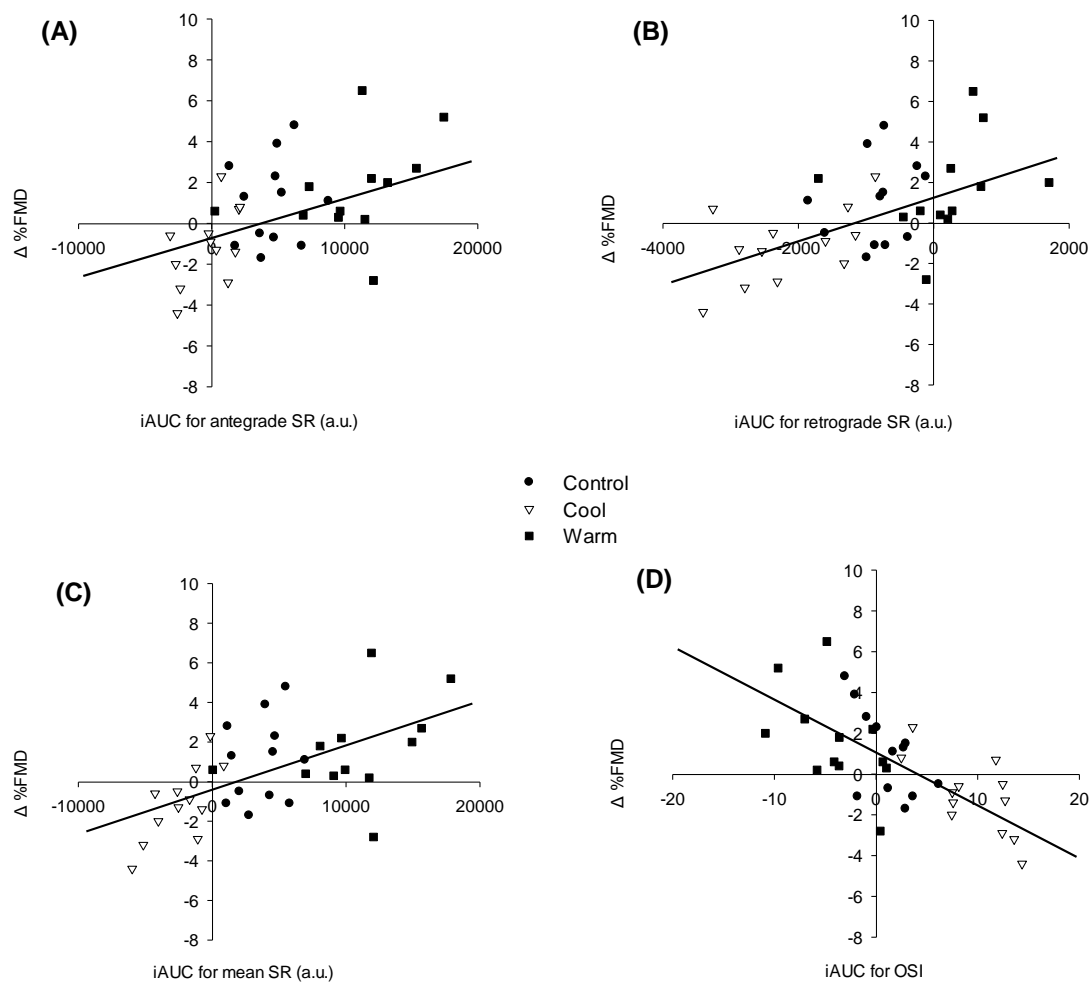


図 3-5 : 運動中の SR (A : 順向, B : 逆向, C : 平均) および OSI (D) の iAUC と, ベースライン に対する運動終了後 15 分目の %FMD の変化量 ($\Delta\%FMD$) の関連性

3-4. 考察

本実験から得られた新たな知見は以下のとおりであった。運動単独では、運動後の%FMDに有意な改善は今回の実験では残念ながら認められなかった。一方、60分間の中等度の一定負荷自転車こぎ運動に、前腕部と手部へ温熱刺激を加えると、BAの%FMDに増加傾向がみられた。次に、逆な冷却刺激を運動中に加えると、%FMDは運動後に有意に低下した。また、運動中および運動後のSRとその様相（順向SR、逆向SR、平均SR）の大きさと、運動終了後のFMDの変化量との間には有意な関連性がみられた。すなわち、抗動脈硬化作用を有する順向SRの増加と催動脈硬化作用を有する逆向SRの減少は、血管内皮機能の急性な改善を惹起していた。これらの結果は、下肢の動的運動中、BAの下流域のNG皮膚循環反応が変化すると、BA-SRおよびその様相が変容して、BAの血管内皮機能に影響を与える可能性を示唆している。

BAの各SR様相は、3条件の間で明らかに異なっていた。運動単独を行った対照条件では、その開始直後に逆向SRが増加し、その後、徐々に逆向SRの減少と順向SRの増加が起きた（SRの二相性反応）。この反応は、運動開始直後には交感神経活性化を介してBAの下流組織（皮膚および骨格筋）の血管収縮が生じて、運動を継続することによって体温調節メカニズムを介した熱放散反応促進による主に皮膚血管拡張が生じるという反応によるものと考えられた（第1章1-6を参照）。おそらく、手掌部SBFの上昇もBAの逆向SRの減少と順向SRの増加に若干、寄与していたものと思われた。手掌部SBFは運動中に徐々に増加しており（図3-2B）、熱交換を促進する役割を果たしていたのではないかと推測された。温熱刺激条件の運動中には、対照条件と比較して、より大きな順向SRとより小さな逆向SRの応答が観察された。これらの結果は、Thijssenらの最近の研究によって裏付けられる。彼らは、LBNP（MSNAを増加させる人為的操作）で引き起こした逆向SR増加は、腕への加温で消失したことを示した⁹⁶⁾。したがって、本実験における前腕への温熱刺激によって生じたSR様相（順向SRの増加、逆向SRの減少）は、局所的な加温によって皮膚や

骨格筋の抵抗血管で著しい血管拡張が生じた結果と思われる。残念ながら本実験では、体内中心部の温度（例：直腸温，食道温）は測定していないが，温熱刺激条件では，他の2条件よりも運動中および運動後のHRが最も高かったので，局所的な影響だけでなく，体温上昇による全身性の循環系への影響も，SR応答に反映されている可能性は極めて高い。さらに，温熱刺激条件での逆向SRの減少は，交感神経活動の局所的な減少も関与している可能性がある。なぜならホットパックを使用して脚を41°Cで局所的に温めると，中心循環（HR，BP）は不変であったにもかかわらず，腓骨神経のMSNAが大幅に減少したと報告されているためである¹⁰³。

対照条件や温熱刺激条件とは対照的に，冷却刺激条件の運動中，順向SRは変化せず，逆向SRとOSIの増加が認められた。すでに述べたように，運動継続中には，放熱促進のために前腕SBFが上昇するといった体温調節メカニズムを介して，逆向SRの減少と順向SRの増加が徐々に生じる。したがって，冷却条件でのSR応答は，前腕への冷却が通常体温調節反応を局所的に抑制したと推測された。結果として，冷却条件での運動中にみられたBAのSR様相の変容は，主に交感神経のより大きな活性化によるものと思われた。Padillaらの研究で，段階的な下半身の陰圧負荷により人為的に交感神経活動を高めていくと，それに従って逆向SRが増加していったことが示されている¹⁰²。また，石田らは，アイスパックを使用して脚を15°Cで局所的に冷却すると，中心循環（HR，BP）は不変であったにもかかわらず，腓骨神経のMSNAが大幅に増加したと報告した¹⁰¹。したがって，本実験での冷却条件での逆向SRの持続的な増大は，おそらく，運動誘発性の全身性と局所的な交感神経活動の亢進に起因していたものと推察される。

BAの血管径の変化は，3条件間で異なり，運動中のSR様相の影響を受けていたと考えられた（図3-2D）。特に温熱刺激条件でみられた，より大きな順向SRとより小さな逆向SRの各応答は，より強力な血管拡張（すなわち，血管径の拡大）をもたらした。一方，温熱刺激条件とは全く逆のSR様相を呈した冷却条件では，BAは血管収縮（すなわち，血管径の

縮小)を生じた。これまで、BAの逆向SRとOSIを人為的により大きくするために、腕へ巻いたカフ圧操作が一般的に用いられてきた^{82,87,114})。それらの研究では、逆向SRの増加は血管径の縮小を引き起こすことを明らかにしている。これは、本実験での血管径の変化とその結果として生じるBAのFMDの変化を解釈する上で役立つ。また、運動中、あるいは腕の加温中にカフを使用してSRを人為的に下げる(逆向SRを増やす)と、BAの血管径は縮小するという先行研究の結果¹¹⁵)と、本実験の結果は、一致していた。Padillaらは、若い健康な被験者に対して、前腕の循環血液内にNO合成阻害剤を局所投与すると、逆向SRとOSIが増加することを示した⁷¹)。以上から、SR様相はNO合成と密接に関連するとともに血管径の調節にも重要な役割を果たしている。したがって、運動中の前腕部と手部への温熱および冷却刺激は、血管径の顕著な変化を引き起こし、それはSR様相の変容を伴ったものであることが理解される。

運動中の前腕部と手部への温熱および冷却刺激による上腕動脈のSR様相の変容は、運動後の血管内皮機能に影響を与えた。本実験の結果は、順向SRの増加が抗動脈硬化作用を引き起こすという先行研究の結果¹¹⁶)や、OSIおよび逆向SRの増大が催動脈硬化作用につながるという先行研究の結果¹¹⁷)と一致する。対照条件では、ベースライン直径の個体差の補正の有無にかかわらず、残念ながら、血管内皮機能の指標、%FMDは運動後に変化しなかった。運動強度が低～中等度の条件下で、運動後の%FMDが運動前の値からどのような推移で変化するのかについて、今のところ、完全に一致した見解が得られているわけではない。本実験と類似した、低～中強度の自転車こぎ運動は、若い健康な被験者を対象とした場合、%FMDが改善した¹¹⁸)、あるいは変化しなかった^{119,120})というように結果が分かれている。ただ、本実験では、adjusted%FMDでさえも、温熱刺激条件では1.4～1.9%の増加(平均値としてはやや増加しているが、残念ながら有意水準には惜しくも達していない)、冷却条件では2.3～2.7%、有意な低下であった。さらに、運動中および運動後の順向SR、逆向SRのiAUCは、運動後の%FMDの変化と有意に相関していた。この結果は、カフを用いて

人為的に誘発された逆向 SR の増減と %FMD の変化の有意な負の相関を示した先行研究⁷⁾の結果と類似したものであった。したがって、運動中の BA の SR 様相の変容は、運動後の血管内皮機能に関連することが示唆される。

本実験でみられた、急性な運動後の FMD の変化を説明するためには、当然、SR 様相の変容のみだけでなく、そのほかの要因、酸化ストレスの増加、交感神経活動の亢進、中心循環の変化、といった他の要因の影響も考慮する必要がある¹²⁾。酸化ストレスの増加は、NO 産生やその生物学的利用能 (bioavailability) の低下による FMD の低下につながる可能性がある。本実験では、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) は測定していないが、先行研究で、軽度～中等度の有酸素運動後、ROS は変化しないことが報告されているので、おそらく重要役割を果たしていたとは考えにくい。しかし本実験の冷却刺激条件においては、血管内皮機能の低下が、酸化ストレスに関連するメカニズムを介して誘発されていた可能性は残る。下肢自転車こぎ運動中にカフ圧操作を用いて BA の逆向性 SR を人為的に増加させると、その後の %FMD が低下することが示されている²⁰⁾。この FMD の低下は、酸化ストレスを減弱させる抗酸化作用のあるビタミン C の補給によって消失した^{118,122)}。これは、冷却刺激によって逆向 SR 増加し、それによって誘発された酸化ストレスの増加が、運動後の FMD 低下の一つの原因であったことを示唆している。加えて、Jenkins らは、20 分間のカフ圧操作で人為的に起こした局所的な血流障害が、急性的にヒトの血管内皮細胞の活性化やアポトーシスを急性的に誘発するという最初の直接的な証拠を提示した¹²³⁾。この延長線上で、Storch らは、カフ圧操作で 30 分間、OSI を人為的に上げると、健康なヒトにおいて、血小板微粒物質 (血小板に由来する微小な膜小胞体) の放出、凝固-線維素溶解などの障害を誘発することを示した OSI は、前者の研究では 0.27、後者では 0.43 で、これらの値は、本実験の冷却条件での値と同等なものであった¹²⁴⁾。したがって、OSI の増加による上述のような分子メカニズムも、冷却条件でみられた %FMD の低下には関連していることが想定される。

本実験の限界として、以下のような点が挙げられる。血管内皮機能に対する SR 様相の関与を検証するために、前腕部と手部への冷却および温熱刺激を本実験では用いた。温熱刺激条件での HR は、運動中および運動終了後ともに、他の 2 つの条件よりも高かった。このことは生体内部の状況が 3 条件間で異なった可能性を意味し、このような違いが ROS の産生量や交感神経活動の亢進レベルに影響を与えた可能性が残る。そのような要因は、内皮細胞に対する運動の有益な効果を潜在的に弱めることにつながるであろう^{120,125}。また、HR の増加は直接、内皮細胞への刺激の量的な多さを意味し、FMD の結果に影響した可能性がある¹²⁶。

また、冷却条件において、運動後の 1 時間程度では FMD がベースライン値に戻らなかったため、もう少し長い期間の FMD の変化を測定する必要がある。将来的には、各条件、試行間による全身循環への影響を最小限に抑えた状態で、SR 様相の変調と血管内皮機能の変化の関係を検討する必要がある。

第 4 章

総括

第4章 総括

心血管性疾患の発症や進展には動脈硬化が深く関わっている。動脈硬化発症は、血管内皮細胞の軽微な機能低下や障害が端緒となる。血管内皮細胞の障害は生活習慣の乱れ（肥満，運動不足，喫煙，塩分の過剰摂取など）や，疾病（高血圧，糖尿病，脂質異常症）によって引き起こされる。動脈硬化の前段階である血管内皮機能の低下は可逆的であるため，動脈血管の内皮機能を正常，あるいはよりよい状態に保つことは，心血管性疾患の発症や進展を抑える上で極めて重要となる。

運動の実施が抗動脈硬化作用をもたらすことは古くから広く知られている。これは主に基礎疾患の改善を介した二次的効果によるものと考えられていたが，近年，血管への直接的効果の存在が認識されつつある。動脈血管への直接的効果とは，運動時，運動肢への血流増加に伴って，血管壁への「ずり応力」(SS)の増加とその様相（順向および逆向SS）の変容が起こり，血管内皮細胞機能が刺激されて生じる効果のことである。中枢から末梢へ流れる順向のSSは抗動脈硬化作用を有するのに対し，末梢から中枢へ流れる逆向のSSは催動脈硬化作用を持つことが解明されつつあり，血管内皮細胞の機能性を正常に保持あるいは改善させるためには，順向SSの増加と逆向SSの減少，消失が重要であると考えられている。さらに，この直接的効果は運動肢内に限定されたものではなく，非運動肢内にまで及ぶ。しかし，非運動肢内への抗動脈硬化作用が波及する機序については，やはりそのSS応答が関与していることは明らかになりつつあるが，詳細な機序については，必ずしもまだ，十分に解明されていない。

一般的な歩走行や自転車こぎといった下肢動的運動を継続すると，非運動肢である上肢の導管動脈であるBA-SSは増大していく。その増大には，運動に伴う体温調節系作動の一つである熱放散反応による皮膚血流の増加が関与している可能性が高い。BAの血液の流れ込み先である肘から先の皮膚は，機能的に異なる2つの領域か

ら成る。それは NG（前腕部と手背部）と G（手掌部）皮膚領域で、それぞれ異なる血流調節機構を有する。運動時の BA-SS 応答に対して、解剖生理学的に異なる 2 つの皮膚領域の内、どちらが大きく起因しているかについては明らかにされていない。そこで本研究は、この点を明らかにすること目的として、最初の実験（実験 I）を行った。その結果に基づいて、抗動脈硬化作用を高める方法につながる実学的な知見を得る目的で、第二の実験（実験 II）を行った。

実験 I. 下肢自転車こぎ運動中に、冷却刺激あるいは温熱刺激を、片側上肢の肘から先の NG と G の両皮膚領域あるいは G 皮膚領域のみに行い、BA-SS 応答に対する下流の皮膚血流調節の影響を、NG と G 皮膚領域に分けて検討した。

実験 II. 実験 I の結果を踏まえて、下肢自転車こぎ運動中、肘から先の皮膚領域に冷却あるいは温熱刺激を行い、BA-SS 応答を人為的に調節した際、BA の血管内皮機能（FMD）にどのような影響が及ぶかを検討した。

これら 2 つの研究から、以下の新たな知見が得られた。

1. 実験 I では、下肢自転車こぎ運動中、非運動肢である BA-SS 応答に対する下流の皮膚 VC の影響を、神経調節機構の異なる NG と G の皮膚領域に分けて検証した初めての研究であった。下肢自転車こぎ運動の 20 分目から両皮膚領域に対して冷却刺激を加えると、BA-SS 応答の様相は、順向 SR の減少、逆向 SR の増加がみられ、同時に NG である前腕部の皮膚 VC と G である手掌部の皮膚 VC がそれぞれ低下した。一方、G 皮膚領域のみへの冷却刺激では、BA-SS 応答に有意な変化はなかった。両皮膚領域への温熱刺激では、冷却刺激とはほぼ逆の応答がみられたが、G 皮膚領域のみへの刺激では有意な変化はなかった。これらの結果から、下肢自転車こぎ運動中、非運動肢である BA-SS 応答に

は、血管の拡張と収縮の両作動性を有する「有毛部」の皮膚循環応答が、無毛部のそれに比べて、大きく関与していることが示された。

2. 実験Iの結果から、下肢自転車こぎ運動時に肘から先の皮膚へ温冷刺激を加えると、BA-SS 応答を人為的に増減できることが明らかになったので、そのような SS の変容が、実際に血管内皮機能へどのような効果を与えるのかについては、実学的に興味もたれる。そこで実験IIでは、運動のみ、同じ運動に冷却あるいは温熱刺激を肘から先の皮膚表面へ行った際の 3 条件で、運動後の血管内皮機能が運動前からどのような推移で変化するかを検討することとした。血管内皮機能の評価には、FMD 法を用いた。下肢自転車こぎ運動中、肘から先に冷却刺激を加えた場合では、運動単独の場合と比較して、BA の順向 SS の減少、逆向 SS の増加がみられ、運動後の BA の血管内皮機能は運動前から有意に低下した。一方、温熱刺激を加えた運動では、冷却刺激とは逆な BA-SS 応答（順向 SS の増加、逆向 SS の減少）が起こり、BA の血管内皮機能は上昇傾向を示した。さらに、運動中における BA-SS 応答の様相である順向 SS や逆向 SS の量的大きさと、運動後の血管内皮機能の変化の間には、想定されるような相関が認められた。これらの結果から、下肢自転車こぎ運動中に BA の SS を調節する NG 皮膚領域へ温冷刺激を加えると、BA の血管内皮機能に急性の付加的な効果が惹起されることを明らかにした。

以上のことから、本研究は、下肢自転車こぎ運動中、BA-SS 応答を主に調節している NG の皮膚領域に対して、温熱刺激を加えることで、運動を単独で実施するよりも、NG 皮膚への血流をより多く増大させることが可能であり、そのことに起因して、非運動肢である BA の血管内皮機能のさらなる上昇が望める可能性が示唆された。したがって、運動能力が比較的 low、身体への負担が大きいことからあまり高

い負荷を課すことが困難な対象者（例えば心不全患者）には、効果があまり望めないといわれる低強度の運動であっても、それに温熱刺激を加えることで、中心循環へ大きな負担を与えることなく、運動単独で実施する場合と比べてより大きな抗動脈硬化効果が得られるものと期待される。また、本研究結果から、下肢運動を課すことが難しい対象者（車いす使用者等）の場合、上肢運動に加え、非運動肢である下肢への温熱刺激を行うことで、それぞれ単独で行うより下肢の血管内皮内皮機能は大きく改善する可能性が十分にある。本研究の成果は、このような抗動脈硬化作用を惹起する新たな実践的方法の開発に寄与する可能性が高く、価値あるものである。

参考文献

参考文献

- 1) Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization; 2018.
(https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/)
- 2) 平成 29 年人口動態統計月報年計（概数）の概況. 2017. 厚生労働省.
(<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai17/index.html>)
- 3) Ross R and Glomset JA: The pathogenesis of atherosclerosis. N Engl J Med, 1976; 295:369-377, 420-425
- 4) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature,1993; 362: 801-809
- 5) Ross R: Atherosclerosis: An inflammatory disease. N Engl J Med, 1999; 340: 115-126
- 6) Furchgott RF and Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, 1980; 288: 373-276
- 7) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84: 9265-9269
- 8) Palmer RMJ, Ferrige AG and Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature, 1987; 327: 524-6
- 9) Vanhoutte PM: Endothelium and control of vascular function. Hypertension, 1989; 13: 658-667
- 10) 東 幸仁: 動脈硬化の第一段階としての血管内皮障害. 日本内科学会雑誌, 2007; 96: 1717-1723
- 11) Cai H and Harrison DG: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of

- oxidant stress. *Circ Res*, 2001; 87: 840—844
- 12) Celermajer DS, Sorensen KE and Spiegelhalter DJ: Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *JACC*, 1994; 24: 471-476
 - 13) Hsueh AW, Quinones MJ, Creager MA: Endothelium in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Review* 5 : 343—352, 1997
 - 14) Rauramaa R, Halonen P, Väisänen SB, Lakka TA, Schmidt-Trucksäss A, Berg A, Penttilä IM, Rankinen T and Bouchard C: Effects of aerobic physical exercise on inflammation and atherosclerosis in men: the DNASCO Study: a six-year randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*, 2004; 140:1007-1014
 - 15) Warburton DE, Nicol CW and Bredin SS: Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*, 2006; 174:801-809
 - 16) Mora S: Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms. *Circulation*, 2007; 116: 2110-2118
 - 17) Malek AM, Alper SL and Izumo S: Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA*, 1999; 282: 2035-2042
 - 18) 安藤譲二. メカニカルストレスの血管への作用. *日本血栓止血誌*, 2002; 13; 227-236
 - 19) Perktold K, Thurner E and Kenner T: Flow and stress characteristics in rigid walled and compliant carotid artery bifurcation models. *Med Biol Eng Comput*, 1994; 32:19–26
 - 20) Tinken TM, Thijssen DH, Hopkins N, Black MA, Dawson EA and Minson CT: Newcomer SC, Laughlin MH, Cable NT and Green DJ. Impact of shear rate modulation on vascular function in humans. *Hypertension*, 2009; 54:278-285.
 - 21) Tinken TM, Thijssen DH, Hopkins N, Dawson EA, Cable NT and Green DJ: Shear stress mediates endothelial adaptations to exercise training in humans. *Hypertension*, 2010; 55:

312-318

- 22) Scholten RR, Spaanderman ME, Green DJ, Hopman MT and Thijssen DH:
Retrograde shear rate in formerly preeclamptic and healthy women before and after exercise training: relationship with endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014; 307: H418-425
- 23) Thijssen DH, Schreuder TH, Newcomer SW, Laughlin MH, Hopman MT and Green DJ:
Impact of 2-Weeks Continuous Increase in Retrograde Shear Stress on Brachial Artery Vasomotor Function in Young and Older Men. *J Am Heart Assoc*, 2015; 4: e001968
- 24) Papaioannou TG and Stefanadis C: Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hellenic J Cardiol*, 2005; 46: 9-15
- 25) Vennemann P, Lindken R and Westerweel J: In vivo whole-field blood velocity measurement techniques. *Experiments in Fluids*, 2007; 42: 495-511
- 26) Padilla J, Simmons GH, Fadel PJ, Laughlin MH, Joyner MJ and Casey DP: Impact of aging on conduit artery retrograde and oscillatory shear at rest and during exercise: role of nitric oxide. *Hypertension*, 2011; 57: 484-489
- 27) Parker BA, Trehearn TL and Meendering JR: Pick your Poiseuille: normalizing the shear stimulus in studies of flow-mediated dilation *J Appl Physiol* (1985), 2009; 107: 1357-1359
- 28) Nerem RM, Levesque MJ and Cornhill JF: Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow. *J Biomech Eng*, 1981; 103: 172-176
- 29) Langille BL and Adamson SL: Relationship between blood flow direction and endothelial cell orientation at arterial branch sites in rabbits and mice. *Circ Res*, 1981; 48: 481-488
- 20) Flaherty JR, Pierce JE, Ferrans VJ, Patel DJ, Tucker WK and Fry DL: Endothelial nuclear

patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events. *Circ Res*, 1972; 30: 23-33

- 31) Malek AM, Jackman R, Rosenberg RD and Izumo S: Endothelial expression of thrombomodulin is reversibly regulated by fluid shear stress. *Circ Res*. 1994; 74: 852-860
- 32) Dewey CF: Effects of fluid flow on living vascular cells. *J Biomech Eng*, 1984; 106: 31-35
- 33) Eskin SG, Ives CL, McIntire VL and Navarro LT: Response of cultured endothelial cells to steady flow. *Microvasc Res*, 1984; 28: 87-94
- 34) Levesque MJ and Nerem RM: The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *J Biomech Eng*, 1985; 107: 341-347
- 35) Laughlin MH, Newcomer SC and Bender SB: Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. *J Appl Physiol* (1985), 2008; 104: 588-600
- 36) Malek AM and Izumo S: Molecular aspects of signal transduction of shear stress in the endothelial cell. *J Hypertens*, 1994; 12: 989-999
- 37) Masuda H, Kawamura K, Tohda K, Shozawa T, Sageshima M and Kamiya A: Increase in endothelial cell density before artery enlargement in flow-loaded canine carotid artery. *Arteriosclerosis*, 1989; 9: 812-823
- 38) Kaiser D, Freyberg MA and Friedl P: Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997; 231: 586-590
- 39) Chun TH, Itoh H, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, Yamashita J, Doi K, Inoue M, Masatsugu K, Korenaga R, Ando J and Nakao K: Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *Hypertension*, 1997; 29: 1296-302.
- 40) Ishibazawa A, Nagaoka T, Takahashi T, Yamamoto K, Kamiya A, Ando J and Yoshida A: Effects of shear stress on the gene expressions of endothelial nitric oxide synthase,

- endothelin-1, and thrombomodulin in human retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011; 52: 8496-8504
- 41) Kawai Y, Matsumoto Y, Watanabe K, Yamamoto H, Satoh K, Murata M, Handa M and Ikeda Y: Hemodynamic forces modulate the effects of cytokines on fibrinolytic activity of endothelial cells. *Blood*, 1996; 87: 2314-2321
- 42) Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, Nerem RM and Harrison DG: Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res*, 1996; 79: 32-37
- 43) Masatsugu K, Itoh H, Chun TH, Ogawa Y, Tamura N, Yamashita J, Doi K, Inoue M, Fukunaga Y, Sawada N, Saito T, Korenaga R, Ando J and Nakao K: Physiologic shear stress suppresses endothelin-converting enzyme-1 expression in vascular endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998; 31: S42-45
- 44) Shyy YJ, Hsieh HJ, Usami S and Chien S: Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemoattractant protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 4678-4682
- 45) Silacci P, Desgeorges A, Mazzolai L, Chambaz C and Hayoz D: Flow pulsatility is a critical determinant of oxidative stress in endothelial cells. *Hypertension*, 2001; 38: 1162-1166
- 46) McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, Jo H and Harrison DG: Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 285: H2290-2297
- 47) Ando J, Tsuboi H, Korenaga R, Takada Y, Toyama-Sorimachi N, Miyasaka M and Kamiya A: Shear stress inhibits adhesion of cultured mouse endothelial cells to lymphocytes by downregulating VCAM-1 expression. *Am J Physiol*, 1994; 267: C679-687

- 48) Korenaga R, Ando J, Kosaki K, Isshiki M, Takada Y and Kamiya A: Negative transcriptional regulation of the VCAM-1 gene by fluid shear stress in murine endothelial cells. *Am J Physiol*, 1997; 273:C 1506-1515
- 49) 日本循環器学会: 血管機能の非侵襲的評価法に関するガイドライン, 2013.
- 50) Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK and Deanfield JE: Noninvasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*, 1992; 34; 1111-1115
- 51) Tronc F, Wassef M, Esposito B, Henrion D, Glagov S and Tedgui A: Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996; 16: 1256-1262
- 52) Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, Lima JA, Crouse JR and Herrington DM: Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*, 2009; 120: 502-509.
- 53) Shimbo D, Grahame-Clarke C, Miyake Y, Rodriguez C, Sciacca R, Di Tullio M, Boden-Albala B, Sacco R and Homma S: The association between endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes in a population-based multi-ethnic cohort. *Atherosclerosis*, 2007; 192: 197-203.
- 54) Harris RA, Nishiyama SK, Wray DW and Richardson RS: Ultrasound assessment of flow-mediated dilation. *Hypertension*, 2010; 55: 1075-1085
- 55) Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, Parker B and Widlansky ME, Tschakovsky ME, Green DJ: Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011; 300: H2-12

- 56) Greyling A, Mil AC, Zock PL, Green DJ, Ghiadoni L and Thijssen DH: Adherence to guidelines strongly improves reproducibility of brachial artery flow-mediated dilation. *Atherosclerosis*, 2016; 248: 196-202
- 57) Pyke KE and Tschakovsky ME: The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol*, 2005; 568: 357-369
- 58) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Herman MG, Herrington D, Vallance P, Vita J and Vogel R: Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*, 2002; 39: 257-265
- 59) Black MA, Cable NT, Thijssen DH and Green DJ. Importance of measuring the time course of flow-mediated dilatation in humans. *Hypertension*, 2008; 51: 203-210
- 60) McAllister RM: Adaptations in control of blood flow with training: splanchnic and renal blood flows. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 1998, 30, 375-381.
- 61) Much TI, Haidet GC, Ordway GA, Longhurst JC and Mitchell JH: Training effects on regional blood flow response to maximal exercise in foxhounds. *Journal of Applied Physiology* 1987, 62, 1724-1732
- 62) Plowman SA and Smith DL: *Exercise physiology for health, fitness, and performance*. Benjamin Cummings, San Francisco, 2003
- 63) Rowell LB: *Human circulation: Regulation during physical stress*. Oxford University Press, New York, 1986
- 64) Endo M, Okada Y, Rossiter HB, Ooue A, Miura A, Koga S and Fukuba Y: Kinetics of pulmonary VO₂ and femoral artery blood flow and their relationship during repeated

- bouts of heavy exercise. *Eur J Appl Physiol*, 2005; 95:418-430
- 65) Fukuba Y, Ohe Y, Miura A, Kitano A, Endo M, Sato H, Miyachi M, Koga K and Fukuda O: Dissociation between the time courses of femoral artery blood flow and pulmonary VO₂ during repeated bouts of heavy knee extension exercise in humans. *Exp Physiol*, 2004; 89: 243-253
- 66) Green DJ, Hopman MT, Padilla J, Laughlin MH and Thijssen DH: Vascular adaptation to exercise in humans: role of hemodynamic stimuli. *Physiol Rev*, 2017; 97: 495-528
- 67) Green D, Cheetham C, Mavaddat L, Watts K, Best M, Taylor R and O'Driscoll G: Effect of lower limb exercise on forearm vascular function: contribution of nitric oxide. *Am J Physiol*, 2002; 283: 899-907
- 68) Padilla J, Simmons GH, Vianna LC, Davis MJ, Laughlin MH and Fadel PJ: Brachial artery vasodilatation during prolonged lower limb exercise: role of shear rate. *Exp Physiol*, 2011; 96:1019-1027
- 69) Fukuba Y, Endo MY, Kondo A, Kikugawa Y, Miura K, Kashima H, Fujimoto M, Hayashi N, Fukuoka Y and Koga S : Brachial artery blood flow dynamics during sinusoidal leg cycling exercise in humans. *Physiol Rep*, 2017; 5: e13456
- 70) Miura K, Kashima H, Oue A, Kondo A, Watanabe S, Endo MY and Fukuba Y: Effect of sinusoidal leg cycling exercise period on brachial artery blood flow dynamics in humans. *J Physiol Sci*, 2020: 70; 23
- 71) Simmons GH, Padilla J, Young CN, Wong BJ, Lang JA, Davis MJ, Laughlin MH and Fadel PJ: Increased brachial artery retrograde shear rate at exercise onset is abolished during prolonged cycling: role of thermoregulatory vasodilation. *J Appl Physiol*, 2011; 110: 389-397
- 72) Smith JR, Ade CJ, Broxterman RM, Skutnik BC, Barstow TJ, Wong BJ and Harms CA:

- Influence of exercise intensity on respiratory muscle fatigue and brachial artery blood flow during cycling exercise. *Eur J Appl Physiol*, 2014; 114:1767-1777
- 73) Tanaka H, Shimizu S, Ohmori F, Muraoka Y, Kumagai M, Yoshizawa M and Kagaya A: Increases in blood flow and shear stress to nonworking limbs during incremental exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 2006; 38; 81-85
- 74) Blair DA, Glover WB and Roddie IC: Vasomotor responses in the human arm during leg exercise. *Circ Res*, 1961; 9: 264-274
- 75) Johnson JM: Responses of forearm blood flow to graded leg exercise in man. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1979; 46: 457-462
- 76) Johnson JM, Rowell LB and Brengelmann GL: Modification of the skin blood flow-body temperature relationship by upright exercise. *J Appl Physiol*, 1974; 37:880-886
- 77) Johnson JM and Park MK: Effect of upright exercise on threshold for cutaneous vasodilation and sweating. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1981; 50:814-818
- 78) Kellogg DL Jr, Johnson JM and Kosiba WA: Control of internal temperature threshold for active cutaneous vasodilation by dynamic exercise. *J Appl Physiol*, 1991; 71:2476-2482
- 79) Smolander J, Saalo J and Korhonen O: Effect of work load on cutaneous vascular response to exercise. *J Appl Physiol*, 1991; 71:1614-1619
- 80) Wenger CB, Roberts MF, Stolwijk JA and Nadel ER: Forearm blood flow during body temperature transients produced by leg exercise. *J Appl Physiol*, 1975; 38:58-63
- 81) Dawson EA, Green DJ, Cable NT, Thijssen DH: Effects of acute exercise on flow-mediated dilatation in healthy humans. *J Appl Physiol*, 2013; 115: 1589-1598
- 82) Thijssen DH, Dawson EA, Tinken TM, Cable NT and Green DJ: Retrograde flow and shear rate acutely impair endothelial function in humans. *Hypertension*, 2009; 53:986-

- 83) Green DJ, Bilsborough W, Naylor LH, Reed C, Wright J, O'Driscoll G and Walsh JH: Comparison of forearm blood flow responses to incremental handgrip and cycle ergometer exercise: relative contribution of nitric oxide. *J Physiol*, 2005; 562: 617-628
- 84) Naylor LH, Carter H, FitzSimons MG, Cable NT, Thijssen DH and Green DJ: Repeated increases in blood flow, independent of exercise, enhance conduit artery vasodilator function in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011; 300: 664-669
- 85) Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL and Stone PH: Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol*, 2007; 49:2379-2393
- 86) Birk GK, Dawson EA, Atkinson C, Haynes A, Cable NT, Thijssen DH and Green DJ: Brachial artery adaptation to lower limb exercise training: role of shear stress. *J Appl Physiol* (1985), 2012; 112: 1653-1658
- 87) Schreuder TH, Green DJ, Hopman MT and Thijssen DH: Acute impact of retrograde shear rate on brachial and superficial femoral artery flow-mediated dilation in humans. *Physiol Rep*, 2014; 2: e00193
- 88) Cooper KE, Edholm OG and Mottram RF: The blood flow in skin and muscle of the human forearm. *J Physiol*, 1955; 128: 258-267
- 89) Johnson JM and Rowell LB: Forearm skin and muscle vascular responses to prolonged leg exercise in man. *J Appl Physiol*, 1975; 39: 920-924
- 90) Ooue A, Ichinose T, Inoue Y, Nishiyasu T, Koga S and Kondo N: Changes in blood flow in conduit artery and veins of the upper arm during leg exercise in humans. *Eur J Appl Physiol*, 2008; 103: 367-373

- 91) Charkoudian N: Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans. *J Appl Physiol*, 2010; 109: 1221-1228
- 92) Johnson JM, Pégola PE, Liao FK, Kellogg DL Jr and Crandall CG: Skin of the dorsal aspect of human hands and fingers possesses an active vasodilator system. *J Appl Physiol*, 1995; 78: 948-954
- 93) Yamazaki F and Sone R: Different vascular responses in glabrous and nonglabrous skin with increasing core temperature during exercise. *Eur J Appl Physiol*, 2006; 97: 582-590
- 94) Brunt VE, Jeckell AT, Ely BR, Howard MJ, Thijssen DH and Minson CT: Acute hot water immersion is protective against impaired vascular function following forearm ischemia-reperfusion in young healthy humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2016; 311: 1060-1067
- 95) Carter HH, Spence AL, Atkinson CL, Pugh CJ, Naylor LH and Green DJ: Repeated core temperature elevation induces conduit artery adaptation in humans. *Eur J Appl Physiol*, 2014; 114:859-865
- 96) Thijssen DH, Atkinson CL, Ono K, Sprung VS, Spence AL, Pugh CJ and Green DJ: Sympathetic nervous system activation, arterial shear rate, and flow-mediated dilation. *J Appl Physiol*, 2014; 116: 1300-1307
- 97) Endo MY, Suzuki R, Nagahata N, Hayashi N, Miura, A, Koga S and Fukuba Y: Differential arterial blood flow response of splanchnic and renal organs during low-intensity cycling exercise in women. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2008;294: 2322-2326
- 98) Koga S, Poole DC, Shiojiri T, Kondo N, Fukuba Y, Miura A and Barstow TJ: Comparison of oxygen uptake kinetics during knee extension and cycle exercise. *Am J Physiol*, 2005; 288: R212-220

- 99) Parker BA, Trehearn TL and Meendering JR: Pick your poiseuille: normalizing the shear stimulus in studies of flow-mediated dilation. *J Appl Physiol*, 2009; 107:1357-1359
- 100) Macefield VG: Sympathetic microneurography. In: Ruud MB, Dick FS (ed) *Autonomic Nervous System. Handbook of clinical neurology*, vol 117. Elsevier, pp 353-364, 2013.
- 101) Ishida K, Nakamura T, Kimura K, Kanno N, Takahashi N, Kamijo Y and Tajima F: Suppression of activation of muscle sympathetic nerve during non-noxious local cooling after the end of local cooling in normal adults. *Eur J Appl Physiol*, 2016; 116: 851-858
- 102) Padilla J, Young CN, Simmons GH, Deo SH, Newcomer SC, Sullivan JP, Laughlin MH and Fadel PJ: Increased muscle sympathetic nerve activity acutely alters conduit artery shear rate patterns. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010; 298: 1128-1135
- 103) Takahashi N, Nakamura T, Kanno N, Kimura K, Toge Y, Lee KH and Tajima F: Local heat application to the leg reduces muscle sympathetic nerve activity in human. *Eur J Appl Physiol*, 2011; 111: 2203-2211
- 104) Woodman RJ, Playford DA, Watts GF, Cheetham C, Reed C, Taylor RR, Puddey IB, Beilin LJ, Burke V, Mori TA and Green D: Improved analysis of brachial artery ultrasound using a novel edge-detection software system. *J Appl Physiol*, 2001; 91:929-937
- 105) Newcomer SC, Sauder CL, Kuipers NT, Laughlin MH, and Ray CA: Effects of posture on shear rates in human brachial and superficial femoral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008; 294:1833-1839
- 106) He X and Ku DN: Pulsatile flow in the human left coronary artery bifurcation: average conditions. *J. Biomech.Eng*, 1996; 118:74-82
- 107) Takase B, Hattori H, Tanaka Y, Uehata A, Nagata M, Ishihara M, and Fujita M: Acute effect of whole-body periodic acceleration on brachial flow-mediated vasodilatation

- assessed by a novel semi-automatic vessel chasing UNEXEF18G system. *J Cardiovasc Ultrasound*, 2013; 21:130-136
- 108) Iwamoto Y, Maruhashi T, Fujii Y, Idei N, Fujimura N, Mikami S, Kajikawa M, Matsumoto T, Kihara Y, Chayama K, Noma K, Nakashima A, and Higashi Y: Intima-media thickness of brachial artery, vascular function, and cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012; 32:2295-2303
- 109) Kawano N, Emoto M, Mori K, Yamazaki Y, Urata H, Tsuchikura S, Motoyama K, Morioka T, Fukumoto S, Shoji T, Koyama H, Okuno Y, Nishizawa Y, and Inaba M: Association of endothelial and vascular smooth muscle dysfunction with cardiovascular risk factors, vascular complications, and subclinical carotid atherosclerosis in type 2 diabetic patients. *J Atheroscler Thromb*, 2012; 19:276-284
- 110) Tomiyama H, Matsumoto C, Yamada J, Teramoto T, Abe K, Ohta H, Kiso Y, Kawauchi T, and Yamashina A: The relationships of cardiovascular disease risk factors to flow-mediated dilatation in Japanese subjects free of cardiovascular disease. *Hypertens Res*, 2008; 31:2019-2025
- 111) Tomiyama H, Higashi Y, Takase B, Node K, Sata M, Inoue T, Ishibashi Y, Ueda S, Shimada K and Yamashina A: Relationships among hyperuricemia, metabolic syndrome, and endothelial function. *Am J Hypertens*, 2011; 24:770-774
- 112) Takase B, Hattori H, Tanaka Y, Uehata A, Nagata M, Ishihara M and Fujita M: Acute Effect of Whole-Body Periodic Acceleration on Brachial Flow-Mediated Vasodilatation Assessed by a Novel Semi-Automatic Vessel Chasing UNEXEF18G System. *J Cardiovasc Ultrasound*, 2013; 21:130-136
- 113) Atkinson G and Batterham AM: The percentage flow-mediated dilation index: a large-sample investigation of its appropriateness, potential for bias and causal nexus in

vascular medicine. *Vasc Med*, 2013; 18:354-365

- 114) Schreuder TH, Green DJ, Hopman MT, and Thijssen DH: Impact of retrograde shear rate on brachial and superficial femoral artery flow-mediated dilation in older subjects. *Atherosclerosis*, 2015; 241:199-204
- 115) Carter HH, Dawson EA, Birk GK, Spence AL, Naylor LH, Cable NT, Thijssen DH and Green DJ: Effect of SR manipulation on conduit artery dilation in humans. *Hypertension*, 2013; 61:143-150
- 116) Cunningham KS and Gotlieb AI: The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest*, 2005; 85:9-23
- 117) Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, and Searles C: Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med*, 2006; 259:351-363
- 118) Johnson BD, Mather KJ, Newcomer SC, Mickleborough TD, and Wallace JP: Brachial artery flow-mediated dilation following exercise with augmented oscillatory and retrograde shear rate. *Cardiovasc Ultrasound*, 2012; 10:34
- 119) Johnson BD, Padilla J and Wallace JP: The exercise dose affects oxidative stress and brachial artery flow-mediated dilation in trained men. *Eur J Appl Physiol*, 2012; 112:33-42
- 120) Mills A, Rosenberg M, Stratton G, Carter HH, Spence AL, Pugh CJ, Green DJ and Naylor LH: The effect of exergaming on vascular function in children. *J Pediatr*, 2013; 163:806-810
- 121) Dawson EA, Green DJ, Cable NT and Thijssen DH: Effects of acute exercise on flow-mediated dilatation in healthy humans. *J Appl Physiol*, 2013; 115:1589-1598
- 122) Johnson BD, Mather KJ, Newcomer SC, Mickleborough TD and Wallace JP: Vitamin C

prevents the acute decline of flow-mediated dilation after altered shear rate patterns.

Appl Physiol Nutr Metab, 2013; 38:268-274

123) Jenkins NT, Padilla J, Boyle LJ, Credeur DP, Laughlin MH and Fadel PJ: Disturbed blood flow acutely induces activation and apoptosis of the human vascular endothelium.

Hypertension, 2013; 61:615-621

124) Storch AS, Rocha HNM, Garcia VP, Batista GMDS, Mattos JD, Campos MO, Fuly AL, Nóbrega ACLD, Fernandes IA and Rocha NG: Oscillatory shear stress induces hemostatic imbalance in healthy men. *Thromb Res*, 2018; 170:119-125

125) Atkinson CL, Lewis NC, Carter HH, Thijssen DH, Ainslie PN and Green DJ: Impact of sympathetic nervous system activity on post-exercise flow-mediated dilatation in humans. *J Physiol*, 2015; 593:5145-5156

126) Himburg HA, Dowd SE and Friedman MH: Frequency-dependent response of the vascular endothelium to pulsatile shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007; 293:H645-H653

謝辭

謝辞

本研究の遂行および学位論文の作成にあたり、終始懇切丁寧なご指導をいただき、また本稿のご高閲を賜りました県立広島大学大学院総合学術研究科 福場良之教授に心より御礼申し上げます。計画立てて研究を進めていくことができず、先生が描かれているような研究者像にはなかなか到達できない私の状況を黙って見守って下さり、終始ご高配を賜るとともに、多くの明快なご示唆を頂いたこと本当に心より感謝申し上げます。

また、ご多忙の中、本学位論文の副査をお引き受け頂き、多くのご助言ならびご指導を賜りました県立広島大学大学院総合学術研究科 北台靖彦教授、原田俊英教授、谷本昌太教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際して、実験、解析、論文作成に至るすべての段階で終始、多大なるご指導、ご助言を賜りました、県立広島大学健康科学科 山岡雅子教授、東洋大学食環境科学科 大上安奈准教授、県立広島大学健康科学科 鍛島秀明助教、に厚く御礼申し上げます。とくに鍛島先生には、研究に向かう姿勢や研究に関する具体的な方策まで丁寧に教えていただき、公私にわたって常に温かい励ましの言葉、多大なるご助言、ご協力を賜りました。心から御礼申し上げます。

また、本研究の実験データは県立広島大学運動生理学研究室に在籍した名村紗希、森本真里奈、上村早織、本間あゆみさんをはじめとした卒研究生の皆さんのご協力によって精力的に積み重ねられました。ここに記して感謝の意を表します。