

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11467

研究課題名(和文) 動脈血管内皮機能の新たな測定評価手法の開発とその応用

研究課題名(英文) Development and application of a new method for measuring and evaluating arterial vascular endothelial function

研究代表者

福場 良之 (Fukuba, Yoshiyuki)

広島国際大学・健康スポーツ学部・教授

研究者番号：00165309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮機能の低下は動脈硬化発症の端緒となり、その機能性の評価は重要である。現在、反応性充血現象を利用して血管内皮へシエアストレス(SS)刺激を与え、その血管拡張を測定して、機能性の良否を評価する方法が一般的である。同法には測定試行毎にSS刺激が個人間・内で同一に制御できないという大きな課題が存在する。そこで本研究では、これを解決し、包括的な血管内皮機能評価法を開発した。具体的には、多段階の一定SS刺激を与える手技、ならびに測定結果をシグモイド曲線に当てはめて評価する方法の開発である。本研究で開発した方法の妥当性と応用性(トレーニング実験)について検討したところ、すぐれた結果をえた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化発症の第一歩は、血管内皮細胞の「軽微な」機能低下から生じる。従って、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、心血管性疾患の発症や進展を抑える上で極めて重要で、その機能を簡便に測定、評価する必要がある。現在、ヒト血管内皮機能性の評価にはFlow Mediated Dilation(FMD)法が広く適用されてきているが、いくつかの課題が残されている。そこで本研究では、現行法の課題を解決した新たな測定評価手法を開発し、その妥当性や応用性を検討したところ、極めて良好な結果を得た。本研究で提案された新たな手法が普及し、より広く利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It is important to evaluate the functionality of the endothelium, since a deterioration of vascular endothelial function is a precursor to the onset of atherosclerosis. Currently, a common method for evaluating endothelial function is to apply an impulse-like shear stress (SS) stimulus to the vascular endothelium using the phenomenon of reactive hyperemia and measure the degree of the vasodilation. This method has a major substantial problem in that SS stimulation cannot be controlled identically between and within individuals at each measurement trial. In this study, we solved this problem and proposed a novel and comprehensive method alternatively. Specifically, this method involves the development of a technique that applies constant SS stimulation in multiple stages and an evaluation strategy that fits the measurement results to a sigmoid curve. The validity and its applicability (using the exercise training experiment) of the method were verified.

研究分野：運動生理学

キーワード：運動 血管内皮機能 運動トレーニング 測定評価方法

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の中で、心血管性疾患の発症や進展には動脈硬化が深く関与する。動脈硬化発症の第一歩は、血管内皮細胞の「軽微な機能低下」から生じる (Green et al., 2017)。従って、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、心血管性疾患の発症や進展を抑える上では極めて重要となる。

ヒトの血管内皮機能性の評価には、伝導血管の上腕動脈 (BA) を対象に、Flow Mediated Dilation (FMD) 法が広く適用されている。その背景にある生理的機序は、以下である (Thijssen et al., 2011)。BA 内での血流が増大すると、壁面の血管内皮細胞に対する力学的刺激 (内壁に生じるずり応力刺激: シェアストレス) となり、内皮細胞から血管拡張物質 (主に NO) が放出され、血管平滑筋へ作用して血管拡張が起こる。この一連の作用を "NO bioavailability" 以下、NO-ba と略記) という。同じシェアストレスを血管壁に与えても、血管拡張の程度に違いが生じるので、それに基づいて、血管内皮機能性 [NO-ba の良否] を評価する。

その具体的な測定は、超音波ドップラ法で BA の血流速度 (BV) と血管径 (D) を連続測定中に、前腕部をカフで 5 分間の阻血後に開放し、その直後に急増する血流 (反応性充血, reactive hyperemia: RH と呼ばれる現象)、すなわち、インパルス状なシェアストレス (その定量的指標は Shear Rate (SR) = BV/D) 増大が刺激となって、血管径がどの程度、最大拡張するか (D) によって、機能性を評価する。評価指標は、阻血前 D に対する最大血管拡張率 (%FMD: (D/D) × 100) で、機能性が高いほど %FMD が大きくなる。本研究では、この RH 操作による測定評価法を RH-FMD 法と呼ぶ。

RH-FMD 法による血管内皮機能性評価の前提は、RH 操作 (5 分間阻血) で「同一な」SR 刺激を血管内皮細胞に与え、その応答として生じる血管拡張の程度の違いに基づいて血管内皮機能性の良否 (NO-ba の良否) を評価するという考え方に立脚しているが、以下に述べるような、大きな問題点が指摘されている。まず、同じ RH 操作を行っても、当然ながら、インパルス状に急増する SR の様相 (その大きさと時間推移) は、測定試行間 (対象者内・間、介入実験条件間) で同一にはならない。対象者間を例にすると、各対象者の D (カフ阻血前)、さらにカフ解放後の SR 様相には当然、かなりの個体差がある。この点は、早くから Atkinson ら (2013) が指摘しており、克服すべき課題として関連研究者間では広く共有されている。そこでとりあえずの便宜的な補正として、最大血管拡張が出現する時点までの SR を積算し (図 1)、その値で %FMD を除す方法がすでに提案されているが、未だ本質的な解決には至っていない。なぜなら、仮にこのような補正法を用いたとしても、背景にある NO-ba の生理的機序と補正法の間にはあきらかな曖昧さが残る。NO-ba の応答 (SR 刺激 内皮 NO 放出 平滑筋弛緩 D 拡張) は、一定の時間を要する過程 (cascade) である。従って、どの時点の SR 刺激がどの程度の遅れ時間の後に D の変化を起こすのかを考慮する必要がある。例えば D の最大拡張 (D) の出現時点直前の SR は D 出現時点よりかなり後の血管拡張を引き起こすはずである。この NO-ba 過程上の時間遅れ要因が、現在の RH-FMD 法の補正ではまったく考慮されていない。このような根本的な問題点が、RH-FMD 法には未だに残っている。

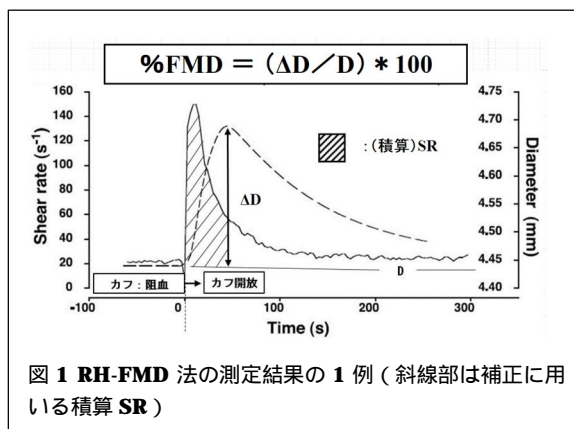


図 1 RH-FMD 法の測定結果の 1 例 (斜線部は補正に用いる積算 SR)

## 2. 研究の目的

現在の RH-FMD 法が有する課題を解決するためには、発想の転換が必要であると考えられる。本研究では、RH-FMD 法で用いられてきたインパルス状な SR 刺激ではない別な刺激方法を採用し、かつ、より包括的に血管内皮機能性を評価できる方法の開発を主目的とする。その根幹をなすのは、被験者内であれ、被験者間であれ、測定試行間で「同一な」SR で血管内皮細胞を刺激するという発想である。RH-FMD 法で用いるインパルス状な、試行間で「同一でない」SR 刺激ではなく、一定時間にわたって「同一な」値が継続するステップ状な SR 刺激を実現し、それへの応答である血管拡張が最大定常状態に至った時点での D を測定すれば、NO-ba の時間的遅れに起因する諸課題を解決できることを着想した。このようなステップ状 SR 刺激に基づく方法を、我々は「SS(sustained stimulus)-FMD 法」と呼ぶこととする。

さらに、単一な値によるステップ状 SR 刺激を行うだけでなく、異なる SR の値でも同様に行う、多段階の SS-FMD 法を課すことで、SR と D の関係を 1 つの図上にプロットすることが可能になり、その 2 次元関係によって、対象者それぞれの血管内皮機能性をより包括的に評価できる画期的な手法の提案を試みることにした。具体的には、いくつかの SR 値を横軸に、それぞ

れで到達した血管径  $D$  の定常値を縦軸にプロットすれば、血管内皮機能特性の全体像を簡単に評価できるはずである。おそらく両者の関係はシグモイド曲線で表現されると予想され、その数学的性質に基づくことで、機能特性をより包括的に理解することが可能になるものと考えられる。

本研究の具体的な目標は、多段階（マルチステップ）な **SS-FMD** 法を行うことができる操作手技の開発ならびに提案、またその結果へのシグモイド曲線近似による評価法の提案、を実現することである。この新たな発想による血管内皮機能性の総合評価方法の開発が実現できれば、従来の **RH-FMD** 法を大きく凌駕する手法となる。

従って、本研究の構成は以下に要約される。まず、多段階 **SS-FMD** 法の開発ならびに確立において根幹をなす検討課題である、ステップ状な一定 **SR** 刺激を実現する操作手技として、「**掌握（HG）運動**」と「**温熱刺激とカフ操作の組み合わせ**」の2つの手技を試みる。その結果に基づき、より簡便に実現可能な手技を選択・決定する。さらに得られた測定結果をシグモイド曲線へフィッティングすることで、包括的な血管内皮機能の解析・評価方法を新たに提案する。提案された多段階 **SS-FMD** 法による血管内皮機能の新たな評価法の一つの応用例として、運動トレーニング実験による効果の検証を実施する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 測定法開発を目的とした2つの手技の検討

SS-FMD 法の開発において根幹をなす検討課題である、ステップ状な一定 **SR** 刺激を実現する手技として、「**掌握（HG）運動**」と「**温熱刺激とカフ操作の組み合わせ**（以下、「**温熱刺激+カフ操作**」と呼称）」の2つの手技について検討を行った。

被験者は、健康な若齢者 26 名がボランティアとして実験に協力した。以下で述べる SS-FMD を実現する手技を実施している間、超音波診断装置を用いて、上腕動脈（BA）の横断面画像による血管径（ $D$ ）とドップラ法による血流速度（ $BV$ ）が連続的に測定された。

##### 掌握（HG）運動

仰臥位の被験者は、肘を伸ばした状態で、5 段階程度の強度で **HG** 運動を行った。**HG** 運動中は、発揮張力（ $F$ ）をリアルタイムでモニタできるような表示システムを構築した。事前に、各被験者は 3-4 段階の負荷強度で **HG** 運動を行い、BA の  $D$  と  $BV$  を計測し  $SR (= BV/D)$  を算出した。3-4 段階の  $F - SR$  間の比例関係（求められた回帰直線）に基づき、 $SR$  が約 25 ~ 150 の間で 5 段階程度になる  $F$  値を決定した。

本測定において、被験者は目標の一定  $SR$  になる  $F$  値の強度が示されたモニタをリアルタイムでみながら、その値に合うよう発揮張力  $F$  を微調整しながら 3 分間の **HG** 運動を行った。10 分の回復時間において、次の目標  $SR$  に相当する  $F$  での **HG** を行った。このようにして、徐々に目標  $SR$  が高い同様な **HG** 運動を繰り返していき、**HG** 運動による多段階 **SS-FMD** 法への適用の可能性を探った。

##### 温熱刺激+カフ操作

仰臥位の被験者は、肘を伸ばした状態で前腕部（肘下にはカフ装着）を恒温水槽内に静置した。その後、前腕部カフを 200mmHg に一気に加圧し阻血したまま、恒温水槽へ 43 °C の温水を 2 分間かけて注水した。5 分後に、熟練した実験者が圧力微調整弁を操作して、カフ圧を少し減圧して阻血を部分解除し、リアルタイム表示される平均  $BV$  が、 $SR$  が約 25 に相当する  $BV$  値にほぼ一致し保持できるよう、微妙な圧制御を行いながら、3 分間維持した。その後、カフを加圧し阻血状態に戻して 5 分間維持した後、再び 1 回目よりやや大きな減圧操作を行い、 $SR$  が約 50 相当な  $BV$  値になるよう、同様な圧制御を行いながら 3 分間維持した。図 2 にその一例を示した。この例では、設定  $SR$  が約 50 でステップ状に血管内皮へ刺激を与えると、血管径  $D$  は急速に拡張して約 2 分程度で定常状態に達することがわかる。

このような操作を繰り返すことで 6-7 段階の一定  $SR$  (75, 100, 125...) 刺激を実現し、温熱刺激 + カフ操作

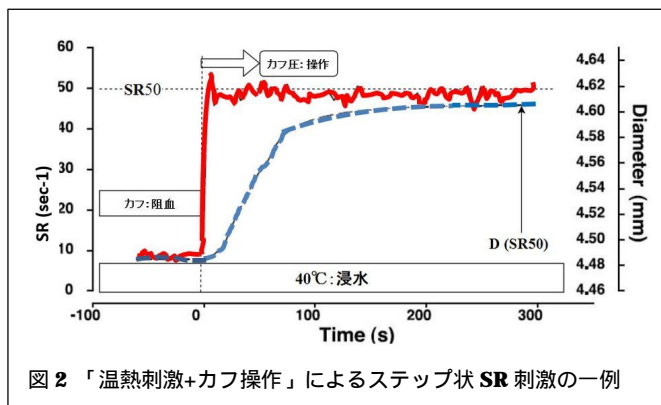


図 2 「温熱刺激+カフ操作」によるステップ状 **SR** 刺激の一例

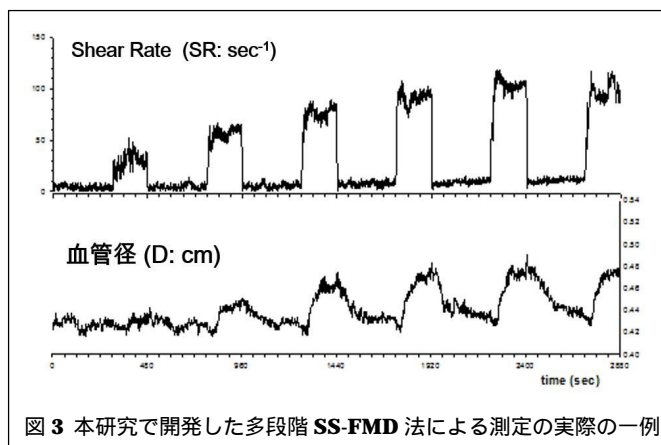


図 3 本研究で開発した多段階 **SS-FMD** 法による測定の実例の一例

による多段階 SS-FMD 法への適用の可能性を探った。なお、図 3 に、間欠的かつ漸増的な SR のマルチ負荷刺激（上段）とその際の血管径 D の反応の一測定例を示した。

両手技で、目的とする広範囲の SR 値をステップ状で負荷すること、また、その目標 SR を徐々に高くしていく多段階負荷の実現性を、測定法への実装という観点から検討した。結果として、後者の手技、すなわち前腕部を水槽（温水）へ浸水した上で、同時に操作者が熟練したカフ圧操作を行って目標とする一定 SR 値を 3 分負荷する手技、すなわち「温熱刺激+カフ操作」を採用することとした。HG 運動による手技を選択しなかったのは、運動による BA 血流への代謝的な影響要因の関与をうまく除去することができないと判断された点が一番大きな理由であった。また、HG 運動のみでは、目的とした刺激を与えたい SR の範囲の中で、特に後半の高い SR の値を実現する運動強度（F の値）の設定が極めて困難であった点も実装上、問題であった。すなわち高い SR 刺激を与えるための運動強度が高くなりすぎて、実現できない点が障害となった。従って、これ以降は、「温熱刺激+カフ操作」による一定 SR 値での刺激 3 分間を、連続的に多段階で実現する手技を採用して、開発を推進した。

## （2）応用例としての運動トレーニング実験による検証

実験 1 と同じ被験者 26 名を、トレーニング（T）群 11 名と対照（C）群 15 名にランダムに群化した。運動トレーニングは、血管内皮機能の改善効果がすでに知られている持久性として、脚自転車エルゴメータによる運動（運動強度：心拍数が約 130 拍/分相当）を 60 分連続して行い、これを週に 3 回の頻度で、4 週間継続した。この 4 週間の介入前後に、本研究で開発した多段階 SS-FMD 法（上記 3-1-3-2 に記載）を用いて血管内皮機能を評価した。参考として、従来の RH-FMD 法による評価も併せて行った。また、自転車エルゴメータによるランブ負荷運動テストも実施し、基本的なガス交換諸量を測定し、実施した持久性トレーニングで想定される効果の確認を行った。

## 4. 研究成果

### （1）多段階 SR-D 関係へのシグモイド曲線近似

図 3 に例示したような、各被験者で測定した、多段階ステップ状な SR 値刺激と血管拡張反応 D の関係性を検討するために、各ステップ刺激における最後の 1 分間の SR と D の平均値を算出してプロットした。その一例を図 4 に示す。図中の左側の 2 つの図で示したように、5 段階の一定 SR 値でのステップ状刺激に対する血管径 D の反応はほぼ 2 分以内で定常を示しており、刺激なしの条件を加えた 6 条件での値を D-SR 平面上へプロットしたものが右側の図となる（プロットの意味をわかりやすく説明するために、左の 2 つの図から、右図への対応関係を破線でそれぞれの条件別に明示）。この右図のプロットに対して、シグモイド曲線を近似した。

ここで、シグモイド曲線とは、 $D = y_0 + a / (1 + \exp(-(SR - x_0) / b))$  で、4 つの未知のパラメータは、非線形最小二乗近似（Sigma-Plot）で推定した。データのフィッティングは相関係数（r）で評価した。同曲線の数学的性質（特性）から、最も重要な指標である感受性（S：同一 SR 増加に対する最大血管拡張能、シグモイド曲線中央部の最も高い接線の勾配に相当）は、 $S = a / (b \cdot 4)$  で算出される。同様に、閾値（Thr）や飽和（Sat）といわれる指標も、 $Sat = x_0 + 2 \cdot b$ 、 $Thr = x_0 - 2 \cdot b$  として求めることができる。結果として、多段階 SS-FMD 法による SR-D 関係へのシグモイド近似は、全被験者において高い適合性を示した（ $r = 0.956 \sim 1.000$ ）。

図 4 で示した 1 例をとりあげて説明すると、シグモイド曲線近似（ $r = 0.9996$ ）で推定された指標は、感受性（S）： $0.08345 (10^{-2}; \text{cm}/\text{sec}^{-1})$ 、Sat： $95.75 (/ \text{sec}^{-1})$ 、Thr： $34.27 (/ \text{sec}^{-1})$  であった。特に興味もたれる指標は感受性（S）であるが、被験者全員からえられた結果は、 $0.033 \sim 0.138$  の範囲にあり、平均  $0.072$ （標準偏差： $0.029$ ）であった。

### （2）運動トレーニング実験による検証

持久性トレーニングの効果としてもっとも基本的な評価指標である体重当たりの  $\text{peak}\dot{V}O_2$  の結果をみると（表 1）、想定通りに 4 週間のトレーニングの前後（Pre：実施前、Post：実施後）で、トレーニング群では有意な増加が認められたが、対照群には有意な変化はなかった。同様な

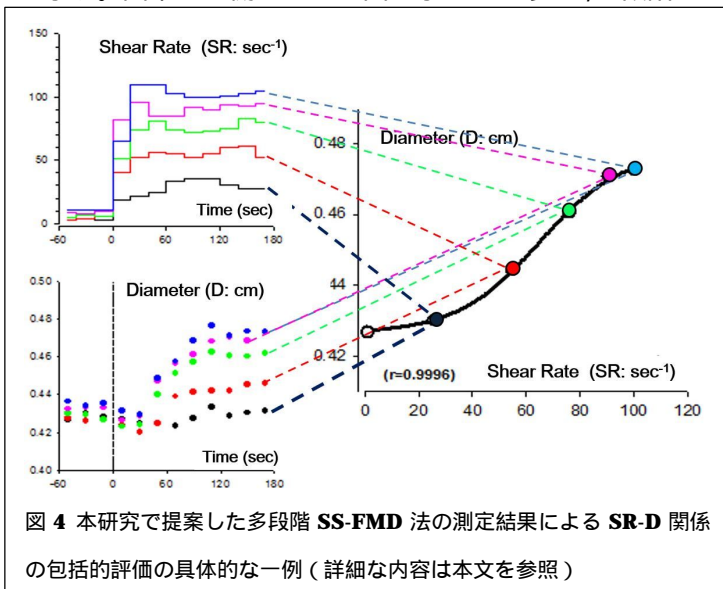


図 4 本研究で提案した多段階 SS-FMD 法の測定結果による SR-D 関係の包括的評価の具体的な一例（詳細な内容は本文を参照）

ことはランブ負荷での到達した運動強度 (peakWR) でも認められた。到達心拍数 (peakHR) には有意な変化はなかった。

次に、従来の血管内皮機能評価法である RH-FMD 法による %FMD の結果をみると (表 1), トレーニング群, 対照群共に, その前後で有意な変化は認められなかった。一方, 本研究で提案した SS-FMD 法による感受性 (S) は, トレーニング群でのみ, トレーニング前に対して, トレーニング後に有意な増加, すなわち感受性の亢進が認められた (図 5)。これは, 高い SR 刺激領域において, トレーニング群のみ, 血管拡張能がより大きくなっていったことが主な理由であった。

表 1 トレーニング実験前後における測定項目の結果 (平均 ± 標準偏差) [\* : vs. Pre, P<0.05]

測定項目	対照群		トレーニング群	
	Pre	Post	Pre	Post
peak $\dot{V}O_2$ (mL/min/kg)	38.2 ± 7.3	37.3 ± 6.9	36.5 ± 4.4	38.8 ± 4.5*
peakWR (W)	213.2 ± 64.7	212.2 ± 64.2	203.2 ± 26.6	226.5 ± 34.3*
peakHR (bpm)	186.3 ± 8.8	188.3 ± 7.7	188.6 ± 7.5	190.8 ± 8.3
%FMD [RH-FMD] (%)	7.09 ± 2.68	7.39 ± 1.64	7.52 ± 2.98	6.96 ± 2.70

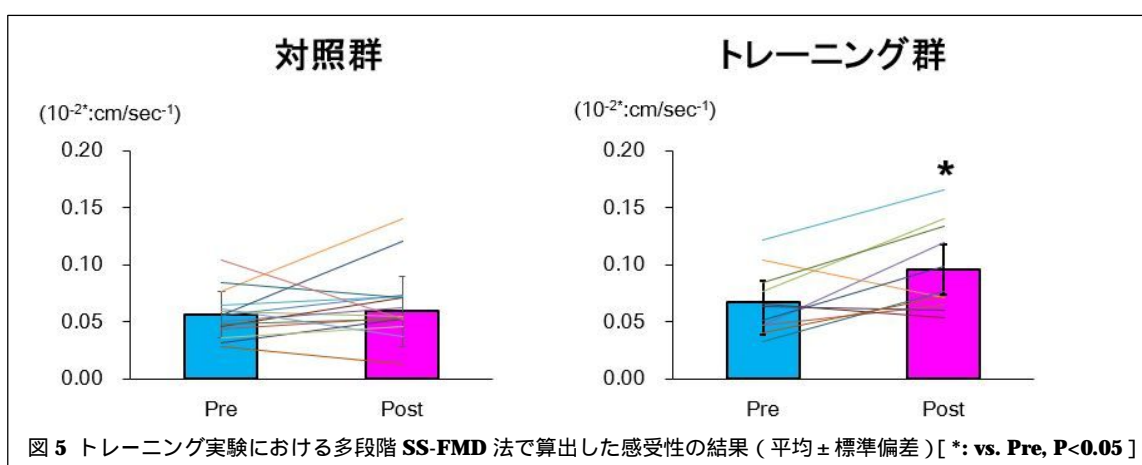


図 5 トレーニング実験における多段階 SS-FMD 法で算出した感受性の結果 (平均 ± 標準偏差) [\* : vs. Pre, P<0.05]

本研究全体を統括すると, 現行の RH-FMD 法の問題点を解決するために, 新たな多段階 SS-FMD 法を開発した。その方法の妥当性を検討したところ, 良好な結果を得た。また, 提案した方法の応用として, 運動トレーニングによる抗動脈硬化作用に対する適用を試み, 従来法である RH-FMD 法では検知できなかった血管内皮機能の改善を, 提案した指標, 感受性 (S) を用いることで, それをより鋭敏に検知できることを示した。これらの結果により, 本研究で提案した多段階 SS-FMD 法は, 新たな血管内皮機能の包括的な評価法になりえることを示した。

#### 引用文献

**Green DJ, Hopman MT, Padilla J, and Laughlin MH, Thijssen DH: Vascular adaptation to exercise in humans: Role of hemodynamic stimuli. *Physiol Rev.*, 2017; 97:495-528**

**Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, Parker B, Widlansky ME, Tschakovsky ME, and Green DJ: Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2011; 300:H2-12**

**Atkinson G, 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**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kohei Miura, Hideaki Kashima, Saki Namura, Marina Morimoto, Masako Y. Endo, Anna Oue & Yoshiyuki Fukuba	4. 巻 30
2. 論文標題 Effects of cooling or warming of the distal upper limb on skin vascular conductance and brachial artery shear profiles during cycling exercise	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Research in Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 308-324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15438627.2021.1872573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 2.Miura K, Kashima H, Morimoto M, Namura S, Yamaoka Endo M, Oue A, Fukuba Y	4. 巻 28
2. 論文標題 Effects of Unilateral Arm Warming or Cooling on the Modulation of Brachial Artery Shear Stress and Endothelial Function during Leg Exercise in Humans.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb.	6. 最初と最後の頁 271-282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.55731.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fukuba, Y., Kashima, H., Nishitani, N., Miura, K., Endo, M.Y.
2. 発表標題 The high carbohydrate-induced impairment of endothelial function is suppressed by the following intermittent exercise
3. 学会等名 28th Annual Congress of the European College of Sport Science（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	山岡 雅子（遠藤雅子）  (Yamaoka Masako)  (30336911)	県立広島大学・人間文化学部・教授    (25406)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鍛島 秀明  (Kashima Hideaki)  (40714746)	県立広島大学・人間文化学部・准教授    (25406)	
研究分担者	林 直亨  (Hayashi Naoyuki)  (80273720)	早稲田大学・スポーツ科学学術院・教授    (32689)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	三浦 康平  (Miura Kohei)  (70801679)	愛知県立大学・看護学部・講師    (23901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関