

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2005～2008

課題番号：17207022

研究課題名（和文） 環境適応能における血流調節機構の生理的多型性に関する研究

研究課題名（英文） Physiological polymorphisms of blood flow regulation in environmental adaptability

研究代表者

工藤 奨 (KUDO SUSUMU)

芝浦工業大学・工学部・准教授

研究者番号：70306926

研究成果の概要：

ヒトは様々な環境下において生理的な応答をおこなう。その応答には個体差が存在し、その生理的な応答の個体差を解明することは困難を極めている。そこで、本研究では、低温環境での血液循環系の生理応答に絞り、個体差がどのようなメカニズムに起因しているかに関して、ヒトの直接計測から細胞・タンパク質計測をおこない、マクロからミクロに至るまで統合的に解析した。その結果、個体差発生に関連する要素を抽出することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2006 年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
2007 年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2008 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
総計	38,200,000	11,460,000	49,660,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：人類学・応用人類学

キーワード：生理人類学，生理的多型性，環境適応能

1. 研究開始当初の背景

生理人類学研究においては、様々な環境下におけるヒトの生理的多型性に関する解明がおこなわれてきた。しかしながら、生理的多型は遺伝的多型と異なり、複数の要素が絡むためその理解は困難を極める。

本来、ヒトに対して要素還元論を適用し議論することは困難であり、創発メカニズムが強く働く脳などでは特に困難である。一方で、遺伝子-タンパク質の関係の様に、要素還元論により有益な情報を獲得してきたことも事実である。ヒトを理解する上で、本来的に

は創発の概念が適用されるべきであるが、現状では、創發現象を解析することは極めて困難である。したがって、要素還元解析が有効な範囲で還元的解析を進めることは、最も信頼性の高い研究方法と考えられる。

特に、ヒトに限らず基本的な生命システムである血液循環系に関しては、要素還元論を適用する範囲が広く、生理的多型に関わる要素を抽出する事が可能であると考えられる。そして要素抽出のためには、マクロからミクロまで細分化された階層の実験が必要となってくる。

2. 研究の目的

低温環境下にヒトが曝露されたことを想定し、血管組織の収縮・弛緩に関連する因子をヒト個体群のマクロレベルから、細胞、タンパクなどのミクロレベルの階層に分けて解析することを目的とする。ヒトの指などの局所部位では極度に冷却がされた場合、血管収縮の約 5-10 分後に Cold-induced vasodilation (CIVD) という血管の拡張反応が起こる。本研究では、この CIVD の個体差発生メカニズムについて検討をおこなった。

3. 研究の方法

(1) ヒト個体群の CIVD 測定

生理機能は全身的協働の観点から進めることが、多型性解析には有効であると考えられる。そのために本研究では血流や温度以外の項目に関しても計測をおこなった。

被験者は左右の手の第3指の末節の腹側にレーザー Doppler 血流計 (FLO-C1: OMEGAFLOW) に接続した計測深度 1.0 mm の血流速度プローブ (EG 型, ML 型: OMEGAFLOW) と皮膚温度トランスデューサ (TSD202F: BIOPAC SYSTEMS INC.) をサージカルテープで固定した。右の皮膚温度トランスデューサは水温の影響を減らすために指に接する部分以外を断熱材で覆った。また、胸部に肺呼吸トランスデューサ (TSD201: BIOPAC SYSTEMS INC.) をバンドで取り付け、左右の手首及び右足首には第 I 誘導に基づき電解質ジェル (GEL102: BIOPAC SYSTEMS INC) を満たした心電図トランスデューサ (EL258s, EL258: BIOPAC SYSTEMS INC.) をサージカルテープで取付けた。それぞれのトランスデューサは専用アンプ (SKT100C, RSP100C, ECG100C: BIOPAC SYSTEMS INC.) に接続し、データ収集解析システム (MP150: BIOPAC SYSTEMS INC.) に接続した。測定したデータは解析ソフトウェア (AcqKnowledge: BIOPAC SYSTEMS INC.) にサンプリングレート 200 Hz で取り込んだ。

実験室の温度は高温(室温 28°C)、常温(室温 25°C)、低温(室温 20°C) の 3 条件とし、被験者は 1 日 1 回、3 日間、各室温下で実験を行った。また湿度は常に 50% 前後とした。

CIVD に関して以下の項目を解析した。血流

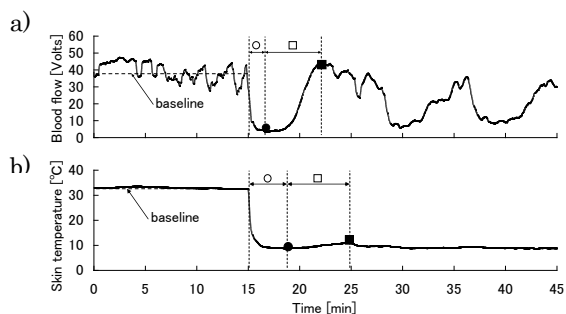


図 1 解析項目

量は 10 Hz にリサンプルし、30 秒で移動平均した波形、皮膚温に関しては原波形から図 1 に示した解析項目を求めた。また、血流量については更に max と baseline の比を取り、CIVD による回復の割合を評価した。

図中の記号は、a: 血流量, b: 皮膚温 冷水曝露前の 15 分間の平均値 (baseline), ●: 曝露後の最小値 (min), ■: CIVD による最大値 (max), ○: 曝露してから min までの時間 (min T), □: min から max までの時間 (max T) をそれぞれ示す。

(2) Wavelet 変換による血流波形解析

CIVD 時の内皮細胞、神経、平滑筋細胞、呼吸、心拍の影響を調べるために、ウェーブレット変換を用いて解析した。周波数分解したウェーブレット変換による血流量解析は Bracic et al. (1998) の方法に準じ、計測した血流量データを 40 Hz でリサンプルした後、100 秒で移動平均したデータで減じ、5Hz にリサンプルした。この波形に対して解析ソフト (BIOMAS: ELMEC Incorporation Limited) でウェーブレット変換を行った。

(3) 細胞・タンパクレベルでの計測

φ 60 mm のシャーレに血管内皮細胞を播種し、温度負荷の条件として 4°C, 28°C, 37°C の HEPES 溶液を加え、それぞれ 37°C, 28°C は気相インキュベータ、4°C は冷蔵庫内でインキュベートすることで温度負荷をおこなった。負荷時間はそれぞれの温度に対して 15, 30, 60 分とした。細胞を溶解し、電気泳動を行った後、ウェスタンブロット法を用いて総 eNOS (一酸化窒素合成酵素) 量とリン酸化 eNOS 量を測定した。さらに、各温度で 15 分, 30 分, 60 分 2Pa のせん断応力を負荷後、板ガラス上の細胞を溶解し、溶解液を回収した。

また、NOS 活性に関連ある血管内皮細胞のカルシウムイオン応答は 37°C で計測をおこなった。

4. 研究成果

本研究報告書においては、特にヒト個体群の成果に関して記述した。

(1) ヒト個体群の測定

① 環境温一定の場合の CIVD 反応

刺激前の血流量は各被験者で様々な値を示したが、低温刺激直後に血流量の減少に続く増加反応 (CIVD 反応) は全ての被験者で確認された。それぞれの被験者の刺激前の血流量の平均値と CIVD 反応時の血流量の最大値を比較したところ、大別して 2 つの型に分類することができた。図 2 の B の被験者のように、CIVD 反応により刺激前と同程度まで血流量が回復したタイプと刺激前の血流量を大きく上回るタイプ (図 2, I) が存在した。これらの反応を示す被験者の特徴として、B の型

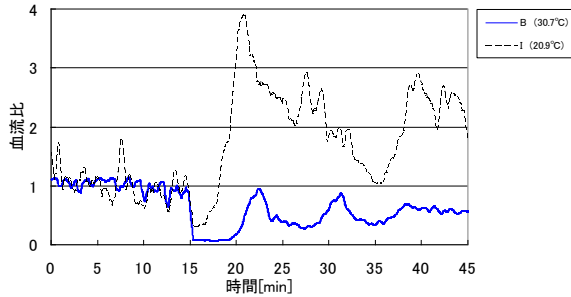


図2 CIVD 応答の2つの型

の被験者では刺激前皮膚温が室温 25°Cで 30°C前後であったのに対して、Iの型の被験者では20°C前後と低い値を示していた。これらのことから、CIVD反応の個体差メカニズムを明らかにするために、皮膚温を変化させた場合のCIVD反応を詳細に解析した。

②環境温(皮膚温)を変化させた場合のCIVD反応

CIVD反応は室温20°Cで18人、室温25°Cで18人、室温28°Cで16人の被験者で確認され、全ての室温下でCIVDを確認できた15人のデータを解析対象とした。また解析結果のエラーバーは、標準誤差を示し、Fisherの最小有意差法を用い有意水準5%(*), 1%(**)で検定した。

表1に実験前後に腋窩温の計測結果を示す。実験前後における体温の有意な変化は見られなかった。

表1 実験前後の腋窩温

	Air Temp.					
	20°C		25°C		28°C	
Body temperature	mean	SE	mean	SE	mean	SE
Pre-experiment	36.39	0.08	36.47	0.06	36.59	0.05
Post-experiment	36.23	0.08	36.44	0.06	36.67	0.04

図3に代表的な血流量と皮膚温の結果を示す。被験者の各室温下での右手の血流量(Blood Flow: BF)と皮膚温(Skin Temperature: ST)の計測結果である。各室温での冷水曝露前の皮膚温と血流量の平均値はそれぞれ、20°Cで18.6°C, 8.83 Volts, 25°Cで32.9°C, 39.05 Volts, 28°Cで34.3°C, 43.40 Voltsとなり、室温20°Cでは25°C, 28°Cの値と比較し、血流量では23%、皮膚温では57%低下した。また冷水曝露後、CIVDによる回復は、baselineに対して、最大値が室温28°Cでは1.19倍、25°Cでは1.16倍となり、baselineと同程度であったが、室温20°Cで

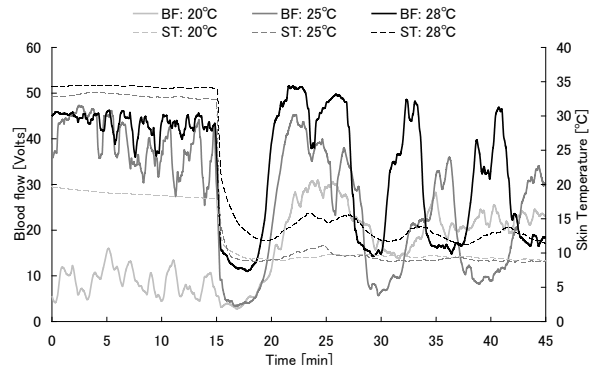


図3 各環境温下での血流量と皮膚温

は冷水曝露前と比較すると3.50倍となり、曝露前の値より高くなった。

図4に血流量、図5に皮膚温の各計測項目の解析結果を示す。皮膚温のmaxについてはCIVDの途中で減少し、更に増加する反応が観察されたため、増加後、最初の減少が始まる直前の最大値をとったものをmax1, max T1, CIVDの最大値をとったものをmax2, max T2とし、2つの評価方法を用いた(図5a, b)。

血流量のbaselineの値は、室温25°Cでは24.1±3.1 Voltsであったのに対し、20°Cでは11.3±2.7 Volts, 28°Cでは33.7±2.8 Voltsとなり、環境温度の違いによる変化が見られた(図4a)。また皮膚温のbaselineの値についても同様に、室温25°Cでは30.3±0.9°Cに対し、20°Cでは21.2±1.1°C, 28°Cでは33.2±0.4°Cとなり環境温度の違いによる変化が見られた(図5a)。このように冷水曝露前の皮膚温と血流量は、室温25°Cに対し、20°Cでは減少、28°Cでは増加した。

また、血流量のminとmaxの値は室温20°Cでは2.29±0.42 Volts, 26.2±3.1 Volts, 25°Cでは3.48±0.54 Volts, 30.0±2.7 Volts, 28°Cでは5.20±0.76 Volts, 34.3±2.3 Voltsとなった。室温28°Cでは20°Cでの値に対して、minは226.9%, maxでは131.1%となった(図4a)。皮膚温のminとmax1では各環境温間の有意な差はなかったが、CIVDの最大値を取ったmax2の値がそれぞれ、室温20°Cで11.1±0.5°C, 25°Cで11.8±0.7°C, 28°Cで13.5±1.0°Cとなった(図5a)。

血流量のmax Tの時間は、室温20°Cでは375±37 sec, 25°Cでは332±22 sec, 28°Cでは276±18 secとなり、室温28°Cでは20°CよりCIVDによる最大値までの回復が早くなった(図4b)。皮膚温のmin Tの時間は、室温20°Cでは333±20 sec, 25°Cでは270±15 sec, 28°Cでは264±14 secとなり、室温28°Cでは20°Cに比べ、冷水曝露による最小値までの減少が早くなった(図5b)。

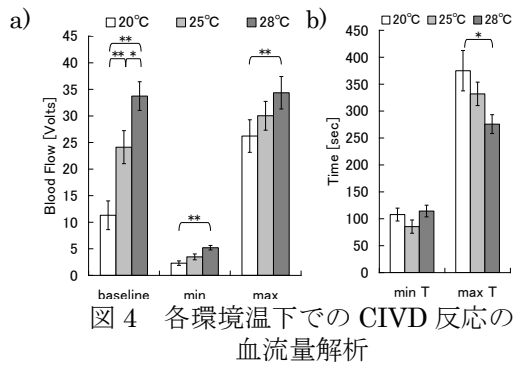


図4 各環境温下での CIVD 反応の
血流量解析

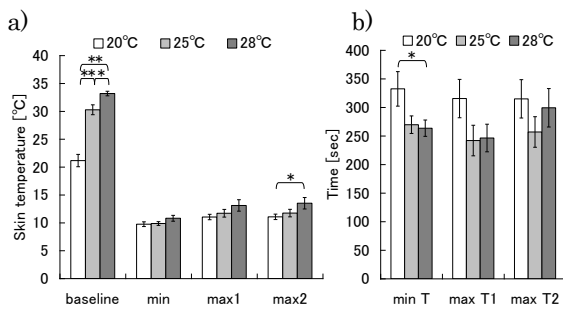


図5 各環境温下での CIVD 反応の
皮膚温解析

血流量の baseline と max の比を取り, CIVD による回復の割合を表 2 に示した. 室温 25°C では 1.58 ± 0.22 , 28°C では 1.10 ± 0.10 となり, 冷水曝露前と同程度の回復であったが, 室温 20°C では 3.72 ± 0.63 となり, CIVD による回復が 25°C の 2.4 倍, 28°C の 3.4 倍となり, 冷水曝露前の値を大きく上回る結果となった.

表 2 各環境温下での CIVD による
血流回復

	Air Temperature					
	20°C		25°C		28°C	
	mean	SE	mean	SE	mean	SE
max/baseline	3.72	0.63	1.58	0.22	1.10	0.10

従来 CIVD においては, 皮膚温計測が多かったが, 皮膚温計測からでは, 血流に関する詳細な情報は把握できない. 本研究において, 血流を詳細に解析することにより, 冷水曝露前に皮膚温が低いと曝露前より血流が増大する結果が示されたことは成果の一つであると考えられる.

③ ウェーブレット変換による血流応答解析

皮膚温の違いにより CIVD 反応に変化が生じたことから, その詳細を調べるために, 血流信号をウェーブレット変換し解析をおこなった. ウェーブレット変換により, 皮膚血流状態に影響を及ぼす 5 つの生理的要因を周波数帯で抽出できることが報告されてい

ることから, 各周波数帯を抽出することで, 解析をおこなった (血管内皮細胞: 0.0095-0.02 Hz, 神経活動: 0.02-0.06 Hz, 血管平滑筋: 0.06-0.15 Hz, 呼吸: 0.15-0.4 Hz, 心拍: 0.4-1.6 Hz). 血流量をウェーブレット変換し, 時間平均した結果の一例を図 6 に示した.

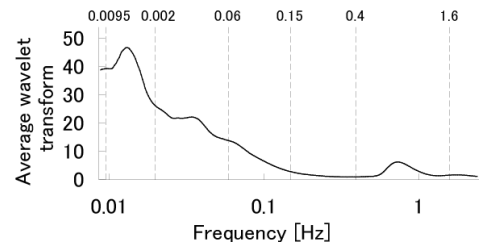


図 6 ウェーブレット変換による
血流信号の周波数分布

5 つの周波数帯の冷水曝露前後の相対エネルギーの変化を図 7 に示す. 室温 28°C において, 0.0095-0.02 Hz, 0.02-0.06 Hz, 0.06-0.15 Hz, 0.15-0.4 Hz, 0.4-1.6 Hz の各周波数帯の冷水曝露前 15 分間の相対エネルギーの平均はそれぞれ, 0.34, 0.38, 0.15, 0.02, 0.12 となった. 冷水曝露後 0.0095-0.02 Hz の周波数帯では 16.2 min に最大値 0.68 を示し, 102%増加した. 0.02-0.06 Hz の周波数帯では 17.7 min に最小値 0.062 を示し 83%減少した. 0.06-0.15 Hz の周波数帯に関しては, 16.8 min に最小値 0.015 を示し 90%減少した. 0.15-0.4 Hz の周波数帯においては, 冷水曝露後急激に増加し 15.0 min に 0.075 を示し 272%増加した. その後減少し 16.6 min で最小値 0.0057 を示し, 冷水曝露前の平均値から 72%減少した. 0.4-1.6 Hz の周波数帯においては冷水曝露後に急激に減少し 15.1 min に最小値 0.032 を示し 72.53%減少したが, その後増加し 18.5 min に 0.58 を示し, 冷水曝露前の平均値から 390%増加した.

20°C, 25°C においても 28°C と同様の傾向があり, 冷水曝露後では 5 つの周波数帯で増加や減少が起こり, 16-19 min の間にそれぞれの周波数帯で最大値, 最小値を示した (図 7). そこで, 冷水曝露前 12-15 min と, 冷水曝露後 16-19 min における, 相対エネルギーの環境温度間の比較をおこなった (図 8, 9). 図中 a) - e) は以下の周波数帯を示す. a: 0.0095-0.02 Hz, b: 0.02-0.06 Hz, c: 0.06-0.15 Hz, d: 0.15-0.4 Hz, e: 0.4-1.6 Hz

冷水曝露前 (12-15 min) では, 0.02-0.06 Hz の周波数帯において, 相対エネルギーの値が室温 20°C では 0.31 ± 0.03 , 25°C では 0.40 ± 0.04 , 28°C では 0.40 ± 0.02 となり, 室温 20°C の値が 25°C の値の 0.77 倍, 28°C の値の 0.78 倍となった (図 8b). 同様に 0.06-0.15 Hz

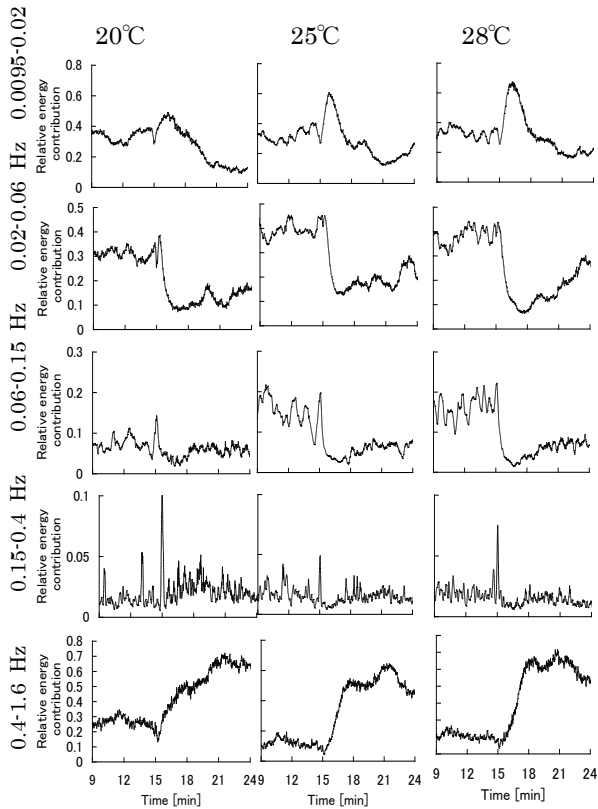


図 7 冷水曝露前後の相対エネルギー変化

の周波数帯においても、相対エネルギーの値が室温 20°Cでは 0.08 ± 0.01 , 25°Cでは 0.15 ± 0.01 , 28°Cでは 0.19 ± 0.02 となり、室温 20°Cでの値が 25°Cの値の 0.51 倍, 28°Cの値の 0.40 倍と低い値となった(図 8c).

これらのことから、環境温による皮膚温の低下は、神経活動及び平滑筋活動の関与が示唆され、非侵襲計測により血流調節因子の影響を推察することが可能となり、本研究による大きな成果の一つとなった。

冷水曝露後(16-19 分)の相対エネルギーは、0.02-0.06Hz の周波数帯において室温 20°Cでは 0.11 ± 0.02 , 25°Cでは 0.16 ± 0.03 , 28°Cでは 0.13 ± 0.03 , 0.06-0.15Hz の周波数帯において室温 20°Cでは 0.05 ± 0.01 , 25°Cでは

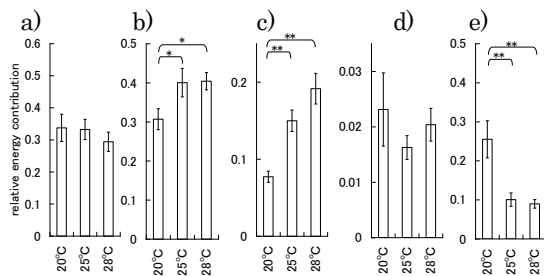


図 8 12-15min における相対エネルギー

0.04 ± 0.01 , 28°Cでは 0.03 ± 0.01 , 0.4-1.6Hz の周波数帯において室温 20°Cでは 0.42 ± 0.06 , 25°Cでは 0.40 ± 0.05 , 28°Cでは 0.32 ± 0.04 となりそれぞれの周波数帯で冷水曝露前に見られた差がなくなった(図 9b, c, e). しかし、0.15-0.4Hz の周波数帯では相対エネルギーの値は室温 20°Cでは 0.02 ± 0.01 , 25°Cでは 0.01 ± 0.00 , 28°Cでは 0.01 ± 0.00 となり、室温 20°Cでの値は 25°Cでの値の 2.34 倍, 28°Cの値の 2.48 倍となり高い値となり、呼吸の影響が表れた(図 9d).

Hansen ら(2000)は、NO が $\alpha 2$ 受容体を介す神経性血管収縮反応を鈍化させることを報告しており、NO の有無でノルアドレナリンの血管収縮への影響が変わることが示されている。冷水曝露後内皮細胞 0.0095-0.02 Hz の相対エネルギーに有意な差は得られなかったが、室温 28°Cにおいて、25°Cと 20°Cに比べ高い値が得られた(図 9a).

これらのことより環境温(皮膚温)の違いによる CIVD への影響には内皮の活性が関わっていることが考えられた。

④培養内皮細胞を用いての一酸化窒素合成酵素リン酸化計測

ヒトの直接計測より、冷水曝露時において内皮細胞の関与が示されたために、培養内皮細胞を用いて、温度と血流の影響を考慮して活性化 eNOS の測定をおこなった(図 10). セン断応力無負荷かつ 37°C の HEPES 溶液で 60 分インキュベートしたサンプルを活性化 eNOS の基準とした(Control).

37°C, 2Pa のせん断応力負荷 15 分後において、eNOS の活性化は Control に対して約 55% 増加したことから、この条件下では NO 産生が促進されると考えられた。28°Cでは、2Pa のせん断応力負荷 30 分後において、約 60% 増加したことから、同様に NO 産生が促進されると考えられた。

また 4°Cでは、2Pa のせん断応力負荷 60 分後、eNOS 活性化は 23.4%減少したことから、NO 産生が抑制されると考えられた。

培養細胞を用いた実験においても温度と流れの影響を受けて、eNOS のリン酸化が変化

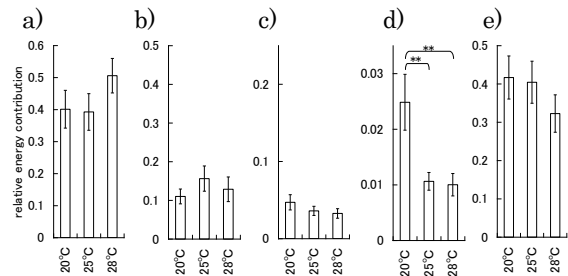


図 9 16-19min における相対エネルギー

することから、ヒトの血流計測から示唆されたように環境温の変化による局所血流調節に内皮細胞からのNOの関与が考えられた。

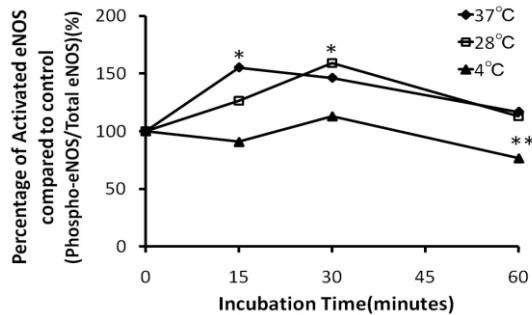


図 10 eNOS リン酸化に及ぼす温度とせん断応力の影響

ヒトの CIVD 反応は皮膚温により大きく二つの型に分類でき、皮膚温の違いはウェーブレット変換により神経活動および平滑筋活動に起因していると推察された。また、CIVD 反応の際には温度の影響を受けた内皮細胞からの一酸化窒素放出が関連していることがウェーブレット変換および培養内皮細胞を用いた結果より推察された。生理的多型のメカニズム解明には、複数の生理計測が必要であり、本研究においてもウェーブレット変換で示された項目のうち呼吸などは同時計測をおこない、血流のウェーブレット変換との相関がみられた。今後は、動物実験やマイクロレベルの実験を含めた多項目に渡るわたる計測をおこなうことで、より詳細な生理的多型のメカニズムを明らかにしていくことが可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- ① Susumu KUDO, Kaoru HOSOE, Makoto HOSOBUCHI, Naoto KAWASAKI, and Kazuo TANISHITA, ATP Release from Cultured Endothelial Cells and Intercellular Calcium Signaling During Shear Stress Exposure, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, Vol. 4 No. 2 (in press) 査読有
- ② Hitoshi Muguruma, Naoya Murata, Naoto Kawasaki, Shogo Kuretoke, and Susumu Kudo, Growth of Endothelial Cells on Surfaces Modified by a Plasma-Polymerized Coating, *IEICE Trans. Electron*, Vol. E90-C, 1844-1847 (2007) 査読有
- ③ Susumu Kudo, Ryuhei Yamaguchi, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, Effect of

Fluid Force on Vascular Cell Function, *J. Physiological Anthropology and Applied Human Science*, Vol. 24, pp. 459-461 (2005) 査読有

〔学会発表〕(計 34 件)

- ① Susumu Kudo, The Effect of Body temperature on the Hunting Response of the Finger Skin Blood Flow, The 3rd South East Asian Technical University Consortium Symposium (2009. 2. 25) Johor Bahru, Malaysia
- ② Susumu Kudo, Effect of fluid frictional force and low temperature on nitric oxide synthase activity in endothelial cells, 9th International Congress of Physiological Anthropology (2008. 8. 25) Delft, Netherland
- ③ Susumu Kudo, Effect of Low Temperature on Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase Activity, 8th International Congress of Physiological Anthropology, p17 (2006. 10. 12) Kamakura, Japan

〔図書〕(計 2 件)

- ① Susumu Kudo and Kazuo Tanishita, Human Variation - from the laboratory to the field, Chapter title: Chapter 2.3 Tissue and cell adaptability to physical and chemical factors, Taylor & Francis (in press)
- ② からだの百科事典, 丸善, 工藤奨 (分担執筆) (印刷中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤奨 (KUDO SUSUMU)

芝浦工業大学・工学部・准教授

研究者番号: 70306926

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

濱崎啓太 (HAMASAKI KEITA)

芝浦工業大学・工学部・准教授

研究者番号: 50348900

佐藤方彦 (SATO MASAHIKO)

九州大学・名誉教授

研究者番号: 10038937

岩永光一 (IWANAGA KOICHI)

千葉大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 70160124

福島修一郎 (FUKUSHIMA SHUICHIRO)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号: 40362644

世良俊博 (SERA TOSHIHIRO)

理化学研究所・生体力学シミュレーション特

別研究ユニット・協力研究員

研究者番号: 40373526