

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：11302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500771

研究課題名(和文) 運動開始直後の機械的血管拡張機構に及ぼす自発走運動と加齢の影響

研究課題名(英文) Effects of voluntary wheel running and aging on mechanical vasodilation of the feed arteries of rat soles muscle.

研究代表者

前田 順一 (MAEDA, Junichi)

宮城教育大学・教育学部・教授

研究者番号：40199617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、運動開始直後1秒程度で生ずる非常に速い血管拡張機構について、血管拡張を生ずる経壁圧変動の閾値に及ぼす自発走運動および加齢の影響を検討した。腓腹筋の収縮により機械的な圧迫を受けるヒラメ筋の供給動脈においては、血管拡張を生ずる経壁圧変動の閾値には自発走運動及び加齢の影響は認められないものの機械的な圧迫に対する血管拡張は自発走運動により有意に亢進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine the effects of 10 weeks of voluntary wheel running and aging on the threshold and amplitude of mechanical vasodilation in the feed arteries of rat skeletal muscle. The threshold transmural pressure of the mechanical vasodilation was 0 mmHg in cage control, VR and aged rats. The amplitude of mechanical vasodilation of the feed arteries in VR rats was significantly larger than that in cage control and aged rats ( $p < 0.001$ ). The amplitude of mechanical vasodilation was decreased significantly ( $p < 0.001$ ) following removal of the endothelium by air. These results indicate that the threshold transmural pressure of mechanical vasodilation of the soleus feed arteries was not altered by VR and aging, whereas the amplitude of mechanical vasodilation was increased by VR.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：運動性高血流 血管拡張機構 経壁圧変化 供給動脈 自発走運動 加齢 ラット

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 運動時の骨格筋血流量は安静時に比べて100倍にも増大する (Joyner MJ ら, *J Physiol* 583: 855 - 860, 2007)。運動時に著しく血流を増大 (運動性高血流 : exercise hyperemia) させる血管調節機構については19世紀後半より100年以上にわたり研究が続けられているが、その詳細は未だ明らかになっていない。筋原性・神経性・代謝性および機械的な多数の血管調節因子が存在し、骨格筋の血管網の空間的な部位や運動開始から運動終了・回復までの時間経過の中で個々の因子が多重に血管調節に関与していることが、これまでに明らかにされてきた (Rowell LB, *J Appl Physiol* 97: 383-392, 2004. Marshall JM, *J Physiol* 583: 835-845, 2007)。しかし、どの因子が、どの部位で、どの時点で、血流調節の主要な因子となるのかについては一致した見解が得られていない (Joyner MJ ら, *J Physiol* 583: 855-860, 2007)。また、運動性高血流の機序は、運動開始直後数秒以内に生ずる非常に速い血管拡張応答と、その後運動終了時まで血管拡張を維持する機構とに分けてられることも明らかになっている。

(2) 運動開始直後の血管拡張機構については、血管拡張物質が活動筋から血管へ拡散するには少なくとも4秒以上の時間を要することや、神経性の作動物質であるアセチルコリンやノルアドレナリンなどの拮抗薬の投与によっても血管の拡張現象に影響が認められないことから、神経性・代謝性の血管拡張機構ではなく、応答の速い他の機構が関与していると考えられる。Hamann JJ ら (*J Physiol* 557: 1013-1020, 2004)、Van Teeffelen JW ら (*Am J Physiol* 290: H119-H127, 2006) は、運動直後の血管拡張について単一の筋収縮であっても筋収縮終了直後には血管の拡張が生じていると報告している。また、Clifford PS ら (*J Physiol* 572: 561-567, 2006)、Kirby BS ら (*J*

*Physiol* 583: 861-874, 2007) は、切り出した血管周囲の灌流液の圧力や生体内の筋内圧を高めるなどの方法により筋収縮をともなわずに血管を変形させると一回の加圧であっても加圧後1秒以内に血管拡張が生ずることを明らかにしている。この点について、最近、Clifford PS ら (*J Physiol* 572: 561-567, 2006) は、運動開始直後1秒内に生ずる非常に応答の速い血管拡張について、筋収縮にともなう筋内圧の上昇が血管を機械的に変形させ、この血管の変形が何らかの機械的な変換 (mechano transduction) 機構を介して血管を拡張させると報告している。この機械的な血管拡張機構には、血管平滑筋の筋原性血管応答及び血管内皮細胞の機械的な圧迫にともなう血管内皮細胞からの一酸化窒素 (NO) の遊離が想定される (Clifford PS: *J Physiol* 583: 825-833, 2007) が、その詳細は明らかになっていない。今後、筋内圧の上昇にともなう骨格筋の細動脈に血管拡張を惹起する最小の血管外圧 (extravascular pressure) の閾値、血管の機械的な圧迫に対する血管応答に血管網内での部位差、運動開始直後から運動中の高血流維持期に到る過程で機械的な圧迫による血管拡張機構の関与の程度はどのように変化するのか、これらに対する自発走運動および加齢の影響はあるのか等の研究が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究においては、特に運動開始直後1秒程度で生ずる非常に速い血管拡張について、機械的な刺激変換 (mechano-transduction) 機構を中心に血管平滑筋に固有な筋原性血管応答から検討することを目的とする。さらに、運動開始直後の血管拡張に及ぼす持久性運動トレーニング及び加齢の影響についても検討することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 供給動脈の生体外標本作製

実験にはWistar系雄ラットを用いた。腹腔内への pentobarbital sodium ( 5 mg/100g body wt ) 注入により麻酔し、下腿三頭筋群を摘出した。牛由来血清アルブミンを含んだ Mops 緩衝生理食塩水 (PSS) を 4 °C に冷却し、摘出した下腿三頭筋群を浸漬した。さらに、生体顕微鏡下で内外側腓腹筋間を通るヒラメ筋への供給動脈 (長さ1~1.5 mm、血管径 100 ~150  $\mu$ m) を摘出した。摘出した動脈を先端径 100  $\mu$ m のガラスマイクロピペットが装着された加圧チャンバー内の PSS bath に移し、血管の上流側と下流側をそれぞれガラスマイクロピペットに挿入し、結紮した。マイクロピペットの上流側は微量注入装置に、下流側は血管内圧調節ポンプに接続した。その後、血管内圧を 80 mmHg、PSS を 37 °C まで徐々に上昇させ、基本的な血管緊張が回復し生体内の直径と同等 (100 ~ 150  $\mu$ m) になるまで約 60 分間の安定期を設けた。

## (2) 血管外圧 (経壁圧) の負荷

血管を装着した圧力チャンバー ( LSI 社製) を密閉し、電磁弁と加圧ポンプにより血管外の圧力を0~250 mmHg の範囲で、1 ~ 5 秒の加圧期と同程度の減圧期となるように矩形波様に変化させた。

まず、加圧の頻度の影響を見るために、250 mmHg の圧力を 1 秒間、1 秒間の間隔を開けて 1 ~ 10 回断続的に負荷した。次に20 ~ 250 mmHg の圧力を 200 mmHg までは 20 mmHg 刻みで、200 mmHg 以上は 25 mmHg 刻みで1 秒間負荷し、血管拡張が生ずる経壁圧の閾値を検討した。

以上の外圧負荷を血管内皮細胞が無傷の状態と血管内に 20 ml 程度の空気を還流させ、血管内皮細胞が傷つきアセチルコリンに対して血管拡張が生じないことを確認した状態で1匹のラットに1回ずつ繰り返した。

## (3) 血管径の計測

血管内圧をサーボポンプ ( LSI 社製) で 80 mmHg に調節しながら、倒立顕微鏡 (オリンパス社製) に接続した血管径測定装置 ( LSI 社製) により、経時的に計測した。血管内径、血管外圧、血管内圧及び血管外の灌流 PSS 温度を、A/D変換器を通してコンピュータに経時的に取込み、処理した。

## (4) 自発走運動の負荷

6 週齢のWistar系雄ラットをコントロール群 (Con) と自発走運動群 (VWR) に分け、自発走運動群は回転カゴの付いたケージにて飼育した。

VWR群の給餌・給水は自由摂取とし、Con群の給餌量をVWR群の体重と有意差が生じないように約 30 % 少なくした。照明は07:00 - 19:00 とし12時間ごとにタイマーにて自動消・点灯した。室温は22 ~ 24 °C に維持し、湿度は 40 ~ 60 % の間で除・加湿器により調整した。

## (5) 加齢ラットの作成

5 週齢で飼育室へ導入したWistar系雄ラットを70~72 週齢になるまで飼育し、加齢ラットを作成した。飼育条件は、室温を22 ~ 24 °C に維持し、湿度は 40 ~ 60 % した。照明は、07:00 - 19:00 の明期と続く12時間の暗期にタイマーにて自動消・点灯した。

## (6) 統計処理

結果はすべて平均値  $\pm$  標準誤差で示した。平均値の有意差検定には、二元配置の分散分析 (ANOVA) を用い、有意差が認められる時には Tukey の HSD検定を用いて多重比較検定を行った。有意水準は、危険率 5 % 未満とした。

## 4. 研究成果

(1) 血管内圧を 80 mmHg に保ちながら 1秒の 250 mmHg の矩形様血管外圧を1秒間の間隔で1~10回負荷したところ、1回 (1秒間) の負荷直後に無加圧時の血管径の 5~10 % の血

管拡張が生じた。負荷回数を増すとともに血管拡張は増大し、5~6回（5~6 秒間）の負荷で無負荷時の 20 ~ 50 % の血管拡張が生じた（Fig. 1）。外圧の負荷回数をさらに増加

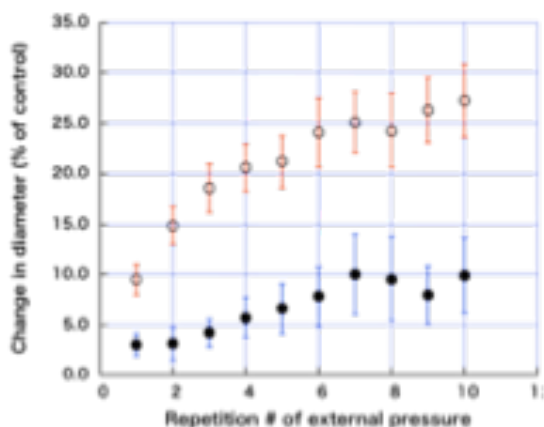


Fig. 1 Dilatation produced by repetational compression of intact (○) and endothelium-denuded (■) soleus feed arteries

させても血管拡張には影響しなかった。また、5秒間の250 mmHg の矩形様外圧を1回負荷した時の血管拡張は、1秒間の250 mmHgの矩形外圧を5 回繰り返した時よりも有意に低値を示し、血管外圧負荷による血管拡張は、外圧の負荷時間よりも負荷頻度に依存することが明らかになった。

(2) 負荷する血管外圧を 20 mmHg から徐々に漸増したところ、血管外圧により血管内径が減少しはじめる60 mmHg（経壁圧 - 20 mmHg）付近から負荷直後に5 ~ 7 % の血管拡張が生じ、200 mmHg 前後で10%の血管拡張が生じた（Fig. 2）。また、この血管拡張は

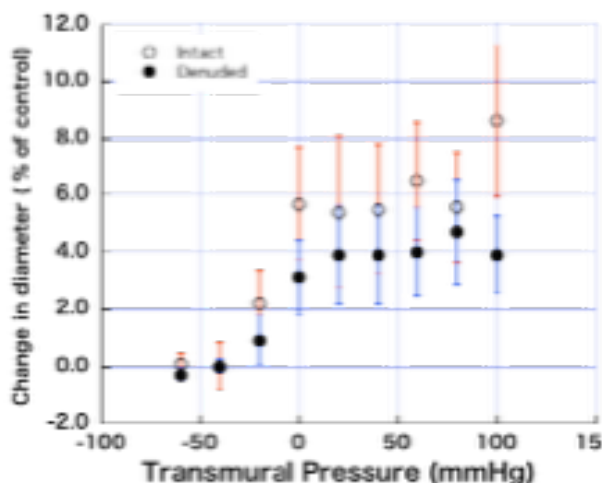


Fig. 2 Dilatation produced by gradual increase in transmurial pressure of soleus feed arteries

血管内皮細胞を傷害することで著しく減少したが、拡張反応が消えることはなかった。

以上の結果より、直径100  $\mu$ m 前後の供給動脈において、血管を変形させる60 mmHg 程度の血管外圧を短時間（1秒）負荷することにより、負荷直後に血管拡張が生ずることが明らかとなった。（3）1秒間の250 mmHgの矩形外圧を1 秒間隔で5 回以上繰り返した時に生ずる血管拡張は、自発走運動を負荷したラットで  $36.5 \pm 3.1 \%$  (19) であり、対照群  $26.2 \pm 1.48$  (80) および加齢群  $21.8 \pm 2.29$  (35) よりも有意に大きな増大を示した。しかし、control 群とVWR 群との間には有意な差異は認められなかった（Fig. 3）。各群

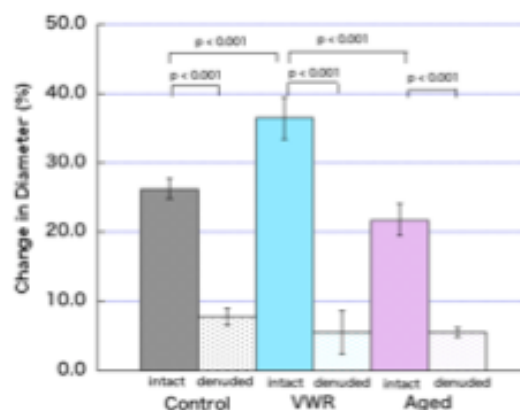


Fig. 3 Diameter responses to over 5 separate 1 sec pulses with 1 sec between each pulse of increasing extravascular pressure in the soles muscle arterioles. Responses were studied in control (young and sedentary) rats, VWR (young and voluntary wheel running) rats and Aged (old and sedentary) rats. Data are presented as means  $\pm$  SE.

内で無傷な内皮細胞条件よりも内皮細胞を傷つけた試行（Control:  $7.8 \pm 1.19 \%$  (60), VWR:  $5.49 \pm 0.98$ , Aged :  $5.51 \pm 0.68 \%$  (35) で、1秒間の250 mmHgの矩形外圧を1 秒間隔で5 回以上繰り返した時に生ずる血管拡張は、有意に（ $p < 0.001$ ）低下した。

(4) 20 ~ 250 mmHgの血管外圧力を 200 mmHg までは 20 mmHg 刻みで、200 mmHg 以上は 25 mmHg 刻みで1 秒間の矩形波様血管外圧を負荷したところ、Control群、VWR群およびAged群のラットの3群ともに血管外圧が 60 mmHg

(経壁圧 -20 mmHg) 以上から顕著な血管拡張が生じた。顕著な血管拡張を生ずる経壁圧は -20 ~ 0 mmHg であり、閾値としての経壁圧には、Cont群、VWR群およびAged群に有意な差異は認められなかった。負荷する血管外圧を 20 mmHg から徐々に漸増したところ、血管外圧により血管内径が減少しはじめる 60 mmHg (経壁圧 - 20 mmHg) 付近から負荷直後に 10 ~ 20% の血管拡張が生じ、200 mmHg 前後まで同程度の血管拡張が生じた (Fig. 4)。

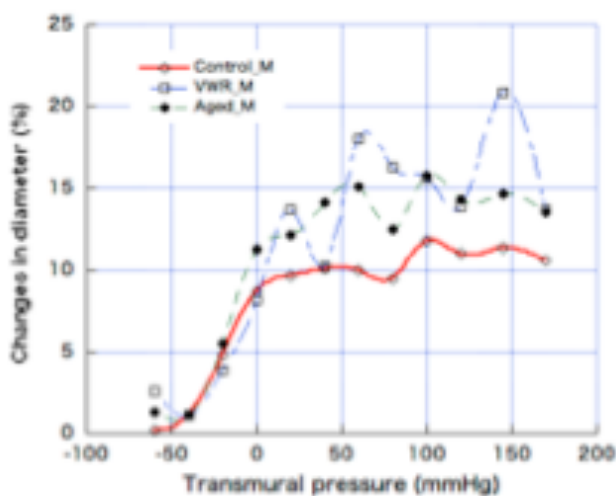


Fig. 4 Dilatation produced by gradual increase in transmural pressure of soleus feed arteries in control, voluntary wheel running (VWR) and aged rats.

(5) ヒラメ筋の供給動脈において、経壁圧が 0 mmHg になる 80 mmHg の血管外圧を短時間 (1秒) 負荷することにより、負荷直後に血管拡張が生ずること、1秒間の250 mmHgの矩形外圧を1 秒間隔で5 回以上繰り返した時に生ずる血管拡張は、自発走運動を負荷したラットで対照群および加齢群よりも有意に大きな増大を示すことが本研究により明らかになった。これらの知見は、Clifford PS ら (J Physiol 572: 561-567, 2006) およびKirby BSら (J Physiol 583: 861-874, 2007) の用いている 600 mmHg という1 秒間の矩形波様の血管外圧変化 (経壁圧では500 mmHg) よりも遙に低い血管外圧変化に対して血管拡張が生ずること

を明らかにした。また、1 秒間の血管外圧変化による血管拡張が血管内皮細胞を剥離することで著しく障害されることも先行研究と同様にみとめられたことから、筋収縮にともなう血管壁の変形による内皮細胞から産生される一酸化窒素 (NO) が一回の筋収縮にともなう血管拡張に重要な要因となっていることを再確認した。さらに、自発走運動により、血管拡張能が増大するが70週齢の加齢ラットでは有意に低下しないこと、血管拡張を生ずる最小の経壁圧変動 (閾値) は自発走運動および加齢により変化しないことを明らかにした。今後はさらにレジスタンストレーニングのおよぼす影響や生体内標本を用いた血流の再配分におよぼす影響等を検討する必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- 1) MAEDA Junichi, Regulation and adaptation of oxygen gradient and blood flow in skeletal muscle microcirculation. *Advances in Exercise and Sports Physiology*, non refereeing, 19 (4) 2013, 95.
- 2) MAEDA Junichi, Rapid vasodilation induced by mechanical factors in rat skeletal muscle feed arteries and arterioles. *Advances in Exercise and Sports Physiology*, non refereeing, 19 (4) 2013, 96.
- 3) MAEDA Junichi, KOMIYA Hideaki and SUZUKI Ishimatsu, Effects of voluntary wheel running on mechanical vasodilation of the feed arteries of rat soles muscle. non refereeing, *Advances in Exercise and Sports Physiology*, 19 (4) 2013, 111.

- 4) MAEDA Junichi, KOMIYA Hideaki and SUZUKI Ishimatsu, Effects of amplitude and frequency of transvascular pressure on vasodilation in rats soles feed arteries. non refereeing, Advances in Exercise and Sports Physiology, non refereeing, 18 (4) 2013, 102.

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 前田順一 (シンポジウム・オーガナイザー), 骨格筋組織の酸素代謝・微小循環の動態と適応, 第21回日本運動生理学会, 2013年07月27日~28日, 東京国際大学(埼玉県川越市) .
- 2) 前田順一 (シンポジウム演者), 筋収縮直後 1 秒以内に生ずる血管拡張と運動性適応, 第21回日本運動生理学会, 2013年07月27日~28日, 東京国際大学(埼玉県川越市) .
- 3) 前田順一, 小宮秀明, 鈴木石松, 自発走運動が血管拡張を生ずる経壁圧変動閾値におよぼす影響, 第21回日本運動生理学会, 2013年07月27日~28日, 東京国際大学(埼玉県川越市) .
- 4) 前田順一, 小宮秀明, 鈴木石松, 血管経壁圧変動の幅と頻度が血管拡張に及ぼす影響, 第20回日本運動生理学会, 2012年07月28日~29日, 筑波大学(茨城県つくば市) .

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 順一 (MAEDA, Junichi)

宮城教育大学・教育学部・教授

研究者番号: 40199617