

# マイクロダイアリシスを用いた汗腺機能の評価

奈良女子大学 芝崎 学  
(共同研究者) テキサス州立大学 Craig G. Crandall  
神戸大学 近藤 徳彦

## Assessment of Sweat Gland Function Using Microdialysis

by

Manabu Shibasaki

*Faculty of Human Life and Environment, Nara Women's University*

Craig G. Crandall

*Southwestern Medical Center at Dallas, University of Texas*

Narihiko Kondo

*Faculty of Human Development, Kobe University*

### ABSTRACT

Our purpose of this project was to establish that the modified microdialysis method for measuring sweat rate (SR) could assess sweat gland function by multiple-administration of acetylcholine. In the first project, two microdialysis membranes were inserted intradermally in healthy 6 subjects (3 males and 3 females; ages 21-35). SR was independently measured over each membrane. At 5 min increments,  $1 \times 10^{-6}$ M to  $1 \times 10^{-1}$ M acetylcholine in Ringer's solution (6 doses) were administered through the microdialysis membranes. Linear regression of SR between sites revealed a strong linear relationship (slope =  $1.03 \pm 0.14$ ,  $R = 0.99 \pm 0.001$ ,  $p < 0.05$ ), verifying the repeatability of the method. Sixteen subjects (8 males and 8 females; ages 21-75) participated in the second project which one membrane was perfused through the microdialysis membrane with  $1 \times 10^{-6}$  to 1 M acetylcholine in Ringer's solution (7

doses). Clear dose-response curve was observed and the acetylcholine concentration threshold for the onset of sweating ranged  $1 \times 10^{-6}M$  to  $1 \times 10^{-3}M$ . SR in the older group failed to increase with increasing acetylcholine concentration above  $1 \times 10^{-3}M$  and was remarkably lower at  $1 \times 10^{-1}$  and  $1M$  than in the young group. However gender-related difference was not observed at any concentrations. These data accord with previous studies, suggesting that intradermal microdialysis coupled with capacitance hygrometry is a viable method of assessing sweat gland function *in vivo* and useful methodology for comparative studies.

## 要 旨

本研究の目的は、発汗量測定用に改良したマイクロダイアリシス法が汗腺機能の評価に有効的な手法であることを確立することである。実験1では、6名の被験者に対し、2本のマイクロダイアリシス管を用いて、本手法の再現性について検討した。リンゲル溶液に溶かした $1 \times 10^{-6}M \sim 1 \times 10^{-1}M$ のアセチルコリン (ACh) を5分ごとに皮内に投与した。両部位からそれぞれ算出した発汗量間には高い相関が見られ ( $R = 0.99 \pm 0.001, p < 0.05$ )、その回帰直線の傾きが  $1.03 \pm 0.14$ であったことより、この手法の再現性は非常に高いことが確認された。16名 (男女各8名: 21~75歳) の被験者が参加した実験2では、1本のマイクロダイアリシス管を用いて、 $1 \times 10^{-6}M \sim 1M$ のAChを実験1と同様の手順で投与した。ACh濃度の増加に伴う容量曲線が確認され、発汗開始閾値濃度は $1 \times 10^{-6}M \sim 1 \times 10^{-3}M$ の範囲であった。高齢者のAChに対する発汗量は、濃度の増大に伴い若年者のそれよりも低くなり、 $1 \times 10^{-1}M$ および $1M$ で若年者のそれよりも明らかに低値を示した ( $p < 0.05$ )。これに対し、性差に伴う変化はいずれの濃度においても認められなかった。これらの結果は従来の薬理実験の結果とほぼ一致し、本手法が *in vivo* の比較研究においても汗腺機能を十分に評価し得る有効的な手法であることが示された。

## 緒 言

体温調節機構は、身体内部の恒常性を保つために非常に重要な役割を担っている。その中でも、発汗機能は夏季のような高温環境下における運動時には欠くことのできない重要な熱放散機序である。発汗神経を介して中枢から送られてきた命令は、発汗神経終末から放出されるアセチルコリンによって汗腺を刺激する。このアセチルコリンと汗腺にあるムスカリン性受容体の複合体形成が、生理的変化つまり発汗を開始させる。

発汗機能の研究において、汗腺機能だけを検討する場合、アセチルコリンやメタコリンなどを用いた薬理実験が一般的に行われている<sup>1-3, 7, 9, 10, 12</sup>。しかし、神経終末から放出されるアセチルコリンの量やそれに対する感受性には部位差や個人差があり<sup>7, 12</sup>、トレーニングまたはデイトレーニングなどによって、アセチルコリンの放出量やそれに対する受容体の感受性は変化する可能性が考えられる<sup>2, 5</sup>。したがって、より詳細に汗腺機能の評価するためには、多重濃度の発汗誘発剤を用いて発汗開始閾値や最高発汗量などを含めた発汗量の容量曲線を求める薬理実験が必要である。

従来の薬理実験で用いられている注射による皮内注入法やイオントフォレシス法などを用いて発汗量の容量曲線を求めるにはいくつかの問題点がある。例えば、注射による皮内注入法では、薬剤の濃度を替えるごとに皮膚を管状針で刺す必

要があるために被験者に負担を与えるだけでなく、同じ場所に溶液を注入することはほとんど不可能である。また、イオンフォレシス法でも溶液の交換ごとに注入部の溶液を抜取ってから注入するために、非常に長い時間がかかり被験者に負担を与える。これを最小限にするために、場所を換えて実験が実施されているが、汗腺密度や汗腺の大きさは場所により異なるので、発汗量の容量曲線を求めるのであれば同一の汗腺を刺激する必要がある。

近年、動物実験などにおいて用いられている体内に挿入して直接的に標的器官を刺激することのできるマイクロダイアリシス法が注目され、ヒトの皮膚における微小循環研究に応用されるようになった<sup>4,6)</sup>。そこで、本研究ではこの手法を用いて同一汗腺を神経伝達物質であるアセチルコリンによって刺激する新しい汗腺機能の評価方法について検討することを目的としている。本研究では、発汗量測定用に改良したマイクロダイアリシス法が様々な比較研究においても有効な手法となりうるか否かを検討するために本手法の再現性を検討するとともに、より広い被験者層にも有用な手法であるか否かを検討するために、幅広い年齢層の男女の被験者に対して実験を行った。

## 1. 研究方法

### 1. 1 被験者

21～35歳までの健康な6名の被験者が実験1に、20, 30, 40および70歳代の男女各2名、計16名の健康な被験者が実験2に参加した。被験者には事前にこの実験の目的およびリスクについて、口頭および書面にて説明し同意を得ている。

#### 実験 1

発汗量を測定することのできるよう改良したマイクロダイアリシス法が、再現性を有するか否かを検討した。マイクロダイアリシス法とは、図1に示すように2つのホウケイ酸塩管の中央部に微細な穴のある直径200  $\mu$ mの膜（有効長10mm）を挟んだ微小管を皮内に据え置き、この膜部分より作動薬を拡散して、対象部位を刺激する方法である<sup>4,5)</sup>。実験1では、この方法論の再現性を検討するために、2本のマイクロダイアリシス管を用いる。前腕背側に50mmの間隔を開けて、25Gauge管状針を真皮層に挿し、約20mm離れたところから針先を出す。それを導管としてマイクロダイアリシス管を皮内に通し、管状針を抜いてマイクロダイアリシス管を皮内に据え置いた。このマイクロダイアリシス管を介して多重濃度( $10^{-6}$ ～ $10^{-1}$  M)のアセチルコリン (ACh) を、マイクロシリンジポンプを用いて一定速度(2  $\mu$ l/min)で注入して汗腺を刺激した。予備実験において、マイクロダイアリシス管によるACh投与

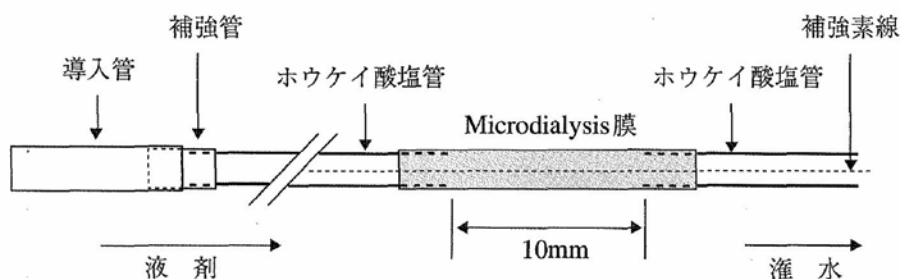


図1 マイクロダイアリシス管の模式図

マイクロダイアリシス管はすべて当研究室にて製作された。すべての管は瞬間接着剤によって接続されている。マイクロダイアリシス膜の溶液放出範囲は10mmである。製作されたマイクロダイアリシス管は、滅菌処理された後に使用される。

によって刺激される汗腺の範囲を測定し、そのデータに基づいて5×10mmの窓を開けた発汗測定用カプセルを製作した。それをマイクロダイアリシス膜上の皮膚に貼付し、そのカプセルに一定量の乾燥窒素ガス(300 ml/min)を一方から流し、反対側にある静電容量湿度センサーで発汗による湿度変化を測定する換気カプセル法によって発汗量を測定した。このシステムを用いることによって、異なる濃度のAChで同一の汗腺を刺激でき、容易に容量曲線を算出することが可能になる。AChは血管拡張を誘発するため<sup>8)</sup>、その影響をできるだけ小さくするために、電気ランプを用いて皮膚温を40℃近くに加温した。皮膚温は熱電対を用いて測定し、実験中モニタしながら皮膚温を一定に制御した。これらのデータはすべて連続的にデータロガーを介してコンピュータに取り込まれた。

実験2

マイクロダイアリシスを用いて、容量反応曲線を描くために最適な濃度を検討するために、幅広い範囲の年齢、性別および体力レベルを有した被験者に対し、多濃度(10<sup>-6</sup>~10<sup>-1</sup> M)のAChを実験1と同様の手法で、各被験者に対し1本のマイクロダイアリシスを用いて実験を実施した。また、16名中12名の被験者に対して、容量曲線のプラトーを確認するために、さらに高濃度(1M)のAChを追加した。

1.2 分析および統計

データの分析は、10秒ごとの平均値を算出したデータ表を作成し、以下の手順で各濃度の発汗量を判別した。図2のように、低濃度のAChから高濃度のAChに替えると、発汗量は急増する。約2分でその量は安定するが、被験者によっては増加減少の波がみられる。発汗が開始しはじめた濃度を発汗開始閾値濃度とし、各濃度の発汗量は、濃度を替えてから5分間の間の最高発汗量をその濃度の発汗量とした。

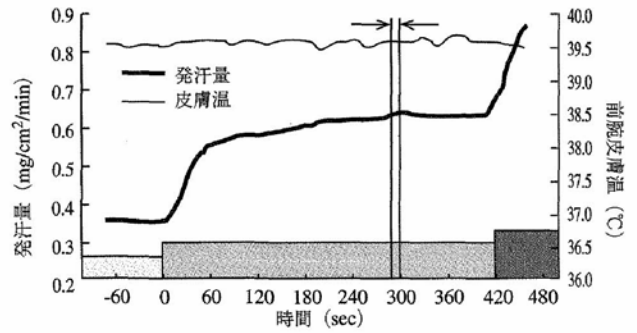


図2 各ACh濃度における発汗量の判定

20Hzでサンプリングされたデータを10秒平均し、さらに平滑化を行った後に以下のデータ解析を行う。AChの濃度を替えると、発汗量は急激に上昇するが、約2分ほどで安定に達する。安定したところから溶液交換後5分間で最も高い値を示したところ(矢印の範囲内)をその濃度の発汗量とする。ボックス内の濃淡は濃度の違いを示している。

データはすべて平均値±標準誤差で表示した。AChの容量曲線に関するグループ間比較には、繰り返しのある2元の分散分析を用い、多重比較にはSheffe's testを用いた。また、各濃度におけるグループ比較にはunpaired t-testを用いた。統計的有意差は有意水準5%未満とした。

1.3 研究結果

実験1において、前腕部の隣接する2部位で測定した発汗量は、ACh濃度の増大にともない指数関数的に増加し、10<sup>-2</sup>M以上ではそれ以下の濃度とは明らかな差が認められた(p<0.05:図3)。両部位における発汗量の増加には直線関

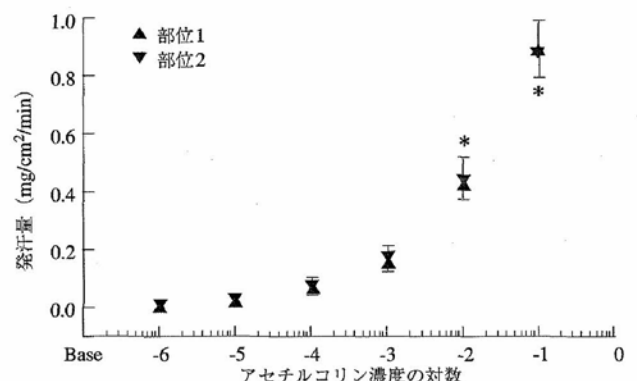


図3 隣接する2部位で測定したAChに対する発汗量の容量曲線

約50mm離れた2点に設置したマイクロダイアリシス膜上でカプセル換気法によって発汗量を測定した。ACh濃度の増大に伴い、指数関数的に発汗量は増加する。\*は対象濃度の発汗量がそれ以下の発汗量よりも明らかに高いことを示す(p<0.05)。

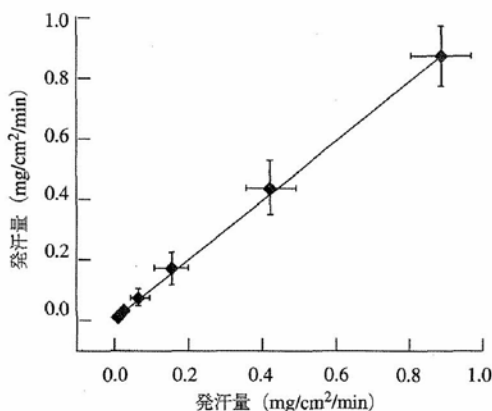


図4 隣接する2部位で測定した AChに対する発汗量間の回帰直線

2点で測定した発汗量間には高い正の相関関係が得られた〔傾き:  $1.027 \pm 0.142$ , 相関係数:  $0.993 \pm 0.001$ , ( $p < 0.01$ )〕.

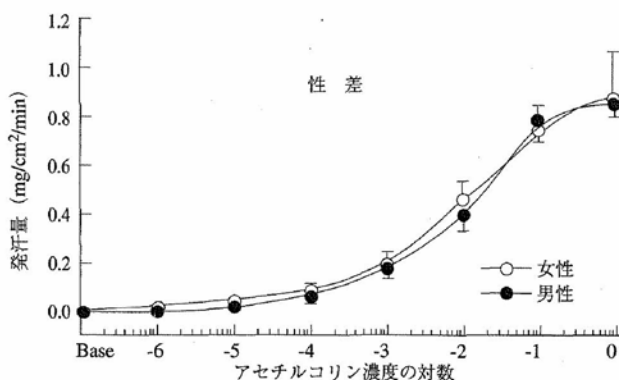


図6 AChに対する発汗量の容量曲線の性差

AChに対する発汗量の容量曲線を性差の観点から比較した図を示した。●は男性被験者の平均の反応を、○は女性被験者の平均の反応を示している。容量曲線に性差は認められなかったが、発汗開始閾値は男性よりも女性の方が低かった ( $-5.50 \pm 0.19$ (女性) vs.  $-4.38 \pm 0.74$ (男性),  $p < 0.01$ )。エラーバーは標準誤差を示す。

係がみられた (図4)。被験者ごとに求めた回帰直線の傾きおよび相関係数の平均±標準誤差は、それぞれ  $1.027 \pm 0.142$  (傾き),  $0.993 \pm 0.001$  であった ( $p < 0.01$ )。

実験2においては、幅広い年齢層のAChに対する発汗量の容量曲線を検討した。図5に各被験者のAChに対する発汗量の容量曲線を示した。汗の拍出波は、最低濃度である  $10^{-6}M$  から  $10^{-3}M$  の範囲で確認された。AChに対する発汗量の容量曲線のプラトーを確認するために、16名中12名の被験者に  $1M$  の高濃度のAChを投与したところ、1名の被験者を除くほとんどの被験者で容量

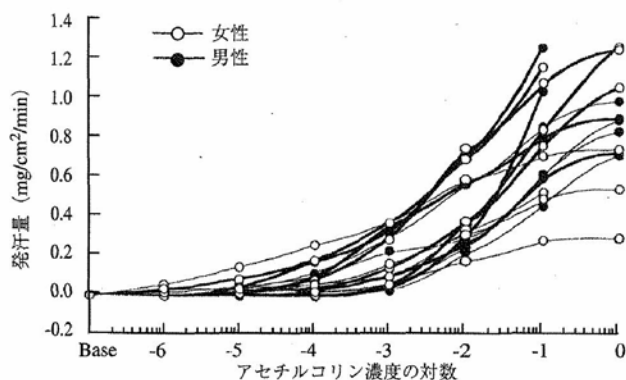


図5 各個人のAChに対する発汗量の容量曲線

各個人のAChに対する発汗量の容量曲線を図示した。●は男性被験者の反応を示し、○は女性被験者の反応を示し、太線は若年者の反応を、細線は高齢者の反応を示している。発汗開始閾値濃度は  $10^{-6}M$  から  $10^{-3}M$  であった。

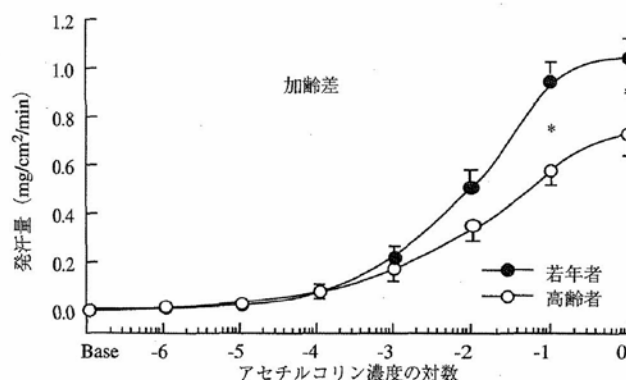


図7 AChに対する発汗量の容量曲線の加齢差

AChに対する発汗量の容量曲線を加齢差の観点から比較した図を示した。●は若年者の平均の反応を、○は高齢者の平均の反応を示している。  $10^{-1}M$  および  $1M$  において高齢者の発汗量は若年者のそれよりも明らかに低かった (\*:  $p < 0.01$ )。エラーバーは標準誤差を示す。

曲線の傾きは減弱した。

加齢および性差に関して比較すると、性差は認められなかったが (図6)、高齢者のAChに対する発汗量の容量反応曲線は、若年者のそれと比較して低い値を示した (図7)。特に、高濃度になるほど、その差が大きくなり、AChの濃度が  $10^{-1}M$  および  $1M$  の時に明らかに低い値を示した ( $p < 0.05$ )。発汗開始閾値でのACh濃度は、男性よりも女性の方が明らかに低い濃度で ( $-5.50 \pm 0.19$  (Log-molar concentration) (女性) vs.  $-4.38 \pm 0.74$  (男性),  $p < 0.01$ )、また若年者よりも高齢者の方が低い濃度で発汗が開始する傾向を

示した (図5).

## 2. 考 察

本研究では、汗腺機能をより詳細に検討する新しい方法として、発汗測定用に改良したマイクロダイアリシス法について提案し、その有効性について検討した。実験1で行った再現性の実験から示されるように、場所によって発汗量が多少異なったものの、隣接する2部位間で測定したAChに対する発汗量の容量曲線はほぼ類似した(図3, 4)。これより、本手法は十分な再現性を有することが確認された。よって、異なる日もしくは時間に実施される比較実験や、トレーニングやデイトレーニングなどの比較実験などにおいても、本手法により導かれるAChに対する発汗量の容量曲線から汗腺機能の変化が評価できる可能性が示唆された。

さらに、今回の実験では、より広い範囲の被験者特性をもった被験者を対象にして、有効なAChの濃度範囲を検討した。10<sup>-6</sup>Mから10<sup>-3</sup>Mの範囲ですべての被験者において発汗が開始した。最低濃度である10<sup>-6</sup>Mにおいてすでに4名の被験者で発汗が確認されたが、その量は非常に微量であった(0.034±0.09 mg/cm<sup>2</sup>/min)ことから、10<sup>-7</sup>Mで発汗が確認される可能性は低いと考えられる。また、16名中12名の被験者に投与した1Mまでで、1名の被験者を除くほとんどの被験者で容量曲線の増加度は減弱した。高濃度側に関しては、数名の被験者において、1MのACh注入時に立毛筋が明らかに刺激されていたことより、これ以上の濃度のAChを投与することは困難と思われる。よって、本手法による発汗量の容量曲線から成人の汗腺機能を評価するためには、10<sup>-7</sup>Mから1Mの範囲のACh濃度を用いることが適当であると考えられる。なお、発汗開始閾値濃度をより詳細に比較検討するためには、10<sup>-7</sup>Mから10<sup>-3</sup>Mの範囲でより細かな濃度間

隔に設定すべきであろう。

*in vivo*による発汗開始閾値濃度に関する研究は、著者らの知る限りほとんどないが、メタコリンを用いた*in vitro*の実験では、発汗量の少ない汗腺ほど、発汗開始閾値濃度が高いことが報告されている<sup>13)</sup>。しかし、同様の関係は、*in vivo*で求めた本研究の結果では認められなかった(図5)。この違いは実験手法の違いに依存しているものと考えられる。つまり、*in vivo*の実験では、汗腺周囲にあるAChを分解するアセチルコリンエステラーゼや、発汗が皮膚表面に拍出するまでに汗腺管における再吸収などの影響を受けるため、*in vitro*の結果と異なった可能性がある。また、メタコリンはAChと比較してアセチルコリンエステラーゼによる分解が遅延するという薬物動態の違いも影響したのかもしれない<sup>11)</sup>。

発汗開始濃度閾値に加齢差は認められなかったが、AChに対する発汗量の容量曲線は高齢者の方が若年者よりも低くなることが示され、先行研究の結果にほぼ一致した<sup>7, 9)</sup>。また、性差の視点から本研究のデータを比較すると、AChに対する発汗量の容量曲線に明らかな差は認められなかった。この結果も0.5% pilocarpineに対する発汗量に性差はなかったとする先行研究の結果と一致している<sup>3)</sup>。これらの一致は、本手法が様々な比較研究にも適していることを支持するものである。これに対し、性差に伴う発汗開始閾値濃度に関してはある疑問点を残した。本研究の結果では、女性の発汗開始閾値濃度は男性のそれよりも明らかに低値を示した。確かに、体力レベル等が考慮されていないために再検討を要するが、この結果は性差が発汗開始閾値濃度に影響している可能性を示唆するものである。薬理実験において、発汗量に性差はみられないものの、女性は男性と比較して、単位面積あたりの汗腺数が多くかつ単一汗腺あたりの汗出力が少ないことが報告されている<sup>3)</sup>。単一汗腺あ



たりの汗出力が少ないことは汗腺が小さいことを意味しており<sup>12, 13)</sup>, *in vitro*の実験では, 汗腺が小さいと汗腺の神経伝達物質に対する感受性は低いことが報告されている<sup>13)</sup>. これらの先行研究の結果を統括すると, 女性の発汗開始閾値濃度は高濃度になると推測されるが, 本研究の結果は逆に低かった. *in vivo*と*in vitro*の方法論の違いにも影響している可能性もあるが, 性ホルモンの影響が汗腺の神経伝達物質に対する感受性に何らかの影響を与えている可能性を否定することはできない. また, 汗腺周囲のメカニズムに性差があるのかもしれない. 今後, 発汗開始閾値に関する汗腺周囲のメカニズムに関しては, 性ホルモンによる感受性の変化も含め, さらに詳細に検討する必要があると思われる.

最後にマイクロダイアリス法の使用上の留意点を記す. 本手法はマイクロダイアリス管を皮内に据え置くために, 25Gaugeの管状針を皮膚に刺し通す必要性があり, その際に多少の痛みを伴う. また, このことによって毛細血管を部分的に破損するため, 皮膚血管拡張が起こる<sup>6)</sup>. そのため, マイクロダイアリス管を固定した後には, 少なくとも1時間程, 皮膚血流量が低いレベルになるまで安静にした後に薬理実験を実施する必要がある<sup>4, 6)</sup>. また, 実験1より示された測定する場所によって, 発汗量が多少異なることは, 場所を替えて容量曲線を求めることは難しいことを意味している. この点は, 同一汗腺を刺激する本手法の有効性を保証するものであるが, マイクロダイアリス管は非常に小さいために, 刺激できる範囲が非常に狭い範囲に限られてしまう. そのため, 汗腺機能が部分的に欠如している可能性のある被験者に関しては繰り返しの実験を行う場合には十分な配慮が必要と思われる.

本研究の結果より, 発汗量測定用に改良したマイクロダイアリス法は十分な再現性を有し, 老若男女を問わず適用できたことから, 本手法を

用いることでヒトの汗腺機能メカニズムを検討できる可能性が示唆された.

## 謝 辞

研究助成を賜りました財団法人石本記念デサントスポーツ科学財団に厚く御礼申し上げます. 本研究にあたり, 快く被験者を引き受けてくださった関係諸氏に感謝の意を表します. また, 本研究に関して多大な御協力を頂いた大阪国際女子大学の井上芳光教授に感謝の意を表します.

## 文 献

- 1) Armstrong, C. G., and W. L. Kenney ; Effects of age and acclimation on responses to passive heat exposure, *J. Appl. Physiol.*, 75, 2162-2167 (1993)
- 2) Buono, M. J., C. S. White, and K. P. Cholinergic ; sensitivity of the eccrine sweat gland in trained and untrained men, *J. Dermatol. Sci.*, 4, 33-7 (1992)
- 3) Buono, M. J., and N. T. Sjoholm ; Effect of physical training on peripheral sweat production, *J. Appl. Physiol.*, 65, 811-814 (1988)
- 4) Crandall, C. G., R. A. Etzel, and J. M. Johnson ; Evidence of functional  $\beta$ -adrenoceptors in the cutaneous vasculature, *Am. J. Physiol.*, 273, H1038-H1043 (1997)
- 5) Fortney, S. M., V. Mikhaylov, S. M. C. Lee, Y. Kobzev, R. R. Gonzalez, and J. E. Greenleaf ; Body temperature and thermoregulation during submaximal exercise after 115-day spaceflight, *Aviat. Space Environ. Med.*, 69, 137-141 (1998)
- 6) Groth, L. Cutaneous Microdialysis; Methodology and validation. *Acta. Derm. Venereol (Stockh)* 76 (1996)
- 7) Inoue, Y., G. Havenith, L. W. Kenney, J. L. Loomis, and E. R. Buskirk ; Exercise- and methylcholine-induced sweating responses in older and younger men: effect of heat acclimation and aerobic fitness, *Int. J. Biometeorol.*, 42, 210-216

- (1999)
- 8) Kellogg, D. L. J., P. E. Pergola, K. L. Piest, W. A. Kosiba, C. G. Crandall, M. Grossmann, and J. M. Johnson ; Cutaneous active vasodilation in humans is mediated by cholinergic nerve cotransmission, *Circ. Res.*, **77**, 1222-1228 (1995)
  - 9) Kenney, W. L., and S. R. Fowler ; Methylcholine-activated eccrine sweat gland density and output as a function of age, *J. Appl. Physiol.*, **65**, 1082-1086 (1988)
  - 10) Low, P. A., T. L. Opfer-Gehrking, and M. Kihara ; In vivo studies on receptor pharmacology of the human eccrine sweat gland, *Clin. Auto. Res.*, **2**, 29-34 (1992)
  - 11) Pappano A. J ; Cholinoceptor-Activating & cholinesterase-Inhibiting drugs. In: Katzung B. G. (Ed) *Basic & clinical pharmacology*, 7th edn. Appletion & Lange, CT, 90-104 (1998)
  - 12) Sato, F., M. Owen, R. Matthes, K. Sato, and C. V. Gisolfi ; Functional and morphological changes in the eccrine sweat gland with heat acclimation, *J. Appl. Physiol.*, **69**, 232-236 (1990)
  - 13) Sato, K., and F. Sato ; Individual variations in structure and function of human eccrine sweat gland, *Am. J. Physiol.*, **245**, R203-R208 (1983)