

運動時の血流, 血圧の変化と 皮膚表面から放出される一酸化窒素との関係

名古屋工業大学 伊藤 宏
(共同研究者) 同 大桑 哲男
同 山崎 良比古
同 津田 孝雄

Changes in Blood Flow and Nitric Oxide Emanating from Human Skin Following the Wrist Flexion-Extension Exercise

by

Hiroshi Itoh, Tetsuo Ohkuwa, Yoshihiko Yamazaki
*Graduate School of Engineering,
Nagoya Institute of Technology*
Takao Tsuda
Research Fellow, Nagoya Institute of Technology

ABSTRACT

We examined whether increased blood flow during acute exercise would change human skin-gas nitric oxide (NO) or not. Nine healthy male students (21.2 ± 1.9 years; mean \pm SD) volunteered as the subjects, and none of them were smokers. The subjects performed the repetitive wrist flexion-extension exercise at 25% maximal voluntary contraction at a pace of a time per second until voluntary exhaustion. The skin-gas samples were obtained by covering the non-dominant hand for 3min with a polyfluorovinyl bag in which pure nitrogen gas was introduced, and collected in a sampling bag at rest and after exercise (2-5, 12-15, 22-25 min). The skin-gas NO concentration was measured by a chemiluminescence analyzer. The peripheral blood flow in the skin surface of the middle fingertip and blood pressure were measured at rest and after exercise (0, 10, 20 min).

The mean (\pm SD) time to exhaustion of the repetitive wrist flexion-extension exercise for the subjects was 131.1 ± 28.5 sec. The peripheral blood flow in the skin surface of the middle fingertip significantly increased immediately after the exercise compared to the resting values ($p < 0.01$), no significantly higher levels were remained 10 and 20 min after the exercise. Similarly, the skin-gas NO concentrations significantly increased immediately after the exercise compared to the resting values ($p < 0.01$), although no significant change was observed 12-15 and 22-25 min after the exercise.

These results suggest that the repetitive wrist flexion-extension stimulates vascular endothelial NO production by increases in shear stress during the exercise and increases skin-gas NO concentrations.

要 旨

本研究では、運動による血流量や血圧の変化と皮膚から放出される一酸化窒素 (nitric oxide; NO) 濃度との関係を明らかにしようとした。健康な男子大学生9人を対象とし、非利き手で手首底背屈運動を最大筋力の25%の負荷、1秒間に1回のリズムで疲労困憊に至るまで行わせ、安静および運動終了後2-5、12-15、22-25分到手首から末梢における皮膚ガスをそれぞれ3分間採集してNO濃度を測定した。また、安静、運動終了直後、10、20分後に、運動を実施した手の中指、第一関節における皮膚表面血流量を、同時に運動を実施しなかった利き腕から血圧を測定した。皮膚表面血流量は安静時に比べて運動直後に有意 ($p < 0.01$) に増大し、その後は安静値に回復する傾向が認められた。また、各被験者における皮膚表面血流量の安静値に対して、運動後の最大値は有意に ($p < 0.01$) 高かった。さらに、運動肢の前腕最大周径囲も皮膚表面血流量の変化と同様な変化が認められたため、本研究では手首底背屈運動によって運動肢での血流が増大した可能性が示唆された。皮膚ガス中NO濃度も皮膚表面血流量と同様に安静値に対して運動後2-5分に有意 ($p < 0.05$) に増大した後、安静値に回復する傾向が認められ、運

動後の最大値も安静値に対して有意に ($p < 0.01$) 高い値が認められた。このように、本研究では手首底背屈運動によって運動肢での血流が増大し、血流変化と同期するように皮膚ガスNO濃度も増大した。一方、皮膚ガスNO濃度の変化と血流量、血圧の間には有意な相関関係が認められなかった。

以上、本研究で見られた手首底背屈運動後の皮膚ガス中NO濃度の増大は、運動による血流量の増大が血管内皮における剪断応力を増大させ、それに伴ってendothelial NO synthase由来のNO産生が促進され、皮膚ガス中の濃度に反映されたと推察された。

緒 言

一酸化窒素 (nitric oxide; NO) は内皮由来血管弛緩因子として知られている¹³⁾。NOは、NO合成酵素 (NO synthase: NOS) によって酸素とL-アルギニンから生成されるガス状のラジカルであり、細胞膜を簡単に通り抜け、血管平滑筋細胞のグアニル酸シクラーゼを直接活性化して、サイクリックGMP (cyclic guanosine monophosphate; cGMP) の産生増加を介して血管を弛緩させて循環動態を調節している^{8, 15)}。運動時には、骨格筋などの組織で血流が増大する^{1, 17)} が、このような運動に

伴う血流や血圧の変化は、血管内皮細胞で産生されたNOの血管調節機構の影響を強く受けていると考えられている^{3, 16, 18}。これまでも、NOS合成阻害剤であるNG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA)の投与により、安静や運動時の組織血流量が減少することが報告されている^{3, 16, 18}。しかし、NOはガス状で、作用する部位で産生されるや否やすぐに皮膚などから体外へ放出されてしまうため^{7, 8, 15}、血管内や組織で産生されたNOが皮膚からどの程度放出されているのか、また、皮膚から放出されたNO濃度が運動時の血流や血圧の変化を反映するか否かについては明らかにされていない。一方、われわれ¹⁰は最近の研究で皮膚から放出されるガス(皮膚ガス)の中に内因性揮発性物質のひとつとしてNOが含まれていることを確認し、非常に微量な皮膚ガスから高感度、高精度なNO濃度分析システムの構築に成功している。

以上のことから、本研究では、最大筋力の25%の負荷で手首底背屈運動を実施し、局所運動が皮膚ガス中NO濃度に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。さらに、運動時の血流量や血圧の変化と皮膚ガス中NOの濃度との関係についても確かめようとした。

1. 研究方法

1. 1 被験者

被験者は、非喫煙者でビタミン剤を含めた特別な薬物を服用していない健康な男子大学生9名とした。被験者には、名古屋工業大学生命倫理審査委員会に承認(19-004)された本研究の目的と実験内容を十分説明し同意を得た。被験者は全員、特別な運動習慣がなく、研究期間内にも実験以外の運動は制限した。表1に被験者の身体的特性を示

表1 被験者の身体的特性

N=9	Age (years)	Height (cm)	Mass (kg)	BMI
Mean±SD	21.2±1.9	174.7±5.1	68.3±7.0	22.4±2.4
BMI (Body Mass Index) ; Mass (kg)/Height (m) ²				

した。

1. 2 皮膚ガス採集および皮膚ガス中NO濃度測定方法

皮膚ガスの採集はテドラーフィルム(ジーエルサイエンス社製)を加工した採集バッグを用いて行った。採集範囲は手全体と手首の尺骨頭頂から肘に向かって5cmまでとし、採集バッグの端、内側に両面テープを貼り、採集バッグの内側と皮膚を密着させた後、外側からさらにテープを巻いて密閉した。採集バッグの端には交換用ミニバルブ付スリーブ(6φ;ジーエルサイエンス社製)を装着し、それと三方活栓を連結させてシリンジに吸引した皮膚ガスを、採集バッグと同様の加工をしたサンプルバッグに測定用ガスとして収集した。実際の皮膚ガス採集手順は次のようであった。すなわち、1)被験者に採集バッグを被せた後、ポンプを用いてバッグ内の空気を吸引し、2)シリンジを用いて窒素ガス(99.9% N₂)100mlを注入、3)そのまま3分間安静を保ち、4)シリンジを用いて皮膚表面から採集バッグ内に放出されたガスを含む100mlをサンプルバッグに採集した。皮膚ガス中NO濃度は、Ohkuwaら¹⁰の方法と同様に化学発光検出器(浜松ホトニクス社製)を用いた化学発光法によって測定した。

1. 3 運動負荷

被験者には、事前に測定した最大筋力の25%の負荷で手首底背屈運動を実施した。運動は、座位、非利き腕を前方に肘を軽く伸ばした状態ではほぼ心臓の高さに保持し、肘から手首までを台上に置いた姿勢で行わせた。運動時に被験者の前腕が台から離れないように指示して、1秒に1回の速さで手首の底背屈を最大可動域で行わせた。最大可動域またはリズムが維持できなくなった時点で運動終了とした。

表2 運動前後における血圧, 心拍数および前腕周径の変化

		Rest	Recovery	
			0 min	20 min
Systolic blood pressure	(mmHg)	131.4 ± 13.2	128.0 ± 11.5	126.3 ± 12.5
Diastolic blood pressure	(mmHg)	73.0 ± 7.2	68.2 ± 6.7	70.0 ± 5.7
Pulse pressure	(mmHg)	58.4 ± 15.4	59.8 ± 13.6	56.3 ± 13.8
Mean blood pressure	(mmHg)	92.5 ± 6.3	90.0 ± 5.9	88.8 ± 5.6
Heart rate	(beats/min)	68.2 ± 10.8	71.5 ± 11.3	64.7 ± 13.7
Forearm circumference	(cm)	25.8 ± 1.7	26.3 ± 1.7*	25.9 ± 1.7

Mean ± SD *; p<0.05 vs. Rest

1. 4 皮膚ガス採集時間

被験者は、少なくとも食後2時間以上経過してから実験に参加し、運動実施は午前11時から4時の間のランダムな時間とした。被験者は、室温25℃に保たれた実験室で、座位で約20分間の安静を保った後、安静時の皮膚ガスサンプルとして3分間の皮膚ガスを連続して2回採集し、これら2回の値の平均値を安静時の皮膚ガス中NO濃度とした。安静時のサンプルを採集後、素早く採集バッグをはずして手首底背屈運動を行わせ、運動終了後2-5分、12-15分、22-25分にそれぞれ皮膚ガスを採集した。それ以外の時間は採集バッグをはずした状態で測定時と同様の姿勢で安静にさせた。

1. 5 血圧, 心拍数と血流量測定

血圧と心拍数は、自動血圧計 (HEM-7011; オムロン社製) を用いて、運動を実施しなかった利き腕で測定し、収縮期血圧と拡張期血圧から脈圧 (収縮期血圧 - 拡張期血圧) と平均血圧 [拡張期血圧 + (収縮期血圧 - 拡張期血圧) / 3] を算出した。血流量は、運動を実施した非利き手、中指第一関節の腹表面の皮膚血流量を非接触型プローブによりレーザードップラー皮膚血流量計 (ALF-21; アドバンス社製) を用いて測定した。血圧, 心拍数および血流量の測定は、安静, 運動直後 (0分), 運動終了後10分, 20分に行った。

1. 6 統計処理

全てのデータは平均値±標準偏差とし、反復測

定一分散分析後、Sheffé法を用いて post hoc 検定を実施した。有意水準は p<0.05 とした。

2. 結果

被験者の手首底背屈運動における運動持続時間は 131.1 ± 28.5 秒であった。運動前後の血圧測定項目 (収縮期血圧, 拡張期血圧, 脈圧, 平均血圧), 心拍数および運動を実施した腕の前腕最大周径の変化は表2のとおりであった。血圧, 心拍数は運動前後で有意な変化が認められなかったが、前腕最大周径は運動直後に有意 (p<0.05) に増大し、運動終了後20分には安静時の値に回復した。

抹消の血流量として測定した中指表面における皮膚血流量は、安静に対して運動直後に有意 (p<0.01) に増大し、その後は安静の値に回復する傾向が認められた (図1A)。各被験者の皮膚血流量最大値も安静値に対して有意 (p<0.01) に高く (図1B)、運動によって中指表面における皮膚血流量が増大したことが示唆された。

図2Aには安静および運動後の皮膚ガス中NO濃度の変化を示した。皮膚ガス中NO濃度も、皮膚血流量変化と同様の傾向を示し、安静に対して運動直後 (回復2-5分) に有意 (p<0.05) に増大した後、安静の値に回復する傾向を示した。また、各被験者の運動後の最大値も安静値に対して有意 (p<0.01) に高く (図2B)、運動によって皮膚ガス中NO濃度は増大したことが示された。

一方、皮膚ガスNO濃度と血圧測定項目、血流量のいずれの項目との間にも有意な相関関係は認

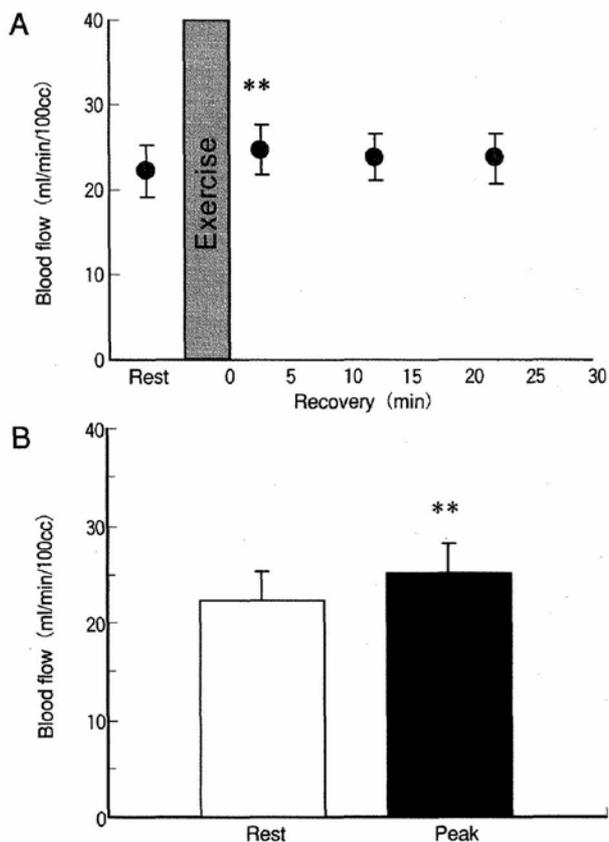


図1 (A) 運動前後の中指における皮膚表面血流量の変化。(B) 皮膚表面血流量における各被験者の安静値および最大値。 Mean ± SD **; p<0.01 vs. Rest

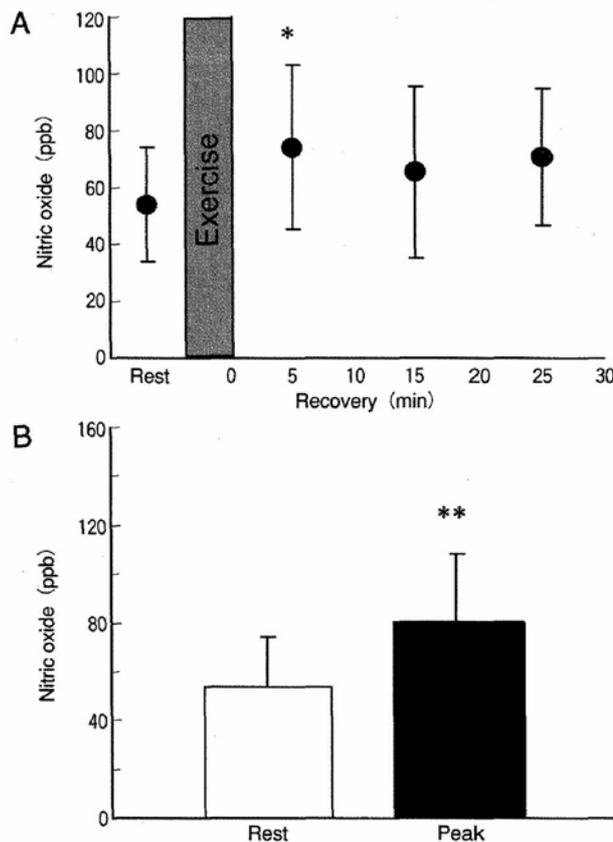


図2 (A) 運動前後の皮膚ガスNO濃度の変化。(B) 皮膚ガスNO濃度における各被験者の安静値および最大値。 Mean ± SD *; p<0.05 vs. Rest, **; p<0.01 vs. Rest

められなかった。

3. 考察

本研究では、手首底背屈運動後に中指、第一関節における皮膚表面血流量が有意 (p<0.01) に増大した。また、運動肢の前腕最大周径囲も運動後に安静値に比べて有意 (p<0.05) に大きな値が認められた。これらのことは、本研究での手首底背屈運動に伴って前腕における血流量が増大したことを示唆するものである。Alomariら¹⁾やShoemakerら¹⁶⁾は、本研究と類似した短時間での局所の運動であるハンドグリップ運動時に前腕血流量が増大することを報告しており、われわれの結果もそれらの報告を支持するものであった。運動直後に一過性に増大する四肢への血流量の制御機構については、筋ポンプ作用¹⁹⁾や代謝物質の影響²⁾、プロスタグランジン⁵⁾、NO^{3, 15, 18)}など様々な血

管拡張因子の存在が議論されている。その中でも内皮由来血管弛緩因子として知られるNO^{7, 8, 15)}については、NOS合成阻害剤であるL-NMMAの投与が、安静や運動時の血流量を減少させることから、NOが重要な血管拡張因子として血圧、血流量などの組織における循環動態を調節していることが確かめられている^{3, 16-18)}。

血管内皮における剪断応力が高まると、血管内皮細胞に局在するendothelial NOS (eNOS)由来のNO産生が活性化される^{7, 8, 15)}。本研究では、運動直後の皮膚ガスNO濃度が有意 (p<0.05) に上昇した。また、各被験者の運動後の最大値は安静値に対して有意 (p<0.05) に高かった。これらの結果、本研究では、運動に伴う前腕での血流量増加が、血管内皮における剪断応力を増大させ、eNOS由来のNO産生を亢進して血管拡張を促し、血管内皮や組織で産生が増大したガス状ラジカル

であるNOが、細胞膜を通り抜けて⁸⁾皮膚から放出されたと考えられた。

一方、皮膚ガスNO濃度の変化と血圧、血流量の変化との間には有意な相関関係が認められなかった。このことについては、少なくとも以下の四つの理由が考えられる。第一は、運動の様式の影響である。局所での血流反応は、運動時の代謝産物による影響や自律神経系の循環調節反応にも大きく影響される¹⁴⁾ため、局所運動と全身運動では部位的な血流反応が異なる³⁾。本研究の手首底背屈運動では、有意な心拍数、血圧の変化は認められず、全身の呼吸循環調節に対する影響が十分とは言えなかった。このことは、本研究の皮膚ガス濃度の変化と心拍数、血圧との間に有意な相関が認められなかった原因のひとつになったのかもしれない。

第二に、血管拡張作用が様々な因子によって調節されていることが考えられる。Sugawaraら¹⁷⁾は、人を対象としたL-NMMAの投与は安静時の心拍数、血圧を低下させ、脈波伝搬速度を高めるが、運動(5分間の片脚での自転車運動)後の心拍数、血圧、脈波伝搬速度にはL-NMMAは影響しなかったことを報告している。その理由として、運動後の血管拡張には、血管内皮における剪断応力の増大に伴って産生が亢進されるプロスタサイクリンの作用が大きく⁴⁾、特にNOSが阻害された環境下ではプロスタサイクリンの作用は強められる¹²⁾こと、また、乳酸、アデノシン、リン酸および水素イオンなどの代謝産物が血管拡張を促す¹⁴⁾ことが影響していると結論づけている。

第三は、本研究の皮膚ガス中NOの変化には血管内皮におけるeNOS以外のNOSが関与して産生されたNOの影響を受けている可能性がある。生体内のNOSには主に血管内皮細胞に存在するeNOS以外に神経細胞で神経伝達物質としてのNO合成に関与するneuronal NOS(nNOS)やマクロファージや他の器官で活性化されて免疫機能

を有するNO合成に関与するinducible NOS(iNOS)の存在も知られ、それらを介して多くのNOが産生する⁷⁾。特に、本研究のように局所における約2分間の最大運動では、解糖系エネルギー供給による乳酸産生が促進され¹⁴⁾、そのような骨格筋における乳酸の産生、水素イオンの増大がiNOSを活性化する⁹⁾ため、本研究における運動後の皮膚ガス中NO濃度の増大にはiNOSやnNOS由来のNO産生も関与している。

第四は、産生されたNOが消去されたことによる影響である。NOはラジカルの性質を持つ脂溶性の気体であり、ヘムに対して強い親和性を持つ。このため、NOは赤血球内のヘモグロビンに吸着されて活性を失う¹¹⁾。また、NOの生理作用は酸素飽和度や活性酸素であるスーパーオキシドと密接に関わる⁶⁾、すなわちスーパーオキシドがNOと高い反応性を持ち、瞬時に反応してNOを消去することや、酸素がNOと反応して窒素酸化物を生じることから、生体内でのNO濃度は酸素濃度に大きく影響を受ける可能性がある²⁰⁾。これらのことから、本研究での運動時に生体内で産生されたNOの消去に、骨格筋などの組織で増大したスーパーオキシドや血中酸素飽和度の低下などが複雑に影響したのかもしれない。

以上、少なくとも上記の理由が、本研究で皮膚ガスNO濃度と血圧、血流量との間に有意な相関関係が認められなかったこととして挙げられた。

4. まとめ

本研究は、運動による血流量や血圧の変化と皮膚から放出されるNO濃度との関係を明らかにすることを目的とした。その結果、本研究で実施した最大筋力の25%による負荷で疲労困憊まで行わせた手首底背屈運動では、運動直後に運動肢における皮膚表面血流量($p<0.01$)および最大前腕囲が有意($p<0.05$)に増大し、その後は回復した。また、皮膚表面血流量変化と同期するように皮膚

ガスNO濃度も運動直後に有意 ($p < 0.05$) に増大し、回復する傾向が認められた。一方、皮膚ガスNO濃度の変化と血流量、血圧との間には有意な相関関係が認められなかった。

以上、本研究で見られた手首底背屈運動後の皮膚ガス中NO濃度の増大は、運動による血流の増大が血管内皮における剪断応力を増大させ、それに伴ってeNOS由来のNO産生が促進され、皮膚ガス中の濃度に反映されたと推察された。一方、運動時の皮膚ガスNO濃度の変化にはiNOSやnNOS由来のNO産生増大やスーパーオキシドなどによるNO消去の影響が考えられるため、皮膚ガスNO濃度と血圧および血流との関係については今後検討が必要である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、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心から深謝いたします。また、本研究実施にあたり多大なご協力をいただいた川本欽也氏をはじめ、名古屋工業大学学生諸氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Alomari, M. A., Welsch, M. A., Prisby, R. D., Lee, C. M. and Wood, R. H.: Modification of forearm vascular function following short-term handgrip exercise training, *Int. J. Sports Med.*, 22, 361-365 (2001)
- 2) Armstrong, R. B., Vandenaeker, C. B. and Laughlin, M. H.: Muscle blood flow patterns during exercise in partially curarized rats, *J. Appl. Physiol.*, 58, 698-701 (1985)
- 3) Green, D. J., Bilsborough, W., Naylor, L. H., Reed, C., Wright, J., O'Driscoll, G. and Walsh, J. H.: Comparison of forearm blood flow responses to incremental handgrip and cycle ergometer exercise: relative contribution of nitric oxide, *J. Physiol.*, 562, 617-628 (2005)
- 4) Hecker, M., Mulsch, A., Bassenge, E. and Busse, R.: Vasoconstriction and increased flow: two principal mechanisms of shear stress-dependent endothelial autacoid release, *Am. J. Physiol.*, 265, H828-833 (1993)
- 5) Holowatz, L. A., Thompson, C. S., Minson, C. T. and Kenney, W. L.: Mechanisms of acetylcholine-mediated vasodilatation in young and aged human skin, *J. Physiol.*, 563, 965-973 (2005)
- 6) Inoue, M., Sato, E. F., Park, A. M., Nishikawa, M., Kasahara, E., Miyoshi, M., Ochi, A. and Utsumi, K.: Cross-talk between NO and oxyradicals, a supersystem that regulates energy metabolism and survival of animals, *Free Radic. Res.*, 33, 757-770 (2000)
- 7) Moncada, S. and Higgs, E. A.: The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology, *Br. J. Pharmacol.*, 147, S193-201 (2006)
- 8) Murad, F.: Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling, *Biosci. Rep.*, 24, 452-474 (2004)
- 9) Niess, A., Baumann, M., Roecker, K., Horstmann, T., Mayer, F. and Dickhuth, H.: Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leucocytes., *J. Sports Med. Phys. Fitness.*, 38, 111-115 (1998)
- 10) Ohkuwa, T., Mizuno, T., Kato, Y., Nose, K., Itoh, H. and Tsuda, T.: Effect of hypoxia on nitric oxide (NO) in skin gas and exhaled air., *Int. J. Biomed. Sci.*, 2, 100-104 (2006)
- 11) Okamura, T., Ayajiki, K., Fujioka, H., Shinozaki, K. and Toda, N.: Neurogenic cerebral vasodilation mediated by nitric oxide, *Japanese journal of pharmacology.*, 88, 32-38 (2002)
- 12) Osanai, T., Fujita, N., Fujiwara, N., Nakano, T., Takahashi, K., Guan, W. and Okumura, K.: Cross talk of shear-induced production of prostacyclin and nitric oxide in endothelial cells, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 278, H233-238 (2000)
- 13) Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature.*, 327, 524-526 (1987)
- 14) Segal, S. S.: Cell-to-cell communication coordinates blood flow control, *Hypertension.*, 23, 1113-1120 (1994)
- 15) Sheel, A. W., Road, J. and McKenzie, D. C.: Exhaled nitric oxide during exercise, *Sports Med.*, 28, 83-90 (1999)
- 16) Shoemaker, J. K., Halliwill, J. R., Hughson, R. L.

- and Joyner, M. J.: Contributions of acetylcholine and nitric oxide to forearm blood flow at exercise onset and recovery, *Am. J. Physiol.* 273, H2388-2395 (1997)
- 17) Sugawara, J., Maeda, S., Otsuki, T., Tanabe, T., Ajisaka, R. and Matsuda, M.: Effects of nitric oxide synthase inhibitor on decrease in peripheral arterial stiffness with acute low-intensity aerobic exercise, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 287, H2666-2669. Epub 2004 Jul 2629 (2004)
- 18) Tagawa, T., Hirooka, Y., Shimokawa, H., Hironaga, K., Sakai, K., Oyama, J. and Takeshita, A.: Long-term treatment with eicosapentaenoic acid improves exercise-induced vasodilation in patients with coronary artery disease, *Hypertens Res.*, 25, 823-829 (2002)
- 19) Tschakovsky, M. E., Shoemaker, J. K. and Hughson, R. L.: Vasodilation and muscle pump contribution to immediate exercise hyperemia, *Am. J. Physiol.* 271, H1697-1701 (1996)
- 20) Tsuchiya, M., Tokai, H., Takehara, Y., Haraguchi, Y., Asada, A., Utsumi, K. and Inoue, M.: Interrelation between oxygen tension and nitric oxide in the respiratory system, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 162, 1257-1261 (2000)