

ラット下肢虚血モデルにおける運動療法の効果と VEGF との関係

藤田 聡子 箱島 明 藤原 靖之 田淵 崇文

要 旨：ラット下肢虚血モデルを用いて、トレッドミルによる歩行訓練を行い、下肢の組織酸素飽和度と筋組織中のVEGF濃度を測定した。歩行訓練は患肢の組織酸素分圧を改善させるのに有効であった。しかし訓練によるVEGFの増加は認められず、VEGFは虚血により増加し、虚血の改善と共に速やかに低下した。従って、運動療法はVEGFの増加とは異なる機序で虚血を改善させ、VEGFに対するnegative feedbackが存在することが示唆された。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003; 43: 59-63)

Key words : Peripheral arterial disease, Physical training, VEGF, Tissue oxygen saturation

序 言

閉塞性動脈硬化症(以下ASOと略す)の間歇性跛行に対して、運動療法が最大歩行距離の延長や、ankle pressure index(API)・経皮的酸素分圧の回復時間の短縮に有効であることは以前より報告されており¹⁻³⁾、治療法の1つとして見直されつつある。一方、血管分子生物学の進歩により血管新生に関わる様々な因子が発見され、下肢虚血に対し、vascular endothelial growth factor (VEGF)・basic fibroblast growth factor(bFGF)・hepatocyte growth factor(HGF)などを用いた血管新生療法の臨床試験が開始されて注目を集めている⁴⁻⁶⁾。しかし運動療法の効果の作用機序や、血管新生因子との関連は明らかではない。

本研究では、ラット下肢虚血モデルを用いて、運動療法と血管新生因子VEGFとの関連を検討した。

対象と方法

1. 動物モデル

SD系ラット、雄、6週齢を用いた。

ラットをトレッドミルに慣らすため、術前に20m/min, 15min./dayの歩行訓練を2日間行った。ペントバルビタール尾静脈投与による麻酔下に、左総腸骨動脈を切除し、外腸骨・内腸骨動脈を分岐部で結紮・切離して下肢虚血モデルを作成した。術後2日目より、20m/min. 30min./dayの歩行訓練を週6日間、術後1・

3・5・7・14・21日で犠牲死させるまで行い、訓練群とした(各n=6)。但し術後1日で犠牲死させる群のみ、術翌日に訓練を行った。

同様に下肢虚血を作成し、行動をケージ内のみに留めたものを、非訓練群とした(各n=6)。

さらに、行動をケージ内に留め、開腹操作のみを行ったShamコントロール群(SC : 各n=3)と、全く侵襲を加えないNormalコントロール群(NC : n=3)を作成した。

2. 組織酸素飽和度

20°C一定に保たれた室内で、ペントバルビタール尾静脈投与による麻酔後、両後肢をバリカンと除毛クリームで除毛した。両後肢大腿部に、動静脈の直上を避けてパルスオキシメーターのセンサーを固定し、測定値が安定してから3分間、経皮的に組織酸素飽和度と脈波形を記録した。パルスオキシメーターはNonin社製8600Vを用い、術前・術直後及び術後1・3・5・7・14・21日に、訓練群では歩行終了後1時間以上経過してから測定した。

測定値は3分間の平均値を用いて、同一肢の術前値を1とし、術後の値を比で表して訓練群・非訓練群の健肢と患肢で比較した。

3. VEGF

術後1・3・5・7・14・21日に、組織酸素飽和度を測定した後、高濃度二酸化炭素吸入により犠牲死させた。両後肢の大腿二頭筋を大腿として、腓腹筋・ヒラ

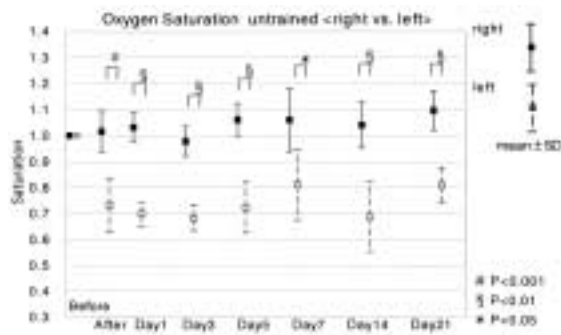


Figure 1 Tissue oxygen saturation of the right and left hind limbs in the untrained group. Left saturation remained significantly lower than right saturation for 21 days. Preoperative data were normalized to 1.0. All other data were normalized to preoperative levels to allow comparisons.

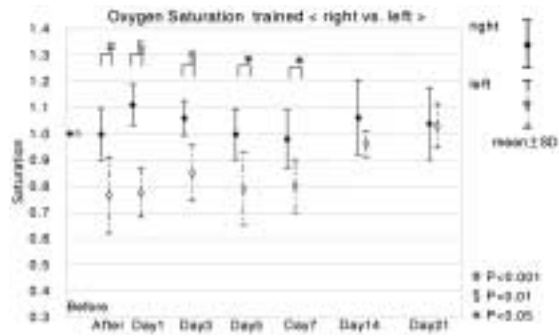


Figure 2 Tissue oxygen saturation of the right and left hind limbs in the trained group. Left saturation had increased by 14 days postoperatively.

メ筋・前脛骨筋・長趾伸筋を下腿として採取し、組織内のVEGF濃度をQuantikine M <R&D systems>(マウス・ラットVEGF交差反応性98%)を用いてELISA法により測定した。

組織内の総蛋白量をLowly法にて測定し、蛋白1μg当たりのVEGF濃度を求めた。

測定値はNormalコントロール群を術前値と考え、訓練群・非訓練群・Shamコントロール群の患肢を、それぞれ大腿・下腿に分けて比較した。

4. 統計

統計学的検討は、Mann-Whitney U-testを用いて行った。

結 果

1. 組織酸素飽和度

患肢の組織酸素飽和度は、血管切除により健肢と比べて術後有意に低下した($p<0.001$)。非訓練群では術後21日まで、患肢の有意な低下が持続したのに対し($p<0.01$) (Fig. 1), 訓練群では術後14日から有意差がなくなった(Fig. 2)。

訓練群と非訓練群の患肢を比較すると、術後14日から訓練群が有意に上昇した(Fig. 3)。

2. VEGF

各群とも、術後のVEGFは大腿・下腿で上昇した。

大腿組織中のVEGFは、Shamコントロール群に比べ、非訓練群は術後3・7・14日で有意に高かったが($p<0.05$) (Fig. 4), 訓練群では術後5日に高く($p<0.01$),

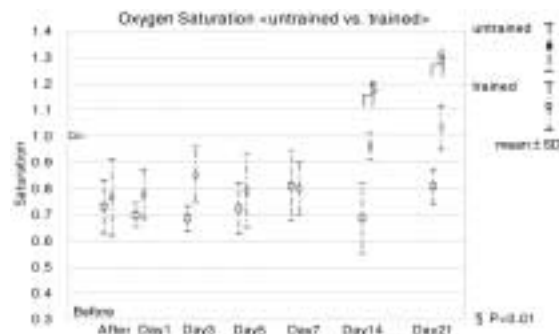


Figure 3 Tissue oxygen saturation of the left hind limbs in the untrained and trained groups. Saturation in the untrained group was significantly lower than that in the trained group 14 and 21 days postoperatively.

その他は差がなかった(Fig. 5)。訓練群と非訓練群を比較すると、術後3・7・14・21日で、訓練群よりも非訓練群のVEGFが有意に高かった($p<0.01$) (Fig. 6)。

下腿組織中のVEGFは、Shamコントロール群・訓練群・非訓練群の間に差は無かった(Fig. 7)。

考 案

虚血肢に対する運動療法は、最大歩行距離の延長、APIや経皮的酸素分圧の回復時間の短縮などにより、その有効性が証明されている¹⁻³⁾。本研究で用いた動物は急性動脈閉塞モデルであり、ヒトの慢性閉塞性動脈硬化症とは厳密には異なる。しかし、ラットにおける本モデルは、ヒトと比べて側副血行路の発達が遙かに早いと、ヒトの急性動脈閉塞のように下肢が壊死に

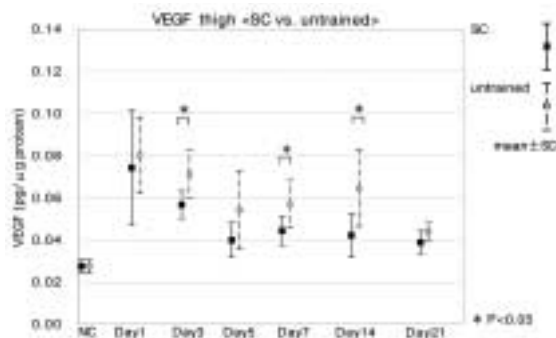


Figure 4 VEGF of the left thigh in the untrained and sham control group. VEGF in the untrained group was significantly higher than that in the control 3, 7 and 14 days postoperatively.

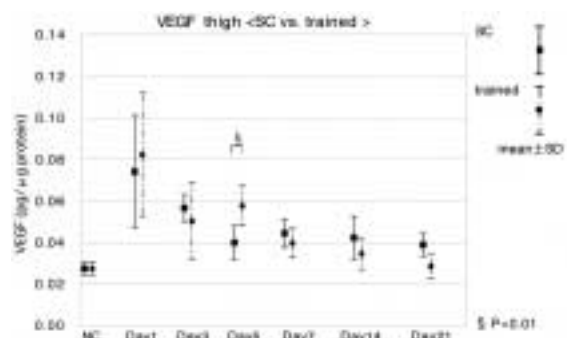


Figure 5 VEGF of the left thigh in the trained and sham control groups. VEGF in the trained group was higher than that in the control only on the 5th day postoperatively. There was no difference on other days.

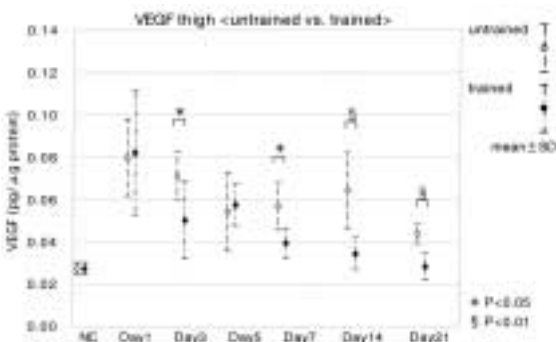


Figure 6 VEGF of the left thigh in the untrained and trained groups. VEGF in the untrained group was significantly higher than that in the trained group 3, 7, 14 and 21 days postoperatively.



Figure 7 VEGF of the left calf in the untrained, trained and sham control groups. There was no difference between the untrained, trained and control groups.

陥ることなく、トレッドミル上で虚血肢の跛行を示すなど、血行動態的にはヒトの慢性動脈閉塞に近いと考えられた。そこで、大腿部の組織酸素飽和度を経皮的に測定して虚血の状態を評価したが、訓練群は非訓練群よりも早く回復し、他の多くの報告と同様、運動療法は下肢虚血に対して有効であった。

運動療法の効果の作用機序については、以下のような報告がある。Dahlöfら⁷⁾はASO患者を対象として、最大歩行距離の延長は、筋組織中の糖代謝能の上昇、インスリン感受性の亢進など、筋組織代謝の改善によるものと述べている。Erneyら⁸⁾は、ラットの大腿動脈狭窄モデルを用いた実験で、運動療法の効果が血流増加によるものではなく、筋組織の酸素利用効率の改善によるものであると報告している。しかしYangら⁹⁾

は、ラット大腿動脈結紮モデルにおいて、運動療法が側副血行路増加により筋血流を増加させると述べており、Deschenesら¹⁰⁾も、運動は血管内皮細胞の分裂を促進し、毛細血管を増加させると述べている。果たして虚血肢における運動療法は、筋組織の代謝を改善させるのみなのか、血流をも増加させるのか、血流を増加させるとするならば、側副血行路として新たな血管が形成されるのか、既存の血管径が増大するのかなど、多くが未だ不明である。本研究も、歩行訓練による組織酸素飽和度上昇の機序については、今後組織学的な検索が必要であると思われる。

一方、組織低酸素(虚血)により様々な血管新生因子が産生され、中でもVEGFが強く誘導されることは周知の通りである^{11,12)}。さらにVEGFは血管内皮細胞に特

異的に作用し、血管新生を促進することから⁴⁾、我々は虚血肢の歩行訓練がVEGFの産生を促進する可能性があったと考えた。しかし本研究では、大腿筋組織において下肢虚血作成後 1 日目に訓練群・非訓練群とも Shamコントロール群と同程度のVEGFの上昇を認め、その後も訓練群のVEGFは他群と比べて上昇しなかった。Shamコントロール群でVEGFが上昇した理由は、開腹操作に対する創傷治癒機転により、VEGFの分泌が促進されたためと考えられる。その後訓練群では組織酸素飽和度の回復に伴って徐々に低下し、組織酸素飽和度が低値のままだった非訓練群の方が、Shamコントロール群と比べて術後14日まで、訓練群に比べて術後21日までVEGFの上昇が続いた。この結果から、歩行訓練がVEGFの産生を促進したとは考えにくく、VEGFは組織虚血により上昇し、虚血が改善されれば速やかに低下すると考えられた。また、下腿筋組織では各群で大腿ほど大きな差は見られなかったが、下腿の組織酸素飽和度を測定する必要があり、今回使用したセンサーでは細い下腿に密着せず、安定した測定が行えなかった。

運動と低酸素およびVEGFとの関係について、ヒトでは高地トレーニングの様な低酸素状態における運動が、VEGFを上昇させるという報告がある¹³⁾。Richardsonら¹⁴⁾は、酸素正常状態・低酸素状態どちらにおいても急激な運動によりVEGF mRNAが上昇すると述べており、その機序には、運動による酸素分圧の低下や、NOの上昇などが挙げられている¹⁵⁾。さらに、Olfertら^{16,17)}はラットを用いた実験で、慢性的な低酸素状態が筋繊維当たりの毛細血管数を増加させるものの、急激な運動による VEGF mRNAの上昇を抑制すると述べている。また、ヒトにおいても同様に、訓練によって毛細血管が増加するが、急激な運動に対する VEGF mRNAの上昇は抑制されるという報告があり、そこには毛細血管増加による、VEGFに対するnegative feedbackが存在すると考えられている¹⁸⁾。これらの報告は全て、全身性の低酸素暴露によるものであり、血管障害による局所的な組織虚血とは、血管内皮細胞や壁細胞などの応答が異なると考えられ、単純に比較することは困難であるが、VEGFを低下させるnegative feedbackの存在を示唆するという点において、本実験の結果もこれらに矛盾しない。

興味深いことに、Gavinら¹⁹⁾は、訓練によるVEGF

mRNAの上昇は第 1 日目をピークに低下するが、その低下はcitrate synthaseの活性上昇ではなく、糖代謝能の亢進によるものと述べている。また、Hersheyら²⁰⁾はウサギの虚血肢において、血管結紮後、VEGF上昇と共に筋組織内の毛細血管密度が増加するが、毛細血管密度の増加は筋血流の増加には寄与せず、VEGFの上昇と筋血流の増加は一致しないと報告している。これらは虚血とVEGFには密接な関係が存在するものの、組織血流の増加にVEGFが直接著しい効果を発揮するかについては不明であることを示している。本研究でも、虚血肢の運動療法による組織酸素飽和度の上昇と、VEGFとの関連は指摘できなかった。このことから、ラット下肢虚血モデルにおいて、運動療法はVEGFの増加とは異なる機序で、虚血の改善を促進することが示唆された。

結 論

ラット下肢虚血モデルにおいて、運動療法は患肢の組織酸素飽和度の改善に有効であった。

患肢筋組織中のVEGF濃度は、訓練群に比べ、非訓練群で高値が持続したことから、VEGFは虚血によって増加し、虚血の改善により速やかに低下すると考えられた。また運動療法は、VEGFの増加とは異なる機序で組織虚血を改善することが示唆された。

本文の要旨は第43回日本脈管学会総会で報告した。

文 献

- 1) Schainfeld RM: Management of peripheral arterial disease and intermittent claudication. J Am Board Fam Pract, 2001, 14: 443-450.
- 2) 横家正樹, 鳥山高伸, 林 久恵他: 下肢閉塞性動脈硬化症(ASO)に対する運動療法の効果 - 下腿動脈狭窄例に対する治療戦略 - . 脈管学, 2002, 42: 167-170.
- 3) 太田 敬, 杉本郁夫, 竹内典之他: 客観的な重症度評価からみた間歇性跛行肢の治療法選択基準. 脈管学, 2002, 42: 171-175.
- 4) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O et al: Constitutive expression of phVEGF₁₆₅ after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. Circulation, 1998, 97: 1114-1123.
- 5) 青木元邦, 森下竜一, 金田安史: 循環器疾患の遺伝子治療. 最新医学, 2000, 55: 38-43.
- 6) 米満吉和, 長谷川護, 居石克夫: 血管新生遺伝子治療

- における「血管新生因子作用機構の階層性」と「Integrated "Therapeutic Angiogenesis」の提唱．脈管学，2002，**42**：381-389．
- 7) Dahlöf A-G, Björntorp P, Holm J et al: Metabolic activity of skeletal muscle in patients with peripheral arterial insufficiency. *Eur J Clin Invest*, 1974, **4**: 9-15.
 - 8) Nerney TP, Mathien GM, Terjung RL: Muscle adaptations in trained rats with peripheral arterial insufficiency. *Am J Physiol*, 1991, **260**: H445-H452.
 - 9) Yang HT, Ogilvie RW, Terjung RL: Training increases collateral-dependent muscle blood flow in aged rats. *Am J Physiol*, 1995, **268**: H1174-H1180.
 - 10) Deschenes MR, Ogilvie RW: Exercise stimulates neovascularization in occluded muscle without affecting bFGF content. *Med Sci Sports Exerc*, 1999, **31**: 1599-1604.
 - 11) Nakagawa K, Chen Y-X, Ishibashi H et al: Angiogenesis and its regulation: roles of vascular endothelial cell growth factor. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2000, **26**: 61-66.
 - 12) Miraliakbari R, Francalancia NA, Lust RM et al: Differences in myocardial and peripheral VEGF and KDR levels after acute ischemia. *Ann Thorac Surg*, 2000, **69**: 1750-1754.
 - 13) Asano M, Kaneoka K, Nomura T et al: Increase in serum vascular endothelial growth factor levels during altitude training. *Acta Physiol Scand*, 1998, **162**: 455-459.
 - 14) Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SRD et al: Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise. *Am J Physiol*, 1999, **277**: H2247-H2252.
 - 15) Gavin TP, Spector DA, Wagner H et al: Nitric oxide synthase inhibition attenuates the skeletal muscle VEGF mRNA response to exercise. *J Appl Physiol*, 2000, **88**: 1192-1198.
 - 16) Olfert IM, Breen EC, Mathieu-Costello O et al: Skeletal muscle capillarity and angiogenic mRNA levels after exercise training in normoxia and chronic hypoxia. *J Appl Physiol*, 2001, **91**: 1176-1184.
 - 17) Olfert IM, Breen EC, Mathieu-Costello O et al: Chronic hypoxia attenuates resting and exercise-induced VEGF, flt-1, and flk-1 mRNA levels in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2001, **90**: 1532-1538.
 - 18) Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SRD et al: Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, **279**: H772-H778.
 - 19) Gavin TP, Wagner PD: Effect of short-term exercise training on angiogenic growth factor gene responses in rats. *J Appl Physiol*, 2001, **90**: 1219-1226.
 - 20) Hershey JC, Baskin EP, Glass JD et al: Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovascular Res*, 2001, **49**: 618-625.

Physical Training Does Not Increase VEGF in Skeletal Muscle of Rats with Peripheral Arterial Insufficiency

Satoko Fujita, Akira Hakoshima, Yasuyuki Fujiwara, and Takafumi Tabuchi

Fourth Department of Surgery, Tokyo Medical University Kasumigaura Hospital, Ibaraki, Japan

Key words: Peripheral arterial disease, Physical training, VEGF, Tissue oxygen saturation

To examine the relationship between physical training and vascular endothelial growth factor (VEGF) in peripheral arterial insufficiency, rats that had undergone removal of the left common iliac artery were trained for 1-21 days at 20 m/min for 30 min/day, 6 days/wk. Tissue oxygen saturation and VEGF of the hind limb were measured.

Training stimulated an increase in tissue oxygen saturation, while VEGF in skeletal muscle was not increased by training but by ischemia. VEGF immediately decreased with improvement in oxygen saturation.

Therefore, it is suggested that training improves ischemia without affecting VEGF concentration and provides negative feedback for VEGF.

(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003; **43**: 59-63)