

局所の熱刺激に対するマウス皮膚微小循環の反応 - 加齢による変化 -

中原 実 市岡 滋* 柴田 政廣** 中塚 貴志* 田原 真也***

要 旨: マウス皮膚微小循環法^{1,2)}を用い、熱刺激による皮膚微小循環の変化を、老齢群と若齢群で比較検討した。その結果、老齢群では細動静脈領域の血管拡張能が低下していることがわかった。次に、この現象における一酸化窒素(NO)の関与を、マウス陰囊皮膚微小循環動態変化を基に検討した。その結果、熱による微小血管の拡張にはNOが強く関与し、加齢に伴うNO産生能の低下が、老齢者の熱耐性低下を招いている可能性が示唆された。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, 44: 109-115)

Key words: Heating, Skin microcirculation in mouse, Skinfold chamber, Nitric oxide (NO), Aging

はじめに

社会の高齢化に伴い老化メカニズムの解明が重要課題となっている。特に高齢者は熱に対する耐性が低く^{3,4)}、熱中症のようなheat stressが致命的になる危険性も高い。加齢による体温調節機能の減弱に関する報告は比較的多く、特に最近ではレーザー・ドップラー血流計により皮膚血流変化を測定し、血管拡張能の違いを検討した報告もある⁵⁻⁹⁾。Evansら⁵⁾は、ヒトの皮膚血流変化をレーザー・ドップラーで測定した結果、熱刺激による血流増加は、35℃では加齢による差はないが、44℃では老齢群で顕著に抑制されることを報告している。また、近年、阻血解除後の反応性充血時血流状態(flow-mediated dilatation)から血管系の老化を検討した報告¹⁰⁻¹²⁾もあるが、それらによるとこの拡張反応には一酸化窒素(NO)が関与し、老化によりNO産生能が低下し血管拡張も減少すると報告している。しかし、これらの報告の多くはレーザー・ドップラーやplethysmography等、皮膚血管床の間接的計測法によるもので、微小血管の反応を直接観察したものは少なく、また、NO産生能と熱耐性の関係を調べたものはない。

本研究では、高齢者の熱耐性低下には加齢によるNO産生能の低下が関与すると考え、これらの関連を、新

たに考案したマウス背部皮膚微小循環観察法と生体顕微鏡ビデオシステムなどにより、微小血管を直接解析する手法を用い、微小循環変化からの解析を試みたので報告する。

対象と方法

実験にはICRマウスを用いた。実験1においては我々の考案したskinfold chamberをマウスの背部皮膚に装着し、生体顕微鏡下に皮膚の微小循環を観察した¹⁾。実験2においてはNOに対する感受性を調べるために、マウスの陰囊皮膚を切開して、生体顕微鏡下に皮膚微小循環の観察を行った。またPhosphate-Buffered Saline (PBS) 溶液を灌流することにより、組織の乾燥を防ぐとともに局所の温度調節を行った。

実験 1

実験には若齢群および老齢群ICRマウスを用いた(若齢群7匹, 4~6週齢。老齢群7匹, 41~45週齢)。

(1) skinfold chamberの装着

マウスはハロセン麻酔下に背部の皮膚を牽引し、二重となった皮膚の片側をメスで切開・切除し、7mm四方のskinfold chamberを装着した(Fig. 1)。これにより、対側皮膚の皮下血管網がintactの状態を観察可能となった。実際の観察は血行動態が安定する装着後48時間以上経過してから行った。

(2) 微小循環の観察

マウスはハロセン麻酔下にskinfold chamber部を生体

兵庫県立成人病センター形成外科

* 埼玉医科大学形成外科

** 東京大学大学院医学系研究科医用生体工学講座

*** 神戸大学大学院形成外科学講座

2003年7月7日受付 2004年2月26日受理

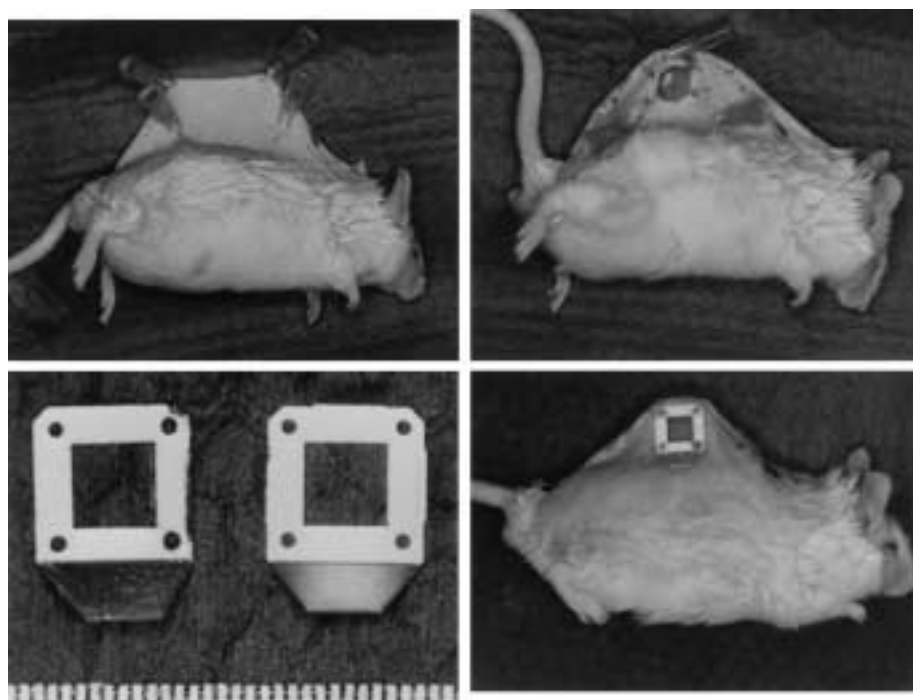


Figure 1

A: Dorsal skin drawn upward and fixed to the board.

B: A square area (about 7 mm on each side) of one layer of skin was removed, maintaining the other layer intact.

C: Skinfold chamber (7 mm on each side).

D: General appearance of a mouse with skinfold chamber in place.

A	B
C	D

顕微鏡の光源部に固定し、生体顕微鏡の画像をテレビモニターに映し出す形で、モニター上で観察を行った (Fig. 2)。この映像はビデオテープに録画され、最終的にコンピュータに取り込み血管密度、総血管長を求めた。

(3) 加熱方法

観察はまず室温 (25°C) で行い、その後40°Cに加熱した状態で行った。加熱にはドライヤーを用いた。ドライヤーは温度コントローラーに接続することで設定した温度でオン・オフを繰り返すようにし、実際の温度は温度モニターにて局部が40°C前後にコントロールされていることを確認しながら実験を行った。

(4) 画像解析

録画した微小循環画像をデジタル化し画像処理ソフト (Adobe Photoshop 5.5) および画像解析ソフト (Scion Image) を用いて、血管が黒 (グレー値濃度255)、それ以外の部分が白 (グレー値濃度0) となる二値化画像を作成した。平均グレー値濃度を計測することにより単位

面積あたりの血管床面積 (血管密度) を計測した。さらに血管領域を細線化し、画像内の総血管長の計測とした (Fig. 3)。

実験 2

実験には若齢群および老齢群のICRマウスを用いた (若齢群 6 匹, 4~5 週齢。老齢群 6 匹, 41~45 週齢)。

(1) 陰嚢の皮膚切開

ウレタン溶液 (1 g/kg) の腹腔内投与による麻酔後、脱毛処理した陰嚢の外側を切開・翻転し、27G針にて透明な合成樹脂台に固定することにより皮下血管網の観察を行った (Fig. 4)。

(2) 微小循環の観察

透過光により、生体顕微鏡下に実験 1 と同様に微小循環画像を観察記録した。組織の乾燥を防ぐため、点滴ルートを用いてPBS溶液を滴下・灌流しながら観察を行った。

(3) 加熱方法

まず初めに18°CのPBS溶液を15分間滴下・灌流し血行動態が落ち着いたところで、5分間33~34°CのPBS溶液を滴下・灌流し、加熱した。PBS溶液の加温は恒温槽を用いて行った。続いて再び18°CのPBS溶液を5分間滴下・灌流し、その後5分間33~34°C、3mM N(l)-Nitro-L-Arginine Methyl Ester(L-NAME)含有PBS溶液を滴下・灌流した。その後室温にてPBS溶液を滴下・灌流し、L-NAMEをwash outした後に塩酸パペリン(4 mg/ml)を滴下し、血管の最大拡張径を求めた(Fig. 5)。

(4) 画像解析

ビデオ録画像をコンピューターに取り込み、画像処理ソフト(Adobe Photoshop 5.5)および画像解析ソフト(Scion Image)を用いて血管径を計測した。血管径の計測は一連の個体の画像で細静脈あるいは細動脈の任意の点を数カ所選んで行った。

(5) response rateの計算

最初の加熱前の血管径をDco, 33~34°C PBSを滴下・灌流したときの血管径をDheat, 33~

34°CのL-NAME含有PBS溶液を滴下・灌流したときの血管径をDL-NAME, 塩酸パペリン滴下時の最大拡張径をDmとしてWitらが報告した次の式に基づいてresponse rateを計算した¹³⁾。

$$\text{response rate} = (D_{tr} - D_{co}) / (D_m - D_{co}) \times 100 (\%)$$

Experimental Equipment

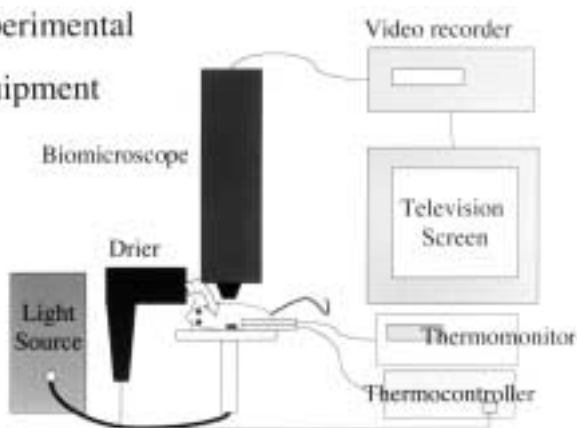


Figure 2 Experimental equipment of EXPERIMENT 1.

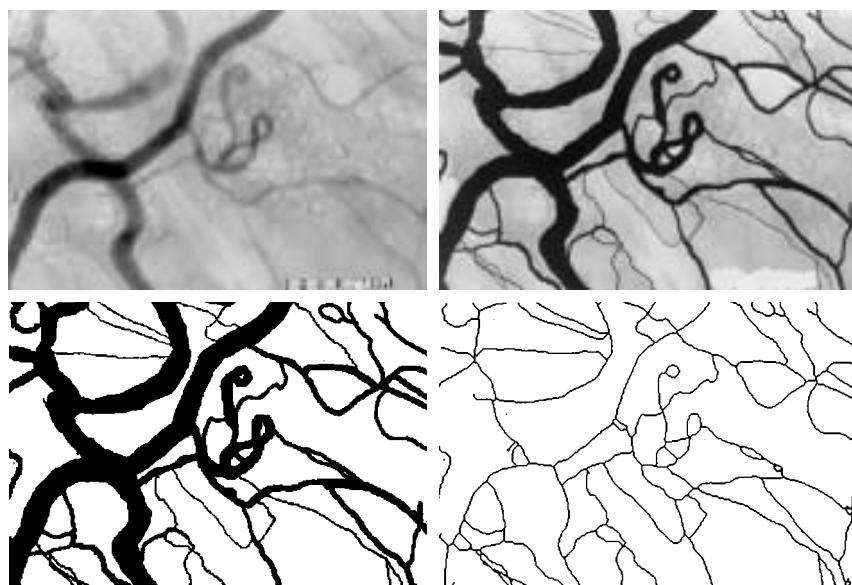


Figure 3

A: An image which was processed in the photoshop®.
B: The vessel area was converted to black.
C: The image was converted to the binary.
D: The binary image was then skeletonized.

A	B
C	D

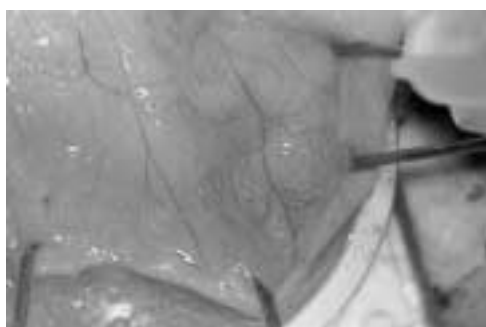


Figure 4 The scrotum skin was incised and observations were made with a biomicroscope.

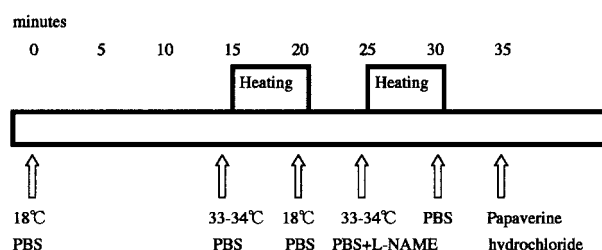


Figure 5 The protocol of EXPERIMENT 2. The scrotum skin was irrigated with PBS at 18°C, then at 33–34°C for 5 minutes and again at 18°C for 5 minutes. Next NO synthesis inhibitor, 3mM N(l)-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME), and PBS at 33–34°C was irrigated for 5 minutes. The L-NAME was then washed out with PBS solution, and Papaverine hydrochloride (4 mg/ml) was irrigated to achieve maximum vasodilation.

ここでDtrは治療時の血管径を表し、33～34°C PBS溶液のみを灌流したときのDheatを入れて計算したときのresponse rateをRheatとし、33～34°CのL-NAME含有PBS溶液を灌流したときのDL-NAMEを入れて計算したresponse rateをRL-NAMEとした。

統計処理

実験1においては血管密度、総血管長について熱刺激による増加率をそれぞれの個体で計算し、若齢群と老齢群の二群間で統計学的に差があるか、Student tテストにより検定した。実験2においては(Rheat-RL-NAME)/Rheat×100 (%)をそれぞれの個体で計算し、L-NAMEによる血管拡張抑制率として、若齢群と老齢群で差があるか、Student tテストにより検定した。

結果 1

血管密度は若齢群で平均19.3%の増加、老齢群で平均2.9%の増加であった(Fig. 6)。総血管長は若齢群で平均12.9%の増加、老齢群で平均6.7%の増加であった(Fig. 7)。血管密度の増加量は二群間で統計学的に有意な差であった(Student t test, $P < 0.01$)が、総血管長の増加は有意な差ではなかった。

結果 2

(Rheat-RL-NAME)/Rheat×100 (%)を計算して、L-NAMEによる血管拡張抑制率として老齢群と若齢群で比較検討した。若齢群では平均67.7%の抑制率であり、老齢群では平均19.9%の抑制率であった。これは統計学的

に有意な差であった(Student t test, $P < 0.01$) (Fig. 8)。

考 察

外界と接して人体最大の臓器である皮膚の微小循環の主たる役割は、皮膚自身に対する酸素の供給と熱拡散による体温の調節である。特に熱拡散による体温の調節は、皮膚という特殊な臓器に与えられた重要な機能と考えられる。最近ではレーザー・ドップラーなどを用いて比較的簡便に皮膚血流量の測定ができるため、若齢群と老齢群の加熱に対する皮膚血流量変化についてのいくつかの報告が見られる^{3,5-9)}。血流測定の方法として、レーザー・ドップラー以外にもvenous occlusion plethysmography^{14,15)}、キセノン133クリアランス法¹⁶⁾、経皮的pO₂測定法¹⁷⁾などが行われている。

これらのヒト皮膚微小循環測定による報告のほぼ一致した結果は、平熱・安静時には若齢群と老齢群では皮膚微小循環血流量に差はないが、熱などのストレスを与えた場合の反応性血流増加は老齢群では減弱するというものである。Evansら⁵⁾は、熱による反応性血流増加の減弱は前毛細血管レベルの血管拡張性の違いによるものではないかと考察で述べている。しかし、これらはすべて間接的な血流測定により推察されたものであり、血管の反応を直接観察して確認したものではない。

そこで我々は実験1において、マウスの背部皮膚にchamberを装着することで皮膚微小循環の可視化モデルを作製し^{1,2)}、熱刺激による微小血管の反応を直接観察することとした。画像上で大きな面積をしめる細動静

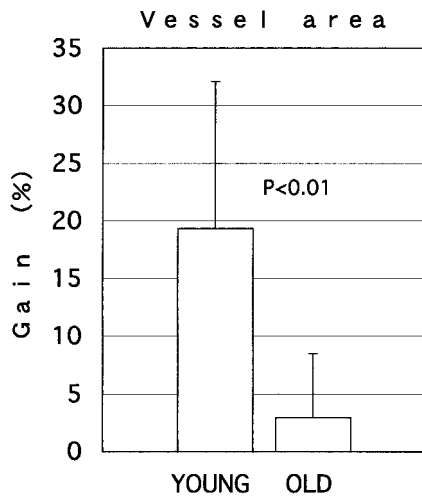


Figure 6 Total vessel area increased 19.3% in the young group and 2.9% in the old group, showing a significant difference.

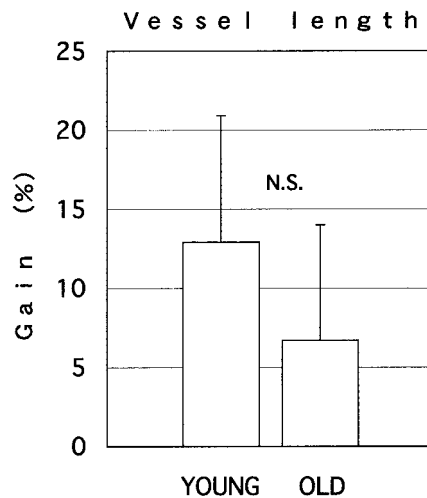


Figure 7 Total vessel length increased 12.9% in the young group and 6.7% in the old group.

脈の拡張は血管密度の増加として捉えられ、毛細血管の開存による側副血行の増加は総血管長の増加として捉えられる。結果は若齢群と老齢群で比較して血管密度の増加は統計学的に有意な差となり、総血管長の増加は有意な差ではなかった。このことから熱による皮膚微小循環の増加は細動静脈レベルの血管拡張による効果大きいことが示唆された。そこで、この熱刺激に対する細動静脈の拡張性の違いにNOが関与しているのかどうかを検討することとし、実験2を計画した。

これまでに熱刺激による血管拡張にはNOが重要な働きをしているという報告がなされている。たとえばTaylor¹⁸⁾やFarrell¹⁹⁾らはrabbit ear chamberでの観察においてNO合成酵素阻害剤を用いて、熱刺激による血管拡張にはNOが関与していることを報告している。また老化により、血管内皮のNO産生能は低下するという報告も多い。たとえばVallanceら²⁰⁾はplethysmographyによる計測により、血管内皮は常にNOを放出し、これが血管の緊張を調節しており、老人ではNO産生能の低下が血管拡張能の低下の原因ではないかと報告している。一方Moriら²¹⁾はラットの血管を用いたin vitroの実験で、老化により血管内皮のNO産生能は低下すると報告している。またSoltis²²⁾は同じくラットの血管を用いたin vitroの実験で老化による血管平滑筋拡張能の低下は血管内皮由来の血管拡張因子の産生低下によると報告し

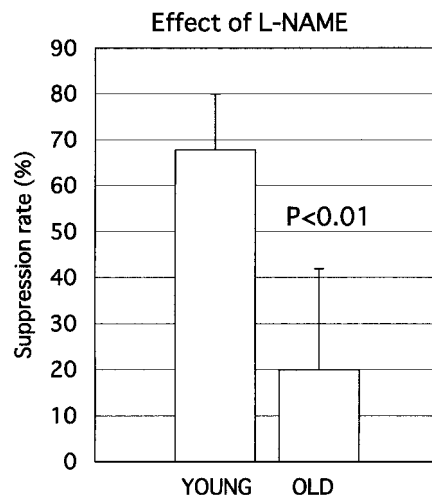


Figure 8 Thermoregulatory vasodilation suppressed 67.7% in the young group and 19.9% in the old group, showing a significant difference.

ている。

以上のように熱刺激に対する血管拡張にNOが関与していること、老化により血管内皮のNO産生能が低下することは報告されていたが、これら二つを統合して論じた報告はなかった。我々はこの二つを同時に、in vivoにて証明するため、マウスの陰囊皮膚を切開し、PBS溶液を灌流しながら生体顕微鏡下に皮下血管網の

観察を行った。NO合成酵素阻害剤であるL-NAMEを含むPBS溶液と、含まない溶液をそれぞれ33～34℃に加熱しマウス陰嚢皮膚に灌流することで、熱刺激による血管拡張にNOがどの程度影響を与えているかを若齢群と老齢群で比較検討した。なお、血管径の計測は、画像上最もその変化を捉えやすい細静脈の径を中心に行った。結果は予想されたとおり、若齢群で大幅に血管拡張が抑制された。老齢群ではL-NAMEによる血管拡張抑制効果はわずかなものであった。これは若齢群の血管拡張においてはNO依存性が高いことを示しており、老齢群ではNO依存性が低い。この現象を説明するには、老齢群ではNO産生能が低下しているか、NO感受性が低下しているかのどちらかである。先ほど述べたとおり老齢群ではNO産生能の低下が報告されており、やはりNO産生能の低下が大きく寄与しているものと考えられる。

まとめ

今回のマウスを用いた実験により、これまで明確にされていなかった局所の熱刺激による皮膚微小循環血流量増加の加齢による減弱は、主として細動静脈レベルの血管拡張性の違いにあることが観察された。熱による細動静脈の血管拡張には血管内皮から放出されるNOが強く関わっており、加齢により血管内皮細胞のNO産生能が低下するために熱による血管拡張能が低下し、全体としての血流量の増加が妨げられると考えられる。

謝 辞

本研究の一部は平成11～12年度丸木記念特別奨学研究費の助成を受け行った。また、実験を行うにあたり、多大な協力を頂いた埼玉医科大学形成外科の関谷直美嬢に深謝いたします。

文 献

- 1) Ichioka S, Minh TC, Shibata M et al: In vivo model for visualizing flap microcirculation of ischemia-reperfusion. *Microsurgery*, 2002, 22: 304–310.
- 2) Minh TC, Ichioka S, Harii K et al: Dorsal bipedicle island skin flap: A new flap model in mice. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2002, 36: 262–267.
- 3) Segawa S, Shiraki K, Yousef MK et al: Sweating and cardiovascular responses of aged men to heat exposure. *J Gerontol*, 1988, 43: M1–8.
- 4) Kenny WL, Hodgson JL: Heat tolerance, thermoregulation and ageing. *Sports Med*, 1987, 4: 446–456.
- 5) Evans E, Rendell M, Bartek J et al: Thermally-induced cutaneous vasodilation in aging. *J Gerontol*, 1993, 48: M53–57.
- 6) Richardson D: Effects of age on cutaneous circulatory response to direct heat on the forearm. *J Gerontol*, 1989, 44: M189–194.
- 7) Anderson C, Anderson T, Wardell K: Changes in skin circulation after insertion of a microdialysis probe visualized by laser Doppler perfusion imaging. *J Invest Dermatol*, 1994, 102: 807–811.
- 8) Kelly RI, Pearse R, Bull RH et al: The effects of aging on the cutaneous microvasculature. *J Am Acad Dermatol*, 1995, 33: 749–756.
- 9) Van den Brande P, von Kemp K, De Coninck A et al: Laser Doppler characteristics at the skin of the foot in young and in elderly healthy human subjects. *Microvasc Res*, 1997, 53: 156–162.
- 10) Bohlen HG, Nase GP: Dependence of intestinal arteriolar regulation on flow-mediated nitric oxide formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279: H2249–2258.
- 11) Kelm M: Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282: H1–5.
- 12) Dora KA, Damon DN, Duling BR: Microvascular dilation in response to occlusion: a coordinating role for conducted vasomotor responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279: H279–284.
- 13) de Wit C, Roos F, Bolz SS et al: Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circ Res*, 2000, 86: 649–655.
- 14) Rooke GA, Savage MV, Blengelmann GL: Maximal skin blood flow is decreased in elderly men. *J Appl Physiol*, 1994, 77: 11–14.
- 15) Taylor WF, Johnson JM, O'leary D et al: Effect of high local temperature on reflex cutaneous vasodilation. *J Appl Physiol J Appl*, 1984, 57: 191–196.
- 16) Tsuchida Y: Age-related changes in skin blood flow at four anatomic sites of the body in males studied by xenon-133. *Plast Reconstr Surg*, 1988, 27: 556–561.
- 17) Sodi N, Chiavetta M, Sensi S et al: A new model to assess tcpO₂ changes during heat-dependent vasodilation: preliminary observations. *Clin Hemorheol Microcirc*, 1998, 19: 235–243.

- 18)Taylor WF, Bishop VS: A role for nitric oxide in active thermoregulatory vasodilation. *Am J Physiol*, 1993, **264** (5 Pt 2): H1355–1359.
- 19)Farrell DM, Bishop VS: The roles of cGMP and cAMP in active thermoregulatory vasodilation. *Am J Physiol*, 1997, **272** (3 Pt 2): R975–981.
- 20)Vallance P, Collier J, Moncada S: Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man, *Lancet*, 1989, **2**: 997–1000.
- 21)Mori K, Hayabuchi Y, Kuroda Y et al: Age-related endothelium-dependent vascular relaxation in rat thoracic aorta in response to colforsin. *Pediatr Int*, 1999, **41**: 673–681.
- 22)Soltis EE: Effect of age on blood pressure and membrane-dependent vascular responses in the rat. *Circ Res*, 1987, **10**: 889–897.

Effect of Local Heating on Cutaneous Microcirculation in Mice - Comparison Between Age Groups -

Minoru Nakahara, Shigeru Ichioka*, Masahiro Shibata**, Takashi Nakatsuka*, and Shinya Tahara***

Department of Plastic Surgery, Hyogo Medical Center for Adults

*Department of Plastic Surgery, Saitama Medical School

**Department of Medical Engineering, University of Tokyo Graduate School of Medicine

***Department of Plastic Surgery, University of Kobe Graduate School of Medicine

Key words: Heating, Skin microcirculation in mouse, Skinfold chamber, Nitric oxide (NO), Aging

It is thought that a rise in blood flow caused by heat decreases with age and various stresses. To identify these affecting stresses, we experimented with the following methods. First, the response of skin microcirculation to direct heat, through a new skinfold chamber attached to the dorsal skin of mice, was studied with a biomicroscope. The result revealed that, compared with that in young mice, vasodilative response of cutaneous arterioles and venules to heat in old mice was limited to a lower blood flow. Second, the role of nitric oxide (NO), a potent vasodilative agent, was examined during thermoregulatory vasodilation in young and old mice. Thermoregulatory vasodilation tended to decrease more significantly in the younger group than the older one when the mice were administered L-NAME, which suggested that the younger group was affected by NO to a greater extent than the older group. One explanation for this phenomenon is that, as reported in previous studies, the ability to synthesize NO decreases with age. Consequently, active vasodilative response to heat declines by aging in mice. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, **44**: 109–115)