

令和元年6月24日現在

機関番号：32823

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16447

研究課題名(和文) 糖尿病性神経障害による横隔神経の損傷は運動耐容能を低下させるか？

研究課題名(英文) Dose the phrenic neuropathy affects the exercise tolerance in diabetic rat?

研究代表者

生友 聖子 (Ikutomo, Masako)

東京医療学院大学・保健医療学部・助教

研究者番号：90515884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1型糖尿病の罹患による横隔神経運動ニューロンへの影響を明らかにするために、トレーサーを用いた横隔神経運動ニューロンの逆行標識と横隔神経軸索の形態学的観察、また電気生理学的解析を行った。糖尿病群では対照群と比べて、逆行標識される横隔神経運動ニューロンの数が減少し、横隔神経の中枢端(腕神経叢からの分岐部)における軸索数の減少や横断面積の萎縮を認めた。電気生理学的解析では、糖尿病群において神経伝導速度の低下や、対照群と比べて大きな振幅の活動電位が観察された。以上の結果は、糖尿病罹患により横隔神経軸索に糖尿病性ニューロパチーによる障害が生じている可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病罹患者にみられる運動耐容能の低下は、理学療法の実施を困難にするため、そのメカニズムを解明することは、適切な理学療法を患者に提供する為に重要である。これまで、糖尿病罹患における運動耐容能の低下は筋の代謝異常によるものであると考えられ、呼吸機能についての研究はほとんど行われてこなかった。横隔神経が支配する横隔膜は呼吸機能にとって非常に重要な筋肉であることから、横隔神経の障害は呼吸機能そのものに何かしらの影響を与えている可能性が高い。以上のことから、本研究結果は、糖尿病罹患による運動耐容能低下のメカニズムの一つとして新たな知見を提供し、その解明に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the phrenic nerve to elucidate whether it would be affected in type 1 diabetes. We used retrograde labeling and staining with toluidine blue to evaluate anatomical and morphological alterations of the phrenic motoneurons. Additionally, we recorded single motor unit potential and calculated the motor nerve conduction velocity to evaluate the electrophysiological alterations of the phrenic nerve. The number of labeled motoneurons showed decrease in the phrenic nerve of diabetic group. The number of axons was decreased, and the cross-sectional areas of the axons were smaller in diabetic group. The motor nerve conduction velocity was lower in diabetic rats. Additionally, an enlarged single motor unit potential was observed in the diabetic group. These results suggest that the phrenic motoneuron is target of diabetic neuropathy in type 1 diabetes rats.

研究分野：糖尿病性ニューロパチー

キーワード：糖尿病性ニューロパチー 1型糖尿病モデルラット 横隔神経

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

運動療法は筋での糖代謝を促進できることから、糖尿病患者に対する治療手段の1つとして重要であり、広く行われている。しかしながら、その実施にあたっては、糖尿病患者における運動耐容能の低下が問題となってきた。糖尿病患者における運動耐容能の低下は広く見られるものであり、運動療法の実施を困難にすることから、そのメカニズムの解明は非常に重要な課題である。しかしながら、これまで運動耐容能低下の原因は筋の代謝異常にあると考えられ、運動耐容能を規定する他の要素である呼吸や循環機能についての研究は殆どなされてこなかった。これは、実際に日常生活において糖尿病患者が呼吸苦を訴えることは殆どない為であると考えられる。他方、少数ではあるが、努力性肺活量の低下などを報告する先行研究もあることから、安静時には問題にならないが運動時には問題となるような呼吸機能の障害が生じている可能性が高いと考えた。

呼吸筋の1つであり重要な作用を持つ横隔膜を支配する横隔神経は、第4頸髄から始まり横隔膜に至る生体の中でも非常に長い軸索を有する神経である。これまで、運動神経は感覚神経と比べて糖尿病性ニューロパチーによる影響を受けにくいと考えられてきたが、我々は近年、下肢筋を支配する運動ニューロンを対象とした実験にて、軸索の長い運動ニューロンもまた、糖尿病性ニューロパチーによって障害される可能性が高いことを明らかにしている。このことから、下肢筋の運動ニューロン同様、長い軸索を持つ横隔神経もまた、糖尿病性ニューロパチーによって障害されている可能性が高いと考え、横隔神経の障害が呼吸機能の低下を引き起こし、運動耐容能を低下させていないかに着目した一連の研究を行うこととした。

### 2. 研究の目的

先にも述べた通り、糖尿病性ニューロパチーは軸索の長い神経を標的とするため、横隔神経も糖尿病性ニューロパチーによって何らかの影響を受けている可能性が高い。また、横隔膜は呼吸筋の1つであり、吸気時に重要な役割を果たすことから、横隔神経の障害によって横隔膜の機能が障害されれば、呼吸機能そのものにも何かしらの障害が生じる可能性は非常に高いと考えられる。

そこで本研究では、横隔神経が糖尿病性ニューロパチーによって障害されているのか、また、横隔神経の障害が横隔膜の機能にどのような影響を与えているのかについて、形態学的・電気生理学的に解析することで、糖尿病性ニューロパチーによって横隔神経が障害され、呼吸機能の低下を引き起こしているのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)動物

実験には13週齢の雄性Wistarラットを用いた。糖尿病群には、ストレプトゾトシンを腹腔内投与し、1型糖尿病を発症させたラットを用いた。対照群には、生理食塩水を腹腔内投与した同週齢のラットを用いた。各群のラットは、22週間の生存期間の後、ハロタン吸入麻酔下で実験に供した。

#### (2)横隔神経運動ニューロンの逆行標識

対象の頸部を切開し、腕神経叢から分岐した横隔神経を同定して切断する。中枢側の断端を逆行性トレーサーDextran Texas Red溶液に暴露し、術創を閉じた。2週間の生存期間後、灌流固定して脊髄を取り出した。後固定後に脊髄を薄切し、切片を作成した。得られた染色像を蛍光顕微鏡下で観察し、ImageJ softwareを用いて逆行標識された横隔神経運動ニューロンの細胞数や断面積を測定した。

#### (3)横隔膜の運動単位の電気生理学的解析

対象の腹部を切開し、露出した横隔膜に記録用電極を刺入して、自発呼吸下で活動中の運動単位の活動電位を導出した。得られた活動電位をPowerLabでAD変換し、LabChartを用いて振幅を測定した。

#### (4)横隔神経の神経伝導速度の測定と形態学的解析

対象の頸部を切開し、腕神経叢から分岐した横隔神経を同定し、刺激電極を設置した。次に対象の腹部を切開し、記録用電極を横隔膜に設置して、横隔神経の電気刺激により誘発される誘発電位を導出した。得られた活動電位から神経伝導速度(Motor conduction velocity: MCV)を測定した。最後に、対象から横隔神経を摘出し、薄切して切片を作成して、トルイジンブルー染色を行った。得られた染色像を顕微鏡下で観察し、ImageJ softwareを用いて横隔神経軸索の数や断面積を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1)動物

ストレプトゾトシンを投与した動物は、投与後、全個体の血糖値が350mg/dl以上となり、1型糖尿病の発症が確認できた。

## (2)横隔神経運動ニューロンの逆行標識

いずれの対象動物でも、トレーサーにより逆行標識された横隔神経運動ニューロンは、脊髄前角の内側に多髄節にまたがる細長いカラムを形成していた。糖尿病群では対照群と比べて、逆行標識される横隔神経運動ニューロンの数が減少していた。他方、横隔神経運動ニューロンの断面積には変化は観察されなかった(図1)。



図1. 逆行標識された横隔神経運動ニューロン

## (3)横隔膜の単一運動単位電位の電気生理学的解析

いずれの対象動物でも、呼吸のリズムに合わせた横隔膜の運動単位の発火が観察された。糖尿病群の単一運動単位電位を解析したところ、対照群と比べてより大きな振幅の活動電位が観察された(図2)。以上の結果は、除神経後の再神経支配筋に特徴的に観察されるものであり、横隔膜で除神経とその後の再神経支配が生じている可能性を示唆している。

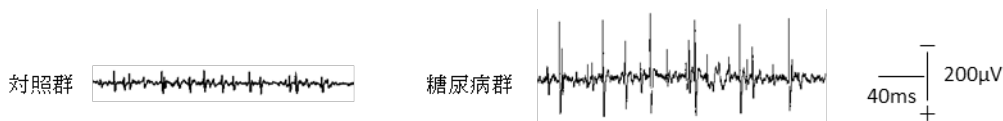


図2. 横隔膜の単一運動単位電位の模式図

## (4)横隔神経の神経伝導速度の測定と形態学的解析

横隔神経のMCVについて糖尿病群と対照群を比較したところ、糖尿病群ではMCVが低下していた。また、横隔神経軸索の形態学的解析では、横隔神経軸索の数の減少や、断面積の萎縮が観察できた(図3)。以上の結果は、軸索障害が生じている神経に特徴的に観察されるものであり、横隔神経の軸索に障害が生じていた可能性を示唆している。



図3. 横隔神経軸索の断面

## (5)まとめ

本研究における一連の結果は、1型糖尿病モデルラットにおいて横隔神経に糖尿病性ニューロパチーによる障害が生じている可能性を示唆するものである。先にも述べた通り、横隔神経の障害は横隔膜機能の低下を引き起こすと考えられることから、横隔神経の障害が運動耐容能の低下に関連している可能性は高い。これを明らかにするため、今後も検討を続けていく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

生友 聖子、玉木 徹、大城 直美、丹羽 正利、三科 貴博、志茂 聡、村松 憲、高血糖が横隔神経運動ニューロンに及ぼす影響～運動ニューロン数に着目した予備的研究～、運動障害、査読あり、26巻1号、2016、49-52 2016年

### 〔学会発表〕(計6件)

Masako Ikutomo, Toru Tamaki, Minoru Fukuda, Masatoshi Niwa, Ken Muramatsu, Discharge frequencies of single motor units of the diaphragm in diabetic rats, 第41回日本神経科学大会、2018年

生友 聖子、玉木 徹、志茂 聡、大城 直美、丹羽 正利、村松 憲、糖尿病罹患による横隔神経運動ニューロン発火頻度の変化、第5回日本糖尿病病理学療法学会学術大会、2018年

生友 聖子、玉木 徹、大城 直美、丹羽 正利、三科 貴博、村松 憲、横隔神経運動ニューロンは糖尿病性ニューロパチーにより障害される、第52回日本理学療法学会学術大会、2017年

Masako Ikutomo, Toru Tamaki, Naomi Oshiro, Takahiro Mishina, Masatoshi Niwa, Ken Muramatsu, Diabetic neuropathy targets the phrenic nerve in rats, 第39回日本神経科学大会、2016年

生友 聖子、玉木 徹、石黒 友康、大城 直美、丹羽 正利、村松 憲、糖尿病性ニューロパチーは横隔神経を障害する、第 51 回 日本理学療法学会、2016 年

生友 聖子、玉木 徹、大城 直美、丹羽 正利、村松 憲、糖尿病は呼吸障害の原因となるか、第 51 回 日本運動障害研究会、2016 年

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：生友 聖子

ローマ字氏名：Masako Ikutomo

所属研究機関名：東京医療学院大学

部局名：リハビリテーション学科 理学療法学専攻

職名：助教

研究者番号 ( 8 桁 ) : 90515884

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：村松 憲

ローマ字氏名：Ken Muramatsu

研究協力者氏名：玉木 徹

ローマ字氏名：Toru Tamaki

研究協力者氏名：志茂 聡

ローマ字氏名：Satoshi Shimo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。