

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19500569  
 研究課題名（和文） 高地トレーニングに関する基礎研究：低酸素環境下における気道粘膜の感受性の変化  
 研究課題名（英文） Basic studies on high-altitude training: Changes in the sensitivity on airway mucosa in chronic hypoxia  
 研究代表者  
 日下部 辰三 (KUSAKABE TATSUMI)  
 国土館大学・体育学部・教授  
 研究者番号：80117663

研究成果の概要：低酸素環境下の気道粘膜におけるペプチド性神経線維の増加は、気道系防御機構に関わる知覚機構の亢進を示唆する。さらに、化学受容細胞における水受容は同神経支配のコントロール下にあるものと推測される。これらの変化は、細胞内カルシウムを介した化学受容機序の変化によるものである可能性が示された。一方、舌・化学受容機におけるカルシウム結合タンパク含有線維の密度の変化は、体内電解質の恒常性維持のための適応であろうと考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：高地トレーニング、低酸素、高血圧、化学受容器、気道粘膜、神経ペプチド、カルシウム結合タンパク、免疫組織化学

## 1. 研究開始当初の背景

最近では各種スポーツ領域で高地トレーニングが盛んに行なわれるようになり、スポーツ科学の分野で大きな関心ももたれるようになって来ている。高地トレーニングは、高所（低酸素環境）滞在により低酸素刺激を受ける受動的効果とトレーニングによる積極的効果を合わせた効果が得られる点にその特徴がある。すなわち、その目的は高所で一定期間トレーニングすることにより、体内

の酸素運搬系機序を高め、その結果競技成績の向上を目指すという点にある。これまでの高地トレーニングに関する基礎的研究の多くは、換気量、血圧、心拍数などの測定や血液性状の分析等が主流で、諸変化のメカニズムに関する報告は少なかった。近年、我々は血中の酸素および炭酸ガス濃度を感受し呼吸および循環器系の調節を行なう動脈系化学受容器（頸動脈小体）を対象に、特にその形態変化について次の様な点を明らかにし

て来た。要約すると、形態学的には (1) 頸動脈小体は血中炭酸ガス濃度に依存して小体内の血管拡張を伴い数倍に肥大する (Anat. Rec., 1993; Brain Res., 1998a; Histol. Histopathol., 2003, 2004, 2005; Adv. Exp. Med. Biol., 2006)、(2) 頸動脈小体の肥大の一因は、血管拡張性ペプチド性神経線維の分布密度の上昇にある (Brain Res., 1998a; Histol. Histopathol., 2003, 2004, 2005; Adv. Exp. Med. Biol., 2005a)、(3) 血中炭酸ガス濃度が高い低酸素環境下では血管拡張の度合いは低く、その一因は血管収縮性ペプチド性神経線維ペプチド性神経線維の支配下にある (Histol. Histopathol., 2002)、(4) 神経ペプチドの関与のみならず、NO 合成酵素 (NOS) およびカルシウム結合タンパクも頸動脈小体内の血管動態に間接的に関与する (Brain Res., 1998b; Histol. Histopathol., 2000; Adv. Exp. Med. Biol., 2005b) ことを明らかにし、さらに、生理学的検討ならびに分子生物学的検討により、(5) 低酸素暴露が化学受容細胞におけるカルシウムの増加と減少の両方に関与している (Adv. Exp. Med. Biol., 2000) ことを示すとともに、(6) 低酸素環境下の情報伝達には細胞内セカンドメッセンジャーおよびリン脂質 (PI) 代謝経路が関与している可能性についても検討を加えた。以上の様に、形態および機能的側面からのアプローチのみならず、分子生物学的側面からも検討を加えて来ている。

## 2. 研究の目的

臓性知覚系である頸動脈小体を対象とした低酸素への適応メカニズムの解明はある程度成されたものと考えられるが、体性知覚系器官の感受性の変化については未知の部分が多い。そこで本研究では、体性知覚系である気道粘膜とその関連神経節を対象に、各種神経神経マーカーおよびカルシウム結合タンパクの動態変化を免疫組織化学的に比較検討し、知覚神経機序の動態を追求することを目的とした。一方、病的状態における変化を加味して考察するために、高血圧動物を用いた検討も行なった。この様に、高地トレーニング時 (低酸素環境下) の高地順応過程における気道粘膜の動態を、特に、呼吸・循環機能との関わりにおいて総合的に検討し、さらなる基礎的研究データを提供することを目的とした。詳細は以下の4項目に要約される。

(1) 我々は慢性低酸素環境下のラット鼻腔および気管におけるペプチド性神経支配の変化について、特に、その粘膜上皮内に存在する substance P (SP) および calcitonin gene-related peptide (CGRP) 含有神経線維

の分布密度の変化を検討してきた。上気道および下気道のみならず気道系全般を通じた変化を把握する意味において、実験1では、上気道下部に位置する喉頭粘膜 [ 喉頭蓋の喉頭面、披裂軟骨部、喉頭室の背側面、声帯の膜性部 ] を対象に substance P (SP) および calcitonin gene-related peptide (CGRP) 線維の分布を正常環境および長期間低酸素暴露したラットで免疫組織化学的に比較検討した。

(2) 化学受容器は、味覚を受容する化学受容器と血液中の酸素および炭酸ガス分圧を受容する化学受容器に分けられる。前者は主として舌乳頭に存在する味蕾を代表とし、後者は総頸動分岐部に存在する脈頸動脈小体を代表とする。本研究代表者を中心とするグループにより、低酸素暴露後および低酸素暴露解除後の頸動脈小体の諸変化について、組織計測法、免疫組織化学、さらには分子生物学的手法を駆使し、検討を加えて来た (研究の背景参照)。低酸素環境への順応メカニズムを解析するに当たり、動脈系化学受容器のみならず、味覚を受容する化学受容器と比較する必要性が出て来たので、呼吸器系に存在する喉頭味蕾についても、低酸素暴露の影響について検討を加えた。味蕾は舌背をはじめ軟および硬口蓋、咽頭、喉頭等にも存在している。舌以外の味蕾は、ラットでは全味蕾数の約 10%、ヒトでは約 27% にも達する。一般に、舌の味蕾は味覚受容器として広く知られているが、舌以外の味蕾に関してはその機能は十分に明らかにされていない。実験2では、長期間低酸素暴露したラット喉頭の味蕾を対象に、知覚系神経ペプチドとされている、Substance P (SP) および Calcitonin gene-related peptide (CGRP) を指標として、その含有神経線維の分布を調べ、正常環境下の分布と比較検討した。同時に、低酸素暴露中の飲水量も測定し、水受容との関連についても考察した。

(3) 化学受容器である味蕾は、一般には舌乳頭に存在するが、口腔粘膜、咽頭および喉頭等にも認められている。咽頭および喉頭に存在する味蕾は全ての味蕾数の 10% にも達する。喉頭味蕾は下気道の入口付近に位置することから、味覚の受容ということよりは、むしろ呼吸の変調あるいは気道系の防衛機構に役割を演じているのではないかと推測されている。最近、細胞内カルシウムイオンの貯蔵と移送に関与すると考えられているカルシウム結合タンパク (calbindin D-28k) が、舌味蕾内の細胞と神経線維に存在することが、免疫組織化学的に報告されている。Calbindin D-28k 免疫陽性神経終末が味細胞とシナプス結合を形成することから、カルシウム結合タンパクは味覚の知覚に関与している可能性が考えられているが、その生理学

的役割等については不明な点が多い。慢性低酸素状況下の動脈系化学受容器（頸動脈小体）で、calbindin D-28k 免疫反応は低くなるという報告があることから、実験3では、本来の化学受容器である舌味蕾と喉頭味蕾を対象に低酸素暴露の影響を検討し、低酸素環境下におけるカルシウム結合タンパクの役割について考察した。

(4) 動脈血の酸素および炭酸ガス分圧ならびに水素イオン濃度を感受する動脈系化学受容器（頸動脈小体）は、慢性低酸素暴露により拡張する。頸動脈小体は主に血管の拡張を伴い肥大し、化学受容細胞は過形成を示す。一方、高血圧ラットの頸動脈小体も肥大する。このように、動脈系化学受容器は低酸素暴露という外因性環境変化のみならず高血圧という内因性環境変化にも適応して形態変化を呈する。実験4では、化学受容器の内因性および外因性環境変化に対する適応を検討する目的で、高血圧自然発症ラット(SHR)の舌味蕾における calbindin D-28k の局在を免疫組織化学的に検討し、既に報告している低酸素環境下における適応変化と比較検討した。

### 3. 研究の方法

上記4項目の目的に対応する為に、実験1から4を行った。

(1) 実験1では、3ヶ月間低酸素暴露(図1)(10% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>, 3-4% CO<sub>2</sub>)したラットを常法に従い灌流固定後、喉頭部を採取し、常法に従い16μmのクリオスタット切片を作成した。PAP法にて免疫染色を行った。一次抗体には、anti-SP(1:500)とanti-CGRP(1:1500)を用いた。対照試験として吸収試験を行なった。



	PO <sub>2</sub> (mmHg)	PCO <sub>2</sub> (mmHg)	pH
Control	94.2 ± 2.3	34.3 ± 0.8	7.43 ± 0.01
Hypoxia	50.5 ± 1.6*	35.4 ± 0.8	7.43 ± 0.01

図1 低酸素暴露装置および血液ガス組成

(2) 実験2では、同環境で3ヶ月間低酸素暴露したラットの喉頭部の試料を用い、二重標識蛍光抗体法により検討した。一次抗体には、anti-SP(1:500)、anti-CGRP(1:1500)を用いた。二次抗体には、ローダミン標識 goat anti-rat IgG(1:100)と FITC 標識 goat anti-rabbit IgG(1:100)を用いた。二重標識観察にはダブルバンドパスフィルターを

装着した蛍光顕微鏡を用いた。対照試験として吸収試験を行なった。

(3) 実験3では、同試料を用いカルシウム結合タンパク(calbindin D-28k)の局在を検討した。一次抗体には、anti-calbindin D-28k(1:1,000)を用いてPAP法にて免疫染色を行った。対象試験として吸収試験を行なった。

(4) 実験4では、高血圧の発症を確認した高血圧自然発症ラット(SHR)および対照群としてWistar系ラット(WKY)の有郭乳頭を摘出し、PAP法にて免疫染色した。一次抗体には、anti-calbindin D-28k(1:1,000)を用いた。対照試験として吸収試験を行なった。

### 4. 研究成果

(1) 実験1の結果を要約すると(表1)、低酸素環境下の喉頭粘膜内および粘膜直下のSPおよびCGRP陽性線維数は増加した。特に、喉頭蓋や披裂軟骨部位では顕著であり、多くの線維が管腔近くまで侵入していたが、声帯部では大きな変化は認められなかった。粘膜固有層の喉頭腺周囲のSPおよびCGRP陽性線維数も増加した。ペプチド性神経支配の変化は低酸素環境への順応を示す形態学的変化の一つであると考えられる。低酸素環境下の鼻粘膜および気管におけるペプチド性神経支配の変化を考え合わせると、粘膜上皮内のSPおよびCGRP線維の増加は、上気道および下気道を通じた特徴であると思われる。さらに、呼吸器系器官の粘膜上皮内のSPおよびCGRP線維は知覚系の性質を持つことから、低酸素環境下の喉頭粘膜における気道系防御機構に関わる知覚機構は亢進していることが推測される。喉頭腺周囲のSPおよびCGRP陽性線維数の増加もまた気道系防御機構に関与しているものと推測される。

表1. コントロールおよび慢性低酸素環境下の喉頭粘膜におけるSPおよびCGRP含有神経線維の分布

	SP		CGRP	
	Control	Hypoxia	Control	Hypoxia
喉頭蓋				
上皮内	+	+++	++	+++
上皮下	+++	++++	+++	++++
披裂部				
上皮内	+	++++	+++	++++
上皮下	++	+++	++	+++
声帯				
上皮内	-	-	-	-
上皮下	+	+	+	+

—無 +, 少; ++~+++、中等度; +++++, 多

(2) 実験2の結果を要約すると(図2)、ラット喉頭粘膜上皮内に見られる味蕾に存在する味蕾内、味蕾直下および周囲のSPおよびCGRP陽性線維数は、低酸素暴露により増加した。低酸素環境に順応した結果であると考えられる。大部分のCGRP線維はSPとの共存を示した。低酸素暴露中のラットの飲水量は、正常環境下のラットに比較して有意に少なかった。喉頭の味蕾は水受容に関与しているという推測があるが、今回の結果

はこの推測を支持すると共に、喉頭味蕾の水受容はペプチド性神経支配のコントロール下にあるものと思われる。

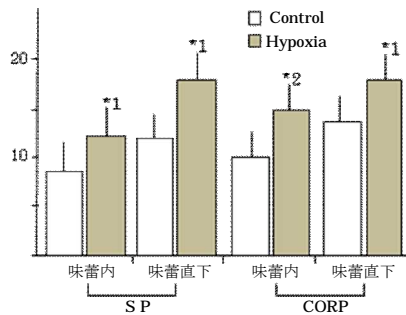


図2. コントロールおよび慢性低酸素環境下の喉頭味蕾におけるSPおよびCORP線維の密度を示すヒストグラム。\*1, P<0.01; \*2, P<0.05.

(3) 実験3の結果を要約すると(表1)、正常環境下ラットでは、calbindin D-28k 免疫活性は舌有郭乳頭の味蕾内細胞および神経線維に認められた。一方、喉頭味蕾では味蕾直下の神経線維には認められるが、味蕾内細胞には認められなかった。低酸素暴露ラットでは、有郭乳頭の味蕾内細胞および神経線維におけるcalbindin D-28k 免疫活性は減少した。喉頭味蕾では、味蕾直下の免疫陽性線維の分布密度は正常環境下ラットに比べ高かった。これらの所見から、喉頭味蕾の機能は舌味蕾の機能とは異なり、味覚の知覚よりはむしろそれ以外の何らかの化学受容に関わる可能性が考えられる。低酸素暴露による舌および喉頭味蕾におけるcalbindin D-28k 免疫活性の顕著な変化は、長期低酸素暴露が舌および喉頭味蕾における細胞内カルシウムイオン調節を介した化学受容機序を変化させている可能性が示唆される。

表2. 正常環境下および低酸素環境下ラットの舌・有郭乳頭味蕾と喉頭味蕾におけるCalbindin D-28k 免疫陽性神経線維の分布密度の比較。

	Control	Hypoxia
有郭乳頭		
味蕾	++	+
味蕾内	++	+
味蕾直下	±	±
固有層	+++	+
喉頭		
味蕾	-	-
味蕾内	±	±
味蕾直下	+	++
固有層	+	+

-, 無; ±, 極少; +, 少; ++~+++ 中等度; +++++, 多.

(4) 実験4の結果を要約すると(表3)、既に報告されているように、calbindin D-28k 免疫陽性反応は、上皮内の味蕾細胞および固有層に認められた。SHRの味蕾におけるcalbindin D-28k 陽性細胞数はWKYに比べ多く、SHRの固有層におけるcalbindin D-28k 陽性線維はWKYに比べ少なかった。低酸素環境下の結果と比較すると、味蕾細胞と固有層の両方で免疫活性が低下していたのに対し、高血圧環境下の味蕾では陽性細胞は増加し逆の結果を示した。SHRではNaClに対する感受性が低下しているという報告があるとともに、味蕾細胞におけるcalbindin D-28kは、特殊

な味覚刺激に対する反応ではないかと推測される。これらの点を勘案すると、SHRの味蕾細胞におけるcalbindin D-28kの増加は、求心性線維を介した味覚感受性の低下により、末梢受容器レベルにおける体内の電解質の恒常性を維持する為の適応ではないかと推察される。

表3. コントロール(WKY)および高血圧ラット(SHR)の舌・有郭乳頭味蕾におけるCalbindin D-28k 免疫陽性神経線維の分布密度の比較。

	WKY	SHR
有郭乳頭		
味蕾	+	++
味蕾内	+	+
味蕾直下	±	±
固有層	+++	+

-, 無; ±, 極少; +, 少; ++~+++ 中等度; +++++, 多.

本研究課題を行なうに当り、文部科学省科学研究費(基盤研究C)の援助を受けたことに対し感謝の意を表する。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

C. Horiguchi, T. Taguchi, T. Yoshida, G. Nishimura, M. Kawakami, Y. Taniguchi, H. Matsuda, Y. Mikami, M. Tsukuda, Early assessment of clinical response to concurrent chemoradiotherapy in head and neck carcinoma using fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission topography. *Auris Nasus Larynx* 35, 103-108, 2008. 査読有.

(3) N. Kondo, Y. Ishiguro, M. Kimura, K. Fujita, A. Sakakibara, T. Taguchi, G. Toth, H. Matsuda, M. Tsukuda, Anti-tumor effect of gefitinib on head and neck squamous cell carcinoma enhanced by trastuzumab. *Oncol. Rep.* 20, 373-378, 2008. 査読有.

T. Taguchi, M. Tsukuda, Y. Mikami, H. Matsuda, Y. Taniguchi, C. Horiguchi, G. Nishimura, Treatment results and prognostic factors for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with concurrent chemoradiotherapy. *Auris Nasus Larynx* (in press, 2008). 査読有.

[学会発表] (計 4 件)

松田 秀樹, 林田 嘉朗, 川上 倫, 竹中 敏文, 日下部 辰三, 高血圧自然発症ラット(SHR)頸動脈小体の形態学的特徴, 第112回日本解剖学会, 2007. 3, 大阪.

日下部 辰三, 平川 晴久, 及川 秀, 川上 倫, 竹中 敏文, 林田 嘉朗, 慢性低酸素暴露ラットの舌および喉頭味蕾におけるcalbindin D-28k 免疫活性, 第84回日本

生理学会、2007. 3、大阪.

松田 秀樹、林田嘉朗、川上 倫、竹中敏文、日下部辰三、ラットの舌および喉頭味蕾における calbindin D-28k 免疫活性：慢性低酸素暴露による変化、第 113 回日本解剖学会、2007. 3、大分.

松田秀樹、高橋優宏、佃 守、川上 倫、竹中敏文、日下部辰三、高血圧自然発症ラット(SHR)の舌味蕾における calbindin D-28k 免疫活性、第 114 回日本解剖学会、2009. 3、岡山.

[図書] (計 1 件)

T. Kusakabe, The amphibian carotid labyrinth. In: Structure, evolution and function of airway chemoreceptors in the vertebrates. G Zaccane, E. Cutz, D. Adriaenson, C. Nurse, A. Maueri (eds). Plymouth UK. ( in press, 2009 ).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日下部 辰三 (KUSAKABE TATSUMI)  
国土館大学・体育学部・教授  
研究者番号：80117663

### (2) 研究分担者

松田 秀樹 (MATSUDA HIDEKI)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号：80305458