

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500360

研究課題名(和文) 中枢呼吸リズム生成機構の発達過程の解明

研究課題名(英文) Developmental changes in central respiratory rhythmogenesis

研究代表者

越久 仁敬 (OKU YOSHITAKA)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：20252512

研究成果の概要(和文)：新生ラットの *vitro* 標本では、 μ オピオイド作動薬 DAMGO は呼吸頻度を遅くすることが知られている。我々は本研究において、若年ラット *in situ* 標本では DAMGO が中枢性に後吸気相を短縮させ、吸気相優位の頻呼吸を生じさせることを見出した。以上の結果は、 μ オピオイドの効果は若年期 *in situ* 標本では新生児期 *vitro* 標本とは異なり、3相パターンを2相パターンに転換させることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：A μ -opioid DAMGO slows down the respiratory rhythm in neonatal rats *in vitro*. However, we found that DAMGO applied to the perfusate of the arterially perfused *in situ* preparation consistently induces rapid breathing with remarkable reduction of expiratory time. The vagal post-inspiratory activity was obliterated. These results indicate that DAMGO switches the breathing pattern from 3-phase to 2-phase in juvenile rats, which is different from the response of neonates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
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：神経科学 神経・筋肉生理学

キーワード：(1) 呼吸リズム (2) 呼吸ニューロンネットワーク (3) ペースメーカー (4) *in situ* 標本 (5) 膜電位イメージング

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の呼吸中枢は、出生前に既に安定した呼吸リズムを生成できるまでに発達しているが、出生後も発育に伴い呼吸リズム生成機構は大きく変化する。新生動物では、延髄腹外側において、吻側に位置する parafacial respiratory group (pFRG) (Onimaru & Homma, 2003) と尾側に位置する preBötzinger Complex (preBötC) (Smith *et al.*, 1991) という2つのオシレーター (ペースメーカー) が

存在し、pFRG の前吸息性 (pre-I) ニューロンが preBötC の吸息性ニューロンをトリガーして呼吸リズムが生成されているとされる。一方、成熟動物では、この2つのオシレータの間に位置する Bötzinger Complex (BötC) と呼ばれる主として抑制性の呼吸ニューロン群と preBötC がネットワークを形成して呼吸リズムを生成している (Ezure, 2004)。新生児型、成人型、それぞれのリズム生成機構についての研究はなされているが、新生児型

呼吸リズム生成機構が発育に伴って、いつ、どのようにして成人型へ変化していくかについての研究は未だ報告されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新生児型呼吸リズム生成機構が、いつ、どのような過程を経て成人型呼吸リズム生成機構へ変化していくのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

経大動脈的に脳幹を灌流する vivo に近い in situ 標本 (Paton, 1996) を用い、(1) 膜電位イメージングによって呼吸ニューロン活動を可視化し、その動特性の発育に伴う変化を相互相関解析法などの統計数理解析法により解析する。抑制性シナプス伝達遮断 (= ネットワークを障害) に対する呼吸ニューロン群の時空間活動パターン変化を、発育段階ごとに解析する。(2) μ オピオイド作動薬は、preBötC を抑制するが、pFRG は抑制されないため、pFRG リズムと吸息リズムの解離 (Quantal Slowing) が起こる (Mellen *et al.*, 2003)。延髄腹側から pFRG あるいは BötC の呼吸ニューロンを細胞外記録あるいはホールセル記録し、ペースメーカー電流遮断薬および μ オピオイド作動薬投与に対する pFRG あるいは BötC のバーストリズムと吸息リズムの変化を、発育段階ごとに解析する。

4. 研究成果

膜電位イメージングに関しては、延髄腹側からのイメージングが技術的に困難であったことなどから、新たな知見は得られなかったが、現在の呼吸中枢膜電位イメージングの state-of-art を専門学術誌に総説として発表した (Resp Physiol Neurobiol, 2009)。

μ オピオイド作動薬に関しては、in situ 標本において Quantal Slowing を誘発させるための様々な条件検討 (オピオイド投与量、灌流液中の K^+ 濃度、灌流速度・温度等) を行った。しかし、呼吸リズムの変化 (呼吸周期の増減、横隔神経活動の振幅減少およびバースト間隔の延長など) は観察されるものの、Quantal Slowing に相当するような呼吸周期の変動は観察されなかった。若年ラット (生後 3W 以降) in situ 標本のみならず、新生ラット (生後数日) での検討も行ったが、やはり、同様に Quantal Slowing は観察されなかった。これらの結果は、呼吸リズム生成機構が生後数日の間にネットワーク型へ移行することを示唆している。

Quantal Slowing が in situ 標本において観測されなかったため、我々は当初の実験計画を変更して、DAMGO に対する呼吸応答をさらに詳細に検討することにした。オピオイドが呼吸抑制を起こすことは古くから知られ

ている。オピオイドの呼吸器系の副作用は、呼吸数と一回換気量の抑制、二酸化炭素や低酸素に対する感受性の低下であり、しばしば臨床において疼痛や呼吸困難感の治療の妨げとなっている。オピオイドの呼吸抑制については、これまで多くの研究がなされてきたが、その機序については未だ不明である。イヌにおいて μ オピオイド作動薬である remifentanyl を静脈内投与すると、脳幹から脊髄に投射する呼吸性前運動ニューロン活動が抑制されるが、オピオイド受容体拮抗薬の naloxone をニューロン周囲に微小注入しても抑制を取り除くことはできない (Stucke *et al.*, 2008)。このことは、オピオイドの呼吸抑制作用が前運動ニューロンより中枢の神経回路で起こっていることを示している。呼吸性神経活動を保持している新生ラットのスライス標本では、 μ オピオイド作動薬 DAMGO によって呼吸数が低下する。これは、DAMGO がこの標本において呼吸リズムを生成している preBötC を抑制するためと考えられる。ところが、覚醒状態の成ヤギの preBötC 領域に DAMGO を注入しても呼吸抑制は認められない (Krause *et al.*, 2009)。このような vivo の状態では、呼吸リズムは橋から延髄にかけての広範囲の神経回路によって生成されており、DAMGO による preBötC の抑制はスライス標本ほど呼吸に影響しないのかもしれない。さらに、Czapla ら (Czapla *et al.*, 2000) は低濃度の DAMGO の静脈内投与は呼吸を抑制するが、高濃度の DAMGO はむしろ呼吸を促進することを示した。このような DAMGO の呼吸に対する濃度依存性の作用は、濃度に依存しないモルヒネの呼吸抑制作用と対照的である。これらの呼吸に対する作用の違いは、 μ オピオイド作動薬間の薬理学的特性の違い (G_{α} 蛋白サブタイプに対する効力の違いなど) によるものかもしれない。そこで、我々は in situ 標本を用いて DAMGO の呼吸に対する濃度依存性の作用を詳細に検討した (Respir Physiol Neurobiol, 2011)。

まず、灌流液の DAMGO 濃度が 200nM となるよう DAMGO を灌流液にくわえ、それ以降、5-10 分毎に DAMGO 濃度を 50~200nM 増加させて、最終的に 300~1800nM まで濃度依存性作用を横隔神経活動 (PNA) をモニターすることで観測した (図 1)。結果、DAMGO 濃度が増加するにつれて、吸気時間の延長と呼気時間の短縮がみられ (図 1Bb)、その後、呼吸パターンは突然、著明に変化し、呼気時間が著しく短い (control 3.9 ± 1.3 s; DAMGO 0.34 ± 0.14 s, $p < 0.0001$) 頻呼吸となった (図 1Bc)。呼吸サイクルは 5.3 ± 1.4 s から 1.8 ± 0.9 s に短縮し、整流積分 PNA の振幅は $35.3 \pm 7.8\%$ に減少した。頻呼吸は、300~500nM の濃度で見られ、1800nM までは濃度を上げて呼吸パターンは変わらなかった。

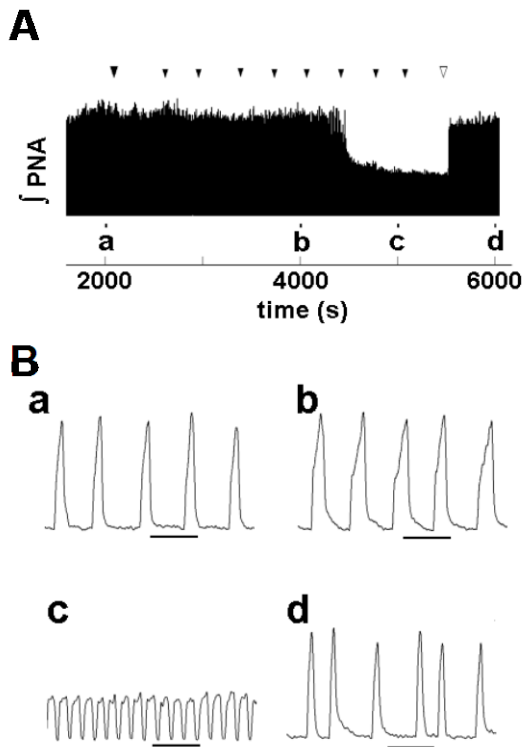


図1. DAMGO濃度依存性の積分横膈神経活動(∫PNA)応答。Koganezawa et al., *Respir Physiol Neurobiol*, 2011より改変引用。Ba~dは、図1Aにおけるa~dの時点での拡大波形を示す。Bars, 5 s。

13例全例で、呼吸パターンはnaloxone投与によりDAMGO投与前のパターンに戻った(図1Bd)。呼吸パターン変化が迷走神経を介する末梢性応答かどうかを検討するために3例において頸部で両側迷走神経切断を行ったが、頻呼吸応答に変化はなかった。

次に、頻呼吸応答を起こす機序を推定する目的で、4例で中枢迷走神経活動(VNA)を横膈神経活動と同時記録した(図2)。コントロールでは、VNAは吸息性と後吸息性コンポーネントからなり、後吸息性コンポーネントが優位で、活動のピークは吸息相終了直後であった(図2A)。DAMGO投与後、VNAの後吸息性コンポーネントが徐々に増加し、後吸息性コンポーネントは短縮した。ただし、13例中6例でPNAの後吸息性活動は増加した。呼吸パターンが頻呼吸に変わると、VNAの後吸息性コンポーネントはほぼ消失し、吸息-呼息の2相性パターンとなった(図2B)。

我々の知る限り、DAMGOが後吸息性コンポーネントを抑制して、正常呼吸の3相性パターンを2相性パターンに頻呼吸に変えるという報告は初めてである。本研究結果は、 μ オピオイド作動薬の呼吸に対する作用は作動薬の種類、投与経路、年齢、標本の種類(vivoかvitroか)によって様々であることを示唆している。

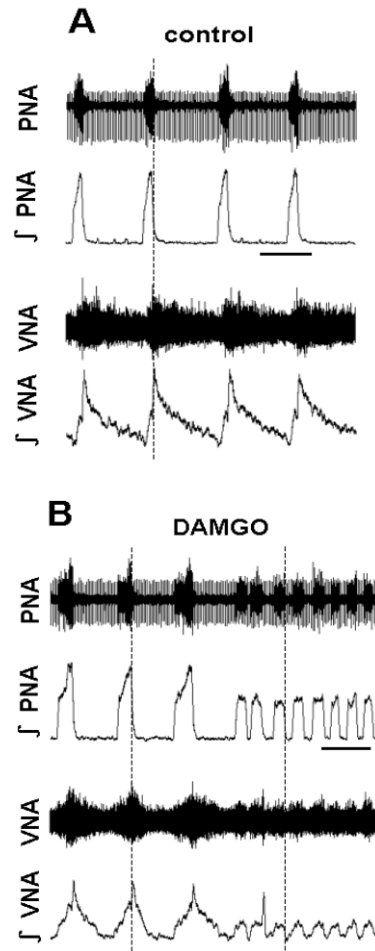


図2. 横膈神経活動(PNA)と中枢迷走神経活動(VNA)の同時記録。∫PNA、∫VNAは、それぞれ積分PNA、積分VNAを示す。点線は吸息-呼息の切り替わるタイミングを示す。Koganezawa et al., *Respir Physiol Neurobiol*, 2011より改変引用。Bars, 10 s。

DAMGOのように呼吸抑制が少ない μ オピオイド作動薬が開発されれば、臨床において呼吸困難感や疼痛制御に有用と考えられた。

文献

- Czapla MA, et al. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 994-9 (2000).
 Ezure K. *Prog Brain Res* 143, 67-74 (2004).
 Krause KL, et al. *J Appl Physiol* 107, 1591-99 (2009).
 Mellen NM, et al. *Neuron* 37, 821-6 (2003).
 Onimaru H, et al. *J Neurosci* 23, 1478-86 (2003).
 Paton JF. *J Neurosci Methods* 65, 63-8 (1996).
 Smith JC, et al. *Science* 254, 726-9 (1991).
 Stucke AG, et al. *J Neurophysiol* 100, 2878-88 (2008).

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2件)

(1) Koganezawa T, Okada T, Terui N, Paton JFR, Oku Y. A μ -opioid receptor agonist DAMGO induces rapid breathing in the arterially-perfused in situ preparation of rat. *Respir Physiol Neurobiol*, epub ahead of print, 2011. (査読あり)

(2) Ruangkittisakua A, Okada Y, Oku Y, Koshiya N, Ballanyi K. Fluorescence imaging of active respiratory networks. *Resp Physiol Neurobiol* 2009; 168: 26-38. (査読あり)

[学会発表] (計1件)

(1) Oku Y. Advances in analyses of spatiotemporal respiratory network activities using voltage-sensitive dyes. (Symposium) 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009) 2009. 7. 28 Kyoto.

[その他]

ホームページ等

<http://www.hyo-med.ac.jp/department/phs1/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越久 仁敬 (OKU YOSHITAKA)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：20252512

(2) 研究分担者

岡田 泰昌 (OKADA YASUMASA)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：80160688

小金澤 禎史 (KOGANEZAWA TADACHIKA)
筑波大学・人間総合科学研究科・助教
研究者番号：80431691

(3) 連携研究者

()

研究者番号：