

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500612

研究課題名(和文) 除皮質されたマウスの還流標本を用いた呼吸/循環と歩行の間の自律機能の解析

研究課題名(英文) Electrophysiological analysis of autonomous function between respiration/circulation and locomotion

研究代表者

矢澤 格 (Yazawa, Itaru)

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：40360656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：灌流標本を用い脳幹と上位脊髄の中樞神経系間で起こる“呼吸/循環、歩行の間で起こる相補的で機能的な相互作用”を電気生理学的に解析した。その結果、これまで歩行・運動時の呼吸数上昇や血圧上昇は、筋活動等による代謝活動によって引き起こされる血中酸素飽和度の低下が末梢化学的受容器で感受され、その求心性情報脳神経を介して呼吸/循環中枢に送られた結果起こると考えられていた。しかし、歩行・運動時には、効率よく酸素が肺に取り込まれ、かつ迅速な血中酸素飽和度の是正がなされるように呼吸数上昇、一過性の血圧上昇、口呼吸が中枢神経系内の経路を介し自律的に起こることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The interplay of neural discharge patterns involved in respiration, circulation, opening movements in the mandible, and locomotion was investigated electrophysiologically in a decerebrate and arterially perfused in situ preparation. The modulated sympathetic tone activated the forelimb pattern generator and spontaneously generated fictive locomotion. The coupling rhythm of respiration and locomotion during motion occurred. Small increases in blood pressure were always generated after the initiation of motion. Opening movements in the mandible, occurring during the inspiratory (I) phase, were generated in both the I and expiratory (E) phases during motion. The activated cervical cord producing locomotion contributed to generating the opening movement in the mandible in the E phase during motion. These results suggest that this reciprocal functional interaction between the brainstem and the spinal cord plays an important role in increasing oxygenated blood flow during locomotion.

研究分野：生理学、神経科学

キーワード：リハビリテーション 脳幹と脊髄の相補的機能的相互作用 呼吸/循環 歩行 自律機能

1. 研究開始当初の背景

先行研究では、体外循環法により個体を維持する”Decerebrate and arterially perfused *in situ* preparation”を開発し、脳幹(呼吸)と下位脊髄(歩行)の間の自律機能のメカニズムの電気生理学的解析を行った。その結果、(1)灌流標本を Hyperoxia/normocapnea といった特異的呼吸状態に曝すことによって標本の交感神経トーンは変調をきたし、この変調した交感神経トーンは脊髄下向路を介し下肢の左右交互のリズム運動を産生する腰仙髄で構成される神経回路網 (Locomotor Pattern Generator [LPG]) を活性化して自発的な歩行様活動を下肢に産生できること、(2)歩行時には歩行様活動の産生により活性化した LPG は脊髄上向路を介して脳幹内の呼吸中枢に影響を及ぼす (Spinal Feedback Mechanism)。その結果、歩行時の呼吸リズムは歩行リズムに同期することが判った。これらの結果から、「呼吸と歩行の間には相補的で機能的な相互作用があり、この相互作用は脳幹(呼吸中枢)と下位脊髄の中経路によって引き起こされる自律機能である」ことを示す、と同時に「高圧酸素療法の治療的意義」を示すと考えられた。

2. 研究の目的

呼吸中枢、循環中枢、三叉神経系はいずれも脳幹領域で重複していることは形態学的研究結果から既知である。また、先行研究で自発歩行時には一過性の血圧上昇も起こることはわかっている。本研究では、自律機能により脳卒中等によって発症した運動機能障害を改善する治療法やその意義を明らかにするため、脳幹(呼吸/循環、下顎の開口運動)と頸髄(歩行)の間で起こる自律機能とこれら中枢神経系間で起こる相補的で機能的な相互作用のメカニズムの電気生理学的解析を行った。

3. 研究の方法

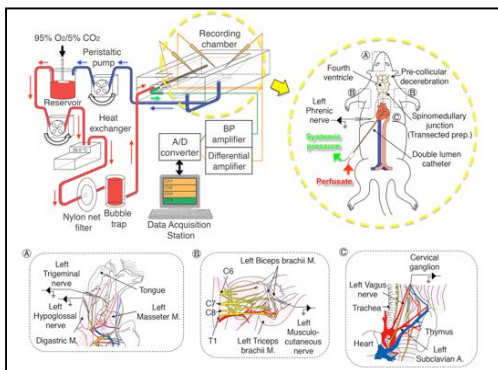


図1: 灌流回路(左上)と灌流標本(右上の破線で囲まれた円)、細胞外記録の記録部位(下段 A~C)を示す。

図1に示すように、灌流標本(Decerebrate and arterially perfused *in situ* preparation)を作成し、体外循環法を適用して標本を管理した。吸気活動の指標として横隔神経あるいは舌下神経から細胞外記録によって神経活動を

導出した。心臓血管中枢(循環中枢)の活動指標として頸神経節から交感神経活動を導出し、血圧も活動指標とした。上肢の歩行様活動は左右筋皮神経、開口運動は顎二腹筋を支配する三叉神経枝から神経活動を導出した。

4. 研究成果

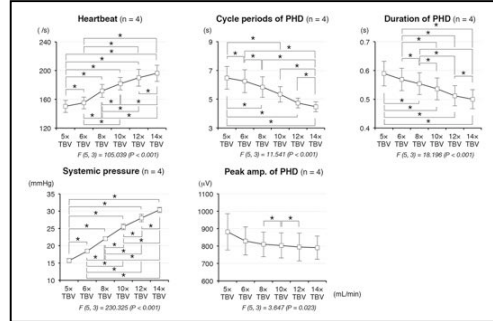


図2: 心拍数、吸気活動の頻度と吸気時間、血圧、吸気の深さに対する灌流量依存性を示す。

図2に示すように、単位時間当りの灌流量を増やすと、呼吸数上昇、一回吸気量の減少、心拍数増加、血圧上昇が起こった。また、単位時間当りの灌流量を増やすと血中の酸素分圧を感受する末梢化学的受容器は機能しなくなり灌流標本の生理状態は Hyperoxic/normocapnic state となった (data not shown)。

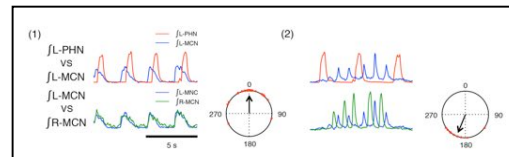


図3: 毎分当りの灌流量を全血量の8倍(1)と10倍(2)に設定した際の横隔(PhN)・筋皮神経(MCN)活動、左右筋皮神経(L&R-MCN)活動の積分波形、および左右筋皮神経活動の位相差を示す。

単位時間当りの灌流量が全血量の8倍では吸気相に同期して左右同時に上肢の運動は起こった(図3-[1])。灌流量を全血量の10倍に変えると呼吸は周期的に速くなり、その際に呼吸と歩行のリズムカップリングが生じ上肢に左右の交互運動が産生された。灌流量を全血量の10倍以上に設定すると標本の生理状態は Hyperoxic/normocapnic state となり、左右上肢の交互運動を産生する頸髄で構成される神経回路網 (Forelimb Pattern Generator [FPG]) を活性化し、自発的な歩行様活動を上肢に産生できることがわかった(図3-[2])。

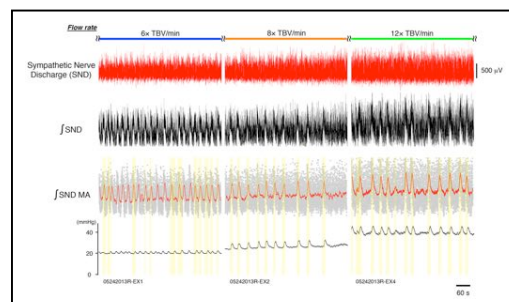


図4: 毎分当りの灌流量を全血量の6, 8, 12倍に設定し

た際の交感神経活動 (SND) 活動、その積分波形と移動平均線 (SND MA)、および血圧変化を示す。

先行研究では歩行様活動が産生される際には必ず一過性の昇圧が見られた。また、本研究でも上肢の歩行様活動が産生される (図 3) 毎に一過性の昇圧が見られた (図 4 の全血量の 12 倍部分を参照)。この結果から、歩行時の一過性の昇圧は血管運動中枢の活動の増加により交感神経支配の細動脈等の収縮することによって起こることが判った。

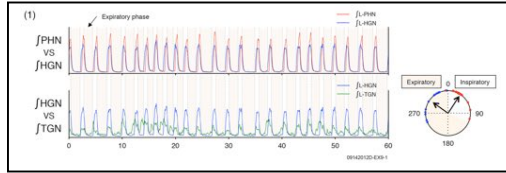


図 5: 毎分当りの灌流流量を全血量の 10 倍に設定し、周期的に起こる呼吸数上昇と歩行様活動を示す横隔・舌下神経活動 (PHN・HGN) と舌下・三叉神経活動 (HGN・TGN) の積分波形と、歩行時の呼吸に対する三叉神経活動の位相を示す。

図 5 に示すように、歩行が産生されない条件下では下顎の開口運動は吸気相で起こり、歩行時には吸気・呼気相の両方で起こった。

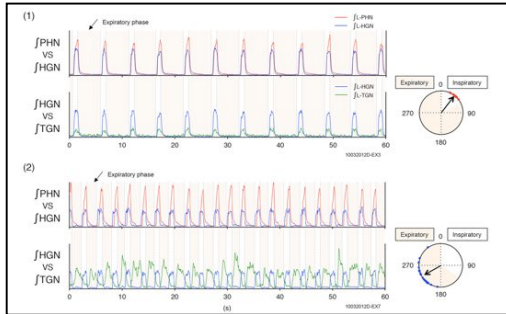


図 6: 灌流流量を全血量の 8 倍に設定し、(1) は通常の灌流液で全身灌流を行い、(2) 標本を低酸素状態にするため灌流液にシアニ化ナトリウムを加え全身灌流を行い、末梢と中枢の O_2 センサーを刺激した。各条件下での横隔・舌下神経活動 (PHN・HGN) と舌下・三叉神経活動 (HGN・TGN) の積分波形と、呼吸に対する三叉神経活動の位相を示す。

血中 pH が生理的範囲にある低酸素状態では下顎の開口運動は吸気相から呼気相にフェイズシフトした (図 6-[2])。即ち、末梢と中枢の O_2 センサーから呼吸中枢への求心性入力が増えることによって下顎運動のフェイズシフトが起こることがわかった。

灌流標本が歩行様活動を産生する際の生理状態は Hyperoxic/normocapnic state であったのに、なぜ下顎の開口運動は歩行時には吸気相と呼気相で起こるのか? 疑問が生じた。また、低酸素状態で三叉神経の活動が増加することは St. John らの研究により知られていたが、本研究では Hyperoxic/normocapnic state になると三叉神経活動は増え、彼らの結果と矛盾していた。そこで、「歩行様活動を産生している活性化した FPG が脊髄上向路を介して脳幹に影響を及ぼす結果、呼吸リズムのみならず下顎の開口運動の産生に寄与している」という仮説を立て、この仮説を立証するために活性化した FPG から脊髄上向路を介した脳幹への影響を遮断した灌流標本を

用いて実験を行った。

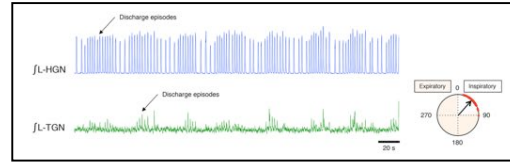


図 7: 脳幹脊髄の移行部を離断した灌流標本を上肢の歩行様活動が FPG によって産生される全血量の 10 倍に設定し全身灌流を行った。歩行様活動時の生理条件下での舌下神経 (HGN) と三叉神経 (TGN) 活動の積分波形と、呼吸に対する三叉神経活動の位相を示す。

歩行時に吸気相と呼気相の両方で起こる下顎の開口運動は、脊髄上向路を介した活性化された FPG による脳幹に対する影響を遮断すると下顎の開口運動は呼気相で起こった (図 7)。この結果から、歩行活動の産生によって活性化された FPG が歩行時の呼気相の下顎の開口運動を産生することがわかった。

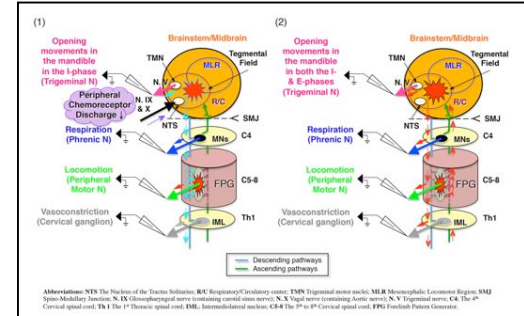


図 8: (1) 特異的呼吸下で上肢に自発的な歩行様活動を産生する、(2) 歩行様活動の産生によって活性化された脊髄が脳幹に影響する結果、昇圧、呼吸数増加、そして呼気相の下顎の開口運動の産生のメカニズムを表した模式図を示す。

以上より、脳幹 (呼吸/循環、下顎の開口運動) と頸髄 (歩行) 間の中枢経路で起こる自律機能は相補的で機能的な相互作用のあることがわかった (図 8)。さらに、これまで歩行・運動時の呼吸数上昇や昇圧作用は、筋活動等による代謝活動によって引き起こされる血中酸素飽和度の低下が末梢化学的受容器で感受され、その求心性情報が迷走・舌咽神経を介して呼吸/循環中枢に送られ起こると考えられていた。しかし、代謝による酸素消費が増える歩行・運動時は、歩行開始時より口呼吸により肺に効率よく酸素が取り込まれ、かつ、呼吸数の上昇や一過性の血圧上昇が起こることにより迅速な全身の血中酸素飽和度の是正が脳幹と脊髄間の中枢経路を介して自律的に起こることが判明した。これらの知見は「高圧酸素療法の治療的意義」を示すのみならず「代償歩行や徒手による歩行運動であっても FPG や CPG の活性化が起こることで Spinal Feedback Mechanism は自律的に起こるので脳卒中により運動麻痺を発症した患者の心肺機能の維持充進に役立つ」と考えられた。

<引用文献>

① Yazawa I.: Reciprocal functional interactions

between the brainstem and the lower spinal cord. *Frontiers in Neuroscience* **8**, 2014, 124

② Yazawa I. and Shioda S.: Reciprocal functional interactions between the respiration/circulation center, the upper spinal cord, and the trigeminal system. *Translational Neuroscience* **6**, 2015, 87-102

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) Yazawa I. and Shioda S.: Reciprocal functional interactions between the respiration/circulation center, the upper spinal cord, and the trigeminal system. *Translational Neuroscience* (査読有り) **6**, 2015, 87-102

DOI: 10.1515/tnsci-2015-0008

(2) Tsuzawa K., Yazawa I., Shakuo T., Ikeda K., Kawakami K. and Onimaru H.: Effects of ouabain on respiratory rhythm generation in brainstem-spinal cord preparation from newborn rats and in decerebrate and arterially perfused *in situ* preparation from juvenile rats. *Neuroscience* (査読有り) **286**, 2015, 404-411

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.12.006

(3) Yazawa I. : Reciprocal functional interactions between the brainstem and the lower spinal cord. *Frontiers in Neuroscience* (査読有り) **8**, 2014, 124

DOI: 10.3389/fnins.2014.00124

(4) Yoshida Y., Yoshimi R., Yoshii H., Kim D., Dey A., Xiong H., Munasinghe J., Yazawa I., O'Donovan MJ., Maximova O., Sharma S., Zhu J., Wang H., Morse III HC. and Ozato K.: The Transcription factor IRF8 activates integrin-mediated TGF β signaling and promotes neuroinflammation. *Immunity* (査読有り) **40**, 2014, 1-12

DOI: 10.1016/j.immuni.2013.11.022

〔学会発表〕(計 12 件)

(1) Kotani S., Yazawa I. and Onimaru H.: Comparison of effects of eugenol on respiratory activity in the brainstem-spinal cord preparation isolated from newborn rat and in the decerebrate and arterially perfused *in situ* preparation from juvenile rat. **第 92 回日本生理学大会** (神戸) 2015/03/21-23

(2) Onimaru H., Lin ST., Tani M., Yazawa I., Ikeda K. and Kawakami K.: TRPA1 agonist, cinnamaldehyde induced long-lasting facilitation of respiratory rhythm in the brainstem-spinal cord preparation isolated from newborn rat and in the *in situ* perfused- preparation from juvenile rat. **第 43 回北米神経科学大会** (Washington DC, USA) 2014/11/15-19

(3) I. Yazawa: Reciprocal functional interactions between the respiration/circulation center, the upper spinal cord, and the trigeminal system. **第 43 回北米神経科学大会** (Washington DC, USA) 2014/11/15-19

(4) Yazawa I.: Reciprocal functional interactions between the brainstem and the lower spinal cord.

第 37 回日本神経科学大会 (横浜) 2014/09/11-13

(5) Yazawa I., Tachikawa S., Mochizuki A., Inoue T. and Nakayama K.: Functional interactions between the respiratory center, the upper spinal cord, and the trigeminal system.

第 42 回北米神経科学大会 (San Diego, CA, USA) 2013/11/09-13

(6) Nakayama K., Yokomatsu M., Mochizuki A., Inoue T. and Yazawa I.: Switching of lower jaw's movements between the inspiratory and expiratory phases generated by chemoreceptor inputs. **IUPS 2013** (Birmingham, UK) 2013/07/21-26

(7) Onimaru H., Tsuzawa K., Tani M., and Yazawa I.: Significance of Na/K ATPase on respiratory rhythm generation in the new born rat *in vitro*- and in the juvenile rat *in situ*-preparations. **第 36 回日本神経科学大会** (京都) 2013/06/20-23

(8) Nakayama K. Yokomatsu M., Mochizuki A., Inoue T. and Yazawa I.: Lower jaw movements generated in the inspiratory phase in a decerebrate and arterially perfused *in situ* rat preparation. **第 36 回日本神経科学大会** (京都) 2013/06/20-23

(9) Onimaru H., Tani M., Tsuzawa K., and Yazawa I.: Long-lasting facilitation of respiratory rhythm by treatment with TRPA1 agonist, cinnamaldehyde. **第 90 回日本生理学大会** (東京) 2013/03/27-29

(10) Nakayama K., Mochizuki A., Shioda S., Inoue T. and Yazawa I.: A decerebrated, arterially-perfused *in situ* rat preparation for studies of breathing, chewing, and swallowing behaviors. **第 90 回日本生理学大会** (東京) 2013/03/27-29

(11) Onimaru H., Tani M., Tsuzawa K., and Yazawa I.: Long-lasting facilitation of respiratory rhythm by treatment with TRPA1 agonist, cinnamaldehyde. **The XIIth Oxford Conference on Breathing, Emotion and Evolution** (Almelo, Netherlands) 2012/08/17-20

(12) Yazawa I., Yoshida Y., Yoshimi R., O'Donovan MJ. and Ozato K.: Electrophysiological analysis of the network function of the lumbosacral cord in the *in situ* adult interferon regulatory factor 8 (IRF8) knockout mice. **Experimental Biology 2012 Annual Meeting** (San Diego, CA, USA) 2012/04/21-25

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢澤 格 (YAZAWA, Itaru)

昭和大学・医学部顕微解剖学・兼任講師

研究者番号：40360656