

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：34605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500628

研究課題名(和文) 肺気腫症における運動介入が呼吸機能および横隔膜機能、呼吸中枢に与える影響

研究課題名(英文) Effects of treadmill exercise on respiratory function, diaphragm muscular function and respiratory center in rats with emphysema.

研究代表者

今北 英高 (IMAGITA, HIDETAKA)

畿央大学・健康科学部・教授

研究者番号：00412148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肺気腫症モデルを作成後、走行運動を実施して、呼吸機能や骨格筋機能、炎症所見などの変化を分析した。ラットをシャム群、肺気腫群、肺気腫+運動群の3グループに分け、肺気腫群および運動群にはタバコ煙水溶液およびリポ多糖体を4週間気管内に噴霧投与した。さらに運動群には、4週間の投与期間の後半2週間において走行運動を実施した。肺組織におけるマクロファージの浸潤は肺気腫群で広範囲に観察されたが、運動群では縮小した。横隔膜および長趾伸筋の筋張力は、肺気腫群と比較して運動群で上昇した。これらの結果から至適な走行運動は呼吸機能や筋機能を改善させるだけでなく、肺組織の炎症症状も軽減できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine the effects of treadmill exercise on respiratory function and skeletal muscle in rats with emphysema. Wistar rats were randomly divided into three groups: the sham (SH) group, pulmonary emphysema (PE) group, and emphysema + exercise (EX) group. Cigarette smoke solution and lipopolysaccharide were intratracheally administered for 4 weeks in the PE and EX groups. The rats in the EX group were made to run on treadmills in the latter 2 weeks of the experiment. Many macrophages were observed in the lung tissue of the PE group. In the EX group, however, the population of macrophages was smaller and the specific force of the diaphragm and EDL muscles was higher than in the PE group. Moreover, the degree of inflammation in the pulmonary tissue was reduced in the EX group. These results suggest that adaptive exercise may improve not only respiratory and muscle functions but also inflammation of the pulmonary tissue associated with emphysema.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：肺気腫モデル 運動介入 筋機能 呼吸機能 炎症反応

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) や肺炎など呼吸器疾患は世界的に増加しており、2020 年には心臓病・脳卒中に次ぐ世界の死亡原因の第 3 位になると予想されている。わが国においても COPD の潜在患者数は 530 万人にも達すると報告されている (Mathers CD et al. PLoS Med. 2006, GOLD. 2011, Fukuchi Y et al. Respirology. 2004)。呼吸器疾患は、呼吸機能に悪影響を及ぼすだけでなく、下肢骨格筋の最大随意収縮力の低下や横隔膜筋線維の遅筋化、代謝亢進による体重減少と栄養障害なども報告されており、現在では骨格筋機能異常や栄養障害、全身性炎症などを呈する全身性疾患として捉えられている。

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD 2011) では呼吸リハビリテーションに関して、運動療法は全ての COPD 患者に対して有用で、運動耐容能および息切れや疲労感の症状改善が得られるとされており、酸素療法は 1 日 15 時間を超える長時間の酸素吸入を行うと、重度の低酸素血症患者の生存率を高めると示されている。しかし、これらの生体内変化におけるミクロな機能的、形態的变化に関する詳細な知見は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺気腫モデルラットを作成し、トレッドミルによる運動介入することによって、呼吸機能や筋機能にどのような影響を与えるかを、生理学的、生化学的、組織化学的分析によって明らかにすることである。肺気腫モデルラットは呼吸状態が悪化していると考えられ、その状態で走行運動を行うことはガス交換の傷害や呼吸仕事量の増大、血液 pH の急激な変動が生じると考えられ、運動によって全身性炎症を助長させ、重症化させる可能性、もしくは習慣的な運動介入によって、運動耐容能の向上、呼吸機能の向上、呼吸中枢経路での神経の活性化など改善させる可能性の両極性があると仮説を立てた。

3. 研究の方法

本研究計画では、第 1 実験として肺気腫モデル作製の確立、第 2 実験として単回運動介入の実施、第 3 実験として習慣的運動介入の実施を計画した。本報告書では、第 3 実験をメインに報告する。

(1) 対象動物

10 週齢の Wistar 系雄性ラット 20 匹を用いた。シャム群 (SH 群) 肺気腫群 (PE 群) 肺気腫+運動群 (EX 群) の 3 群を設定した。飼育環境は室温 23 ± 2 度、湿度 $50 \pm 10\%$ で、明暗サイクルは 12 時間ごとに点灯、消灯を

繰り返す環境を設定し、飼育期間中の飼料および飲用水は自由摂取とした。尚、本実験は畿央大学動物実験倫理委員会の承認を得て、畿央大学動物実験管理規定に従い実施した。

(2) 肺気腫モデルの作成と運動介入

肺気腫群は、タバコ煙溶液 (CSS) およびリポポリサッカライド (LPS) を気管内に 4 週間噴霧投与した。投与サイクルは、3 日間の CSS 投与後、4 日目に CSS+LPS の混合液を投与した。この 4 日間のサイクルを基本に 28 日間気管内に噴霧投与した。運動群には投与後 2 週目に運動負荷試験を実施し、運動強度 (15 - 20 m/min、30 min) を設定後、3 週目、4 週目の 2 週間を CSS および LPS を継続投与しながら、走行運動トレーニングを実施した。

全てのラットは、29 日目にトレッドミル走行運動 (20 m/min、30 min) を実施して、運動前および運動後 90 分に採血し、続いて各種機能を測定した (図 1)。

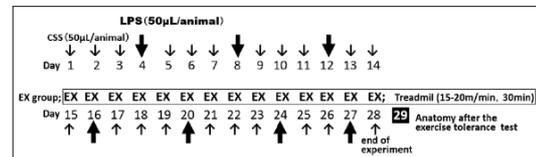


図 1. 本実験のプロトコル

(3) 呼吸機能の測定

ラットは十分な麻酔後に背臥位に固定され、頸部の皮膚を正中切開し、気管を露出した。その後気管切開を行い、カニューレを挿入した。呼吸機能の分析として基礎医学研究システム (日本光電社製 LEG-1000) を用いて呼吸の状態をオシロスコープに映し出し、呼吸の安定後に呼吸流量を測定した。呼吸機能の分析は測定した呼吸流量のデータより、おおよそ 10 呼吸を抽出し、1 回換気量 (VT) と吸気呼気比 (IE 比) を算出した。また、カニューレの長時間挿入は、気道抵抗による換気への影響を受けやすいため、測定のためにカニューレを着脱することで気道抵抗による換気への影響を及ぼさないよう配慮を行った。

(4) In vitro での筋張力測定

解剖時に、横隔膜 (DIA) および長趾伸筋 (EDL) ヒラメ筋 (SOL) を素早く摘出し、37 に加温したリンガー液の中に入れ、上端をアイソメトリックトランスデューサー (日本光電社製 TB-651T) に、下端を固定用のアームのクリップにセットした後、プレート電極を介して電気刺激装置 (日本光電社製 SEN-3301) により筋張力を測定した。測定後、筋重量を電子天秤にて計測し、筋長、筋重量、筋密度から平均筋横断面積を求め、単

位断面積あたりの単収縮張力を算出した。

(5) 肺組織の蛍光免疫染色

筋組織を摘出後、4% パラフォルムアルデヒドにて還流固定し、肺組織を摘出した。固定された組織サンプルは OCT コンパウンドで包埋し、液体窒素で急速凍結した。その後クリオスタット (Leica CM1850) で 20 μ m に薄切され、CD68 および CD163、CD206 抗体を用いて蛍光免疫染色を実施した。撮影された組織写真から各群における CD68 陽性細胞数、CD68/CD206 両陽性細胞数、および CD68/CD163 両陽性細胞数を計測した。

(6) 炎症性サイトカインの分析

29 日の全群における 30 分間のトレッドミル走行前後に採血し、その血清サンプルは、Bio-Plex (Bio-rad, Billerica, MA) を用いて、炎症性サイトカインである IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α を分析した。

(7) 統計学的処理

データはすべて平均値 \pm 標準偏差で表した。また、各レベル間の比較には一元配置分散分析を行った上で多重比較検定は Sheffe 法を用い、危険率 5%未満を以って有意とした。

4. 研究成果

(1) 全群に対する走行運動前後の血中乳酸値の変化

実験 29 日目に実施した全群に対するトレッドミル走行運動の前後に血中乳酸値を測定した。運動前の血中乳酸値は、3 群とも 1.1-1.4 mmol/L であった。速度 20 m/min で 30 分間の運動 90 分後では、SH 群および PE 群では 200%以上上昇した。しかし、EX 群では変化が認められなかった。

(2) 呼吸機能の変化

実験 29 日目の採血後に、差圧トランスデューサおよびフローメーターを用いて、呼吸流量曲線を記録し、その波形の積分値より 1 回換気量を算出した。SH 群は 1.2 ± 0.3 mL で、PE 群 1.1 ± 0.2 mL、EX 群は 1.1 ± 0.1 mL となり、3 群間に有意な差は認められなかった。IE 比では、SH 群が 1.4 ± 0.2 、PE 群 1.8 ± 0.3 、EX 群 1.6 ± 0.1 となり、PE 群と他の 2 群の間で有意な延長が認められた。

(3) 骨格筋機能の変化

In vitro における SOL および EDL、DIA の筋張力では、SOL は 3 群間で有意な差は認められなかった。しかし EDL および DIA では、EX 群が PE 群および SH 群と比較して有意に張力が上昇した。

(4) 肺組織における蛍光免疫組織染色

CD68 陽性細胞数は、PE 群が他の 2 群と

比較して、有意に増加した (図 2 G)。また、CD68/CD206 両陽性細胞数では、PE 群が他の 2 群よりも有意に増加したことに加え、SH 群と EX 群にも有意な差が認められた (H)。CD68/CD163 両陽性細胞数では PE 群が他の 2 群よりも有意に増加した (I)。

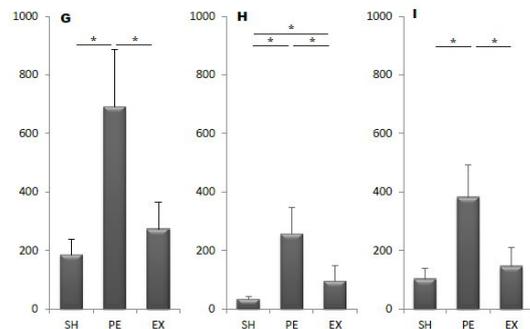
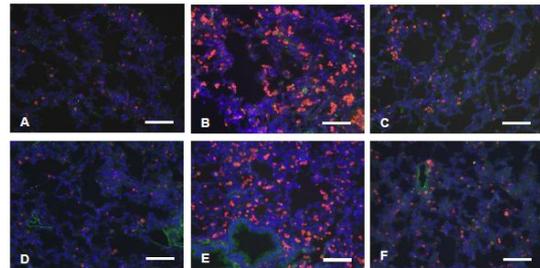


図 2. 肺組織における蛍光免疫染色 (上段) と各抗体における陽性細胞数のグラフ

* A, B, C は CD68/CD206/DAPI の蛍光免疫染色、D, E, F は CD68/CD163/DAPI の蛍光免疫染色。A, B は SH 群、B, E は PE 群、C, F は EX 群である。G は CD68 陽性細胞数、H は CD68/CD206/DAPI 両陽性細胞数、I は CD68/CD163/DAPI の両陽性細胞数を表す。

(5) 運動前後における血清サイトカインの変化

SH 群および EX 群では、運動後に低下傾向を示したが、PE 群は増加傾向を示した。しかし、3 群間に有意な差は認められなかった。

(6) 考察

(1) 至適運動負荷量の設定

EX 群において、2 週間の CSS および LPS 投与後に運動負荷試験を実施した。運動前、10 分、20 分後に尾静脈から採血し、血中乳酸値の上昇状況から至適運動負荷量を速度 17m/min、20 分間を初期負荷量と設定した。その後、漸増的に 20m/min、30 分を最終負荷量に設定した。

(2) トレッドミル走行運動による骨格筋張力の変化

29 日目に実施した全群での走行運動において、SH 群および PE 群では、運動終了後に 200%以上の乳酸値の上昇を認められたが、EX 群では運動後でも上昇しなかった。これは、EX 群は 2 週間の走行トレーニングにより運動耐容能が上昇したことによって、29

日目の負荷量では変化がなかったのではないかと考える。

骨格筋張力では、EX 群において、SOL は有意な上昇は認められなかったが、上昇傾向は見られた。また、EDL および DIA においては、SH 群、PE 群と比較して EX 群に有意な上昇が認められた。これらの結果からも CSS、LPS 投与中でも走行トレーニングによって骨格筋機能は改善できる可能性が示唆された。

(3)トレッドミル走行運動による呼吸機能の変化

実験 29 日目に測定した 1 回換気量においては、3 群間に有意な差は認められなかった。しかし、IE 比においては、SH 群および EX 群と比較して、PE 群では有意に増加した。これは呼気時間の延長が原因として考えられ、CSS および LPS 投与によって炎症誘発性の気道攣縮や閉塞が生じていると考えられる。また、EX 群においては、それが改善され SH 群と類似していた。このことは運動によって呼気時間の延長が改善され、いわゆる炎症症状が軽減した可能性が考えられる。

(4)トレッドミル走行運動による炎症所見の変化

肺組織における CD68 陽性細胞数は、PE 群と他の 2 群との間に有意な差が認められた。また、同様に CD68/CD163 両陽性細胞数でも PE 群が他の 2 群よりも有意に増加した。さらに、CD68/CD206 両陽性細胞数では、PE 群が他の 2 群よりも有意に増加したことに加え、SH 群と EX 群にも有意な差が認められた。これらの抗体はマクロファージに特異的にみられる抗体であり、PE 群においては 4 週間の CSS および LPS の投与によって、肺組織にも炎症反応が増強されたものと捉えられる。さらに EX 群においては、PE 群と同様の 4 週間の CSS および LPS 投与であったにも関わらず、後半の 2 週間に至適走行トレーニングを実施することで肺組織の炎症反応が軽減されたことを示す所見であった。

血清での炎症性サイトカインにおいては有意な差は認められなかったが、SH 群と PE 群では、運動後に上昇する傾向が見られたが、EX 群では、その変動が小さかった。これらも 2 週間の至適走行トレーニングが運動耐容能を高めるとともに炎症反応も軽減させた結果ではないかと考えられる。

結論として、肺気腫モデルラットにおいて、至適な負荷設定でトレッドミル走行トレーニングを 2 週間実施することで、運動機能の改善だけでなく呼吸機能も改善し、さらには肺組織の炎症症状を改善させた。このことは、呼吸器疾患に対する運動療法の新しい基礎的知見になると思われる。

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 10 件)

・Nishii Y, Kawata S, Fujita N, Tomoda K, Imagita H: Moderate exercise attenuated airway resistance and inflammation induced by cigarette smoke solution and endotoxin in rats. *Sport Sciences for Health*, 12(1) 91-97. 2016 (査読有)

・Minematsu A, Nishii Y, Imagita H, Takeshita D, Sakata S.: Whole-body vibration can attenuate the deterioration of bone mass and trabecular bone microstructure in rats with spinal cord injury. *Spinal cord*, 2015, doi: 10.1038/sc.2015.220. (査読有)

・Hayashibe M, Homma T, Fujimoto K, Oi T, Yagi N, Kashiwara M, Nishikawa N, Ishizumi Y, Abe S, Hashimoto H, Kanekiyo K, Imagita H, Ide C, Morioka S.: Locomotor improvement of spinal cord-injured rats treadmill training by forced plantar placement of hind paws. *Spinal cord*, 2015, doi: 10.1038/sc.2015.186. (査読有)

・Kitakaze T, Harada N, Imagita H, Yamaji R.: β -Carotene increases muscle mass and hypertrophy in the soleus muscle in mice. *J Nutr. Sci. Vitaminol*, 61, 481-487. 2015 (査読有)

・Imagita H, Nishikawa A, Sakata S, Nishii Y, Minematsu A, Moriyama H, Kanemura N, Shindo H.: Tidal volume and diaphragm muscle in rats with a cervical spinal cord injury. *J Phys. Ther. Sci.* 27: 791-794. 2015 (査読有)

・Sakata S, Hanaoka T, Ishizawa R, Iwami K, Takada Y, Imagita H, Minematsu A, Waki H, Nakatani A. Poor Wheel-Running Exercise Can Decrease Blood Pressure through Hormonal Control and Increase Endurance Exercise Capacity in Middle-Aged Normal Rats. *J Biosci Med.* 3 (8), 10-24. 2015 (査読有)

・諸橋直紀、山崎聖也、中塚翔、木村悠人、片岡雄希、見田忠幸、西井康恵、今北英高：肝機能障害モデルラットにおける予防的運動が肝機能と筋機能に与える影響。総合リハビリテーション 43(10)：949-954, 2015。(査読有)

・Imagita H, Sakata S, Minematsu A, Kanemura N, Moriyama H, Takamoto H, Miata T.: Effects of Exercise on Fiber Properties in the Denervated Rodent

Diaphragm. Am J Biomed Life Sciences.;
2(6): 141-145. 2014 (査読有)

・ Shanelly RA, Nieman DC, Zwetsloot KA,
Knab AM, Imagita H, Luo B, Davis B,
Zubeldia JM. : Evaluation of Rhodiola rosea
supplementation on skeletal muscle
damage and inflammation in runners
following a competitive marathon. Brain
Behav Immun. ;39(6):204-210. 2014 (査読
有)

・ Imagita H, Ogaki M, Fukuoka H, Yamada
T, Okada K, Kawata S, Yamagami T. : The
effects of hypoventilation disorder on
physiological and biochemical properties of
the hindlimb muscles. Biomed
Res. ;34(6):321-8. 2013 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

・ Imagita H, et al.: Effects of treadmill
running on diaphragm and hind-limb
muscles in rats with emphysema. The
International Congress of World
Confederation for Physical Therapy
Singapore 2015.6

・ 今北英高・他：肺気腫症ラットへの運動介
入によるサイトカインおよび肺組織の変化
第 70 回日本体力医学会大会 2015.9

・ 今北英高・他：肺気腫症ラットにおける運
動介入が横隔膜および後肢骨格筋に与える
影響。第 69 回日本体力医学会大会 2014.9

・ Imagita H, et al.: The effects of
hypoventilation disorder on the
physiological and biochemical properties of
the hindlimb muscles. EXPERIMENTAL
BIOLOGY 2013 Boston 2013.5

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

・ 畿央大学教員紹介データベース

http://webinfo.kio.ac.jp/kio1/news_s.as
p

・ 研究室ホームページ

<http://imagita.greater.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今北 英高 (IMAGITA Hidetaka)

畿央大学・健康科学部・教授

研究者番号：00412148

(3)連携研究者

金村 尚彦 (KANEMURA Naohiko)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：20379895

森山 英樹 (MORIYAMA Hideki)

神戸大学・医学部・教授

研究者番号：10438111

藤田 直人 (FUJITA Naoto)

広島大学・医歯薬保健学研究院・講師

研究者番号：90584178

西井 康恵 (NISHII Yasue)

畿央大学・健康科学部・助手

研究者番号：50461207