

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：34605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01547

研究課題名(和文)呼吸器疾患に対する複合的介入によるリハビリテーション戦略の構築

研究課題名(英文)Structure of the rehabilitation strategy with complex interventions for respiratory dysfunction

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、肺気腫モデルラットに対する運動療法、栄養療法、酸素療法の治療介入が骨格筋や呼吸筋機能にどのような影響を与えるかを検討した。実験は、シャム群、肺気腫群、肺気腫+運動群の3群を設定し、4週間実施した。運動群には投与後、3週目、4週目の2週間に走行運動を実施した。肺組織は蛍光免疫染色を、血清はサイトカインレベルについて分析した。肺気腫群においては肺胞および気管支内にマクロファージが浸潤し、炎症所見が顕著であった。しかし、運動群にはマクロファージの浸潤が軽減していた。これらの結果から、至適運動負荷を実施した場合、肺気腫症においては呼吸機能や筋機能が改善することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸器疾患モデルに対する基礎研究は、組織細胞中のある特定物質の変化や薬物治療介入による効果判定の研究報告が多数を占める。また、運動療法などの介入に関する研究としては、臨床研究が多い。本研究では、呼吸器疾患モデルを作成し、臨床でも導入されている運動療法、栄養療法、酸素療法の治療介入が肺組織の炎症所見および筋組織の機能面に及ぼす影響を明らかにすることで、基礎研究と臨床研究の融合的な研究に位置し、臨床応用に展開するための基盤となるものとする。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine the effects of exercise therapy, nutrition therapy, and oxygen therapy on the skeletal muscle and respiratory function of a rat model of emphysema (Only the effects of exercise therapy are described in the overview). The experiment was conducted for 4 weeks in 3 groups: the sham (SH) group, pulmonary emphysema (PE) group, and emphysema + exercise (EX) group. The rats in the EX group were made to run on treadmills in the latter 2 weeks of the experiment. Lung tissue was stained with CD68 and CD206 antibodies and serum was analyzed for cytokine levels. Many macrophages were observed in the lung tissue of the PE group. In the EX group, however, the population of macrophages was smaller. 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：基礎理学療法学

キーワード：呼吸器疾患モデル 運動療法 栄養療法 酸素療法 複合的介入 リハビリテーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease ; COPD) や急性肺炎など呼吸器疾患は世界的に増加しており、2030 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。わが国における COPD 患者のうち、2017 年には約 1.8 万人が死亡し、重症例では身体運動時の息切れのために日常生活が著しく障害され、現在 16 万人以上いるとされる在宅酸素療法者の半数近くは COPD が基礎疾患であるとされる。また、悪性腫瘍死亡で最多である肺癌のリスク因子でもあり、さらには、近年、急速に増加し死亡原因の第 5 位となった肺炎の基礎疾患としても重要である。このように呼吸器疾患の重症例では、死に至ることも多く、中等症や軽症であっても、呼吸機能に悪影響を与えるだけでなく、下肢骨格筋力の低下や横隔膜筋線維の萎縮、代謝亢進による体重減少や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。

2. 研究の目的

本研究は、呼吸器疾患モデルに対して運動療法、栄養療法、酸素療法のそれぞれの治療および複合的介入を実施する中で、肺組織および骨格筋への影響を明らかにすることを目的とした。研究期間内において、これらの介入効果を骨格筋張力 (機能的) や肺組織、筋組織における炎症細胞所見 (形態的) 血液での炎症性サイトカイン産生の網羅的解析 (生化学的) から、機能・形態面への影響を調査した。

3. 研究の方法

(1) 被験動物

被験動物として、9 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。1 週間の環境適応後、10 週齢より投与実験を開始した。ラットは室温 23 ± 2 、湿度 $55 \pm 5\%$ を維持した動物飼育室で、12 時間毎に点灯と消灯を繰り返す環境で管理された。なお、本研究におけるすべての動物実験は、畿央大学動物実験委員会の承認を得て、動物の愛護及び管理に関する法律、畿央大学動物実験管理規定等、関係法令に従って実施した。

(2) 肺気腫モデルの作成

本実験の肺気腫モデルは、タバコ煙溶液を直接気管内に投与する方法を用いた。動物はシャム (SH) 群、肺気腫 (PE) 群に分けられ、SH 群には生理食塩水を、PE 群にはタバコ煙溶液及びリポポリサッカライド (LPS) 溶液を気管内投与した。PE 群に投与されたタバコ煙溶液は、生理食塩水 1ml に対しタバコ 1 本分の主流煙をバブルすることで得られ、10 倍希釈したタバコ煙溶液は吸光度 267nm で 1.205 を示した。なお、ラットへの投与には希釈せず、タバコ煙溶液の原液を用い、ラット口腔より気道上部に液体噴霧器 (PENN CENTURY™ 社製) を挿入し、ラットの吸気に合わせて液体を下気道に向けて噴霧投与した。

(3) 実験プロトコル

a) 投与 1 日目を Day1 とし、タバコ煙溶液は、Day1-3、5-7、9-11、13-15、17-19、21-23、25-26、28 に 1 日 1 回 100 μ l を投与した。LPS 溶液は Day4、8、12、16、20、24、27 に 1 日 1 回、同量を気管内に投与した。

b) 運動療法介入の設定

EX 群の運動強度については、高負荷運動は炎症反応を惹起させる可能性があるため、Day15 に運動負荷試験を実施し、運動前、15 分、30 分間の血中乳酸を測定した。乳酸値の上昇程度から初期負荷量を軽負荷であると考えられる 17m/min、20min に設定し、その後は漸増的に負荷を上昇させ、Day29 には 20m/min、30min で実施した。動物は Day29 に最終のトレッドミル運動を実施し、その運動前後に採血を実施した。血液サンプルは、Lactate ProTM2 (LT-1730 ARKRAY, Inc. Japan) にて乳酸値を測定後、遠心分離され血清成分を抽出した。

c) 栄養療法介入の設定

PE モデルラットに対して分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 摂取を行うことにより骨格筋に対する影響を調査した。1 週間の環境適応期間後に、上記と同様の手法を用いて 4 週間気管内に噴霧投与することで、PE モデルを作成した。また、BCAA 群には、実験開始 3 週目から飲用水を 3%BCAA 溶液に変更し、2 週間自由に摂取させた。

d) 酸素療法介入の設定

酸素療法は、酸素濃縮装置と酸素ルームにて実施した。酸素ルーム内を 1.3 気圧、毎分 10L の濃縮酸素を流入することで、室内酸素濃度を約 33% に設定して、40 分間保持した。また、その環境下でトレッドミル運動も実施した。

(4) . 測定項目

a) 筋張力測定

Day29 の運動終了から 1.5 時間後にソムノペンチル腹腔内投与 (1 ml/kg · body weight) にて麻酔をかけ仰臥位に固定し、右後肢のヒラメ筋 (SOL)、長趾伸筋 (EDL) および横隔膜 (DIA) を摘出した。それぞれの筋をリンガー液に満たされたマグナス管内で上端をアイソメトリックトランスデューサ (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。パーソナルコンピュータ上に映し出された単収縮曲線から単収縮張力 (Peak Twitch Force ; PTF) を測定した。その後、至適筋長と筋重量を測定し、単位断面積あたりの単収縮張力を算出した。また、強縮張力も測定した。

b) 免疫組織化学

SOL、EDL、DAI および肺組織は、手順に従って組織固定および薄切を実施後、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色および一次抗体 CD68、CD206、DAPI を用いた蛍光免疫染色を実施した。これら染色された組織標本に対して画像処理ソフト (Image J) を用い、炎症所見の観察と陽性細胞数をカウントした。

c) 生化学

血清サンプルは、マルチプレックス サスペンションアレイ (Bio-Plex, Luminex) を用いてマルチプレックスアッセイにて炎症性サイトカインについて分析した。インターロイキン (IL) -1b、IL-4、IL-6、IL-10、および TNF-a をアッセイキット (Bio-rad 製) で測定した。

4 . 研究成果

(1) 肺気腫 (PE) モデルラットにおける変化

本実験では肺気腫モデルラットを作成した。PE 群においては、後肢骨格筋の筋張力が低下し、特に横隔膜筋張力が最も低下した。肺組織内で観察された CD68 陽性細胞は、肺胞周囲で多く観察され、肺胞内でも顕著に確認できた。また、血清サンプルより測定したサイトカインでは、Pro-inflammatory である IL-1b、IL-6、TNF-a などの増加率も PE 群で高い傾向を示した。

(2) 運動療法介入における変化

Day29 に測定した運動前後の血中乳酸値において、SH 群および PE 群では 200% 以上上昇したが、2 週間の至適運動トレーニングを実施した EX 群は変化がなく、SH 群、PE 群との間に有意な差が認められた。また、CD68 および CD206 の両陽性細胞数においても SH 群、EX 群、PE 群の順で有意に高値を示した。これら結果は、2 週間の運動トレーニングにより、EX 群の運動耐容能が上昇し、全身持久力に対するトレーニング効果として現れた。肺組織の炎症症状も Drastic に低下させており、肺組織への炎症症状を抑制する可能性があると考えられた。

(3) 栄養療法介入における変化

本実験では SH 群、BCAA 摂取 (BCAA) 群、肺気腫 (PE) 群、肺気腫+BCAA 摂取 (PEBC) 群の 4 群を設定した。結果、体重は全群ともに経時的に増加がみられたが、SH 群と BCAA 群に比べ、PE 群および PEBC 群では増加量が低かった。筋重量は、SOL および EDL とともに BCAA 群では SH 群と比較し、有意に増大した。しかし、同様に BCAA を摂取した PEBC 群では、低下傾向を示した。これらの結果から BCAA を 2 週間摂取することで筋湿重量が増加したため、BCAA による筋タンパクの合成促進作用があったと考えられた。しかし、同様に BCAA を摂取した PEBC 群では筋重量の増加は認められなかった。呼吸器疾患患者の呼吸消費エネルギーは健常者に比べ、約 10 倍も必要とするという報告があり、BCAA 摂取の影響は、呼吸筋の仕事量が多くなった呼吸筋へ優先的に補填されたことで、下肢筋に影響を与えなかったことが推察された。

(4) 加圧酸素療法介入における変化

本実験では、SH 群、PE 群、肺気腫+加圧酸素介入群(O2 群)、肺気腫+運動療法 + 加圧酸素療法群(EXO2 群)の 4 群を設定した。プレ実験において、イソフルラン吸入にて麻酔をかけた状態では、血中酸素飽和度が約 85-90%であったが、酸素ルームに保持すると室内酸素上昇に伴って、血中酸素飽和度も 95%以上に改善した。PE 群においては、肺胞組織の巨大化 (肺胞壁の破壊) された数が多く認められ、O2 群においては、その数が有意に低下した。また、炎症所見も抑えられていた。時期によっては、不可逆的に生じる肺胞壁の破壊が抑えられる可能性も示唆された。また、その複合的介入を行った EXO2 群では、Day29 に測定した最大歩行距離は、有意に増加した。しかし SOL、EDL および DIA の筋張力は、単収縮張力も強収縮張力も上昇傾向がみられたが、有意な差ではなかった。筋疲労においても同様の傾向がみられた。加圧酸素療法はその効果として抗炎症作用、運動耐容能の向上、SpO2 の上昇、呼吸困難感の軽減が報告されている。これらの作用が運動療法の悪影響である急性炎症作用、酸化ストレスを

軽減させたことから、本来得られる運動療法の効果をさらに高める可能性が示唆された。今後も継続して研究を続けていく。

引用文献

淵上淳一ほか: タバコ煙を用いた慢性閉塞性肺疾患(COPD)の薬効評価モデル. 日薬理誌
127 : 183-189, 2006

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 IMAGITA Hidetaka, NISHII Yasue, FUJITA Naoto, SUKEDZANE Taiko, KAWATA Shinnosuke	4. 巻 41
2. 論文標題 Effects of appropriate-intensity treadmill exercise on skeletal muscle and respiratory functions in a rat model of emphysema	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 13～22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.41.13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Minematsu Akira, Nishii Yasue, Imagita Hidetaka, Sakata Susumu	4. 巻 5
2. 論文標題 Possible effects of whole body vibration on bone properties in growing rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Osteoporosis and Sarcopenia	6. 最初と最後の頁 78～83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.afos.2019.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujita Naoto, Yamasaki Natsuki, Eto Kanako, Asaeda Makoto, Kuwahara Wataru, Imagita Hidetaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Oxygen therapy may worsen the survival rate in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0204254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Koda Hitoshi, Kai Yoshihiro, Murata Shin, Osugi Hironori, Anami Kunihiko, Fukumoto Takahiko, Imagita Hidetaka	4. 巻 26
2. 論文標題 Relationship Between Muscle Strength Asymmetry and Body Sway in Older Adults	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Aging and Physical Activity	6. 最初と最後の頁 457～461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1123/japa.2017-0096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 白波瀬未萌、今北英高
2. 発表標題 呼吸器疾患モデルに対する運動療法および加圧酸素療法の併用が筋機能へ及ぼす影響
3. 学会等名 第45回日本運動療法学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今北英高
2. 発表標題 Fasciaの解剖生理学的意義
3. 学会等名 第124回 日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今北英高
2. 発表標題 肺炎症モデルラットにおける分岐酸アミノ酸摂取の影響
3. 学会等名 第24回 日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidetaka Imagita
2. 発表標題 Influence of adhesion-related fascial gliding restrictions on dermal and articular movement
3. 学会等名 5th International Fascia Research Congress（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今北英高
2. 発表標題 運動器疾患・呼吸循環器疾患に対する理学療法-モデル動物を用いた検証-
3. 学会等名 第52回 日本理学療法学会大会 教育講演（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今北英高
2. 発表標題 筋損傷後の超早期軽負荷運動は筋回復に与える影響
3. 学会等名 第72回 日本体力医学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

畿央大学 教員紹介データベース http://webinfo.kio.ac.jp/kio1/news_s.asp 畿央大学 ホームページ http://www.kio.ac.jp/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤田 直人 (Fujita Naoto) (90584178)	広島大学・医系科学研究科(保)・講師 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------