

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：22101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2023

課題番号：20K23257

研究課題名（和文）脊髄損傷後の呼吸筋支配運動ニューロンの可塑的变化にリハビリテーションが与える効果

研究課題名（英文）Effects of rehabilitation on plastic alterations in the phrenic motoneurons after spinal cord injury

研究代表者

河村 健太（Kawamura, Kenta）

茨城県立医療大学・保健医療学部・助教

研究者番号：00875742

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：高位頸髄損傷後には横隔膜の運動麻痺が生じ、呼吸機能が低下する。しかし、頸髄損傷後の呼吸機能低下に対するリハビリテーションは十分に確立されていない。本研究では頸髄損傷後に呼吸トレーニングを実施し、横隔神経運動ニューロンの形態学的特徴がどのように変化したかを調べた。動物は頸髄損傷後に高二氧化碳ガスによる呼吸負荷トレーニングを3週間実施した。3週目に横隔神経運動ニューロンへ逆行性にHorseradish peroxidaseを取り込ませ、作成した切片からデータを解析した。頸髄損傷後に横隔神経運動ニューロンは縮小することが報告されているが、呼吸トレーニングは縮小を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のところ、頸髄損傷後の呼吸リハビリテーションのエビデンスは十分に確立されていない。エビデンスを確立していくためには、臨床データだけでなく、神経や筋が形態学的/機能的にどのように回復するのかを明らかにしていく必要がある。本研究の成果は頸髄損傷後の呼吸リハビリテーションが横隔神経運動ニューロンの萎縮を防ぐ可能性を示しており、回復メカニズムを明らかにしていくうえでの基礎的なデータとなり得る。

研究成果の概要（英文）：After cervical cord injury, diaphragm paralysis occurs and respiratory function is impaired. However, rehabilitation for respiratory dysfunction after cervical cord injury is not well established. In this study, respiratory load training was performed after cervical cord injury to determine how the morphological characteristics of phrenic motoneurons were altered. Animals underwent 3 weeks of respiratory load training with high carbon dioxide gas after cervical cord injury, and at week 3, horseradish peroxidase was retrogradely incorporated into the phrenic motoneurons and morphological data were analyzed from the spinal cord sections. It has been reported that the phrenic motoneurons decrease in size after cervical spinal cord injury, but respiratory training may prevent the decrease in size.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：横隔神経運動ニューロン 頸髄損傷 リハビリテーション 横隔神経 運動ニューロン 呼吸トレーニング

1. 研究開始当初の背景

高位頸髄損傷患者は横隔膜の運動麻痺により呼吸機能の低下が生じ、肺炎などの呼吸器合併症の発生が問題となる。リハビリテーションでは呼吸機能改善を目的として呼吸トレーニングを実施するが、患者によって損傷高位や損傷程度が様々なこともあり、頸髄損傷患者に対する呼吸トレーニングのエビデンスは十分に確立されていない。本研究では頸髄半切除モデルラットに呼吸トレーニング介入を行い、横隔神経運動ニューロンの形態学的特徴の変化を明らかにする。呼吸トレーニングによる中枢神経回復メカニズムの解明と効果的な呼吸トレーニング確立に向けた一助となる可能性がある。

2. 研究の目的

頸髄損傷後には横隔神経運動ニューロンのサイズが縮小することが報告されており、それは吸息ニューロンからの横隔神経運動ニューロンへのシナプス入力への遮断によって引き起こされると考えている。その仮説が正しければ、頸髄損傷直後から横隔神経運動ニューロンへのシナプス入力を増加させることで、そのような変化を最小限にし、頸髄損傷後の早期回復を促進するのではないかと考えた。

本研究は、頸髄損傷モデルラットにおいて損傷後早期から呼吸トレーニングを実施することにより、頸髄損傷後の横隔神経運動ニューロンの縮小を予防する可能性を検討するために、モデルにおける横隔神経運動ニューロンの形態学的変化を観察した。

3. 研究の方法

オスのWistarラット(10-12週齢)を対象に実施した。すべての実験は実験動物の管理と使用に関する指針に準拠して実施した。また、実験プロトコルは茨城県立医療大学動物実験委員会によって承認された(2021-2号)。

3-1. 頸髄半切除

動物はコントロール群(n=6)、トレーニング群(n=10)、偽手術群(n=3)、トレーニング+偽手術群(n=2)の4群に分けられた。すべての手術は無菌的に行い、コントロール群およびトレーニング群は第2頸髄半切除術を受けた。セボフルラン麻酔下で動物の皮膚を切開して頸椎を露出し、第2頸椎を椎弓切除した。露出した脊髄の硬膜を切開し、マイクロメスで第2頸髄と第3頸髄の間を左半切除した。その後、筋と皮膚を縫合した。動物は加温・補液・抗菌薬投与・鎮痛薬を行い愛護的に回復に努めた。偽手術群は同様のプロトコルで椎弓切除のみ実施した。頸髄半切除の完全性は脊髄横断面の観察によって行った。

3-2. 呼吸トレーニング

頸髄損傷後72時間以内に開始した。トレーニングは高二酸化炭素(7%)で満たされたチャンバーに動物を20分間留置し、週4回実施した。コントロール群と偽手術群では高炭酸ガスへの暴露は実施しなかった。

3-3. Horseradish peroxidase(HRP)の標識

頸髄半切除から3週後に麻酔下で頸部から左横隔神経を露出した。横隔神経を単離して可能な限り遠位を切断し、マイクロバッグに断端を挿入し、30%HRPに2時間浸漬した。その後、筋と皮膚を縫合し、動物を回復させた。ラットはHRP浸漬して2日後に灌流固定を行った。脊髄は横断面または水平断面で切片を作成し、Tetramethyl benzidineでHRPを反応させた。切片はスライドガラスに貼り付け、ニッスル染色で背景を染色した。

3-4. 解析

光学顕微鏡で切片を観察し、反応した運動ニューロンを撮影した。撮影した画像データは解析ソフト(ImageJ)で取り込み、長径・短径・断面積を算出した。

4. 研究成果

横断面および水平断面の両方でコントロール群以外のすべての群はコントロール群よりも有意に大きな直径・断面積を有していた(表1)。頸髄損傷後には横隔神経運動ニューロンが縮小することが報告されており、本研究も同様の結果であった。頸髄損傷後の呼吸トレーニングは運動ニューロンが縮小する変化を抑制することが考えられた。形態学的変化は横隔神経運動ニューロンの機能的特性にも影響を与えている可能性がある。

表1 各群の横隔神経運動ニューロンの形態学的特徴

	コントロール	トレーニング	偽手術	トレーニング+偽手術
平均直径, μm				
横断	24.5 \pm 0.2	26.1 \pm 0.2*		

断面積, μm^2	水平断	28.8 ± 0.2	$30.9 \pm 0.2^*$	$30.7 \pm 0.2^*$	$30.2 \pm 0.2^*$
	横断	458.4 ± 7.0	$506.5 \pm 6.7^*$		
	水平断	589.5 ± 8.8	$675.0 \pm 6.2^*$	$668.8 \pm 9.0^*$	$649.9 \pm 8.4^*$

* $p < 0.05$, コントロール群に対して
平均直径; (長径 + 短径)/2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawamura Kenta, Kobayashi Masaaki, Tomita Kazuhide	4. 巻 13
2. 論文標題 Routine hypercapnic challenge after cervical spinal hemisection affects the size of phrenic motoneurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-023-40505-x	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kawamura K, Kobayashi M, Tomita K
2. 発表標題 Routine hypercapnic challenge affects the size of phrenic motoneurons of cervical spinal hemisection rat
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河村健太, 小林雅明, 富田和秀
2. 発表標題 頸髄損傷後の呼吸負荷トレーニングによる横隔神経運動ニューロンの形態学的特徴の違い
3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------