

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2013

課題番号：22500468

研究課題名（和文）

呼吸筋強化トレーニングが呼吸中枢機能制御機構に及ぼす可塑的变化の検証

研究課題名（英文）

Plastic changes of the neural expression of c-Fos protein in the medullary respiratory neurons following respiratory muscle training with CO<sub>2</sub> breathing in the Wistar rats.

研究代表者 富田 和秀 (TOMITA KAZUHIDE)

茨城県立医療大学・理学療法学科・教授

研究者番号：00389793

研究成果の概要（和文）：呼吸筋強化トレーニング(RMT)は、呼吸筋を肥大させ、筋張力の増大にともなう呼吸状態の変化が惹起されることは報告されているが、筋形態変化以外の生体反応に及ぼす影響については十分に明確にされていない。我々の仮説では、呼吸筋強化トレーニングは筋を肥大させ、さらに延髄呼吸ニューロン群の活動変化が生じると考えている。本研究では、c-Fos 免疫組織化学的ならびに呼吸生理学的手法を用いて「呼吸筋強化トレーニング」が呼吸中枢制御機構に及ぼす可塑的变化を検証することを目的とした。本年度は、無麻酔・覚醒ラットに 4 週間の RMT を行い、RMT 前後で、高二酸化炭素負荷に対する換気応答解析、延髄呼吸ニューロンにおける c-Fos 免疫組織化学的解析を行った。その結果、4 週間の RMT 後で、高二酸化炭素負荷に対する換気応答は維持したにも関わらず、その際の呼吸活動に参加した延髄呼吸ニューロンの数が減少した。

研究成果の概要（英文）：Respiratory muscle training (RMT) can improve respiratory muscle weakness in chronic respiratory diseases. However, it is unclear whether RMT induces adaptations in the respiratory center as well as respiratory muscles. We hypothesized the respiratory center in the medulla would also adapt to the RMT and less neurons became to recruit to achieve same minute ventilation under hypercapnic stimulation. To clarify this hypothesis, the number of c-Fos positive medullary neurons after short term hypercapnic stimulation (7%CO<sub>2</sub>, 50%O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> balance, 90 min) in the rats with RMT was compared to that in the untrained control rats. For the respiratory muscle training program, we used the hypercapnic stimulation that consisted of placing each rat in a hypercapnic chamber in order to increase the minute ventilation. The RMT rats (n=2) were placed in a chamber filled with 7% CO<sub>2</sub> and 50% O<sub>2</sub> for 30 min, 5 times a week, for 4 weeks, whereas control rats (n=2) were placed in the same chamber filled with room air. After 1.5 hours from the completion of the last trial of the 4 weeks program, axial sections from the medulla oblongata were processed for c-Fos immunohistochemistry.

It was found that the number of the c-Fos positive neurons in the RMT rats were smaller than those in the control rats at ventral and dorsal region of the medulla oblongata.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：呼吸筋強化トレーニング・延髄呼吸ニューロン・c-Fos 免疫組織化学法・呼吸生理学的解析・電気生理学的解析

### 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患（Chronic obstructive Lung Disease、以下 COPD）の国際ガイドライン<sup>3)</sup>では、薬物療法と併用して早期の呼吸リハビリテーションが推奨されている。COPD に対する呼吸リハビリテーションには、有酸素性運動、呼吸筋強化トレーニング、横隔膜呼吸練習、胸郭ストレッチがあり、特に運動療法を中心としたリハビリテーションにおいては有酸素性運動と呼吸筋強化トレーニングが重要とされている。有酸素性運動はこれまで多くの基礎的・臨床的な研究により効果的なプログラムが考案されている。一方、呼吸筋強化トレーニングは運動強度のみから検討された報告で詳細な検証がなされていないまま臨床応用されているのが実状であり、効果的な運動プログラムとは言い難い。実際、臨床では最大呼吸筋力の30%以上の負荷圧で筋力強化トレーニングを実施しているが、その負荷強度の強さにより、実施できない症例あるいは継続できない症例が多く存在する。そのため臨床では、より簡便に、より安楽に実施でき、そして効果的な呼吸筋強化が図れる新しいトレーニングの開発が期待されている。有効な「呼吸筋力強化トレーニング」の開発のためにも、まずはトレーニングによって呼吸筋力が増大するメカニズムを解明することが重要であろう。

今日までのヒトを対象とした呼吸筋強化トレーニングに関する研究は、呼吸筋力の指標である最大口腔内圧のみで、その効果を検証するという研究デザインが主体であった。また実験動物を用いた研究では、呼吸筋強化トレーニングによって呼吸筋（横隔膜・外肋間筋）を肥大させ、筋張力の増大にともなう呼吸状態の変化が惹起されることは報告されているが、筋形態変化以外の生体反応に及ぼす影響については十分に明確にされていない。近年、下肢筋運動トレーニングの効果は骨格筋を肥大させることだけではなく、運動トレーニング後に motor unit(運動単位)の活動変化をもたらすことが解明された<sup>8)</sup>。また我々の先行研究においてトレッドミルトレーニンが呼吸中枢系の活動変化に影響を及ぼすことを発見した。

これらの研究成果から呼吸筋においても、呼吸筋力の増大は筋自体のみで筋出力が変化するのではなく、呼吸筋を制御している motor unit や呼吸中枢にも何らかの変化を

及ぼしている可能性がある。我々の仮説では、呼吸筋強化トレーニングは筋を肥大させ、さらに延髄呼吸ニューロン群の動員領域を減少させる効率な神経活動の適応化が起こることと考えている。

### 2. 研究の目的

本研究では、c-Fos 免疫組織化学的ならびに呼吸生理学的手法を用いて「呼吸筋強化トレーニング」が呼吸中枢制御機構に及ぼす可塑的变化を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本年度は、無麻酔・覚醒ラットに4週間のRMTを行い、RMT前後で、高二酸化炭素負荷に対する換気応答解析、延髄呼吸ニューロンにおけるc-Fos免疫組織化学的解析を行った。

#### (1) 呼吸筋強化トレーニング (RMT)

実験にはWistar系ラットを用いた。RMTは、ほぼ密閉されたボックスの中に実験動物を入れ、混合ガス(7%CO<sub>2</sub>,50%O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> balance)を充満させ、過換気を行わせる方法でトレーニングを行った。なおトレーニング中、ボックス内のCO<sub>2</sub>濃度等を観察しながら、過剰な呼吸困難を起こさないように注意した。RMTの頻度と期間は30分/日、5回/週、4週間とした。

#### (2) 高二酸化炭素負荷に対する換気応答解析

高二酸化炭素負荷に対する換気応答の測定では、RMT前後で無麻酔・覚醒状態のラットを用い高二酸化炭素負荷(7%)に対する換気応答(呼吸周期、吸息時間、呼息時間、一回換気量、分時換気量などの変化)をホールボディプレチスモグラフィ法で記録した。

#### (3) 延髄呼吸ニューロンの免疫組織化学的解析

実験動物は、4週間の実験期間終了後、免疫組織染色法に先立って、密閉されたボックスの中で、90分間のCO<sub>2</sub>(7%CO<sub>2</sub>, 50%O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> balance)負荷刺激を与えられた。これは、いわゆる過換気刺激を与えることで、それに反応する呼吸中枢ニューロンを同定するための処理である。

c-Fos免疫組織化学染色法の手順は、CO<sub>2</sub>負荷から1.5時間後にペントバルビタールナトリウム(50mg/kg)の腹腔内注射によって麻

酔を施した。左室を介して約 20mL の生理食塩水を流して血液を除去し、引き続いて 0.5% グルタルアルデヒド(GA)/4% パラホルムアルデヒド(PFA) 0.1M リン酸緩衝液(PB, pH7.4) 100mL を 100~120mmHg で加圧をしながら速やかに流入した。さらに、4% PFA-PB 200mL を同圧下で、200mL を大気圧下で流入して固定した。脳を取り出し、上丘と下丘の間を切断して、2 つのブロックに分けた。取り出された脳は、4% PFA-PB、4°C、1.5 時間で後固定し、次いで 10、20、25% スクロース液に段階的に浸した。脱水は 10% スクロース液に 1 時間、20%、25% スクロース液には標本が溶液の底に沈むまで浸した。脳は凍結し、マイクロトームを使って 40  $\mu$ m の連続横断切片を作製した。その切片は氷で冷却された PB で満たされた平皿バケツに一時収集され、連続切片から 4 枚おきに取り集めた。脳標本は、0.1M Tris-saline 溶液(TS, pH7.4)で 3 回洗浄した後、0.5% ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin; BSA)/TS で 20 分間室温下で振盪を行い、sheep anti-c-Fos polyclonal 抗血清(1:100; sc-52, Santa Cruz Biotech. Inc., USA) /0.5% BSA で 4°C 16 時間、振盪・反応を行った。その後、脳切片は TS で 3 回洗浄され、Avidin 溶液、Biotin 溶液でそれぞれ室温下 15 分間振盪を行った。引き続き、以下の反応を室温下で行った。2% Normal rabbit serum/TS で 20 分間振盪・反応を行い、非特異的反応をブロックした。そして、anti-sheep IgG/TS で 60 分間振盪・反応し、切片を TS で 3 回洗浄した。Vectastain ABC キット(Vector Lab., Burlingame, VA, USA) の ABC 溶液を加えて 60 分間振盪・反応させた。続いて、切片を TS で 2 回洗浄(10 分間  $\times$  2 回)、PB(10 分間)で洗浄した後、ゼラチンコートしたスライドグラスに尾側から順に並べた。スライドグラスに貼付けられた脳切片は、一晚、室温で乾燥させてから、50%、70%、95%、99% エタノール、キシレン(3 回)で透徹した後に、Permount(Fisher Comp., USA)で封入した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 呼吸ニューロンの可塑的变化

4 週間の RMT 後で、高二酸化炭素負荷に対する換気応答は維持したにも関わらず、その際の呼吸活動に参加した延髄呼吸ニューロンの数 (c-Fos 免疫組織化学反応ニューロン) が減少した(表 1、図 1、2)。これらの研究成果から、呼吸筋強化トレーニングは呼吸筋を肥大させる効果以外に、延髄呼吸ニューロン群にも何らかの変化を及ぼしている可能

性がある事が示唆された。

表 1. RMT 前後での高二酸化炭素負荷に対する換気応答

RMT	Tidal volume (ml/100g rat)		Respiratory frequency (breath/min)		Minute ventilator (ml/min $\cdot$ 100g rat)	
	Before	After	Before	After	Before	After
T1	0.90	0.85	190.83	187.33	171.13	158.40
T2	0.86	0.95	152.60	167.49	130.60	159.90
T3	0.90	0.95	138.11	155.69	124.28	148.52

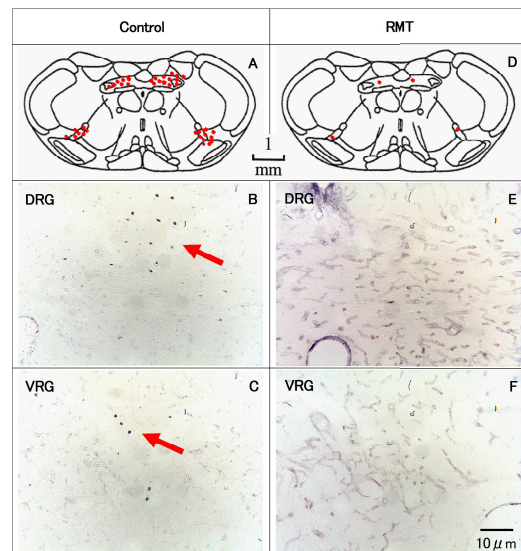


図 1. 高二酸化炭素刺激下で反応する延髄呼吸ニューロンの RMT 前後比較

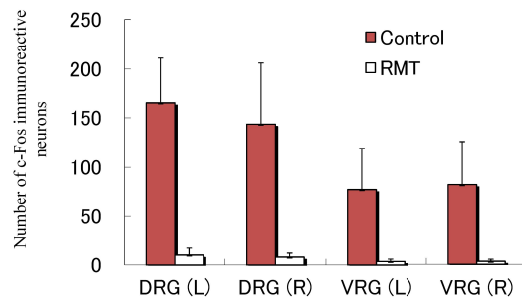


図 2. 延髄呼吸ニューロンにおける c-Fos 免疫組織化学染色陽性ニューロン数の RMT 前後比較

##### (2) c-Fos 免疫組織化学法を用いた呼吸中枢ニューロンの活動を評価する実験系の確立

我々は、これまで一側横隔神経ラットに対して、4 週間のトレッドミル走行を実施し、呼吸を制御している延髄の呼吸ニューロンに、どのような可塑的变化をもたらされるかを c-Fos 法を用いて比較する実験系に取り組んだことがあった。今回の研究では、これま

での実験系をもとに、より臨床的な研究へと発展させた。

今回用いた c-Fos 法は、c-Fos 蛋白を免疫組織化学的に染色することで、脳および脊髄の多シナプス神経回路を視覚的に追跡できる方法である。これにより、呼吸筋強化トレーニングが呼吸中枢制御機構に与える影響を解明することができる評価指標の一つに成り得る。実際に今回の結果からも、呼吸筋トレーニングによって、延髄呼吸ニューロン活動に何らかの変化を及ぼしたことが観察できた。今後、「新しい呼吸筋強化トレーニング法」開発の一助として寄与するなど、呼吸リハビリテーションの基礎的知見を得る道が開けた。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Kazuhide Tomita, Nakanishi Tomoya, Makito Iizuka: Plastic changes of the neural expression of c-Fos protein in the medullary respiratory neurons following respiratory muscle training with CO2 breathing in the Wistar rats. 第90回日本生理学会大会(東京都江戸川区)

〔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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 和秀 (TOMITA KAZUHIDE)  
茨城県立医療大学・理学療法学科・教授  
研究者番号：00389793

(2) 研究分担者

飯塚 眞喜人 (Iizuka Makito)  
茨城県立医療大学・医科学センター・助教  
研究者番号：40274980

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：