

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23680067

研究課題名(和文) 運動時の心臓副交感神経活動はどのように制御されているのか？

研究課題名(英文) How is cardiac parasympathetic nerve activity controlled during exercise?

研究代表者

土持 裕胤 (Tsuchimochi, Hirotsugu)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：60379948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、意識下動物において心臓副交感神経活動が運動時にどのように調節されているのかを調べる事を主目的とした。それと並行して、運動時に心臓自律神経活動の影響を受けるであろう血行動態指標、心機能指標を意識下動物から直接計測する手法の確立を目指した。麻酔下においては胸部迷走神経の末梢端より心拍および呼吸に同期した神経活動が計測できたが、心臓へ行く神経と肺へ行く神経の区別が難しく、心臓支配神経のみの計測には成功していない。また、意識下においても同様に心臓神経と肺神経の区別が出来ていないため、両者の混在した神経活動が計測出来ているのみである。運動時の全身の循環動態および心機能評価方法はほぼ確立した。

研究成果の概要(英文)：The main purpose of this study was to examine how parasympathetic nerve activity to the heart is controlled during dynamic exercise in conscious animals. In addition to this, it was also aimed to establish how to measure cardiac and hemodynamic parameters which will be affected by cardiac autonomic nervous system during dynamic exercise. Although efferent thoracic parasympathetic nerve activity could be measured successfully in anesthetized rats and mice and decerebrated-unanesthetized rats, it remains to be established how the efferent cardiac parasympathetic nerve activity can be separated from another non-cardiac parasympathetic activities. Also, because the same technical problem remains to be solved in conscious animal preparations, only mixed efferent thoracic nerve activities could be measured at this time. In the meantime, it was established to measure cardiac and hemodynamic parameters during treadmill exercise as well as during resting in conscious rats.

研究分野：Exercise Physiology

キーワード：運動 心臓 迷走神経 心拍数

1. 研究開始当初の背景

動的小よび静的運動時の循環調節は自律神経性および体液性に調節されているが、短時間での調節には自律神経性調節が特に重要である。心臓機能は心臓を支配する心臓交感神経と副交感神経による二重支配を受けており、大まかには交感神経活動の増加は心臓機能を亢進させ、副交感神経活動の増加は心臓機能を抑制することが知られている。申請者が実際に意識下および除脳・無麻酔下動物の心臓交感神経活動を計測した結果、動的運動開始直後に交感神経活動が急激に増大し、その増加は心拍数の増加に先行することがわかった (Tsuchimochi H et al, Am J Physiol 2002)。その一方で、運動開始直後、運動中、および運動終了後に心臓副交感神経活動はどのように応答しているのか？といった疑問が生じた。これら運動生理学において基本的であると思われる事象がすべて未解決のままである。

2. 研究の目的

運動時および回復期に心臓副交感神経系がどのように心臓機能を調節しているのかを解明すること、最終的には運動時および回復期の心臓自律神経応答を交感神経と副交感神経の両面から詳細に調べる事を第一の目的とした。また、自律神経機能を調べるには自律神経が支配する臓器の機能を測定する必要がある。したがって、無麻酔動物の臓器血流量を計測する技術を確立する事を第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遠心性迷走神経心臓枝の神経活動計測技術の確立

実験にはラットおよびマウスを用いた。イソフルランまたはメドミジン、ミダゾラム、ブトルファノールの三種混合麻酔薬混合麻酔を用い、麻酔下にて迷走神経を頸部から心臓まで追跡し、心臓枝の同定を試みた。候補の神経束に銀線を2本固定し、電気刺激による除脈を確認後、差動増幅による神経活動計測を試みた。求心性シグナルが多く含まれる場合には末梢端を切断し、さらに必要に応じて神経線維をシングルファイバーレベルにまで単離し、シングルエンド入力にて神経活動の計測を試みた。マウスにおいては神経が細くて顕微鏡下でも追跡が困難なため、神経線維に YFP を発現する Thy1-YFP 遺伝子改変マウス (Jackson Lab, USA) を用い、蛍光実体顕微鏡 (Leica 社製) 下で観察しながら神経の手術を行った。

迷走神経に含まれる遠心性および求心性神経を神経を切断せずに分離するために、いくつかの化学的除神経法を用いて神経活動

の測定を試みた。

また、計測時のノイズを極力減らすため、自律神経活動計測に使われる銀線とステンレスより線のどちらが適しているかを調べるため、生理食塩水中で 20Hz-5kHz の周波数帯における交流インピーダンス測定を行った。

(2) 無麻酔動物における血行動態および臓器血流量の連続測定法の開発

自律神経機能を評価するためには支配臓器機能を測定する必要がある。そこで、無麻酔で血圧および様々な臓器血流量を連続測定する技術の開発を試みた。

心筋血流量計測

実験にはラットおよびマウスを用いた。イソフルラン麻酔下にて左開胸し、左心室を露出させ、レーザー血流計 FLO-C1BV (オメガウェーブ社製) の光ファイバプローブ (GJ+JF) の先端を心筋表面へ接触させ、医療用シアノアクリレート系接着剤 アロンアルファ A (三共) にて固定した。背側皮膚から体外へ導出したプローブを装置に接続し、心筋血流量をモニターした。

心拍出量計測

実験にはラットを用いた。イソフルラン麻酔下にて正中で開胸し、上行大動脈を露出させ、トランジットタイム血流計 (トランソニック社製) のプローブを留置した。閉胸し、コネクタ部を背側に固定し、血流測定時のみプローブと装置を接続するようにした。

肝門脈および肝固有動脈血流量計測

実験にはラットを用いた。イソフルラン麻酔下にて正中で開腹し、肝門脈または肝固有動脈を剥離し、トランジットタイム血流計プローブを留置した。閉腹し、コネクタ部を背側に固定し、血流測定時のみプローブと装置を接続するようにした。

肺動脈血流量計測

実験にはラットを用いた。イソフルラン麻酔下にて正中で開胸し、肺動脈を露出させ、トランジットタイム血流計プローブを留置した。閉胸し、コネクタ部を背側に固定し、血流測定時のみプローブと装置を接続するようにした。

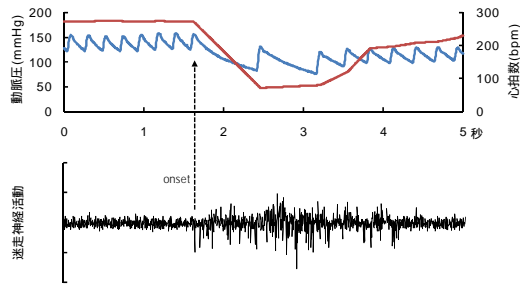
心臓、肺、肝臓は迷走神経の支配を受けているため、これらの臓器血流と神経活動の関係を調べることで、将来的には迷走神経の臓器ごとの活動パターンを調べることが可能となると考えた。

4. 研究成果

(1) 遠心性迷走神経心臓枝の神経活動計測技術の確立

次ページの図に示すように、麻酔下動物では迷走神経心臓枝から神経活動を計測可能と

なり、神経活動の増加による心拍数の急激な減少をとらえることが出来た。シグナルはマルチユニットであり、すべてのスパイクが心臓支配神経とは限らない。



動脈血圧、心拍数、および迷走神経活動の同時計測例（麻酔下ラット）

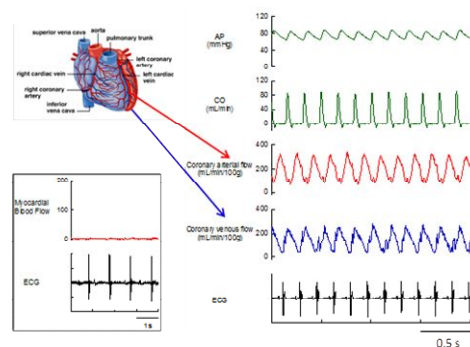
神経活動増加直後に急激な徐脈が生じた。神経は迷走神経心臓枝を末梢で切断し、シングルファイバーレベルにまで割いて計測した。

しかしながら、明瞭な神経活動を得るには神経束をかなり細く割く必要があり、神経を割いた状態で長時間生かしておくことが出来なかった。したがって本研究の主目的である、無麻酔動物からの神経活動計測は現時点では成功していない。

生理食塩水に浸した銀線とステンレスより線のインピーダンスを測定した結果、銀線は先行研究と同様長期間安定していた。ステンレスより線は日が経つにつれてインピーダンスが上昇していったことから、神経活動の長期計測には不向きであると思われる。

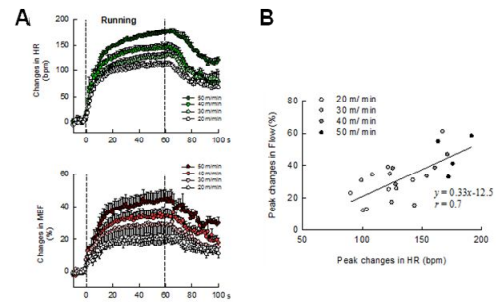
(2) 無麻酔動物における血行動態および臓器血流量の連続測定法の開発

下の図に示したように、レーザー血流計を用いて麻酔下および無麻酔ラットおよびマウスの心筋血流量を測定可能となった。運動時の心筋血流量のリアルタイム計測例は大動物、中動物を含めても過去に報告が無い。



心筋組織血流量測定の妥当性の検討（麻酔下）

プローブ先端を冠動脈および冠静脈直上へ置くと、冠動脈血流は拡張期にピーク、冠静脈血流は収縮期にピークに達した。また、血液を温タイロッド液に置換すると心臓は拍動しているが血流シグナルはゼロになるため、動きによるアーチファクトではない。



トレッドミル運動時の心筋組織血流応答(ラット)

心筋組織血流応答は走行速度依存的であった(A)、心拍数増加と血流量増加の間には正の相関が認められた($r=0.7$, B)。

また、肝門脈血流、肝固有動脈血流、肺動脈血流、および心拍出量といった臓器血流を無麻酔動物のトレッドミル運動時に計測可能となった。これらの技術は中動物以上では報告があるが、小動物での報告は少なく、研究が進んでいない。

以上、本研究において主目的である無麻酔動物からの心臓副交感神経活動の計測および評価は現時点では未達成であるが、麻酔下での計測には成功し、各種臓器機能の計測技術も確立出来たことから、今後の方策を立てることが出来た。化学的除神経法は現時点ではある種の神経のみ選択的に抑制することは出来たが、求心性神経をすべて抑制できた訳ではなく、問題の解決には至っていない。研究期間は終了したが、現在、無麻酔動物からの計測用に適した電極の開発を計画しており、今回の成果を基に本研究をさらに発展させていく予定である。

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 抄録7件)

1. Tsuchimochi H, Inagaki T, Shirai M. The Role of TRPV1-Expressing Neurons in the Control of Heart Rate during Dynamic Exercise in Rats. *FASEB Journal* 29: 674.3, 2015 (抄録、査読無)。
2. Tsuchimochi H, Inagaki T, Shirai M. Even Small Changes in Body Temperature Can Affect the Cardiac Function in Anesthetized Mice. *FASEB Journal* 29: 1043.8, 2015 (抄録、査読無)。
3. Tsuchimochi H, Inagaki T, Shirai M. Importance of body temperature regulation for the evaluation of cardiac function in anesthetized mice. *Journal of Physiological Sciences* 65: S210, 2015 (抄録、査読無)。

4. Tsuchimochi H, Sonobe T, Inagaki T, Shirai M. Contributions of central command and exercise pressor reflex on myocardial perfusion during exercise in rats. *FASEB Journal* 27: 943.4, 2013 (抄録、査読無).
5. Tsuchimochi H, Sonobe T, Inagaki T, Shirai M. Stimulation of subthalamic locomotor region increases myocardial tissue blood flow in anesthetized rats. *Journal of Physiological Sciences* 63: S235, 2013 (抄録、査読無).
6. Tsuchimochi H, Sonobe T, Shirai M. Real-time continuous monitoring of myocardial blood flow response to dynamic exercise with laser Doppler flowmetry in conscious rats and mice. *FASEB Journal* 26: 1138.47, 2012 (抄録、査読無).
7. Tsuchimochi H, Sonobe T, Shirai M. Continuous monitoring of myocardial blood flow response to dynamic exercise with laser Doppler flowmetry in conscious rats and mice. *Journal of Physiological Sciences* 62: S164, 2012 (抄録、査読無).

[学会発表](計 10 件)

1. Tsuchimochi H, Inagaki T, Shirai M. The Role of TRPV1-Expressing Neurons in the Control of Heart Rate during Dynamic Exercise in Rats. *Experimental Biology* 2015 (Boston, USA), 2015.
2. Tsuchimochi H, Inagaki T, Shirai M. Even Small Changes in Body Temperature Can Affect the Cardiac Function in Anesthetized Mice. *Experimental Biology* 2015 (Boston, USA), 2015.
3. Tsuchimochi H, Inagaki T, Shirai M. Importance of body temperature regulation for the evaluation of cardiac function in anesthetized mice. (麻酔下マウス心機能評価における体温調節の重要性) 第 92 回 日本生理学会大会(神戸市), 2015.
4. 土持 裕胤, 稲垣 薫克, 白井 幹康. 動的運動時の心拍数調節における TRPV1 チャネルおよびカプサイシン感受性神経の役割. 第 69 回 日本体力医学会大会(長崎市), 2014.
5. Tsuchimochi H, Yoshimoto M, Inagaki T, Sonobe T, Shirai M. Implications of adenosine and muscarinic acetylcholine receptors on bradycardia during systemic episodic hypoxia in rats. (ラットの一過性低酸素暴露時の非圧受容器反射性徐脈応答にはアデノシンおよび M₂ アセチルコリン受容体が関与している). 第 91 回 日本生理学会大会(鹿児島市), 2014.
6. Tsuchimochi H, Sonobe T, Inagaki T, Shirai M. Contributions of central command and exercise pressor reflex on myocardial perfusion during exercise in rats. *Experimental Biology* 2013 (Boston, USA), 2013.
7. Tsuchimochi H, Sonobe T, Inagaki T, Shirai M. Stimulation of subthalamic locomotor region stimulates myocardial perfusion in anesthetized rats (視床下部歩行誘発部位の刺激は麻酔下ラットの心筋灌流量増加をもたらす). 第 90 回 日本生理学会大会(東京都), 2013.
8. Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Shirai M. Real-time continuous monitoring of myocardial blood flow response to dynamic exercise with laser Doppler flowmetry in conscious rats and mice. *Experimental Biology* 2012 (San Diego, USA), 2012.
9. Tsuchimochi H, Sonobe T, Shirai M. Continuous monitoring of myocardial blood flow response to dynamic exercise with laser Doppler flowmetry in conscious rats and mice (意識下ラットおよびマウスの動的運動時心筋血流量のレーザー血流計による連続計測) 第 89 回 日本生理学会大会(長野県松本市) 2012 年 3 月
10. 土持 裕胤, 曾野部 崇, 白井 幹康. 意識下ラットにおける動的運動時心筋血流量の直接計測. 第 66 回 日本体力医学会大会(山口県下関市) 2011 年 9 月

[図書](計 1 件)

1. (著書) 土持 裕胤 『身体運動と呼吸・循環機能』 宮村 実晴 編, 真興交易医書出版部, 2012; 283-291 (分担執筆)

[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：
出願年月日：
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

土持 裕胤 (TSUCHIMOCHI, Hirotugu)
国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号：60379948

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：