

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09332

研究課題名(和文) 漢方薬と鍼灸を併用した新たなうつ病治療開発

研究課題名(英文) Development of new treatment combining Kampo medicine and acupuncture and moxibustion for depression

研究代表者

西村 甲(Nishimura, Ko)

鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・教授

研究者番号：20218192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：うつ病に対して日本の伝統治療の有効性を検討した。強制水泳によるうつ病モデルマウスを用いて、イミプラミン、鍼治療(経穴としてGV20と Ex-HN3)、漢方薬(柴胡加竜骨牡蛎湯)、鍼と漢方の併用について効果を比較した。また、神経栄養因子(BDNF, NT-3, NGF)を用いて、抗うつ効果の機序について分子生物学・生化学的に検討した。水中での無動時間による行動学的検討では、各治療において無動時間の改善が認められた。神経栄養因子の変動から、鍼と漢方がイミプラミンとは異なる神経栄養因子の調節作用を有すること、漢方鍼併用療法が鍼または漢方単独治療では発揮しえない特別な抗うつ作用を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代社会において、うつ病の早期の回復と予防が重要とされている。主要な薬物療法であるイミプラミン等の抗うつ薬は、しばしば望ましくない副作用を引き起こす。その結果、種々の副作用を低減させる薬剤が追加され、多剤による治療になることが多い点が問題視されている。患者自身の病状回復への負担の大きさだけでなく、使用薬剤の多さから医療経済的にも改善が望まれている。今回の漢方薬や鍼による伝統医学的治療成績は従来の抗うつ治療に勝るとも劣らないものである。各治療効果の相違については十分な検討がなしえなかったが、伝統医学的治療も利用されるものであり、今後の抗うつ治療が修正されていく可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined the effectiveness of Japanese traditional treatment for depression. Additionally, we compared the effects of imipramine, acupuncture (GV20 and Ex-HN3 as acupoint), Kampo herbal medicine (Saikokaryukotsuboreito), and combination of acupuncture and Kampo using depression model mice by forced swimming. In addition, we investigated the mechanism of antidepressant effect using neurotrophic factors (BDNF, NT-3, and NGF) from the viewpoint of molecular biology and biochemistry. A behavioral study based on immobility time in water showed improvement in immobility time with each treatment. Changes in neurotrophic factors suggest that acupuncture and Kampo have different neurotrophic factor regulatory effects compared with imipramine, and that Kampo acupuncture combination therapy has a special antidepressant effect that cannot be achieved by acupuncture or Kampo monotherapy.

研究分野：神経学

キーワード：うつ病 漢方薬 鍼灸 神経栄養因子 柴胡加竜骨牡蛎湯

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病は、気分障害として分類される精神障害である<sup>1)</sup>。うつ病の罹患率が高いため、現代社会では早期の回復と発症の予防が重要である。うつ病の治療には、薬物療法、電気けいれん療法、および心理療法が含まれる。抗うつ薬による薬物療法は、多くの場合、うつ病の主な治療法である。ただし、抗うつ薬は望ましくない副作用を引き起こす可能性がある。その結果、うつ病の患者は、副作用を減らすためにいくつかの追加の薬を服用する必要がある<sup>2)</sup>。

したがって、一部の患者は、多剤併用を回避し、より効果的な治療を受けるために、うつ病の補完代替医療を求めている。実際、鍼治療や伝統的な漢方薬などの補完代替治療の有効性については、いくつかの報告がある<sup>3-7)</sup>。鍼と伝統的な漢方薬は、長い間、伝統的な東洋医学の身体的および精神的障害の治療薬として利用されてきた<sup>8、9)</sup>。これらの治療の役割は、体内のエネルギーの不均衡を調整することである。副作用がほとんどないため、西側諸国でさえ、治療者は潜在的な新しいアプローチとしてそれらに焦点を合わせてきた<sup>10)</sup>。残念ながら、それらは通常それぞれ単独療法として使用されてきた。鍼治療と伝統的な漢方薬は連携して多くの力を発揮すると言われているが、実際にほとんどの患者が実際に鍼治療または伝統的な漢方薬のいずれかを利用している。

## 2. 研究の目的

うつ病のメカニズムについてはさまざまな報告がある。しかし、明確な結論はまだ得られていない。うつ病は、約 60 年間、脳内のモノアミン濃度の低下を伴うと考えられてきた<sup>11、12)</sup>。三環系抗うつ薬は確かにうつ病に部分的な効果があるため、この仮説は否定できない。一方、神経栄養因子はうつ病に関連していることが判明しており、脳由来神経栄養因子 (BDNF) は神経発生の重要な因子の一つである<sup>13-15)</sup>。2000 年に、Berman RM ら<sup>16)</sup> は、ケタミンがうつ病に即時効果があることを報告し、BDNF はケタミンの効果と重要な関連があることが判明した<sup>17)</sup>。このような状況を考えると、うつ病発症の仮説として神経可塑性が注目を集められる<sup>18、19)</sup>、確立してきているといえる<sup>18-20)</sup>。

本研究では、うつ病モデルマウスに対して、日本伝統医学による治療で、西洋医学よりも副作用の少ないとされる漢方薬と鍼灸を利用して、その単一療法と併用療法の効果を比較した。さらに、そのメカニズムについて分子生物学/生化学的方法を用いて分析した。これは、私たちの知る限り、うつ病に対する鍼と漢方の併用療法の効果に関する最初の検討と思われる。

## 3. 研究の方法

うつ病の動物モデルを用いて、鍼治療、漢方薬、西洋医学の抗うつ効果を検討した。さらに、予防と治療の両方の効力に焦点を当てた。すべてのプロトコルは、鈴鹿医療科学大学の動物実験倫理審査委員会によって承認された (承認番号: 189)。

### 実験動物

うつ病モデルとして、6 週齢の雄 ICR マウスを使用した。これらは、CLEA Japan, Inc. (東京、日本) から購入し、室温  $22 \pm 3$ 、湿度 60%、12 時間の明/暗サイクルで維持した。マウスは、餌 (CE-2; CLEA Japan, Inc.) と水を自由に摂取できるものとした。実験開始前の 1 週間は、環境に慣れさせた。

### うつ病モデルマウス作成

Porsolt et al<sup>21)</sup> によって記述された強制水泳 (FS) 手順を使用して、うつ病モデルマウスを作成した。ICR マウスを  $25 \pm 2$  の淡水を含むプラスチックビーカー (直径 15cm、高さ 22cm) に入れ、体高 + 5cm の深さまで週 5 日、週 2 日、2 週間置いた。

### 鍼灸・漢方薬の治療方法

鍼灸単独療法、漢方単剤療法、鍼灸と漢方の併用療法で抗うつ効果に違いがあるかどうかを主に検討した。最初に、うつ病モデルマウスを 2 つのグループ、すなわち、予防効果の評価のためのグループと治療効果の評価のためのグループに分けた。次に、2 つのグループをさらに 5 つのグループにそれぞれ分類した。漢方投与と鍼治療群 (FS+AP+漢方群)、およびイミプラミン投与群 (FS+イミプラミン群) さらに、我々はコントロールグループとして FS も治療もない ICR マウスを設定した。各グループにはそれぞれ 8 例を用意した。予防効果を評価するグループでは、強制水泳と鍼治療および/または薬物治療を同時に実施した。

鍼治療の手順では、セイリン株式会社 (日本、静岡) から入手したステンレス鍼 (直径、0.25mm、長さ、15mm、D タイプ) を使用した。元の鍼はハンドルが付いているため、15 mm より長くなっている。ハンドルが切り取られ、マウスが外さないように修正した。これまでのうつ病に対する鍼治療の有効性を示した以前の報告からして、経穴として百会 (DV20) と印堂 (Ex-HN3) を選択した<sup>6、22、23)</sup>。DV20 は通常、脳卒中、頭痛、めまい、不安などの神経疾患や精神疾患に使用される。Ex-HN3 は精神を落ち着かせる機能があり、不眠症、不安、ストレスによく使われる。こ

これらの経穴で、水平方向と内向きの同時鍼刺激を 20 分間続け、深さ 5 mm まで挿入した。鍼刺激の間、マウスは、ひっくり返されたケージで尾を粘着テープで固定された。これらの鍼刺激は、週 5 日、2 週間行われた。鍼で刺激を受けなかったコントロールマウスは、AP グループと同じ期間だけ固定された。

薬物療法では、有用性が示されている過去の報告に基づき、漢方薬として柴胡加竜骨牡蠣湯、西洋の抗うつ薬としてイミプラミンを使用した 24-26)。柴胡加竜骨牡蠣湯は、柴胡 (5.0 g)、黄芩 (2.5 g)、人参 (2.5 g)、半夏 (4.0 g)、生姜 (1.0 g)、大棗 (2.5 g)、桂皮 (3.0 g)、茯苓 (3.0 g)、牡蠣 (2.5 g)、および竜骨 (2.5 g) の混合物から作られた粉末抽出物 (4.5 g) として得られました (日本、東京の Tsumura & Co.) (ロット番号: 2160012010)。イミプラミンは米国ミズーリ州シグマから入手した。これらの薬物の投与量は、以前の報告に従って設定された。柴胡加竜骨牡蠣湯 (1g / kg 体重) とイミプラミン (10mg / kg 体重) を生理食塩水に溶解し、胃管で週 5 日、2 週間経口投与した。薬物療法を受けなかった対照マウスは、治療群と同じ方法で生理食塩水を摂取させた。

### 測定方法

うつ病の評価は、上記の強制水泳試験における不動時間により決定した 22)。ICR マウスを 25 ± 2 の淡水を含むプラスチックビーカー (直径 15cm、高さ 22cm) に入れ、体高 + 5cm の深さまで週 5 日、週 2 日、2 週間置いた。マウスの動きをビデオカメラで記録し、6 分間の記録時間から最初の 1 分間を除いた後の 5 分間の不動時間を測定した。不動状態は、マウスがほとんどの動きを一時停止し、バランスを維持するために必要な手足の動きのみを行う状態として定義された。うつ病に関連して体重も測定された。

サンプル採取では、一連の動物実験の直後にマウスに麻酔をかけた。マウスの脳はすぐに取り出され、-80 で保存した。右前大脳を分子生物学的および生化学的分析に使用した。脳神経栄養因子の発現は、RT-PCR と ELISA によって決定された。

メーカーのプロトコル (Qiagen、バレンシア、カリフォルニア、米国) に従って RNeasy Mini キットを使用して、脳組織から総 RNA を抽出した。RNA の量を分光光度法で測定した。マウスのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、神経成長因子 (NGF)、BDNF、ニューロトロフィン-3 (NT-3)、およびニューロトロフィン-4/5 (NT-4 / 5) をコードする cDNA が研究対象として評価された。発現を定量化するために、これらの神経栄養因子の mRNA を、Super Script III (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)、PowerUp SYBER Green Master Mix (Applied Biosystems、TX、USA) および ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems) を使用してリアルタイム RT-PCR で分析した。プライマー最適化の熱サイクルパラメーターは次のとおりである。95 で 10 分間活性化した後、95 で 15 秒、60 で 1 サイクルを 50 サイクルとした。各サンプルの mRNA レベルは、GAPDH mRNA に対して正規化された。特定のプライマーを表 1 に示す。

脳神経栄養因子の発現は、Multi-Neurotrophin Rapid Screening ELISA kit: Mouse for the manufacturer's protocol (Biosensis、SA、Australia) を使用して評価された。

Table 1. Primer sets for real time PCR

Molecule	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	ATGGGAGTTGCTGTTGAAGTCA	CCGAGGGCCCACTAAAGG
NGF	GATCGGCGTACAGGCAGAAC	CAGTGGGCTTCAGGGACAGA
BDNF	CCAAAGGCCAACTGAAGCAGTA	GCAGCCTTCCTTGGTGTAAAC
NT-3	TTCTGCCACGATCTTACAGG	GGCAAACCTCTTTGATCCAT
NT-4/5	AGCGTTGCCTAGGAATACAGC	GGTCATGTTGGATGGGAGGTATC

### 統計分析

統計的有意性は、PRISM バージョン 5.0 (GraphPad Software、カリフォルニア州ラホーヤ) を使用した。Tukey-Kramer ポストホックによる一元配置分散分析 (ANOVA) を使用して評価された。P < 0.05 を有意と定義した。

## 4. 研究成果

### 身体的および行動的所見

予防効果の評価のためのグループまたは治療効果の評価のためのグループ間で体重に有意差はなかった (図 1A、2A)。予防効果評価群では、AP 群、漢方群、併用群、イミプラミン群の不動

時間に有意差はなく、FS 群の時間は他の群に比べて有意に増加した (図 1B)。治療効果の評価グループでは、すべての治療グループで治療後の不動時間が大幅に減少した (図 2B)。

Fig. 1

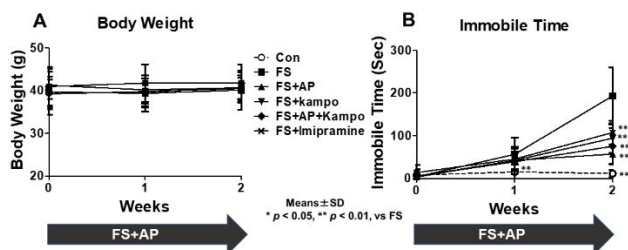
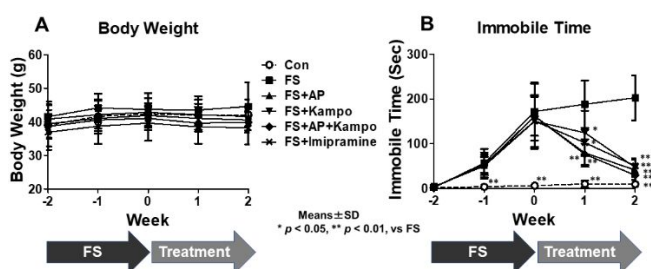


Fig. 2



### 分子生物学/生化学的所見

予防効果の調査では、以下の結果が得られた (図 3、4)。コントロール、FS +漢方、および FS +イミプラミン群の NGF の mRNA 発現は、FS 群のそれよりも有意に低かった。コントロール、FS + AP、FS + 漢方、および FS +イミプラミン群における NGF のタンパク質発現は、FS 群におけるそれよりも有意に低く、併用群における発現は FS 群と同様であった。コントロール、FS + AP、FS + 漢方、および FS + AP + 漢方群の BDNF の mRNA 発現は、FS 群よりも有意に高かった。コントロール、FS + AP、および FS + AP + 漢方群での BDNF のタンパク質発現は、FS 群よりも有意に高かった。コントロール、FS + AP、および FS + AP +漢方群における NT-3 の mRNA 発現は、FS 群のそれよりも有意に高かった。NT-3 のタンパク質発現は、mRNA 発現と同様に観察された。どのグループ間でも、NT-4 / 5 の mRNA 発現に有意差はありませんでした。コントロールと FS + AP +漢方群の NT-4 / 5 のタンパク質発現は、FS 群よりも有意に高く、AP、漢方、およびイミプラミン群の発現は FS グループと同様であった。

Fig. 3

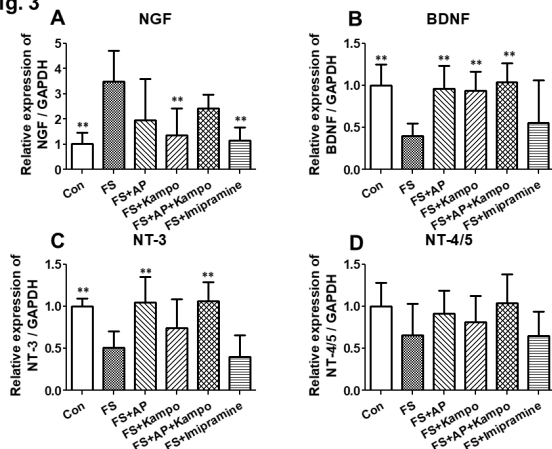
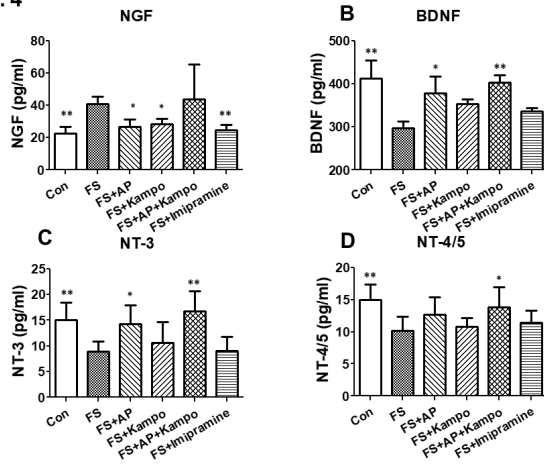


Fig. 4



治療効果の検討では、以下の結果が得られた(図5、6)。対照、FS + AP、FS + 漢方、およびFS + イミプラミン群におけるNGFのmRNA発現は、FS群におけるそれよりも有意に低く、併用群における発現はFS群と同様であった。NGFのタンパク質発現はmRNA発現に類似していた。コントロール、FS + AP、FS + 漢方、およびFS + AP + 漢方群のBDNFのmRNA発現は、FS群よりも有意に高かった。コントロール、FS + AP、およびFS + AP + 漢方群でのBDNFのタンパク質発現は、FS群よりも有意に高かった。コントロール、FS + AP、FS + 漢方、およびFS + AP + 漢方群のNT-3のmRNA発現は、FS群のそれよりも有意に高かった。NT-3のタンパク質発現は、FS + 漢方群を除いて、mRNA発現と同じように観察された。どの群間でも、NT-4 / 5のmRNA発現に有意差はなかった。対照群のみにおけるNT-4 / 5のタンパク質発現は、FS群のそれよりも有意に高かった。

Fig. 5

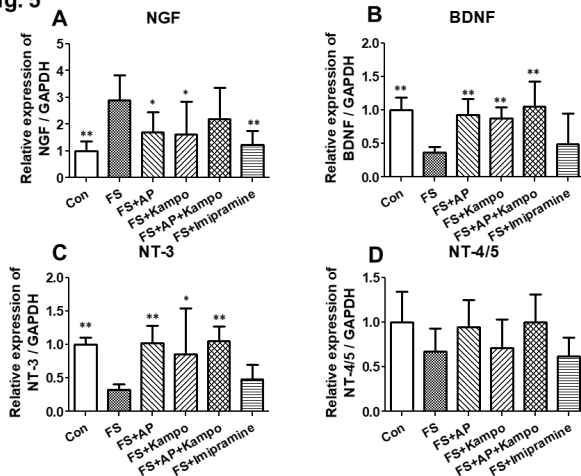
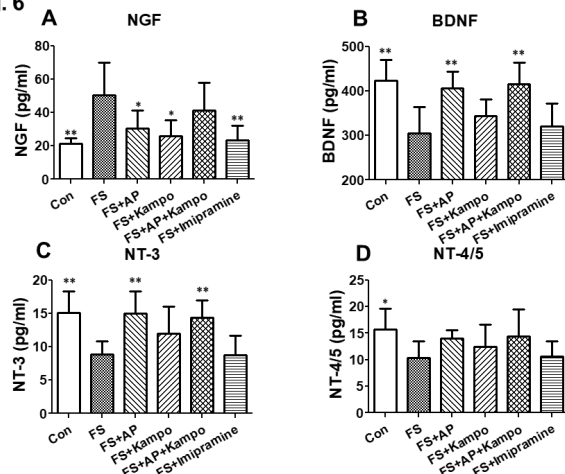


Fig. 6



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 Ko Nishimura, Jun Kawanokuchi, Teruhisa Yamamoto, Ken Takagi, Kaito Mizuno, Torao Ishida, Atsushi Ishige	4. 巻 11
2. 論文標題 Specific Effectiveness of Acupuncture and Kampo Medicine on Mice with Depression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Complementary Medicine & Alternative Healthcare	6. 最初と最後の頁 6-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.19080/JCMAH.2020.11.555803	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 2件）

1. 発表者名 Kawanokuchi J, Takagi K, Yamamoto T, Nagaoka N, Tanahashi N, Sunami Y, Mizuno K, Nishimura K, Ishida T.
2. 発表標題 Basic Research for Development of New Treatment of Depression with Acupuncture and Kampo Medicine.
3. 学会等名 14th International Congress of Neuroimmunology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawanokuchi J, Nishimura K
2. 発表標題 Basic Research for Development of New Treatment of Depression with Acupuncture and Kampo Medicine
3. 学会等名 14th International Congress of Neuroimmunology（国際学会）
4. 発表年 2018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
研究分担者	川ノ口 潤 (Kawabikuchi Jun) (50752979)	鈴鹿医療科学大学・東洋医学研究所・准教授  (34104)	