

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670360

研究課題名(和文) 施灸によるパーキンソン病治療法の探索的研究

研究課題名(英文) Investigative studies on the effect of moxibustion on Parkinson's disease

研究代表者

厚沢 季美江 (Atsuzawa, Kimie)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：60387727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：正常と薬剤投与パーキンソン病モデル動物について、施灸がドパミン分泌、運動・非運動症状に与える影響の判定を試みた。正常動物で線条体ドパミン分泌、c-fos遺伝子発現、夜間行動量増加が示された。6OHDA投与動物では、黒質のドパミン合成が低下し、線条体c-fos遺伝子発現が消失した。これは、施灸によるドパミン分泌の線条体機能制御への関与を示すと考えた。レセルピン投与動物では、施灸による体温の上昇が観察された。これらの施灸に対する動物の反応、線条体のドパミン分泌と引き続いて起こる組織活性化、個体レベルでは動物の行動活発化と体温上昇、これらの知見はパーキンソン病の症状改善に有用と推測された。

研究成果の概要(英文)：The effect of moxibustion on normal and Parkinson's disease model animals were attempted to show its effects on dopamine secretion, motor and other symptoms. The moxibustion on normal rats resulted in the secretion of dopamine and c-fos expression in the striatum, also made the locomotor activity higher. The synthetic activity of dopamine shown by the presence of tyrosine hydroxylase was made decreased, and c-fos expression in the striatum in the animals administered with 6OHDA to the striatum. This may indicate the dopamine secretion induced by moxibustion regulates the function of the striatum. The body temperature of the animals administered with reserpine was made elevated by moxibustion. These reactions of animals to moxibustion, dopamine secretion in the striatum; its activation by dopamine; increased locomotor activity; and the elevation of the body temperature, were suggested to be effective for the treatment of the symptoms of Parkinson's disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：東洋医学 施灸 ドパミン分泌 パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

(1) 施灸は、温熱刺激により慢性疾患の治療に有効とされる、東洋医学の一方法である。有効性の判定は、患者の主観に頼ってきた。東洋医学は、西洋医学と全く異なる原理に基づき、病気を「気血水の流れの異常」と捉えるので、西洋医学との接点が存在しない。パーキンソン病の運動症状については、鍼が有効であるとの報告があり、中国の文献によれば、灸治療はパーキンソン病患者の8割以上に効果が見られたとされるが、我が国では3%の患者に行われるに過ぎない。

(2) 施灸治療の客観的指標を得るために、ラットに施灸実験を行うと、大脳基底核において、ドパミン分泌が観察される。そこで、線条体におけるドパミン分泌の不足が原因であるパーキンソン病に対して、施灸により症状軽快の道が探れると考えた。パーキンソン病は、中脳黒質の神経細胞の変性の結果として起こる大脳基底核でのドパミン分泌不足が症状の原因である。L-ドーパを代表とする薬物治療が症状改善に著効を示す。一方、副作用を伴うことも多く、薬物に反応しない症例もある。本研究で用いる灸は、副作用がないと考えられ、薬物療法と同様に線条体におけるドパミン分泌が期待されるため、パーキンソン病への有効性が期待される。

2. 研究の目的

以上の背景のもとで、パーキンソン病の症状を軽快させるために、大脳基底核でのドパミン分泌促進作用が示される施灸を、補助療法として用いる可能性を探索する。パーキンソン病は原因不明の難治性神経疾患であり、ドパミン補充療法が成功してきた。一方、非運動症状の出現やドパミン補充療法の副作用に対しては十分な方法がない。そこで、補完代替医療の一方法として施灸を用いる可能性を動物実験により探る。

3. 研究の方法

(1) 材料：正常ラット：ウイスターラット(オス、4週から30週)。パーキンソン病モデル動物：脳内に6-OHDAを投与した動物、レセルピンを腹腔内に投与したラットを主に用いた。MPTPを腹腔内に投与したマウスについては、解析方法および測定装置の違いから十分な解析に至らなかった。

(2) 方法：正常およびパーキンソン病モデル動物に施灸を行う。施灸によりもたらされる

脳内ドパミン分泌能を調べるとともに、動物の行動測定により非運動症状に対する効果を調べ、ドパミン分泌神経保護作用を組織学的に明らかにすることを試みた。施灸の効果とL-ドーパ投与の効果を比較して、両者の有用性に関する解析が進行中である。

4. 研究成果

施灸を正常動物に行うことにより、背側線条体にドパミンが分泌されること、また、背側線条体における early immediate gene である c-fos 遺伝子発現を誘発することが示された。さらに、施灸は動物の夜間行動量を増加させた。6OHDA を線条体に投与したパーキンソン病モデル動物では、黒質神経細胞のドパミン合成が低下し、背側線条体における施灸による c-fos 遺伝子発現が消失していた。施灸により分泌されるドパミンが、背側線条体の機能の制御に関与することを示すと考えられる。レセルピンを投与したパーキンソン病モデル動物では、施灸による体温が上昇が観察された。これらの施灸に対する動物の反応つまり、線条体におけるドパミン分泌と引き続いて起こる組織の活性化、個体レベルでは動物の行動活発化と体温上昇、はヒトのパーキンソン病の運動・非運動症状の改善に有用であると推測された。幾つかの解決すべき問題が残された。モデル動物の運動症状と非運動症状であるうつ状態について明瞭な改善効果が示し得なかった。問題解決のためには、モデル動物の取り扱い方法とうつ状態の測定方法を改善する必要があると考えた。

(1) 施灸方法：モグサ 2mg を毛を刈った皮膚の上に置き、燃焼させた。1粒のモグサは、数十秒で燃え尽き、瞬間的に最高 170 度付近に達した。5粒のモグサを連続して5分以内に燃焼させた。選穴は、最も施灸しやすい部位として、背中の中1穴の天平穴 GV5 (最下位胸椎と第1腰椎の間)と天門穴(頭頂部)を選穴した。これを30分おきに3回繰り返した。施灸の対照としては、1) 処置なし。2) シャム：脱脂綿を5粒経穴に置く。3) 熱：シリコンオイル中で200に温めたジルコニアビーズを経穴に2秒間置く。4) 煙：動物を箱(30cm x 30cm x 35cm)に入れ、5mgのモグサを燃焼させて煙で30分間燻す、とした。

(2) パーキンソン病のモデル動物の作製：神経毒とレセルピンによりパーキンソン病モデル動物を作製した。

6-OHDA：ラットの線条体に定位脳手術によ

り背側線条体に、マイクロインジェクションカニューレで脳表面より 5.0mm 侵入させて、20 μ g 6-OHDA を 2 μ l/2 分で投与した。評価は、行動学的組織学的に解析を実施し、反応陽性個体を使用した。

レセルピン：ラットに 3 あるいは 5mg/kg を腹腔注射し、3 時間、20 時間後に使用した。行動量測定に反応陽性個体を使用した。行動量測定によれば、5mg/kg 投与動物は夜間行動量は全ての動物で激減した。3mg/kg 投与動物では、約半数の動物で激減した。

MPTP：マウスに 20mg/kg を腹腔内注射し作製する。ドパミン分泌と運動症状に対する灸の効果を観察する。MPTP 動物は作成の試みに留まった。

(3) ドパミン分泌測定：

マイクロダイアリシス：透析プローブを脳の背側線条体に定位脳手術にて挿入し、灌流液中のドパミンを、HPLC により経時的に測定し、施灸によるドパミン分泌量を測った。麻酔下で、ラットに脳固定装置でガイドカニューレを背側線条体に留置し、ダミーカニューレを挿入した。2 週間以上の回復期の後、自由に動ける動物を用いてマイクロダイアリシスを行った。透析プローブ (2mm の透析膜を有する 4mm 直管型透析プローブ) を挿入した。リンゲル液を、流速 1.5 μ l/分で灌流した。送液を 3 時間以上行い、測定値を安定させた後、透析サンプルを 30 分毎に回収した。処置前 3 点のサンプルをベースラインとした。ODS カラムと炭素電極を装着した HPLC を用いて測定した。測定が終了した後、脳断面のヘマトキシリン・エオシン染色を行い、プローブの位置を確認した。部位より外れている個体のデータは排除した。また、ベースラインの値が安定しない個体も排除した。刺激前 3 点の安定した値の平均値をベースライン値 100% とした変化率を、t-検定を用いて統計処理し、有意差 ($p < 0.05$) を求めた。合計変化率は刺激開始後 5 点の値からベースラインを除いた値を合計した。図 1 は、背側線条体における透析プローブの刺入位置を示すヘマトキシリン・エオシン染色切片である。図 2 は、線条体におけるドパミン分泌の変化を示した。灸刺激、熱刺激、煙刺激では、刺激開始直後から 2 時間にわたってドパミン分泌の一過性の有意な増加が見られた。灸、熱、煙ではそれぞれ最大 123%、121%、114% に達した。一方、シャム刺激および無処置群では有意な変化は見られなかった。図 3 に示す、6OHDA 投与動

物の対側線条体での施灸によるドパミン分泌は正常動物と同様であった。

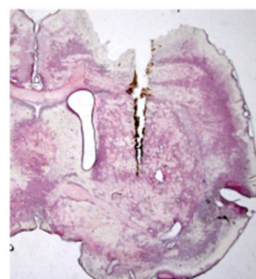


図 1

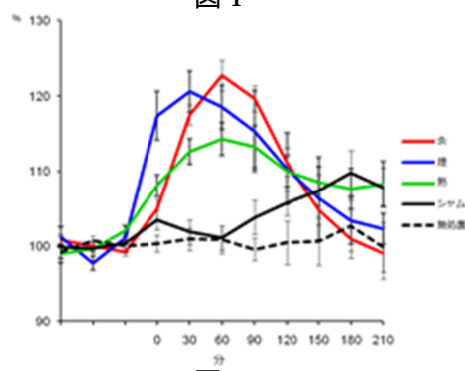


図 2

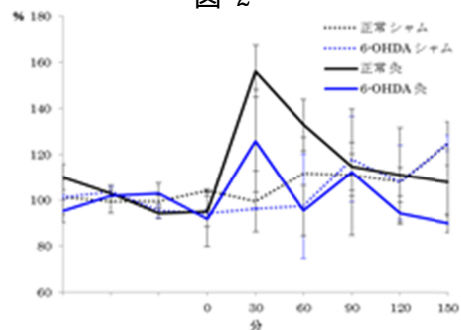


図 3

小動物 PET：施灸による線条体でのドパミン D2 受容体結合能の変化を、PET により解析する。ドパミン分泌の部位および量を知るために、 $[^{18}\text{F}]\text{FDOPA}$ および $[^{11}\text{C}]\text{ラクロプライド}$ をラットに投与し、投与後 20 分まで 2 分毎、その後 60 分まで 5 分毎に 3 次元ダイナミック収集を行う。線条体から参照部位の放射能を差し引き、D2 受容体特異的結合の指標とする。装置の都合により期間中に測定が行う事が出来なかったため、実行計画中である。

(4) 行動実験：運動症状の把握のためにビデオ撮影および行動計測装置による自動測定を行った。動物の活動量は、赤外線を用いた自動測定装置により 2 分間隔で測定した。動物はハンドリングによる十分な馴化の後使用した。夜間活動量 (午後 7 時から午前 7 時)

の総和をその日の運動量として採用した。刺激前に1週間、運動量が安定するまで待ち、変動が激しい個体は除いた。刺激前3日間の平均をベースラインとして、合計変化率を求めて統計処理を行った。強制水泳テストを試みたが、水浸の刺激が強いためか、施灸効果を示す事ができなかった。図4は、正常動物に施灸を行った結果である。施灸後数日間にわたり増加傾向であった。図5では、レセルピン投与動物にL-ドーパを投与したが、運動量の回復は観察されなかった。施灸後3日間および4日間で合計変化率は施灸群で有意に増加した。図6、7は、レセルピン投与により、行動量が極端に減少したが、L-ドーパ投与と施灸による回復は示されなかったことを示す。

行動実験：運動症状の把握のために、6-OHDA投与動物について施灸による旋回行動出現を検討した。6-OHDA投与手術後2週にアポモルフィン(1mg/kg)を腹腔内投与し、投与後約30分間動物の回転運動を観察した。赤外線を用いた自動測定装置を用いて行動量・軌跡を1サンプル/秒の間隔で記録した。連続する移動3点の座標からベクトルの外積を求め、Sinをもつて回転の方向を数値化した。1分間の積算値の正負を求め、回転方向の傾向を検討した。術後2週間ですべての動物で反応が陽性となった。図8にアポモルフィンと施灸による施灸を行っても旋回行動は観察されなかった。旋回行動量の比較を示す。

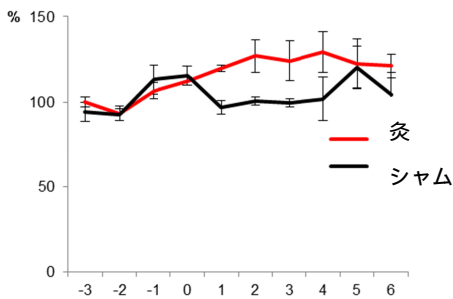


図4

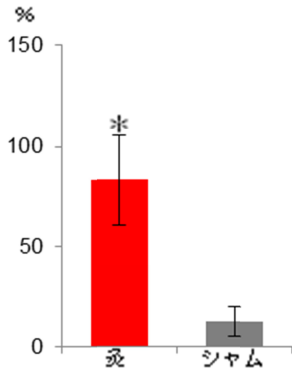


図5

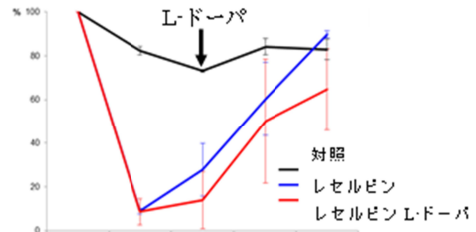


図6

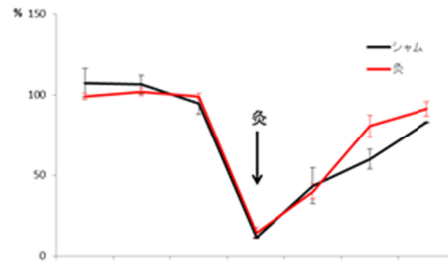


図7

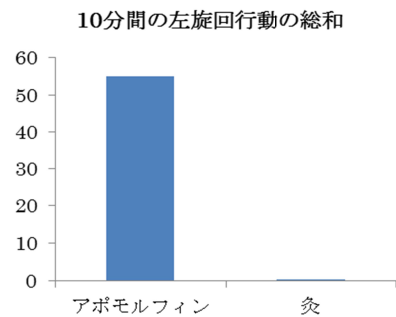


図8

(5) 体温測定

体表温度測定：体表温度は、赤外線カメラを用いて非接触的に背部・耳介で測定した。カメラの測定温度範囲は-40 ~ 160、測定変化は0.2である。直腸温度測定：直腸温度は、サーミスタ温度計、測定変化0.1、測定時間15秒、を用いた。端子は肛門から4cm挿入した。体表温度測定によると、正常動物では36、レセルピン投与動物では32とレセルピン投与により体温低下が測定できたが、施灸による体温変化は明瞭ではなかった。図9はレセルピン投与動物(3mg/kg)の直腸温度測定の結果を示す。レセルピン投与により体温低下が示された。5mg/kgの投与を行った動物では、3mg/kgの投与を行った動物に比べ、体温低下が著しかった。施灸を行うと正常動物では0.2程度、レセルピン投与動物(3mg/kg)では0.6程度の体温上昇が観察された。一方、レセルピン投与動物(5mg/kg)では体温上昇は観察されなかった。

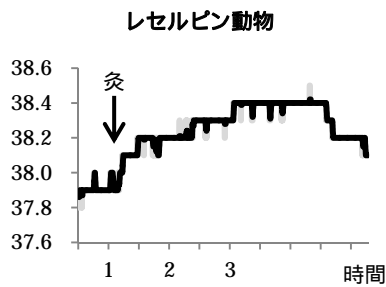


図 9

(6) 組織学的解析：正常動物および 6OHDA・レセルピン投与動物を用いて、冷 4% パラフォルムアルデヒドにより灌流固定した脳組織から 50 μm 厚の凍結切片を作製した。抗 c-Fos 抗体と抗 TH 抗体を用いて ABC 法による酵素抗体染色を行った。図 10 は正常動物における、背側線条体の c-Fos の局在を示す。施灸動物では、陽性細胞が増加した。6OHDA 投与動物においては、図 11 のように同側の線条体および黒質が TH 陰性となり、対側では正常動物と比べて著大な変化はなかった。レセルピン投与動物においては、TH 染色性の変化は観察されなかった。レセルピン投与動物（図 12）と 6-OHDA 投与動物の対側線条体（図 13）は、いずれも施灸群で c-Fos 陽性細胞が見られた。ただし 6-OHDA 投与動物の投与同側では c-Fos 陽性細胞の増加は見られなかった。

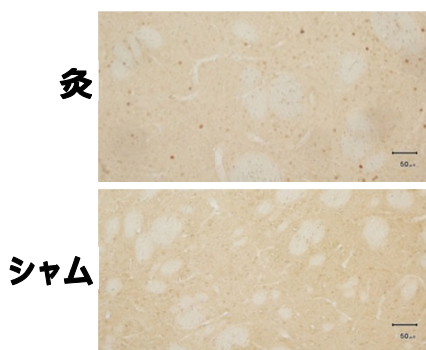


図 10

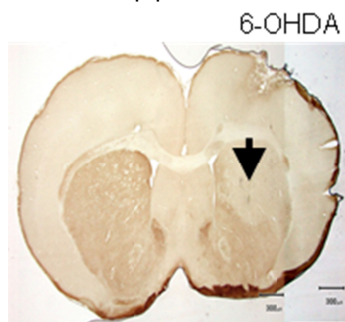
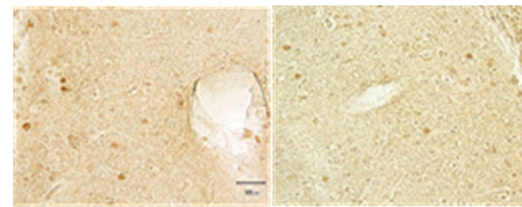


図 11

レセルピン

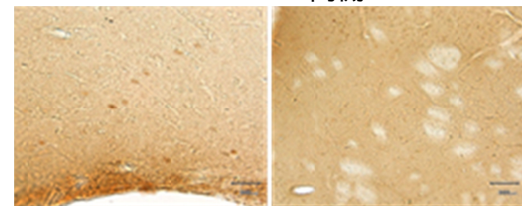


シヤム

灸

図 12

6-OHDA 同側



シヤム

灸

図 13

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Osuka K, Usuda N, Aoyama M, Yamahata H, Takeuchi M, Yasuda M, Takayasu M. Expression of the JAK/STAT3/SOCS3 signaling pathway in herniated lumbar discs. *Neurosci Lett.* 2014 ; 569: 55-8. doi: 10.1016 (査読有)

Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Aoyama M, Takeuchi M, Takayasu M. Eotaxin-3 activates Smad through the TGF- β 1 pathway in chronic subdural hematoma outer membranes. *J Neurotrauma.* 2014 (査読有)

Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Atsuzawa K, Takayasu M. Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser1412 in the dentate gyrus of rat brain after transient forebrain ischemia. *Neurochem Int.* 2013; 63(4):269-74. doi: 10.1016 (査読有)

Joko M, Osuka K, Usuda N, Atsuzawa K, Aoyama M, Takayasu M. Different modifications of phosphorylated Smad3C and Smad3L through TGF- β after spinal cord injury in mice. *Neurosci Lett.* 2013; 549:168-72. doi: 10.1016 (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

深澤元晶、臼田信光、永津郁子、中原大一郎、厚沢季美江、森山陽介．施灸による脳反応の c-Fos 免疫組織化学による解析．第 119 回日本解剖学会全国学術集会、下野、2014 年 3 月 27 日

深澤元晶、臼田信光、森山陽介、永津郁子、
中原大一郎、厚沢季美江 . 施灸による c-Fos
発現の免疫組織化学的研究 . 第 73 回日本解剖
学会中部支部学術集会、甲府、2013 年 10 月 5
日

深澤元晶、厚沢季美江、森山陽介、中井さ
ち子、渡仲三、永津郁子、中原大一郎、臼田
信光 . c-Fos の免疫組織化学による施灸反応
の脳反応の解析 . 第 54 回日本組織細胞化学会
総会・学術集会、東京、2013 年 9 月 27 日

〔その他〕

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

厚沢 季美江 (ATSUZAWA, Kimie)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号 : 60837727

(2) 研究分担者

臼田 信光 (USUDA, Nobuteru)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号 : 30135123

深澤 元晶 (FUKASAWA, Motoaki)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号 : 70387728

森山 陽介 (MORIYAMA, Yohsuke)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号 : 00452532