

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 15 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860483

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患(COPD)の息切れ対策と治療法の開発

研究課題名(英文)Development of treatment for dyspnea of chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

鈴木 雅雄(Suzuki, Masao)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・准教授

研究者番号：10378698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：呼吸リズムの生成には延髄腹側に存在しているpre-Botzinger complex (preBotC)とBotzinger complex (BotC)が重要な役割を担っている。本研究では呼吸困難に対する鍼刺激の効果を解明する一端として、呼吸負荷(CO₂ 8%)を行いその際に鍼刺激を行い2領域の影響について脳内モノアミン(ドーパミンおよびセロトニン)を用いて評価した。結果、ドーパミンは呼吸負荷群 32.2(SD 5.65)、鍼刺激群 77.4(SD 32.6)、セロトニンは呼吸負荷群 79.1(SD 34.2)、鍼刺激群 144.5(SD 71.4)と鍼刺激群で有意な上昇が認められた。

研究成果の概要(英文)：Two areas on the abdominal side of the medulla oblongata, pre-BotC and BotC, play an important role of generating respiratory rhythms. In this study, to elucidate how acupuncture(ACP) work effectively on dyspnea, we evaluated the effects on these two areas by measuring brain monoamines (dopamine and 5-HT) in respiratory load (CO₂ 8%) rats. There was no significant difference found in the amount of dopamine between the intact group and the control group. However, in the respiratory load group, it was significantly decreased compared with the intact group and control group. On the other hand, it was significantly increased in the ACP group compared with the respiratory load group and even with the control group. Although the serotonin level was not detected in the intact group and the control group, it was significantly increased in the ACP group compared to the respiratory load group. Results of this study indicate that ACP could affect respiratory rhythm via pre-BotC and BotC.

研究分野：鍼灸学

キーワード：呼吸中枢 呼吸困難 鍼刺激 セロトニン ドーパミン

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は喫煙を契機に発症する疾患であり、現在 common disease として生活習慣病の一つと認識されている。さらに、COPD は近年本邦において有病者数の増加に伴い医療費の高騰は避けられない。その理由として、COPD 患者の主訴である労作時呼吸困難は ADL の低下を招くと共に、活動性の低下から廃用症候群となり長期臥床から COPD の急性悪化を招く。従って、COPD 患者においては呼吸困難の軽減と予防を行う事が重要である。さらに、GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) ガイドラインでは労作時呼吸困難の管理と予防は患者の予後に関連していると報告されている。しかし、現行で COPD の労作時呼吸困難に対してエビデンスが認められている治療方法は、呼吸リハビリテーションが挙げられるが、健康保険の制約により短期間しか受ける事が出来ず、また呼吸リハビリテーションを実施していない施設もあることから一般に広く受けられる治療法では無い。さらに、通院が必要となるため労作時呼吸困難を有している COPD 患者には負担となる。そのため、COPD 患者が在宅で実施可能な治療法を模索する必要がある。

一方、これまで申請者は補完代替医療の観点から COPD 患者の労作時呼吸困難の軽減を目的に伝統医学の一つである鍼治療を用いて臨床研究を行い、鍼治療による呼吸困難の軽減が得られることを報告してきた (1-2)。さらに、Jobst らの報告 (3) でも申請者と同様の結果であり、Maa らの報告ではツボを指圧刺激した場合でも類似した効果が得られていることから、特定のツボ (経穴) には労作時呼吸困難を軽減させる効果があると示唆できる。

しかし、ツボ刺激による呼吸困難を軽減させるメカニズムは不明であり、今回はツボ刺激による呼吸困難の軽減について動物を用いてメカニズムの解明を行い、その結果を踏まえてセルフメディケーションとして、COPD 患者の労作時呼吸困難の予防効果の基礎を作る事が目的である。

これまでの研究で明らかにされた事は、動物を対象とした研究では、呼吸中枢は主に延髄網様体に存在しており、呼吸リズムの生成には parafacial respiratory group (pFRG) と pre-Bötzinger complex (preBötC) の 2 つの領域が関与している。特に、preBötC はオピオイドによって抑制を受けていることが報告されており、臨床上においても呼吸困難発生時にオピオイドを投与することで呼吸困難が軽減される (4,5,6)。

また、ヒトを対象とした研究では、COPD の呼吸困難の要因は複数存在しているが、共通した要因として肺過膨張に伴う呼吸筋疲労が上げられる。

一方、従来のツボに関する研究では、中枢レ

ベルではツボに鍼刺激や経皮的電気刺激をした場合、強い鎮痛作用を引き起こす事が証明されており、そのメカニズムに下行性疼痛抑制系を介した内因性オピオイド (エンドルフィンなど) の賦活であると報告されている。従って、鍼刺激により内因性オピオイドが賦活することにより、preBötC の活動を抑制し呼吸困難を軽減させるという仮説が成り立つが現段階では証明されていない (7,8)。また、末梢レベルでは、筋疲労に陥った筋に対してツボ刺激を行った場合、筋の異常放電が抑制され筋緊張緩和が認められ、疲労改善が得られたと報告されている。申請者が実施した先行研究でも呼吸筋疲労に陥った COPD 患者の胸郭に鍼刺激を行い、労作時呼吸困難の改善に加えて呼吸筋力の増加が認められた。

2. 研究の目的

本研究では慢性閉塞性肺疾患 COPD 患者が自覚している労作時呼吸困難の対策と新規治療法を導くために、まずは呼吸困難のメカニズムの一端を明らかにすることで、呼吸困難の対策と新規治療法の方略を考える。呼吸リズムの生成には幾つかの領域が存在しており、特に延髄腹側に存在している pre-Bötzinger complex (preBötC) と Bötzing complex (BötC) が重要な役割を担っている。また、この 2 領域の神経には Enkephalin 受容体が多く存在していると報告されているが、呼吸困難における 2 領域の機能に関しては明確にはされていない。

そこで、ツボ刺激における呼吸困難の軽減に関与するメカニズムを検討する上で、動物 (ラット) を用いて呼吸困難発生時の呼吸中枢の動きを電気生理学的手法により観察するとともに、呼吸リズムに関係する物質であるサブスタンス P やドーパミン、セロトニンなどを高速液体クロマトグラフィー法にて評価し、ツボ刺激によりこれらがどのような変化をするか検討する。

3. 研究の方法

8 週令の SD 系雄性ラット (体重 280 ~ 300g、日本クレア (株) 東京) を用いて、観察対象群 (N10)、コントロール群 (N10)、呼吸負荷群 (N10)、鍼刺激群 (N10) の 4 群を設定した。観察対象群は麻酔の影響を比較するために、なにも処置等は行わず、速やかに苦痛を与えることなく断首し脳の採取を行い、モノアミンを高速液体クロマトグラフィーにて測定した。コントロール群はペントバルビタール (腹腔内注射 0.1ml/100g) にて麻酔を行い、30 分間の経過を観察後に断首し脳を採取した。呼吸負荷群は麻酔後 (コントロール群と同様) に気管切開を行い人工呼吸器管理 (KN-58 SLA Ventilator, NATUME) (1.5ml/g/分) し、呼吸安定後より負荷 (酸素 92%、二酸化炭素 8% の混合気) を 30 分間行い、その後脳採取を行った。鍼刺激群は呼吸負荷群と同条件の混合気で負荷を行い、15 分間の呼吸負荷後より鍼刺激を 15 分間行い、その後断

首し脳を採取した。鍼刺激の方法は尺沢穴 (LU5) に太さ 0.20mm、長さ 15mm の鍼 (セイリン株) を 0.5mm 程度挿入し、針電極低周波治療器 (Ohm Pulser LFP-4000A、(株) 全医療器、福岡) にて出力 5V、パルス幅 0.2msec、双方向パルスを用いて筋収縮が見られるまで刺激を行った。

脳組織の採取

preBötC と BötC の領域の採取は、Bregma より -12mm から -14mm の間をブレインスライサーにてカットを行い、正中より 2mm 耳側、腹側より 0.5mm 背側を 1mm 幅でパンチを行い採取した。

統計解析

ドーパミン量については、一元配置分散分析 (ANOVA) およびコントロール群を基準とした Dunnett 検定を行った。また、呼吸負荷群と鍼刺激群の 2 群間の比較を Student-t 検定を用いた。セロトニン量は Student-t 検定を行った。全ての統計解析結果は有意水準 0.05 以下とした。

本研究の全ての動物実験は、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (平成 18 年 6 月 1 日 日本学術会議) に基づき、明治国際医療大学動物実験：委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

ドーパミン量は観察対象群では $57.0 \pm 22.2 \mu\text{mol}/\text{mg}$ 、コントロール群 $52.5 \pm 15.9 \mu\text{mol}/\text{mg}$ 、呼吸負荷群 $32.2 \pm 5.65 \mu\text{mol}/\text{mg}$ 、鍼刺激群 $77.4 \pm 32.6 \mu\text{mol}/\text{mg}$ であった。ドーパミン量は観察対象群とコントロール群では大きな変化は認められなかった。しかし、呼吸負荷群では観察対象群とコントロール群と比較して有意に低下を認めていた。一方、呼吸負荷群と比較して鍼刺激群では有意に上昇しており、さらにコントロール群と比較しても有意な上昇が認められた。(図 1)

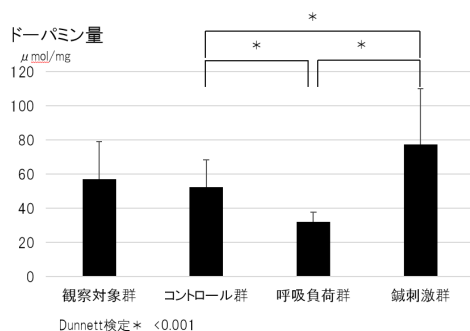


図 1

一方、セロトニン量は観察対象群およびコン

トロール群では検出されなかった。しかし、呼吸負荷群および鍼刺激群ではセロトニンの検出が認められた。呼吸負荷群のセロトニン量は $79.1 \pm 34.2 \mu\text{mol}/\text{mg}$ であり、鍼刺激群では $144.5 \pm 71.4 \mu\text{mol}/\text{mg}$ と呼吸負荷群と比較して有意な上昇が認められた。(図 2)

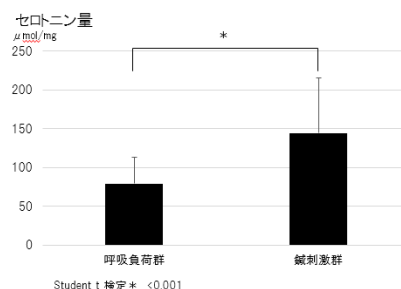


図 2

本研究においてサブスタンス P の解析に関しては、微量であったため今回の実験系では同定が困難であった。

考察

本研究では呼吸困難のモデルを高二氧化碳素の呼吸負荷により作成を行った。その際の呼吸リズム生成に寄与する preBötC と BötC の機能をモノアミンにて評価した。これまで、preBötC では neurokinin-1 receptor の存在が確認されておりサブスタンス P が関わっている事は報告されていた⁹⁾。さらに、この領域の神経では μ 受容体が確認されており enkephalin により呼吸抑制が起こる。今回、本研究により preBötC と BötC の領域においてドーパミンおよびセロトニンが検出されたことは、既報告がないため初の報告となる。また、正常時および麻酔時にはセロトニンは検出されず呼吸負荷によりドーパミン量が減少しセロトニンが検出された。また、呼吸負荷に鍼刺激を加えることで、ドーパミン量の増加に加えてセロトニン量の有意な増加が認められた。この反応は呼吸負荷時には呼吸リズム生成にセロトニンが関わっていると推察できる。また、鍼刺激時にはドーパミンおよびセロトニン量が共に増加していたが、鍼刺激には中脳中心灰白質 (periaqueductal gray; PAG) を介してオピオイドを賦活する作用がある¹⁰⁾。PAG は中脳水道の周囲に広がる細胞集団で、大脳辺縁系や視床下部などから情動やそれに伴う自律神経性の入力、脳幹や脊髄からは感覚性入力を受け、これらの情報を統合して、適切な行動や自律神経系活動の発現に関与している¹¹⁾。特に、呼吸に関しては PAG からは、Bötzing complex、後疑核、孤束核、延髄の呼吸ニューロン群に直接の投射があり、呼吸リズムの修飾、状況に応じたさまざまな呼

吸パターンの発現に関与している。PAG をグルタミン酸作動薬で刺激すると様々な呼吸パターンが誘発されることが報告されている(12)。さらに呼吸筋や補助呼吸筋と発声筋の協調運動にも密接に関連している。従って、本研究では呼吸負荷により呼吸リズムの生成においてセロトニンが関与していると推察され、さらに鍼刺激ではPAGを介してpreBötCおよびBötCに影響を及ぼしドーパミンおよびセロトニンなどのモノアミンを賦活し、呼吸リズムに影響していた可能性が考えられた。今後はさらに詳細な機能の検証を行う必要があると考えられた。

参考文献

1. Suzuki M, et al. Arch Intern Med. 2012 172(11). 878-86.
2. Suzuki M, et al. J Altern Compl Med. 2008. 14. 9. p1097-1105.
3. Jobst K, et al. Lancet 1986. 20. 1416-1419.
4. Onimaru H, et al. J Neurosci 23. 2003.
5. Smith JC, et al. science 254. 1991.
6. Feldman JL, et al. Nat Rev Neurosci 7. 2006.
7. Oku Y, et al. J Physiol 585. 2007.
8. Ren J, et al. Am J Respir Crit Care Med 174. 2006.
9. Paul A.Gray, et al. Nature Neuroscience 4, 2001.
10. Kawakita K, et al. J Pharmacol Sci 100. 2006
11. Hari H Subramanian, et al. J. Neurosci 28.2008.
12. S Kyuhou, et al. Neuroreport 9(7).1998.

*当初、第1研究として in vivo にてこれらの領域の活動電位を取るためにガラス電極を挿入しニューロンの活動を記録した。しかし、この領域が延髄腹側に存在しているため実験手技面において難易度が高く、研究期間内にニューロンの活動電位を得ることが困難であった。

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0件)

〔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
該当無し

6. 研究組織

- (1)研究代表者
鈴木雅雄 (SUZUKI Masao)
福島県立医科大学・公私立大学の部局等・
准教授
研究者番号:10378698
- (2)研究分担者
該当なし
- (3)連携研究者
該当なし
- (4)研究協力者
福田文彦 (FUKUDA Fumihiko)
明治国際医療大学鍼灸学部 教授