

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390200

研究課題名（和文）生活習慣病における施灸効果の神経科学的解明

研究課題名（英文）Neuroscientific studies on the effect of moxibustion on chronic diseases

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：施灸に対する脳反応について客観的指標の樹立を試みた。ラットに施灸し、マイクロダイアリシスによる神経伝達物質測定、脳波等の電気生理学的測定、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。全ての反応は極めて弱く、測定には高 S/N 比を得る工夫が必要であった。ドパミン分泌・関係する脳内部位の遺伝子発現変化・体温上昇・海馬脳波 θ 波の変化が示され、施灸が情動・記憶など重要な脳機能に影響し、生活習慣病に効果を示す可能性が推定された。

研究成果の概要（英文）：Subjective evidence of the brain reactions for moxibustion was attempted. Moxibustion treatment was done on rats, and measurements of brain functions based on neurotransmitter secretion by microdialysis; electrophysiological changes including EEG; and gene expression analyses by DNA microarray, were performed. As all the reaction measured was very weak, high S/N ratio was required. Dopamine secretion, elevated gene expression, the elevation of body temperature, changes of hippocampal θ wave in EEG, were shown in the experiments. As these are considered to affect brain functions including emotion, memory, etc, moxibustion may have possible curative effects on chronic diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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・施灸の脳科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 鍼灸治療のうち鍼治療については、東洋医学以外の領域の雑誌に報告があるようになり効果が認識され始めた。しかし、灸治療については、その効果を万人が認めるようにはなっていない。

(2) 施灸に対する脳内情報処理機構の解明は、すでに集積している他分野の脳科学の研究

を応用すると、予見可能となる。つまり、研究で得られる所見と合わせ考察を行うと、施灸効果の全貌解明につながると期待している。

2. 研究の目的

施灸による脳の初期効果について物質レベルで客観的指標を樹立し、脳内情報処理機構を解明する。経験的に施灸が有効であると知

られる慢性疾患における、施灸に対する脳の反応特性を明らかにする。具体的には、施灸により生体に引き起こされる現象を、脳微量透析法（マイクロダイアリシス）と呼ばれる脳内化学物質を直接に調べる手法と自律神経系の反応を中枢・末梢反応の電気的変化の実時間的計測を中心とした神経科学の研究法と、さらに、神経伝達物質の変動については質量分析装置により、遺伝子発現についてはDNAマイクロアレイ法により、脳内物質の網羅的解析を行う。これらの計測により得た結果を、生活習慣病：高血圧・痴呆・糖尿病のモデル動物において、物理化学的な視点から定量化することにより施灸に対して脳・神経系が反応する仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マイクロダイアリシスによる脳内化学物質の直接測定

施灸による神経伝達物質の分泌を脳の初期反応として調べた。ウィスターラット オス 250g（前頭前野・腹側線条体・側坐核）に透析プローブを定位脳手術により刺入する。リング液を灌流し、無麻酔・非拘束下でマイクロダイアリシスを行い透析サンプルを回収する。サンプルを電気化学検出器を装置した HPLC によりドーパミン分泌を検出した。

(2) 実時間測定による自律神経系反応の測定

①体温変化：施灸は従来から体を温めると言われているが、体温に耐える影響については報告がない。施灸が体温に及ぼす影響を調べた。体温データロガーをラット腹腔内に手術で装置した。一部の動物には STZ を投与して高血糖動物（1型糖尿病）とした。測定は5分に1回行われ、実験終了後に開腹してデータロガーを取り出し、データを PC に取り込んだ。

②脳波測定：施灸と認知症の関係を調べるために迷路を用いた実験を計画した。しかし、迷路を用いた実験で施灸を行うことが非常に困難であった。ラットで測定されている脳波には脳表脳波と海馬脳波がある。海馬脳波については動物の活動・睡眠・環境・空間学習・行動・薬品などの影響が調べられているが、海馬θ波は特に位置に関する学習記憶と密接な関係があると推定される。そこで、施灸が海馬θ波に与える影響を調べた。

定位脳手術により海馬電極を側頭筋に設置した。シールド内で、無麻酔・非拘束下で0.5~35Hzの脳波を測定した。安定している5秒間を選択し、高速 Fourier 変換 (FFT) 解析を行い、パワースペクトラム： δ 波

(0.5-4Hz)、 θ 波 (4-8Hz)、 α 波 (8-13Hz)、 β 波 (13-30Hz) θ 波領域 (5-13Hz) を得た。各周波数領域の強度分布を比較した。

(3) 質量分析装置による神経伝達物質の変動の解析

①マイクロダイアリシス試料：様々な神経伝達物質を質量分析装置により同時測定する

可能性について調べた。目的とする物質を検出するためには、カテコールアミンでは fmol/ μ l レベル、ペプチドでは amol/ μ l の検出感度が必要である。マイクロダイアリシスの透析液を材料とすることを目指した。3種類のカテコールアミン：Dopamine；Serotonin；Noradrenaline と、2種類のペプチド：Enkephalin； β -endorphin の標品を基準物質として用いた。表1のような3種類の質量分析装置を用いた。

質量分析表1 質量分析装置

測定法	検出方法
1. GC MS	四重極型
2. LC MS	Ion Trap 型
3. TOF MS	飛行時間型
HPLC	ECD

②ImagingMSによる測定：神経伝達物質の imaging MS による直接測定を、MALDI-TOF 型質量分析装置で試みた。前述のカテコールアミン・ペプチドの標品と、脳 homogenate および脳 homogenate に標品を加えたものの3種類について通常の測定を行った。脳の凍結切片については、対照として、脳の凍結切片に標品 (dopamine, enkephalin, β -endorphin) をスポットした標本を用いた。matrix には HCCA を用いた。溶液サンプルは、サンプルを matrix と混合し target 上に乗せ、真空乾燥して測定した。凍結切片は、切片を ITO コートスライドガラスに添付して真空乾燥し、ImagePrep を用いて切片に matrix を噴霧塗布して測定した。

(4) DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析

施灸によりドーパミン分泌が脳の3部位（前頭前野・背側線条体・側坐核）で観察された。中脳黒質からこの3部位にドーパミン分泌が行われるので、これら4部位において施灸後の遺伝子発現の変化を調べた。無処置群を対照として、2色法で DNA マイクロアレイを行った。施灸開始から 1・2・3・4・12 時間ごとに3個体から脳4部位を採取した。組織から全 RNA を抽出し、キャピラリー電気泳動法により品質を確認した。前実験として、early immediate genes についてリアルタイム PCR を行ったが、明確な遺伝子増幅は観察されなかった（図1）。DNA マイクロアレイのためには、RNA から cRNA を合成し、施灸群を Cy5（赤）、無処置群を Cy3（緑）で標識した。両 cRNA を混合して DNA マイクロアレイ（約4万遺伝子搭載）にハイブリダイズし、スキャナーで蛍光シグナルを読み取った。数値化した各遺伝子の発現データから、有意に変動の見られた 590 遺伝子 ($p < 0.01$ 、図2) についてパスウェイ解析を行った。

(5) 施灸刺激

標準的な施灸は、2mg の艾を5個点火し、そ

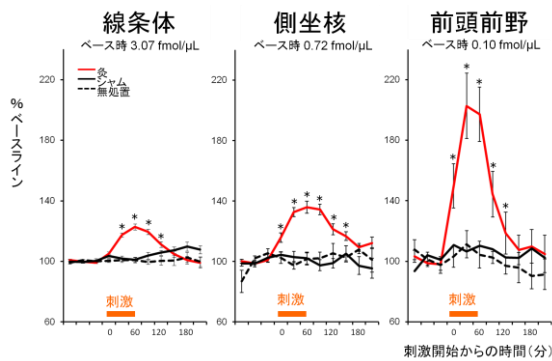
それを30分おきに3回繰り返した。測定において脳を操作する必要があるため、主な経穴としては背部の天平穴（GV5）を用いた。対照として、艾の煙で30分間燻煙、180℃に加熱したジルコニアビーズによる加熱、綿球を用いたシャム刺激（点火せず）を行った。

4. 研究成果

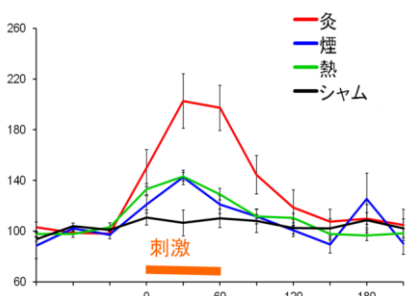
(1) マイクロダイアリシスによる脳内化学物質の直接測定

施灸により3部位でドーパミン分泌が観察された。前頭前野での増加率が最大であった。施灸後2時間分泌が続いた（図1）。煙・熱のみでもドーパミン分泌が観察されたが、増加の程度は施灸に及ばなかった（図2）。灸の量（回数）が多いほど分泌量が多かった（図省略）。全身麻酔を行うとドーパミン分泌は消失した。昼間の実験で動物を揺り動かし覚醒を促しても分泌量は変わらなかった（図省略）。現在、論文投稿中である。

MD 図1 施灸によるドーパミン分泌



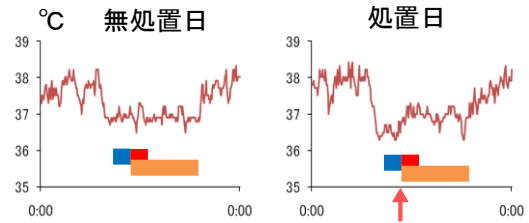
MD 図2 灸の要素（前頭前野）



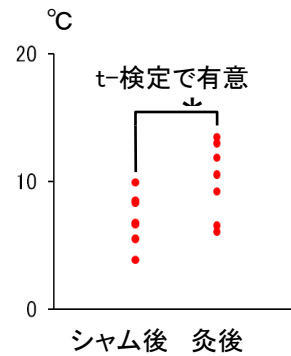
(2) 実時間測定による自律神経系反応の測定

① 体温測定：術後に日内周期が観察されるようになり、体温が安定したところで実験を行った。処置日においては、施灸群で体温の上昇が観察され（図1）、シャム群（対照）と比較すると、施灸群の体温上昇は統計学的に有意であった（図2）。施灸を行うと短時間（2時間）体温が上昇することが示された。糖尿病動物においては、施灸実験のためにケージを飼育ラックから取り出しておくのみで徐々に体温が低下した。そのため施灸による体温上昇は観察できなかった。

体温図1：施灸による体温上昇

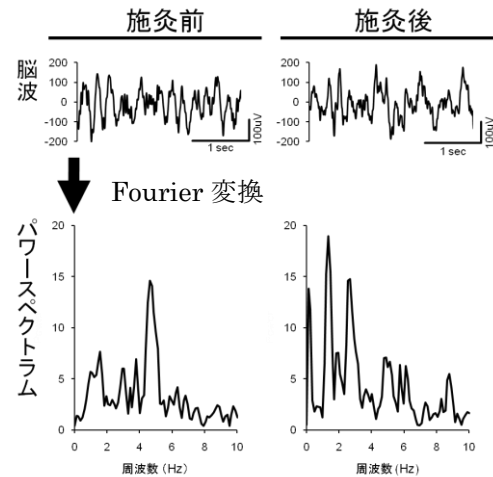


体温図2：体温変化量の合計

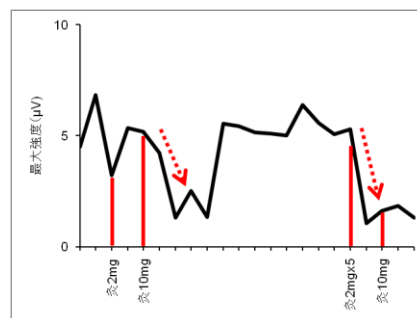


② 脳波測定：施灸前にはθ波の同期が観察され、θ波の強度が最大であった。施灸中および施灸後は同期が消失した（図1、2）。パワースペクトラムは低周波優位になった。これは施灸が記憶に影響を与える可能性を示している。

脳波図1 海馬脳波の周波数の変化



脳波図2 海馬θ波の強度変化



(3) 質量分析装置による神経伝達物質の変動の解析

① マイクロダイアリシス試料：GCMS によれば、標品についてカテコールアミンは同定可能であったが、ペプチドは検出不能であった。LCMS はカテコールアミンとペプチドの両者とも検出可能であったが、MD の試料中の物質の検出のためには 1000 倍の感度が必要であった。各物質について別々の分離用カラムを用いなければならないので、同時測定は現状では不可能である。TOFMS では両者とも同定可能であったが、MD の試料中の物質の検出のためには 1000 倍の感度が必要である。以上の結果は表 2 にまとめた。同一サンプルで検出可能な質量分析装置は唯一 MALDI-TOF MS であった。ただし、飛行時間型では検出感度が不足していた。フーリエ変換イオンサイクロトロン型の質量分析装置の応用が期待される。

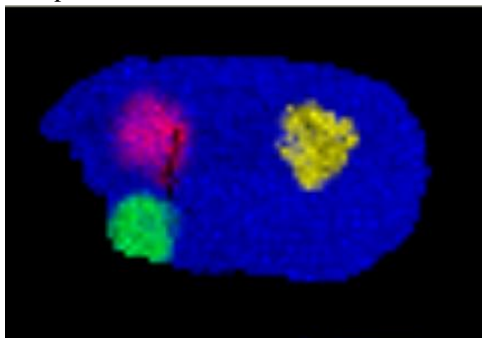
質量分析表 2 各質量分析装置の適用可能性

	GCMS	LCMS	TOFMS	ECD
CA s	不可	可	可	可
ペプチド	不可	可	可	一部可

② ImagingMS による測定：標品は測定できたが、標品と脳 homogenate の混合物、脳 homogenate に内在の神経伝達物質は全く検出できなかった。切片については、内在性の神経伝達物質については通常の TOFMS 装置では全く検出できなかった。対照として用いた標品をスポットした切片については可視化できた (図 1 : 赤 dopamine; 緑 enkephalin; 黄 β -endorphin)。フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分析装置を用いれば imaging MS を行える可能性があると考えられた。

Imaging MS 図 1

3 種類の標品 (dopamine, enkephalin, β -endorphin) をスポットした脳切片

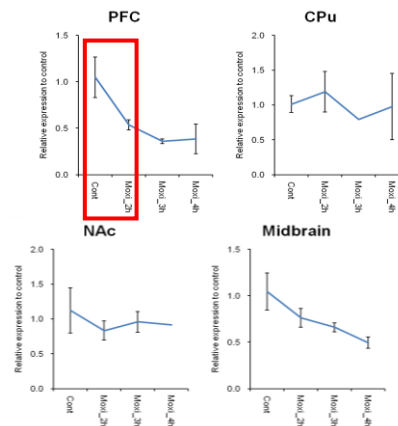


(4) DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析

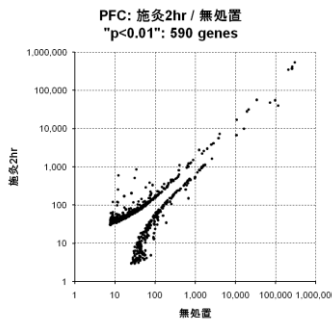
early immediate gene および乱用薬物中毒関連遺伝子について (参考: Piechota M et al., Genome Biology 2010, 11:R48) : 施灸開始後 2 時間で複数の遺伝子に発現増加が見られた (表 1)。パスウェイ解析を行うと、複数のパスウェイが関連付けられた (表 2)。現在、脳

各部位での解析が進行中である。

MA 図 1 リアルタイム PCR



MA 図 2 変化のあった遺伝子



MA 表 1 変化のあった遺伝子

	2hr / 無処置	機能
Fos	0.9	e. i. gene
Sgk1	1.2	apoptosis
Crem	2.9	
Pim3	0.3	
Rasd1	1.8	細胞内情報伝達
Sult1a1	3.4	
Per1	1.5	rhythmic process

MA 表 2 関連のあるパスウェイ

関連付けられたパスウェイ	
EGFR1 signaling	16
TNF-alpha NF-kappaB signaling	12
Androgen receptor signaling	7
B cell receptor signaling	14
TGF-beta signaling	11
Insulin signaling	13

(5) 研究の問題点と今後の課題

脳機能の測定における問題点：マイクロダイアリシスにおいては神経伝達物質の分泌量が、通常良く調べられている麻薬に比べ非常に小さく、S/N 比を高く取る高精度の測定が必要であり、手術方法と測定方法等に非常な

困難がある。麻酔下では伝達物質の分泌が観察されない。そこで、自律神経系の反応における電気信号の検出において、覚醒下かつ free moving の状態で測定する必要があり、ノイズが極めて多い。質量分析装置による解析には、通常使用される装置で検出が不可能なため、非常に高価なフーリエ変換イオンサイクロトロン型機器により解決される見込みである。DNA マイクロアレイ法については、当初は陽性所見が得られなかったが、マイクロダイアリシスで陽性になった脳のマクソに対象を限定して結果が得られ始めた。生活習慣病の動物を用いた問題点：手術操作においては病態に影響を与える薬剤を使用する必要があり、長い時間の測定中には病状が悪化し測定が継続できないことがある。認知症と施灸の関係について、迷路を用いては妥当な測定が不可能であった。替えて海馬 θ 波測定を行った。論文発表は遅れているが着実に結果が積みあがっており、今期においては複数報の発表を目指している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Funai M, Osuka K, Usuda N, Atsuzawa K, Inukai T, Yasuda M, Watanabe Y, Takayasu M. Activation of PI3 kinase / Akt signaling in chronic subdural hematoma outer membranes. *J Neurotrauma*. 2011; 28, in press.
- ② Nakashima A, Mori K, Kaneko YS, Hayashi N, Nagatsu T, Ota A. Phosphorylation of the N-terminal portion of tyrosine hydroxylase triggers proteasomal digestion of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;407: in press. 査読有
- ③ Nakamura M, Gao S, Okamura H, Nakahara D. Intrathecal cocaine delivery enables long-access self-administration with binge-like behavior in mice. *Psychopharmacology*. 2011;213:119-129. 査読有
- ④ Hasegawa M, Sugiyama S, Yuzawa Y. 他 (15 人中 14 番目). Evaluation of blood purification and bortezomib plus dexamethasone therapy for the treatment of acute renal failure due to myeloma cast nephropathy. *Ther Apher Dial*. 2010;14:451-456. 査読有
- ⑤ Yamamuro T, Senzaki K, Iwamoto S, Nakagawa Y, Hayashi T, Hori M, Sakamoto S, Murakami K, Shiga T, Urayama O. Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat hippocampus enhanced by tickling stimulation with positive emotion. *Neurosci Res*. 2010;68:285-289. 査読有
- ⑥ Matsui T, Yokoyama A, Matsushita S, Mori S, Arai H, Higuchi S, Maruyama K. Changes in the serum bone metabolism markers of elderly alcoholics during abstinence. *J Am Geriatr Soc*. 2010;58:984-986. 査読有
- ⑦ Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Atsuzawa K, Wakabayashi T, Takayasu M. Oxidative stress activates STAT1 in basilar arteries after subarachnoid hemorrhage. *Brain Res*. 2010;1332:12-19. 査読有
- ⑧ Fukasawa M, Atsuzawa K, Mizutani K, Nakazawa (Matsuzawa) A, Usuda N. Immunohistochemical localization of mitochondrial fatty acid beta-oxidation enzymes in rat testis. *J Histochem Cytochem*. 2010;58:195-206. 査読有
- ⑨ Sawada H, Suzuki H, Nagatsu T, Sawada M. Neuroprotective and neurotoxic phenotypes of activated microglia in neonatal mice with respective MPTP- and ethanol-induced brain injury. *Neurodegener Dis*. 2010;7:64-67. 査読有
- ⑩ Matsui T, Higuchi S, Maruyama K. 他 (10 人中 8 番目). Effect of a comprehensive lifestyle modification program on the bone density of male heavy drinkers. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010;34:869-875. 査読有
- ⑪ Kawaguchi K, Kitaguchi N, Nakai S, Murakami K, Asakura K, Mutoh T, Fujita Y, Sugiyama S. Novel therapeutic approach for Alzheimer's disease by removing amyloid beta protein from the brain with an extracorporeal removal system. *J Artif Organs*. 2010;13:31-37. 査読有
- ⑫ Hayashi T, Murakami K. The effects of laughter on post-prandial glucose levels and gene expression in type 2 diabetic patients. *Life Sci*. 2009;85:185-187. 査読有
- ⑬ Takei N, Higuchi S, Kuwano R. 他 (18 人中 8 番目). Consortium for Alzheimer Disease. Genetic association study on and around the APOE in late-onset Alzheimer disease in Japanese. *Genomics*. 2009;93:441-448. 査読有
- ⑭ Osaki Y, Tanihata T, Ohida T, Kanda H, Suzuki K, Higuchi S, Kaneita Y, Minowa M, Hayashi K. Decrease in the prevalence of adolescent alcohol use and its possible causes in Japan: periodical nationwide cross-sectional surveys. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009;33:247-254. 査読有
- ⑮ Sawayama T, Yoneda J, Tanaka K, Shirakawa N, Sawayama E, Higuchi S, Miyaoka H. Assessing multidimensional cognitions of drinking among alcohol-dependent patients: development and validation of a drinking-related cognitions scale (DRCS). *Addict Behav*. 2009;34:82-85. 査読有
- ⑯ Matsushita S, Miyakawa T, Maesato H, Matsui T, Yokoyama A, Arai H, Higuchi S, Kashima H. Elevated cerebrospinal fluid tau protein levels in Wernicke's encephalopathy. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008;32:1091-1095. 査読有
- ⑰ Kitagawa W, Imai H, Komatsuda A, Maki N, Wakui H, Hiki Y, Sugiyama S. The HLA-DRB1*1501 allele is prevalent among Japanese patients with anti-glomerular

basement membrane antibody-mediated disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:3126-3129. 査読有

- ⑮ Ota A, Mori K, Kaneko YS, Nakashima A, Nagatsu I, Nagatsu T. Peripheral lipopolysaccharide administration affects the olfactory dopamine system in mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1148:127-135. 査読有
- ⑯ Miura H, Ozaki N, Sawada M, Isobe K, Ohta T, Nagatsu T. A link between stress and depression: shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression. *Stress*. 2008;11:198-209. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 深澤元晶「施灸による前頭前野と線条体におけるドーパミン分泌」第 116 回日本解剖学会全国学術集会、横浜、2011 年 3 月 30 日
- ② 臼田信光「施灸による体温上昇」第 116 回日本解剖学会全国学術集会、横浜、2011 年 3 月 29 日
- ③ 深澤元晶「施灸による脳内ドーパミン分泌に関するマイクロダイアリシス」*Neuro 2010* (第 33 回日本神経科学学会大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会)、神戸、2010 年 9 月 2 日
- ④ 深澤元晶「施灸によるラット大脳基底核におけるドーパミン分泌」第 25 回日本大脳基底核研究会、福島、2010 年 8 月 1 日
- ⑤ 深澤元晶「施灸による線条体におけるドーパミン分泌」第 115 回日本解剖学会全国学術集会、盛岡、2010 年 3 月 29 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

杉山 敏 (SUGIYAMA SATOSHI)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：50340229

永津 俊治 (NAGATSU TOSHIHARU)
藤田保健衛生大学・医学部・名誉教授
研究者番号：40064802

村上 和雄 (MURAKAMI KAZUO)
国際科学振興財団・バイオ研究所・研究所長
研究者番号：70110517

中井 さち子 (NAKAI SACHIKO)
藤田保健衛生大学・医学部・研究員
研究者番号：30257836

渡 仲三 (WATARI NAKAZOU)
藤田保健衛生大学・医学部・客員教授
研究者番号：40079976

永津 郁子 (NAGATSU IKUKO)
藤田保健衛生大学・医学部・名誉教授
研究者番号：80084573

中原 大一郎 (NAKAHARA DAIICHIROU)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：80128389

樋口 進 (HIGUCHI SUSUMU)
藤田保健衛生大学・医学部・客員教授
研究者番号：40156576

高橋 久英 (TAKAHASHI HISAHIDE)
藤田保健衛生大学・名誉教授
研究者番号：80084606

畑 敏道 (HATA TOSHIMICHI)
同志社大学・文学部・准教授
研究者番号：50399044

林 隆志 (HAYASHI TAKASHI)
国際科学振興財団・バイオ研究所・研究員
研究者番号：80399328

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

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

松沢 綾美 (MATSUZAWA AYAMI)
藤田保健衛生大学・医学部・客員講師
研究者番号：90273078

山崎 将生 (YAMAZAKI MASAO)
藤田保健衛生大学・医療科学部・教授
研究者番号：10192325
(H21、22)

長岡 俊治 (NAGAOKA TOSHIHARU)
藤田保健衛生大学・医療科学部・教授
研究者番号：20021420
(H20)

大河原 剛 (OKAWARA TAKESHI)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：20469034
(H20)

(3) 連携研究者

瀬籾 光利 (SETOU MITSUTOSHI)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(共通施設)・統合バイオサイエンスセンター・准教授
研究者番号：20302664

大須賀 浩二 (OOSUKA KOUZI)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40378013

金子 里奈 (KANEKO RINA)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：70367697