

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 18 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670372

研究課題名(和文) 施灸の脳内神経伝達物質分泌作用の網羅的解析

研究課題名(英文) Detection of function of moxibustion on neurotransmitter secretion

## 研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：灸は経穴に熱刺激を与え、そこから遠く離れた疾患部位へ経絡を介して作用すると解釈されているが、そこには脳における情報伝達が介在すると考えられる。本研究では、施灸に対する反応として脳における神経伝達物質の動態を網羅的に解析するとともに、脳への作用という観点から灸の新規治療応用の提案を試みた。

ラット脳において、施灸によりドパミン神経系が活性化させる知見が得られた。ここから、ドパミン補充効果を期待してパーキンソン病モデル動物への施灸を行った。しかし、有効な治療効果は見られなかった。また、施灸により疼痛関連部位の反応が抑制されたことから、施灸による鎮痛効果が期待された。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of moxibustion treatment has not been clarified. Some effects of moxibustion may be mediated by the neuronal transmission of the brain with various neurotransmitters. In the present study, moxibustion was applied to rats, and their brains were investigated. Moxibustion induced the dopamine release and c-Fos expression in the mesolimbic dopamine system, and showed a positive preference by the conditioned place preference test, suggesting that moxibustion stimulated the activation of the reward system of rat brain.

In addition, we investigated the possibility of the application of moxibustion for treatments of diseases in which the disorder of neurotransmitters was involved. In 6-OHDA rats which had a shortage of dopamine release, no improvement was shown by moxibustion. In pain-sensitive animals to which naloxone was applied, pain-relative areas of brains were inactivated with moxibustion stimulation, suggesting that moxibustion has a possibility of analgesia.

研究分野：神経科学

キーワード：灸 東洋医学 神経伝達物質 報酬系 統合医療 EBM

### 1. 研究開始当初の背景

伝統中国医療（漢方薬、鍼、灸など）は、現代の先進諸国においては補完代替医療として扱われている。近年、鍼の鎮痛効果についてはその分子機構の研究が進んでおり、脳内での内因性オピオイドの分泌や末梢におけるアデノシン分泌が鎮痛効果に関与することが報告されている。一方、灸については広く慢性疾患に有効であるといわれるものの、その作用機序は未だ不明である。我々は動物実験により、施灸刺激について次のことを見出した。(1)ドーパミン神経系を活性化する。(2)報酬特性を有する。(3)前頭前野においてはカテコールアミンやアセチルコチンを分泌させる。従って、施灸は神経伝達物質の分泌を介して前頭前野をはじめとする脳の複数の部位を活性化し、以って施灸のいわゆる「効果」を発現させると示唆される。

様々な脳機能障害において観察される特徴として、神経伝達物質の欠乏がある。パーキンソン病ではドーパミン、うつ病や痛覚過敏ではセロトニンやノルアドレナリン、アルツハイマー型痴呆ではアセチルコリン、てんかん発作ではGABA、アルコール・薬物依存症では内因性オピオイドペプチド、が挙げられる。これらの病態の対症療法として、薬物投与による神経伝達物質の補充や作用増強が行われるが、概して脳内への薬物伝達は血液脳関門の存在により困難であり、また副作用が現れる場合も多い。施灸による神経伝達物質の分泌作用を活用できれば、穏やかな症状軽快効果が得られるのではないかと着想した。

### 2. 研究の目的

施灸に対する脳での生体反応を定量化し、施灸の「効果」を脳の反応から再定義するとともに、脳機能改善の手段として灸を適用する科学的基盤を確立することを目的とした。具体的には以下の3点であった。

(1) 施灸により活性化される脳の部位の同定。

(2) 脳各部位、特に(1)において活性化が見られた部位における神経伝達物質の分泌の測定。

(3) 施灸による脳機能障害モデル動物における機能改善効果の検討。

### 3. 研究の方法

〔施灸法〕モグサ 2mg 15 粒 (計 30mg) を動物の背部 (GV5、懸樞に相当) において 60 分間に断続的に燃焼させた。シャム刺激として綿球による施灸動作を行った。

(1) 正常動物における、施灸による神経伝達物質の分泌とその活性化部位の測定。

〔動物〕Wistar ラット、オス、8~12 週 (体重 200~250g) を用いた。

神経伝達物質の分泌の測定。

マイクロダイアリシスを用いた。内側前頭前野・側坐核・弓状核に透析プローブを刺入し

てリンゲル液を灌流 (流速 1 $\mu$ L/min) し、60 分毎に透析サンプルを回収した。Met-エンケファリン、Leu-エンケファリン、エンドルフィン、GABA について、それぞれ ELISA による測定を試みた。

神経組織の活性化部位の検索。

神経細胞の活性化の指標として c-Fos の発現と局在を免疫組織化学により検出した。

(2) 脳機能障害動物に対する施灸効果の測定。

パーキンソン病モデルラット：

右脳黒質に 6-OHDA を投与して黒質および線条体の TH (ドーパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素) 陽性細胞を破壊して作製した。機能評価はアポモルフィン投与による回転運動の発現 (アポモルフィンテスト)、および実験使用後の TH に対する免疫組織化学により行った。〔評価項目〕線条体におけるドーパミンの分泌、アポモルフィンテストにおける回転変化。

痛覚過敏モデルラット：

正常ラットに エンドルフィンの遮断薬であるナロキソンを注射した後に施灸を行い、脳において c-Fos に対する免疫組織化学を行い、c-Fos 陽性部位を検索した。

### 4. 研究成果

(1) 正常動物における、施灸による神経伝達物質の分泌とその活性化部位。

神経伝達物質の分泌の測定。

マイクロダイアリシスの透析サンプルにおける内性オピオイド (エンケファリン、エンドルフィン) および GABA の測定を ELISA 法 (比色法および蛍光法) により試みたが、安定した数値を得ることができなかった。現在、より安定かつ高感度な測定方法として、GABA については HPLC による測定、内性オピオイドについては質量分析装置による測定を実行中である。

神経組織の活性化部位の検索。

灸刺激個体とシャム刺激個体の脳において c-Fos の免疫組織化学を行い、陽性細胞数に有意差がみられる部位を検索した。現在も解析を継続中であるが、これまでに灸刺激個体における陽性細胞数の増加を見出したドーパミン神経系に加え、大脳皮質における差が示された。体性感覚野においては灸刺激個体で陽性細胞数が増加した一方、近接の運動野では差が見られなかった (図 1)。これは、温痛覚を司る体性感覚野における施灸刺激の受容を示唆するものである。

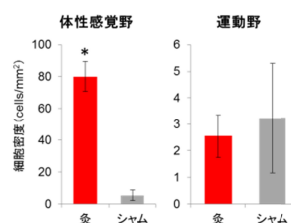


図1) 大脳皮質におけるc-Fos陽性細胞の密度。

(2) 脳機能障害動物に対する施灸効果の測定。

パーキンソン病モデルラット。

パーキンソン病様行動を示した動物(図2)に2週間連続して施灸し、行動の変化を解析した。左回転量の総和における刺激前後の差を比較すると、灸刺激個体とシャム刺激個体で差は見られなかった(図3)。しかしながら、患側において健側より少ないながらドーパミン分泌が残存していた個体に灸刺激を行うと、患側では健側と同様にドーパミン分泌の数時間にわたる増加を示した(図4)。これらの結果は、パーキンソン病治療において、施灸刺激単独では効果は期待できないが、L-dopaなどドーパミン補充療法などと併用することにより薬剤使用量を減少させ、これらの薬剤の副作用の軽減に寄与できる可能性を示唆する。

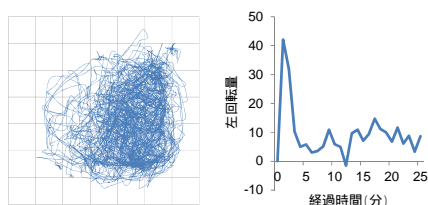


図2) アポモルフィンテストの例。行動の軌跡(左図)とその左方向への回転量(右図)。

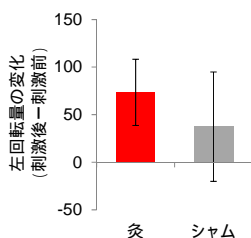


図3) 刺激前後におけるアポモルフィンテストの差。

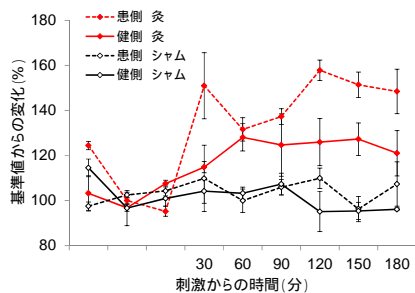


図4) 線条体におけるドーパミン分泌。

痛覚過敏モデルラット。

ナロキソンを腹腔投与(0, 1, 5, 10 mg/kg)した動物に施灸刺激を行い、脳におけるc-Fosの局在を比較解析した。現在も解析中であるが、室傍核、弓状核、分界条床核(BNST)においてナロキソン濃度依存的なc-Fos陽性細胞の増加が見られた(図5)。これらは痛覚刺激に関連する部位であり、ナロキソン存在下では灸刺激が痛覚刺激であったことを示す。ここから、施灸は痛覚を刺激するが内在性オピオイドを介して鎮痛反応が起きている可能性が示唆された。また、これらの部位は慢性ストレスにより惹起される痛覚過敏とも関連

するため、施灸刺激は痛覚過敏における神経細胞の過活性化を抑制できる可能性も考えられる。

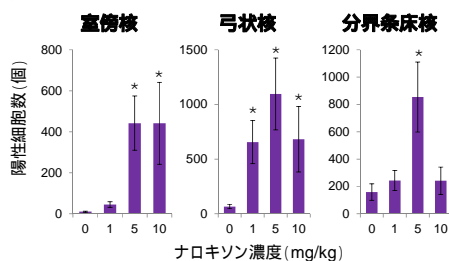


図5) ナロキソン投与における灸刺激とc-Fosの局在。

【本研究の位置づけ】

本研究の結果は、灸治療のエビデンスを提供し、その作用機序の解明に貢献できると考える。灸は鍼と比較して研究が進んでおらず、近年は火傷や煙臭のために鍼灸治療の場においても敬遠されつつあるといわれる。しかしながら、灸は日本において発達した独特な治療法であり、また鍼とは異なり患者が自ら定量的に再現性よく行える貴重な治療法である。灸が西洋医学にも取り入れられ、統合医療におけるセルフメディケーションの一つとして確立されるには、本研究のような西洋科学に立脚した研究が今後に進展することが必要である。

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8件)

Makino K, Osuka K, Watanabe Y, Usuda N(8人中4番). Increased ICP promotes CaMKII-mediated phosphorylation of neuronal NOS at Ser847 in the hippocampus immediately after subarachnoid hemorrhage. *Brain Res.* 7 (1616), 19-25. 2015. DOI: 10.1016/j.brainres. 2015.04.048. 査読有

Tanaka Y, Ito T, Hashimoto M, Fukasawa M, Usuda N, Sano A. Collagen fibers induce expansion of receptive field of Pacinian corpuscles. *Advanced Robotics.* 29(11), 735-41. 2015. DOI: 10.1080/ 01691864.2014.1003194. 査読有

Aoyama M, Osuka K, Usuda N(7人中3番). Expression of mitogen-activated protein kinases in chronic subdural hematoma outer membranes. *J Neurotrauma.* 32(14), 1064-70. 2015. DOI: 10.1089/neu.2014.3594. 査読有

Osuka K, Usuda N (7人中2番). Expression of the JAK/STAT3/SOCS3

signaling pathway in herniated lumbar discs. *Neurosci Lett.* 569:55-8. 2014. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.03.045. 査読有

Osuka K, Watanabe Y, Usuda N(6人中3番). Eotaxin-3 activates Smad through the TGF- $\beta$ 1 pathway in chronic subdural hematoma outer membranes. *J Neurotrauma.* 15:31(16):1451-6. 2014. DOI: 10.1089/neu.2013.3195. 査読有

Ohtake A, Moriyama Y(14人中12番). Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: Exome sequencing for disease gene identification. *Biochim. Biophys. Acta.* 1840, 1355-1359. 2014. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.01.025. 査読有

Uehara N, Mori M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Tamaru S, Kohda M, Moriyama Y(21人中7番). New genetic MT-ND6 and NDUFA1 mutations in mitochondrial respiratory chain disorders. *Annals of Clinical and Translational Neurology.* 1(5), 361-369. 2014. doi: 10.1002/acn3.59. 査読有

Fukao T, Moriyama Y(17人中10番), Usuda N(17人中12番). The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. *J Hum Genet.* 59, 609-614, 2014. DOI: 10.1038/jhg.2014.79. 査読有

[学会発表](計15件)

深澤元晶, 木下雄貴, 中井さち子, 臼田信光. 施灸刺激に対する脳の反応の免疫組織化学的解析. 第65回 全日本鍼灸学会学術大会, 北海道札幌市・札幌コンベンションセンター, 2016年6月11日

深澤元晶, 須崎大地, 臼田信光. ドパミン神経細胞の施灸刺激に対する反応性の組織化学的解析. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会, 福島県郡山市, ビッグパレットふくしま, 2016年3月30日

深澤元晶. 施灸に対する脳反応についての実験的研究. 第1回 東洋医学研究についての解剖学所の集い, 福島県郡山市・ビッグパレットふくしま, 2016年3月27日

深澤元晶, 須崎大地, 木下雄貴, 臼田信光. 高感度免疫組織学CARD法の脳科学への応用: 施灸・ニコチン刺激におけるVTAドパミン神経細胞の解析. 第56回 日本組織細胞化学会総会・学術集会, 大阪府枚方市・

関西医科大学枚方キャンパス, 2015年10月2日

森山陽介, 深澤元晶, 新美元, 臼田信光. 連続スライスSEMと組織化学的手法を用いた三次元超微構造観察技術によるペルオキシソーム分裂・増殖の解析. 第31回医学生物学顕微鏡技術学会, 愛知県名古屋市・名古屋市立大学, 2015年6月20日

深澤元晶, 木下雄貴, 中井さち子, 渡仲三, 臼田信光. 施灸の報酬特性に関する研究. 第64回全日本鍼灸学会学術大会, 福島県郡山市・ビッグパレットふくしま, 2015年5月22日

深澤元晶, 臼田信光, 中原大一郎, 厚沢季美江, 永津郁子, 中井さち子, 渡仲三. 施灸による脳内報酬系の活性化. 第120回日本解剖学会全国学術集会, 兵庫県神戸市・神戸国際会議場, 2015年3月23日

森山陽介, 臼田信光, 深澤元晶, 宮崎直幸, 村田和義. 連続ブロック表面走査型電子顕微鏡(SBF-SEM)を用いた三次元超微構造観察によるペルオキシソーム分裂・増殖の解析. 第130回日本解剖学会全国学術集会, 兵庫県神戸市・神戸国際会議場 2015年3月21日

森山陽介, 厚沢季美江, 榎本早希子, 荒井重勇, 臼田信光. 超高压電子顕微鏡と連続スライスSEMによる細胞小器官の三次元超微構造解析の試み. 第71回顕微鏡学会, 京都府京都市・京都国際会館, 2015年5月13日

Moriyama Y, Miyazaki N, Murata K, Fukasawa M, Usuda N. SBF-SEM observation on histochemically-stained specimens. Three dimensional analyses of peroxisomal proliferations. IGER International Symposium on Frontiers in Biological Research with Advanced Electron Microscope Technologies, Aichi, Nagoya, Nagoya University, Japan, 2015, Jan 15

森山陽介, 臼田信光, 宮崎直幸, 村田和義, 深澤元晶. 組織化学的手法を応用したSBF-SEMによるペルオキシソーム分裂の三次元超微構造観察. 生理研研究会「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用」, 愛知県岡崎市・岡崎コンファレンスセンター, 2014年11月13日

森山陽介, 臼田信光, 深澤元晶, 宮崎直幸, 村田和義. SBF-SEMによるペルオキシソーム増殖の電顕組織化学的観察. 第46

回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、  
東京・TKP市ヶ谷カンファレンスセンター、  
2014年10月18日

深澤元晶、臼田信光、厚沢季美江、古居み  
どり、橋本隆、山口清次、初代培養繊維芽  
細胞のミトコンドリア脂肪酸酸化系の免疫  
組織化学とIVPAによる解析、第55回日本  
組織細胞化学会総会・学術集会、長野県松  
本市・松本市中央公民館、2014年9月27日

深澤元晶、臼田信光、厚沢季美江、古居み  
どり、橋本隆、山口清次、初代培養Sertoli  
細胞の組織化学的特徴とミトコンドリア脂肪  
酸酸化系酵素の免疫組織化学、第55回  
日本組織細胞化学会総会・学術集会、長野  
県松本市・松本市中央公民館、2014年9月  
27日

臼田信光、深澤元晶、厚沢季美江、松澤綾  
美、古居みどり、橋本隆、山口清次、初代培  
養神経細胞および星状膠細胞のミトコンド  
リア脂肪酸酸化系の免疫組織化学と  
IVPAによる解析、第55回日本組織細胞化  
学会総会・学術集会、長野県松本市・松本  
市中央公民館、2014年9月27日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.fujita-hu.ac.jp/lecture/anatomy/II/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

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

### (2)研究分担者

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, Daiichiro)  
藤田保健衛生大学・医学部・客員教授  
研究者番号: 80128389

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

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

(3)連携研究者  
なし