

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07867

研究課題名(和文) 鍼治療に於ける手技(鍼刺激方法)の意義：治療効果との関連の科学的解明

研究課題名(英文) Significance of manipulative treatment of acupuncture as stimulation method: Its scientific relevance to therapeutic effect.

研究代表者

大田 美香(Ohta, Mika)

富山大学・学術研究部医学系・特命助教

研究者番号：20274706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、鍼治療の刺激方法の治療に於ける意義の科学的解明である。我々は、これまでにフェムト秒レーザー鍼と切皮刺激の比較で、治療後の刺激部位の組織形態が類似しているにもかかわらず、骨格筋でのミオスタチン遺伝子発現への影響が真逆になる事を見出した。そこで、様々な鍼刺激方法が引き起こす生体反応の違いを比較解析した。血清クレアチンキナーゼ活性は、単刺群が他群に比べて有意に高値であった。骨格筋ミオスタチンの遺伝子発現は、コントロール群と比較し単刺群、鍼通電群、フェムト秒レーザー群で有意に低かった。これらの結果は、異なる鍼刺激方法が多様な生体反応を引き起こす可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、様々な鍼刺激方法が生体に及ぼす影響を明らかにするため、麻酔下マウスの下腿部に様々な鍼刺激を行い、血清クレアチンキナーゼ活性と骨格筋ミオスタチンの遺伝子発現を指標として比較解析した。マウスの系統や解析手法を同一することで、様々な鍼刺激方法の生体反応についてより正確な解析が可能となった。そして、伝統医学として我が国で発展してきた鍼刺激方法を網羅的に解析することにより、これらの刺激方法の違いを明らかにすることは意義深い。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the significance of acupuncture stimulation in treatment. We have previously shown that myostatin gene expression was not altered in seppi stimulation, but that myostatin gene was expressed lower by femtosecond laser irradiation, which showed a similar histology to that of seppi. Therefore, we analyzed the biological responses induced by various acupuncture stimulation. The serum creatine kinase activity was significantly higher in the tan-shi group than in the other groups. The gene expression of myostatin was significantly lower in the tan-shi group, the electroacupuncture group and the femtosecond laser group compared to the control group. The results suggest that different acupuncture stimulation may induce various biological responses.

研究分野：東洋医学

キーワード：鍼刺激 クレアチンキナーゼ ミオスタチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

鍼治療で用いられる鍼刺激方法の代表的なものには、切皮(せつぴ) 単刺(たんし) 旋捻(せんねん) 雀啄(じゃくたく) 鍼通電、レーザー鍼(低出力レーザー・連続波) フェムト秒レーザー鍼(超短パルスレーザー)等がある。我々は、これまでに鍼通電について骨格筋での効果を遺伝子発現とシグナル伝達系の解析により明らかにし(Pysiol Genomics, 30, 102-110, 2007、Lasers Med Sci, 32, 2167-2171, 2017) 病態マウスモデルへの鍼治療実験で、骨格筋幹細胞の活性化が生じ廃用性筋萎縮の抑制や予防に有効であることを明らかにした(日温気物医誌, 74, 103-111, 2011)。さらに、フェムト秒レーザー鍼を発明し、我が国と米国で特許を成立させた(Appl Phys A, 142, 197-207, 2013)。研究の過程で、我々は鍼刺激した組織の形態が類似しているにも関わらず、鍼刺激方法によって骨格筋でのミオスタチン遺伝子発現への影響が逆になるという、非常に興味深い現象を見出した。このことは、鍼刺激の結果生じた形態学的変化が類似していても、刺激に対する生体の反応が異なることを示唆する。鍼刺激方法ごとに生体への効果が異なることは、我が国の鍼治療の特徴である多種類の鍼刺激方法(手技)の治療上の存在意義ではないかとの着想を得た。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、鍼治療で用いられる刺激方法の治療上の意義の科学的解明である。鍼刺激方法による効果の評価法を確立し、鍼刺激方法と治療効果の関係を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験

8週齢のC57BL/6系雄性マウス(日本チャールズリバー(株) 神奈川)を7群(1群、約5匹)に分けた。全マウスに麻酔した後、下腿部を脱毛し、様々な鍼刺激を下腿三頭筋に行なった。

コントロール群は無刺激とした。

単刺群では、ステンレス鍼(直径0.16 mm)を骨格筋まで刺入し、182ヶ所に刺入した。

鍼通電群では、針電極低周波治療器を用いて1.2Hz、15分間の刺激を行った。

フェムト秒レーザー群では、フェムト秒レーザー照射装置を用いて、300  $\mu$ J/pulse、150 fsの照射を652ヶ所に行った。

切皮群では、ステンレス鍼(直径0.16 mm)を用いて真皮まで刺入し、30ヶ所に行った。

切皮・旋捻群では、切皮後にステンレス鍼を左へ10回転と右へ10回転を1セットとし、30ヶ所に刺激した。

切皮・筋膜上旋捻群では、筋膜上までステンレス鍼を刺入し左へ10回転と右へ10回転を1セットとし、30ヶ所に刺激した。

本研究の動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」や「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(日本学会議)に基づき、神戸大学動物実験委員会(承認番号P080913号、P160208号)、筑波大学動物実験委員会(承認番号07-037号)、奈良先端科学技術大学院大学動物実験委員会(実験承認番号113号)、茨城大学動物実験委員会(承認番号19070号)の承認を得て、適切に実施した。

### (2) 解析方法

様々な鍼刺激を行なった5時間後、麻酔下のマウスから採血し、下腿三頭筋を含む組織の摘出を行い、解析に供した。血清クレアチンキナーゼ活性については、全血から血清を分離し、JSCC Transferable Methodを用いて測定した。ミオスタチン遺伝子の発現解析では、マウス骨格筋か

ら全 RNA を抽出し cDNA を合成した後、既報に従いリアルタイム PCR 法で解析した (Lasers Med Sci, 32, 2167-2171, 2017)。組織解析については、摘出した組織をホルマリン固定した後に Hematoxylin Eosin 染色を行った。

### (3) 統計解析

全ての結果は、平均値 ± 標準偏差で示した。一元配置分散分析では、Tukey-Kramer 法で多重比較を行った。全て 5%未満を有意水準とした。

## 4. 研究成果

### (1) 血清クレアチンキナーゼ活性

血清クレアチンキナーゼ活性は、単刺群が他群に比べて有意に高い活性であった (図 1)。単刺群以外のグループはコントロール群と同じレベルであった。単刺群では骨格筋の損傷程度が大きく、他群では損傷程度が小さいことを示した。

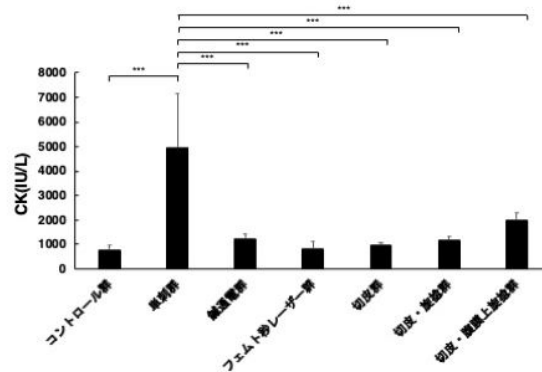


図1 血清クレアチンキナーゼ  
\*\*\* p<0.001

### (2) 骨格筋ミオスタチンの遺伝子解析

ミオスタチンの遺伝子発現では、コントロール群と比較すると、単刺群、鍼通電群、フェムト秒レーザー群で有意に低値であった (図 2)。

我々は、これまでにミオスタチンの遺伝子発現が低下すると、mTOR/S6K シグナル伝達系が活性化し、タンパク質合成が亢進する可能性を報告した。これまでの研究成果と今回の結果から、mTOR/S6K シグナル伝達系を介する刺激法は、単刺群、鍼通電群、フェムト秒レーザー群である可能性を示した。

### (3) 組織解析

フェムト秒レーザー群、切皮群、切皮・捻捻群で組織損傷が皮膚に認められたが、骨格筋の損傷は観察されなかった。

以上の結果をまとめると、単刺群と鍼通電群では血清クレアチンキナーゼ活性が高く、ミオスタチン遺伝子の発現が低下した。一方、フェムト秒レーザー群では血清クレアチンキナーゼ活性はコントロール群と同程度であったが、ミオスタチン遺伝子の発現が低下した。さらに、フェムト秒レーザー群は切皮群と切皮・捻捻群の組織像と類似しているにも関わらず、ミオスタチン遺伝子の発現の変化は逆になるという結果であった。以上の結果は、鍼刺激方法が違つと異なる生体反応が誘導される可能性を示した。

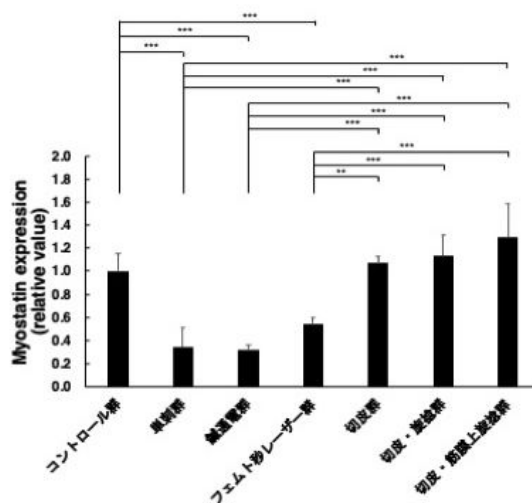


図2 ミオスタチン遺伝子発現  
\*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001

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 Takaoka Yutaka, Ohta Mika, Tateishi Satoshi, Sugano Aki, Nakano Eiji, Miura Kenji, Suzuki Takashi, Nishigori Chikako	4. 巻 9
2. 論文標題 In Silico Drug Repurposing by Structural Alteration after Induced Fit: Discovery of a Candidate Agent for Recovery of Nucleotide Excision Repair in Xeroderma Pigmentosum Group D Mutant (R683W)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 249 ~ 258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines9030249	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大田美香
2. 発表標題 分子エビデンスが示す老年患者と鍼治療
3. 学会等名 第71回 全日本鍼灸学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大田美香、奥野海良人、高岡裕
2. 発表標題 異なる鍼刺激方法が多様な生体反応を誘導する
3. 学会等名 第87回日本温泉気候物理医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大田美香、高岡 裕
2. 発表標題 ミオスタチン遺伝子発現を指標にした手技による効果の違いの解析
3. 学会等名 第69回全日本鍼灸学会学術大会
4. 発表年 2020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	高岡 裕  (Takaoka Yutaka)  (20332281)	神戸大学・医学部附属病院・准教授   (14501)	
研究分担者	鈴木 高史  (Suzuki Takashi)  (70305530)	神戸常盤大学・保健科学部・教授   (34535)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------