

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2006年 2月 26日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 馮起国  (印)

指導責任者名： 稲葉 裕 職名： 教授
順天堂大学大学院医学研究科疫学環境医学

所属機関名： _____
〒 113-8421

所在地： 東京都文京区本郷2-1-1

電話： 03-5802-1047 内線： 3532

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

運動負荷によるストレス蛋白質発現の変化に関する疫学・環境医学的研究

3. 成果の概要（100字程度）

中医学におけるストレス蛋白質の疫学的研究をまとめた上、ラット「足三里」ツボに針灸、中薬の投与、極限水泳の運動により、臓器筋肉HSP72発現に及ぼす影響を検討した。成果①HSP72はラットの大脳前頭葉、肝臓、脾臓及び下腿骨格筋では広く発現された。②針刺激は灸刺激と中薬より、HSP72への誘導が著しい。③針灸と中薬がストレスと運動系統の疾患を治療するメカニズムはHSP発現に影響を及ぼすことに関わると考えられる。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (有) (学会名・演題)

第70回日本民族衛生学会総会 2005年11月18日口演 東京池袋明日館
「漢方医学における熱ショック蛋白質の研究」 民族衛生第71巻付録 74～75ページ

順天堂大学医学部衛生学教室抄読会 2005年12月3日口演 順天堂大学5号館3F会議室
「健常ラットのHSP発現に対する刺針、艾灸と漢方薬の影響」

(2) 発表した論文 (無) ・ 有 (雑誌名・題名)

運動負荷によるストレス蛋白質発現の変化に関する疫学・環境医学的研究

研究者氏名 馮 起国
中国所属機関 遼寧中医学学院
日本研究機関 順天堂大学大学院医学研究科
指導責任者 教授 稲葉 裕

要 旨

本研究では、インターネットによる文献検索を行い、中医学におけるストレス蛋白質の疫学的研究を検討したうえで、ラットの「足三里」ツボに対する針刺、艾灸及び四君子湯の経口投与、極限水泳運動などにより、その全血乳酸値、臓器と骨格筋のHSP72発現に施した影響を観察した。針刺、艾灸と中薬療法が、いずれも中医学範疇に属し、数千年の歴史にわたって、人々に利用されている。その治療効果のメカニズムについて、明らかにならないところがまだまだ多いようである。本研究の目的は、細胞分子生物学レベルから「蛋白質の一生と伴っているシャペロンとして細胞内の手厚い総合社会保障システムを営む」と言われるストレス蛋白質(熱ショック蛋白質)を主な指標として、針刺、艾灸と中薬療法による治療メカニズムとストレス蛋白質との相関性を検討することである。結果としては、①健常ラットでは、HSP72の誘導が心臓左室筋、大脳前頭葉、肝臓左葉及び骨格筋に発現された；②運動群ラットの全血乳酸が倍以上増え、運動により、大脳前頭葉と脾臓と肝臓左葉のHSP72の誘導発現が増強されたが、心臓のほうがはっきり誘導されない。骨格筋に対して、ただヒラメ筋のHSP72の誘導発現が増強されたが、前脛骨筋と足底筋のほうがやや下がった；③針刺により、心臓のほかの臓器と足底筋のHSP72の誘導発現が強くなった；④艾灸により、大脳前頭葉と肝臓左葉及び前脛骨筋の誘導が強くなった；⑤漢方四君子湯には、大脳前頭葉のHSP72が多く誘導されたが、艾灸漢方群は、前脛骨筋からの誘導が一番強くなった。上述のように、針刺も艾灸も中薬四君子湯もいずれもHSP72を異なる程度に誘導でき、臨床において、三者はストレスによる疾患及び運動疾患に対して優れた治療効果を果たすメカニズムの一つとしては、HSP発現に影響を及ぼすことが関係していると考えられる。

Key Words ストレス蛋白質, ラット, 運動負荷, 針刺, 艾灸, 漢方薬

緒 言:

人体細胞の中では、通常ポリペプチド鎖開始複合体を介して蛋白質の合成誘導が活発に行われている。一方、細胞が発熱(熱ショック)状態に曝されると、その蛋白質の合成誘導はほぼ完全に抑制される。細胞内の蛋白質は一般的に熱に弱く、熱ショック環境下では固有の立体構造が変化し、生理機能が低下したことになる。このような熱変性した蛋白質がそのまま放置されると、互いに凝集塊を形成し、細胞は危機的状态を呈する。熱ショック環境下で、通常蛋白質の合成誘導が抑制されるとともに、顕著に合成が誘導されてくる蛋白質群がある。即ち、熱ショック蛋白質(heat shock proteins; HSP)と呼ばれ、分子量(kDa)によりHSP70やHSP90など十数種類が報告された⁽¹⁾。

HSPの発現は、熱以外のストレス、例えば、有害な重金属・放射線・代謝阻害物質・虚血・酸化ストレス・運動・グルコース飢餓・pHの低下などによっても誘導されることが明らかにされた。ゆえに現在では広くストレスタンパク質(stress proteins; SP)と呼ばれている。HSPの多くはストレスに対する細胞の応答として発現するばかりでなく、実は非ストレス下においても構成的に発現していて、細胞の分化、増殖、生存、機能など様々な細胞の営みに必須の蛋白質であることが判明してきている⁽²⁾。

伝統的な中医学理論を科学化するため、現代科学の理論と方法により実証される必要がある。本研究は、EBM(エビデンス)を基準として分子生物学の方法と技術を利用して健常ラットに対して針刺、艾灸、四君子湯(漢方薬の煎じ剤)及び運動負荷を与えて、その全血乳酸と骨格筋・心臓・肝臓・脾臓・大脳などの組織HSP72の発現に及ぼす影響という観点から、針刺、艾灸と四君子湯の効能メカニズムを解明することを目的とする。

対象と方法：

「対象」wistar ラット♀(メスは体重の変わる幅が小さい)、生後6週齢、各群n=6、開始時の体重122.46±16.86g。

本実験は、日本生理学会の制定された『生理学領域における動物実験に関する基本的指針』を守って行った。

「方法」1、実験群分けと操作

対照群—①健常群—なにも処理しない。

②固定群—ラット固定器による固定10min。

処理群—①艾灸群—ラット固定器による固定10min+後肢両側の足三里に長生灸2壮、2ml食塩水の経口投与。

②漢方群—ラット固定10min, 2ml四君子湯の経口投与。

③艾灸漢方群—ラット固定10min, 後肢両側の足三里に艾灸+2ml四君子湯の経口投与。

④運動負荷群—運動負荷(1w)—1日目はトレッドミルによる運動負荷：300r/25~30min。

2日目から7日目まで、32~35℃の温水プールで水泳負荷30min。

⑤針刺群—ラット固定器による固定10min+後肢両側の足三里に針刺、2ml食塩水の経口投与。

2、四君子湯の精製

①処方：人蔘+白朮+茯苓各9g+甘草6g=33g、1日2回の服用量/大人

②経口投与：2ml

③精製：生薬99g=人蔘・白朮・茯苓各27g、甘草18gを取って、浸泡・水煎・濾過・濃縮して100%濃度の煎じ液100mlを精製して、冷却後4℃冷蔵。

3、採血とサンプリング(組織の摘出)

実験8日目にネプタール麻酔注射液(大日本製薬株式会社出品)を0.2ml腹腔注射する。胸腔と腹腔を広げて腹腔の右下静脈から1.0~3.0mlぐらい採血するし、心臓・肝臓左葉・脾臓・大脳及び前脛骨筋・ヒラメ筋・足底筋・長趾伸筋を取って重さを計った後、液体窒素にて瞬間凍結して-84℃保存。

4、測定

①乳酸の測定—BIOSEN5040 乳酸測定装置を用いて固定化酵素法により測定する。

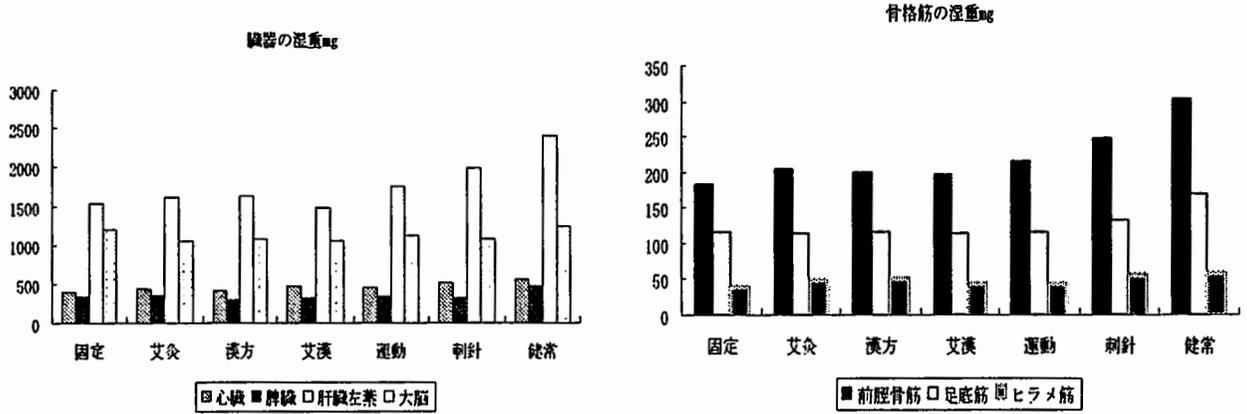
②HSP72 の測定—サンプルのホモジネート(homogenate)後、日立分光光度計(HITACHI u-2000 specerophotometer)により、蛋白質の総濃度を測定する。さらに BIO RAD Power/pac 200 により電気泳動、転写、免疫染色、脱イオン水の洗浄後、できたメンブレンをスキャンして NIH image ソフトにより HSP72 の発現量を評価した。

5、統計処理

データはすべて平均値 means±SD で示す。群間における有意差の検定には、SPSS of windows11.01J により処理され、有意水準は P<0.05 を設定する。

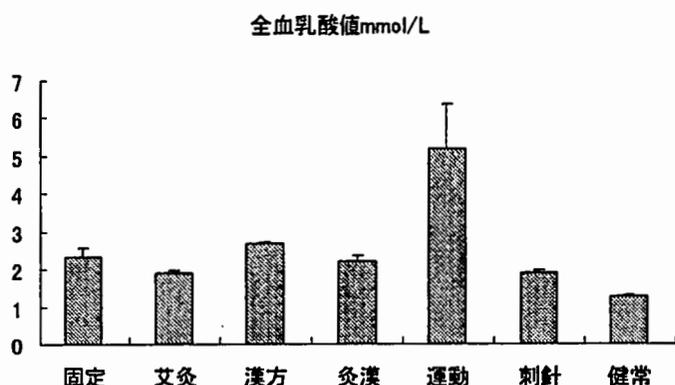
結果：

1、臓器と骨格筋の湿重



上図のように、一週間の実験期間では、臓器と骨格筋の湿重はわりあい安定している。健常ラットだけ、ちょっと重くなる。

2、全血乳酸値

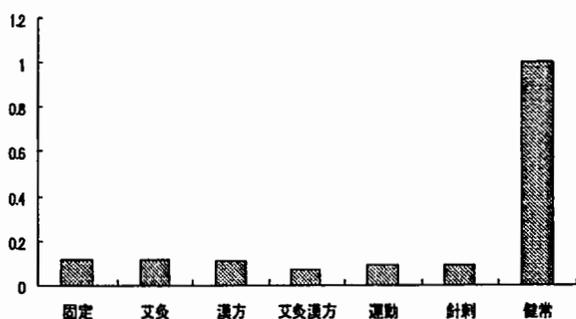


健常群(1.27±0.035)と比べて、他の群がすべて上がったが、運動群(5.2±1.17)が一番高くなり、他の群と有意差がある(運動群 or その他 P<0.05)。

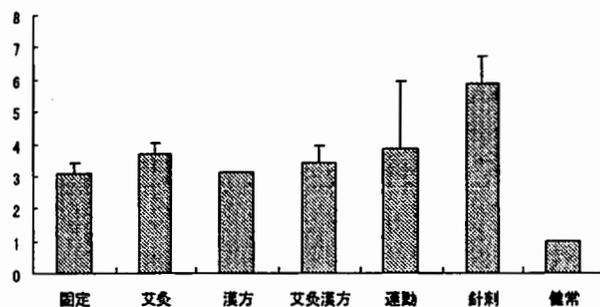
3、HSP72 に対する誘導発現

3.1 臓器における HSP72 の発現

心臓左室筋のHSP72発現

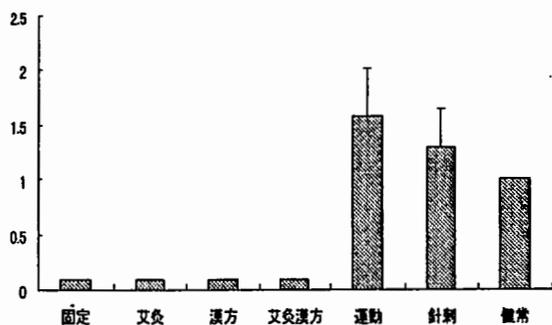


肝臓左葉のHSP72発現

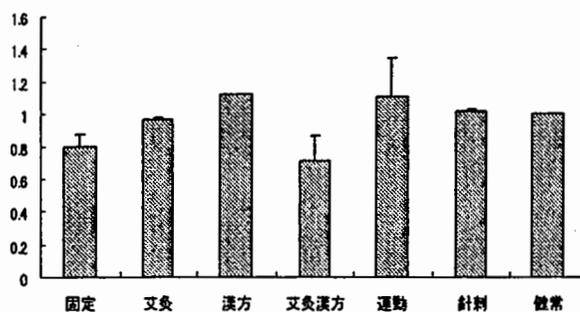


心臓では、健常群のほか、殆ど誘導されなかった。逆に肝臓では、どっちでも強く誘導され、中で刺針のほうが一番著しい(刺針 or その他 P<0.05, 刺針 or 健常 P<0.01)。

脾臓のHSP72発現

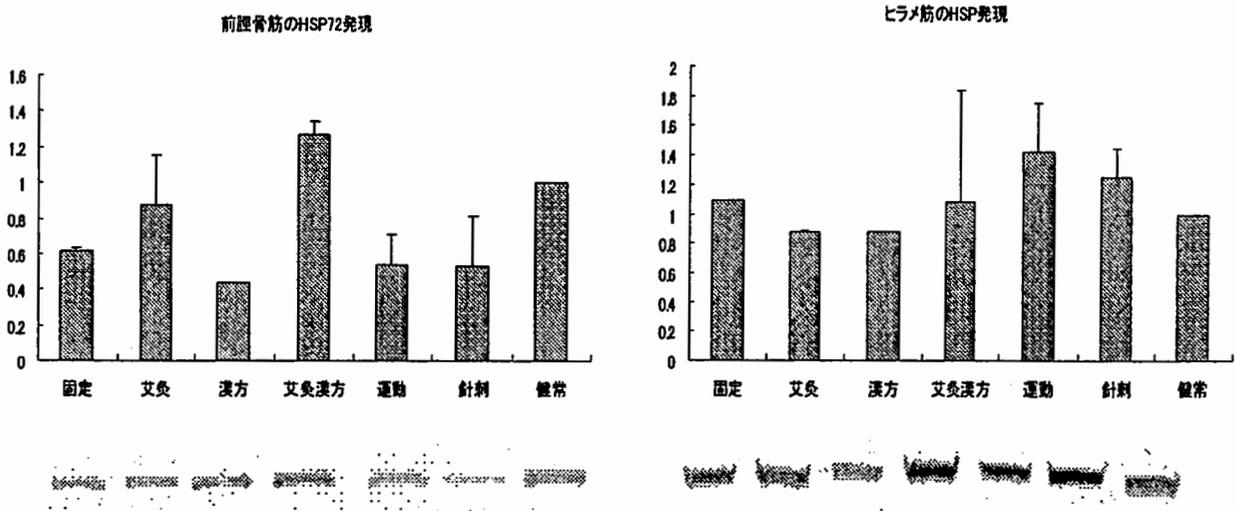


大脳前葉のHSP72発現

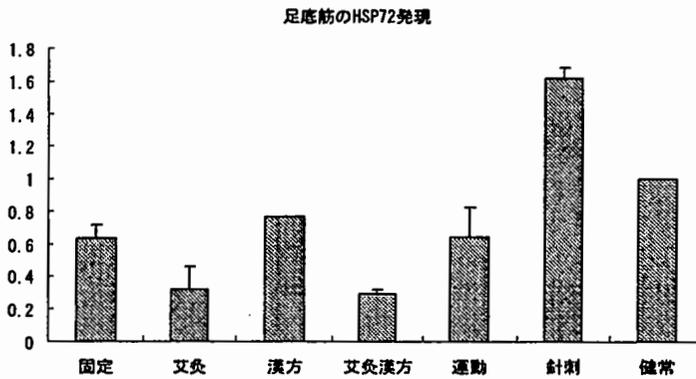


脾臓では、電気泳動を3回繰り返したが、ただ運動群と刺針群と健常群が発現されたが、ほかはされなかった。運動群と刺針群が発現増強である。大脳なら、各群も誘導されたが、健常群と有意差はない。

3.2 骨格筋における HSP72 の発現



前脛骨筋では、艾灸漢方群のほかに健常群より誘導が弱いと考えられる。ヒラメ筋では、運動群と針刺群の誘導が結構強く発現されたが、艾灸群はちょっと弱い誘導であった。



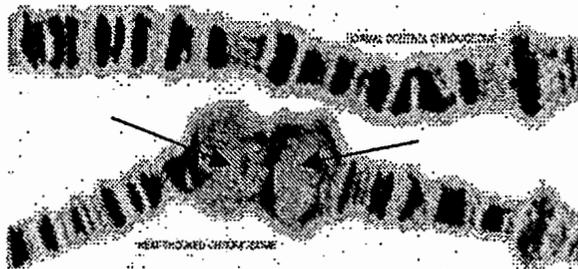
足底筋では、針刺群が他の各群と有意差がある ($P < 0.05, 0.01$)。ほかは健常群より弱いですが、その中で、艾灸群と艾灸漢方群がほぼ一致で、もっとも誘導が弱いである。

考 察:

1、ストレス蛋白質

1.1 熱ショック応答の発現

Ritossa は、ショウジョウバエの幼虫 (その唾液腺組織) を通常の培養温度 (25 °C) から高温 (30°C) に短時間 (30 分間) さらすと、唾液腺多糸染色体の幾つかの特定部位に膨らんだ構造 (パフ、puff, この区域の遺伝子転写が増強) が新たに誘導されることを観察し、1962 年に報告した (下の図の矢印) ⁽³⁾。このパフの生成は一過的で、温度が下がると消失した。一方、通常温度で存在したパフは、このような「熱ショック」により観察されなくなった。



(Ritossa, *Experientia* 1962)

1.2、ヒートショックプロテイン (Heat Shock Protein: HSP)

HSPとは熱ストレス(通常より3~5°C上がるとか、或いは40°C以上)によって細胞内に誘導される蛋白質。1974年に Tissieres が熱ショックによりショウジョウバエの染色体内に遺伝子の転写が増強され、6種の新しい特異的タンパク質(HSP)が合成されることを報告した⁽⁴⁾。その他のストレス(重金属、放射線、代謝阻害物質、虚血、酸化ストレス、グルコースとアミノ酸の飢餓、PH低下、運動など)によっても誘導されるため、ストレスタンパク質(stress proteins; SP)とも呼ばれ、細胞レベルでのホメオスタシスを維持する働きを持つ。

1.3、HSP70の役割

I. 分子シャペロン Chaperone—Pelham が1986年に提出した分子シャペロン理論により、HSP70が蛋白合成や高次構造の形成の品質管理、膜の通過と輸送、活性の制御と維持、また蛋白質分解過程などにおいて、蛋白質の正しい畳み込みを介助する⁽⁶⁾。

II. 防御—ストレスによる蛋白質の凝集を抑制できる。

III. 修復—ストレスによる蛋白質の損傷を修復できる。

IV. ストレス耐性と交差耐性

「ストレス耐性とは」—あらかじめ非致死的な熱ストレスを加えること(プレコンディショニング)によってHSPが増大した細胞では、その後に与えられる致死的な熱ストレスに対してその細胞の傷害の程度が小さくなる。

「交差耐性とは」—あるストレスに対する抵抗性を獲得すると、他のストレスに対しても同様に抵抗性が高まる性質である。短時間に一過的心筋虚血が心筋梗塞に予防するのみでなく、脳梗塞にも予防作用を現わす⁽⁵⁾。

2、中医学におけるストレス蛋白質の疫学的研究

近年来、熱ショック蛋白質(HSP)が「分子シャペロン」として、人体生命の機能単位であるタンパク質の一生において、重大な品質管理の役目を果たしているため、世界では研究ブームになっている。

2.1、中薬療法 広州中医薬大学の王洪琦氏は、白虎湯と黄連解毒湯を投与して熱ショックラットの肝臓、肺臓組織HSP発現の増加を誘導でき、細胞の耐性を高めることにより細胞の損傷が避けられる結果である(広州中医薬大学学报)。武漢市中医医院の崔金濤氏は、三七五参湯を投与して心筋虚血損傷に対する拮抗作用とHSP70発現が正比例に関係していると報告した(中国心血管病研究雑誌)。北京中医薬大学の郭順根氏は、活血化瘀類の補肝中薬を投与して肝障害ラットの肝臓HSP70の発現が増大して、肝障害も一定な程度で回復したと報告した(中国組織化学と細胞化学雑誌)。武警湖北総隊医院の李長軍氏は、健脾益気中薬を消化性潰瘍患者さんに投与してヘリコバクターピロリ菌を取り除いたほかに、HSP60の発現も増える効果があると報告した(中国臨床医学)。謝建軍氏は、砂地ネズミに脳虚血再灌流して48h後、HSP70の発現が顕著に増強して、補陽還五湯を投与してHSP70の転写を明らかに抑制した他に、その翻訳も軽度により下げることにより、脳虚血損傷後の神経機能を保護すると報告した(中西医结合心脑血管病雑誌)。日本中部大学の戴研氏は、シャペロン誘導剤としての芍薬などの漢方薬によるHSP誘導を研究した(日本ハイパーサーミ学会誌19、20巻)。日本東京大学の富井明望氏は黄芩、紅花、烏薬を常法で抽出して飲料水として動脈硬化モデルマウスに自由に摂取させ、HSP60を免疫することにより血管内皮に産生され、動脈硬化を促進する作用を持つ抗HSP60抗体の産生を拮抗する効果が漢方生薬特に烏薬によって抑制され、動脈硬化の進行を抑制したと考えられる(日本未病システム学会雑誌8巻2号)。日本順天堂大学 JinGuang-Bi氏はヒト活性化T細胞を使って233種類の漢方薬について、HSP70発現量のスクリーニングを行い、1.5倍以上の増加傾向が濃度依存性から認められた生薬は、紅花・山茱萸・山査子・瞿麦・甘遂・黄芩・香鼓であった。そのうち、いくつかの生薬もHSPの発現量をコントロールできる活性があることは証明され、HSP系の関与する様々な疾患の治療などに応用できる可能性が示された(和漢医薬学雑誌19巻6号)。日本横浜市立大学の関口由紀氏は、前立腺肥大症患者における八味地黄丸の抗HSP60抗体への影響を研究した(日本東洋医学雑誌49巻6号)。

2.2、針灸療法

湖南中医学院の彭艶氏ら及び北京中医薬大学の李曉泓氏は、針灸で人体のツボを刺激して、針灸ストレス状態になって一定量のHSP70発現が誘導されて、人体の抵抗能力と免疫力が強められ、疾患の予防と治療に重要な役

に立つと考えた(中華実用中西医雑誌、上海針灸雑誌)。天津中医学院の馬岩璠氏は、「醒腦開竅針刺法」を使って実験性脳梗塞ラットの梗塞区皮質、線条体及び海馬の HSP 発現を増強して、通常の針刺法より脳虚血後の細胞への保護作用が優れていると示された(中国針灸)。重慶市第 1 人民医院の王渝蓉氏は、電気針でラット両側の「合谷」穴を打ち、局所性脳虚血 3h、再灌流 3h と 6h の HSP70 発現を仮手術群より顕著に増加したのは、脳虚血再灌流による損傷を回復するメカニズムであると考えた(重慶医科大学学報)。天津中医学院の樊小農氏は、内頸動脈に自体血栓を注射してラットの多発性梗塞性痴呆(MID)モデルを作成して、大脳皮質と海馬、線条体、間脳などの部位の細胞死亡が見られて、針刺群で人中と内関、風池などのツボに刺して、その部位の細胞死亡がコントロール群より顕著に低くなったし、HSP70mRNA の発現もコントロール群より顕著に高くなったと報告した(中国中医基礎医学雑誌)。上海第二医科大学の王祥瑞氏は、電気針で心臓手術を受ける患者 28 例の心筋細胞 HSP70mRNA の発現をコントロールより大いに増加したと報告した(中国針灸)。河南医科大学の王一菱氏は、針刺が無菌パラフィン油を注射したマウス腹腔マクロファージの HSP 70、iNOS(誘導性一酸化窒素)及びその iNOSmRNA の発現を顕著に高めたと報告した(解剖学報)。日本では、Kobayashi, K. がラット腰の筋肉に灸刺激し、筋肉内温度は 15 分の間 40℃に保たれた。ラットは深麻酔をうけて殺され、刺激の 3h と 24h 後に、筋組織は直ちに切除された。蛋白質は刺激されたラットと制御ラットの均質にされて遠心分離機で分離された組織から引き抜かれた。蛋白質の二次元のゲル電気泳動は、実施された。70,000、85,000(hsp 85)と 100,000(hsp 100)の分子量による hsp は、灸によって刺激の 3 時間後に殺されるラットで見つけられた。蛋白像は分析され、hsp の比率は得られた。施灸と分子シャペロン機能の発生、細胞内輸送の活性化、局所炎症におけるサイトカイン・HSP・酵素ラジカル(遊離基)との関連性などが示唆される⁽⁷⁾。

上述のように、漢方薬は解熱、抗心筋虚血、抗動脈硬化、抗脳虚血、抗潰瘍、補肝などの様々な薬理作用を持ち、針灸療法も鎮痛麻酔、安静安神、抗菌抗炎症、抗アレルギー、免疫力増加などの多種作用を持ち、その作用のメカニズムの一つとしては、細胞 HSP の発現に影響を及ぼすものである。

まとめ：

- 1、臨床において、漢方薬療法と針灸療法はストレス損害に対して優れた効果を果たしたことが明らかになった。それ効果を果たすメカニズムの一つとしては、HSP の発現に影響を及ぼすことに密接に関わっていると考えられる。
- 2、運動と比べて、針刺、艾灸、中薬四君子湯により、臓器と骨格筋の HSP72 の誘導発現が著しく増強されてないであるが、艾灸により大脳前葉と肝臓左葉及び前脛骨筋の誘導が強くされた。漢方四君子湯により大脳前葉の HSP7 が多く誘導されたが、艾灸と漢方の合わせる群は、前脛骨筋からの誘導が一番強くなった。
- 3、異なる病理状態により、HSP 発現が増強したり減弱したりすることから言えば、中薬療法も針灸療法も両方向の良性調節作用がありそうである。

参考文献：

1. 内藤久士：細胞レベルでのストレス応答—ストレスタンパク質の発現と機能, 体力科学 vol153, 455~460(2004)
2. Sorger PK. et al : Nature vol329, 81~84(1987)
3. F. Ritossa : Experientia vol18, 571~573(1962)
4. Pelham HRB : Cell vol46, 959(1986)
5. 内藤 久士 : 身体活動とストレス蛋白質 日本臨床 vol158 (増刊号), 97~101 (2000)
6. 馮 起国 : 熱ショック蛋白 医学綜述 vol4, 468~469 (1998)
7. Kobayashi, K : Induction of Heat-Shock Protein(hsp)by moxibustion Am. J. Chin. Med. vol23, 3~4(1995)

注：本研究は、2005年11月18日『第70回日本民族衛生学会総会』にて口演発表

『民族衛生』(2005年11月 vol 71 巻付録)に掲載

2005年12月3日『順天堂大学医学部衛生学教室抄読会』にて口演発表

作成日：2006年2月28日