

エラスターゼ誘発性COPDモデルマウスの 疲労・倦怠感に対する人参養栄湯の効果

クラシエ株式会社 漢方研究所
河辺 ももこ、下山 泰輝、杉野原 武史、道原 成和、千葉 殖幹



イントロダクション

慢性閉塞性肺疾患(COPD: Chronic obstructive pulmonary disease)は、たばこ煙を主とする有害物質を長期吸入曝露することで生じる肺の炎症性疾患である^{1, 2)}。近年、COPDでは呼吸困難や咳、痰といった肺局所の症状に加えて、呼吸器状態の悪化を背景に、うつなどの精神症状や重度の疲労・倦怠感などの関連症状を併存するケースが多いと報告されており、全身性の疾患として捉えられている^{3, 4)}。

特に疲労・倦怠感は、COPD症状の実感として、呼吸困難に次いで2番目に多い症状であり、毎日または週に数日の疲労感や全身の倦怠感を訴える患者は47~71%に上る^{5, 6)}。また患者には、COPDが健康と日常生活に与える影響の評価を目的として、COPDアセスメントテスト(CAT)が実施されるが、他の項目に加えて疲労・倦怠感が関連する“まったく元気がない”“家での普段の生活が非常に制限される”などの項目を含むスコアが高値を示し、日常のQOLが低下していることが明らかとなっている^{5, 7)}。COPD病態においては、肺や気管支の機能障害から呼吸困難が引き起こされ、その結果、身体活動に対する負荷が大きくなり、炎症状態とも相まって、軽い活動負荷でも疲労・倦怠感が容易に出現し、その回復も遅延する。また生じた疲労・倦怠感は、COPD病態の改善に有効な身体活動を行う意欲をさらに削ぐため、病態は悪循環を辿る。このためCOPD患者で出現しやすい疲労・倦怠感を制御する方法や薬剤が求められる^{6, 8, 9)}。しかし、現在COPD患者の疲労・倦怠感に対しては、呼吸状態を改善する酸素療法や気管支拡張薬といった薬物投与、呼吸法の改善、食事療法などの方法が取られているが、十分な効果が得られているとは言えず、直接的な介入が必要とされる。

本研究では、疲労倦怠を効能にもつ人参養栄湯に着目した。人参養栄湯(NYT)は体力の低下した患者に用いる補剤であり、補剤の中でも呼吸器系の疾患に強い処方とされている^{10, 11)}。さらに近年、老化や様々な疾患に伴う疲労について、人参養栄湯の基礎研究が進み、運動持続時間の延長や自発運動量の増加など抗疲労効果が示唆されている¹²⁻¹⁴⁾。また、臨床においても、抗がん剤の副作用による疲労や術後の疲労・倦怠感を改善することも報告されてい

る^{15, 16)}。そのため、人参養栄湯はCOPD患者で頻発する疲労・倦怠感にも有効である可能性がある。

そこで、本研究ではエラスターゼ誘発性COPDモデルマウスに運動負荷を与えることで、疲労・倦怠感が出現する状態を模したモデルを作製し、人参養栄湯の疲労・倦怠感に対する有効性を検討した。

実験方法

実験スケジュールを図1に示した。5週齢(雄)のC57BL6/Jマウス(ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社)を導入し、13日間馴化した。馴化後17日目に、porcine pancreatic elastase(エラスターゼ、PPE、4.0U/mouse、富士フィルム和光純薬株式会社)を気管内投与により直接肺に投与することでCOPDの病態に類似した気腫性モデルを作製した。馴化後22日目からは、人参養栄湯を投与したが、本研究では、Zhangらの方法を用いて、ヒト等価用量の人参養栄湯(45mg/匹/day)をゲルに混合して短時間で自然摂食を介して投薬する方法を用いた¹⁷⁾。本試験は、健常群(ビヒクルゲル)、モデル群(エラスターゼ投与、ビヒクルゲル)、人参養栄湯(NYT)群(エラスターゼ投与、人参養栄湯混合ゲル)の3グループで実施した。実験スケジュールは人参養栄湯投与35日目に強制水泳試験を実施し、その後の自発運動量を測定した。さらに、人参養栄湯投与36~37日目には、強制水泳から1日後の自発運動量を測定した。また、人参養栄湯投与38~39日目には営巢行動試験を実施した。

試験期間中、マウスは室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、8:00点灯、20:00消灯の12時間サイクルで飼育した。試験期間中、水と餌(MF固型飼料:オリエンタル酵母工業株式会社)は自由に摂食させた。馴化から試験終了まで

図1 実験スケジュール



は1匹ずつ個別のケージで飼育した。

得られたデータ値は平均値±標準偏差で示した。群間における有意差検定はTukey testを用い、危険率が5%未満($p < 0.05$)の場合を有意差ありと判断した。

運動負荷時の遊泳行動：強制水泳試験

強制水泳は、一般的には早期の諦めなどの抑うつ状態を評価する試験であるが、運動負荷中の疲労を評価する試験としても用いられている^{18, 19)}。そこで、疲労評価時の運動負荷として、強制水泳試験を実施した。透明アクリル製円筒容器(Φ19×H25cm)を用いて、水深16cmの水浴(26±1℃)を準備した。その中に1匹ずつマウスを計7分間に入れ、行動を観察した。2分間馴致させた後、5分間について遊泳時間を目視で測定した。

運動負荷後の自発運動量

運動負荷後と運動負荷から1日後の自発運動量を、スーパーメックス(CompACT AMS、室町機械株式会社)を用いて、マウスが動いた回数を運動量として評価した。

運動負荷後の日常生活動作：

営巣行動試験

営巣行動試験は、身体や精神状態が日常生活動作を実施できる状態にあるかどうかや、意欲そのものを評価する試験として知られている²⁰⁻²²⁾。そこで日常生活動作を阻害する疲労の蓄積具合を評価するため、運動負荷から2日後の日常生活動作としての営巣行動試験を実施した。本解析では、営巣材としてシュレッダーペーパー(長さ：5-7cm、幅：0.2~0.5cm)を用いた²¹⁾。シュレッダーペーパーは各ケージの床敷きの上に均一になるように置いた。マウスは暗期開始の1時間前にケージに入れ、16時間後に評価した。営巣スコアの評価はNeelyらの論文を参考にした²¹⁾(図2)。

試験結果

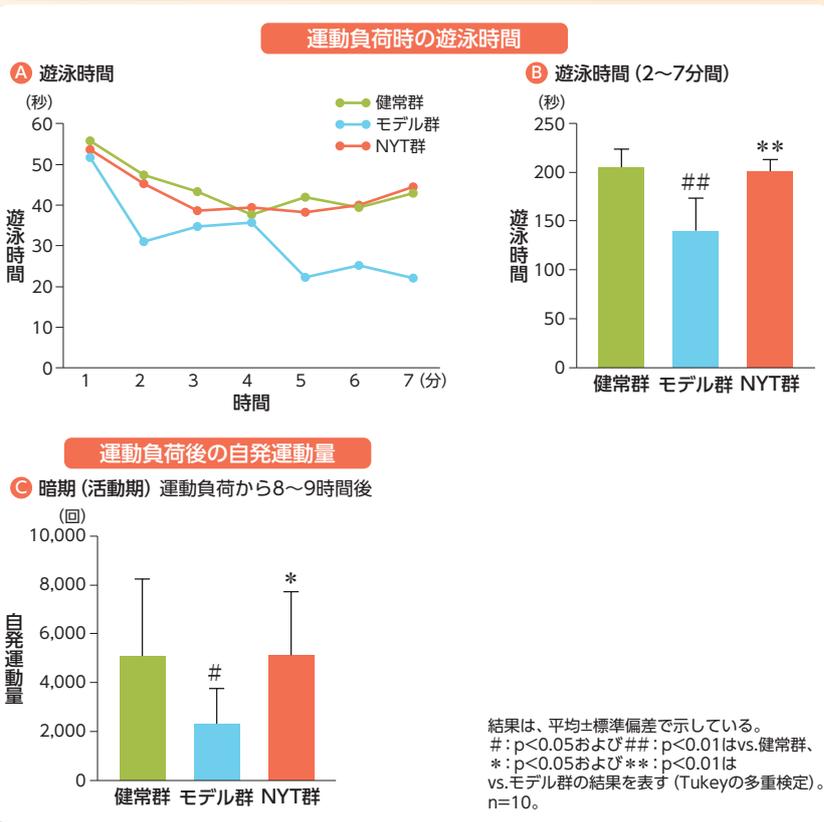
まず、運動負荷中の疲労のしやすさや持久力を評価するため、強制水泳試験で遊泳時間を解析した。7分間の遊泳時間

を解析したところ、健常群と比べて、COPDモデル群は経時的な遊泳時間の短縮を示した(図3A)。一方で、人参養栄湯投与群は遊泳時間を有意に改善した(図3A)。初期応答を除く2~7分間の累積遊泳時間についても、COPDモデル群は健常群に比べて遊泳時間が短縮し、人参養栄湯投与により有意に改善した(図3B)。続いて、運動負荷後の疲労の蓄積具合を評価するため、強制水泳試験後の自発運動量を解析した。その結果、強制水泳の8~9時間後に出現

図2 営巣行動評価方法



図3 運動負荷中と負荷後の運動量



する暗期(活動期：ヒトの昼間に当たる)の活動ピークで、COPDモデル群は健常群に比べて運動量が減少し、人参養栄湯投与により有意に改善した(図3C)。このことから、COPDモデル群が示す運動負荷中の持続時間の短縮(疲労のしやすさ・持久力の低下)および運動負荷後の自発運動量の低下(運動疲労の蓄積)を人参養栄湯は改善することが明らかとなった。

さらに、疲労回復の遅れ、すなわち倦怠感を評価するため、運動負荷した翌日の暗期の自発運動量も評価した(図4A)。その結果、暗期前半(活動期のピークを含む)の自発運動量については、COPDモデル群と健常群に差は認められなかった(図4A・B)。一方で、暗期後半では、COPDモデル群は健常群に比べて自発運動量が減少し、人参養栄湯投与により有意に改善した(図4A・C)。つまり、COPDモデル群では活動期前半の活動性は維持しているものの、後半での活動性が低下(倦怠感)しており、人参養栄湯投与群では改善を示した。

また、日常生活動作を評価するために営巣行動試験を実施したところ、COPDモデル群は健常群に比べて営巣スコアが低下し(図5A-C)、人参養栄湯群ではCOPDモデル群に比べて営巣スコアの有意な改善を認めた。これらの結果からCOPDモデル群では運動負荷後の日常生活動作の維持が難しく、人参養栄湯によってその回復が認められることが明らかとなった(図5A-C)。

なお、本研究で用いたCOPDモデルマウスでは、全試験区について、脚の筋肉量に差は認めなかった(データ未提示)。

考察とまとめ

本研究では、COPDモデルマウスに運動負荷を与えることで、その後の運動性・活動性の低下が出現するモデルを作製し、そこで人参養栄湯による治療介入を行うことで、その後の回復が認められることを示した。

マウスは、疲労により遊泳などの運動持続時間、自発運動量、および日常生活

動作の低下などを示すことが報告されている^{19, 20, 23, 24}。本検討で用いたCOPDモデルでも、運動持続時間、運動

図4 運動負荷から1日後の自発運動量

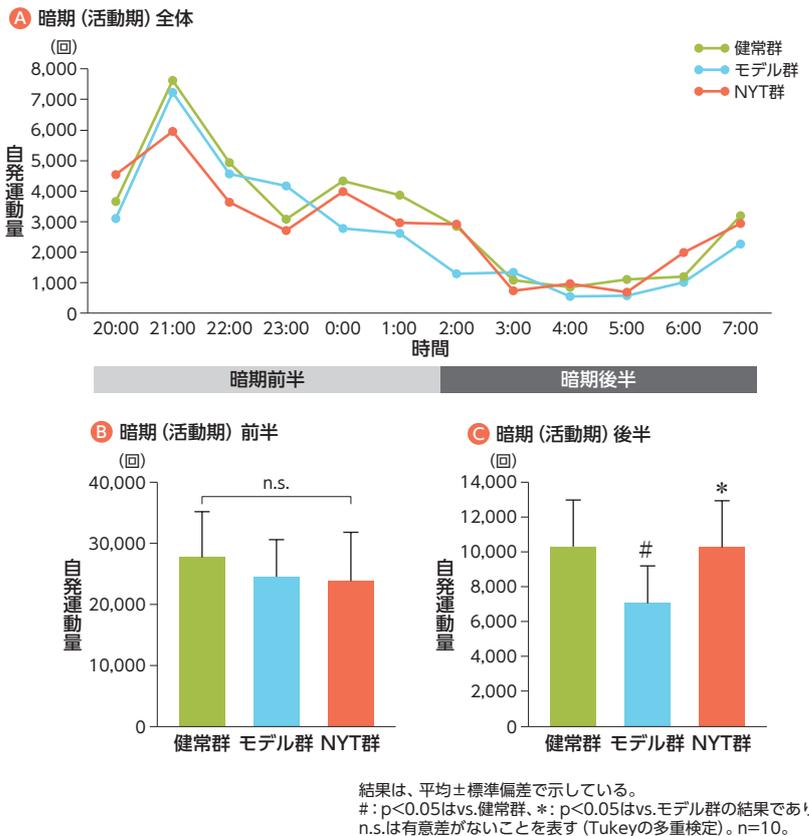
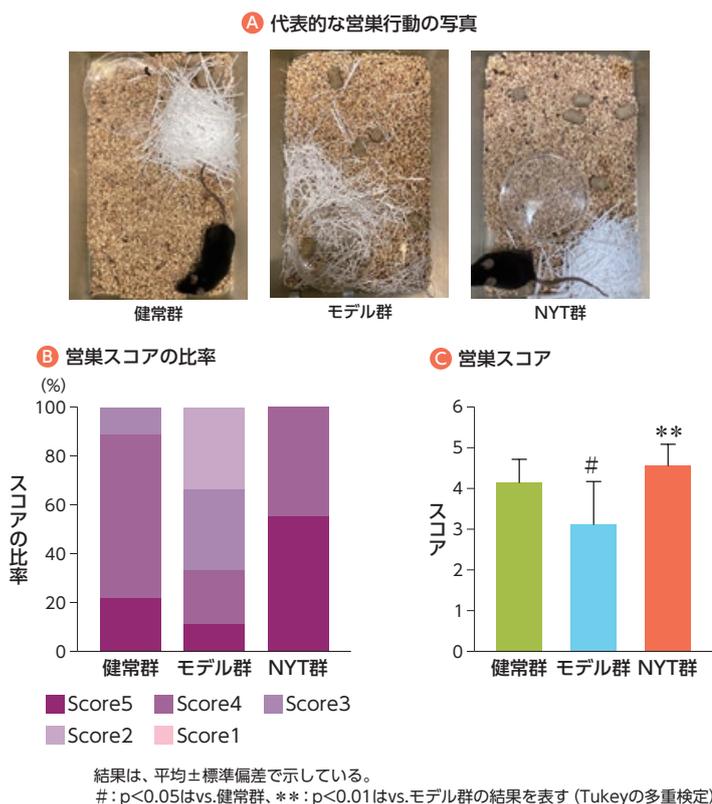


図5 運動負荷から2日後の営巣行動試験



負荷後の自発運動量や営巣行動が減少したことから、これらは疲労や倦怠感を示すモデルと考えられた。またCOPDモデルにおいては、負荷1日後における活動期後期のみ自発運動量が低下したことから、日常生活程度の負荷でも、疲労が容易に起こる易疲労状態に陥っていることが推測された。こうした挙動は、COPD患者が感じる疲労・倦怠感と特徴が良く類似していると考えられた。

最近の報告では、疲労があるCOPD患者において、人參養榮湯は疲労の主観評価(VAS)試験のスコアを改善し、さらに運動耐容性すなわち持久力を評価する6分間歩行距離を改善することが報告されている²⁵⁾。このことから、COPDモデルで人參養榮湯が示した、運動負荷中の疲れやすさや持久力の回復、その後の疲労の蓄積の改善は、患者における改善を裏付ける結果となっていた。また先に述べた疲労や日常動作に関わる項目が含まれる臨床のCATスコアが、人參養榮湯により改善することが報告されている²⁵⁻²⁷⁾、本試験の運動負荷後の営巣行動つまり日常生活動作の改善結果から、人參養榮湯によるCATスコア全体の改善には、これらの項目の寄与が示唆された。

本解析で日常生活動作の評価として用いた営巣行動には、

【参考文献】

- 1) Svanes C. et al.: Early life origins of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 65: 14-20, 2010
- 2) Postma DS. et al.: Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: common genes, common environments?. *Am J Respir Crit Care Med* 183: 1588-1594, 2011
- 3) Lu Y. et al.: Systemic inflammation, depression and obstructive pulmonary function: a population-based study. *Respir Res* 14: 53, 2013
- 4) Lin B. et al.: The Association of systemic interleukin 6 and interleukin 10 levels with sarcopenia in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Gen Med* 14: 5893-5902, 2021
- 5) Peters JB. et al.: Course of normal and abnormal fatigue in patients with chronic obstructive pulmonary disease, and its relationship with domains of health status. *Patient Educ Couns* 85: 281-285, 2011
- 6) Kentson M. et al.: Factors associated with experience of fatigue, and functional limitations due to fatigue in patients with stable COPD. *Ther Adv Respir Dis* 10: 410-424, 2016
- 7) 川山 智隆: COPD assessment test (CAT) を用いたCOPD管理. *日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌* 23: 127-132, 2013
- 8) Breslin E. et al.: Perception of fatigue and quality of life in patients with COPD. *Chest* 114: 958-964, 1998
- 9) Szymanska-Chabowska A. et al.: The fatigue and quality of life in patients with chronic pulmonary diseases: *Science Progress* 104: 3, 2021
- 10) Takayama S., et al.: "Review of frequently used Kampo prescriptions: Part 4, Ninjin'yoeito." *Traditional & Kampo Medicine* 10: 224-252, 2023
- 11) Kawabe M., et al.: Comparative study of the effects of the three kinds of Kampo-hozai: Ninjin'yoeito, Hochuekkito, and Juzentaihoto on anxious and low sociability behavior using NPY-knockout zebrafish. *Front. Pharmacol* 14: 1168229, 2023
- 12) Amitani H. et al.: Impact of Ninjin'yoeito on frailty and short life in klotho-hypomorphic (kl/kl) mice. *Front Pharmacol* 13: 973897, 2022
- 13) Otsuka S. et al.: Ninjin'yoeito reduces fatigue-like conditions by alleviating inflammation of the brain and skeletal muscles in aging mice. *PLoS One* 19: e0303833, 2024
- 14) Takano K. et al.: The protective effects of Ninjin'yoeito against liver steatosis/fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis model mouse. *J Nat Med* 78: 514-524, 2024
- 15) Ito T. et al.: Combined use of Ninjin'yoeito improves subjective fatigue caused by lenalidomide in patients with multiple myeloma: A retrospective study. *Front Nutr* 5: 72, 2018
- 16) 伊藤 量基 ほか: 人參養榮湯の併用は多発性骨髄腫患者のレナリドミドによる「疲労」を改善する. *phil漢方* 78: 7, 2019

脳のドーパミン経路が関与していることが知られている²⁸⁾。ドーパミンは意欲のみならず疲労・倦怠感にも関与しており、疲労を感じる時にはドーパミン量が減少することが示されているだけでなく、ドーパミンが増加することで運動能が向上することも明らかとなっている^{29, 30)}。また最近の報告では、人參養榮湯はマウスにおいて水浸ストレスで低下したドーパミンの分泌を促進し、ドーパミン受容体(D2受容体)の活性化を介して営巣行動の低下を改善することも報告されている³¹⁾。これらのことから、本研究における人參養榮湯によるCOPDモデルの営巣行動や運動量の改善効果は、脳内のドーパミン系の改善による可能性が考えられる。

COPD患者の治療では、禁煙、呼吸リハビリテーション、栄養療法、運動療法が基本であり、意欲・疲労/倦怠を制御して日常でどれだけ動くことができるかが重要であると考えられている^{25, 32)}。人參養榮湯はCOPD患者の疲労・倦怠感を軽減し、体を動かせる基本をつくることでCOPD関連症状の改善とQOLの向上に寄与すると期待される。

今後は、ドーパミンなどを始め脳内の神経伝達物質の動きを解析し、COPD病態における人參養榮湯の抗疲労効果の機序を明らかにする予定である。

- 17) Zhang L. et al.: Ninjin'yoeito modulates feeding and activity under negative energy balance conditions via the NPY system. *Neuropeptides* 87: 102149, 2021
- 18) Shin HY. et al.: Decrease of immobility behavior in forced-swimming test and immune system enhancing effect of traditional medicine Gamsipjundaabo-tang. *Pharmacol Biochem Behav* 79: 253-259, 2004
- 19) Yan K. et al.: Establishment and identification of an animal model of long-term exercise-induced fatigue. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 915937, 2022
- 20) Deacon R. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *J Vis Exp* 59: e2607, 2012
- 21) Neely CLC. et al.: Nest building behavior as an early indicator of behavioral deficits in mice. *J Vis Exp* 152: e60139, 2019
- 22) 河川 恵 ほか: 老化に伴う日常生活動作の減退に対する人參養榮湯の効果. *phil漢方* 91: 10, 2022
- 23) Zhang ZT. et al.: Activation of the NLRP3 inflammasome in lipopolysaccharide-induced mouse fatigue and its relevance to chronic fatigue syndrome. *J Neuroinflammation* 13: 71, 2016
- 24) Xu, J. et al.: Effects of Hochuekkito on lenvatinib-induced fatigue in mice. *BBP Reports* 6: 1-7, 2023
- 25) Ohbayashi H. et al.: Effects of Ninjin'yoeito on patients with chronic obstructive pulmonary disease and comorbid frailty and sarcopenia: A preliminary open-label randomized controlled trial. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 19: 995-1010, 2024
- 26) Hirai K. et al.: Improvement in frailty in a patient with severe chronic obstructive pulmonary disease after ninjin'yoeito therapy: A Case Report. *Front Nutr* 5: 71, 2018
- 27) Hirai K. et al.: Usefulness of Ninjin'yoeito for chronic obstructive pulmonary disease patients with frailty: *J Altern Complement Med*. 26: 8, 2020
- 28) Szczypka MS. et al.: Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron* 30: 819-828, 2001
- 29) Cordeiro LMS. et al.: Physical exercise-induced fatigue: the role of serotonergic and dopaminergic systems. *Braz J Med Biol Res* 50: e6432, 2017
- 30) Meeusen R. et al.: Endurance exercise-induced and mental fatigue and the brain. *Exp Physiol* 106: 2294-2298, 2021
- 31) 山田 ちひろ ほか: 人參養榮湯はドーパミンD2受容体を介して新規アパシー様モデルマウスにおける食欲不振ならびに集作り行動低下を改善する. *薬理と治療* 46: 207-216, 2018
- 32) 一ノ瀬 正和: COPD(慢性閉塞性肺疾患)診断と治療のためのガイドライン2018. *日本内科学会雑誌* 107: 11, 2018

お詫びと訂正

phil漢方 102号(2024年7月1日発刊号)におきまして、以下の誤植がございました。ご愛読いただいております先生、ご執筆いただいた先生にご迷惑をおかけいたしましたこととお詫び申し上げますとともに、ここに訂正いたします。

phil漢方編集部

Basic Research 「老化による栄養不良に対する人參養榮湯の効果検討」

● p.41 10行目～

「未治療群で野生型群と比較して、134.17%低下していたのに対し、3%人養群では71.62%の低下に有意に止まっていた」

誤) 低下 ⇒ 正) 上昇

● p.42 左段下から12行目

「ターンオーバー指標である陰窩長に対する絨毛長比率も改善を認めたため」

誤) 陰窩長に対する絨毛長比率 ⇒ 正) 絨毛長に対する陰窩長比率