

## 鍼刺激がマウス末梢血リンパ球サブセットに及ぼす影響

\*明治鍼灸大学 東洋医学教室 \*\*明治鍼灸大学 麻酔科学教室  
 \*\*\*明治鍼灸大学 免疫・微生物学教室

渡辺 勝之\* 水沼 国男\* 篠原 昭二\* 林田 一志\*\*  
 行待 寿紀\*\* 塚本 紀之\*\*\* 近藤 裕一\*\*\* 酒井ゆうこ\*\*\*  
 雨貝 孝\*\*\*

要旨：我々は東洋医学で重視する自然治癒力とその要因の一つである免疫系との関連に注目し研究を進めている。今回、拘束したマウスに鍼、灸、鍼通電刺激を行い、拘束刺激のみのコントロールと比較してマウス末梢血リンパ球サブポピュレーションにどのような影響を及ぼすかを、蛍光ラベルモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー法により検討した。拘束刺激のみの30分後ではヘルパーT細胞、 $\alpha\beta$ 陽性T細胞の比率が有意に上昇し、B細胞は逆に有意な低下を示した。鍼群において30分後単球が、また30分及び60分後にはヘルパーT細胞、 $\alpha\beta$ 陽性T細胞の比率が有意に上昇し、B細胞は30分、60分後で有意な低下を示した。

### Effect of Acupuncture on Subpopulations of Murine Peripheral Blood Lymphocytes

WATANABE Katsuyuki\*, MIZUNUMA Kunio\*, SHINOHARA Shoji\*,  
 HAYASHIDA Itsushi\*\*, YUKIMACHI Toshinori\*\*,  
 TSUKAMATO Noriyuki\*\*\*, KONDO Yuichi\*\*\*,  
 SAKAI Yuko\*\*\* and AMAGAI Takashi\*\*\*

\*Department of Oriental Medicine, Meiji College of Oriental Medicine

\*\*Department of Anesthesiology, Meiji College of Medicine

\*\*\*Department of Immunology and Microbiology, Meiji College of Medicine

Summary: A major aim of the treatment with oriental medicine is to increase the self-defense mechanisms, for natural restoration of balance, depending on the traditional diagnosis of individual specificity. The immune system is a central mechanism for self-defense against foreign substances. We have been investigating modulation of immune responses by the treatment with techniques of oriental medicine, acupuncture and moxibustion. In this study, we investigated the effect of acupuncture, electro-acupuncture, moxibustion and restraint stress on subpopulations of murine peripheral blood lymphocyte fraction, using fluorescent flowcytometry. The results indicate that the percentages of  $\alpha\beta$  positive helper T cells increased 30 min after restraint stress treatment alone, and by acupuncture treatment the percentages of monocytes were increased 30 min after treatment, while the percentages of  $\alpha\beta$  positive helper T cells were also increased 30 and 60 min after treatment. On the other hand, B cell population was decreased 30-60 min after treatment.

Key Words : 鍼 acupuncture, 灸 moxibustion, 鍼通電 electro-acupuncture, リンパ球サブポピュレーション lymphocyte subpopulations, 蛍光フローサイトメトリー fluorescent flowcytometry.

## I 緒 言

鍼灸治療の主な目的は“自然治癒力を高める”事が重要とされている<sup>1,2,3)</sup>。

その主要な因子の一つである免疫反応との関連も注目されている。鍼灸治療による免疫系の増強効果の報告<sup>4,5)</sup>や、実験的な研究では鍼灸刺激により、リンパ球増殖反応<sup>6)</sup>、抗体産生の応答<sup>7)</sup>、NK活性<sup>8)</sup>の増強も報告されている。

しかし、東洋医学は本来、人と自然環境との関わりや個体の特異性を重視し、全人的におこなわれるものとされている。鍼灸の効果においても、同様な刺激を行なったとしても、個体により反応様式が異なる事が多く見受けられる。そのため、鍼灸の免疫系調節に関するヒトでの臨床的研究においては、個体の特異性をどのように評価し分離するかの方法論をまず確立しなければならない。

以上のことから実験的研究を行うに際して、まず最初に均一な条件設定での評価が必要不可欠であり基礎にもなると考え、環境条件、個体条件をなるべく均一にするため、Specific pathogen free (SPF) にて飼育している純系マウスを対象として実験をおこなった。

これまでに、様々なストレスによりリンパ球サブポピュレーションが変化することが多数報告されている。またヒトでの鍼灸治療による変化も少数ではあるが報告されている<sup>9~11)</sup>。そこで、拘束ストレス及び鍼灸臨床でよく用いられる、鍼灸、鍼通電刺激による末梢血リンパ球サブポピュレーションの変化を検討した。

を対象とした。

## 2) リンパ球サブセット

刺激前、刺激終了後30分、60分の計3回眼窩静脈叢より約300 $\mu$ l採血を行なった。採血は9:00~13:00時の間とした。血液をヘパリン(1000u/ml)加PBS 2mlで希釈したのち、Ficollを用いた比重遠心法にて分離し、リンパ球単球分画を採取した。それらを10%牛胎児血清(FCS)加Eagle Minimum essential medium (MEM)で洗浄(1500回転、5分)後、各々400 $\mu$ lに調整し、4つに分け100 $\mu$ lずつ染色用チューブに分注した。

## 3) 抗体及び染色方法

使用した抗体は、以下に示す6種類を用いた。Anti-Mouse L3T4 R-Phycoerythrin (PE) (San Jose, CA. Becton Dickinson), Anti-Mouse Lyt 2 Fluorescein isothiocyanate (FITC)(San Jose, CA. Becton Dickinson), PE Anti-Mouse alpha beta TCR (San Diego, CA. PharMingen), FITC Anti-Mouse gamma delta TCR (San Diego, CA. PharMingen), FITC Anti-Mouse  $\mu$ 鎖抗体 (West Chester, PA. Cappel) ヤギ・アフィニティー精製抗体, Anti-Mac-1 抗体 Rat-Mouse ハイブリドーマ M1/70. 15. 11.5 (ATCC T1B 128) の培養上清。(表1)

染色は、以下に示すごとく行なった。

- a) PE 標識 Anti-mouse L3T4を4 $\mu$ l/tube と FITC 標識 Anti-mouse Lyt 2を4 $\mu$ l/

## II 対象及び方法

## 1) 対象動物

室温24 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 湿度55 $\pm$ 10%, 照明12時間の一定環境下でクリーンラック内のSPF条件にて飼育した, 6~9週令の純系C57BL/6マウス

表1 標識抗体、染色方法およびサブポピュレーション分類

抗 体	標識	染色方法	分 類
Anti-Mouse L3T4	PE	直接法	Helper/Inducer T cells
Anti-Mouse Lyt 2	FITC	直接法	Suppressor/cytotoxic T cells
Anti-Mouse $\alpha$ $\beta$ TCR	PE	直接法	$\alpha$ $\beta$ 陽性 T cells
Anti-Mouse $\gamma$ $\delta$ TCR	FITC	直接法	$\gamma$ $\delta$ 陽性 T cells
Anti-Mouse $\mu$ 鎖	FITC	直接法	IgM( $\mu$ )陽性B細胞
Anti-Mac-1	FITC	間接法	Monocytes, Macrophages, Granulocytes

tube 用いて直接法で2カラー染色

- b) PE 標識 Anti-mouse  $\alpha\beta$  Tcell レセプターを10倍希釈し,  $10\mu\text{l}/\text{tube}$  と FITC 標識 Anti-mouse  $\gamma\delta$  Tcell レセプターを10倍希釈し  $10\mu\text{l}/\text{tube}$  を直接法で2カラー染色
- c) FITC 標識 Goat Anti-mouse IgM ( $\mu$ ) を20倍希釈し  $10\mu\text{l}/\text{tube}$  を直接法で1カラー染色
- d) M1/70(Anti-Mac1)を  $50\mu\text{l}/\text{tube}$  に FITC 標識 Anti-Rat  $\kappa$ 鎖抗体を40倍希釈し, 間接法で1カラー染色
- それらを  $4^\circ\text{C}$  で30分間反応させた後, 1% FCS 加MEMで1000rpm, 5分, 2回洗浄した。染色した細胞のリンパ球の膜マーカー陽性細胞率(%)を Becton Dickinson 社製, Laser Flowcytometry, FACScan を用いて解析した。測定では, 前方散乱及び測方散乱を用い, リンパ球分布領域に Live gate をかけ, Gated events を 500 に設定した。統計処理は, Student's paired t-test を用いた。

### III 鍼, 灸及び鍼通電刺激

マウスをストレスを少なく拘束するため, エルエーテルで麻酔し, 通気孔を空けたポリカーボネート50ml遠心管(Nalge Company, New York)に両後肢を側方の穴から出して固定し拘束を行なった。マウスを以下の4群に分け, 麻酔覚醒後マウス両側足三里相当部位に刺激を行なった。

- 1, コントロール(拘束)群(拘束ストレス: 30分)
- 2, 鍼群(拘束および鍼刺激: 13ミリ26号鍼置鍼30分)
- 3, 鍼通電群(拘束および鍼通電刺激: 13ミリ26号鍼, 15HZ 30分)
- 4, 灸群(拘束および灸刺激: 拘束30分下で半米粒大=約0.65mg 3壯)各群N=10とした。

### IV 結 果

- 1) 拘束ストレスの効果  
拘束ストレスのみでは,  $\text{L3T4}^+\text{Lyt2}^+$ 細胞, M

$1/70^+$ 細胞は30分後, 60分後ともにほとんど変化を示さなかった。 $\text{L3T4}^+\text{Lyt2}^-$ 細胞,  $\alpha\beta^+\gamma\delta^-$ 細胞は30分後有意に上昇した。60分後には $\text{L3T4}^+\text{Lyt2}^-$ 細胞は30分後に比べ低下し拘束前と同レベルにもどった。他方 $\alpha\beta^+\gamma\delta^-$ 細胞は60分後には30分後よりも低下する傾向を示した。 $\mu^+$ 細胞は30分後有意に低下し, 60分後も低下傾向を示した。 $\alpha\beta^+\gamma\delta^-$ 細胞もやや低下傾向を示した。(図1)

#### 2) 鍼刺激の効果

鍼群では $\text{L3T4}^+\text{Lyt2}^-$ 細胞,  $\alpha\beta^+\gamma\delta^-$ 細胞は30分後及び60分後で有意に上昇した。60分後でも上昇が持続していることが, 拘束群とは異なった反応である。またM1/70 $^+$ 細胞は拘束群と異なって, 30分後有意に上昇した。 $\mu^+$ 細胞は30分, 60分後共に有意に低下した。 $\alpha\beta^-\gamma\delta^+$ は拘束群と同様やや低下傾向を示し,  $\text{L3T4}^-\text{Lyt2}^+$ 細胞は拘束群と同様変化しなかった。(図2)

#### 3) 鍼通電刺激の効果

鍼通電群では拘束群と異なり,  $\text{L3T4}^+\text{Lyt2}^-$ 細胞の変化が30分でも60分でもみられなかった。 $\alpha\beta^-\gamma\delta^+$ 細胞, M1/70 $^+$ 細胞はやや上昇傾向を示した。 $\alpha\beta^+\gamma\delta^-$ 細胞及び $\mu^+$ 細胞は, 拘束群と同様な変化を示した。 $\text{L3T4}^-\text{Lyt2}^+$ 細胞は拘束群及び鍼群と同様に変化を示さなかった。(図3)

#### 4) 灸刺激の効果

灸群では30分後の $\mu^+$ 細胞のみが拘束群と同様な変化を示した。しかし,  $\text{L3T4}^+\text{Lyt2}^-$ 細胞,  $\alpha\beta^+\gamma\delta^-$ 細胞では拘束群で認められた変化を示さなかった。 $\text{L3T4}^-\text{Lyt2}^+$ 細胞,  $\alpha\beta^-\gamma\delta^+$ 細胞, M1/70 $^+$ 細胞は拘束群, 鍼通電群と同様, 変化を示さなかった。(図4)

### V 考 察

今回の実験で, 末梢血リンパ球の膜表面マーカー陽性細胞率(%)の測定において, 鍼群60分と拘束群とを比較して, ヘルパーT細胞( $\text{L3T4}^+\text{Lyt2}^-$ 細胞),  $\alpha\beta$ T細胞( $\alpha\beta^+\gamma\delta^-$ 細胞)の陽性細胞率の上昇がみられた。拘束群では30分後のみヘルパーT細胞,  $\alpha\beta$ 陽性T細胞の上昇が認め

拘束群

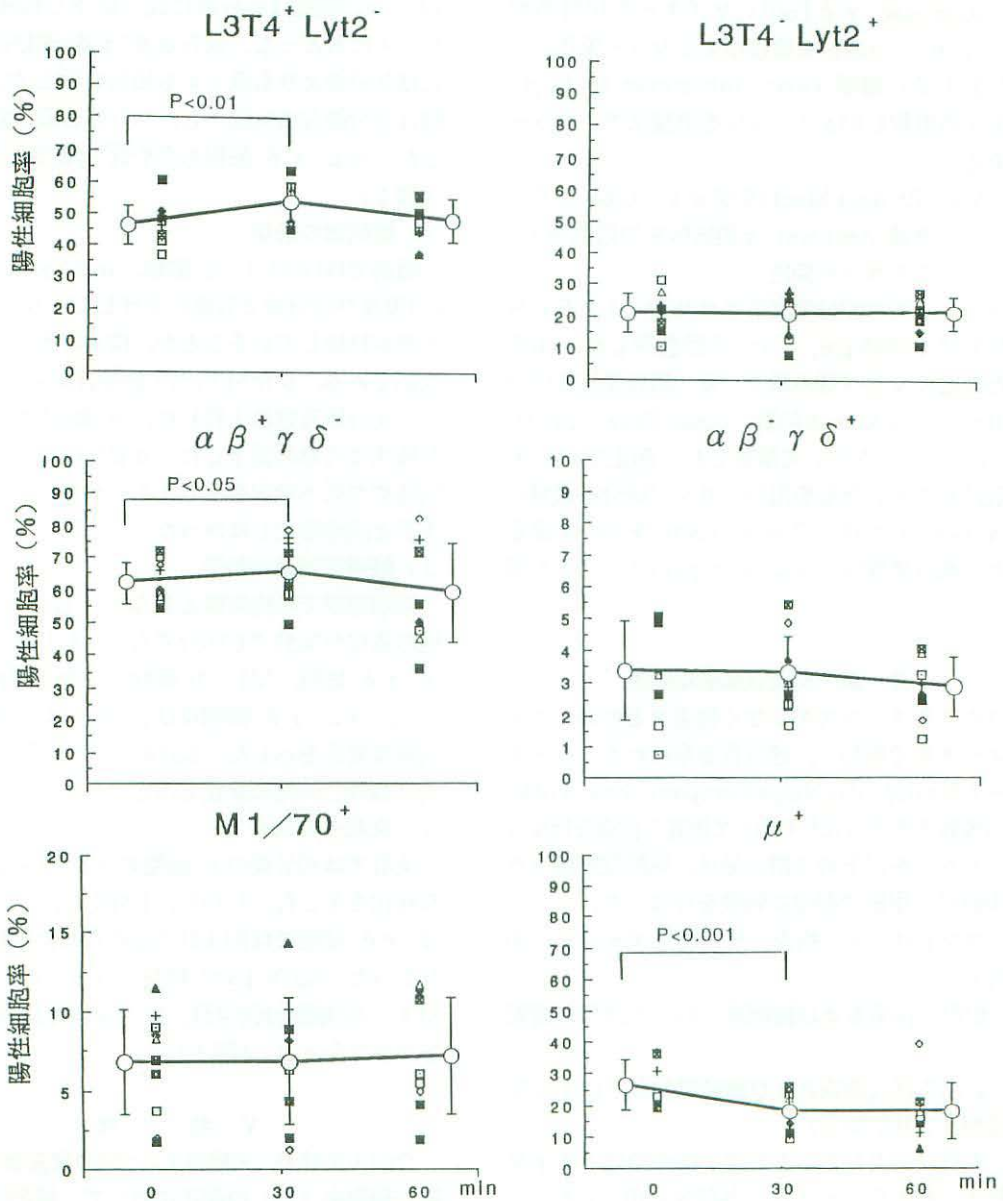


図1 拘束群でのサブポピュレーションの変化

マウス末梢血リンパ球単球分画での刺激前及び30分間の拘束刺激後（30分後、60分後）におけるサブポピュレーションの変化をFACS解析した結果を示した。N=10とし、平均○±標準偏差で示し、各個体ごとの測定値をそれぞれのシンボルで示した。検定は処置前と比較して Student's paired t-test で行なった。

鍼群

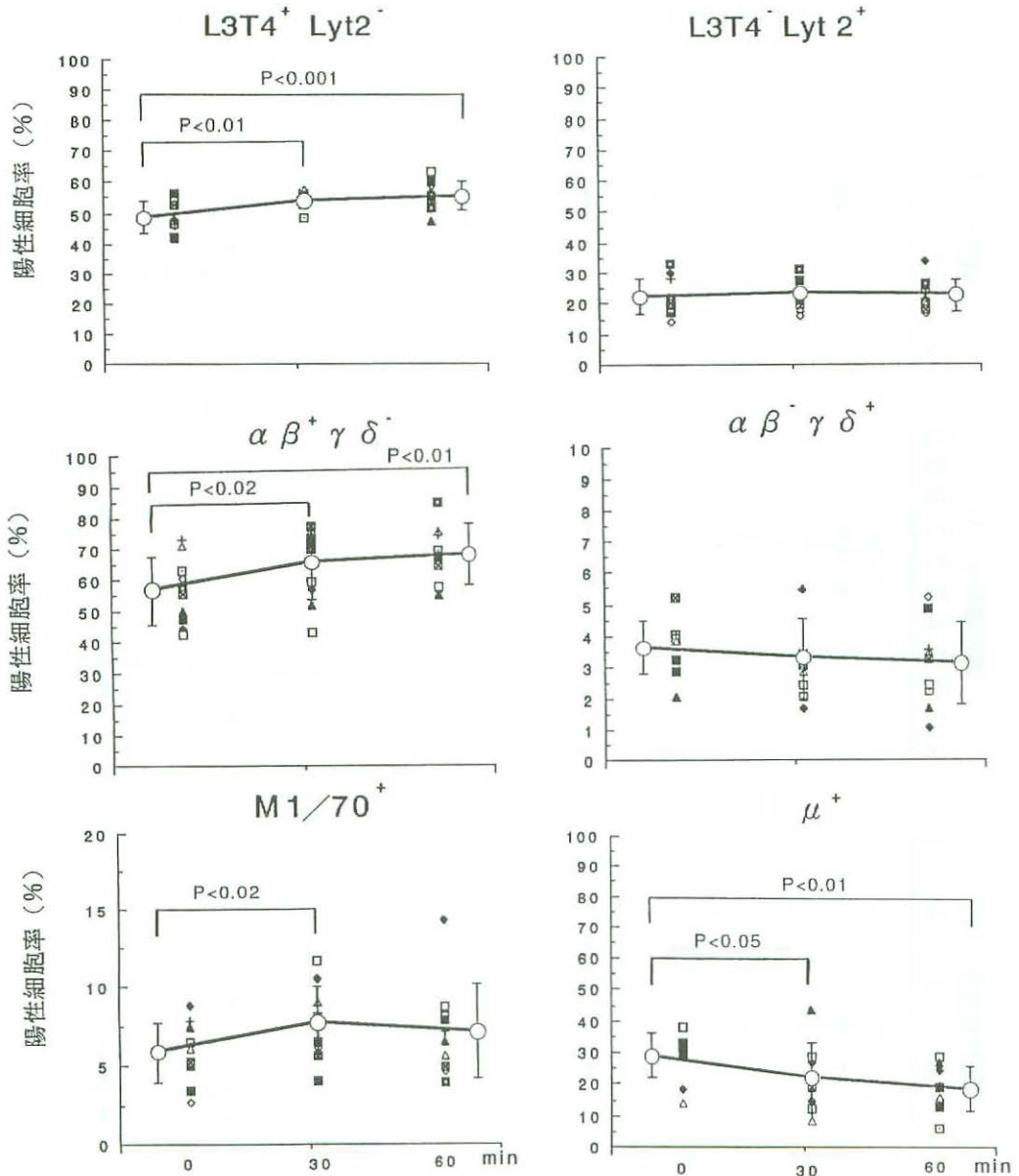


図2 鍼群でのサブポピュレーションの比較

マウス末梢血リンパ球単球分画での刺激前及び30分間の鍼刺激後(30分後, 60分後)におけるサブポピュレーションの変化をFACS解析した結果を示した。N=10とし, 平均○±標準偏差で示し, 各個体ごとの測定値をそれぞれのシンボルで示した。検定は処置前と比較して Student's paired t-test で行なった。

## 鍼通電群

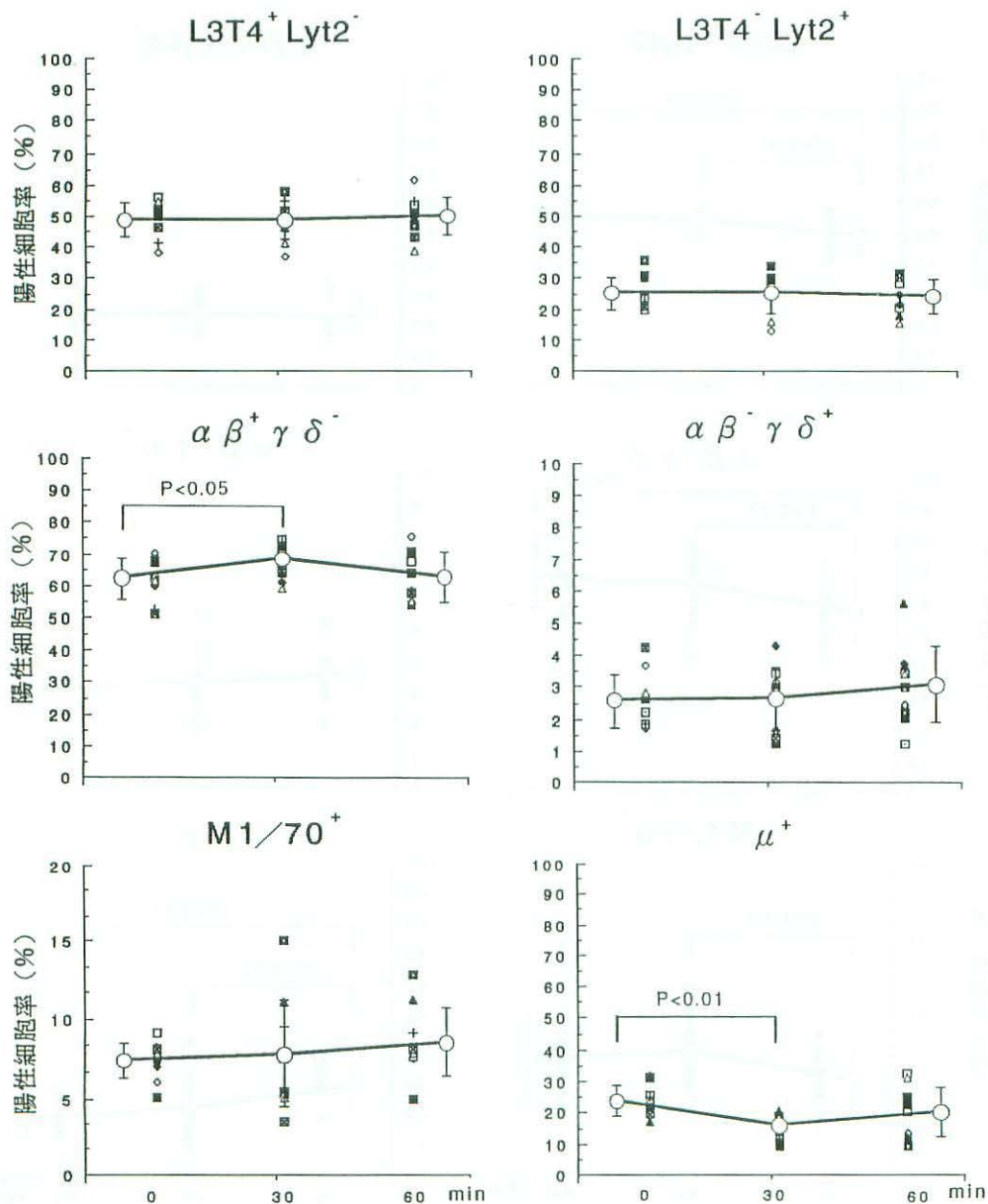


図3 鍼通電群でのサブポピュレーションの変化

マウス末梢血リンパ球単球分画での刺激前及び30分間の鍼通電刺激後（30分後、60分後）におけるサブポピュレーションの変化をFACS解析した結果を示した。N=10とし、平均 $\pm$ 標準偏差で示し、各個体ごとの測定値をそれぞれのシンボルで示した。検定は処置前と比較して Student's paired t-test で行なった。

灸群

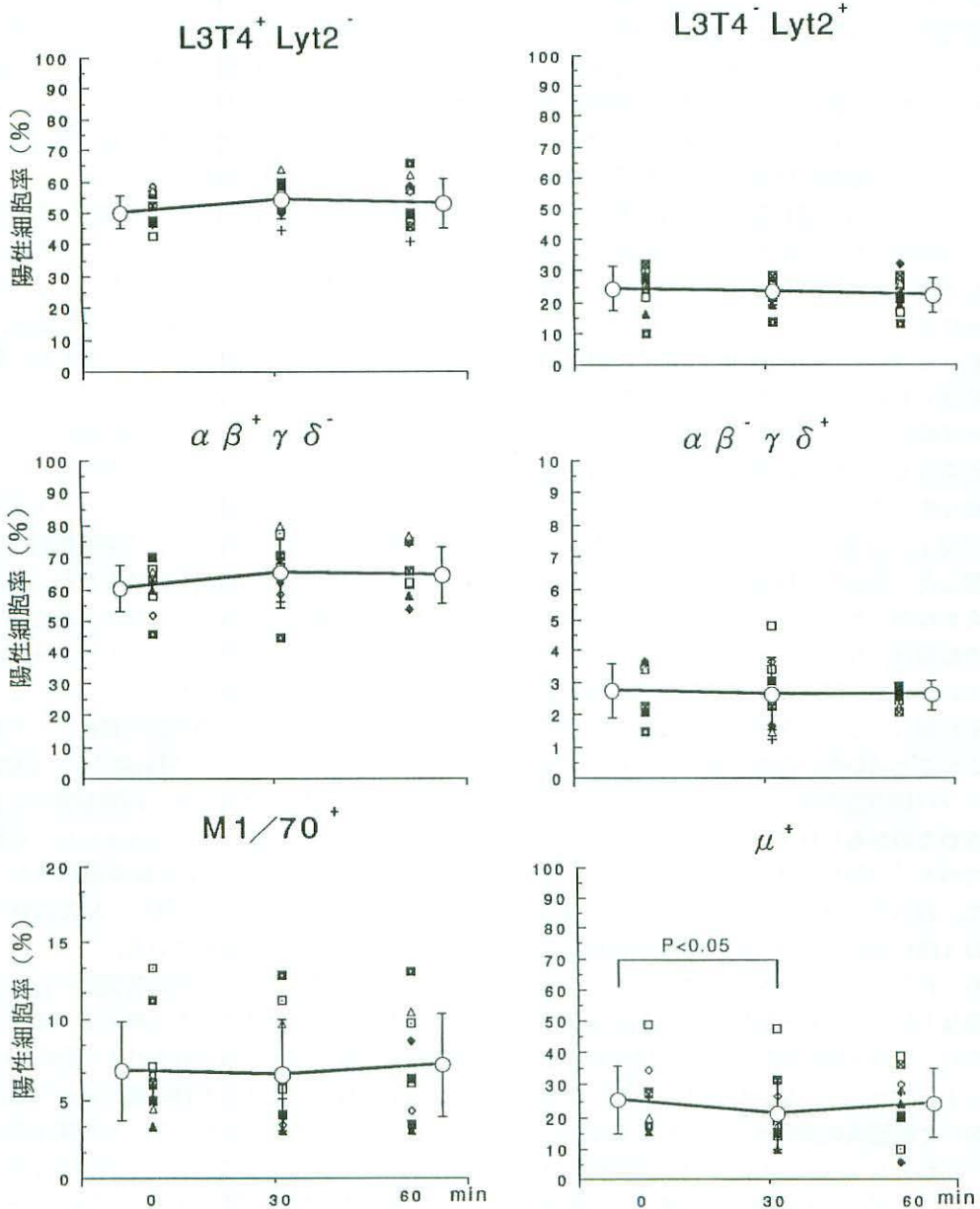


図4 灸群でのサブポピュレーションの変化

マウス末梢血リンパ球単球分画での刺激前及び灸（半米粒大3壯）刺激後（30分後、60分後）におけるサブポピュレーションの変化をFACS解析した結果を示した。N=10とし、平均 $\pm$ 標準偏差で示し、各個体ごとの測定値をそれぞれのシンボルで示した。検定は処置前と比較してStudent's paired t-testで行なった。

られるのに比べ、灸、鍼通電群においては、ヘルパーT細胞の陽性比率は30分、60分後とも有意な変化は認められなかった。 $\alpha\beta$ T細胞の陽性比率は、鍼通電刺激では拘束群と同様に30分後のみ有意な上昇を示したが、灸群では有意な変化を示さなかった。これらの結果は、灸、鍼通電刺激により、拘束ストレスにおける末梢血リンパ球サブポピュレーションの変動を抑制する可能性を示唆する。以上のことから、鍼刺激の効果は末梢血へのヘルパーT細胞及び $\alpha\beta$ 陽性T細胞の動員が、拘束ストレスのみに比べて、より強く発現したことが示唆される。

B細胞( $\mu^+$ 細胞)の変化においては、鍼群でのみ60分後でも有意な低下を示した。このことは、ヘルパーT細胞の上昇と連動した変化である可能性が考えられる。灸群、鍼通電群においては拘束群と同様な変化を示した。

単球(M1/70<sup>+</sup>細胞)は鍼群の30分のみで有意に上昇した。拘束群、鍼通電群、灸群とも変化が認められなかった。

これらの結果は、リンパ球サブポピュレーションの変化という点で、鍼、灸、鍼通電群を比較するとそれぞれ異なった反応を引き起こすことが示された。このことは刺激の質の違いにより、末梢血へのリンパ球の急性移行へのシグナルの差として表現されたのかもしれない。

ヒトでのリンパ球サブポピュレーションの変化に関して、鍼通電刺激によって健常群では刺激直後にCD4陽性細胞、CD8陽性細胞の有意な変動は認められなかったが、疾患群においてCD4陽性細胞は上昇し、CD8陽性細胞は有意な低下が認められ、CD4陽性細胞/CD8陽性細胞比が有意に上昇したという報告がある<sup>9)</sup>。また健康成人において鍼通電刺激直後に、CD4陽性細胞は一定の変動をみなかったが、CD8陽性細胞は増加したという報告もある<sup>10)</sup>。鍼刺激では、健康成人において刺激直後にCD4陽性細胞は有意に上昇し、CD8陽性細胞は有意な低下が認められたという報告がある<sup>11)</sup>。

ヒト末梢血リンパ球サブポピュレーションは様々

なストレスや環境の変化により変動するという報告が多い<sup>12-17)</sup>。総リンパ球数と同様T細胞、B細胞が夜をピークとした日内変動を示すことが報告されている<sup>18)</sup>。また初夏をピークとする総リンパ球数、ヘルパーT細胞、サブプレッサーT細胞のサーカディアンリズムがみられるが、CD4陽性細胞/CD8陽性細胞比は年間を通じて安定しているということも報告されている<sup>19)</sup>。

精神的ストレスでは単球、NK細胞、B細胞は増加し、生理的ストレスでは、すべてのリンパ球サブセットは増加したが、T/B比、CD4陽性細胞/CD8陽性細胞比は減少した<sup>20)</sup>こと、また急性的なストレスではCD8が上昇し<sup>20)</sup>、慢性的なストレスではCD8が低下する<sup>21)</sup>という報告がある。これらのストレスや環境変化によるリンパ球サブポピュレーションの変動と異なって、今回の結果において鍼群では、ヘルパーT細胞、 $\alpha\beta$ T細胞陽性率の上昇、CD4陽性細胞/CD8細胞比、T/B比の増大が認められた。以上のことから、鍼刺激がこれまでに報告されているストレスによるリンパ球サブポピュレーションの変動とは異なることが示唆される。

鍼刺激による免疫系への調節の機構としては、opiate peptidesの役割や、鍼刺激によって知覚-自律神経系が活性化された後、副腎髄質から放出される epinephrin ならびに enkephalin の役割が報告されている<sup>6, 7, 9)</sup>。また鍼通電刺激がリンパ球増殖反応<sup>6)</sup>、抗体産生応答<sup>7)</sup>、NK活性<sup>8)</sup>を増強するという報告もされている。

これらの結果は鍼灸の免疫応答調節が以下の二つのメカニズムによることを示唆する。第一に知覚神経・中枢神経・自律神経を介する調節として、リンパ系組織を支配する神経線維自身から放出される分子による調節であり、第二に視床下部-下垂体-副腎(性腺)系の放出する血中ホルモンによる調節である<sup>22)</sup>。鍼灸と免疫系の関連の研究では、神経・免疫・内分泌系を一つの軸としてとらえ、また中枢での反応と局所反応をも考慮することが重要であろう。今回の結果は、自律神経によるリンパ球の血中への移行の制御としても考えら



れうる。今後自律神経機能及びリンパ球活性の両面からの鍼灸の効果を検討して行きたい。

文 献

- 1) 龍 伯堅著, 丸山敏秋訳 : 治療の原則と方法, 黄帝内経概論. 第二版, 東洋学術出版社, 千葉県, pp73~81, 1989.
- 2) 定方 昭夫 : 「自然治癒力」を考える, 宗教学と医療, 講座人間と医療を考える 2, 初版, 弘文堂, 東京都, pp67~91, 1991.
- 3) Bossy J : Immune Systems, Defense mechanisms and acupuncture : Fundamental and practical aspects. *Am J Acupuncture*, 18 : 219~232, 1990.
- 4) Kobayashi T et al : Relationships between ryodoraku autonomic nervous patterns and immunological levels. *Am J Acupuncture*, 14 : 23~28, 1986.
- 5) Nagano K : Immune enhancement through acupuncture and moxibustion : Specific treatment for allergic disorders, mild infectious disease and secondary infections. *Am J Acupuncture*, 19 : 329~338, 1991.
- 6) Fujiwara R et al : Effects of acupuncture on immune response in mice. *Intrn J Neuroscience*, 57, 141~150, 1991.
- 7) 周 桂桐ら : ハリ刺激による抗体産生増強効果のメカニズム, 神経免疫研究, 3 : 47~50, 1990.
- 8) 黒野 保三ら : 鍼刺激のヒト免疫反応系に与える影響(Ⅲ). 全日本鍼灸学会雑誌, 33, 12~17, 1983.
- 9) 田山 文隆ら : EAPの免疫系におよぼす影響, 日本臨床麻酔学会誌, 8, 495~501, 1988.
- 10) 黒野 保三ら : 鍼刺激のヒト免疫反応系に与える影響(V). 全日本鍼灸学会雑誌, 36, 148~151, 1984.
- 11) 渡辺 勝之ら : 鍼刺激が及ぼす生体免疫学的パラメーターの変化について. 明治鍼灸医学, 6, 97~102, 1990.
- 12) 藤原 良一ら : ストレスと免疫機能. *BIOOTHERAPY*, 4, 875~883, 1990.
- 13) Westermann J et al : Lymphocyte subsets in the blood : a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunology Today*, 11 : 406~410, 1990.
- 14) 綾部 光芳ら : ジョガーの免疫能, 体力研究, 69, 1~7, 1988.
- 15) 松尾 和彦ら : 運動トレーニングと免疫能, 臨床スポーツ医学, 7, 1335~1340, 1990.
- 16) Hamid J et al : The significance of changes in blood lymphocyte populations following surgical operations. *Clin Exp Immunol*, 56 : 49~57, 1984.
- 17) Maisel A S et al : Adrenergic control of circulating lymphocyte subpopulations. *Clin Invest*, 85, 462~467, 1990.
- 18) Abo T et al : Studies on the bioperiodicity of the immune response. I. circadian rhythms of human T, B and K cell traffic in the peripheral blood. *J Immunol*, 126 : 1360~1363, 1981.
- 19) Abo T et al : Annual stability in the levels of lymphocyte subpopulations identified by monoclonal antibodies in blood of healthy individuals. *J Clin Immunol*, 5 : 13~20, 1985.
- 20) Landmann R M A et al : Changes of immunoregulatory cells induced by psychological and physical stress : relationship to plasma catecholamines. *Clin Exp Immunol*, 58, 127~135, 1984.
- 21) Maisel A S et al : Adrenergic control of circulating lymphocyte subpopulations; Effects of congestive heart failure, dynamic exercise, and terbutaline treatment. *J Clin Invest*, 85, 462~467, 1990.
- 22) 雨貝 孝ら : 神経系及び神経ペプチドの免疫系への関与, 明治鍼灸医学, 6, 11~21, 1990.