

## 灸によるコラーゲン誘発関節炎の予防効果の検討

† 松熊 秀明<sup>1)</sup>、篠原 鼎<sup>2)</sup>、中村 辰三<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 明治鍼灸大学大学院 鍼灸臨床医学

<sup>2)</sup> 明治鍼灸大学 健康鍼灸医学教室

### 要旨：

【目的】リウマチモデルマウスにⅡ型コラーゲン誘発関節炎を発症させ、灸の関節炎発症に対する影響を検討した。

【方法及び結果】実験1：初回免疫から4週間1mg灸2壮、週2回行った群と対照群と比較したが差が無かった。実験2：1mg灸6壮を隔日に30日間施灸した群で発症の遅れがあり、関節炎スコアの低いものが2例あった。実験3：初回免疫の4週間前から8週間施灸し1mg灸群と0.4mg灸群を比較した。36日目の発症率は対照群71%、1mg灸群50%、0.4mg灸群57%であった。関節炎スコア、腫脹値の低下が1mg灸群で2例、0.4mg灸群で1例あった。実験4：他の報告をもとに、2mg灸5壮を隔日に30日間行ったが効果の再現は出来なかった。実験5：Ⅱ型コラーゲン免疫部位のリンパ節細胞を調製し、*in vitro*での特異的増殖反応を検討した。その結果対照群 (n=4) の全例で増殖したのに対し、施灸群では4例中2例にしか増殖反応がみられなかった。

【考察】対照群と比べ統計的有意差はなかったが、施灸をした個体の中には関節炎の発症が抑制されたものがあり、灸刺激により発症予防効果がある可能性が示唆された。灸刺激が抗原特異的リンパ球の活性化の段階で抑制的に作用する可能性が示唆された。

### I. 緒言

古来より鍼灸の臨床において慢性関節リウマチ(以下RAと略)は痺証<sup>1, 2)</sup>といわれ、鍼灸が効くとされてきた。また、現在鍼灸の保険適応疾患<sup>3)</sup>となっており、関節の痛みや不定愁訴などの随伴症状等に対して改善されているという報告等<sup>4~11)</sup>があるが、科学的根拠が十分とはいえない。一方、灸の臨床研究においては、Zhuら<sup>12)</sup>はRA患者に温灸(隔物灸)を用い、リウマトイド因子(以下RF)の陽性から陰性への転換がみられたことを報告し、Liuら<sup>13)</sup>はRA患者に灸頭針を行った結果、免疫グロブリンレベル(IgG, IgA)が低下し、RFの陰性への転換がみられたことを報告している。またLiら<sup>14)</sup>は患者の関節周囲の経穴に灸頭針を行った結果、関節の機能の改善や炎症々が治癒し、同様にRFの陰性への転換がみられたことを報告している。これらの臨床研究では、人を対象としているため、均一な対照群をおくことが難しく、灸の効果を明確に示すことは困難である。一方、動物実験でFangら<sup>15)</sup>は、Ⅱ型コラーゲン誘発関節炎マウスに、2mg灸を5壮隔日に30

日間命門穴相当部位に行い、予防効果を得たことを報告している。そこで均一な対照群と比較できる方法として関節炎モデル動物を用いて灸刺激による効果を調べることにした。

関節炎の発症が抑えられる灸の最適刺激を選定する必要性から、刺激量、期間、頻度による影響を考え、数種のパターンを検討した。また刺激部位についてはRAの臨床例の記載<sup>16)</sup>から小腸兪相当部位を選択した。またFangら<sup>15)</sup>の灸刺激条件も併せて検討した。さらにその影響を*in vitro*で検討するため、免疫したマウスのリンパ節細胞を用いてⅡ型コラーゲンに対する特異的増殖反応における灸刺激の影響を検討した。

### II. 方法

#### 1. 実験動物

実験動物として9~10週齢のDBA/1J雄性マウス(体重17~25g, セアック吉富株式会社, 福岡)を用いた。マウスはSPF(Specific Pathogen Free)条件下でポリカーボネート製ケージ内(日本クレア, 大阪, 190×260×125mm)で飼育

平成14年7月19日受付, 平成14年9月13日受理

Key Words：灸刺激、コラーゲン誘発関節炎、特異的増殖反応、予防効果

† 連絡先：〒629-0392 京都府船井郡日吉町保野田ヒノ谷6 明治鍼灸大学 臨床鍼灸医学Ⅲ研究室 内線325  
Tel.0771-72-1181 Fax.0771-72-0394 E-mail: mak @muom.meiji-u.ac.jp

し、明暗の周期は12時間（明期は午前7時～午後7時）とした。

2. 関節炎の誘導

仔牛の関節軟骨由来II型コラーゲン（コスモ・バイオ株式会社、東京）を4℃にて0.1M酢酸で0.5mg/mlに溶解し、-20℃で保存した。このコラーゲン溶液0.2mlと等量のフロイント完全アジュバント0.2mg（FCA, Sigma-Aldrich, Mo, USA）を氷冷水中で超音波処理してエマルジョン化した。DBA/1J雄性マウスに100μg/0.4mlのエマルジョン化したコラーゲン溶液を尾根部皮内（4～6箇所）に初回免疫し、28日後、背部（4～6箇所）に同様に調製した抗原100μgを追加免疫した。

3. 灸刺激

刺激期間、頻度、刺激量により実験を5つに分けFig.1に示す。刺激部位は実験1～3では小腸脛相当部位（第5腰椎から外方2mm、下方5mmのところ）とし、実験4ではFangら<sup>15)</sup>の追試として命門穴相当部位（第3腰椎の下方）、実験5ではリンパ節細胞のII型コラーゲンに対する特異的増殖反応をみたが、刺激部位は免疫部位の近傍とした。

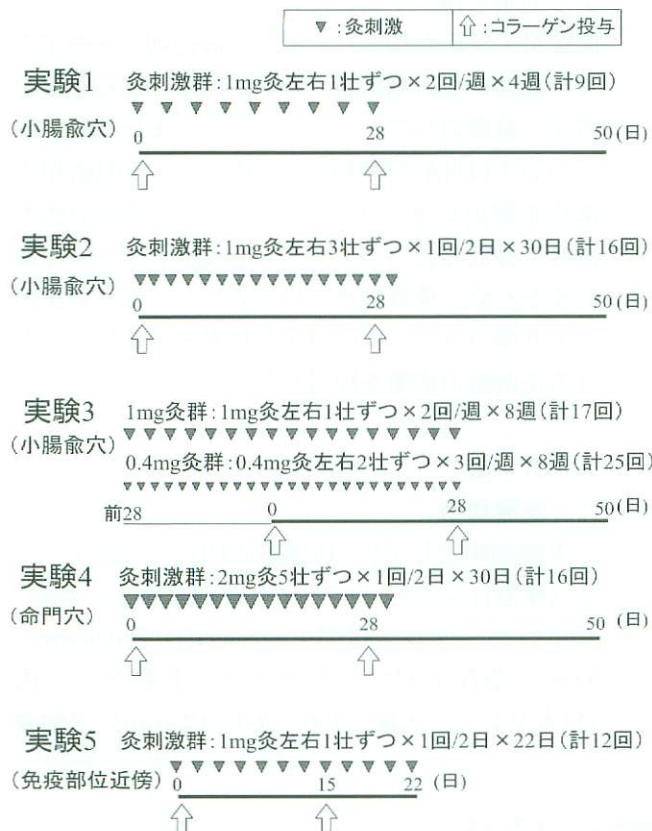


Fig. 1: 各実験の灸刺激  
各実験の灸刺激の部位、頻度、期間、刺激量を示す。

刺激頻度、期間、刺激量は実験1では1mg灸を左右1壮ずつ初回免疫から4週間、週2回の割合で行い、刺激回数は初回を入れ9回行った。実験2では1mg灸を左右3壮ずつ2日に1回（隔日）、初回免疫から30日間行い、刺激回数は初回を入れ16回行った。実験3では初回免疫の4週間前から8週間行い、1mg灸を左右1壮ずつ週2回行う群（以下1mg灸群）と0.4mg灸を左右2壮ずつ週3回行う群（以下0.4mg灸群）とした。刺激回数は1mg灸群では初回を入れ17回、0.4mg灸群では25回行った。実験4ではFangら<sup>15)</sup>の実験の追試として2mg灸を5壮ずつ2日に1回（隔日）、初回免疫から30日間行い、刺激回数は初回を入れ16回行った。実験5ではリンパ節細胞の特異的増殖反応を見るため1mg灸を左右1壮ずつ2日に1回（隔日）、初回免疫から22日間行い検討した。

4. 関節炎の評価

マウスの足関節を隔日に観察し、足の関節が1関節でも発赤又は腫脹しておれば発症したものとみなした。関節炎の炎症部位の数を関節炎スコア<sup>17)</sup>として評価した。関節炎スコアは前足は指4本とpawとankleの12部位、後足は指5本とfootpadとankleの14部位とし、発赤又は腫脹があれば1点とし、最大26点、最小0点とした。また、炎症の程度の指標として足の腫脹を測定した。前肢(ankle)、後肢（footpadとankle）の厚さをダイヤル付きノギス（最小目盛0.01mm）を用いて5日に1回の割合で計測し、その合計値を求めた。それぞれの測定値からその個体の初回免疫前の測定値を引き、腫脹値とした。腫脹の計測はマウスの前肢と後肢が出る穴（長径23mm、短径13mm）を二つあけた50mlのポリカーボネート製遠心管にマウスを入れて行った。体重測定は、初回免疫時より隔日に測定した。

5. リンパ節細胞のII型コラーゲンに対する特異的増殖反応

10週齢DBA/1J雄性マウスに100μg/0.4mlのFCAとエマルジョン化したコラーゲン溶液を背部（4～6箇所）に皮内注射にて免疫し、15日後、背部（4～6箇所）に同様に調製した抗原で追加免疫した。22日目に、マウスを頸部切断により放血後、無菌的に腋窩リンパ節を摘出しイーグルMEM培地（日本製薬株式会社、東京）を用いてステンレスメッシュ上にて単細胞浮遊液を作成した。遠心

分離 (1000r.p.m., 5min, 4°C) し、上清を取り除いた後8%FCS加RPMI1640培地 (日水製薬株式会社, 東京) に細胞を浮遊させ $5 \times 10^6$  cells/mlに調整した. II型コラーゲンは100°C, 30分間加熱処理後培地で希釈して用いた. 各個体より調整したリンパ節細胞は, 96穴平底細胞培養プレート (旭テクノグラス株式会社, 東京) に $5 \times 10^5$  cells/0.1ml/wellで分注し, 抗原なしのwell及び抗原としてII型コラーゲン100  $\mu$ g/mlを0.1ml加えたwell各4wellを作成し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>条件下で120時間培養した.

培養終了前18時間に[methyl-<sup>3</sup>H]Thymidine (アマシャム バイオサイエンス株式会社, 東京)18.5kBq/10  $\mu$ l/wellでパルスし, 細胞セルハーベスター (Skatron, Suffolk, UK) を用いてグラスファイバーフィルター (Skatron, Suffolk, UK) に回収し, シンチレーターカクテル (シンチゾールEX-H, 同仁化学, 熊本) を加えた後, <sup>3</sup>Hの取り込みを $\beta$ -カウンター (Aloka liquid scintillation system, 東京) を用いて測定した.

### 6. 統計

統計処理には統計解析ソフトSTATISTICA 98 Edition for Windows (statsoft Japan 株式会社, 東京) を使用した. 関節炎発症への灸刺激の影響をみた実験の検定法は, 発症率の推移 (Fig. 2~5のA) に対しては独立性の $\chi^2$ 検定を用い, 関節炎スコア, 腫脹, 体重の変化 (Fig. 2~5のB~D) に対しては二元配置法の経時的手法を用い, さらに交互作用項をTukey・Kramerの多重比較で検定を行った. II型コラーゲンに対するリンパ節細胞の特異的増殖反応における灸刺激の影響をみた実験 (Fig. 6) では一元配置分散分析法を行ってからTukeyの多重比較で検定した.

### III. 結果

**実験 1 :** 1mg灸左右1壮, 2回/週, 4週, 計9回の灸刺激によるII型コラーゲン誘発関節炎への影響

II型コラーゲンにより誘発されるマウスの関節炎発症への灸刺激の効果を検討するため, 1mg灸刺激を初回免疫から追加免疫までの4週間に週2回の割合で行い, 無刺激対照群と比較検討した. Fig. 2-Aは発症率の推移を示す. 対照群では32日目より関節炎が発症, その後上昇し36日目に100

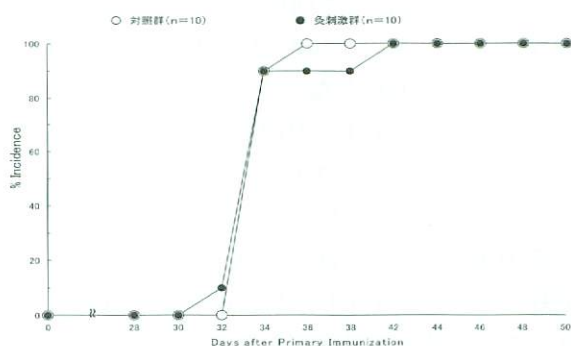


Fig. 2-A: 発症率の推移

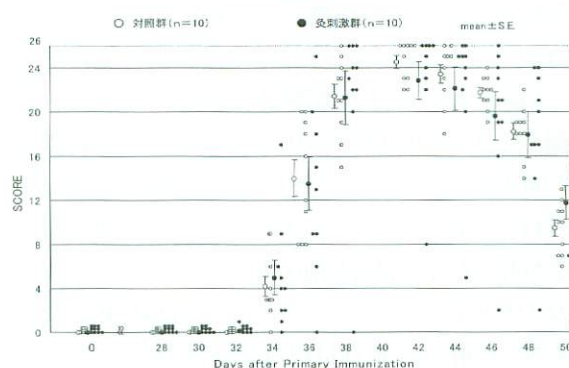


Fig. 2-B: 関節炎スコアの変化

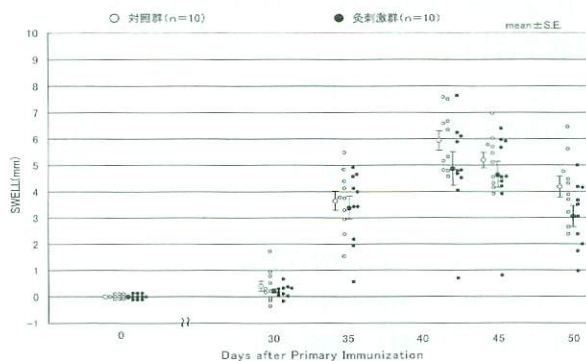


Fig. 2-C: 腫脹の変化

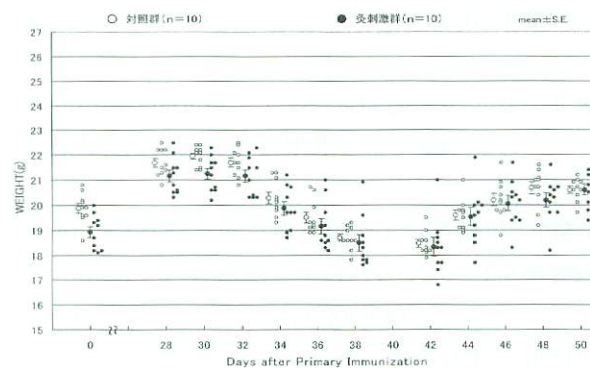


Fig. 2-D: 体重の変化

Fig. 2: 1mg灸左右1壮, 2回/週, 4週, 計9回の灸刺激によるII型コラーゲン誘発関節炎への影響

初回免疫から二次免疫の間に1mg灸を小腸俞穴相当部位に1壮ずつ週2回の割合で4週間行った時のII型コラーゲン誘発関節炎への効果を示した. Aは発症率の推移, Bは関節炎スコアの変化, Cは腫脹の変化, Dは体重の変化を示す.

%となった。灸刺激群でも同様のパターンを示したが発症が遅れたものが10例中1例あり、34日目に90%、42日目に100%となった。Fig.2-Bは関節炎スコアの変化を示す。対照群では関節炎発症にともない34日目以降スコアの上昇がみられ、42日目にピークとなり10例ともにスコア値20を超え、その後スコアの低下がみられた。灸刺激群も同様のパターンを示し、統計的有意差はみられなかったが、関節炎の発症が遅れた1例は、関節炎発症後もスコアが低く42日目でピークとなりスコアが8であった。Fig.2-Cは腫脹の変化を示す。2群とも30日目以降腫脹値が上昇し、42日目に最大となり対照群で $5.95 \pm 0.36$ mm、灸刺激群で $4.96 \pm 0.58$ mmとなった。その後腫脹の減退がみられた。統計的有意差は無かったが、関節炎の発症が遅れた1例は腫脹値が低く、42日目でピークとなり $0.96$ mmであった。Fig.2-Dは体重の変化を示す。2群とも32日目以降関節炎発症にともない体重の減少がみられ、42日目に最低となり、対照群では $18.5 \pm 0.2$ g、灸刺激群では $18.3 \pm 0.4$ gとなった。その後体重の回復がみられた。2群間に統計的有意差は無かったが、関節炎の発症が遅れた1例は体重の減少がみられず、前値30日目21g、42日目21gであった。

これらの結果より統計的有意差は無かったが、関節炎発症前に灸刺激をすることにより個体の中には関節炎発症が遅れ、発症後も関節炎のスコア値、腫脹値が低く、体重減少がみられなかったものが10例中1例あった。

## 実験2：1mg灸左右3壮、隔日、30日間、計16回の灸刺激によるII型コラーゲン誘発関節炎への影響

実験1では両群に差が得られなかったため、1回の刺激量を1mg灸左右1壮ずつから3壮ずつに増やし、さらに頻度を週2回から隔日に変えて、無刺激対照群と比較検討した。Fig.3-Aは発症率の推移を示す。対照群では32日目以降上昇し、36日目までに全例の発症が認められたが、灸刺激群では発症が遅延したものがあり34日目に60%、36日目に90%、40日目に100%となった。Fig.3-Bは関節炎スコア変化を示す。2群とも32日目から40日目までスコアの上昇がみられたが、灸刺激群では対照群と比べ34、36、38日目に統計的有意に低

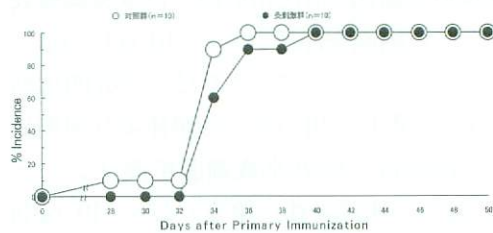


Fig.3-A:発症率の推移

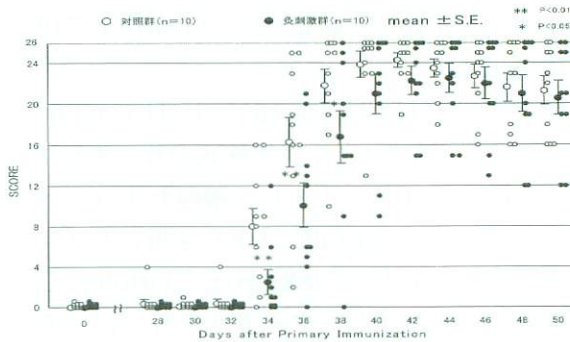


Fig.3-B:関節炎スコアの変化

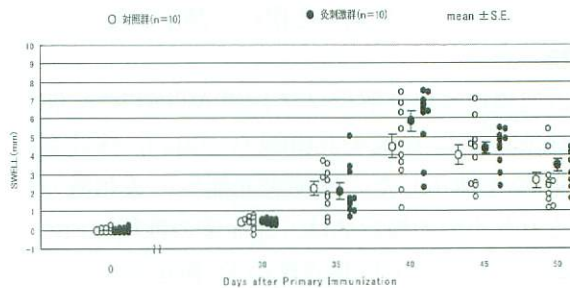


Fig.3-C:腫脹の変化

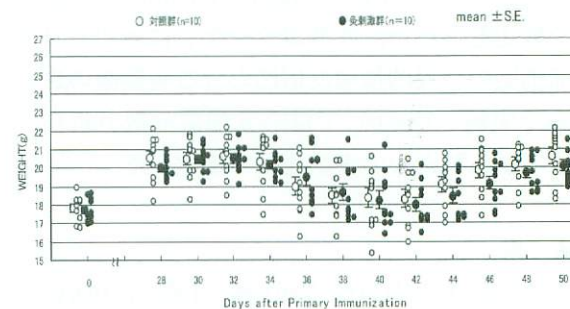


Fig.3-D:体重の変化

## Fig.3：1mg灸左右3壮、隔日、30日間、計16回の灸刺激によるII型コラーゲン誘発関節炎への影響

初回免疫から1mg灸を3壮ずつ隔日に30日間行った時のII型コラーゲン誘発関節炎への効果を示した。Aは発症率の推移、Bは関節炎スコアの変化、Cは腫脹の変化、Dは体重の変化を示す。

かった。(34, 36日目は $P<0.01$ , 38日目は $P<0.05$ ) スコア値が高くなる42日目以降では対照群と比較すると、有意差は無かったが灸刺激群で特にスコア値が低いものが2例あった。Fig.3-Cは腫脹の変化を示す。関節炎の発症にともない2群とも30日目以降腫脹値は上昇し、40日目に最大(対照群で $4.47\pm 0.65\text{mm}$ , 灸刺激群で $5.85\pm 0.58\text{mm}$ )となり2群間に統計的有意差はなかった。対照群では7.42mmから1.16mmまで点在し、灸刺激群では6mmから8mmの間に10例中7例が集中しており、灸刺激群の方が腫脹の平均値が高かった。その後2群とも腫脹の退行がみられた。Fig.3-Dは体重の変化を示す。2群とも32日目以降関節炎発症にともない体重の減少がみられ、対照群は40日目に、灸刺激群は42日目に最低となり、対照群で $18.3\pm 0.5\text{g}$ , 灸刺激群では $18.0\pm 0.4\text{g}$ となった。その後体重の回復がみられ2群間に統計的有意差は無かったが、灸刺激群で回復の遅れがみられた。

これらの結果から灸刺激群では対照群と比べ、関節炎スコアにおいては有意に低値を示し、発症の遅れたものがあった。

**実験3：初回免疫の4週間前から8週間1mg灸を左右1壮、2回/週、計17回あるいは0.4mg灸を左右2壮、3回/週、計25回の灸刺激によるII型コラーゲン誘発関節炎への影響**

実験2では初回免疫から30日間の灸刺激を行ったが、抗原投与前からの生体の調整を行うという健康増進の観点により初回免疫の4週間前から8週間と灸刺激期間を延ばし、刺激量として1mg灸と0.4mg灸を用いその効果を検討した。対照群は灸刺激群と同様に拘束を行った。Fig.4-Aは発症率の推移を示す。対照群は36日目までに7例中5例が発症し71.4%、1mg灸群は6例中3例が発症し50%であり、0.4mg灸群では7例中4例が発症し57.1%であった。50日目までに各群ともさらに1例ずつ発症し、対照群で85.7%、1mg灸群で66.7%、0.4mg灸群で71.4%となった。Fig.4-Bは関節炎スコア変化を示す。3群とも32日目以降スコアの上昇がみられた。統計的有意差は無かったが、0.4mg灸群で上昇の遅れがみられた。スコア値の高くなる42日目以降を対照群と比較すると有意差は無かったが、灸刺激を行った2群で平均値は低値を示した。また個体の中には対照群と比べスコ

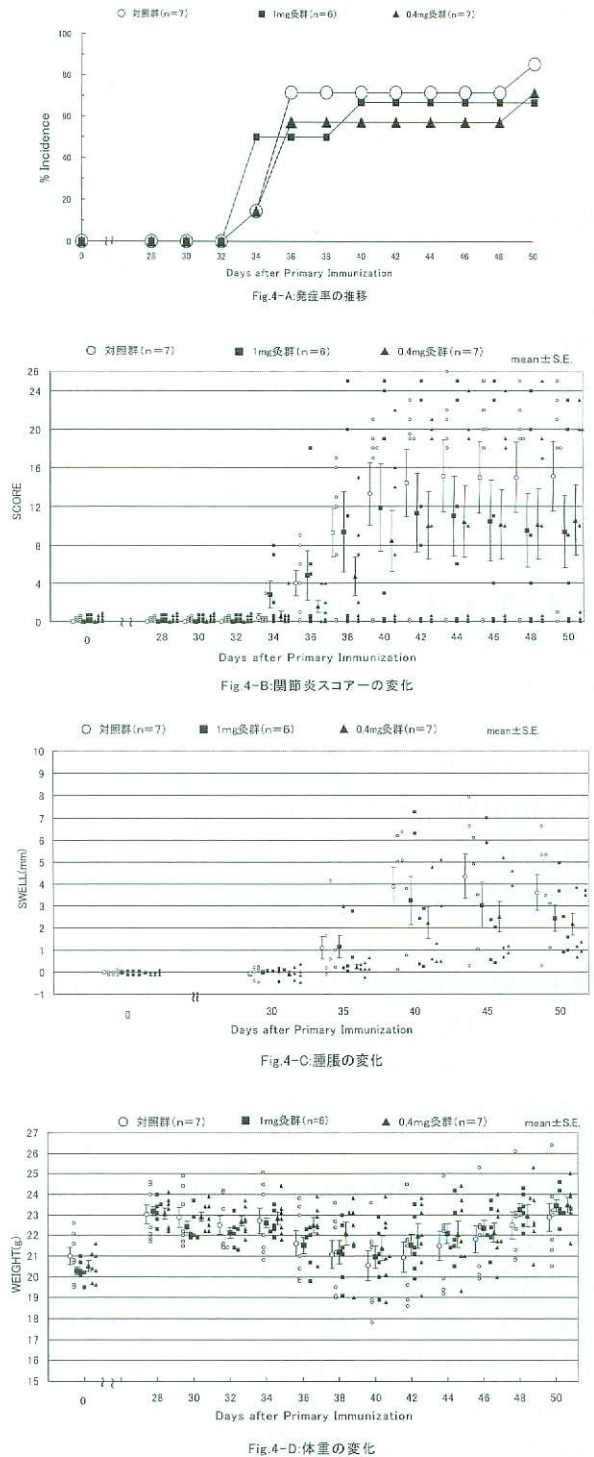


Fig.4：初回免疫の4週間前から8週間1mg灸を左右1壮、2回/週、計17回あるいは0.4mg灸を左右2壮、3回/週、計25回の灸刺激によるII型コラーゲン誘発関節炎への影響

初回免疫の4週間前から8週間1mg灸を1壮ずつ週2回行う群と0.4mg灸を2壮ずつ週3回行う群を用いた時のII型コラーゲン誘発関節炎への効果を示した。Aは発症率の推移、Bは関節炎スコアの変化、Cは腫脹の変化、Dは体重の変化を示す。

ア値の低いものが1mg灸群で2例、0.4mg灸群で1例あった。1mg灸群と0.4mg灸群を比較すると、統計的有意差はなかったが関節炎スコアのパターンが異なり、44日目までは0.4mg灸群の方が低値を示すが46日目を境として48、50日目では1mg灸群の方が低値を示した。Fig.4-Cは腫脹の変化を示す。3群とも30日目以降腫脹値が上昇し、45日目までに最大となった。統計的有意差は無かったが、対照群と比べると灸刺激を行った2群の方が平均値は低く、1mg灸群と0.4mg灸群を比較すると0.4mg灸群の方が低値を示した。また関節炎を発症したものの中で45日目での対照群よりも腫脹値が低いものは、1mg灸群では2例あり、0.4mg灸群では1例あった。Fig.4-Dは体重の変化を示す。3群とも34日目以降関節炎発症にともない体重の減少がみられ、40日目に最低となり、その後回復がみられた。統計的有意差は無かったが、対照群と比べ0.4mg灸群では体重減少の程度は少なかった。

これらの結果より対照群の発症率が約86%であり、各群の個体数も少なく明確ではないものの、抗原投与前からの灸刺激についての意義を示している可能性があった。

#### 実験4：命門穴相当部位に2mg灸を5壮、隔日に30日間、計16回の灸刺激によるII型コラーゲン誘発関節炎への影響

灸刺激による明らかな関節炎発症の予防効果をFangら<sup>15)</sup>が報告している。その灸刺激方法は、2mg灸5壮を命門穴相当部位に初回免疫から30日間隔日に行うものであった。われわれも同じ方法を用いて灸の効果を検討した。Fig.5-Aは発症率の推移を示す。関節炎の発症率は対照群で34日目以降上昇し、40日目までに全例の発症が認められたが、灸刺激群では発症が遅延し、36日目以降上昇がみられた。40日目までに10例中9例が発症したが、発症が抑制されたものが1例あった。Fig.5-Bは関節炎スコアの変化を示す。関節炎スコアの変化をみると2群とも36日目から42日目までスコアが上昇、その後50日目までスコア値が12から14の間で安定し、2群間に有意な差は認められなかった。Fig.5-Cは腫脹の変化を示す。腫脹の変化は35日目以降みられ、45日目にピーク（対照群で $3.85 \pm 0.74\text{mm}$ 、灸刺激群で $3.83 \pm 0.68\text{mm}$ ）

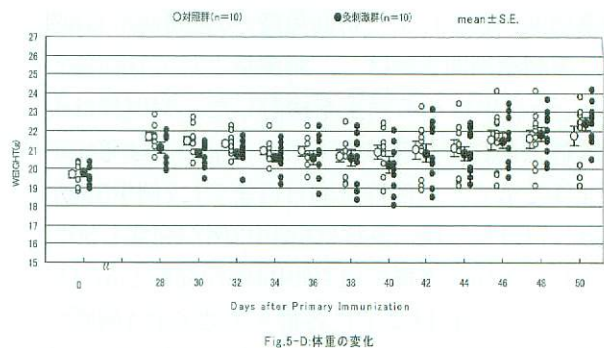
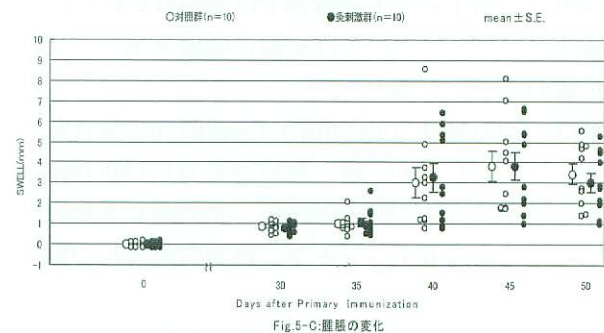
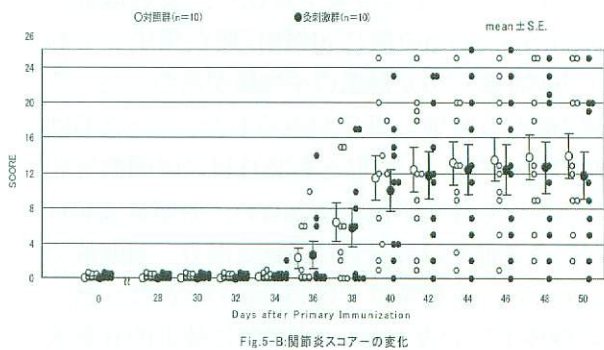
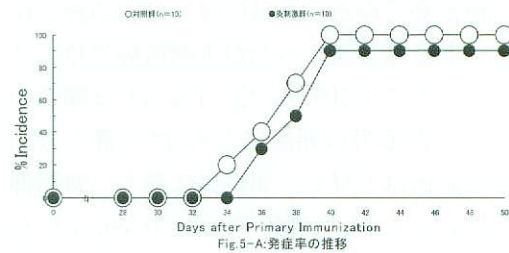


Fig.5：命門穴相当部位に2mg灸を5壮、隔日に30日間、計16回の灸刺激によるII型コラーゲン誘発関節炎への影響

初回免疫から2mg灸を命門穴相当部位に5壮、隔日に30日間行った時のII型コラーゲン誘発関節炎への効果を示した。Aは発症率の推移、Bは関節炎スコアの変化、Cは腫脹の変化、Dは体重の変化を示す

となり、その後低下がみられた。2群とも同様のパターンを示し、2群間に統計的有意差は認められなかった。Fig.5-Dは体重の変化を示す。体重の変化においても有意差は認められず、28日後から体重が減少、40日目頃までに最低値を示し（対照群で $20.7 \pm 0.3g$ 、灸刺激群で $20.2 \pm 0.5g$ ）、その後回復がみられた。

これらの結果より、Fangら<sup>15)</sup>の報告と同じ灸刺激を用いても、著明な関節炎予防効果は得られなかった。しかし、灸刺激群には発症が認められなかったものが10例中1例あった。

**実験5：リンパ節細胞のII型コラーゲンに対する特異的増殖反応への灸刺激の影響**

II型コラーゲン誘発関節炎に対する灸刺激の効果の個体差の要因を細胞レベルで検討するため、in vitroでリンパ節細胞のII型コラーゲンに対する特異的増殖反応を個体ごとに検討した。対照群及び灸刺激群の動物は、II型コラーゲンを15日間間隔で2回背部に免疫した。灸刺激は1mg灸を左右1壮ずつ隔日に22日間免疫部位の近傍に行い検討した。追加免疫後7日目にそれぞれの個体よりリンパ節細胞を調整し、抗原非添加及び添加時の増殖反応を比較検討した。

Fig.6で示すように、リンパ節細胞の抗原添加

時の増殖反応は、対照群の抗原(-)では $(2.69 \pm 0.34) \times 10^3$ cpmで、抗原(+)では $(9.37 \pm 2.25) \times 10^3$ cpmであり、灸刺激群の抗原(-)では $(2.53 \pm 0.54) \times 10^3$ cpmで、抗原(+)では $(6.89 \pm 2.20) \times 10^3$ cpmとなり、対照群と灸刺激群の間に有意な差は得られなかった。しかし、個体ごとにみると、対照群では抗原(+)で4例ともに増殖反応を示したのに対し灸刺激群では4例中2例に増殖反応が認められないものがあった。

このことから、II型コラーゲン誘発関節炎の発症過程において、個体によっては灸刺激が抗原特異的リンパ球の活性化を抑制することが示唆された。

**IV. 考 察**

DBA/1Jマウスにフロイント完全アジュバント(以下CFA)と共にエマルジョン化したウシII型コラーゲンを4週間間隔で2回尾根部と背部に皮内投与することで関節炎の誘導を行った。実験動物として関節炎モデルはMRL-lprマウス<sup>18)</sup>、SKGマウス<sup>19)</sup>やHTLV-1遺伝子導入トランスジェニックマウス<sup>20)</sup>等の自然発症モデルとII型コラーゲン誘発関節炎マウス及びラット<sup>18)</sup>、アジュバント関節炎ラット<sup>18)</sup>等の誘発モデルがある。自然発症モデルは遺伝的に関節炎を発症するタイプで、

Fig.6 II型コラーゲンに対するリンパ節細胞の特異的増殖反応

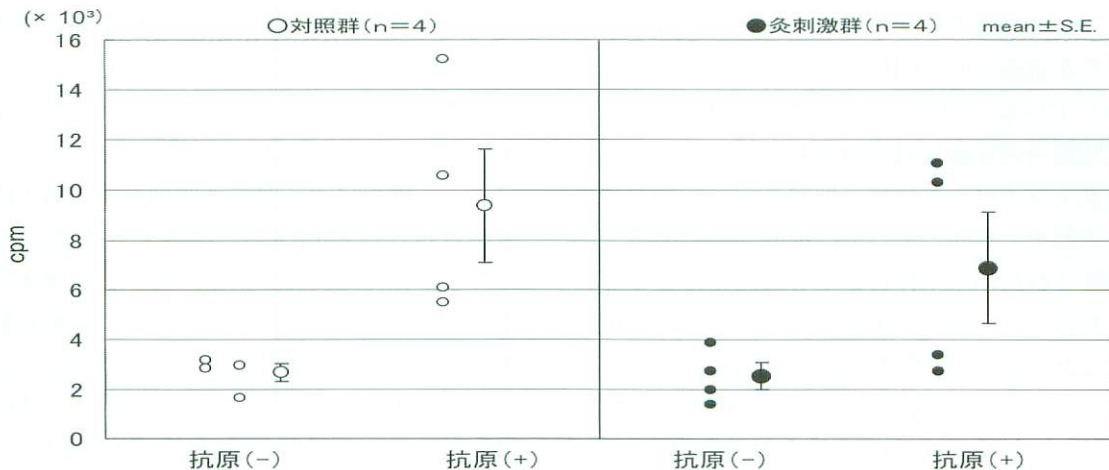


Fig. 6：リンパ節細胞のII型コラーゲンに対する特異的増殖反応への灸刺激の影響

II型コラーゲンを15日間間隔で2回背部に免疫し、対照群と灸刺激群から免疫部位のリンパ節細胞を調整し、in vitroでのII型コラーゲンに対する特異的増殖反応を個体ごとに検討した。灸刺激は1mg灸を左右1壮、隔日に22日間、計12回免疫部位の近傍に行った。

関節炎発症までの経過が誘発モデルと比べ長く、発症の時期や発症率が一定ではないこと、発症しても症状が緩徐であることから、各種の灸刺激を用い関節炎の予防効果をみる実験には不適であると考えられた。他方、誘発モデルは特定の抗原を感作することでリンパ球の抗原に対する免疫反応を介し、関節炎を発症するとされている<sup>21-23</sup>。灸刺激はリンパ球と関わる<sup>24</sup>とされていることから、抗原感作による免疫反応に関わり、関節炎の発症や進行に対し影響を与える可能性があるのではないかと考え、誘発モデルを選択した。アジュバント関節炎は、多発性関節炎のみならず皮膚・粘膜や種々の臓器に随伴症状を示すとされる<sup>25</sup>。一方、II型コラーゲン誘発関節炎は関節の軟骨の構成成分であるII型コラーゲンに特異的なT細胞<sup>26</sup>やリウマチ因子<sup>27</sup>も見られ、耳介を除き関節外病変を認めず<sup>28</sup>、関節を中心とした炎症々状を呈するとされ、RAにより近いモデル動物といわれている<sup>27</sup>ので、関節炎モデル動物としてII型コラーゲン誘発関節炎マウスを用いることにした。

DBA/1Jマウスは初回免疫後32日目頃から発症し、45日目頃までに関節炎スコアの上昇、腫脹の増大がみられ、その後関節炎は退行したが、マウスの中には関節の変形を残すものが観察された。関節炎の50日目での発症率は、85.7%~100%であった。Fang<sup>15</sup>、Courtenary<sup>28</sup>らもII型コラーゲンをDBA/1Jマウスに免疫し、23~30日頃から発症し、足の関節の症状が増悪、結果的に炎症は退行するが組織学的に関節の破壊がみられたことを報告している。実験1, 2, 3ではII型コラーゲン誘発関節炎の発症に対する灸刺激の影響を小腸脛相当部位を選び、刺激量と期間を変えて検討した。その結果、条件によっては抑制効果のあることが示唆されたが、全体として有意差を得ることは出来なかった。他方、Fangら<sup>15</sup>は、命門穴相当部位に2mg灸を5壮ずつ、隔日に初回免疫から30日間行った結果、発症率、関節炎の程度、II型コラーゲンに対する抗体レベルが対照群に比べ、有意に抑制されたと報告している。そこで、実験4では命門穴相当部位に同様の灸刺激を用い検討したが、発症が抑制されたものは10例中1例のみであり、関節炎スコアと腫脹の変化を対照群と比較したところ有意差は得られなかった。選穴の

差異についてはわれわれは臨床上の理由から小腸脛相当部位を用いたが、Fangら<sup>15</sup>の命門穴相当部位との差は無かったものとする。

0.4mg灸左右2壮ずつ、週3回の割合で8週間行った群(0.4mg灸群)では関節炎スコアが低く、腫脹も小さく、関節炎発症にともなう体重の変化においても減少の程度が少なかった。個体の体重変化は体力、体調の全体的表徴と考えられており、0.4mg灸群は体力を低下させず、関節炎の程度を軽度に維持していたと考えられ、関節炎の予防に適した灸刺激と考えられた。1mg灸左右3壮ずつ、隔日に30日間行った群では関節炎スコア上昇の遅れがみられたが、関節炎が発症した後体重が低下し、その回復に遅れがみられた。この灸刺激は関節炎の進行を遅らせると同時に、体力の回復も遅らせていたので刺激が過剰で適刺激ではないと考えられた。個体に強烈なストレス刺激が加えられた時、体力は消耗し、体重が減少し、死に至る過程がストレス学説<sup>29,30</sup>で述べられている。灸刺激が適量であれば抵抗力を増加させ、体力・体重も増加すると考えられることから、体重の変動についても今後注目し検討したいと考えている。鍼灸治療では慢性関節リウマチに対し一般的に弱刺激を用いて、長期間施術されており<sup>31</sup>、実験3の結果は臨床と一致する結果であると考え、このことから、予防的に弱い刺激を長期に施すことが適刺激であると思われた。

今回の実験では対照群と比べ統計的有意差は得られなかったが、すべての実験群を通じて施灸をした個体の中には関節炎を発症しなかったものや、発症したものの中にも関節炎スコアが低く、腫脹の程度が抑えられたものがあった。従って個体によっては灸による発症予防効果がある可能性が示唆された。Fangら<sup>15</sup>の結果は灸刺激群で有意に発症が抑えられていたが、発症した個体も14例中6例あったことから、われわれの実験も個体の中には効いたものがあるという点で一致していた。個体差が出たことについては今回用いた評価法や観察だけでは検討出来ないが、免疫されたコラーゲン溶液量や灸刺激の微妙な個体間の差など多くの因子が考えられる。

II型コラーゲンを15日間間隔で2回背部に免疫し、対照群と灸刺激群から免疫部位のリンパ節細胞を調製し、in vitroでのII型コラーゲンに対す



る特異的増殖反応を個体ごとに検討した結果、対照群で全例増殖反応を示したのに対し、灸刺激群で増殖反応が完全に抑制された個体が半数認められた。このことから、灸刺激が個体によっては抗原特異的リンパ球の活性化の段階で作用することが示唆された。Ⅱ型コラーゲン誘発関節炎発症の予防効果を検討した実験結果とリンパ節細胞の特異的増殖反応の実験結果から、灸刺激のⅡ型コラーゲン誘発関節炎に及ぼす影響には個体差があることが示唆された。Ⅱ型コラーゲン誘発関節炎の発症の機序として、Ⅱ型コラーゲンの免疫により、マクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞がⅡ型コラーゲンを捕らえて、リンパ節へ運び、T細胞に抗原を提示する。それによりT細胞が活性化、サイトカインを放出し白血球（単球、リンパ球、好中球）が活性化する。その後活性化した白血球が関節へ移動し、接着分子を介して血管内皮と接着、血管外に遊出する。次に白血球が細胞外基質蛋白であるコラーゲンやフィブロネクチンなどと接着し持続的に活性化され、単球やリンパ球からサイトカインが産生され、好中球からは蛋白分解酵素、血小板活性化因子や活性酸素などが産生される。これらの作用によって骨、軟骨組織の破壊が起るものと考えられている<sup>32)</sup>。実験5の結果灸刺激群で増殖反応が抑制されたことは、灸刺激がストレス刺激となり免疫能を低下させT細胞の機能が低下して関節炎が起りにくかった可能性がある。しかし、実験2の灸刺激群では関節炎発症後の体重の回復が遅れていたが、実験3の0.4mg灸群では体重の回復を早めていたことから、灸刺激は単なるストレス刺激ではないと考えている。このように刺激の違いにより、体重の変化が起ることは灸独特の効果である可能性がある。一方、灸刺激は神経を介し自律神経系、内分泌系、末梢知覚神経等に関与し、その作用分子として神経伝達物質、神経ペプチド、サイトカイン等が関与し免疫系に作用することが考えられている<sup>33)</sup>。灸刺激は直接又は間接的にこれらを介して抗原特異的リンパ球の活性化を抑制する可能性も推測される。

以上のことより、灸刺激を行った群では個体によっては明らかに効いているものもあるので、今後はⅡ型コラーゲン誘発関節炎を予防できる灸刺激方法をより詳細に探る必要がある。灸刺激がⅡ

型コラーゲンに対する抗原特異的リンパ球の活性化を抑制するならば、関節炎発症の予防に繋がることが期待できるので、最適な灸刺激方法を明確にしたいと考えている。

## V. 結 語

1. Ⅱ型コラーゲン誘発関節炎の発症に対する灸刺激の影響をその刺激量と期間を変えて検討した結果、抑制効果としては有意差を得ることが出来なかった。しかし施灸、特に0.4mg灸を長期間施した個体の中には関節炎発症が抑制され、炎症の程度も軽く抑制されたものがあり、個体の条件次第では灸による関節炎発症の予防効果がある可能性が示された。
2. リンパ節細胞のⅡ型コラーゲンに対する特異的増殖反応では、対照群 (n=4) の全例で増殖反応を認めたのに対し、灸刺激群(n=4)では増殖反応が完全に抑制された個体が4例中2例認められた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、動物実験の初歩から終始懇切なるご指導を賜りました明治鍼灸大学免疫・微生物学教室 雨貝孝教授に深謝いたしますと共に研究の過程において、有益な御助言を賜りました糸井マナミ講師、塚本紀之講師に厚く感謝いたします。

また、有益なるご助言を頂きました京極方久名誉教授に、心から厚く感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) 入江靖二：図説深谷灸法。自然社、東京、pp250-252、1980。
- 2) 井垣清明、池上正治、浅川 要ら：鍼灸学。刊々堂出版社、東京、pp634-635、1977。
- 3) (社)日本鍼灸師会保険部：医療保険等の取り扱い資料 (改正版)。日本鍼灸新報7月号 435：1-14、1998。
- 4) 丹沢章八：慢性関節リウマチ。理療 19 (3・4)：176-179、1990。
- 5) 野上貞夫：慢性関節リウマチ。理療 19(3・4)：180-189、1990。
- 6) 鎌野俊彦：慢性関節リウマチの鍼灸・漢方治療。日本東洋医学雑誌 46(5)：90-100、1996。
- 7) 坂井友実：RAに対する鍼灸治療の果たす役割。医道の日本 621：19-28、1996。

- 8) 西條一止：慢性関節リウマチに対する鍼灸臨床。日本温泉気候物理医学会雑誌 43 (1・2) : 21-28, 1979.
- 9) Guan Z., Zhang J. : Effects of acupuncture on immunoglobulins in patients with asthma and rheumatoid arthritis. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 15(2) : 102-105, 1995.
- 10) Zhao P. : Rheumatic arthritis treated with acupuncture : clinical observation of 368 cases. *International Journal of Clinical Acupuncture* 4(4) : 419-421, 1993.
- 11) Sun L. : Treatment of rheumatoid arthritis by warming needle. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 12(1) : 41-44, 1992.
- 12) Zhu Y., Chen X., Han H., et al : The influence of moxibustion on immune function in the treatment of rheumatoid arthritis. *American Journal of Acupuncture* 19(4) : 315-317, 1991.
- 13) Liu X., Sun L., Xiao J., et al : Effect of acupuncture and point-injection treatment on immunologic function in rheumatoid arthritis. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 13(3) : 174-178, 1993.
- 14) Li C., Jiang Z., Li Y., et al : Therapeutic effect of needle warming through moxibustion at twelve shu points on Rheumatoid arthritis. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 19(1) : 22-26, 1999.
- 15) Fang J., Aoki E., Seto A., et al : Influence of moxibustion on collagen-induced arthritis in mice. *In Vivo* 12 : 421-426, 1998.
- 16) 代田文誌：沢田流聞書鍼灸真髓。医道の日本社，神奈川，pp69-70, 1974.
- 17) 松山恵子，岸原健二，鎌田直幸ら：「免疫ミルク」の抗炎症効果とマウスコラーゲン関節炎に対する抑制効果。日本免疫学会総会・学術集会記録 30 : 180, 2000.
- 18) 安部千之：関節炎モデル。室田誠逸，柏崎禎夫編：炎症と抗炎症戦略，医薬ジャーナル社，大阪：pp469-482, 1997.
- 19) 坂口教子，坂口志文：リウマチ様関節炎自然発症モデルマウスの確立：胸腺，自己反応性T細胞の関与。臨床免疫 29(12) : 1470-1478, 1997.
- 20) 岩倉洋一郎：慢性リウマチの疾患モデル。最新医学別冊 : 20-33, 2000.
- 21) Kakimoto K., Katsuki M., Hirofuji T., et al : Isolation of T cell line capable of protecting mice against collagen-induced arthritis. *The Journal of Immunology*, 140(1) : 78-83, 1988.
- 22) Trentham D. E., Dynesius R. A., David J. R. : Passive transfer by cells of type II collagen-induced arthritis in rats. *The Journal of Clinical Investigation* 62 : 359-366, 1978.
- 23) Van Eden W., Thole J. E., Van der Zee R, et al : Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331(6152) : 171-173, 1988.
- 24) 岩竹修司，伊関孝一，岡本高明ら：モルモット施灸によるリンパ球の動態。全国東洋医学学校協会学会誌 5 : 84-87, 1981.
- 25) 坪井紀興：ラットII型コラーゲン関節炎とアジュバント関節炎における炎症・活動性の検討。東京医科大学雑誌 50(4) : 559-568, 1992.
- 26) 宮原寿明，佛淵孝夫：実験関節炎（コラーゲン関節炎／アジュバント関節炎）。臨床免疫 23 (7) : 1024-1033, 1991.
- 27) 古賀敏生，樽谷 晋：コラーゲン関節炎。臨床科学 27 (9) : 1090-1095, 1991.
- 28) Courtenary J. S., Margaret J. D., Dayan A. D., et al : Immunization against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 283(14) : 666-668, 1980.
- 29) 田多井吉之助：ストレス。創元社，大阪，pp37-38, 1980.
- 30) 河野友信，田中正敏：ストレスの科学と健康。朝日書店，東京，pp14, 1986.
- 31) 代田文誌：治験例を主とした針灸治療の実際（下巻）。創元社，大阪市，pp6-9, 1967.
- 32) 天野宏一：RAにおけるサイトカインネットワーク。RA&セラピー 6 (1) : 4-8, 2000.
- 33) 雨貝 孝，糸井マナミ，平井伸明：鍼灸刺激にみる生体防御系の応答。丹沢章八，尾崎昭弘編：鍼灸最前線，医道の日本社，神奈川，pp68-73, 1997.

## Preventive Effect of Moxibustion on Collagen-Induced Arthritis in Mice

†MATSUKUMA Hideaki<sup>1)</sup>, SHINOHARA Kanae<sup>2)</sup>, NAKAMURA Tatsuzo<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Clinical Acupuncture and Moxibustion,  
Graduate School of Acupuncture and Moxibustion, Meiji University of Oriental Medicine

<sup>2)</sup> Department of Health Promoting Acupuncture and Moxibustion,  
Meiji University of Oriental Medicine

## Abstract

**[Purpose]** The present study investigated the prophylactic effect of moxibustion on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice in vivo.

**[Methods and Results]** Mice were immunized intradermally twice at 4-week intervals with type II collagen (C II). Arthritis started to become prevalent around day 30 after the first immunization. In experiment 1 : Moxibustion was applied at the acupoint equivalent of BL27. For direct moxibustion, we applied two 1mg moxa cones in each session. Stimulation was performed twice a week from day 0 to day 28 after the first immunization. There were no significant differences between the moxibustion group and the control group throughout the experimental period. In experiment 2 : We applied six 1mg moxa cones to the same point in each session. Stimulation was performed every other day from day 0 to day 30 after the first immunization. Progression of the arthritis score was delayed in the moxibustion group. And the arthritis scores for two of ten animals in the moxibustion group were markedly lower than those in the control group. In experiment 3 : The animals were divided into three groups : the control group without stimulation ; the 1mg moxa group receiving two 1mg moxa cones twice a week ; the 0.4mg moxa group receiving four 0.4mg moxa cones three times per week. Moxibustion was applied to the same point for 56 days from day 28 before the first immunization. There were no significant differences between the two moxibustion groups and the control group throughout the experimental period ; however, the incidence of arthritis in the moxibustion groups were lower than that in the control group on day 36 after the first immunization (50% in 1mg moxa group, 57% in 0.4mg moxa group and 71% in the control group). And, the arthritis scores for two of six animals in the 1mg moxa group and one of seven in the 0.4mg moxa group were especially lower than in those the control group. In experiment 4 : We applied five 2mg moxa cones to GV4 in each session. Stimulation was performed every other day from day 0 to day 30 after the first immunization. There were no significant differences between the moxibustion group and control group throughout the experimental period. In experiment 5 : To determine how moxibustion enhances the proliferative response to C II in vitro, we isolated the draining lymph node cells from mice that had been immunized with C II. We applied two 1mg moxa cones in each session. Stimulation was performed every other day from day 0 to day 22 after the first immunization. All 4 animals in the control group showed proliferation of lymphocytes, however 2 of 4 animals in the moxibustion group suppression of proliferation.

**[Discussion]** There were no significant differences in the moxibustion group and control group between groups throughout the experimental period; in some moxibustion groups the onset of arthritis was suppressed. We suggest that moxibustion may contribute to preventing the onset of arthritis. Furthermore, moxibustion may be useful for suppressing the activation of antigen-specific lymphocytes.

---

Received on July 19, 2002 ; Accepted on September 13, 2002

† To whom correspondence should be addressed.

Meiji University of Oriental Medicine, Hiyoshi-cho, Funaigun, Kyoto 629-0392, Japan