

鍼刺激がヒト末梢血NK活性及び NK細胞サブセットに及ぼす影響

渡辺 勝之¹ 篠原 昭二¹ 水沼 国男² 林田 一志³
糸井マナミ³ 近藤 裕一³ 雨貝 孝³

¹明治鍼灸大学 鍼灸診断学教室

²明治鍼灸大学 経絡・経穴学教室

³明治鍼灸大学 免疫・微生物学教室

要旨：ヒトの免疫機能に及ぼす鍼の効果については未だ明らかとなっていない。そこで今回は、ウイルス感染の初期防御や腫瘍細胞に対して重要な働きをされているNK細胞に着目し、ヒトを対象として実験を行った。鍼刺激群は両側足三里（ST36）に置鍼を10分間おこない、対照群は採血のみとし、実験中の環境条件を一定とした。その結果、鍼刺激群の60%、採血刺激群の50%で末梢血NK活性の増強が認められ、それらが末梢血NK細胞サブセットとされるCD16およびCD57陽性細胞率の上昇と平行していた。また同じ刺激を行っても反応に『個体差』があることが明らかとなった。これらのことから、鍼および採血刺激がNK活性ならびにNKマーカー陽性細胞比率の増強をひきおこすことが示唆された。

I 緒 言

NK細胞は腫瘍に対する免疫学的監視機能、ウイルスなどの感染の制御、さらにはある種の血液疾患や膠原病、消化器疾患などに密接に関与している¹⁾。またマウスやラットを対象として、様々なストレス restraint²⁾、foot shock³⁻⁵⁾、cold water⁶⁾、rotation⁷⁾、communication box^{8,9)}の負荷によりNK活性が低下することが多数報告されている。一方、ヒトを対象としたものでは、運動負荷¹⁰⁻¹⁵⁾、心理的ストレス¹⁶⁻¹⁹⁾、身体的ストレス^{20,21)}によるNK活性の変化が報告されている。

またこれまでに、鍼通電刺激により末梢血のNK活性が高まるという報告²²⁾がなされている。しかし、ヒトを対象とする研究では、様々なストレスラーおよび環境要因の関与が避け難くこのよ

うな変化が純粋なストレスおよび鍼灸刺激によるものであると断定することは難しい。そこで今回ヒトを対象として、できる限り環境条件を一定にし、短時間での実験とすることによりサーカディアンリズムの影響を少なくして、鍼刺激による末梢血NK活性および末梢血NKサブセット（CD16、CD57）に及ぼす影響を検討した。

II 対象及び方法

1) 対 象

健康成人男性11例を2群に分けた。年齢は20歳～26歳（平均22歳）。NK活性の測定には、鍼刺激群（足三里・置鍼10分+採血3回）5例、採血対照群（採血3回のみ）6例とした。実験条件は、午前8：00～午後1：00の間、室温25±1℃の同室内とした。

Key Words : ヒト Human, 鍼 Acupuncture, NK活性 Natural Killer Activity, NK細胞サブpopulation Natural Killer Subpopulation

2) 方 法

① 刺 激

鍼刺激群は安静座位にて、両脚を前方の同じ高さの椅子に乗せて伸展し、両側足三里（ST36）に40ミリ18号鍼にて10分間置鍼を行った後、安静座位とした。採血対照群も同様に安静座位とした。

② 採血及びリンパ球単球分画採取

鍼刺激群は、鍼刺激前、刺激30分後及び180分後の計3回、前腕より末梢血を約10ml採血を行った。採血対照群も同様に計3回採血を行った。採取した血液を、ヘパリンを1000U/ml加えたPBS 5ml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、Eagle Minimum essential medium (MEM)にて遠心洗浄後使用した。

③ NK活性の測定

採取した単核球を effector 細胞 (E) とし、K562細胞を target 細胞 (T) とした。K562細胞は、 1×10^5 個に対して、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (アマシヤム製: 37MBq/ml) 100 μl を加え、37°Cで60分間標識し、MEMで5回洗浄し、5%FCSを加えたRPMI 1640に浮遊させた。T細胞数は 2×10^4 個とし、E/T比を20:1で96穴U字型マイクロプレートの各孔に入れ、1500rpm、30秒間遠心後、5%CO₂培養器内で6時間インキュベートした。次にプレートを1500rpm、10分間遠心し、各ウェルから上清100 μl ずつをカウントチューブに集め、その放射性活性をガンマカウンターにて測定した。自然遊離としてE細胞の代わりに5%FCSを加えたRPMI 1640を、また最大遊離として終濃度1%のSodium dodecylsulfateを加えたものを用いた。NK活性は下記の式により求めた。

% cytotoxicity =

$$\frac{\text{実験群の平均cpm} - \text{自然遊離cpm}}{\text{最大遊離cpm} - \text{自然遊離cpm}} \times 100$$

④ NK細胞サブポピュレーションの測定

FITC標識抗Leu7 (CD57) および FITC 標識抗 Leu11a (CD16) (Becton Dickinson, San Jose) を用いた。末梢血単核球にそれぞれの標識抗体を加え、4°C、30分間反応させた後、2回洗浄した。

染色した細胞のリンパ球膜表面マーカーを、Laser Flowcytometry, FACScan (Becton Dickinson 社製) を用いて測定し、陽性細胞率 (%) を求めた。

III 結 果

① NK活性の変化

まず、予備実験として被験者を刺激時間以外は日常生活を送らせる条件下で、鍼刺激前、鍼刺激直後、刺激後3時間目と7時間目のNK活性の変動を検討した。その結果、鍼刺激後、個体ごとに経時的に一定の変化が認められず、日常生活動作またはサーカディアンリズムによる変化が極めて大きいと思われ、鍼刺激による効果の検討が困難であった。

そこで本実験では、被験者は実験中同一室内環境下で安静座位とし、またサーカディアンリズムの影響も最小限にするため、刺激後180分までは安静座位として実験を行った。その結果、鍼刺激群 (N=5) では、刺激後30分、180分共に、3例が上昇し、2例が低下した。採血対照群 (N=6) では、刺激後30分では、2例が上昇、2例が低下、残り2例では変化が見られなかった。180分後では、3例が上昇、2例が低下、残り1例は変化が見られなかった。

この結果から、鍼刺激のみならず採血刺激そのものが皮膚神経系を介して、末梢血NK活性を上昇もしくは低下のいずれにも変動することが示唆された。またこの際、経穴への鍼刺激による特異的な変化としては認められなかった。(図1, A, B)

② NK細胞サブポピュレーションの変化

a) CD57 (Leu7) 陽性細胞率の変化

鍼刺激群では、刺激後30分に5例中3例は上昇し、2例は変化が見られなかった。180分後では5例中3例が顕著に上昇を示したが、2例はほとんど変化を示さなかった。NK活性が上昇したヒトでは3例中2例は陽性細胞率も上昇しているが、1例はほとんど変化しなかった。NK活性が低下したヒトでも1例は陽性細胞率が上昇し、もう1

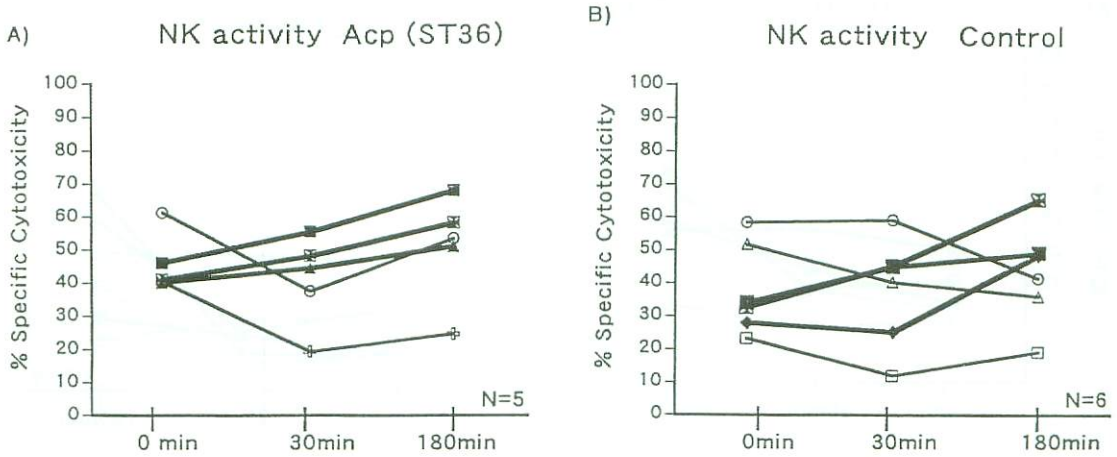


図1 ヒト末梢血NK活性の変化

- A) 鍼刺激群：足三里 (ST36) 置鍼10分による、刺激前・刺激後30分・刺激後180分の末梢血NK活性の変化を示した。太線はNK活性が上昇したヒト3例を、細線はNK活性が低下したヒト2例を示す。N=5とした。
- B) 採血対照群：採血のみのコントロールにおける末梢血NK活性の変化を示した。太線はNK活性が上昇したヒト3例を、細線はNK細胞活性が無変化または低下したヒト3例を示す。N=6とした。

例は変化しなかった。

採血対照群では、刺激30分後では、あまり変化を示さないが、180分後では1例がやや低下し、1例が変化せず、4例が上昇を示した。NK活性が上昇したヒトでは3例共に陽性細胞率も上昇しているが、NK活性が低下したヒトでは1例が陽性細胞率が上昇し、2例は変化を示さなかった。

鍼刺激群と採血対照群とでは同様な変化が認められ、経穴への鍼刺激による特異的な変化としては認められなかった。(図2, A,B)

b) CD16 (Leu11a) 陽性細胞率の変化

鍼刺激群では、刺激後30分には有意な変化は認められず、180分では3例が上昇を示し、2例はほとんど変化を示さなかった。NK活性が上昇したヒトでは3例中2例は陽性細胞率も上昇しているが、1例はほとんど変化を示さなかった。NK活性が低下したヒトでは1例が陽性細胞率の上昇を示し、もう1例は変化を示さなかった。

採血刺激群では、刺激後30分ではあまり変化を示さないが、180分では3例が顕著に上昇を示し、

残り3例はほとんど変化を示さなかった。NK活性が上昇したヒトでは2例は顕著に陽性細胞率も上昇しているが、1例はやや上昇を示した。NK活性が低下したヒトでは1例は陽性細胞率が上昇し、2例は変化を示さなかった。

各個体ごとの変化を見ると、NK活性とCD57陽性細胞率、CD16陽性細胞率の変化は、ほぼ平行していたので、活性増強はNK細胞数の増大を反映すると思われる。しかし、NK活性低下の要因についてNK細胞サブポピュレーションの変化のみでは説明できない。また、鍼刺激群と採血対照群とは同様な変化が認められ、CD57陽性細胞率の変化と同様、経穴への鍼刺激の特異性は認められなかった。(図2, C,D)

IV 考 察

鍼刺激により末梢血NK活性が増強するヒトと低下またはほとんど変化しないヒトとの個体の反応性の相違が認められた。同様な変化は採血のみの対照群でも認められ、採血行為自体が皮膚から

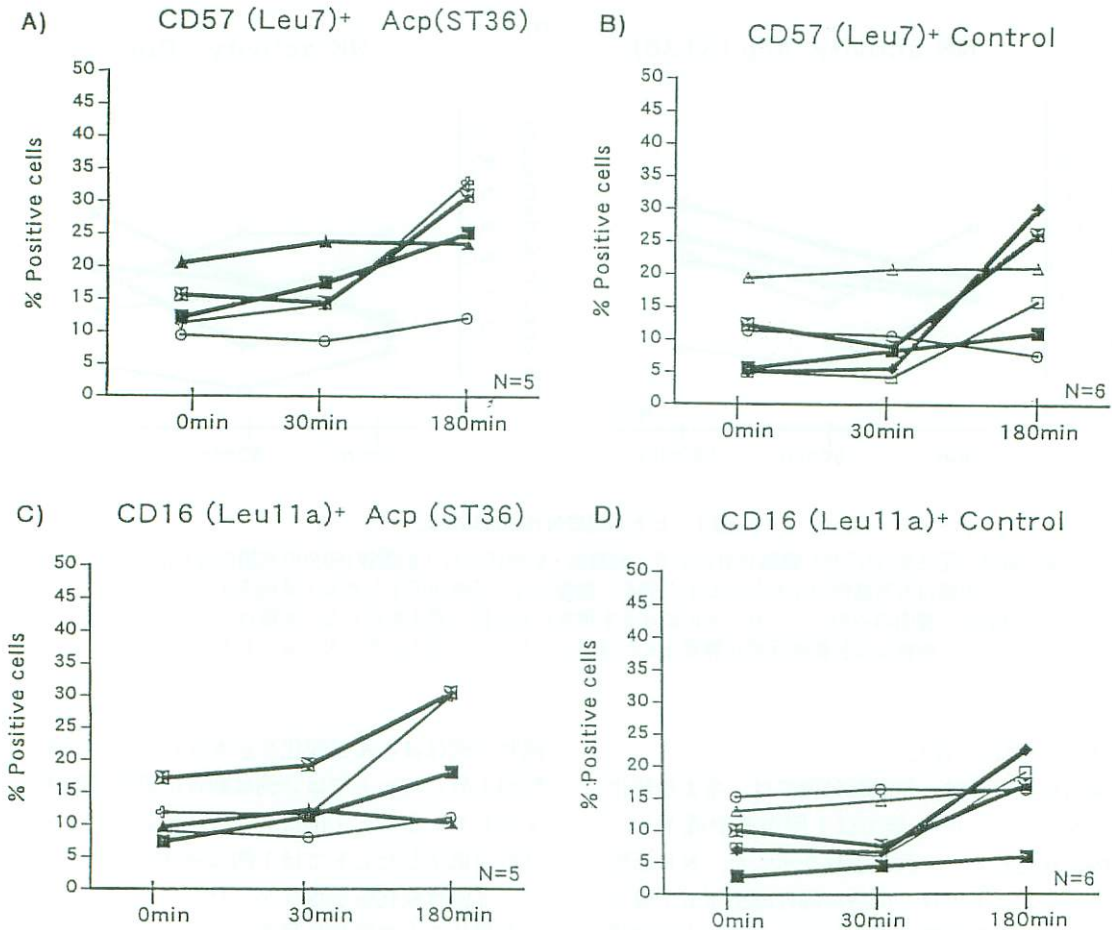


図2 ヒト末梢血NK細胞サブポピュレーションの変化

A) 鍼刺激群の CD57 (Leu7) 膜マーカー陽性細胞率の変化

足三里 (ST36) 置鍼10分による, 刺激前・刺激後30分・刺激後180分の末梢血CD57膜マーカー陽性細胞率の変化を FACS 解析した結果を示した。太線はNK活性が上昇したヒト3例を, 細線はNK細胞活性が低下したヒト2例を示す。N=5とした。

B) 採血対照群の CD57 (Leu7) 膜マーカー陽性細胞率の変化

採血のみのコントロールにおける末梢血CD57膜マーカー陽性細胞率の変化を FACS 解析した結果を示した。太線はNK活性が上昇したヒト3例を, 細線はNK活性が無変化または低下したヒト3例を示す。N=6とした。

C) 鍼刺激群の CD16 (Leu11a) 膜マーカー陽性細胞率の変化

足三里 (ST36) 置鍼10分による, 刺激前・刺激後30分・刺激後180分の末梢血CD16膜マーカー陽性細胞率の変化を FACS 解析した結果を示した。太線はNK活性が上昇したヒト3例を, 細線はNK細胞活性が低下したヒト2例を示す。N=5とした。

D) 採血対照群の CD16 (Leu11a) 膜マーカー陽性細胞率の変化

採血のみのコントロールにおける末梢血CD16膜マーカー陽性細胞率の変化を FACS 解析した結果を示した。太線はNK活性が上昇したヒト3例を, 細線はNK活性が無変化または低下したヒト3例を示す。N=6とした。

の刺激となって変化を引き起こすことが示唆された。末梢血のNK細胞サブポピュレーションのマーカーであるCD16とCD57陽性細胞比率は共に、鍼および採血刺激により上昇する傾向が認められた。採血刺激のみでも鍼刺激と同様な変化が認められた。このことは、鍼または採血による皮膚刺激により、経穴特異性なしにNK活性の増強が起こり、そのかなりの部分がNKマーカー陽性細胞の増加に依存することが示唆され、さらにその反応には個体差があることがわかった。

これまでに我々は鍼刺激によるマウス末梢血リンパ球サブポピュレーションの変化を検討し、拘束群と比較して鍼刺激後30分に単球がまた60分にはヘルパーT細胞・ α 陽性T細胞の比率が有意に上昇し、逆にB細胞は60分後に有意に低下する結果を得ている²³⁾ので、今回の鍼や採血によるNK活性の変化の一部はNK細胞の末梢血への移入によるものと考えられる。他方、 α および γ -インターフェロン、インターロイキン-2、 β -エンドルフィン等が*in vitro*においてNK活性を上昇させるという報告^{1,9)}がなされている。また、鍼刺激により血中 β -エンドルフィンが上昇するという報告²⁴⁻²⁹⁾がある。さらに我々はマウスでは鍼刺激によりIL-6のみ³⁰⁾が産生され、ヒトでは鍼刺激によりIL-1およびIL-6が合谷穴への刺激特異的に産生されることを報告している³¹⁾。このようなニューロペプチドやサイトカインが鍼刺激により産生または放出されることにより、末梢血NK活性と末梢血NK細胞サブポピュレーションに変化をもたらすのではないかと考えられる。しかし、NK活性、NK細胞サブポピュレーションは採血のみでも変化をもたらすことから、皮膚への針刺激全般とNK細胞との関連を検討する必要がある。

今回見出された、末梢血NK活性と末梢血NKサブポピュレーションの上昇は、足三里穴への鍼刺激による特異的変化ではなかった。しかし、我々の以前の研究ではIL-6の産生は、合谷穴への刺激特異的に発現していた³¹⁾。このことから、鍼灸刺激と免疫系調節作用の関連について、今後

十分に検討されなければならない。

また同一の鍼刺激により、NK活性及びNK細胞サブポピュレーションの動きがクリアーに変化するヒトとしないヒトと、個体による相違・『個体差』が認められた。今後、ヒトを対象としては、測定条件の一層の均一化、個体の特異性・反応性の相違の客観的評価方法の確立、鍼灸治療本来の「個人の生体に一番適した、刺激の量・質・時間(タイミング)を与えた時の、免疫系調節・生体防御系に及ぼす影響」を検討する必要があると考える。

参考文献

- 1) 押味和夫 : NK細胞 (基礎から臨床へ), 13~22, 金原出版, 1993.
- 2) Jill I, Shmuel : Behavioral influences on the immune system: stress and conditioning, *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol. Psychiat.* 11 : 137~143; 1987.
- 3) Yehuda S, James W, Gregory W : Opioid peptides mediate the suppressive effect of stress on natural killer cell cytotoxicity, *Science*, 223 : 188~191, 1983.
- 4) Shavit Y, Martin F, Yirmiya R, Ben-Eliyahu S, et al : Effects of a single administration of morphine or footshock stress on natural killer cell cytotoxicity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1 : 318~328, 1987.
- 5) Joan E, Donald T, Ada A, Bruce S : Shock-induced modulation of lymphocyte responsiveness and natural killer activity: differential mechanisms of induction. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2 : 102~113, 1988.
- 6) Gregory W, Michael J, John C : Opioid and non-opioid stress analgesia from cold water swim: importance of stress severity, *Brain Research*, 372 : 167~171, 1986.
- 7) Osama K, Myrin B : Decline of natural killer cell target binding and lytic activity in mice exposed to rotation stress. *Health Psychology*, 6(2) : 89~99, 1987.
- 8) Gerda C, Cobi J, Wim E, Sietse F et al : A role for the autonomic nervous system in modulating the immune response during mild emotional stimuli. *Life sciences*, 46 : 419~425, 1990.
- 9) 井上直也, 深田順一, 井村裕夫, 内田温土ら : 神経

- 免疫, 内分泌の相互作用に及ぼすストレスの影響, ストレス科学, 7(1): 108~116, 1992.
- 10) 松尾和彦, 柳田 巖, 広橋伸之, 横山三男ら: 運動トレーニングと免疫能, 臨床スポーツ医学, 7: 1335~1340, 1990.
 - 11) Zacharie B, Jean E, Mahin P, Melvin P et al: The effect of acute exercise on natural killer cell activity of trained and sedentary human subjects. *Journal of clinical immunology*, 5(5): 321~328, 1985.
 - 12) Maria A, John E, Eda T, Donna B et al: Endogenous opioids and the exercise-induced augmentation of natural killer cell activity, *J Lab Clin Med*, 112: 544~552, 1988.
 - 13) Deuster A, Curiale A, Cowan M, Finkelman FL: Exercise-induced changes in populations of peripheral blood mononuclear cells. *Med Sci Sports Exerc*, 20: 276~280, 1988.
 - 14) Kendall A, Hoffman L, Michael H, Brain M et al: Exercise and blood lymphocyte subset responses: intensity, duration, and subject fitness effects. *J Appl Physiol*, 69: 251~260, 1990.
 - 15) Kappel M, Tvede N, Galbo H, Haahr P et al: Evidence that the effect of physical exercise on NK cell activity is mediated by epinephrine, *J Appl Physiol*, 70: 2530~2534, 1991.
 - 16) 井出雅弘, 末松弘行: 行動と免疫 (心身疾患と免疫性変化), ストレス科学, 7(3): 19~23, 1993.
 - 17) 堀哲郎, 安藤哲也: 脳・免疫連関機構からみたストレス・免疫系修飾, ストレス科学, 7(3): 2~8, 1993.
 - 18) Naliboff B, Benton D, Solomon G, Morley J et al: Immunological changes in young and old adults during brief laboratory stress. *Psychosom Med*, 53: 121~32, 1991.
 - 19) Brosschot J, Benschop R, Godaert G, Smet M et al: Effects of experimental psychological stress on distribution and function of peripheral blood cells. *Psychosom Med*, 54: 394~406, 1992.
 - 20) Rusthoven J, Adams J, Cheung R, Dosch H: Volume regulation of natural killer cells under hypotonic stress: comparison with T and B cell subpopulations. *Immunol Lett*, 13: 203~207, 1986.
 - 21) Lackovic V, Borecky L, Vigas M, Rovensky J: Activation of NK cells subjects exposed to mild hyper- or hypothermic load. *J Interferon Res*, 8: 393~402, 1988.
 - 22) 黒野保三, 平松由江, 松本美富士, 渡 伸三: 鍼刺激のヒト免疫反応系に与える影響 (IV), 全日本鍼灸学会雑誌, 33: 12~17, 1983.
 - 23) 渡辺勝之, 酒井ゆうこ, 雨貝 孝ら: 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, 明治鍼灸医学, 11: 61~69, 1992.
 - 24) Malizia E, Andreucci G, Paolucci D, Crescenzi F et al: Electroacupuncture and Peripheral β -endorphin and ACTH Levels, *Lancet*(2), 535~536, 1976.
 - 25) 北出利勝, 南川正純, 兵頭正義, 井村裕夫ら: ハリ麻酔における血中および脳脊髄液中の β -endorphinおよびACTH濃度について, 東洋医学とペインクリニック, 10(3): 116~124, 1980.
 - 26) 矢野 忠, 森 和, 尾崎 毅, 星野 稔ら: 針通電刺激における鎮痛効果の発現について, 日温気物医誌, 50(4): 197~204, 1987.
 - 27) Sharon D, Terry J: β -endorphin alters a viral induced central nervous system disease in normal mice but not in nude mice, *J. of Neuroimmunology*, 24: 47~53, 1989.
 - 28) Shalev E, Yanay N, Peleg D, Yagudin E: Electroacupuncture During Labor and Its Effect on Peripheral Plasma Beta-Endorphin Concentration, *American Journal of Acupuncture*, 19(4): 345~348, 1991.
 - 29) Bianchi M, Jotti E, Sacerdote P, Panerai A: Traditional Acupuncture Increases the Content of Beta-Endorphin in Immune Cells and Influences Mitogen Induced Proliferation, *American Journal of Chinese Medicine*, 19(2): 101~104, 1991.
 - 30) 塚本紀之, 近藤裕一, 雨貝 孝ら: ストレス及び鍼灸刺激によるIL6の産生誘導, 第22回日本免疫学会総会・学術集会記録, 22: 287, 1992.
 - 31) 水沼国男, 近藤裕一, 雨貝 孝ら: 鍼刺激によるヒトインターロイキン6の産生, 第3回世界鍼灸学術大会抄録集, 126, 1993.

Effect of Acupuncture on Human Natural Killer Activity

WATANABE Katsuyuki¹, SHINOHARA Shoji¹, MIZUNUMA Kunio²,
HAYASHIDA Itsushi³, ITOI Manami³, KONDO Yuichi³
and AMAGAI Takashi³

1 Department of Diagnostic Oriental Medicine, Meiji College of Oriental Medicine

2 Department of Meridians and Acupuncture Points, Meiji College of Oriental Medicine.

3 Department of Immunology and Microbiology, Meiji College of Oriental Medicine.

Summary: Little is known about effect of acupuncture on the immune function. Since NK cells are known to function against viral infection and tumor growth, in this study we investigated changes in NK activity after acupuncture stimulation. For this experiment, human subjects were used. To minimize environmental influences, experiments were carried out in the morning in an air conditioned room, and subjects were relaxed and seated on chairs. Acupuncture stimulation was applied to ST36 on both legs. Following acupuncture, NK activity of peripheral blood lymphocytes (PBL) increased 30 and 180 min after stimulation in 60% of the subjects. A similar tendency was also found in 50% of control subjects whose blood samples were taken without acupuncture. Parallel increases in the percentages of CD16 and CD57 positive cells in PBL were found in the subjects who showed increased NK activity. These results suggest that stimulation of the skin by acupuncture needles and/or syringe needles causes an increase in NK activity in some individuals.