原 著

電子灸の施灸後の免疫機能への影響 (2)

渡辺 信一郎*

松尾 敬志 原 寛 広瀬 勝美 原 志免太郎

要旨 前報に続き施灸後の免疫賦活作用の機序の解明のため抗原としてT細胞依存性の DNP-KLH, T細胞非依存性の DNP-Ficoll を用い、電子灸の施灸を一定期間受けた Wistar ラットについて、二次免疫後4日目の脾細胞DNP抗体産生細胞数につき検討した。結果、施灸を実験前日まで9週余り行うと、非施灸群あるいは抗原感作前に4週間施灸した群に比べ、DNP-KLH に対し著明な抗体産生細胞数の増加を認めた。しかし DNP-Ficoll では施灸による増強はなかった。施灸の免疫賦活作用を得るために要する期間について感作時まで4週行ったが対照群と有意差なく、免疫増強効果を期待するには4週以上の長期にわたり施灸する必要のあること、その作用はT細胞機能の活性化を介し、直接抗体産生細胞やB細胞に作用しない。

I 緒 言

前報¹⁾において施灸効果について動物実験の結果、従来の経絡説よりは原が提唱した非特異性加熱自家蛋白療法説²⁾を強く支持する成績を示した。すなわちラットを用い通常のもぐサ施灸と同一条件なる電子灸を用い、連日一定期間施灸し、その後ヒトγグロブリンを抗原とし感作後の足蹠の浮腫増強作用、血中抗体価の測定から、抗原に惹起される炎症性浮腫は抗原抗体複合物によるIII型の即時型反応によること、免疫賦活剤であるレバミゾールと比較すると施灸群の方がより高い抗体価が得られ、両者併用群でさらに強い効果のあることを明らかにした。そこで今回施灸の免疫賦活作用について細胞レベルでの機序を解明すべくT細胞、B細胞レベルにおいて検討した。

連日電子灸により施灸されたラットのT細胞、B細胞がどのような影響を受けその結果として抗

体産生が上昇するのかを調べるため、免疫にはT細胞依存抗原としてDNP-KLHを、T細胞非依存(B細胞単独で抗体産生刺激する)抗原としてDNP-Ficollを用い感作後のラット脾細胞抗体産生細胞を検出するPFC-Assayを用いDNP抗体産生細胞数を測定し検討した。また血中抗体価を前報と同様にTNPハプテン受身感作赤血球凝集反応により検討した。

II 方 法

実験動物：SLC-Wistar系雌ラット、9週令、体重150~170gを用いた。

施灸方法：前報と同様、ラット背部をバリカンで除毛後、脱毛クリームで脱毛正中左右対称に2cmの間隔で計6か所、2回ずつ電子灸(シオノギ製薬研究所製)を用いgrade 4 (65°C)の条件のもとで行った。

抗原感作：抗原に用いるDNP₁₀-KLHは、KLH(Keyhole-Limpet Haemocyanin, Calbiochem社製)を幅ら³⁾の方法にしたがって2, 4ジニトロベンゼン(DNFB, Sigma社)を加え作成した。

DNP₂₀-FicollはFicoll 400(Pharmacia社製)に塩化シアヌル(和光純薬)、次いでε-N-DNP lysine HCl・2H₂O(和光純薬)を加え作成

*Shinichiro WATANABE 大阪大学医療技術短大

共同研究者 Takashi MATSUO 大阪大学歯学部, Hiroshi HARA 原土井病院, Katsumi HIROSE 塩野義製薬研究所, Shimetaro HARA 明鍼灸原病院灸法医学研究所

Key Word Immune Response, Moxibustion, Electronic Moxibustion

した。施灸群の半数を DNP_{10} -KLH で、残り半数を DNP_{20} -Ficoll を用い DNP_{10} -KLH は 1 匹当たり 1 mg, DNP_{20} -Ficoll は 1 匹当たり 0.35 mg を Freund 完全アジュバントと共に感作を行った。非施灸の対照群も同様に感作を行った。初回感作後、7 日目に二次感作を行った。二次感作後 4 日目に麻酔下で全採血後、脾細胞を採取し PFC- Assay を行った。

DNP-PFC Assay 法 (直接法)⁴⁾ :

TNP-SRBC を作成するために Rittenberg⁵⁾の方法に準じ作成した。

ラット脾細胞浮遊液の調整は免疫したラットの脾臓を取り出し、あらかじめ冷却した MEM (Minimum Essential Medium Eagle with Earle's Balanced Salt Solution, 阪大微研製) を少量入れておいた小型シャーレ中に移す。ピンセット 2 本あるいは針を用い、脾臓から細胞を浮遊させ細胞浮遊液を作り、2.5ml のシリンジに脱脂綿をつめたもので濾過し、その濾液をスピッツに採り、1500 rpm 10 分間遠心後うわ澄みを除き、1.25 ml, 2.5ml, 5.0ml, 10.0ml の MEM に浮遊させる。

細胞浮遊液の調整は水の上ですばやく行うことが必要である。DNP 抗体産生細胞の検出に TNP-SRBC を用いるがあらかじめ試験管を 44~46°C の恒温槽につけておき 2 倍濃度 MEM (粉末 MEM ニッスイ社製) を 0.2ml 各試験管に加えた後、1% アガロース A37 (半井化学製) を蒸留水で加熱溶解したもの 0.2ml, 次いで TNP-SRBC 0.05ml, 最後に細胞浮遊液 0.1ml を加え混和した後、あらかじめ 0.1% アガロースを薄く塗り乾燥させておいたスライドガラス上に均一に流す。以上の操作はアガロースが固まらないように敏速に行ない、プレートに気泡を作らないようにする。アガロースが固まった後、乾燥させないようにして 37°C の炭酸ガス培養器に入れ 45 分たったら取り出し、しばらくの間、室温にて放置し補体として SRBC で吸収した新鮮モルモット血清を MBB で 15 倍に希釈し注意深く全面にかけける。さらに 37°C 炭酸ガス培養器内に 45 分入れた後プラーク数を数える。

血中抗 DSK 抗体の測定 :

TNP 受身ヒツジ感作赤血球凝集反応を用いて

施灸群、対照群ラット血中の抗 DNP 抗体価を測定した。頸動脈より採取した血液より血清分離し、56°C, 30 分間非働化後、1% アルブミン加生理食塩リン酸バッファーを用いて血清の希釈系列を作り血清 0.1ml と 1% TNP 受身感作ヒツジ赤血球浮遊液 0.1ml をそれぞれファルコンマイクロプレート (96 穴) に入れ 37°C の培養器に一昼夜放置し、その凝集の有無を判定した。

脾細胞数の算定には、冷却した MEM を入れたシャーレ中でピンセットで無菌下脾臓の膜をはがすようにして浮遊細胞とし、さらにメッシュを通して単細胞のみを集めその一部を取り 0.5% トリパンプル液を培養液で作り 1 : 1 に加え Tatai 血球計算盤で算定した。

レクチン刺激による免疫脾細胞の反応

各群の脾細胞を ConA, PHA, PWM のレクチン存在下 3 日間 37°C, 炭酸ガス培養器で無菌的に培養後、1 μCi の ^3H Thymidine を加えさらに一昼夜培養しデオキシ核酸への取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。

III 実験結果

1) 施灸期間を検討するため実験 I で図 1 に示すごとく電子灸による施灸を一次および二次免疫の期間も含め 8 週間以上にわたり持続した群 (A 群)、4 週間施灸した後休灸し同様に一次、二次免疫をした群 (B 群)、非施灸群 (C 群) に分け各群 8 匹について T 細胞依存性抗原 DNP_{10} -KLH, T 細胞非依存性抗原 DNP_{20} -Ficoll を用いて 2 回免疫後 TNP 受身感作ヒツジ赤血球を用いた PFC Assay 法と感作赤血球凝集反応で抗体価を測定した。

図 1 Protocol of electronic moxibustion and immunization schedule (1)

表1 TNP-PFC Assay

(1)

Immunogen	DNP ₁₀ -KLH	DNP ₂₀ -Ficoll
A Group	448±146	104±52
B Group	161±127	150±107
C Group	157±136	88±44

(per 10⁶ spleen cells)

(2)

Immunogen	DNP ₁₀ -KLH	DNP ₂₀ -Ficoll
A Group	100±48	72±72
B Group	36±13	124±92
C Group	25±17	138±167

(per 10⁶ spleen cells)

表IはそのPFC-Assay法の結果で、脾細胞10⁶個当りのプラーク数で示してある。T細胞依存性抗原であるDNP₁₀-KLHで免疫した場合、施灸群Aは対照群Cに比べ、その(1)では約3倍、その(2)では約4倍の高値を示した。また施灸群Bではその(1)、その(2)とも対照群Cと比べあまり差があるとはいえない結果が得られた。一方T細胞非依存性抗原であるDNP₂₀-Ficollを用いた場合はその(1)、その(2)においてA、B、C群間に全く差はみられなかった。

さらに同じラットの血中抗DNP抗体価についてTNP受身感作ヒツジ赤血球凝集反応での結果を表IIに示したが、PFC-Assay法の結果と同様に、DNP₁₀-KLHを抗原とした場合、A群は対照

群Cよりも明らかに高い血中抗体価を示した。またB群とC群を比較すると、やはりB群とC群は余り差のない抗体価を示した。一方DNP₂₀-Ficollを抗原とした場合はA、B、C群間に著明な差はなく、しかも希釈倍数がわずかに2倍または4倍で陰性となる低い血中抗体価しか示さなかった。これは血中抗体が少量しか含まれていないためか、avidityの低い抗体しか産生されていないことを示すものである。

このように抗原がDNP₁₀-KLHである場合、A群はPFC-Assay法においてもTNP受身感作ヒツジ赤血球凝集反応においても、B、C、群に比べ明らかに高い値を示したがDNP₂₀-Ficollを抗原とした場合はA、B、C群に大差はみられ

表II Passive Hemagglutination Test

(1) Immunogen DNP₁₀-KLH

Group Serum Dilution	A ₁	B ₁	C ₁
×200	+	+	+
×400	+	+	+
×800	+	±	+
×1600	+	-	+
×3200	+	-	±
×6400	+	-	-

(2) Immunogen DNP₁₀-KLH

Group Serum Dilution	A ₂	B ₂	C ₂
×200	+	+	+
×400	+	+	+
×600	+	+	+
×800	+	±	±
×1000	+	-	-
×1200	+	-	-

Immunogen DNP₂₀-Ficoll

Group Serum Dilution	A ₁	B ₁	C ₁
×1	±	±	±
×2	-	-	-
×4	-	-	-
×8	-	-	-
×16	-	-	-
×32	-	-	-

Immunogen DNP₂₀-Ficoll

Group Serum Dilution	A ₂	B ₂	C ₂
×1	±	±	±
×2	-	-	-
×4	-	-	-
×8	-	-	-
×16	-	-	-
×32	-	-	-

なかった。これらの結果は、T細胞依存性抗原の場合には施灸による免疫増強効果が認められたが、T細胞非依存性抗原の場合にはその効果が認められなかったことを示している。またA群とB群の間で灸の免疫機能の増強効果に明らかな差がみられたことは施灸期間が4週間より8週間の方が効果があることを示しているが、施灸をどれくらいの期間持続すればよいかについてはさらに検討を要するものと考えられる。

2) 8週間電子灸施灸を行ないその後、一次二次抗原刺激後の脾細胞について Con A 500μg/ml, PHA 0.1ml/ml, PWM 100μg/mlの濃度下3日間培養後のリンパ球の幼若化を³H Thymidine のデオキシ核酸への取り込みで検討すると表Ⅲに示すごとく8週間施灸のA群は4週間施灸後休灸したB群あるいは対照のC群に比べ明らかに幼若化が亢進していることが特に Con Aで著明であることが示された。

表Ⅲ Stimulation of immune spleen cells from electric moxibustion treated rats by lectins.

Lectin	Con A/control	PHA/control	PWM/control
A group	2102/257(8.2)	2805/1881(1.5)	262/ 469(0.6)
	3719/257(14.6)	4686/1881(2.5)	2922/ 469(6.2)
	6524/257(25.4)	4248/1881(2.3)	858/ 469(4.0)
B group	1311/466(2.8)	766/ 582(1.3)	4571/1629(2.8)
	2171/466(4.7)	1823/ 582(3.1)	1680/1629(1.0)
	2026/466(4.3)	1513/ 582(2.6)	10019/1629(6.2)
C group	717/366(2.0)	2158/1216(1.8)	4141/1972(2.1)
	862/366(2.4)	7746/1216(6.4)	2396/1972(1.2)
	2049/366(5.6)	4164/1216(3.4)	3313/1972(1.7)

dpm/dpm (): Stimulation Index

表Ⅳ TNP-PFC Assay

(1) Immunogen DNP₁₀-KLH

	1	2
A Group	59±33	169±16
C Group	55±30	141±81

(per 10⁶ spleen cells)

3) 4週間電子灸施灸直後の免疫機能への影響を検討するため実験Ⅱでは図2に示すようなプロトコルで行なった。すなわちT細胞依存性抗原としてDNP₁₀-KLHを、T細胞非依存性抗原としてDNP₄₃-Dextranを用い、一次免疫直前まで

図2 Protocol of electronic moxibustion and immunization schedule (2)

4週間にわたり施灸を持続した群(A群)と対照群(C群)の二群について、実験Ⅰと同様に二次免疫後の抗体産生能をTNP受身感作ヒツジ赤血球によるPFC-Assay法により抗体産生細胞数を、血球凝集反応により血中DNP抗体価を検討した。表Ⅳ、Ⅴに示した結果からDNP₁₀-KLH、DNP₄₃-Dextranのいずれの免疫抗原を用いてもA群とC群の間に有意の差はみられなかった。

Ⅳ 考 察

実験Ⅰにおいて施灸群と非施灸群の対照群とを比較したとき、T細胞依存性抗原であるDNP₁₀-KLHで免疫した場合、TNP-PFC Assay法の結果から明らかなように、施灸によりT細胞の中のヘルパー機能を示す細胞群の機能の増加、または相対的なT細胞数の増加が示唆される。一方、T細胞非依存性抗原であるDNP₂₀-Ficollで免疫した場合、すなわちB細胞に対しては施灸は影響ないと考えられる。

(2) Immunogen DNP₄₃-Dextran

	1	2
A Group	12±12	37±19
C Group	25±21	33±14

(per 10⁶ spleen cells)

表 V Passive Hemagglutination Test

1) Immunogen DNP₁₀-KLH

Group Serum Dilution	A ₁	A ₂	C ₁	C ₂
×10	+	+	+	+
×20	+	+	+	+
×40	+	+	+	+
×80	+	+	+	+
×160	+	+	+	+
×320	±	±	±	±
×640	-	-	-	-

(2) Immunogen DNP₄₃-Dextran

Group Serum Dilution	A ₁	A ₂	C ₁	C ₂
×1	+	+	+	+
×2	+	+	+	+
×4	+	+	+	+
×8	+	+	+	+
×16	+	+	+	+
×32	+	±	±	+
×64	-	-	-	±

よって施灸刺激による効果はB細胞よりはT細胞のヘルパー機能を増加させるか、あるいは相対的にT細胞数を増加させると考えられる。ここでDNP₁₀-KLHとDNP₂₀-Ficollの抗原性の差が問題となるが、用いたKLHおよびFicollに結合しているDNPの数は逆にFicollの方が20と多く、その違いはキャリアーであるKLHと、Ficoll又はDextranの違いであり、このキャリアーの違いは、T細胞を必要とするか、B細胞のみに作用するかの差を示す。さらに免疫に用いた抗原は十分に抗原性を発揮するだけの抗原量をもって免疫してあるから、抗原量の差によりPFC応答の差が生じたものではないと考えてよい。ここに得られた施灸による免疫機能の増強作用はT細胞のうち、サブプレッサーT細胞の機能抑制によるものか、あるいはヘルパーT細胞の機能増強によるものか、T細胞サブポピュレーションについて今後検討する必要がある。その他、T細胞非依存性抗原であるDNP₂₀-FicollまたはDNP₄₃-Dextranを用いた場合、血中DNP抗体価についてTNP受身感作ヒツジ赤血球凝集反応で検討したところ、TNP-PFC Assay法で抗体産生細胞が認められるにもかかわらず、施灸、非施灸群のいずれの場合も抗体価が極めて低い結果が得られた。このことは血中抗体量が少ないためか、または一般にT細胞非依存性抗原刺激で主に産生されるIgMクラスの抗体のDNPとの結合能がDNP₁₀-KLHで免疫した時に比べて極めて低いためであると考えられる。T細胞依存性のDNP₁₀

-KLHではこのような現象がみられず、T細胞がヘルパー活性を示す際に血中抗体価を上昇させる役割を示すことが考えられる。

次に実験I、IIのDNP₁₀-KLH抗原刺激における結果から、施灸の期間、抗原刺激の時期との関係について考察してみると、条件の統一がなされていなかったため明らかな比較はできないが、実験Iより施灸は長期である方が効果が大きいのではないかと考える事ができる。実験IIの結果からも一層抗原感作中の施灸の効果について考察してみる必要性が感じられる。今後、それぞれの条件(一定期間・時期)の下における施灸効果について、とりわけ抗原感作中の施灸の効果について検討していく必要がある。

灸による液性免疫が前報に引続いてこのように明らかになったが、一方火傷の場合細胞性免疫および感染防御能が低下することが知られている。丹野⁶⁾の実験では、家兎において適量の施灸では細胞性免疫の増強が示され疾病予防治療に有用であるが、過量では逆に増悪をもたらすことから、灸はその適応や量などを十分慎重に選ぶ必要性をもつということが示唆されている。今後はさらに、ここに認められた灸の免疫増強作用について、より一層細かく、マクロファージ・レベルやリンパ球サブポピュレーション、灸の適量、適応などについて、また細胞性免疫能や腫瘍免疫におよぼす効果についても実験、検討を重ねていく必要がある。

引用文献

- 1) 渡辺信一郎, 伯田宏, 松尾敬志ほか: 電子灸の施灸後の免疫機能への影響(1), 全日本鍼灸学会雑誌 **31** (1), 42-50, 1981.
- 2) 原志免太郎: お灸療法, 実業之日本社, 東京, 1933.
- 3) 幅誠二, 浜岡利之: 種々の蛋白, 多糖体とDNP基との結合物の作成法, 免疫実験操作法B, 日本免疫学会編, 金沢, 1974, p. 1129
- 4) 橋本勢津子, 芳原園恵, 木村和美ほか: カゼイン連日投与によるマウス抗体産生への影響, 大阪大学医療技術短期大学部研究紀要, 医療科学篇 **8**, 59, 1980.
- 5) Rittenberg, M. B. & Pratt, K. L.: Anti-trinitrophenyl ploque assay. Primary response of BALB/C mice to soluble and particulate immunogen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **132**, 575, 1969.
- 6) 丹野恭夫: 灸の家兎末梢リンパ球幼若化現象に及ぼす影響, 日本東洋医学会誌, **28** (1), 18-22, 1977.
(〒565 豊中市上新田4-22-1-709)

Effects of electronic moxibustion on immune response (II)

Shinichiro Watanabe M. D. et al.
College of Biomedical Technology,
Osaka University

In the previous papers, we reported the effects of electronic moxibustion on immune response of experimental rats to the exogeneous antigens, human γ -globulin.

The results supported the theory, "non-specific heat aggregated autologous tissue protein stimulation therapy" presented by Dr. Shimetaro Hara in 1933.

Therefore, in this paper we chose two kinds of antigens, one is the T-cell dependent antigen, dinitrophenylated keyhole limpet hemocyanin (DNP-KLH), the other is the T-cell independent antigen dinitrophenylated Ficoll (DNP-Ficoll) to analyse the mechanism of electronic moxibustion whether it enhances the immune response or not.

Using 9 weeks old femal SLC-Wistar rats, we administered the electronic moxibustion according to the method reported in the previous papers. Following daily moxibustion for 8 weeks, antigens were given twice at intervals of one week together with Freund's complete adjuvant. And 4 days later from the last antigen stimulation direct, DNP plaque forming cells in the spleen were counted.

The results obviously showed daily electronic moxibustion for 8 weeks enhanced immune response against the T-cell dependent antigen (DNP-KLH) stimulated rats but no effect on the immune response to the T-cell independent antigen (DNP-Ficoll) stimulated rats.

The daily electronic moxibustion for 4 weeks to rats failed to show any effective results against both antigens stimulation.

The responses of spleen cells against mitogenic lectins, PHA, Con A and PWM were analysed 3 days after the incubation with lectins by tritiated thymidine up takes into cells. The results also showed the animal group received the electronic moxibustion for 8 weeks manifested higher response against the one of T-cell mitogens, Con A compared with either the group received the electronic moxibustion for 4 weeks or the control group, not received any treatment.

These results suggested that the immune activation mechanism exhibited by the electronic moxibustion is via the activation of T-cell function and the electronic moxibustion does not act on

B cell nor antibody forming cells.

The direct effects on the animal skin by the electronic moxibustion were shown exactly the same physical characteristics as the conventional moxibustion method as reported in the previous papers. Therefore, we could expect the similar T-cell activation effect on the immune response by the conventional moxibustion.

But from our results to get such a T-cell activation by the electronic moxibustion, it has been necessary to administrate the electronic moxibustion daily at least for more than 4 weeks.

Next we would like to make clear what kinds of subpopulation in the T-cell populations are activated by the electronic moxibustion.

Before the clinical administration of the electronic moxibustion as one of immune activators, it is necessary to investigate further about the optimal amounts of the moxibustion, effects of the moxibustion on the cellular immunity or tumor immunity.