原 著

鍼刺激のヒト免疫反応系に与える影響(V)

～特に単クローン性抗体を用いた Laser Flow Cytometry による解析～

黒 野 保 三* 石 神 龍 代 堀 茂
渡 仲 三 松 本 美富士

要旨 鍼刺激のヒト免疫能へ与える影響を調べるため、単クローン性抗体によるヒトの末梢血Tリンパ球サブセットの変動について検討を行った。

健康成人男子10名、女子3名の被験者に対し、脉診法にて2穴を選穴し、5Hz、2V、5minの低周波通電鍼刺激を行った。鍼刺激前および直後に採血し、末梢血Tリンパ球サブセットの変化をOKT、Leuシリーズの単クローン性抗体を用いてLaser Flow CytometryによるTリンパ球サブセット自動解析を全血法で行った。

末梢血Tリンパ球であるOKT 3⁺細胞は、一定の変動を示さないが、Eロゼット形成細胞であるOKT 11⁺細胞は、鍼刺激後に増加した。免疫反応に対してhelper/inducer Tリンパ球となるOKT 4⁺細胞は、一定の変動をみなかったが、suppressor/cytotoxic Tリンパ球となるOKT 8⁺細胞は鍼刺激後増加した。また、生体の免疫学的監視機構を担うnatural killer (NK)細胞に属するLeu 7⁺細胞は、増加するが、同じくNK細胞の一部であるLeu 11⁺細胞は、低下を示した。

単クローン性抗体による末梢血Tリンパ球サブセットの変動は、我々がこれまで行ってきたin vitroにおけるリンパ球機能の変化をより特異的に確認するとともに、NK前駆細胞をより活性化することを示している。このように、鍼刺激によって、ヒトの免疫反応系に変化をもたらすことがさらに示された。

I はじめに

鍼治療は、東洋医学における内経系医学としての基本的治療法のひとつである。そして、各種疾

患、病態に有効であることが経験的に示されているが、その作用機序、すなわち生体への影響については不明な点が多い^{1,2)}。著者らは従来から、鍼治療の作用機序解明のため実証医学的検討を加えてきた³⁻⁹⁾。

近年の免疫学のめざましい発達によって、各種病態、疾患成立に対する免疫学的反応の関与の重要性、あるいは、免疫反応系と神経系との関連などが明らかにされてきている¹⁰⁾。そこで我々は、鍼刺激の生体への影響のひとつとして、様々の方法を用いて明らかにし、鍼刺激がヒトの免疫系に対

* Yasuzo KURONO 東洋医学研究所[®]

共同研究所：Tatsuyo ISHIGAMI, Shigeru HORI 東洋医学研究所[®]

Nakazo WATARI 名古屋市立大学医学部第一解剖

Yoshifuji MATSUMOTO 名古屋市立大学医学部第二内科

Key Words：通電鍼刺激、免疫反応、単クローン性抗体

し、確実に変化をもたらすことを示してきた³⁻⁷⁾。今回は、鍼刺激による健康成人末梢血Tリンパ球サブセットの変動について、単クローン性抗体(monoclonal antibody)を用いて Flow Cytometry による解析を行った。

II 実験方法

1. 鍼刺激

鍼刺激は六部定位の脉診法^{11,12)}により五俞穴¹³⁾より2穴を選穴し、直径0.18mm、長さ30mmのセイリン鍼を用いて鍼電極パルス刺激装置PG-400による5Hz、2Volt.の低周波通電鍼刺激を5分間行った¹⁴⁾。このような条件で鍼刺激を健康成人13名(男10名、女3名)について行い、鍼刺激前および直後に採血を行って以下の実験を行った。

2. リンパ球サブセットの解析法

鍼刺激前後におけるTリンパ球サブセットの変動の解析を単クローン性抗体によるレーザー・フロー・サイトメトリー・システム(laser flow cytometry system)を用いて検討を行った。すなわち、ヘパリン加末梢血に蛍光色素FITC 標識単クローン性抗体を加え、4℃で30分間反応させた。その後、溶血剤を加え室温にて5～15分間放置し、十分に溶血したことを確認した後にレーザー・フロー・サイトメトリー・システム(laser flow cytometry system)Ortho Spectrum III(Ortho Diagnostic System Inc.)で分析を行った¹⁵⁾。

用いたマウス単クローン性抗体は表1のごとくである。すなわち、OKT3は末梢血Tリンパ球の100%に存在し、成熟Tリンパ球と反応する抗体、OKT4は末梢血Tリンパ球のうち、helper/inducer Tリンパ球と反応する抗体で、Tリンパ球の約60%が反応する。OKT8は末梢血Tリンパ球のうち、suppressor/cytotoxic Tリンパ球と反応し、Tリンパ球の約30%に反応する。OKT11は末梢血Tリンパ球の約91%と反応し、ヒツジ赤血球のレセプターと反応する抗体である。Leu7は末梢血リンパ球の約15%が反応し、ヒトの natural killer (NK) 細胞の大部分と反応する抗体であり、Leu11は末梢血Tリンパ球の数%と反応し、NK細胞の一部と反応する抗体とされている。OKT3、OKT11陽性リンパ球は全リンパ球に対する比率、OKT4、

表1 単クローン性抗体によるTリンパ球 subpopulation

抗 体	リンパ球 subsets	比 率
OKT3	pan T (成熟) 細胞	60～70%
OKT4	helper/inducer 細胞	20～30%
OKT8	suppressor/ cytotoxic 細胞	50～60%
OKT11	T 細胞 (ヒツジ赤血球 レセプター陽性)	70～80%
Leu 7	NK/K 細胞	10～20%
Leu 11	NK/K 細胞	10%

OKT8、Leu7、Leu11陽性リンパ球はT細胞に対する比率で表わした。

III 結 果

1. データ解析

レーザー・フロー・サイトメトリー(laser flow cytometry)である Ortho Spectrum IIIは前方散乱光と90°散乱光によって白血球の細胞種を認識(リンパ球、単球、顆粒)し、溶血した赤血球や血小板はデブリスと処理される。リンパ球と認識された細胞は、次に蛍光抗体法によって蛍光色素で標識されたもの、されないものと緑色蛍光強度を読みこんで緑色蛍光をパラメーターとするヒストグラムが描かれる。すなわち、X軸に対応する蛍光強度をY軸に各蛍光強度に対応する細胞数が示される(図1)。蛍光強度ヒストグラム上でコントロールとの対比から陰性領域と陽性領域を設定してやれば各領域内の細胞数、%等が算定される。

2. OKT3陽性細胞の変動

末梢成熟Tリンパ球を表現しているOKT3陽性細胞比率は、鍼刺激前後において有意な変動は示さなかった。

図 1

3. OKT4陽性細胞の変動

helper Tリンパ球あるいはinducer Tリンパ球を表現しているOKT4陽性細胞比率は鍼刺激前後において有意な変動を示さなかった。

4. OKT8陽性細胞の変動

suppressor Tリンパ球あるいはcytotoxic Tリンパ球を表現すると考えられているOKT8陽性細胞比率は鍼刺激直後、鍼刺激前に比して有意($P < 0.001$)に上昇することが示された(図2)。

5. OKT4/OKT8比率の変動

helper/inducer Tリンパ球比率あるいはsuppressor/cytotoxic Tリンパ球比率の各々を測定することより、OKT4/OKT8比率を出すことによって、生体の免疫反応の制御バランスを検討するものである。このOKT4/OKT8比率は鍼刺激後低下傾向($P < 0.1$)を示した。

6. OKT11陽性細胞の変動

末梢血リンパ球のうちヒツジ赤血球に対するレセプターに対する単クローン性抗体と考えられているOKT11陽性細胞は鍼刺激後、有意($P < 0.01$)に上昇することが示された(図3)。

7. Leu7陽性細胞の変動

NK細胞と反応する抗体であるLeu7陽性細胞

図 2

図 3

は鍼刺激後、有意($P < 0.001$)に増加を示した(図4)。

8. Leu11陽性細胞の変動

NK細胞の一部と反応し、かつLeu7と異なったNK細胞の細胞表面抗原に反応する抗体と考え

られている Leu11陽性細胞は鍼刺激後、有意($P < 0.001$)に低下を示した(図5)。

IV 考 察

近年の免疫学の急速な進歩によって生体の免疫応答反応が明らかにされるにつれ、免疫反応は各種生物学的反応系と密接に関連しあっていることが示されている。すなわち、免疫反応系は他の生物学的反応系を含めてひとつの大きなネットワークを形成している。また、各種疾患、病態形成に免疫反応が直接的、間接的に関与していることも明らかにされている¹⁶⁾。したがって、生体に様々な変化をもたらす鍼刺激が直接的、間接的に免疫反応系にも何らかの変化をもたらすことが推測される。しかしながら、この点に関する研究は少ないのが現状である。我々はこれまでに鍼刺激がヒトの免疫反応系に変動をもたらすことを報告してきた。その結果、鍼治療の作用機序のひとつとして、鍼刺激が生体の免疫反応系に作用することによって説明しうるものが存在する可能性を示してきた³⁻⁷⁾。

今回の研究は、これまでの我々の実験結果を確認するため、反応特異性の高い単クローン性抗体を用いて末梢血リンパ球サブセットの変動に鍼刺激がいかなる影響を与えるかを検討したものである。単クローン性抗体を用いる実験のメリットは、単一抗原決定基(epitope)に向けられた物理化学的性質が均質な特異抗体によるものであり、その結果は極めて特異性が高く、信頼性の高いことである。このような単クローン性抗体を用いて、レーザー・フロー・サイトメトリー(laser flow cytometry)によるTリンパ球サブセットの検討でも従来の我々の報告と同様の結果をえた。すなわち、鍼刺激にヒトのTリンパ球のマーカーであるヒツジ赤血球のレセプターと反応するOKT11陽性細胞の増加を認めた。これは、鍼刺激後にヒツジ赤血球ロゼット形成細胞数の増加との結果とまったく同じことである。免疫反応に対して抑制的に働く suppressor あるいは細胞障害性に働く cytotoxic リンパ球を反映していると考えられているOKT8陽性細胞は、鍼刺激後増加を示した。先の鍼刺激後にT γ リンパ球の減少がみられるとする報告と相反する結果となるが、T γ リンパ球が必ずしも suppressor リンパ球を表わすのではなく、またOKT8陽性細胞とT γ リンパ球が必ずしも同一の population

図4

図5

図6

図7

でないことなどから、両者の解離は必ずしも矛盾するものでない。次に、我々は先にNK細胞活性が鉅刺激によって増強することを示したが、このNK細胞に対する単クローン性抗体としてLeu 7、Leu 11があり、Leu 7陽性細胞は鉅刺激後増加がみられる。一方、Leu 11陽性細胞は逆に減少を示した。NK細胞に対する単クローン性抗体としてLeu 7、Leu 11の違いは、Leu 7陽性細胞はNK細胞の大部分と反応し、Leu 11陽性細胞はNK細胞の一部と反応する点である。NK細胞活性としてはLeu 11⁺7⁻細胞がhighly activeで、Leu 11⁻7⁺細胞がWeak active、Leu 11⁻7⁻細胞がno activeとされている¹⁷⁾。したがって、鉅刺激によってWeak activeなLeu 11⁻7⁺細胞のNK細胞が増加することが考えられる。

末梢血成熟Tリンパ球と反応するOKT 3陽性細胞や免疫反応に対して補助的あるいは、各種のeffector細胞のinducerとして働くOKT 4陽性細胞の変動は鉅刺激によって一定の傾向を示さなかった。

このように、単クローン性抗体を用いた末梢血Tリンパ球サブセットの検討においても鉅刺激に

よって、あるサブセットに変動をもたらすことが示された。すなわち、鉅刺激が生体の免疫系にリンパ球レベルにおいて変化をもたらすことを示唆するものである。最近、神経系を介する免疫反応系の調整機構が明らかにされてきている。この調整機構に重要な役割を果たすものとして、endorphineなどのneuropeptidesである¹⁸⁾。鉅刺激がendorphineに変動をもたらすことがすでに示されており、鉅刺激による生体免疫反応系の変化はendorphineなどを介して行われている可能性も考える必要があり、今後検討すべき点と思われる。

V 結 語

鉅刺激による健康成人の免疫反応系に及ぼす効果をみるため、ヒトのTリンパ球サブセットに対する単クローン性抗体を用いて、レーザー・フロー・サイトメトリー(laser flow cytometry)によって末梢血Tリンパ球サブセットの変動を検討した。

1. 末梢血成熟Tリンパ球と反応するOKT 3, helper/inducer Tリンパ球と反応するOKT 4陽性細胞は鉅刺激前後において一定の変動は示さな

かった。

2. ヒトのTリンパ球のマーカーであるヒツジ赤血球レセプターと反応するOKT 11, suppressor/cytotoxic Tリンパ球と反応するOKT 8陽性細胞は鍼刺激後、それぞれ有意に増加した。

3. NK細胞と反応するLeu 7陽性細胞は鍼刺激後増加し、Leu11陽性細胞は低下した。

以上のごとく鍼刺激によってヒトの末梢血Tリンパ球サブセットの変動が単クローン性抗体を用いた解析によっても示された。

引用文献

- 1) Chou, S. N. : Acupuncture. Mayo Clin. Proc. 55: 775-778, 1980.
- 2) Lu, G. D. & Needham, J. : Ascientific for acupuncture. The Science, 19: 6-10, 1979.
- 3) 黒野保三, 平松由江, 松本美富士, 渡仲三: 鍼刺激のヒト免疫反応系に与える影響(I), 日本鍼灸治療学会誌 29(2);22~27, (1980)
- 4) 松本美富士, 山本正彦, 渡仲三, 黒野保三: 鍼刺激の生体免疫系に及ぼす影響(II), 自律神経雑誌 27;235~238, (1980)
- 5) 松本美富士: 鍼刺激の作用機序, 特に免疫応答系に与える影響, 全日本鍼灸学会雑誌 31;323~327, (1982)
- 6) 黒野保三, 平松由江, 松本美富士, 渡仲三: 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)
- 7) 黒野保三, 石神龍代, 渡仲三, 松本美富士: 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 34;23~27, (1984)
- 8) Watari, N., Kurono, Y., Takagi, K. : The curative effect of acupuncture for liver injury caused by carbon tetrachloride administration, proc. of the Intern. Union of physical Sci., paris, Vol VIII 801. 1977.
- 9) 渡仲三, 黒野保三, 馬淵良生ほか: アロキサン膵島障害に対するハリの効果についての超微形態学的研究, 日本内分泌学会雑誌 34(4);425, (1978)
- 10) Smith, E. M., McMenamin, D. H. and Blacklock, J. E. : Lymphocyte production of endorphins and endorphin-mediated immunoregulatory activity. J. Immunol. 135 : 779s-782s, 1985.
- 11) 本間祥白: 難経の研究, 医道の日本社, 横須賀(1968), 263~278.
- 12) 藤田六郎: 脈診の研究, 医道の日本社, 横須賀(1970).
- 13) 長濱善夫: 東洋医学概説, 創元社, 大阪(1961). p.246~256.
- 14) 伊藤嘉紀, 黒野保三, 只本英子, 熊沢孝朗: 人体皮膚知覚に及ぼすハリ麻酔の影響, 日本生理誌 37;291. (1975)
- 15) 佐藤三郎: リンパ球サブセット解析のための周辺機器の開発, 最新医学 39;106~110, (1984)
- 16) Ballanti, J. A. : General immunology. in "Immunology II" (ed. by Bellanti, J. A.) Sanders, Philadelphia, pp26-77, 1978.
- 17) Lanier, L. L., Le, A. M., Phillips, J. H., Warner, N. L. & Babcock, G. F. : Subpopulation of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 and Leu-11 antigens. J. Immunol. 131 : 1789-1796, 1983.
- 18) Plotnikoff, N. P. & Murgo, A. J. : Enkephalins-endorphins : stress and the immune system. Fed. Proc. 44 :91-122, 1985.
(〒464 名古屋市中千種区春岡2-23-10 東洋医学研究所®)

Effect of Electric Acupuncture on Human Immune System

Analysis of Peripheral T Lymphocyte Subsets by Laser Flow Cytometry System

Yasuzo Kurono and Tatsuyo Ishigami

The Institute for Oriental Medicine

We investigated the effect of electric acupuncture on peripheral T lymphocyte subset from normal individuals, analysed by laser flow cytometric system with monoclonal antibodies for human T lymphocyte subset.

OKT3⁺ cells (peripheral T cells) and OKT4⁺ cells (helper/inducer cells) did not show any changes after electric acupuncture. OKT8⁺ cells (suppressor/cytotoxic T cells), however, OKT11⁺ cells (E rosette positive T cells) and Leu7⁺ cells (natural killer cells) increased and Leu11⁺ cells (another population of natural killer cells) decreased after electric acupuncture.

These changes of peripheral T lymphocyte subsets would suggest that electric acupuncture effects human immune system.