

神経系及び神経ペプチドの免疫系への関与

*明治鍼灸大学 免疫・微生物学教室 **京都府立医科大学 第2外科学教室
***明治鍼灸大学 解剖学教室

雨貝 孝* 近藤 裕一* 酒井ゆうこ* 塚本 紀之*
村山祐一郎** 熊本 賢三*** 松浦 忠夫***

Modulation of immune system by neural system and neuropeptides.

AMAGAI Takashi*, KONDO Yuichi*, SAKAI Yuko*,
TSUKAMOTO Noriyuki*, MURAYAMA Yuichiro**,
KUMAMOTO Kenzo*** and MATSUURA Tadao***

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

**Department of Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine

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

I はじめに

東洋医学の基本概念となっている気の内容は、中国思想の歴史の変遷のもとで様々な表現形で示されるが、その基礎にあるものは「生命及び物質のもつ動的エネルギー」として理解することができるであろう¹⁾。古代ギリシャでも Galen は、「心の活力は病を防ぎ、心の鬱は病を促す」と述べている。また、我国でも、「病は気から」という言葉が古くから用いられている。人間は外界の多様な刺激を受けながらその恒常性を維持している。我々は、この“気”の概念、“ホメオスタシス”の概念に示される生体の調節力の解析を生体防御という側面からアプローチしていきたい。

鍼刺激では、鍼麻酔の研究から、脳内の内因性オピエートが誘発されることが発見された²⁾。また末梢神経末端からの Substance P, Calcitonin gene-related peptide (CGRP) の放出³⁾ などによ

り、生体反応誘発への物質的基礎が明らかにされつつある。同時に、鍼灸が自律神経系や内分泌系にも調節的に働くことも示されている。他方、免疫学においても免疫系の神経・内分泌調節が1つの基本テーマとして焦点を集めつつある^{4,5)}。神経・内分泌系と免疫系との関連は、神経系由来のペプチドやホルモンが免疫系を調節するという一方向性のものではなく、インターロイキン、リンホカイン、肥満細胞の産生物質（ヒスタミン、ロイコトリエン等）を介して神経系、内分泌系の調節をも行なうという重なりあうところのあるシグナルを用いての調節系により個体のホメオスタシスが維持されていることが示唆されている。

そこで、我々は、神経系と免疫系との関連を次の3つの側面とらえることにより、神経免疫学の展開、そして東洋医学、ことに鍼灸治療と免疫系の関わりを解析する足がかりとしたい。第1に

は、免疫反応にあずかるリンパ球の産生と成熟の場である一次リンパ器官すなわち骨髄及び胸腺での自律神経系の役割である。骨髄では、アドレナリン性神経線維は、細動脈叢より入り実質に分布して血球系及びリンパ球系細胞の造成の場に終末する⁶⁾。胸腺でのアドレナリン性神経線維は血管系と共に入って一部は皮質領域に、一部は皮膜及び皮膜下領域に分布する⁷⁾。このような形態学的な知見をもとにリンパ球の分化と神経の関連を明らかにしていきたい。第2には、成熟リンパ球が抗原と反応する際における神経系由来物質の調節である。個体では、リンパ節、脾臓、粘膜付属リンパ組織がその場となる。驚くべきことであるが、リンパ系の細胞自身も神経ペプチドやホルモンを産生することが知られており⁸⁾、リンパ系細胞の一部は、神経ペプチドやホルモンに対するレセプターをもち⁹⁾、リンパ系細胞の機能の正または負の調節をすることが知られている¹⁰⁾。我々はこのような調節機構が個体の調節としてどのような生理的意義を持っているかを解析していきたい。第3には、抗原との反応で分化したリンパ球の機能、及びすでに機能的に分化しているNK細胞などの機能と神経系との関わりである。また免疫系の生体での機能は最終局面では炎症として表現されることが多い。局所炎症反応自体が神経系の刺激をともしなうことも知られており、炎症性細胞の機能と神経系との関連で検討しなくてはならない¹¹⁾。

以上示した3つの点で、我々の研究は出発している。研究室が機能するようになってまだ日が浅いため、データの多くは予備的なものや追試を含むがその内容と今後の方向性を含めて述べていきたい。

II 胸腺におけるリンパ球の分化と自律神経系

胸腺は、Tリンパ球の産生の場である。我々は、骨髄細胞中にはT系の幹細胞が存在し、その1個から、ヘルパー系T細胞及びキラー系細胞の双方へと増殖、分化し得ることを示してきた¹²⁾。また、ヘルパー系T細胞の胸腺内分化には、胸腺内放射線感受性細胞(Ia陽性と思われる)を必要とし、

キラー系T細胞の分化にはそれを必要としないことを示した¹³⁾。また、骨髄中のT系幹細胞は、皮質と髄質の境界領域血管から胸腺内へ入り一度皮膜下に集まり皮質から髄質方向に移動しながら増殖分化して皮質と髄質の境界領域の血管から外に出て末梢の2次リンパ組織に移動する。他方自律神経は先に述べたように皮膜下において網状構造をとっており、皮質と髄質の境界領域にも密な分布がみられる¹⁴⁾(図1-b)。Bullock¹⁵⁾は、マウス胸腺への神経支配が確立するのは胎生10~11日目であり、リンパ球分化の開始(11~12日)に先行することを示している。他方、ヌードマウス胸腺原基痕跡には、正常な神経支配が認められない¹⁶⁾。これらの報告から、我々は胸腺内でのリンパ球初期分化に自律神経系が関わっている可能性を検討している。C57BL/6マウス新生仔に6-ヒドロキシドーパミン(6-OH-DA)¹⁷⁾を、生後24時間以内に200mg/kg静注、2日後及び4日後に50mg/kgを腹腔内に投与した。図1は、6-OH-DA投与マウス及び対照マウスの生後7日目における胸腺切片の位相差像及びグリオキシル酸法による蛍光像を示している。図からもあきらかなように、6-OH-DA投与により蛍光で示されるカテコールアミン特異蛍光を有する神経線維は認められず、薬理的脱神経が行えることを示している。この6-OH-DA投与がリンパ球分化にどのように影響するかを検討するために、薬剤投与と新生仔胸腺細胞をとり、その細胞表面マーカーをFACSScanを用いて解析した。表1に示すように、Thy1陰性細胞の減少とPgp1陽性細胞の増大が認められた。このことは、胸腺内でのT系幹細胞でThy1抗原の発現がきわめて低いことと関係づけられるかもしれない。我々は現在、妊娠マウスへ6-OH-DAを投与して、新生仔胸腺細胞の細胞表面マーカーと細胞機能への影響を検討している。もう一方でinvitro胸腺器官培養系への6-OH-DA、ノルアドレナリン及び神経ペプチド添加の影響を検討しつつある。

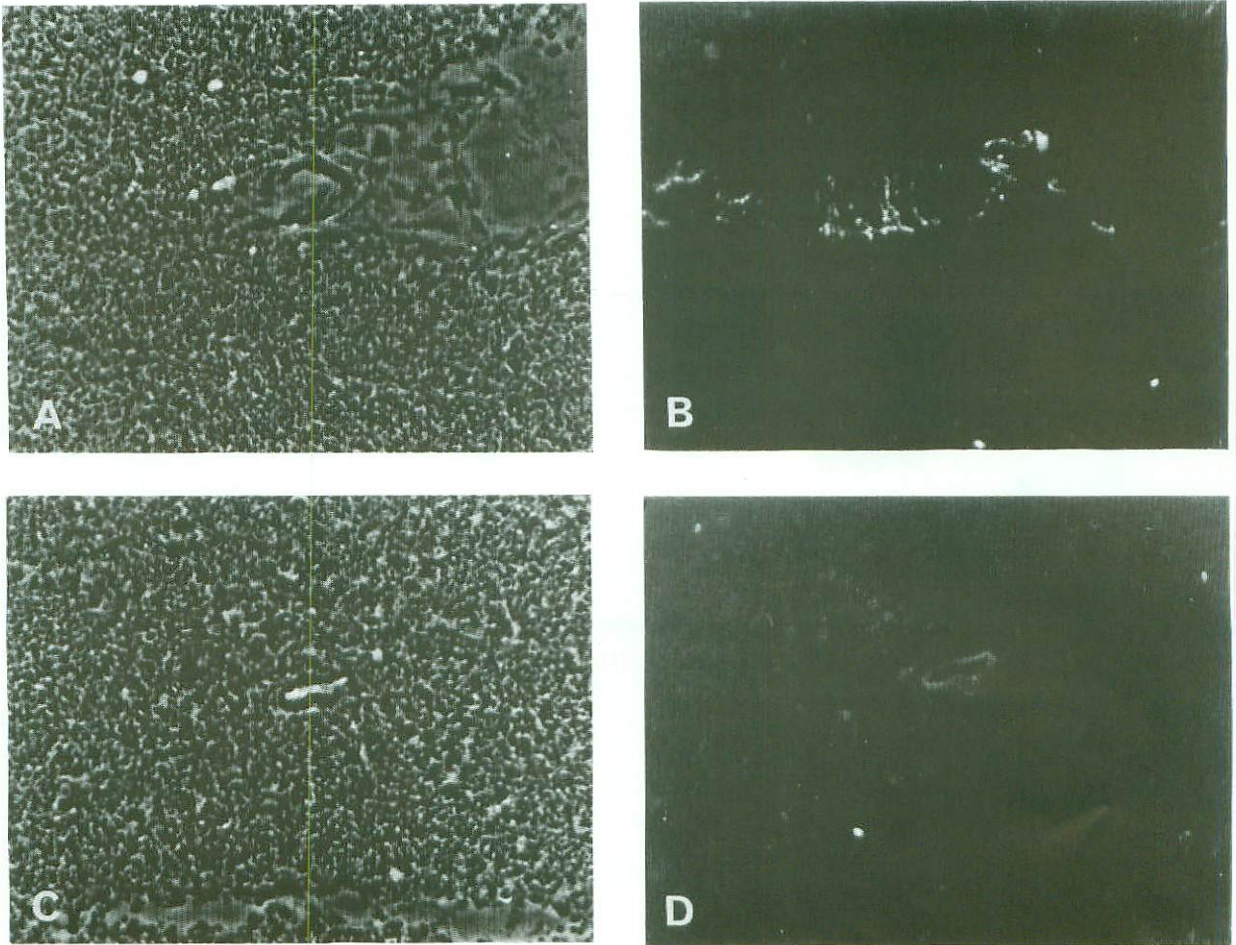


図1 胸腺における神経分布 (A, B, C, D×66): (A),(C) は, 位相差像, (B),(D) は Catecholamine 蛍光像, (A),(B) は正常マウス, (C),(D) は 6-OH-DA 処理マウス

Table 1. Surface antigen profile of thymus cells from control and 6-OH-DA injected mice.

	Surface antigen positive cells (%)	
	Control	6OH-DA
Thy1 ⁺	0.76 ± 1.00	0.36 ± 0.13
DN	1.29 ± 0.57	1.59 ± 0.66
CD4 ⁺ CD8 ⁻	4.15 ± 0.29	3.50 ± 0.72
CD4 ⁺ CD8 ⁺	0.91 ± 0.29	1.23 ± 0.42
PgPI ⁺	4.08 ± 1.94	5.70 ± 0.96
CD3 ⁺	5.09 ± 1.26	4.46 ± 0.68

Ⅲ 神経ペプチドと免疫応答

Ⅲ-1. リンパ球活性化による神経ペプチドの産生

リンパ球を, 異種リンパ球, ウイルスなどの抗原や, コンカナバリンA (ConA), リポ多糖 (LPS) などで刺激することにより, 神経ペプチド (enkephalin, endorphins) やホルモン (corticotropin, growth hormone, prolactin, gonadotropin) が産生されることが知られている⁹⁾. 我々も, BALB/c マウス胸腺を ConA で刺激し, 3 日

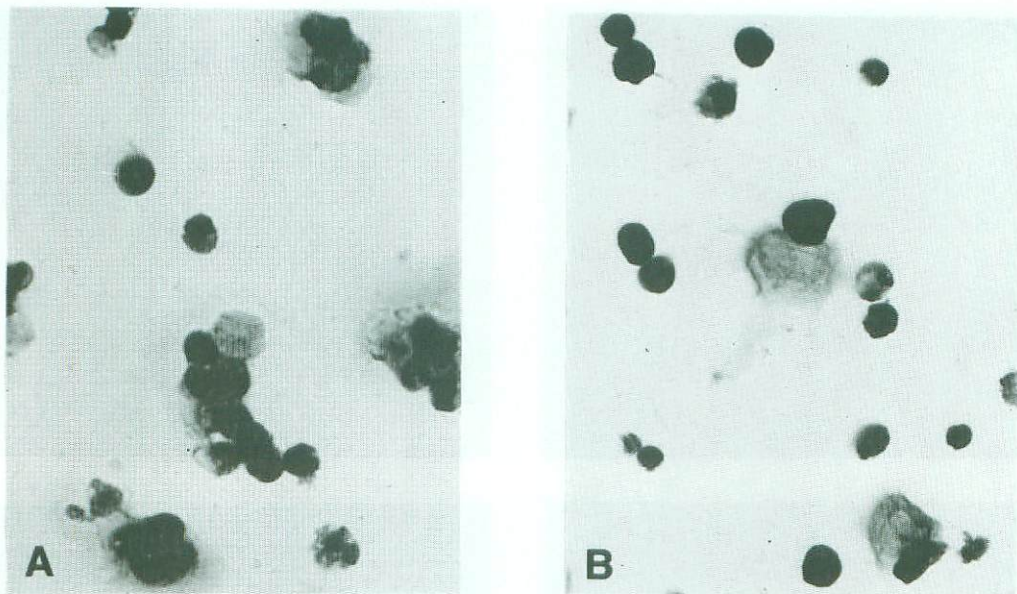


図2 ConA 活性化マウス胸腺細胞, 酵素抗体による染色
(A) 抗 Met-enkephalin, (B) Substance P (×240)

後の細胞を用い Met-enkephalin, Substance P の産生を酵素抗体法を用いて検討した。図2に示すように, Met-enkephalin 産生と Substance P 産生が芽球化したT細胞に認められた。現在我々は, 正常マウスと抗原刺激マウスで酵素抗体法による二重染色と, 蛍光の二重染色の FACSscanによる解析を用いてどのような細胞表面マーカーを持った細胞に神経ペプチド産生が認められるかを検討している。

リンパ球における神経ペプチドの産生が生理的に意義を持つか否かについては, *in vivo* での抗原(蛋白抗原, 異種細胞, 病原微生物)刺激により神経ペプチドの産生が認められるか否か。産生のメカニズムはどうか(他のリンホカインによる活性化が必要か等)またその機能は, という問いに順次答えていく必要がある。現在方法論上の検討を行ないながら実験を進めているところである。

Ⅲ-2. リンパ球における神経ペプチド・レセプターの発現

リンパ球の細胞表面にも神経細胞と同様に種々の神経ペプチドに対するレセプターが存在することが知られている。神経ペプチドのリンパ球への作用という点からみれば, レセプターの発現がどのようなリンパ球サブポピュレーションに発現しているかを確認することが必要である。そのために, 我々は, 神経ペプチドを赤色蛍光色素である R-Phycoerythrin (PE) と結合したものを作り, これと, 細胞表面抗原を緑色蛍光色素である Fluorescein isothiocyanate (FITC) 結合抗体を用いて染色するという二重染色法を用いて解析を行なった。

BALB/c マウス 8~12週令の胸腺細胞を Met-enkephalin 結合 PE (ENK-PE) と抗細胞表面分子抗体で二重染色して FACSscan で解析した結果を図3, 4に示す。胸腺細胞では, Thy1 陽性T細胞の約45%が Enkephalin レセプター (ENK-R) 陽性であり, L3T4 陽性細胞の25%, Lyt2 陽性細胞の28%程度が ENK-R を発現している。T200 陽性細胞ではその28%が ENK-R 陽性で, T200

ENK-R expression on lymphocyte subpopulations

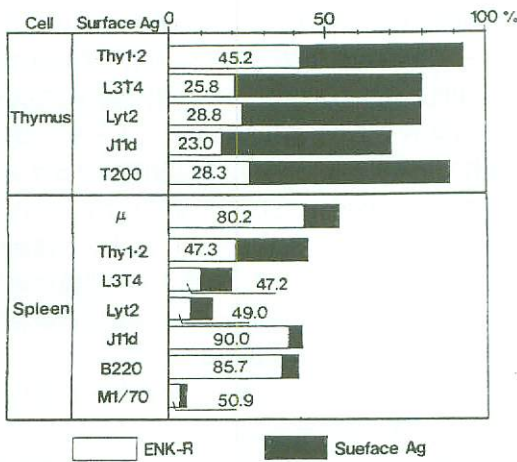


図3 胸腺及び脾細胞のサブポピュレーションにおける Enkephalin レセプターの発現: カラム中の数字は, マーカー陽性中の Enkephalin レセプター陽性細胞のパーセント

陰性胸腺細胞のほとんどは ENK-R 陽性と思われた。

他方, 脾細胞においては, μ 陽性B細胞の70%, B220 陽性B細胞の83%は ENK-R 陽性であった。脾T細胞 (Thy1 陽性) では, その34% ENK-R 陽性で, L3T4 陽性細胞, Lyt2 陽性細胞の約半数は ENK-R を発現していた。脾マクロファージ (M1/70 陽性細胞) ではその66%に ENK-R が発現していた。

リンパ球に発現するオピオイド・レセプターが δ subtype であるか μ であるか特定できていない。今後生化学的, 免疫学的検討が必要である。免疫系への Enkephalin の効果は神経系と同様に負の調節を行なっているという報告もあり, これらの結果を土台に検討を加えたい。

次に同じマウスを用いて Substance P 結合

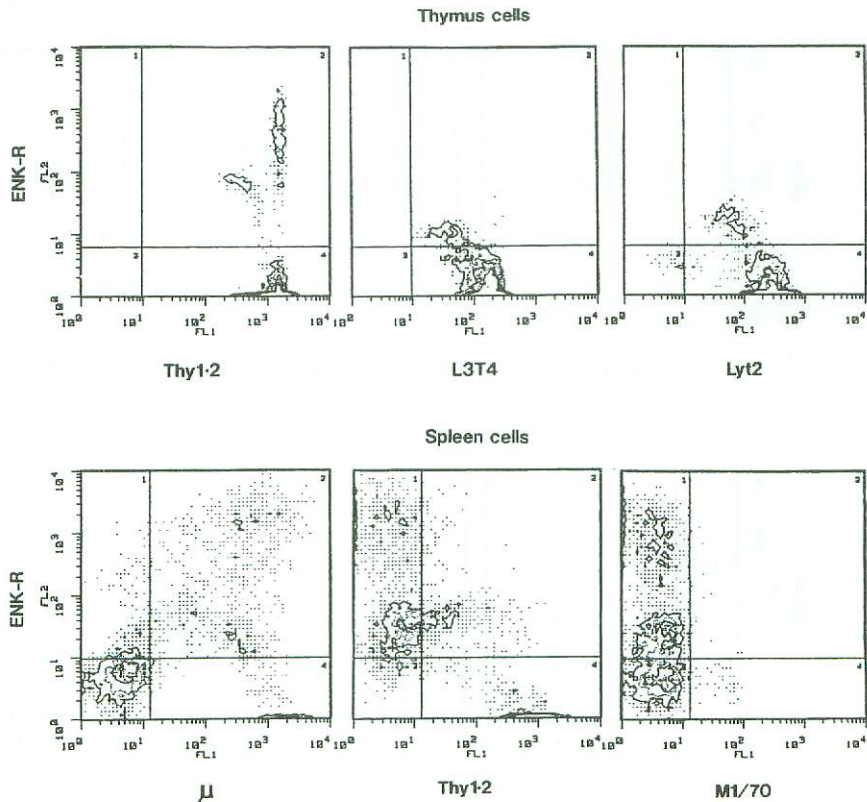


図4 胸腺細胞 (A) 及び脾細胞 (B) における Enkephalin レセプターの発現の FACSscan プロフィールの例

SP-R expression on lymphocyte subpopulations

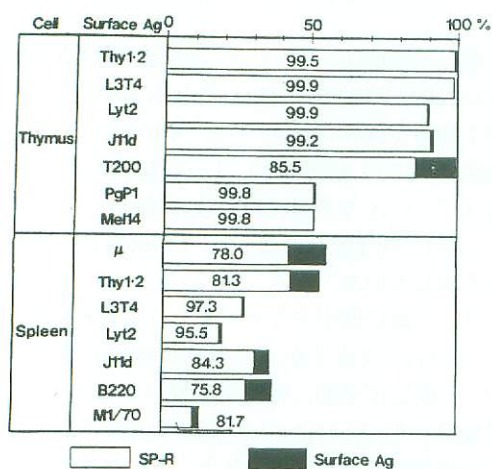


図5 胸腺及び脾細胞のサブポピュレーションにおける Substance P レセプターの発現：カラム中の数字は、マーカー陽性中の Substance P レセプター陽性細胞のパーセント

P Eを用いて行なった結果を図5, 6に示す。胸腺細胞では、そのほとんどに Substance P レセプター (SP-R) が発現している。他方、脾細胞では、 μ 陽性B細胞の78%が、B220 陽性細胞の75%が SP-R 陽性であり、脾T細胞のほとんども、SP-R 陽性であった。また、M1/70 陽性脾マクロファージでは、その81%に SP-R が発現していた。次の節で述べるように Substance P はリンパ球活性化作用を有しており^{18, 19)}、末梢リンパ組織における神経の positive regulation に何かの役割を果たしていることが示唆される。

図7, 8は、 β -Endorphin 結合 P Eを用いてのリンパ球の染色結果を示す。

胸腺細胞には、Substance P と同様にそのほとんどに β -Endorphin レセプター (END-R) が発現している。脾B細胞 (μ 陽性) には86%に、

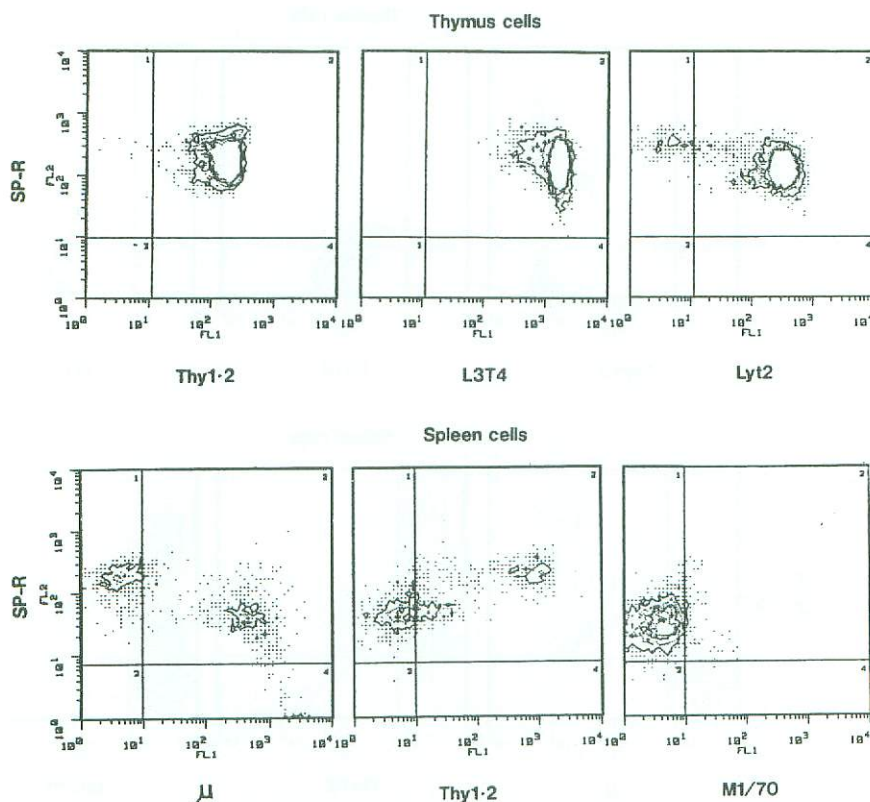


図6 胸腺細胞 (A) 及び脾細胞 (B) における Substance P レセプターの発現の FACSscan プロフィールの例

END-R expression on lymphocyte subpopulation

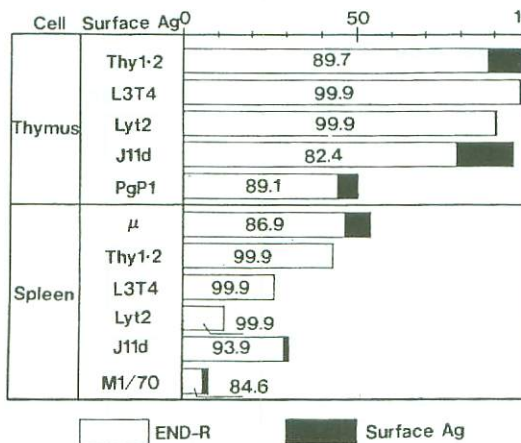


図7 胸腺及び脾細胞のサブポピュレーションにおける β -Endorphin レセプターの発現: カラム中の数字は、マーカー陽性中の β -Endorphin レセプター陽性細胞のパーセント

脾マクロファージ (M1/70) には84%に END-R が発現している。また、脾T細胞でもそのほとんどに END-R が発現している。このことは、T細胞に対する増殖増強効果²⁰⁾と関連して興味深い。

リンパ系細胞における神経ペプチドに対するレセプター発現は、そのレセプターが高親和性の機能的レセプターであるか否かが問題となる。我々は、これらのレセプターに対するモノクローナル抗体を作製して検討を行なうとともに in vitro および in vivo での抗体によるレセプター bridging の効果も検討する。

Ⅲ-3. リンパ球の活性化と神経ペプチド

リンパ球の機能への神経ペプチドの効果は in vitro の系を用いて免疫薬理学的検討が行なわれている。Tリンパ球の mitogen に対する増殖反応

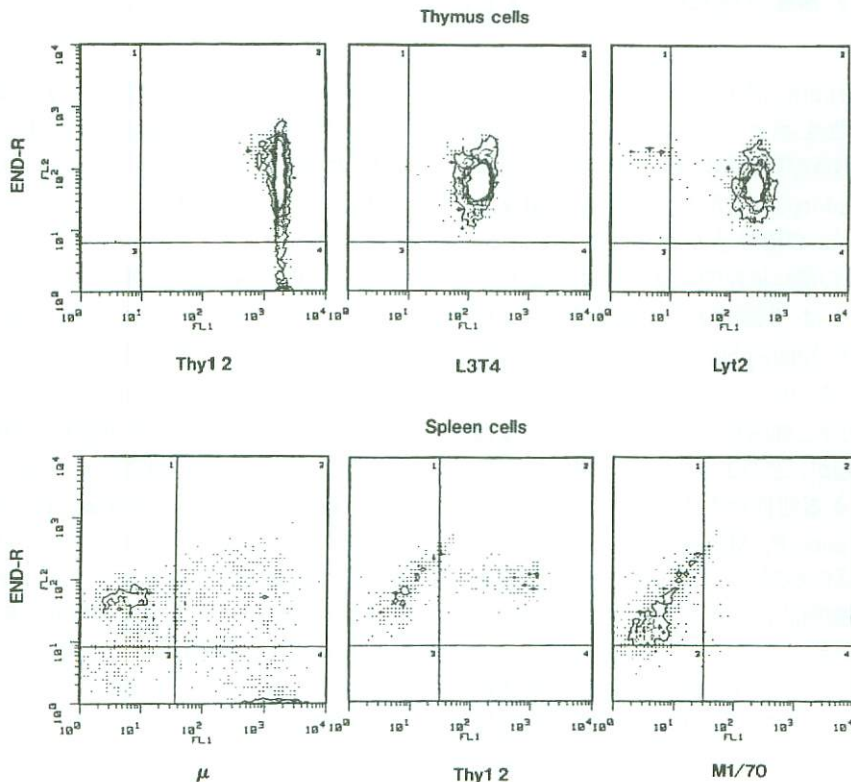
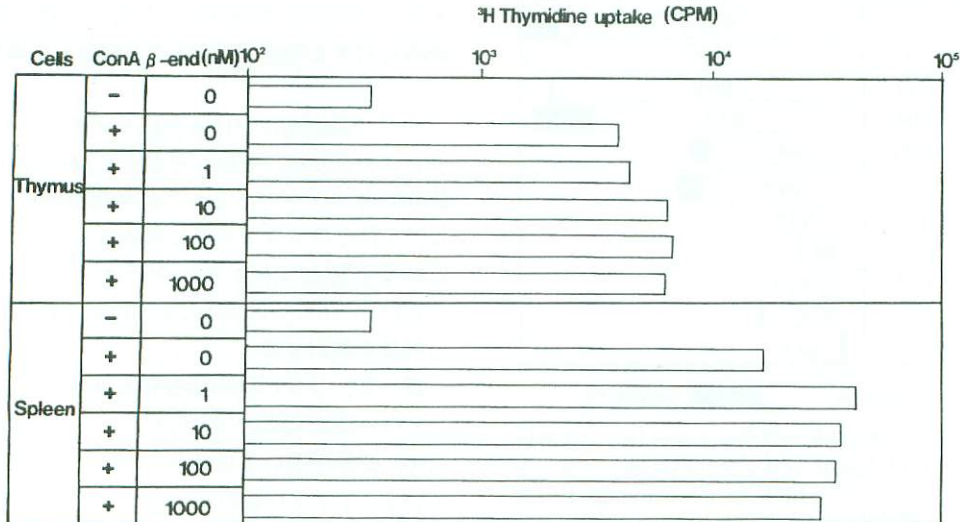


図8 胸腺細胞 (A) 及び脾細胞 (B) における β -Endorphin レセプターの発現の FACSscan プロフィールの例

Activation of ConA response by β -endorphin図 9. 胸腺及び脾細胞の ConA に対する反応の β -endorphin による活性化

には、 β -Endorphin, Met-enkephalin, Substance P は、増殖活性を示す^{10, 20}。図 9 は、BALB/c マウス胸腺細胞及び脾細胞に ConA を加えて培養する際に β -Endorphin を加えた場合の増殖反応を ^3H -Thymidine の取り込みでみた結果である。 β -Endorphin の量に依存的に反応増強が認められた。このことは、刺激された B 細胞や、マクロファージが、 β -Endorphin を産生するという報告²¹や NK 活性が β -Endorphin で増強されるとい報告²²と関連し興味深い。現在どのような機能を持つ T 細胞が、どのようなメカニズムで、 β -Endorphin による活性化を受けるのかを検討中である。Substance P, Met-enkephalin にも、増殖反応の増強活性が認められ、それぞれ別の機能的 subset の T 細胞活性化を行なっているのかどうか検討する必要がある。

他方、 α -Endorphin などが in vitro の抗体産生を抑制するという報告²³、ストレス誘発内因性 opiate が NK 活性を抑制するという報告²⁴もあり、検討することが必要である。

また、Substance P が、T 細胞、B 細胞の活性

化と共に、肥満細胞の脱顆粒²⁵、好中球のライソゾーム酵素の放出²⁶、食細胞の活性化²⁷、走化性の促進²⁸に働くことは次に述べる局所炎症と関連して興味深いところである。

IV 炎症反応と神経ペプチド

炎症反応は、物理的、化学的及び微生物学的侵害に対する局所での生体防御反応として理解し得る。炎症の基本的性格は局所での血漿と食細胞である好中球の滲出という初期過程と組織細胞成分の増生である。この初期過程の trigger となるものは、侵害因子によって直接または間接に肥満細胞をその中核とする局所の炎症誘発性細胞に働き化学伝達物質の放出をおこすことにある。物理、化学的刺激に対しては、末梢軸索反射を介して、Substance P が末梢局所に遊離され、それが肥満細胞からヒスタミンを遊離させることにより炎症が惹起されることが知られている¹¹。

我々は、Substance P レセプターが、肥満細胞培養株である MMC-34 に高く発現されていることを見だし (図10)、このレセプターの解析と

MMC-34 cells

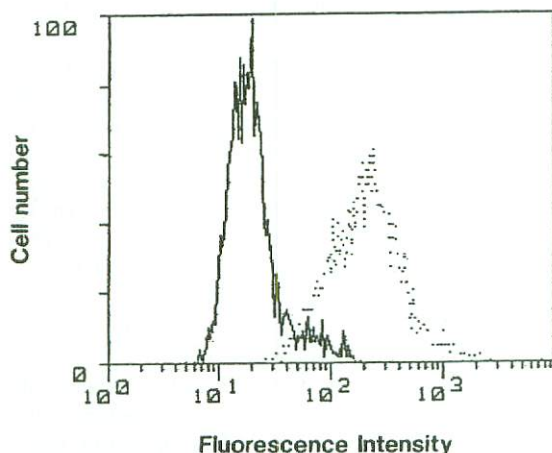


図10 マスト細胞株における Substance P レセプター
の発現: FACSscan によるプロフィール実線は非
染色対象, 破線は Substance P-PE による染色
したもの

共に, 鍼灸や微生物学的侵害によって, ①直接の
肥満細胞への作用, ②局所リンパ系細胞での Sub-
stance P の誘導, ③局所神経刺激による Sub-
stance P の誘導という3つの可能性について検
討を加えている。

V 鍼灸の免疫応答調節について

鍼灸が免疫反応に与える影響について, 多くの
概念的提起と, 小数の実験的研究の報告²⁸⁻³⁰⁾が認
められる。我々も, ボランティアによる, 人での
鍼灸刺激の末梢リンパ球動態への影響, マウスで
の抗体産生及び遅延型過敏症応答への影響を見て
きた。残念ながら現在まで十分再現性のある結果
は得られていない。鍼灸という mild な刺激系に
対して, 反応の検出系をいかに鋭敏なものとして
いくかという点と, 反応する個体の側の差異を無
視できる実験動物系を用いることが必須と思われ
る。

我々は, システムの改善によって鍼灸の免疫系
への効果を直接的に検出するアプローチと, 鍼灸

が誘発する既知の, または未知の生理活性物質を
検討して, その物質の免疫系への影響を検討する
という2つの方法を併用しながら研究を進めて行
きたい。同時に, 神経免疫学の学問的基礎の広が
りなくしてはこの問題の展開は望めないと信ずる。

VI おわりに

神経と神経由来因子, 及びホルモンと免疫系
との関連について我々は研究の一步を踏み出した
ばかりである。我々の作業仮説のシェーマを図11
に示す。神経系による免疫応答の調節は, リンパ
系組織に入ってきている神経線維自身から放出さ
れる分子と視床下部-下垂体-副腎系の放出する
血中ホルモンの2つの方向から調節が行なわれて
いるであろう。作用を受ける免疫系においては神
経系はその Hard 部分となるリンパ球の造成の場:
骨髄と胸腺と, その Soft 面となる局所反応の両
方に作用し得るものと考えられる。神経系は外か
らの多様な刺激入力に対し生体のバランス維持の
方向で免疫系の調節をすると考えられ, on, off
という形の絶対的な役割をするものとは考えにく
い。このバランスの作用の中に鍼灸も位置づけら
れるものと考えている。

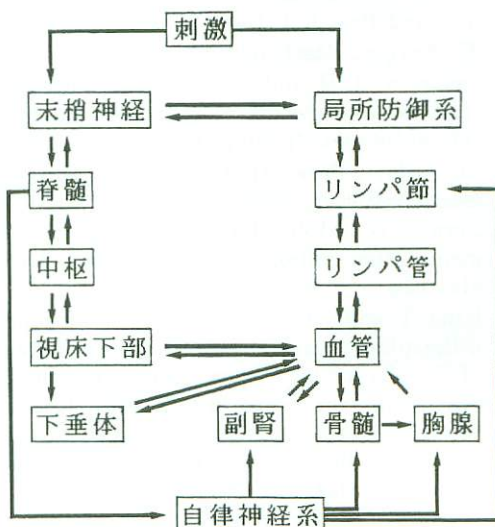


図11. 神経系と免疫系の関係

VII 文 献

- 1) 小野沢精一 福永光司 山井湧 編：気の世界。東大出版会，東京，1978.
- 2) He L : Involvement of endogenous opioid peptides in acupuncture analgesia. *Pain* 31 : 99~121, 1987.
- 3) 熊澤孝朗：痛みとポリマー受容器。日本生理学雑誌 51 : 1~15, 1989.
- 4) Martin B J : Neuroendocrine regulation of Immune response. In Behan P Spreafico F (eds) : Neuroimmunology, Raven Press, New York, pp433~443, 1984.
- 5) Cotman C W : The Neuro-Immune-Endocrine Connection. Raven Press, New York, 1987.
- 6) Calvo W and Forteza-Vila J : On the development of bone marrow innervation in newborn rats as studied with silver impregnation and electron microscopy. *Am J Anat* 126 : 355~359, 1968.
- 7) Williams J M et al : Sympathetic innervation of murine thymus and spleen. Evidence for a functional link between the nervous and immune systems. *Brain Res Bull* 6 : 83~94, 1981.
- 8) Blalock J E : Production of neuroendocrine peptide hormones by the immune system. In Blalock J E and Bost K L (eds) : *Prog Allergy*, vol 43, Karger, Basel, pp1~13, 1988.
- 9) Bost K L : Hormone and neuropeptide receptor on mononuclear leukocytes. In Blalock J E and Bost K L (eds) : *Prog Allergy*, vol 43, Karger, Basel, pp68~83, 1988.
- 10) Johnson H M and Torres B A : Immunoregulatory properties of neuroendocrine peptide hormones. In Blalock J E and Bost K L (eds) : *Prog Allergy* vol 43, Karger, Basel, pp37~67, 1988.
- 11) Pernow B : Role of tachykinins in neurogenic inflammation. *J Immunol* 135 : 812~815, 1985.
- 12) Kina T and Amagai T et al : Functional differentiation and repertoire diversification of T cells derived from single progenitor cells. *Eur J Immunol* 18 : 897~903, 1988.
- 13) Amagai T et al : Dysfunction of irradiated thymus for the development of helper T cells. *J Immunol* 139 : 358~364, 1987.
- 14) Felten et al : Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol* 135 : 755~765, 1985.
- 15) Bulloch K : A light and ultrastructural analysis of innervation of the thymus gland during the perinatal period. *Soc Neurosci Abstr* 8 : 72, 1980.
- 16) Bulloch K and Pomeranz W : Autonomic nervous system innervation of thymic related lymphoid tissue in wild type and nude mice. *J Comp Neurol* 228 : 57~68, 1984.
- 17) Jonsson G : Lesion Methods in Neurobiology. In Heym C H and Forssmann W-G (eds) : *Techniques in Neuroanatomical Research*, Springer-Verlag, Berlin, pp76~82, 1981.
- 18) Payan D G et al : Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J Immunol* 131 : 1613~1615, 1983.
- 19) Stansz A M et al : Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferation by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *J Immunol* 136 : 152~156, 1986.
- 20) Gilman S C et al : β -Endorphin enhances lymphocytes proliferative responses. *Proc Natl Acad Sci* 79 : 4226~4230, 1982.
- 21) Habour-McMenamin D et al : Bacterial lipopolysaccharide induction of leucocyte derived ACTH and endorphins. *Infect Immun* 48 : 813~817, 1985.
- 22) Mathews P M et al : Enhancement of natural cytotoxicity by β -endorphin. *J Immunol* 130 : 1658~1662, 1983.
- 23) Heijnen C J et al : Effect of α -endorphin on the antigen induced primary antibody response of human blood B cells in vitro. *J Immunol* 136 : 213~216, 1986.
- 24) Shavit Y et al : Opioid peptides mediate the suppressive effect of stress on natural killer cell cytotoxicity. *Science* 223 : 188~190, 1984.
- 25) Mazured N et al : The role of the N-terminal tetrapeptide in the histamine releasing action of substance P. *Neuropharmacology* 20 : 1025~1027, 1981.
- 26) Marasco W A et al : Substance P binds to the formylpeptide chemotaxis receptor on the rabbit neutrophil. *Biochem Biophys Res Commun* 99 : 1065~1072, 1981.
- 27) Hartung H-P et al : Substance P: Binding properties and studies on cellular responses

- in guinea pig macrophages. *J Immunol* **136**: 3856~3863, 1986.
- 28) Sakic B et al: Electro-acupuncture modifies humoral immune response in the rat. *Acupuncture & Electrotherapeutics Res Int J* **14**: 115~120, 1989.
- 29) Zhao J and Wengin L: Relationship between acupuncture-induced immunity and the regulation of central neurotransmitters in the rabbit: I. Effect of central catecholaminergic neurons in regulating acupuncture-induced immune function. *Acupuncture & Electro-therapeutics Res Int J* **13**: 79~85, 1988.
- 30) Chin T F et al: Induction of circulating interferon in humans by acupuncture. *Am J of acupuncture* **16**: 319~328, 1988.