

マウスへの鍼灸刺激およびストレス刺激による インターロイキン6の産生誘導

†塚本 紀之¹⁾, 林田 一志¹⁾, 糸井 マナミ²⁾, 雨貝 孝²⁾

¹⁾ 明治鍼灸大学院・免疫生化学 ²⁾ 明治鍼灸大学・免疫微生物学教室

要旨: マウスの系を用いて鍼灸刺激およびストレス刺激によるサイトカインの産生について検討を行った。拘束したC57BL/6マウスに鍼刺激、鍼通電刺激、通電刺激を30分間与えると刺激終了後1~5時間をピークとする末梢血中のIL-6の活性が検出され、その後長時間にわたってIL-6の活性が持続した。しかし灸刺激では末梢血中のIL-6の活性は検出されなかった。対照として行った拘束のみの群では3時間後にのみIL-6活性が検出された。刺激の量的、質的負荷が末梢血中のIL-6の活性に影響を与えるかについて、拘束、通電、水浸拘束刺激を用い刺激時間を4時間にして検討したところ、末梢血中でのIL-6の活性は増加した。これらの末梢血中のIL-6活性は抗IL-6モノクローナル抗体によって大部分が中和された。他方、末梢血中でのIL-1, TNF, IFN- γ 活性は検出されなかった。T・Bリンパ球が欠損するSCIDマウスを用いて各種刺激後の末梢血中でのIL-6の活性を検討したところ、拘束のみ、鍼、鍼通電、通電刺激ばかりでなく灸刺激においても活性が確認された。しかし、scid突然変異を持たず遺伝的形質がSCIDマウスと同じであるCB17マウスでは灸刺激においては、C57BL/6マウスと同様に、末梢血中でのIL-6の活性が認められなかった。以上の結果よりIL-6の産生誘導に関し、鍼、灸、その他諸種ストレスが異なる刺激であることが示された。

IL-6の産生部位について、水浸拘束4時間刺激を与えたC57BL/6マウスでRT-PCR法により検討を行ったところ、視床下部においてのみIL-6mRNAの発現が確認された。この結果は物理的・精神的な強いストレスによるIL-6の産生部位の一つとして視床下部が存在することを示唆している。

I はじめに

生体は外部環境の変化に対し、それを素早く察知し、さまざまな反応を発動して、生体の恒常性を維持するための機構を備えている。このような機構の中核として神経系・内分泌系・生体防御系が位置付けられる。そして、それらの系が互いに情報を伝達することによって調節がおこなわれ、生体の恒常性が維持される。このような情報伝達は細胞が分泌する分子によって行われるが、その分子として神経ペプチド・ホルモン・サイトカインといった分子が存在している。

このうちサイトカインはこれまでの研究から、特に造血系と免疫系の間にネットワークを形成し、多面的・多岐にわたる生物活性を示すことが明らかになってきている。近年、インターロイキン1 (IL-1)、インターロイキン6 (IL-6)、インターフェロン- γ (IFN- γ) などのサイトカインが、免疫系の細胞ばかりでなく、神経系の細胞で産生されることが報告されている^{1,2)}。これらのサイトカインは中枢神経系の睡眠中枢、発熱中枢、食欲中枢

などに作用して、生体の生理作用を調節することが知られている³⁾。また、マウス下垂体腫瘍細胞AtT20を用いたin vitroの実験で、IL-1・IL-6がAtT20細胞に直接作用して培養液中への副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 放出を増加させるという報告もあり⁴⁾、サイトカインが神経・内分泌系とのクロストークの一因子として作用していることも示されている。このように免疫系、内分泌系、中枢神経系を含めた生体調節をつかさどる情報伝達因子としてのサイトカインの位置付けが明らかになってきている。

一方、生体調節における鍼灸刺激の分子メカニズムに関する研究は少ない。鍼灸刺激の目的は、身体の恒常性維持能力を調べ、自己防御能力をたかめることとされている。具体的には施術者が患者の状態を四診 (望診、聞診、問診、切診) により把握し、体表に刺鍼、施灸するといった方法をとる。鍼を刺入したり、施灸による熱刺激は通常侵害刺激と考えられ、生体の組織が損傷し局所的な組織反応が起こることが予想される。しかしな

平成9年1月9日受付, 平成9年2月20日受理

Key Words: 鍼刺激 Acupuncture ストレス Stress マウス Mouse インターロイキン6 Interleukin 6

†連絡先: 〒629-03 京都府船井郡日吉町 明治鍼灸大学院 免疫生化学

がら、鍼刺激、灸刺激によって生体は多様な反応を示す⁵⁾とされており、鍼灸刺激による反応とストレス反応とが異なるのかどうかを検討する必要がある。

そこで、本研究では鍼灸による生体調節の中にサイトカインがどのように位置付けられるかということに関し検討を加えた。また、鍼灸刺激によって多様な炎症性サイトカインの産生が起こるのか否か、また鍼灸刺激による反応とストレス反応に違いがあるのかということに関し検討を行った。本研究ではマウスを用い、鍼、灸、ストレス刺激後のサイトカインの末梢血中への産生について検討を行った。サイトカインとして、免疫系、神経系の調節因子としての作用が示されているIL-6、IL-1、TNF、IFN- γ を測定した。その結果、鍼刺激やストレス刺激によってIL-6のみの産生が見いだされ、さらに、鍼刺激とストレス刺激においてはその産生動態に違いがみられたのでここに報告する。

II 材料および方法

1. 動物

実験にはすべて8~12週齢の(1) C57BL/6マウス(体重約27.7g)、(2) C17マウス(体重約26.7g)、(3) C17SCIDマウス(体重約26.4g)雄性を用いた。マウスは室温23~25℃、湿度45~55%のSPF条件下で、ポリカーボネート製ケージ(日本クレア, 190×260×125mm)内で飼育し、明暗周期は12時間(明期は午前7時~午後7時)とした。

2. 生体刺激

各マウスはガラス容器(700ml)内でジエチルエーテル(和光純薬)を用いて吸入麻酔し、後肢を出せるように2つの穴(直径9mm)を側面に、また呼吸できるように先端に10個の穴(直径4mm)を開けたポリカーボネート製遠沈管(50ml, Nalgen)に拘束し、麻酔から覚醒した後、後述する各種刺激を行った。刺激終了後は採血時までケージ内に置いた。刺激方法は(1)拘束のみ、(2)拘束+鍼刺激、(3)拘束+鍼通電刺激、(4)拘束+灸刺激、(5)拘束+通電刺激、(6)拘束+水浸刺激とした。刺激部位はいずれも両側のヒト三里穴相当部位(膝外側下部)とした。鍼は13mm26

号鍼(直径0.26mm)ステンレス製を、灸は1mgの円錐状(底面の直径約2mm)を3壮、通電は低周波治療機(ラウスHOT SSP, 日本メディックス)を用い、15Hzの一定周波とした。また、水浸刺激は恒温槽(水温30℃)にマウスを遠沈管に拘束した状態のまま垂直に立て頸まで水浸した。上記の(1)~(6)の実験群において、刺激時間は、(1)~(5)群については30分とし、(1)(5)(6)群については4時間刺激も検討した。

3. 採血と血清の分離・保存

30分刺激群では刺激終了後より1, 3, 5, 18時間の時点で、4時間刺激群では刺激終了後0, 1, 3, 5時間の時点で、それぞれ各群5匹全採血した。採血方法としては予備実験により眼窩静脈叢からの経時的採血がIL-6の誘導をおこすことが明らかとなったため全採血とした。血液は各個体ごとに1.5mlのマイクロチューブ(岩城硝子)にとり、直ちに氷上に保存し、4℃, 15000rpm, 5分間冷却遠心し血清を分離した。分離した血清の2/3容量はIL-1アッセイ, IL-6アッセイ用試料として10%ウシ胎仔血清(Bioproducts), 50 μ M 2-メルカプトエタノール(ナカライテスク), ペニシリンG(明治製菓)100U/ml, 硫酸ストレプトマイシン(明治製菓)100 μ g/ml炭酸水素ナトリウム(和光純薬)1.5g/lを加えたRPMI 1640培養液(日水製薬)で10倍に希釈した。残り1/3容量はTNFアッセイ用として10%ウシ胎仔血清, ペニシリンG 100U/ml, 硫酸ストレプトマイシン 100 μ g/ml, 炭酸水素ナトリウム 1.5g/lを加えたダルベッコ変法MEM培養液で10倍に希釈した。希釈血清は、0.20 μ mのセルロースアセテート膜シリンジフィルター(Corning)でろ過滅菌後分注し、アッセイ時まで-80℃で保存した。

4. サイトカインアッセイ法

IL-1, IL-6については細胞増殖アッセイ, TNFについては細胞障害アッセイ, IFN- γ についてはELISA法を用いた。

1) IL-1アッセイ: 96穴平底細胞培養プレート(Corning)に10%ウシ胎仔血清, 50 μ M 2-メルカプトエタノール, ペニシリンG100U/ml, 硫酸ストレプトマイシン 100 μ g/ml, 炭酸水素ナトリウム 1.5g/lを加えたRPMI1640培養液

で最終濃度40~1080倍にした血清3倍希釈系列を100 μ lずつ各希釈3ウェル作成し、そこへC3H/HeJマウスより無菌的に調製した胸腺細胞浮遊液を $1.5 \times 10^6 / 100 \mu\text{l} / \text{well}$ ずつ、およびPHA-P (Difco) を最終濃度10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ になるように加え、混合し、37°Cで10%CO₂条件下で72時間培養した。培養終了前6時間に [methyl-³H] Thymidine (Amersham) 18.5kBq/10 $\mu\text{l} / \text{well}$ でパルスし、細胞をセルハーベスター (Skatron) を用いてグラスファイバーフィルター (Skatron) 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) を加えた後、³Hの取り込みを β -カウンター (Aloka liquid scintillation system) を用いて測定した。各血清試料中のIL-1活性単位はrIL-1 β (大塚製薬 平井博士より供与) 標準試料の希釈系列による増殖活性を解析 (Aloka RIA program Sys-7102-Ver3.1) し標準曲線を作成し、これを用いて算出した。

2) IL-6アッセイ: 血清希釈系列の作成および細胞増殖の測定はIL-1同様に行った。アッセイにはマウスIL-6依存性ハイブリドーマ7TD1細胞株をセミコンフルエントの時点でアッセイに使用した。作成した血清希釈系列に7TD1細胞株浮遊液を $1 \times 10^3 / 100 \mu\text{l} / \text{well}$ ずつ加え、37°C, 10% CO₂条件下で72時間培養した。細胞は、維持に用いたrIL-6の混入を最小限に抑えるため、血清無添加のRPMI1640培養液で2回洗った後、20%ウシ胎仔血清を加えたRPMI1640培養液で37°C, 10%CO₂条件下で2時間培養し、再び血清無添加のRPMI1640培養液で2回洗った後アッセイに用いた。各血清試料中のIL6活性単位の算出は、標準試料rIL-6 (東レ基礎研 須藤博士より供与) を用いIL-1同様に行った。

3) TNFアッセイ: 96穴平底細胞培養プレートに、1%ウシ胎仔血清、ペニシリンG 100U/ml, 硫酸ストレプトマイシン 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 炭酸水素ナトリウム1.5g/l加えたダルベッコ変法MEM培養液で最終濃度40~1080倍にした血清3倍希釈系列を100 μl ずつトリプレケートで作成し、そこへLM細胞株浮遊液 $5 \times 10^4 / 100 \mu\text{l} / \text{well}$ およびアクチノマイシンD (Sigma) 最終濃度1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ を加え、混合し、37°C, 10%CO₂条件下で24時間培養した。LM細胞株は10%ウシ胎仔血清を加えたダルベッコ変法MEM培養液で培養し、セミ

コンフルエントの時点でアッセイに使用した。培養終了後、細胞を1%グルタルアルデヒド (和光純薬) を加えたリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, 日水製薬) で30分間固定し、PBSで洗浄、乾燥した後、1%メチレンブルー (和光純薬) 水溶液で60分間染色した。再びPBSで洗浄、乾燥後1N塩酸で60分間メチレンブルーを抽出しプレートリーダー (東ソー) で吸光度665nmで測定した。各血清試料中のTNF活性単位の算出はrTNF (大日本製薬 中野博士より供与) 標準試料を用い、IL-1, IL-6と同様に行った。

4) IFN- γ アッセイ: Mouse Interferon- γ Elisa Kit (Genzyme)⁶⁾ を用いて測定した。

4. IL-6中和実験

10倍に希釈した血清試料50 μl (最終濃度40倍) とラット抗マウスIL-6モノクローナル抗体 (Genzyme) 50 μl (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) を4°Cで1時間前処理した後、IL-6アッセイと同様に活性を測定した。抗体による抑制の程度を示す% inhibitionは次の式より算出した。

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \left[\frac{\{(\text{抗体処理血清試料 [CPM]}) - (\text{抗体処理標準試料 [CPM]})\}}{\{(\text{血清試料 [CPM]}) - (\text{抗体処理標準試料 [CPM]})\}} \right] \times 100$$

5. IL-6mRNAの検出

1) RNAの抽出

視床下部、下垂体、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、副腎、精巣を摘出後4°Cで、0.1M Tris-HCl (pH 7.5, 和光純薬), 1%2-メルカプトエタノールを加えた4.0M Guanidine thiocyanate (ナカライテスク) 溶液 (GTC) 中でホモジナイズした。超遠心チューブ (2.2PA, 日立) に、0.1%ジエチルピロカーボネート処理した超純水を使用して作成した5.7M CsCl (和光純薬) 水溶液 (0.01M EDTA (pH7.5) を含む) を加え、GTC溶液を重層し、15°C, 55000 rpm, 5時間超遠心し全RNAを分離した。分離した全RNAをGTCでリンスしたのち70%エタノール水溶液でリンスし、室温で30分間乾燥した。その後、1%SDSを含むTris-EDTA (pH7.6) を加えて全RNAを溶かし3M酢酸ナトリウム水溶液 (pH5.2) 1容と99.9%エタノール2容を加え、-80°Cで30分間置き、4°C, 15000 rpm, 20分間遠心した。上清を捨てた後、沈さを

70%エタノール水溶液で洗い、再び15000rpmで5分間遠心し、沈さを室温で、30分間乾燥した。このRNAサンプルを定量し、cDNAの合成に用いた。

2) cDNAの合成

Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MoMLV-RTase) を用いたRT反応によりcDNAを合成した。全RNA10 μ gを5 μ lのジエチルピロカーボネート処理超純水に溶かした。500 μ lのマイクロチューブに次のように試薬を加えた。ジエチルピロカーボネート処理超純水4.5 μ l, 5 $\times$ RTbuffer (250mM Tris-HCl (pH8.3) 375mM KCl, 15mM MgCl₂, Life Technologies) 4 μ l, 0.1M DTT solution (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM DTT, 0.01% N p40, 0.1mM Na₂EDTA, 0.1MNaCl, 50%グリセロール, Life Technologies) 2 μ l, 20mM dNTPs (Pharmacia) 1 μ l, oligo-dT12-18 (100 μ g/ml in TE) 2 μ l, RNasin (40u/ml) 0.5 μ l, 全RNA 5 μ l (10 μ g), MoMLV-RTase 1 μ l。これを37°C, 60分間反応させ、その後95°Cで5分間酵素を不活化し、4°Cに冷却した。

3) Polymerase Chain Reaction (PCR) 法

Pfu DNAPolymerase (Stratagene) を用いたPCR反応を行った。PCRチューブ (Mobitec) に次のような試薬を加えた。ジエチルピロカーボネート処理超純水80 μ l, 10 $\times$ Reaction buffer (200mM Tris-Cl (pH8.2), 100mM KCl, 60mM (NH₄)₂SO₄, 20mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 100ng/ μ l nuclease-free BSA, Stratagene) 10 μ l, 20mMdNTPs 1 μ l, Primer-センス鎖 3 μ l, Primer-アンチセンス鎖 3 μ l, DNA Template 2 μ l, Pfu DNA polymerase (2500U/ml) 1 μ l。これをサンプルとしてPCR反応を行った。PCR反応は温度コントロールシステム (Astec PC-700) を用い、反応サイクルは前反応として95°C7分, 55°C5分, 73°C2分行い, 95°C1分, 55°C1分30秒, 73°C2分の反応を25サイクル行い最後に95°C2分, 55°C2分, 73°C5分反応させ4°Cで冷却した。PrimerとしてIL-6センス鎖 GTGATGCTGGTGACAACCACG (1537-1558), IL-6アンチセンス鎖 GTTTTCTGCAAGTGCATCATCG (2979-3000) を用いた。

4) 電気泳動

ゲルは3%アガロース (NuSieve) を用い、泳動用緩衝液としてTAE (0.04M Tris-acetate,

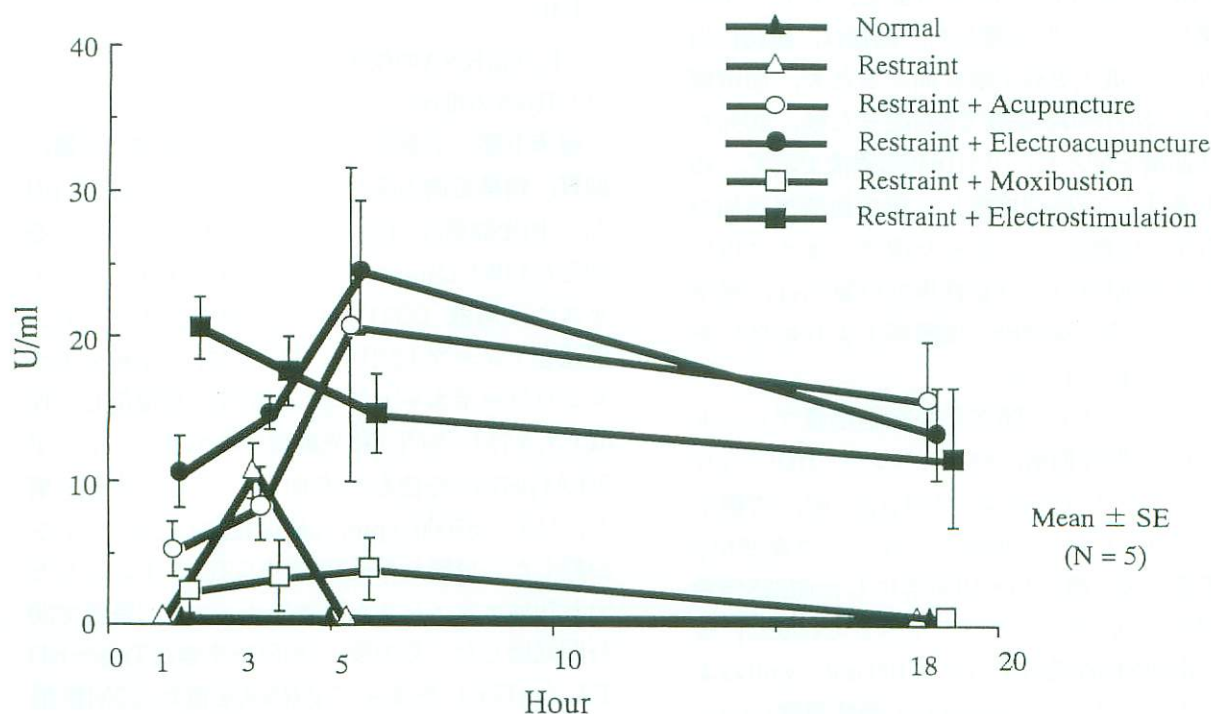


図1 30分刺激群におけるIL-6の産生動態：拘束のみの刺激、拘束+鍼刺激、拘束+鍼通電刺激、拘束+灸刺激、拘束+通電刺激の5つの刺激群について30分間刺激を行った。刺激終了後1, 3, 5, 18時間の時点で全採血を行い、血清を分離しIL-6活性を測定した。

0.002M EDTA) を用いた。PCR増幅産物は泳動槽 (Advance) にて15V/cmの電圧で1時間泳動を行い分離した。DNAの染色には0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロマイドを用いた。なお、マーカーは2 μl の100bp Ladder (Pharmacia) を用いた。バンドの確認はUVトランスイルミネーターを使用した。

III 結果

1. 鍼灸刺激によるIL-6の産生誘導

鍼灸刺激が生体にIL-6を産生誘導するかどうか検討するためC57BL/6マウスを拘束下で鍼刺激、鍼通電刺激、灸刺激を30分行い、刺激終了後1, 3, 5, 18時間の時点で全採血し血清を分離し血清中のIL-6を測定した。対照として拘束のみ及び拘束下での通電刺激を行った。図1は30分刺激群におけるIL-6の産生動態を検討した結果である。鍼刺激、鍼通電刺激を与えた群では刺激終了1時間後でIL-6の末梢血中での活性が検出され、刺激終了5時間後でそれぞれ $24.1 \pm 4.5\text{U}/\text{ml}$, $20.1 \pm 10.8\text{U}/\text{ml}$ となり、刺激終了18時間後においても末梢血中でIL-6の活性が検出された。しかし灸刺激においては経時的に検討したにもかかわらず末梢血中

でのIL-6の活性はほとんど検出されなかった。対照として行った通電刺激においては、刺激終了1時間後で末梢血中のIL-6の活性が $20.0 \pm 2.2\text{U}/\text{ml}$ となり、刺激終了18時間後においても活性が検出された。30分刺激群全ての実験について対照として行った拘束のみの刺激においては末梢血中におけるIL-6の活性は刺激終了3時間後においてのみ検出されその活性は $11.4 \pm 1.6\text{U}/\text{ml}$ だった。また、全く刺激を与えていないマウスの末梢血中におけるIL-6の活性は認められなかった (表1)。これらの結果は鍼刺激、鍼通電刺激および通電刺激により末梢血中に長時間にわたってIL-6が産生誘導されることを示し、加えて、鍼及び鍼通電刺激と通電刺激はIL-6の産生誘導に関し、産生パターンの異なる刺激であることが示唆された。他方、灸刺激ではC57BL/6マウスにおいてはIL-6の産生誘導は認められなかった。また、拘束のみの刺激では軽度且つ一過性にではあるが末梢血中にIL-6が産生誘導されることを示し、心理的・精神的ストレスでもIL-6が産生誘導されることを示した。

2. IL-6の産生に対する刺激時間および

方法の影響

拘束や通電ストレス刺激ではIL-6が一過性にの

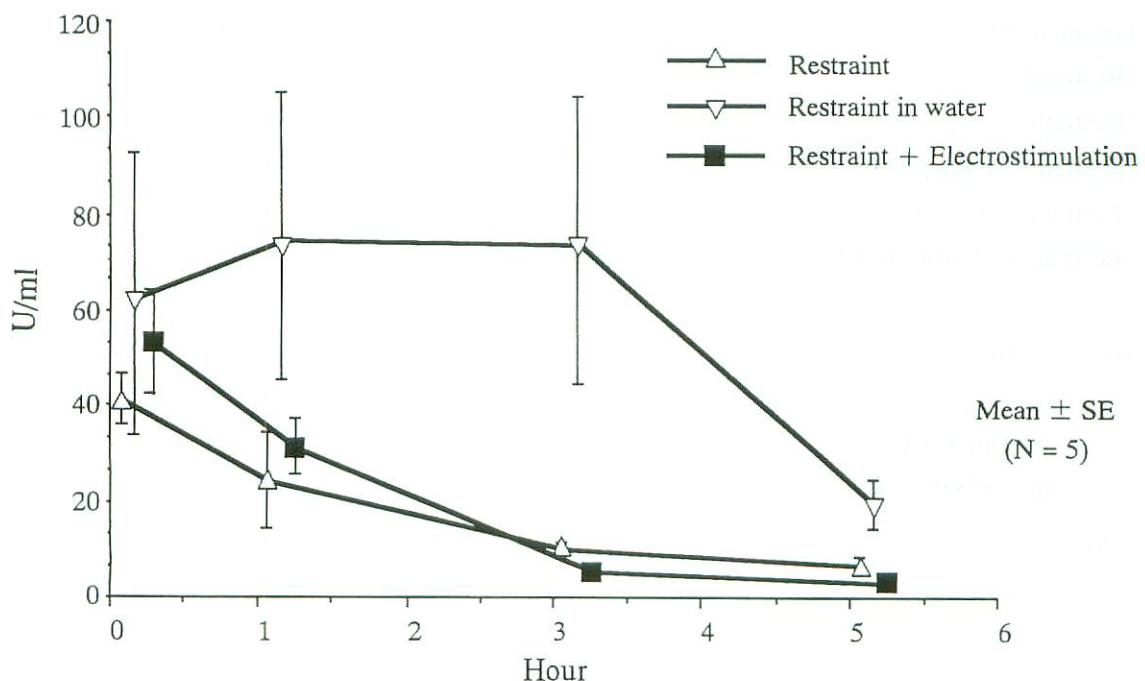


図2 4時間刺激群におけるIL-6の産生動態：拘束のみの刺激、拘束+通電刺激、拘束+水浸刺激の3つの刺激群について4時間刺激を行った。刺激終了後0, 1, 3, 5時間の時点で全採血を行い、血清を分離した後IL-6活性を測定した。

み産生誘導された。そこで、刺激の時間及び方法を変えた場合IL-6の産生に影響を与えるかどうか検討するために拘束のみ、通電刺激、水浸拘束刺激について4時間刺激の系で検討を行った(図2)。4時間刺激を行うと拘束のみ群と通電刺激群では、それぞれ、刺激終了直後では、 $39.0 \pm 5.4 \text{ U/ml}$ 、 $51.6 \pm 11.0 \text{ U/ml}$ であったが、刺激3時間後には、 $8.8 \pm 0.9 \text{ U/ml}$ 、 $3.8 \pm 0.8 \text{ U/ml}$ となった。またより過酷なストレスである水浸拘束刺激を行ったところ、刺激終了直後から3時間後までのIL-6の末梢血中での活性が $61.1 \pm 29.2 \sim 73.1 \pm 29.7 \text{ U/ml}$ と高値であった。

3. IL-6活性ピーク時におけるIL-1,

TNF, IFN- γ の活性

C57BL/6マウスを用いて、30分刺激群と4時間刺激群でIL-6活性ピーク時における末梢血中のIL-1, TNF, IFN- γ の活性について検討を行った。しかし、IL-1, TNF, IFN- γ の活性はいずれも検出限界以下であった(表1)。以上の結果は鍼刺激、鍼通電刺激および拘束ストレス刺激といった物理的・精神的ストレスが生体にIL-6のみを産生誘導することを示唆している。

4. SCIDマウスにおける鍼灸刺激およびストレス刺激によるIL-6の産生誘導

T・Bリンパ球が欠損しているSCIDマウスを用いて、C57BL/6マウスと同様の刺激を加えてIL-6の末梢血中での活性を検討した。C57BL/6マウスにおいて各種刺激によりIL-6の活性がピークとなった時間を採血時間として選び、検討を行った(図3)。その結果SCIDマウスにおいても各種刺激によりIL-6が産生誘導されることが観察された。刺激を全く与えていないSCIDマウスではIL-6の末梢血中での活性は全く認められなかった。C57BL/6マウスにおいては、灸刺激群ではIL-6の末梢血中での活性はほとんど認められなかったが、SCIDマウスでは灸刺激により末梢血中へのIL-6の産生誘導が行われることが明らかとなった。

5. CB17マウスにおけるIL-6の産生誘導

SCIDマウスにおいては灸刺激により末梢血中にIL-6が産生されることが明らかとなった。この結果はマウスの系統差によるのか、あるいはT・Bリンパ球欠損によるのかを明らかにするために、SCID突然変異を持たず他の遺伝的形質はSCIDマウスと同じであるCB17マウスを用いて検討を行った。拘束のみ4時間、通電4時間の刺激においては

表 1 Serum IL-1, TNF and IFN- γ activities at the peak of IL-6 respons

Treatment 30 min	Time	IL6	IL1	TNF	IFN- γ
Restraint	3h	11.4 *	<4 *	<40 *	<125 ※
Restraint + acupuncture	5h	24.1 *	<4 *	<40 *	<125 ※
Restraint + electroacupuncture	5h	20.1 *	<4 *	<40 *	<125 ※
Restraint + moxibustion	5h	3.3 *	<4 *	<40 *	<125 ※
Restraint + electric stimuli	1h	19.9 *	<4 *	<40 *	<125 ※
Treatment 4h					
Restraint	0h	39.5 *	<4 *	<40 *	<125 ※
Restraint + in water	0h	51.5 *	<4 *	<40 *	<125 ※
Restraint + electric stimuli	0h	61.1 *	<4 *	<40 *	<125 ※
None		<1.2 *	<4 *	<40 *	<125 ※

* : U/ml

※ : pg/ml

IL-6を測定した血清試料と同じ血清試料を用いてIL-1, TNF, IFN- γ についても測定した。データは各刺激によるIL-6活性のピーク時と同じ時点のIL-1, TNF, IFN- γ の活性の平均値を示す。個体数は各群ともに5匹。検出限界はそれぞれ、IL-6 : 1.2 U/ml 以上、IL-1 : 4 U/ml 以上、TNF : 40 U/ml 以上、IFN- γ : 125 pg/ml 以上である。

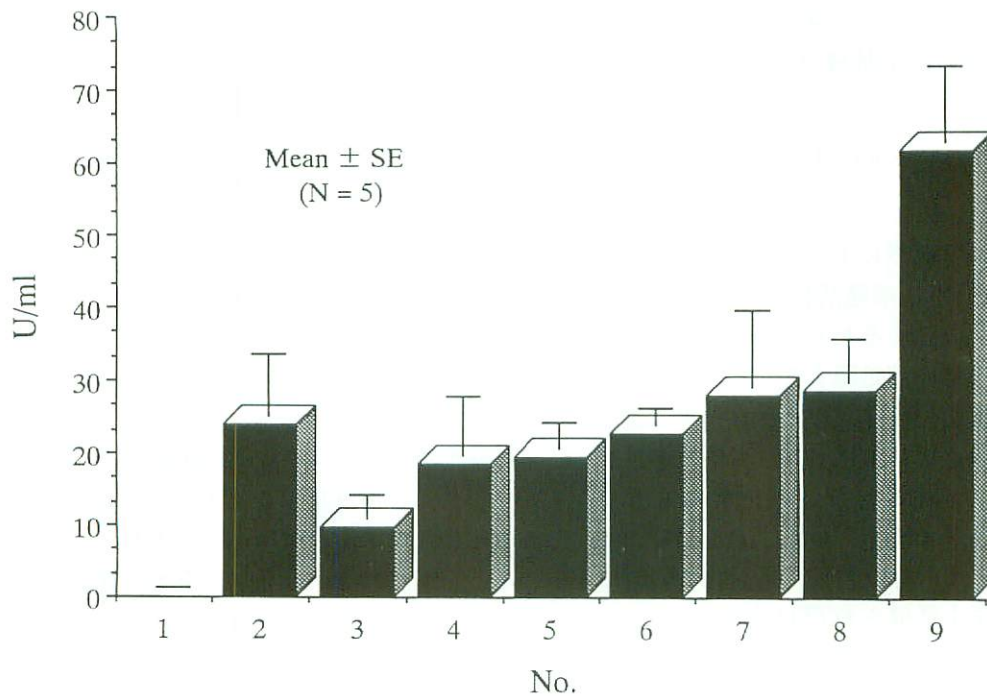


図3 SCIDマウスにおける各種刺激によるIL-6の産生：C57BL/6マウスにおける各種刺激によるIL-6の産生のピーク時においてSCIDマウスを用いて検討した。

1：Normal 2：拘束のみ30分後3時間目， 3：拘束+鍼通電30分後5時間目， 4：拘束+鍼30分後5時間目， 5：拘束+通電30分後1時間目， 6：拘束+灸30分後5時間目， 7：拘束のみ4時間直後 8：拘束+水浸4時間後1時間目， 9：拘束+通電4時間直後

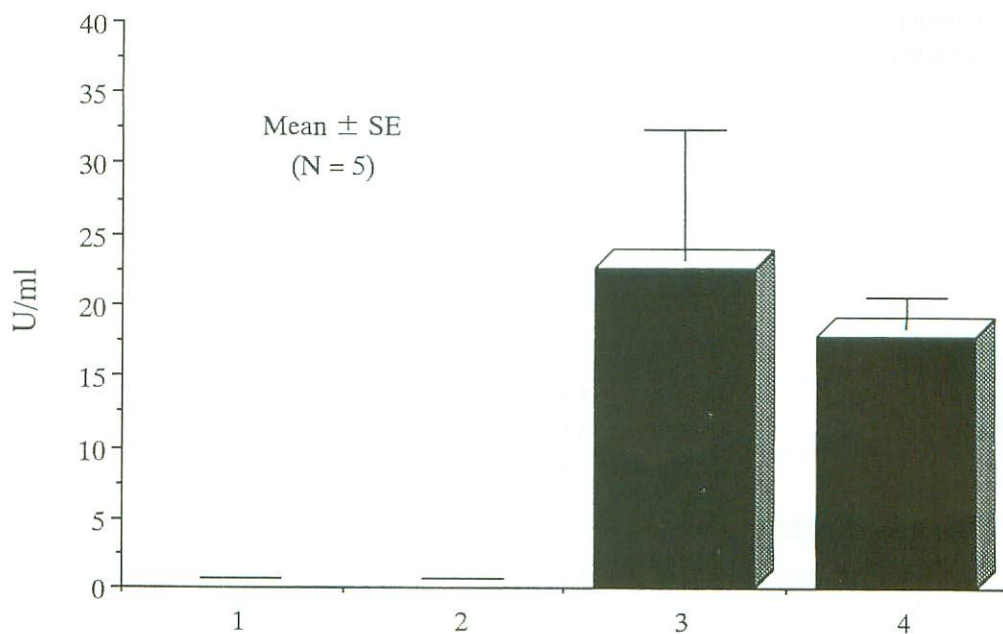


図4 CB17マウスにおけるIL-6の産生：C57BL/6マウスにおいては灸刺激によりIL-6は産生されなかったが，SCIDマウスにおいては灸刺激によりIL-6の産生がみられた，そこでSCID突然変異を持たず他の遺伝的形質は同一であるCB17マウスで検討を行った，採血はC57BL/6マウスにおいて各刺激によりIL-6の産生がピークとなった時間を選んだ。

1：Normal 2：拘束+灸30分後5時間目， 3：拘束4時間直後， 4：拘束+通電4時間直後。

末梢血中でIL-6の活性が検出されたが、灸刺激においては検出されなかった（図4）。以上の結果は、灸刺激によるIL-6の産生誘導はSCIDマウスに特異的であることが示唆された。

6. 抗IL-6モノクローナル抗体による

IL-6活性の中和

鍼刺激、ストレス刺激により末梢血中に産生誘導される7TD1細胞株に増殖活性をもつ物質が本当にIL-6かどうか確認するために、抗IL-6モノクローナル抗体で血清を前処理することによる中和実験を行った（表2）。抗IL-6モノクローナル抗体により、各種刺激により末梢血中に産生誘導される物質の7TD1細胞株に対する増殖活性が30分刺激群で70～90%、4時間刺激群で60～80%抑制された。したがって、鍼灸刺激、ストレス刺激により末梢血中に産生誘導され7TD1細胞に対して増殖活性をもつ物質の大部分がIL-6であることが

明らかとなった。

7. IL-6 mRNAの発現

IL-6の産生部位を検討するために検出感度の高いRT-PCR法を用いてIL-6 mRNAの発現について検討を行った。図5は水浸拘束刺激4時間終了直後のC57BL/6マウスより摘出した各臓器より抽出したRNAをRT-PCR法により増幅後、その増幅産物を電気泳動した結果である。AはプライマーとしてIL-6プライマーを用いた結果、Bは対照として β -actinプライマーを用いた結果である。Aでは、レーン7にのみバンドが認められ、視床下部でのみIL-6mRNAが発現されたことを示している。この結果からストレス刺激による末梢血中へのIL-6の産生部位の一つとして視床下部があることが示唆された。他方、全ての臓器で β -actin mRNAの発現が確認された。

表 2 Neutralization tests of stress induced IL-6 activities by anti-IL-6 mAb

		³ H-Thymidine incorporation (cpm)		
A. C57BL/6 Mice		Ab—	Ab+	%inhibition
Treatment	30min.			
Restraint		36755.0 ± 686.3	18500.0 ± 130.9	77.5
Restraint + acupuncture		33149.5 ± 458.1	15396.0 ± 1058.7	88.9
Restraint + electroacupuncture		38130.3 ± 3258.1	16761.1 ± 827.7	85.7
Restraint + moxibustion		16258.1 ± 1025.3	14745.8 ± 1848.8	—
Restraint + electric stimuli		22355.4 ± 1178.0	15207.8 ± 1170.6	77.9
Treatment	4hours			
Restraint		42386.0 ± 2039.0	14256.5 ± 1111.1	62.9
Restraint + in water		45040.7 ± 3556.7	18431.6 ± 1076.6	83.5
Restraint + electric stimuli		32272.3 ± 543.9	19954.8 ± 836.4	65.4
None		12862.8 ± 670.8	13872.6 ± 1129.4	—
B. rIL6				
2u/ml		46112.1 ± 1336.3	12699.9 ± 76.5	
1u/ml		46509.5 ± 3303.1	13617.2 ± 234.8	
0.5u/ml		29036.0 ± 427.6	13758.8 ± 1001.0	
0.25u/ml		19465.4 ± 525.2	12608.4 ± 402.4	

各種刺激において7TD1細胞株に対する増殖活性のピーク時の最も活性の高い血清サンプル 50 μ l（最終濃度40倍）を抗IL-6モノクローナル抗体 50 μ l（10 μ g/ml）で4℃、1時間処理後、7TD1細胞を用いてIL-6活性を測定した。測定数は2、データは平均±標準誤差。%inhibitionは次の式より算出した。

$$\%inhibition = 100 - \left[\frac{\{ (\text{抗体処理血清試料 [cpm]}) - (\text{抗体処理標準試料 [cpm]}) \}}{\{ (\text{血清試料 [cpm]}) - (\text{抗体処理標準試料 [cpm]}) \}} \right] \times 100$$

IV 考察

本研究において鍼刺激、鍼通電刺激、通電刺激によりマウス末梢血中にIL-6活性が長時間にわたって検出されることが明らかとなった。また、その活性は抗IL-6抗体を用いてその大部分が中和されることによりマウス末梢血中に産生誘導される物質が主としてIL-6であることが確認された(図1, 表2)。これまで、鍼灸刺激によってIL-6が産生誘導されたという報告はない。Kronfolらは精神病患者を対象とし、治療の一環として通電療法を行った結果、末梢血中のIL-6活性は治療前と比較して上昇したことを報告している⁷⁾。この結果は末梢の知覚神経を介した刺激により、IL-6が末梢血中に産生増強されることを示している。本実験で使用したSPF条件で飼育したマウスでは正常状態で末梢血中にIL-6活性が認められていない。しかし、他方、Kronfolらの検討によると、精神病患者の一部では通電刺激前でも末梢血中にIL-6活性が認められている。

IL-6を測定したのと同じ血清試料を用いて炎症性サイトカインであるIL-1, TNFおよびIFN- γ も測定したがいずれも検出限界以下であった(表1)。このような末梢の知覚神経刺激によりなぜIL-6のみが産生誘導されるのだろうか。一般に外因性の傷害に対しては、種々の炎症性サイトカイ

ンが誘導されることが知られている。しかし、神経性の刺激に対してはIL-6のみが産生誘導される可能性が考えられる。鍼刺激、鍼通電刺激、通電刺激によって末梢血中へIL-6が産生誘導されるメカニズムならびに産生細胞については明らかにできていない。

C57BL/6 マウスにおける検討では灸刺激ではIL-6の末梢血中への産生誘導は認められなかった(図1)。しかし、SCIDマウスで、IL-6は産生誘導された(図3)。そこでscid突然変異を持たず他の遺伝形質が同一であるCB17マウスで検討したところ灸刺激ではIL-6が検出できなかった(図4)。これらの結果から、拘束+灸刺激によるIL-6産生抑制がT,Bリンパ球の欠損によって解除されている可能性が考えられる。

また、同じ侵害刺激とされる鍼刺激、鍼通電刺激、通電刺激、灸刺激が末梢血中へのIL-6の産生誘導刺激としては質的量的に異なるということを示唆している。これまでの報告では鍼刺激のような機械刺激、灸刺激のような熱刺激、さらに組織の損傷を伴わないような刺激に対しては共通に作動するポリモーダル受容器の存在が示唆されている⁸⁾。しかし、今回の検討において得られたC57BL/6およびCB17マウスで、灸刺激においてはIL-6が産生されないという結果は、IL-6の産生誘

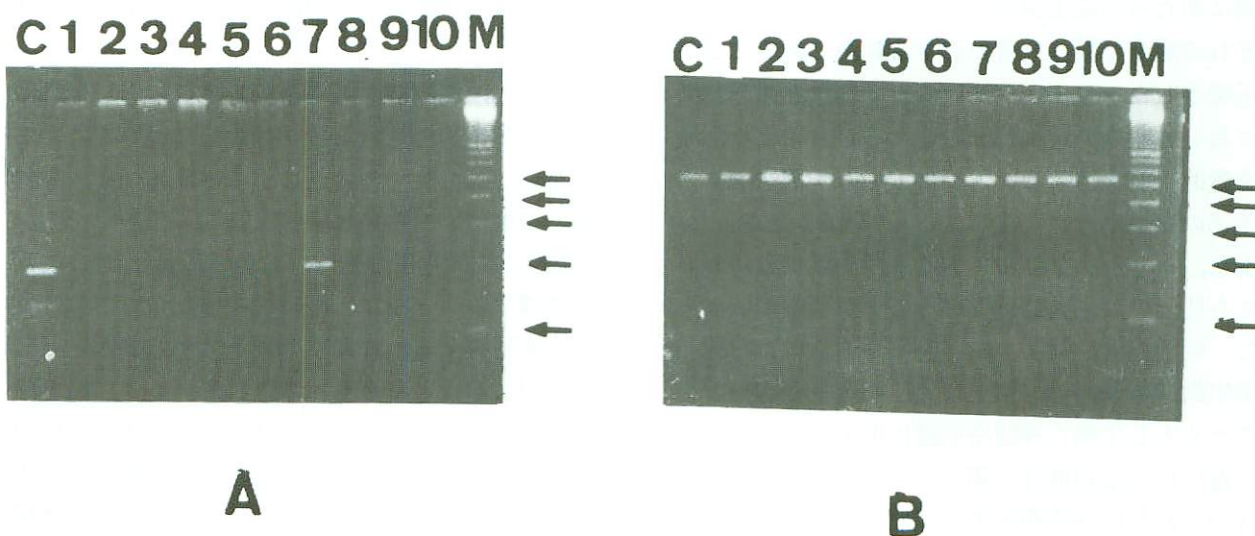


図5 RT-PCR法によるIL-6mRNAの検出: 拘束+水浸4時間刺激終了直後のC57BL/6マウスの各臓器を摘出し、RNAを抽出しcDNAを合成した後、PCR法により増幅し、その増幅産物を電気泳動し解析した。AはIL-6 primerを、Bは β -actin primerを用いてPCR反応を行いその増幅産物を電気泳動した結果である。C: Control probe 1: Kidney 2: Liver 3: Thymus 4: Spleen 5: Testis 6: Adrenal 7: Hypothalamus 8: Pituitary 9: Hypothalamus 10: Pituitary M: Marker (100bp ladder) 但し、1~8は拘束+水浸4時間刺激を加えたもの、9, 10はNormal Controlである。

導がポリモーダル受容器を介しての刺激の入力によるという仮定と矛盾する。

本研究では、マウスを30分間拘束するだけでも末梢血中にIL-6が刺激終了後3時間で一過性に生産誘導されることが示された。このことは侵害刺激のみならず、心理的・精神的ストレスによってもIL-6が生産誘導されることを示している。しかし、この反応形式は鍼刺激、鍼通電刺激、通電刺激を30分行った場合と明らかに異なり、刺激の質によりIL-6の生産誘導パターンが異なることも明らかになった(図1)。さらに、IL-6産生に対するストレスの負荷の増大の影響を拘束時間と通電時間を4時間にして検討したところ、末梢血中のIL-6の産生量が増強され、産生動態は、刺激直後をピークとして速やかに減少した。ストレスの量および強度を上げる目的でより過酷なストレスである水浸拘束を4時間行うことにより末梢血中へのIL-6の産生が増強され、ピークの持続も認められた(図2)。Le Mayらは、ケージ内で飼育していたラットを野外に開放するという精神的ストレスにより、ケージ内で飼育していたときと比較して末梢血中でIL-6活性が増大すると報告している⁹⁾。この結果も、我々とは逆の精神的ストレスによりIL-6の産生が誘導されるということを支持する。

鍼刺激、鍼通電刺激及び通電刺激はIL-6を長時間にわたって生産誘導するが、そのピークはそれぞれの場合で異なり質の異なる刺激であることが示唆された。さらに、拘束のみの刺激と通電刺激において刺激の継続時間を変えることにより刺激を量的に変化させることによって末梢血中でのIL-6の産生動態が変化することが明らかとなった。また、より過酷な刺激である水浸拘束刺激においてもIL-6の産生動態は異なることが明らかとなった。刺激の質、強度、継続時間の違いによるIL-6産生動態の違いは、第一に、IL-6産生細胞へのシグナルとして働く神経系刺激に由来する伝達物質の違いによる可能性、第二に、刺激を伝える物質は同じだがIL-6を産生する部位の違いによる可能性が示唆される。鍼刺激によって内因性オピオイドが誘発されるということはよく知られている¹⁰⁾。また、電気ショックストレスによって脳内で β -エンドルフィン、Met-エンケファリンおよびLeu-エンケファリンの含量が変化するという報告もある^{11,12)}。このような神経由来物質が鍼

刺激、鍼通電刺激、通電刺激によって放出され生体内でIL-6の生産誘導に関わるという可能性がある。動物に拘束ストレスや強制水泳ストレス負荷を行うと脳内や末梢血中でオピオイドペプチドの含量が変化することが報告され、ストレス継続時間によっても変化することが報告されている^{13,14,15)}。また、情動によりACTHなどのホルモンが末梢血中に放出されることはよく知られている¹⁶⁾。このように物理的・精神的ストレスが神経系・内分泌系に対して影響を与えることから神経由来物質、ホルモンなどの刺激が生体内でIL-6の産生を誘導することも考えられる。

本研究により、物理的・精神的ストレスによって末梢血中にIL-6が生産誘導されることが明らかとなったが、このIL-6の産生を考える上でIL-6の産生部位を考えることが重要である。そこで検出感度の高いPCR法を用いてIL-6 mRNAの発現を検討したところ水浸拘束4時間の系で視床下部でのみIL-6 mRNAの発現が確認された。これまでの報告によると、IL-6を産生する細胞としてT・Bリンパ球、マクロファージ、線維芽細胞、脳のアストログリア細胞など非常に多岐にわたっていることが報告されている¹⁷⁾。in vitroの実験であるがラットの視床下部をLPSで刺激するとIL-6が産生されたという報告もある¹⁸⁾。今後、鍼灸刺激によって産生されるIL-6の産生部位と産生細胞を明らかにしたい。

最後に、鍼刺激、鍼通電刺激及びストレス刺激により生産誘導されるIL-6の機能について考えてみたい。これまでの報告によるとIL-6は血液系幹細胞の増殖、あるいは細胞障害性T細胞への分化、B細胞の抗体産生細胞への分化、形質細胞の増殖を誘導する、さらに、肝細胞にはたらいて急性期蛋白を誘導する、加えて神経系での発熱因子として作用することなども示唆されている¹⁷⁾。鍼刺激やストレス刺激により生産誘導されるIL-6の作用部位としては次の可能性が考えらる。第一に、水浸拘束刺激により視床下部でIL-6 mRNAの発現が確認されたことから視床下部や下垂体で何らかの役割を果たしている可能性、第二に、末梢血中に生産誘導されることから肝細胞に働き急性期蛋白の産生を誘導する可能性、第三に、局所における細胞の調節因子として作用し、局所防御系の賦活化に働く可能性である。これまで生体にスト

レス刺激が加わると視床下部-下垂体-副腎軸が反応し生体調節を発動するとされているが、もう一つの軸として中枢神経系が産生するIL-6が位置付けられる可能性も考えられる。すなわち、生体はその恒常性を侵されるような危険に曝されたとき神経系が素早く局所に信号を伝達し恒常性を保つように反応する際、IL-6は、特に生体防御系に対する信号伝達分子としてホルモ的に機能するのではないだろうか。生体にとっての危険を高次の中枢である神経系が察知しそれを全身に伝達する分子としてIL-6が位置付けられる可能性も示唆される。また、このようなIL-6が鍼刺激により産生誘導されることは、鍼刺激が生体の防御に効果的に働く可能性も示唆される。

V 謝 辞

本研究の過程において、御協力を得た大塚製薬株式会社免疫開発部平井嘉勝博士、東レ株式会社基礎研究所 須藤哲央博士、大日本製薬株式会社総合研究所 中野勝二博士、京都パスツール研究所 宇野賀津子博士に感謝の意を表します。

VI 参考文献

- 1) Benveniste EN : Lymphokines and monokines in the neuroendocrine system. *Prog Allergy*, 43:84-120, 1988.
- 2) Bryan L.Spangelo,Robert M.Macleod, Peter C.Isakson : Production of Interleukin-6 by Anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 126 : 582~586,1990.
- 3) 堀 哲郎, 森 俊憲, 水野圭一郎 : 脳・免疫系 連関. *生体の科学* 40(5):592~601,1989.
- 4) Fukata, J Usui, T Nakai, Y et al. : Effects of recombinant human interleukin-1 α , - β and 6 on ACTH synthesis and release in the mouse pituitary tumour cell line AtT-20. *J. Endocrinology*, 122 : 33~39, 1989.
- 5) Ding-Zong Wu : Acupuncture and neurophysiology. *Clin Neurol Neurosurg*, 92 : 13~25, 1990.
- 6) Parkinson R.M. et al : *J.Immunol Methods*, 15 : 105,1988.
- 7) Kronfol Z, Lemay L, Nair M et al. : Electroconvulsive Therapy Increases Plasma Level of Interleukin-6. *Ann NY Acad Sci*, 594 : 463~465, 1990.
- 8) 熊澤孝朗 : 痛みとポリモーダル受容器. *日本生理学雑誌*, 51 : 1~15, 1989.
- 9) LeMay LG,Vander AJ,Kluger MG : The effects of psychological stress on Plasma interleukin-6 activity in rats. *Physiology and Behavior*, 47 : 957~961, 1990.
- 10) 高木健太郎, 山村秀夫 : 東洋医学を学ぶ人のために, 医学書院,東京, 1982.
- 11) Robinson TE, Becker JB, Young EA, et al. : The effects of footshock stress on regional brain dopamine metabolism and pituitary β -endorphin release in rats previously sensitized to amphetamine. *Neuropharmacology*, 26 : 679~691, 1987.
- 12) Mcvern RF,Mousa S,Couuri D, et al. : Prolonged intermittent footshock stress decreases Met- and Leu-enkephalin levels in brain with concomitant decreases in pain threshold. *Life Sci*, 33 : 47~54, 1983.
- 13) Kant GJ, Mougey EH and Meyerhoff JL : Diurnal variation in neuroendocrine response to stress in rats : plasma ACTH, beta-endorphin beta-LPH, corticosterone, prolactin and pituitary cyclicAMP responses. *Neuroendocrinology*. 43 : 383~390, 1986.
- 14) Pierzchala K and Van Loon GR : Plasma native and peptidase-derivable Met-enkephalin responses to restraint stress in rats. *J Clin Invest*, 85 : 861~873, 1990.
- 15) Lim AT, Smith GC, Clemats JA, et al. : Stress, dopaminergic blockade and median eminence-neurointermediate lobe catecholamine depletion : effects on hypothalamic, pituitary and plasma immunoreactive beta-endorphin. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 11 : 221, 1984.
- 16) 伊藤真次, 船田紀明 : 行動内分泌学, 理工学社, 東京, 1982.
- 17) Kishimoto T : The biology of Interleukin-6. *Blood*, 74 1~10, 1989.
- 18) Spangelo BL, Judd AM, Macleod RM, et al. : Endotoxin-induced release of nterleukin-6 from rat medial basal hypothalami. *Endocrinology*, 127,1779~1785, 1990.

Acupuncture and Stress induced IL-6 Production in Mice

TSUKAMOTO Noriyuki¹⁾, HAYASHIDA Itsushi¹⁾,
ITOI Manami²⁾, and AMAGAI Takashi²⁾¹⁾ *Department of Immunology and Biochemistry, Graduate School of Meiji
University of Oriental Medicine*²⁾ *Department of Immunology and Microbiology, Meiji University of Oriental Medicine*

Summary: Inflammatory cytokines are known to regulate not only peripheral responsive cells but also the central nervous system. This study was undertaken to investigate production of cytokines by acupuncture stimulation and psychological stress in mice. IL-6 activity was not detected in sera from normal C57BL/6 mice, but serum IL-6 activities was observed after acupuncture, electroacupuncture and electric stimuli. Restraint stress alone caused a slight elevation in serum IL-6. But restraint stress in water caused C57BL/6 mice to produce a high level of IL-6 within five hours after the stress. These IL-6 activities were neutralized by treatment with anti-IL-6 monoclonal antibody. However, IL-1, IFN- γ and TNF activities were not detected in these sera. RNA was extracted from various organs of mice that underwent restraint stress in water and IL-6 mRNA expression was determined by using RT-PCR. The results indicate that IL-6 mRNA was detected only in the hypothalamus of the stressed mice. Our results suggest that IL-6 may function as a hormone-like regulatory molecule in the acute phase response to acupuncture and stress.

Received on January 9, 1997; Accepted on February 20, 1997

† To Whom correspondence should be addressed.