

研究区分：重点研究

鍼灸による免疫応答への作用および神経系の関わりへの検討

糸井 マナミ¹⁾, 千葉 章太¹⁾, 伊部 功記²⁾, 大下 紘平²⁾

¹⁾基礎医学講座 免疫・微生物学ユニット, ²⁾鍼灸学科 4 年

【目的】

鍼灸刺激は皮膚への微小な侵害刺激として免疫系を賦活すると考えられる。これまでに我々はマウス単純ヘルペスウイルス脳炎モデルを用い、ウイルス感染前の足三里 (ST36) 相当部位 (両足) への灸刺激が脳炎による致死率を下げることを示した。皮膚への灸刺激により刺激局所の皮膚だけでなく二次免疫器官である脾臓においても炎症性サイトカイン産生の誘導と増強が認められ、皮膚への灸刺激が全身免疫系を賦活しウイルス感染に対する免疫応答へのプライミング効果を示したと考えられる。しかし、皮膚局所への微小な灸刺激が全身免疫系を賦活する機序は不明である。

免疫系の器官・組織が自律神経系や迷走神経系による調節を受けることは良く知られている。そこで、本研究では皮膚灸刺激による全身免疫系賦活が神経系を介して起こる可能性を考え、外科的除神経動物モデルを用いて皮膚灸刺激による脾臓でのサイトカイン産生誘導への体性神経の関与について検討することとした。

【材料と方法】

・動物および除神経モデル：C57BL/6 マウス (雄性, 6~9 週齢, 日本クレア) を用いた。除神経モデル作製は、麻酔下 (3 種混合麻酔：塩酸メドミジン 0.3mg/kg, ミダゾラム 4mg/kg, 酒石酸ブドルファノール 5mg/kg, 腹腔内投与：0.1mg/kg) でマウスの左足大腿部皮膚 (1.0~1.5cm) および筋層 (約 1cm) を切開後、坐骨神経を取り出し約 5mm 切除した。除神経はフォンフライテスト (VFT) による足底の触覚検査により確認した。除神経後 1, 2, 3 週間後に脾臓を摘出し、サイトカイン産生を測定した。

・灸刺激：麻酔下で左足三里 (ST36) 相当部位に透

熱灸 (0.5mg, 5 壮) を行った。麻酔下で 2 日前に施灸部位を剃毛した。

・定量的 PCR によるサイトカイン mRNA 発現量の測定：インターカレータ法 (TB Green Premix EX Taq II (Tli RNaseH Plus) ; TAKARA) による定量的 PCR (Thermal Cycler Dice Real Time System II ; TAKARA) によりサイトカイン (IL-1 β , TNF- α) mRNA 量を測定した。mRNA 量は GAPDH を用いて標準化し比較 Ct 法により相対定量を行った。

施灸 24 時間後に脾臓を採取し、RNeasy Protect Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出, AB High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を合成し、定量的 PCR に用いた。

【結果と考察】

・灸刺激による脾臓サイトカイン産生誘導の確認：外科的除神経動物モデルにおいて灸刺激は除神経足のみとなるため、片足灸刺激においても脾臓でのサイトカイン産生に影響がみられるかどうかを検討した。施灸 24 時間後の脾臓において施灸群の IL1 β mRNA 量は対照群に対し有意に高かった (図 1)。TNF α mRNA も有意差はなかったが施灸群で増加する傾向が認められた。よって、片足への施灸において

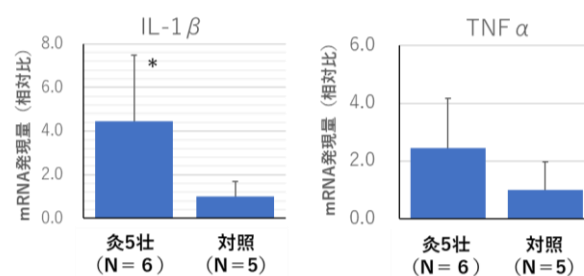


図 1 片足灸刺激による脾臓サイトカイン産生の検討
足三里相当部位への施灸 (0.5mg×5 壮) 後 24 時間において脾臓 IL1 β 産生が有意に増加した ($p<0.05$)。

も脾臓サイトカイン産生に影響することが認められた。片足への施灸が全身免疫系を賦活するに十分な刺激であることが示唆された。

・外科的除神経動物モデルの検討：外科的座骨神経切断による侵襲で誘導される脾臓でのサイトカイン産生への影響について検討を行った。除神経群、偽手術群（除神経群と同様に座骨神経を取り出すまで行い切除しない）、対照群について、手術後 1, 2, 3 週間後に脾臓を摘出しサイトカイン産生を検討した。手術 1 週間後において脾臓 IL1 β mRNA は除神経群、偽手術群ともに対照群に比べ高い発現量を示したが、3 週間後にはいずれも対照群と同等に低下した（図 2）。このことより、除神経手術による脾臓サイトカイン産生への影響は術後 3 週間で消失すると考えられた。

・外科的除神経動物モデルを用いた灸刺激の脾臓サイトカイン産生への体性神経の関与の検討：上記の結果より、外科的除神経 3 週間後に除神経足もしくは健常（反対）足に灸刺激を行い、脾臓サイトカイン産生への神経系の関与について検討することとした。現在検討中である。

【発表】

皮膚灸刺激による脾臓でのサイトカイン産生誘導のメカニズムの解析～体性感覚神経の関与の検討～：伊部功記，大下紘平，千葉章太，糸井マナミ．令和 4 年度全学研究ポスターワークショップ（令和 5 年 3 月 6 日）

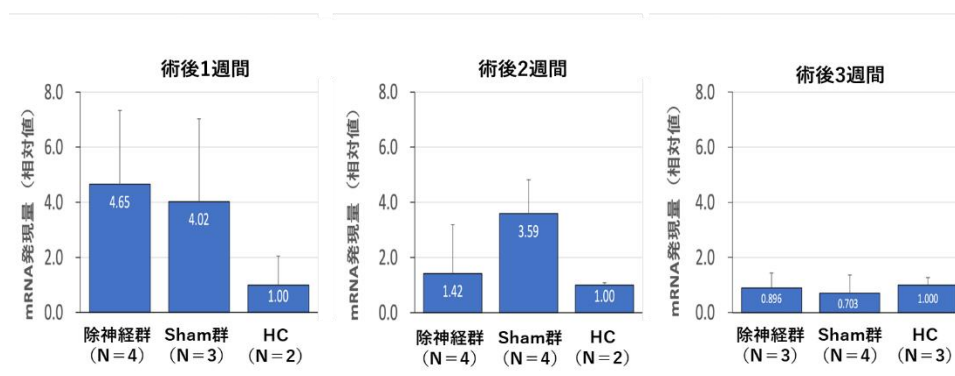


図 2 外科的除神経による脾臓サイトカイン産生への影響

左座骨神経切除群（除神経群）、偽手術群（Sham 群）および対照群（HC 群）について、手術後 1, 2, 3 週間後における脾臓サイトカイン（IL1 β ）発現量を検討した。術後 1 週間目には除神経群および Sham 群で IL1 β 発現量の増加が認められたが、手術後 3 週で HC 群と同程度まで低下した。