

## ストレスがラット腸管免疫に及ぼす影響 — アレルギー遺伝子素因・Brown Norway ラットにおける検討 —

山本 沙織, 高橋 享子

(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

### Immunoglobulin secretions in the mesenteric lymph node in stressed Brown Norway rats

Saori Yamamoto, Kyoko Takahashi

*Department of Food Science and Nutrition, School of Human Environmental Sciences,  
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan*

To study the effects of physical stress (electric foot shock; FS) on intestinal immune function, the immunoglobulin productions by the lymphocytes in stressed Brown Norway (BN) rats were observed. Physical stress was induced using the communication box. Stresses were exposed for 2 hours a day, and the treatments were maintained for 14 consecutive days. Lymphocytes were isolated from mesenteric lymph node (MLN) and spleen using lympholyte-rat.

No significant differences were found in plasma IgA, IgG or IgE concentration of the FS group. Production of IgG in the FS group was significantly lower than the control group in the MLN lymphocytes. Likewise, the level of IgA in the FS group was slightly lower than the control group in the MLN lymphocytes. As for IgE production in the MLN lymphocytes, these were significantly high in the FS group compared to that in the control group. No significant differences were found in the spleen lymphocytes.

These results demonstrated that the intestinal immune functions of BN rats with genetic causes of allergy were decreased with physical stress.

#### 緒言

我々は、ストレス社会の中で、様々なストレスに曝され、健康や生活の質(QOL)を脅かされた生活を送っている。ストレスは、食生活・生活習慣の乱れを引き起こすだけでなく、様々な生活習慣病の発症に関わり、憎悪因子であることが明らかとなっている<sup>1)</sup>。また、ストレスが免疫系に影響し、免疫機能に影響を及ぼすことも明らかになりつつある<sup>2)3)</sup>。さらに、ストレスは免疫機能を抑制し、アレルギー、自己免疫疾患の発症にもつながると考えられている。現在、日本人の約3割が何らかのアレルギーを患っているとされ、病態の重症化傾向、発症年齢の低年齢化など大きな社会的な現象となっている<sup>4)</sup>。アレルギー疾患の発

症には、遺伝因子に加えて地球環境、大気環境、居住環境、食生活の変化、ストレスの増加などの様々な環境要因が関与し、現代の増大したストレスもその一因であると考えられている。しかしながら、アレルギー疾患に対するストレスの影響については、未だ十分な研究報告もなく明らかにされていない。

そこで、本研究では、アレルギーとストレスの関係について注目し、アレルギー遺伝子素因を有し、高いIgE抗体産生能を有するアレルギー性疾患のモデル動物であるBrown Norway (BN)ラットを用い、物理的ストレス負荷における抗体産生能および免疫細胞における抗体産生、サイトカイン産生能等の免疫機能に及ぼす影響について検討した。

## 実験材料及び方法

### 1. 動物

5週齢のBrown Norwayラット(日本SLC株式会社)の雄を用い、コントロール(非ストレス)群、物理的ストレス(FS)群の2群に分けた。飼育条件は、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 7\%$ 、12時間の明暗サイクル(明期8:00~20:00)とし、個別に金網ケージにて飼育した。飼育期間中は、市販固形飼料(オリエンタル酵母工業株式会社, MF)及び水は自由摂取させ、毎日体重測定を行い、解剖時には副腎の重量を測定した。なお、実験に際し、動物は「武庫川女子大学動物実験指針」に基づいて取り扱われた。

### 2. 物理的ストレスの負荷

物理的ストレス(FS)の負荷には、Fig. 1に示すコミュニケーションボックス(東洋産業株式会社製)を用いた<sup>5)6)</sup>。この装置は、9区画に分割されており、各区画、透明なプラスチック製の板によって仕切られている(各区画は $10\text{cm}\times 10\text{cm}$ 、コミュニケーションボックスの高さは $40\text{cm}$ )。また、装置の床は、電気刺激の流れるステンレス製のグリッドで構成されており、ラットは床からの直接の電気刺激により物理的なストレスを与えられる(物理的ストレス:FS群)。電気刺激は、タイマーにより60秒間のうち10秒間だけ電気が流れるようにセットし、電流強度はショックジェネレーターを用いて、 $2.0\text{mA}$ に調節した。このストレス負荷は、毎日10時から12時とし、14日間継続して行った。また、コントロール(非ストレス)群には、通常のケージで飼育したラットを用いた。どちらの群も、ストレス負荷時間は、試料及び水は与えなかった。2週間のストレス負荷後、解剖を行った。

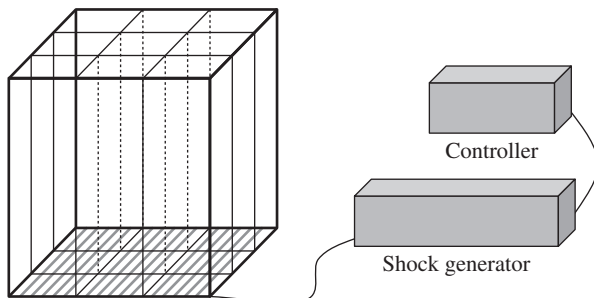


Fig. 1. Schema of the communication box

### 3. リンパ球の単離・培養

腸間膜リンパ節(MLN)及び脾臓のリンパ球は、Lim et al.<sup>7)</sup>の方法により単離した。細胞浮遊液は、RPMI1640培地(日水製薬株式会社)で懸濁し、洗浄操作の後、Lympholyte-Rat (CEDARLANE)を用いた密度勾配遠心法によりリンパ球を単離した。単離した細胞を $2.5\times 10^6\text{cell/ml}$ に調製し、ConA ( $2\mu\text{g/ml}$ )添加後、 $37^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  5% 通気下で24時間培養した。24時間培養後、培養液上清を採取し、分析まで $-30^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。

### 4. 血漿抗体価の測定

2週間のストレス負荷後、解剖を行った。エーテル麻酔下で腹部大動脈よりヘパリン採血を行い、血漿を得た。血漿中のIgA及びIgG濃度の測定には、Rat IgA ELISA Quantitation Kit, Rat IgG ELISA Quantitation Kit (BETHYL)を用いた。また、IgE濃度は、Rat IgE (ZYMED), anti Rat IgE-Biotin (SEROTEC), Avidin Conjugated HRP (PIERCE)を用いてELISA法により測定した。

### 5. リンパ球の抗体産生能

MLN及び脾臓リンパ球の培養液中のIgA、IgG及びIgE濃度は、ELISA法により測定した。方法は、血漿抗体価の測定と同様の方法で行った。

### 6. サイトカイン分泌能の測定

ConA刺激下の各リンパ球培養上清中のIFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10について測定を行った。測定には、Rat IL-4及びIFN-gamma Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)を用いた。また、IL-10は、Anti Rat IL-10, Rat IL-10, Biotinylated Anti Rat IL-10 (PEPROTECH)を用いてELISA法により測定した。

### 7. 統計処理

データは、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。また、コントロール群とFS群間の統計学的分析は、SPSS 12.0Jを用いて、t検定による有意検定を行い、 $p<0.05$ で統計的に有意とした。

## 実験結果

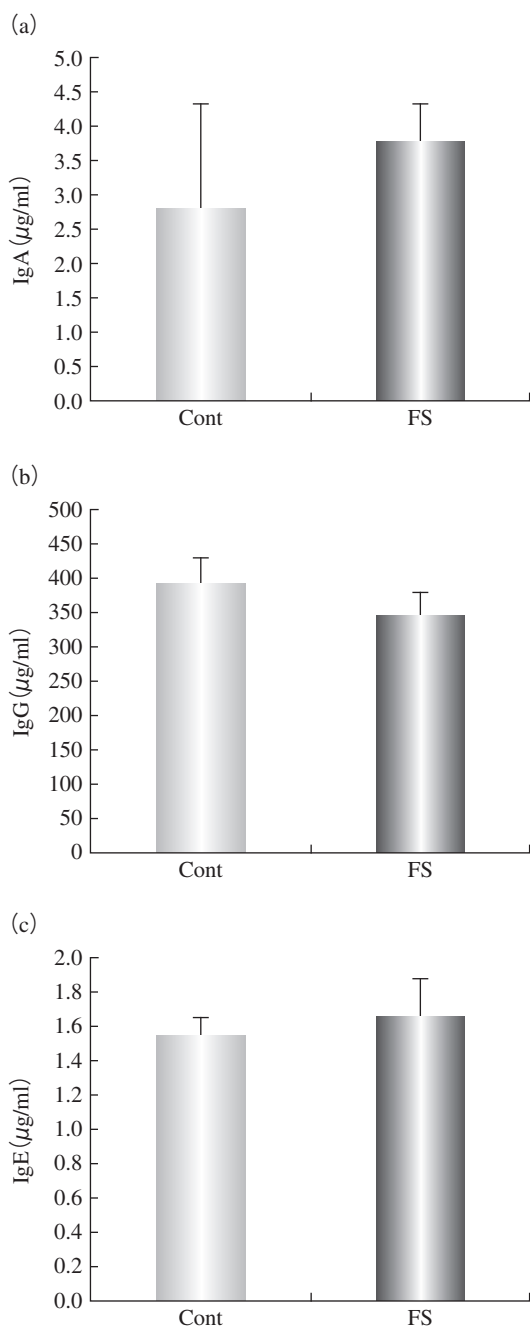
### 1. 体重増加量及び副腎重量

体重は、FS群でストレス負荷開始後1日目より徐々に増加抑制を示し、FS群はコントロール群に対し体重増加量の減少がみられた(コントロール群: $4.16\pm 0.47$ , FS群: $3.78\pm 0.33$ )。また、副腎重量は、コントロール群と比べFS群で有意

に増加した(コントロール群:  $20.92 \pm 0.70$ , FS 群:  $24.22 \pm 1.31$  \*\*  $p < 0.01$ ).

## 2. 血漿中免疫グロブリン濃度

血漿中の抗体濃度については Fig. 2 に示すように、血漿 IgA 濃度において FS 群で上昇傾向がみられ、血漿 IgG 濃度では FS 群で減少傾向がみられた。しかし、IgA, IgG, IgE 濃度のいずれにお

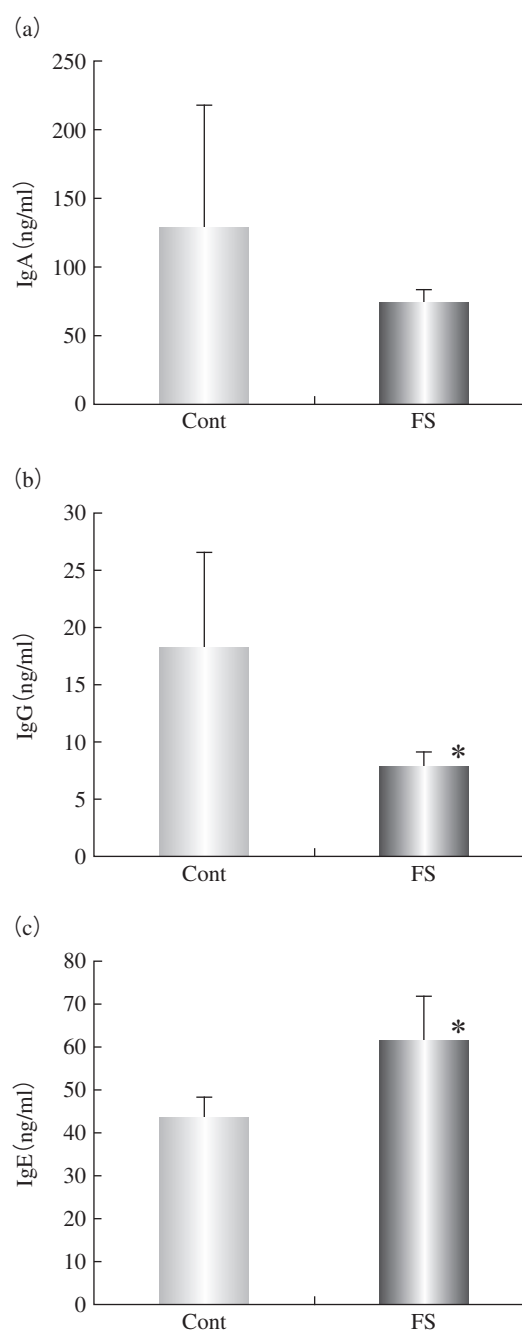


**Fig. 2.** Effects of the physical (electric foot shock) stress on plasma IgA (a), IgG (b), IgE (c). Each value is expressed as the mean  $\pm$  SD of 4 rats per group.

いても、2 群間に有意な差は認められなかった。

## 3. リンパ球の抗体産生能の変化

MLN リンパ球の IgA, IgG 及び IgE 産生能については、Fig. 3 に示した。IgA は、顕著ではないが FS 群において減少傾向を示し、IgG についてはコントロール群に対し、FS 群で有意な減少を



**Fig. 3.** Effects of the physical (electric foot shock) stress on IgA (a), IgG (b), IgE (c) production of MLN lymphocyte (physical stress: FS). Each value is expressed as the mean  $\pm$  SD of 4 rats per group. \* $p < 0.05$ , compared with Cont.

示した。一方, IgE はコントロール群に対し, FS 群で有意な増加を示した。

次に, 脾臓リンパ球の IgA, IgG 及び IgE 産生能について Fig. 4 に示すように, コントロール群に対し FS 群では, IgA は増加傾向, IgG 及び IgE は減少傾向を示したが, いずれも有意な差は認められなかった。

#### 4. サイトカイン分泌能

MLN リンパ球及び脾臓リンパ球のサイトカイン分泌能の変化については, Table 1 に示した。いずれにおいても 2 群間に有意な差は認められなかったが, MLN 及び脾臓リンパ球ともに IFN- $\gamma$  産生が増加傾向を示した。

### 考 察

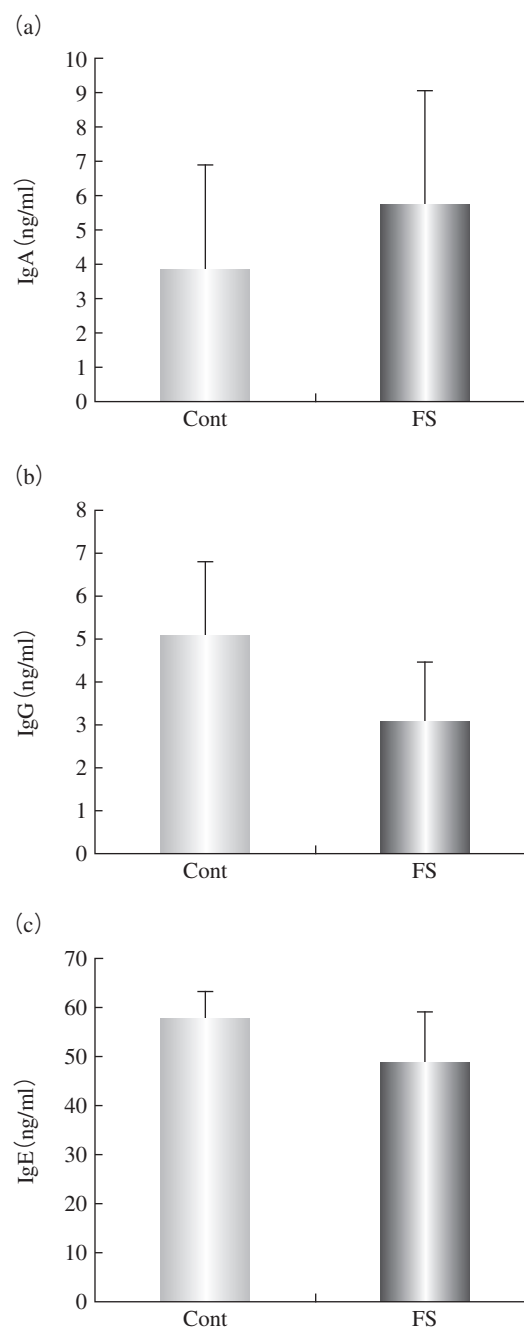
本実験では, コミュニケーションボックスを用いて, BN ラットにおけるストレス負荷が免疫機能に及ぼす影響を検討した。体重においては, コントロール群に対し物理的ストレス (FS) 群において増加が抑制された。また, 副腎重量については, FS 群での有意な増加が認められた。一般的に, ストレスにより視床下部・下垂体・副腎系 (HPA axis) が賦活され, ストレッサー刺激に対して, 抗炎症作用, 抗ショック作用を介して, 生体防御を司るグルココルチコイド (コルチコステロン) が放出される。身体的ストレスや心理的ストレスが加わる事により, 下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 分泌が増加し, 副腎重量の増加が認められている<sup>8)</sup>。このことより, 本実験において, コミュニケーションボックスによるストレスの刺激は, コルチコステロンの分泌を増大させ, 副腎皮質の肥大を生じさせるものと考えられた。

血漿中の免疫グロブリン濃度については, スト

**Table 1.** Effects of the physical (electric foot shock) stress on IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10.

	Control	FS
<i>MLN lymphocytes</i>		
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	17.21 $\pm$ 5.48	38.58 $\pm$ 24.25
IL-4 (pg/ml)	0.27 $\pm$ 0.68	2.65 $\pm$ 2.76
IL-10 (ng/ml)	0.27 $\pm$ 0.08	0.29 $\pm$ 0.10
<i>Spleen lymphocytes</i>		
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	15.94 $\pm$ 2.39	34.68 $\pm$ 9.66
IL-4 (pg/ml)	1.58 $\pm$ 1.98	5.71 $\pm$ 3.98
IL-10 (ng/ml)	0.17 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.03

レスによる顕著な影響は認められなかった。リンパ球の抗体産生能については, 脾臓リンパ球においてはストレス負荷による影響がそれほどみられなかったのに対し, MLN リンパ球においては IgA 及び IgG 産生能が FS 群で低下することが明らかとなった。また, IgE 産生能についてはコン



**Fig. 4.** Effects of the physical (electric foot shock) stress on IgA (a), IgG (b), IgE (c) production of Spleen lymphocyte (physical stress: FS). Each value is expressed as the mean  $\pm$  SD of 4 rats per group.

トロール群に対し有意な上昇がみられた。

一般的にストレスは、HPA axis を介したグルココルチコイドの分泌増加により、免疫系を抑制することが知られている<sup>9)</sup>。しかし、著者の研究において、Sprague-Dawley (SD)の雄ラットを用いた同様の実験では、ストレス負荷に対し、MLNリンパ球及び小腸上皮細胞間リンパ球(IEL)のIgA, IgG 産生が亢進することを明らかにした<sup>10)</sup>。このことから、本ストレス条件下において、腸管粘膜免疫システムはストレス負荷時においても適応的に亢進していることが考えられた。

しかしながら、今回、アレルギー性疾患のモデル動物であるBNラットに対するストレス負荷は、血漿抗体価及び脾臓リンパ球の抗体産生能に顕著な影響がなかった一方で、MLNリンパ球における抗体産生能の低下、及びアレルギー抗体価の上昇がみられた。このことは、アレルギー素因を有する場合、ストレスが全身性に比べ腸管の免疫機能により大きく影響するという事を示すものであり、腸管の免疫システムの維持機能を低下させることが考えられた。また、ストレスは小腸のバリア機能を損傷し、腸管の透過性を亢進させることが報告され、消化管に対する炎症反応を増大することも報告されている<sup>11) 12) 13)</sup>。この小腸のバリア機能の障害は、食物アレルギーにおける病因として示唆されていることから、本実験モデルにおいても小腸のバリア機能の損傷が生じているものと考えられる<sup>14) 15)</sup>。

以上より、アレルギー素因を有するラットにおける物理的ストレス負荷は、腸管でのアレルギー抗体価の上昇を惹起し、腸管粘膜免疫システムによる生体防御能を抑制すると示唆された。この結果は、SDラットの結果と異なるものであり、アレルギー素因の有無によって、ストレスへの適応能力が異なることが推察された。

## 要 約

アレルギー疾患の発症には、遺伝因子に加えて様々な環境要因が関与し、現代の増大したストレスもその一因であると考えられる。しかしながら、アレルギー疾患に対するストレスの影響については未だ十分に明らかにされていない。そこで、本研究では、アレルギー素因を有するBrown Norway (BN)ラットを用い、物理的ストレ

スが免疫機能に及ぼす影響について検討することを目的とした。

実験には、BNラットの雄を用い、コミュニケーションボックスにより物理的ストレスを負荷した。1日2時間のストレスを14日間継続して負荷し、血漿の採血、腸間膜リンパ節(MLN)及び脾臓リンパ球を単離培養し、ELISA法によりIgA, IgG, IgE産生能を測定した。また、IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10の分泌能も併せて測定した。その結果、脾臓リンパ球において、ストレス負荷による顕著な影響がみられなかったのに対し、MLNリンパ球においてはIgA及びIgG産生能が抑制され、IgE産生能が亢進することが明らかとなった。従って、アレルギー素因を有する場合、ストレスの影響は腸管の免疫機能により大きく影響し、腸管粘膜免疫システムによる生体防御能を低下させると考えられた。

## 参考文献

- 1) 平野鉄雄, 新島 旭, 脳とストレス—ストレスにたちむかう脳, 共立出版, 東京(1995)
- 2) Fukui Y et al, *J Neuroimmunol*, 79 (2), 211-217 (1997)
- 3) Shimizu T et al, *Scand J Immunol*, 51, 285-292 (2000)
- 4) 富岡玖夫, 日本内科学会雑誌, 93 (10), 2055-2058 (2004)
- 5) 林千嘉子 et al, *Yakugaku Zasshi*, 121 (10), 753-759 (2001)
- 6) Endo Y et al, *Med Sci Monit*, 7 (6), 1161-1165 (2001)
- 7) Lim BO, Yamada K, Sugano M, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 30A, 407-413 (1994)
- 8) 河野友信, 田中正敏, ストレスの科学と健康, 朝倉書店, 東京(1986)
- 9) Kusnecov AW, Rabin BS, *Int Arch Allergy Immunol*, 105 (2), 107-121 (1994)
- 10) 一橋沙織, 南 久則, 消化と吸収, 28 (1), 122-125 (2005)
- 11) Saunders PR et al, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 267, G794-799 (1994)
- 12) Soderholm JD, Johan D, Mary HP, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280, G7-G13 (2001)
- 13) Gue M et al, *Am J Physiol*, 272, G84-91 (1997)

(山本, 高橋)

14) Bjamason I, Mac Pherson A, Hollander D, *Gastroenterology*, 108 (5), 1566-1581 (1995)

15) Crowe SE, Perdue MH, *Gastroenterology*, 103 (3), 1075-1095 (1992)