

拘束ストレスが BN ラットの OVA 特異抗体価および骨密度に及ぼす影響

酒井 芙弥子¹, 鈴木 宏枝², 宮井 弓菜²
頼田 美佳¹, 浅野 真理子², 高橋 享子^{*,2}

(2013 年 8 月 23 日受付; 2013 年 11 月 11 日受理)

要旨: Brown Norway (BN) ラットを用いて, 拘束ストレスがアレルギー誘導時における腸間膜リンパ節リンパ球の免疫機能および骨密度に与える影響について検討した。ストレスは, 血漿コルチコステロン量や食餌量に影響を及ぼした。さらに, ストレス負荷下のアレルギー誘導群の骨密度の増加率は, ストレス非負荷群よりも低い値を示した。ストレス負荷下のアレルギー誘導群の血漿 IgE, IgG1, IgG2a, OVA 特異 IgE, OVA 特異 IgG1, OVA 特異 IgG2a は, いずれもストレス負荷前に比較して有意な増加を示した。さらに, MLN リンパ球の OVA 特異 IgE, OVA 特異 IgG1, IL-10 も, 負荷前に比較して有意な増加を示した。このことより, ストレスがアレルギー誘導時の局所性腸管免疫応答に強い影響を与え, Th2 細胞への分化が優位に誘導され, さらに, 骨密度形成に影響を与えたものと考えられた。

キーワード: アレルギー, 拘束ストレス, BN ラット, MLN リンパ球, OVA 特異 IgE

ストレス社会と称される現代では, 我々は, 様々なストレスに曝されて生活している¹⁾。ストレスは, 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与することが明らかにされている²⁾。また, 生体がストレスに曝されると, 自律神経系や内分泌系だけでなく免疫系も大きな影響を受ける。ストレスによってリンパ球をはじめとする免疫能に関与した細胞の機能が影響を受け, アレルギーや自己免疫疾患の発症が促進されることが知られている³⁻⁶⁾。我が国では約 2 人に 1 人が何らかのアレルギー疾患を有しているとされており, アレルギー疾患の急速な増加が危惧されている⁷⁾。アレルギー疾患の発症には, 遺伝的要因に加え, 環境衛生や食生活の変化, ストレスの増加など様々な環境要因が挙げられている⁸⁾。

アレルギーとストレスとの関係については, ストレスによりストレス応答の中心である視床下部-下垂体-副腎皮質軸 (hypothalamo-pituitary-adrenal axis: HPA axis) で, 副腎皮質からのグルココルチコイド放出を促進し IFN- γ 産生抑制と IL-4 産生亢進を引き起こすといわれている⁹⁾。よって, ストレスは免疫系を Th2 細胞への分化に誘導すると考えられている⁹⁾。

また, ストレスはコルチコステロンおよびノルエピネフリンの増加により骨芽細胞からのオステオカルシン分

泌を抑制し¹⁰⁾, グルココルチコイドにより腎臓における Ca 再吸収の抑制や腸管における Ca の吸収抑制, 副甲状腺における副甲状腺ホルモン (parathormone: PTH) の増加を引き起こす¹¹⁾ など, 骨密度に影響を与えている。

しかしながら, ストレス負荷がアレルギー疾患および骨密度に及ぼす影響については, 未だ十分な報告もなく明らかにされていない。そこで, 本研究では, アレルギー遺伝子素因を有するアレルギー疾患性モデルラットの Brown Norway (BN) ラット¹²⁾¹³⁾ を用いて, 拘束ストレス負荷が腸管免疫の主要組織の 1 つである腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph node: MLN) リンパ球の免疫機能および骨密度に及ぼす影響について検討した。

実験方法

1. 実験動物および飼育方法

実験動物は 6 週齢の雄性 BN ラット 20 匹を日本 SLC (株) より購入した。ラットは, 室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 7\%$, 明暗サイクル 12 時間 (明期 8:00-20:00) の環境下で個別に金網ケージにて飼育し, 市販固形飼料 (MF, オリエンタル酵母 (株)) および水を自由に与えた。

ラットは 1 週間の通常飼育を行った後, 4 匹についてはストレス負荷前に解剖し, 副腎および MLN の摘出を

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: taka@mukogawa-u.ac.jp)

¹ 武庫川女子大学大学院生活環境学研究科食物栄養学専攻 (663-8558 兵庫県西宮市池開町 6-46)

² 武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科 (663-8558 兵庫県西宮市池開町 6-46)

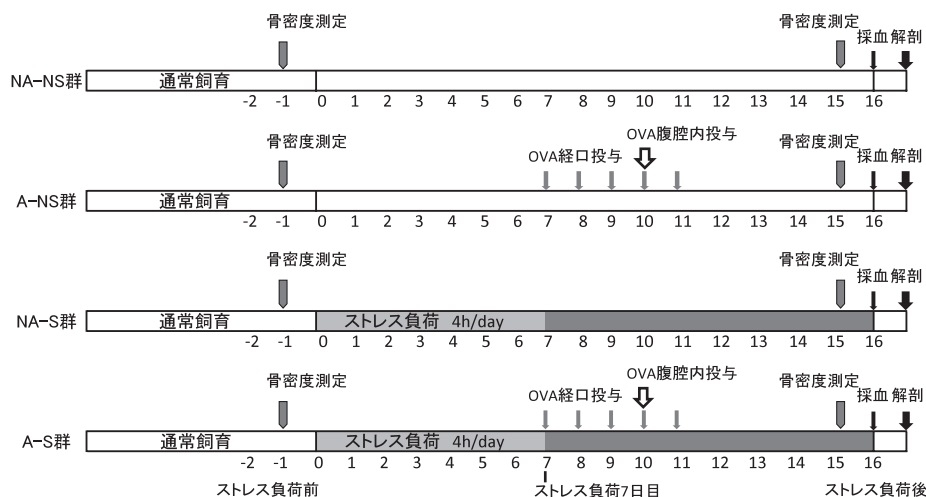


図 1 実験計画

行った。残りのラットについては、ストレス負荷を行わずに通常飼育を行う Non Stress (NS) 群と拘束ストレスを 7 日間負荷する Stress (S) 群の体重に有意差が認められない 2 群に分けた。さらに、ストレス負荷 7 日目には、NS 群と S 群のそれぞれについてアレルギーを惹起させない Non Allergy (NA) 群とアレルギーを惹起させる Allergy (A) 群の 2 群に分けた。したがって、NS 群は NA-NS (Non Allergy on Non Stress) 群と A-NS (Allergy on Non Stress) 群とし、S 群は NA-S (Non Allergy on Stress) 群と A-S (Allergy on Stress) 群と称し、各群 4 匹ずつとした。また、NA-S 群と A-S 群は、ストレス負荷開始から解剖までの 16 日目までストレス負荷を継続した (図 1)。

なお、本実験は「武庫川女子大学動物実験規定 (平成 23 年 4 月 1 日 規定第 14 号)」を遵守して実施した。

2. 体重・食餌量

体重および食餌量は、毎日、同時間帯に計量を行った。

3. ストレス負荷

ストレス負荷は、ラットを拘束用ネット (高密度ポリエチレン (タキロン社製) を袋状に成型したもの) の中に入れ、ネット上部を山形クリップ (LION 社製) で留めて拘束した。拘束時間は、1 日 4 時間とし、ストレス負荷開始日から 16 日間継続して行った。また、ストレス負荷は、NS 群からは見えない位置で行い、NS 群に心理的ストレスが負荷されないように考慮した。なお、S 群へのストレス負荷中は、NS 群の給餌および給水も停止した。

4. アレルギー誘導

アレルギー誘導は、ストレス負荷 7 日目よりオボアルブミン (ovalbumin : OVA) 10 mg/水 500 μ L を 5 日間経口投与し、経口投与 4 日目に OVA 0.5 mg/生理食塩水 425 μ L と水酸化アルミニウムゲル 75 μ L を混合したものを腹腔内投与して行った。

5. 採 血

採血は、ストレス負荷前の 4 匹と負荷後 (16 日目) の各群において行った。ヘパリン処理シリジを用いてエーテル麻酔下でラットの尾静脈より採血した。得られた血液は、遠心分離 (KUBOTA 社 2010) にて血漿を分離・回収し、測定に用いるまで -40°C にて保存した。

5.1 血漿コルチコステロン測定 血漿コルチコステロンは、Assay Max Corticosterone ELISA Kit (ASSAY-PRO 社製) を用いて Sandwich 法にて測定した。

5.2 血漿総抗体価測定 血漿の総 IgE 価は、一次抗体として anti-Rat IgE (UK-Serotec Ltd 社製)、標準抗原として Rat IgE (ZYMED 社製)、標識抗体として anti-Rat IgE HRP (NORDIC IMMUNOLOGIC LABORATORIES 社製) を使用して Sandwich 法にて測定を行った。また、抗原の血漿は、100 倍希釈して測定に用いた。次に、血漿の総 IgG 価および総 IgG1 価、総 IgG2a 価については、各種 ELISA Quantitation Kit (BETHYL 社製) を用いて Sandwich 法にて測定した。血漿は、10,000 倍に希釈して用いた。抗体価は、測定で得られた標準曲線より算出した。

5.3 血漿 OVA 特異抗体価測定 血漿の OVA 特異 IgG1 価および OVA 特異 IgG2a 価は、OVA (1 $\mu\text{g/mL}$) を一晚固層した 96 well プレートに 50 倍に希釈した血漿を加えて反応させた後、標識抗体を結合させる間接法にて測定を行った。なお、抗体価は、5.2 の総抗体価と同様の測定方法にて標準曲線を作成して算出した。測定には、各種 ELISA Quantitation Kit (BETHYL 社製) の抗体を用いた。

6. 骨密度測定

骨密度は、各群のストレス負荷前および負荷終了の前日 (15 日目) にそれぞれ測定を行った。ラットの右脚脛骨の海綿骨および皮質骨を合わせた全骨密度を実験動物用 X 線 CT 装置 (ALOKA 社製) にて測定・解析して算出した。ただし、ピクセルサイズ 120 μm 、スライス

厚 240 μm , スライス間隔 480 μm とした。

7. 副腎および MLN の摘出, ならびに MLN リンパ球の単離・培養

ストレス負荷前の 4 匹および負荷終了後 (16 日目) の各群のラットをエーテル麻酔下で解剖し, 副腎および MLN を摘出した。副腎は左右の総重量を測定し, 体重当たりの重量を算出した。また Lim¹⁴⁾ の方法に従って, MLN からリンパ球を単離した。すなわち, MLN 細胞を Hank's solution (ニッスイ製薬社製) で懸濁し, 洗浄操作をした後, Act Solution (トリスヒドロキシアミノメタン 0.41 g, NH_4Cl 1.5 g/200 mL, pH 7.65) にて赤血球の除去を行った。その後, Lympholyte-Rat (CEDAR-LANE 社製) を用いた密度勾配遠心法によりリンパ球を単離した。得られた MLN リンパ球を Hank's solution にて 2 回洗浄操作を行った後, RPMI-1640 培地 (ニッスイ製薬社製) にて懸濁した。最終細胞数が 2.5×10^6 cells/mL になるよう調整し, 24 well プレートに添加した。その後, 細胞懸濁液と同量の Concanavalin A (ConA, 和光純薬社製, 終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) または Phytohemagglutinin (PHA, 和光純薬社製, 終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加え, 37°C, 5% CO_2 通気下で ConA 添加細胞は 24 時間, PHA 添加細胞は 48 時間培養した。24 時間または 48 時間培養後, 培養液上清を採取し, 分析まで -40°C にて凍結保存した。

7.1 MLN リンパ球産生の抗体価測定 MLN リンパ球産生の総 IgE, 総 IgG, 総 IgG1, 総 IgG2a, OVA 特異 IgG1 および OVA 特異 IgG2a の各々の抗体価については, 血漿抗体価と同様の方法にて測定を行った。また, MLN リンパ球培養上清中の総 IgA 価については, ELISA Quantitation Kit (BETHYL 社製) を用いて Sandwich 法にて測定した。なお, MLN リンパ球産生の抗体価測定については, ConA 刺激の 24 時間培養上清を使用した。

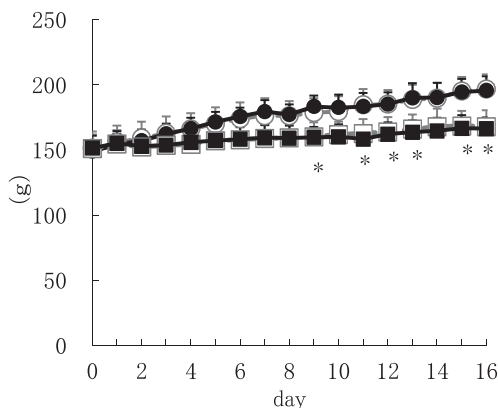


図 2 体重推移

図は, ストレス負荷前 (0 日目) から負荷 16 日目までのラットの体重推移を示した。NA-NS 群 (○), A-NS 群 (●), NA-S 群 (□), A-S 群 (■)。各値は Mean $\pm$ SD (n=4) で示した。統計学的な有意差検定は * p < 0.05 (A-NS 群 vs A-S 群) で示した。

7.2 MLN リンパ球産生のサイトカイン測定 MLN リンパ球産生 IL-4, IL-10 および IFN- γ は, PEPRO-TECH 社製の抗体を用いて Sandwich 法にて測定した。TNF- α は, Rat TNF- α Immunoassay (R & D 社製) を用いて測定した。また, IL-4, IL-10 および TNF- α の測定については, ConA 刺激の 24 時間培養上清を使用した。IFN- γ については, PHA 刺激の 48 時間培養上清を使用した。いずれのサイトカイン測定においても, 試料の培養上清は原液のまま使用した。

8. 統計処理

データは, 平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。また, ストレス負荷前と負荷後 (15 日目または 16 日目) および 4 群間の統計学的分析は, PASW Statistics 17.0 を用いて, t 検定による有意差検定および Bonferroni による有意差検定を行った。なお, ストレス負荷前および負荷後の比較は, コルチコステロン, 血漿抗体価, 副腎重量, MLN リンパ球産生の抗体価およびサイトカインについては t 検定 (対応なし) を用い, 骨密度については t 検定 (対応あり) で検定を行った。 p < 0.05 で統計学的に有意とした。

結 果

1. 体重・食餌量

体重は, S 群間 (NA-S 群・A-S 群) および NS 群間 (NA-NS 群・A-NS 群) とともにアレルギー誘導の有無による差は認められなかったが, ストレス負荷により S 群の体重増加は抑制され, NS 群より低い値を示した (図 2)。また, 食餌量においても S 群間および NS 群間ともに有意差は認められなかったが, ストレス負荷 2 日目に S 群において大きく減少し, 8 日目以降は, NS 群の値まで摂取量の回復が認められた (図 3)。

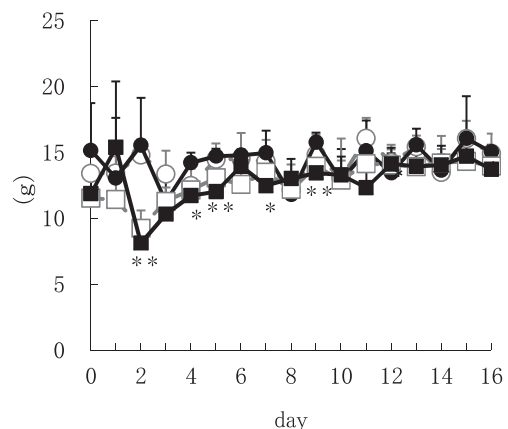


図 3 食餌量推移

図は, ストレス負荷前 (0 日目) から負荷 16 日目までのラットの食餌量推移を示した。NA-NS 群 (○), A-NS 群 (●), NA-S 群 (□), A-S 群 (■)。各値は Mean $\pm$ SD (n=4) で示した。統計学的な有意差検定は * p < 0.05, ** p < 0.01 (A-NS 群 vs A-S 群) で示した。

2. 血 漿

2.1 血漿コルチコステロン ストレス指標の血漿コルチコステロンは、負荷前に対して 16 日目において A-NS 群、NA-S 群および A-S 群にて有意な増加が示された。また、16 日目において S 群間および NS 群間ともにアレルギー誘導の有無による差は認められなかったが、ストレスを負荷した NA-S 群はストレス非負荷の NA-NS 群に対して有意な高値を示し、また A 群においても A-S 群は A-NS 群に対して有意な高値を示した(表 1)。

2.2 血漿総抗体価 血漿の総抗体価として、総 IgE は S 群 (NA-S 群および A-S 群) の両群で負荷前に対して有意な増加を示した。また、総 IgG1 および総 IgG2a については S 群間および NS 群間では有意差は認められなかったが、S 群の両群は負荷前に対して増加を示し、A-S 群は A-NS 群に対して有意な高値を示した。総 IgG については、有意差は認められなかった (表 2)。

2.3 血漿 OVA 特異抗体価 OVA 特異 IgE, IgG1,

IgG2a のいずれの抗体価も、A-NS 群および A-S 群は負荷前に対して有意な増加が認められた。また、A-S 群は A-NS 群に対して、OVA 特異 IgE は高値となる傾向を示し、OVA 特異 IgG1 は有意な高値を示した。一方、OVA 特異 IgG2a については有意な低値を示した。また、OVA 特異抗体価の IgG1/IgG2a 比は、A-S 群は A-NS 群に対して有意な高値を示した (表 3)。

3. 骨 密 度

骨密度は、4 群ともに負荷前に対して有意な増加を示した。また、15 日目において S 群間および NS 群間ともに有意差は認められなかったが、S 群は NS 群と比較して増加率は低値を示し、A-S 群は A-NS 群に対して有意な低値を示した (表 4)。

4. 副 腎 重 量

副腎重量は、4 群とも有意な差は認められなかったが S 群の両群で負荷後 (16 日目) に高値となる傾向を示した (データ非掲載)。

表 1 血漿コルチコステロン

	負荷前	負荷後 (16 日目)			
		NA-NS 群	A-NS 群	NA-S 群	A-S 群
ng/mL	480.5 ± 18.3	520.6 ± 15.4	557.1 ± 42.6*	640.9 ± 40.6**,\$\$	682.7 ± 56.2***,##

ストレス負荷前および負荷後にラットの採血を行い、得られた血漿よりコルチコステロン濃度を測定した。各値は Mean ± SD (n=4) で示した。統計学的な有意差検定は * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (vs 負荷前), \$\$ $p < 0.01$ (vs NA-NS 群), ## $p < 0.01$ (vs A-NS 群) で示した。

表 2 血漿総抗体価

	負荷前	負荷後 (16 日目)			
		NA-NS 群	A-NS 群	NA-S 群	A-S 群
総 IgE (μg/mL)	4.88 ± 0.96	6.00 ± 1.63	8.88 ± 2.46	9.10 ± 3.66*	11.22 ± 1.72*
総 IgG (mg/mL)	1.80 ± 0.86	1.68 ± 1.21	1.44 ± 0.56	5.76 ± 3.27	7.51 ± 5.26
総 IgG1 (mg/mL)	0.14 ± 0.05	0.65 ± 0.15	0.48 ± 0.21	0.90 ± 0.40	1.25 ± 0.44**,#
総 IgG2a (mg/mL)	0.24 ± 0.07	0.28 ± 0.08	0.23 ± 0.05	0.62 ± 0.16**	0.71 ± 0.35**,#

ストレス負荷前および負荷後にラットの採血を行い、得られた血漿中の各総抗体価を測定した。各値は Mean ± SD (n=4) で示した。統計学的な有意差検定は * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs 負荷前), # $p < 0.05$ (vs A-NS 群) で示した。

表 3 血漿 OVA 特異抗体価

	負荷前	負荷後 (16 日目)	
		A-NS 群	A-S 群
OVA 特異 IgE (ng/mL)	312.56 ± 28.56	449.67 ± 75.69*	533.00 ± 31.56***
OVA 特異 IgG1 (μg/mL)	0.05 ± 0.02	0.57 ± 0.02***	0.77 ± 0.13***,##
OVA 特異 IgG2a (μg/mL)	0.21 ± 0.07	4.44 ± 1.45***	2.40 ± 0.36***,##
OVA 特異抗体価 IgG1/IgG2a 比	0.25 ± 0.13	0.14 ± 0.06	0.32 ± 0.05##

ストレス負荷前および負荷後にラットの採血を行い、得られた血漿中の各 OVA 特異抗体価を測定した。各値は Mean ± SD (n=4) で示した。統計学的な有意差検定は * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (vs 負荷前), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ (vs A-NS 群) で示した。

5. MLN リンパ球

5.1 MLN リンパ球産生の抗体価 MLN リンパ球の総 IgE, 総 IgG, 総 IgG1, 総 IgG2a, 総 IgA のいずれも S 群間および NS 群間における有意差は認められず, A-NS 群と A-S 群間にも有意差はなかった。なお, 総 IgG1 は, いずれの群も負荷前に対して低下となる傾向あるいは有意な低下を示した。総 IgA では, A-S 群で負荷前に対して有意な増加を示した (表 5)。一方, OVA 特異 IgE および OVA 特異 IgG1 は, A-NS 群および A-S 群とも負荷前に対して有意な増加を示し, A-S 群は A-NS 群に対して有意な高値を示した。また, OVA 特異抗体価の IgG1/IgG2a 比についても, A-S 群は A-NS 群に対して有意な高値を示した (表 6)。

5.2 MLN リンパ球産生のサイトカイン MLN リン

パ球産生 IL-4 については, アレルギー誘導を行った A-NS 群および A-S 群とも増加となる傾向を示し, 16 日目において NS 群間および S 群間ともに有意な差が認められた。A-NS 群と A-S 群の群間には差は認められなかった。IL-10 は, 16 日目において NS 群間および S 群間ともに有意差は認められなかったが, ストレス負荷を行った S 群の両群で負荷前に対して有意な増加を示し, 16 日目において A-S 群は A-NS 群に対して高値となる傾向を示した。IFN- γ は, 群間で有意差は認められなかった。TNF- α では, 4 群ともに負荷前に対して有意な増加を示し, NS 群間および S 群間ともに有意差は認められなかったが, A-S 群は A-NS 群に対して有意な高値を示した。また, IL-4/IFN- γ 比については, 16 日目において A-NS 群は NA-NS 群に対して高値となる傾向を示し,

表 4 骨密度

	NA-NS 群	A-NS 群	NA-S 群	A-S 群
mg/cm ³ 負荷前	517.5 $\pm$ 16.4	503.8 $\pm$ 4.6	500.2 $\pm$ 18.4	516.5 $\pm$ 27.8
負荷後 (15 日目)	601.5 $\pm$ 5.2**	598.9 $\pm$ 2.9***	560.3 $\pm$ 7.7**	563.8 $\pm$ 16.9**,#
増加率 (%)	16.3 $\pm$ 4.1	18.9 $\pm$ 0.8	12.1 $\pm$ 3.9	9.3 $\pm$ 2.6##

ストレス負荷前および負荷後にラットの右脚脛骨の骨密度を実験動物用 X 線 CT 装置にて測定・解析した (ピクセルサイズ: 120 μ m, スライス厚: 240 μ m, スライス間隔: 480 μ m)。

各値は Mean $\pm$ SD (n=4) で示した。統計学的な有意差検定は* p <0.01, *** p <0.001 (vs 負荷前), ## p <0.01 (vs A-NS 群) で示した。

表 5 MLN リンパ球産生総抗体価

	負荷前	負荷後 (16 日目)			
		NA-NS 群	A-NS 群	NA-S 群	A-S 群
総 IgE (ng/mL)	77.65 $\pm$ 16.90	69.54 $\pm$ 4.87	71.78 $\pm$ 8.86	96.13 $\pm$ 41.50	57.80 $\pm$ 9.31
総 IgG (ng/mL)	13.65 $\pm$ 2.20	17.78 $\pm$ 2.66	12.78 $\pm$ 3.16	16.30 $\pm$ 6.06	12.61 $\pm$ 4.89
総 IgG1 (ng/mL)	9.63 $\pm$ 3.87	2.61 $\pm$ 1.01**	2.72 $\pm$ 1.00**	4.35 $\pm$ 3.78	1.82 $\pm$ 0.70*
総 IgG2a (ng/mL)	2.41 $\pm$ 0.71	4.33 $\pm$ 1.67	2.41 $\pm$ 0.933	4.47 $\pm$ 3.62	3.10 $\pm$ 1.54
総 IgA (ng/mL)	52.66 $\pm$ 17.79	68.70 $\pm$ 10.83	101.14 $\pm$ 52.97	89.04 $\pm$ 38.92	163.73 $\pm$ 43.56*

ストレス負荷前および負荷後にラット解剖し, 得られた MLN リンパ球を培養した培養上清中の各総抗体価を測定した。

各値は Mean $\pm$ SD (n=4) で示した。統計学的な有意差検定は* p <0.05 (vs 負荷前) で示した。

表 6 MLN リンパ球産生 OVA 特異抗体価

	負荷前	負荷後 (16 日目)	
		A-NS 群	A-S 群
OVA 特異 IgE (ng/mL)	88.25 $\pm$ 3.09	102.14 $\pm$ 3.44***	116.58 $\pm$ 8.11***,##
OVA 特異 IgG1 (ng/mL)	0.26 $\pm$ 0.07	11.88 $\pm$ 0.67***	108.53 $\pm$ 7.78***,###
OVA 特異 IgG2a (ng/mL)	0.36 $\pm$ 0.06	0.51 $\pm$ 0.07*	0.45 $\pm$ 0.05
OVA 特異抗体価 IgG1/IgG2a 比	0.74 $\pm$ 0.15	23.93 $\pm$ 4.25***	243.03 $\pm$ 34.63***,###

ストレス負荷前および負荷後にラット解剖し, 得られた MLN リンパ球を培養した培養上清中の各 OVA 特異抗体価を測定した。

各値は Mean $\pm$ SD (n=4) で示した。統計学的な有意差検定は* p <0.05, *** p <0.001 (vs 負荷前), ## p <0.01, ### p <0.01 (vs A-NS 群) で示した。

表 7 MLN リンパ球産生サイトカイン

	負荷前	負荷後 (16 日目)			
		NA-NS 群	A-NS 群	NAS 群	A-S 群
IL-4 (ng/mL)	5.13 ± 1.23	2.30 ± 1.06	7.46 ± 2.09 ^{††}	1.85 ± 0.92 [*]	7.03 ± 1.32 ^{‡‡}
IL-10 (ng/mL)	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.01 [*]	0.16 ± 0.02 ^{**}
IFN- γ (ng/mL)	1.86 ± 0.87	4.13 ± 2.02	3.05 ± 1.49	3.99 ± 0.63 [*]	3.00 ± 2.61
TNF- α (pg/mL)	31.66 ± 7.86	48.918 ± 6.51 ^{**}	52.48 ± 8.89 ^{**}	69.86 ± 8.84 ^{**}	88.19 ± 13.82 ^{***,##}
IL-4/IFN- γ 比	3.33 ± 1.70	0.64 ± 0.32 [*]	2.90 ± 1.43	0.50 ± 0.30 [*]	3.51 ± 1.89 ^{‡‡}

ストレス負荷前および負荷後にラット解剖し、得られた MLN リンパ球を培養した培養上清中の各サイトカイン濃度を測定した。

各値は Mean ± SD (n=4) で示した。統計学的な有意差検定は^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01 (vs 負荷前), ^{##}p<0.01 (vs A-NS 群), ^{††}p<0.01 (vs NA-NS 群), ^{‡‡}p<0.01 (vs NAS 群) で示した。

A-S 群は NAS 群に対して有意な高値を示した。A-NS 群と A-S 群の間には有意差は認められなかった (表 7)。

考 察

アレルギー誘導ラットにおけるストレス負荷が、MLN リンパ球の抗体価およびサイトカインの産生に及ぼす影響について検証した。生体に慢性的なストレスの負荷は、視床下部-下垂体前葉を介して副腎皮質からのコルチコステロンの分泌を促進する¹⁵⁾。また、副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone : ACTH) の作用により副腎皮質細胞の増大や血液含有量の増大により副腎重量が増加することも報告されている¹⁵⁾。したがって、ストレスを負荷した S 群では血漿コルチコステロンが有意な増加を示し、副腎重量においても S 群で高値となる傾向を示した。この結果から、拘束用ネットを用いた S 群ラットに対する拘束は、明らかにストレスが負荷されたものと考えられた。げっ歯類への重篤なストレスは、摂食障害と体重減少を起こすことが報告されており、コルチコトロピン放出ホルモン (corticotropin-releasing hormone : CRH) がげっ歯類の脳室内にて強力な食欲減退薬となることが証明されている¹⁶⁾。結果にも示されているように体重は、ストレス負荷により増加が抑制され、ストレス負荷を行っていない NS 群に比べて低値であった。また、食餌量も、ストレス負荷 2 日目に S 群で減少し、その後 NS 群の食餌量まで回復が認められた。ストレス負荷 2 日目の食餌量の減少やストレス負荷が、体重減少への影響を引き起こしたと考えられた。

ラットへの拘束ストレス負荷により、血漿コルチコステロンおよびノルエピネフリンが増加し、骨芽細胞からのオステオカルシン分泌を抑制することが報告されている¹⁰⁾。また、血漿のグルココルチコイドは、腎臓における Ca 再吸収の抑制や腸管における Ca の吸収抑制、副甲状腺における PTH の増加を引き起こすともいわれている¹¹⁾。このことにより、骨芽細胞の増殖と代謝を抑制し、またアポトーシスを増加させる一方で、破骨細胞の

増殖と骨吸収を高め、骨粗鬆症を引き起こすといわれている¹¹⁾。ストレス負荷後 (15 日目) の骨密度は、全ての群において負荷前に比較して有意な増加を示した。しかし、ストレス負荷前後の骨密度増加率は、NS 群に比較して S 群はいずれも低かった。このことは、成長により骨密度は増加するものの、ストレス負荷により骨形成が抑制的に働くものと考えられた。

アレルギー疾患の重要な指標となる抗体価の総 IgE については、ストレス負荷を行った S 群の両群 (NAS 群および A-S 群) で、アレルギー誘導の有無に関係なく負荷前に比較して有意な増加を示した。また、Th2 細胞メディエータで誘導される IgG1 が S 群で高値を示し、特に A-S 群で有意な増加を示した。このことは、ストレス負荷により Th2 細胞への分化が誘導されたものと考えられた。さらに、OVA 特異抗体価も、A-S 群と A-NS 群のアレルギー誘導群で有意な増加を示した。また、ストレス負荷を行った A-S 群は、ストレス非負荷の A-NS 群と比較して、OVA 特異 IgE が高値となる傾向および OVA 特異 IgG1 の有意な高値が認められ、さらに、Th2/Th1 バランスを示す OVA 特異抗体の IgG1/IgG2a 比でも、A-S 群は A-NS 群に対して有意な高値を示した。したがって、ストレス負荷時にアレルギーが誘導されると、感作抗原の OVA に対する IgE および IgG サブクラス抗体価が増加し、Th2 細胞への分化誘導が優位な方向に働くことが考えられた。

MLN リンパ球産生の総 IgE、総 IgG、総 IgG2a については、有意な差は認められなかったが、総 IgA では A-S 群のみで有意な増加が認められた。また、OVA 特異抗体価では、アレルギー誘導を行った A-NS 群と A-S 群ともに Th2 細胞からのメディエータの OVA 特異 IgE および OVA 特異 IgG1 の有意な増加が認められた。さらにストレス負荷を行った A-S 群は、A-NS 群よりも有意な高値を示した。OVA 特異抗体の IgG1/IgG2a 比についても同様に A-S 群は有意な高値を示した。よって、ストレスは、血漿抗体価と同様に MLN リンパ球産生 OVA 特異抗体価についても、Th2 細胞への分化に優位に誘導

することが示唆された。一方、Th2/Th1 バランスを示す主要なサイトカインである IL-4、IFN- γ および IL-4/IFN- γ 比については、A-NS 群および A-S 群間で有意な差は認められなかったが、TNF- α については A-S 群は A-NS 群に対して有意な増加を示した。TNF- α は、炎症時にマクロファージより産生される炎症性サイトカインであることより、アレルギー誘導時のストレスの存在は、MLN 局所における炎症反応を亢進させることが考えられた。また、TNF- α は ACTH を介してグルココルチコイドを増強することが知られていることより¹⁷⁾、血漿のコルチコステロンの上昇は、HPA axis だけでなく TNF- α の関与により更に増強し、A-S 群へのストレスの影響を増大させたと考えられた。

MLN リンパ球産生の IL-10 は、S 群の両群で有意な増加を示し、A-S 群は A-NS 群に対して高値となる傾向を示した。IL-10 は Th2 サイトカインであると同時に、Th1 に抑制的に働くことが知られている¹⁸⁾。また、IL-4 とともに IgA 産生に関わるサイトカインとしても知られている¹⁹⁾²⁰⁾。このことは、A-S 群について MLN リンパ球産生総 IgA が有意に増加したと関係づけることができる。また、腸管粘膜の主たる抗体である IgA については、ラットへのストレス負荷により腸管における IgA 濃度が増加することが報告されており、その機構としてコルチコステロンが IgA 抗体形成細胞に直接はたらき、IgA α 鎖 mRNA の発現と IgA 分泌を増加させることが考えられている²¹⁾。よって、A-S 群の総 IgA は、ストレスにより増加したコルチコステロンおよび IL-10 とアレルギーにより増加した IL-4 により産生が亢進したと考えられた。したがって、ストレス負荷時におけるアレルギー誘導によって、Th2 細胞への分化が誘導され、Th2 細胞からのメディエータの産生が増加したものと考えられた。

本研究において、我々はアレルギーモデルラットへの心理的ストレスの負荷は、ラットの体重を減少させ、骨形成を抑制するなど生体への影響を引き起こすことを確認した。また、ストレスは、全身性の免疫を亢進させ、感作抗原である OVA に対する特異抗体を増加させ、免疫応答を Th2 細胞へ優位に分化誘導した。MLN 局所についても同様に、ストレスにより Th2 細胞のメディエータ産生が増加し、OVA 特異抗体の産生が増加した。

ストレスの暴露は、腸管免疫系と密接な関係を有することが知られており、アレルギーを増強することが知られている。本研究では、拘束ストレスはアレルギー誘導時において、MLN リンパ球における免疫応答を Th2 細胞へ分化誘導し、アレルギー亢進に強い影響を及ぼしたものと推察する。

文 献

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部 (2008) 平成 19 年労働者健康状況調査結果の概要. p 17.
- 2) 大塚 礼, 豊嶋英明, 玉腰浩司, 森本祐介, 和田恵子, 松下邦洋, 竹藤聖子, 堀田 洋, 三橋弘嗣, 杉浦嘉一郎, 歐陽 蓓, 八谷 寛 (2006) 仕事のストレス要因から評価した自覚的ストレスの妥当性, および自覚的ストレスと生活習慣との関連. 日本循環器病予防学会誌 41, 62-9.
- 3) Ader R, Cohen N, Felten D (1995) Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet* 345: 99-103.
- 4) Nagata S, Irie M, Mishima N (1999) Stress and asthma. *Allergol Int* 48: 231-8.
- 5) Kiecolt-Glaser JK, Glaser R (1995) Psychoneuroimmunology and health consequences: Data and shared mechanisms. *Psychosom Med* 57: 269-74.
- 6) Shavit Y, Terman GW, Martin FC, Lewis JW, Liebeskind JC, Gale RP (1985) Stress, opioid peptides, the immune system, and cancer. *J Immunol* 135: 834-7.
- 7) 厚生科学審議会疾病対策部会 リウマチ・アレルギー対策委員会 (2011) 平成 23 年 8 月 リウマチ・アレルギー対策委員会報告書, 15.
- 8) 宮本昭正 (1999) 食物アレルギーの最前線 (別冊・医学のあゆみ) (名倉 宏編著), p 3-5. 医歯薬出版, 東京.
- 9) 奥山香織, 大野 勲 (2008) 精神的ストレスによる Th2 反応の誘導機序. 臨床免疫・アレルギー科 49, 626-32.
- 10) Patterson-Buckendahl P, Kvetnansky R, Fukuhara K, Cizza G, Cann C (1995) Regulation of plasma osteocalcin by corticosterone and norepinephrine during restraint stress. *Bone* 17: 467-72.
- 11) Patschan D, Loddenkemper K, Buttgerit F (2001) molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* 29: 498-505.
- 12) 渡辺 東, 長谷川鎮雄, 三島秀康 (1997) 気道過敏性の動物モデル. 呼吸 16, 773-8.
- 13) 井出脇太郎, 千田金吾 (2007) BN ラット喘息モデルの有用性とその限界. 喘息 20, 63-7.
- 14) Lim BO (2003) Effects of wogonin, wogonoside, and 3,5,7,2',6'-pentahydroxyflavone on chemical mediator production in peritoneal exudate cells and immunoglobulin E of rat mesenteric lymph node lymphocytes. *J Ethnopharmacol* 84: 23-9.
- 15) Vinson GP, Whitehouse BJ, Hinson JP (2009) 副腎皮質: ストレス百科事典 (ストレス百科事典翻訳刊行委員会編), 1-5, p 2345-53. 丸善, 東京.
- 16) Chotiawat C, Harris RBS (2006) Increased anxiety-like behavior during the post-stress period in mice exposed to repeated restraint stress. *Horm Behav* 50: 489-95.
- 17) 清水善徳, 山北高志, 有馬 豪, 赤松浩彦, 松永佳世子 (2009) ストレスと免疫—アトピー性皮膚炎様モデルマウスを用いて. 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌 3, 78-85.
- 18) 須藤 一 (2000) Th1/Th2 とアトピー. 免疫・Immunology Frontier 10, 142-57.
- 19) 文 炳坤, 高津聖志 (1999) 腸管の粘膜免疫系における分泌型 IgA の役割と産生機構. *Surgery Frontier* 6, 40-5.

- 20) 浦 英樹, 平田公一, 古畑智久 (1999) 腸管免疫の Th1/Th2 バランス. *Surgery Frontier* **6**, 73-5.
- 21) Reyna-Garfias H, Miliar A, Jarillo-Luna A, Rivera-Aguilar V, Pacheco-Yepez J, Baeza I, Campos-Rodriguez R (2010) Repeated restraint stress increases IgA concentration in rat small intestine. *Brain Behav Immun* **24**: 110-8.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **67**: 87-94 (2014)

Original Paper

Effects of Restraint Stress on Ovalbumin-specific Antibody Titers and Bone Density in Brown Norway Rats

Fumiko Sakai,¹ Hiroe Suzuki,² Yumina Miyai,²
Mika Yorita,¹ Mariko Asano,² and Kyoko Takahashi^{*2}

(Received August 23, 2013; Accepted November 11, 2013)

Summary: The present study examined the effects of allergy induction under restraint stress conditions on the immune function of mesenteric lymph node lymphocytes and bone density in Brown Norway rats, a rat model that is genetically predisposed to allergic diseases. Stress caused by a restraint net affected the plasma corticosterone level and dietary bulk as well as body weight immediately after stress application. The rate of increase in bone density under stress conditions was lower in allergy-induced rats than in rats where the allergy was not induced. The levels of plasma immunoglobulin (Ig)E, IgG1, IgG2a, ovalbumin (OVA)-specific IgE, OVA-specific IgG1, and OVA-specific IgG2a in allergy-induced rats significantly increased after stress application. In addition, the levels of OVA-specific IgE, OVA-specific IgG1, and IL-10 in mesenteric lymph node lymphocytes were significantly increased after stress application. These findings suggest that allergy induction under conditions of stress greatly affects local immune responses in the intestinal canal, resulting in induction of Th2 differentiation and also having an influence on bone density.

Key words: BN rat, restraint stress, allergy, MLN lymphocytes, OVA-specific antibody

* Corresponding author (E-mail: taka@mukogawa-u.ac.jp)

¹ Graduate School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's University, 4-46 Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan

² School of Human Environmental Sciences, Department of Food Science and Nutrition, 4-46 Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan