

ストレス誘導アレルギー性腸炎モデルにおける 発酵乳酸菌の抑制効果

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻：戸塚 護

要 約

ストレス負荷は自律神経系や内分泌系の変化のみならず、免疫系にも影響を与える。炎症性腸疾患や過敏性腸症候群、アレルギー疾患の発症・増悪にストレスが関与する可能性も知られている。一方、プロバイオティック乳酸菌はストレス緩和効果を示すことが報告されている。ストレスが誘導し免疫応答が関与するアレルギー性の腸炎症モデルを確立することは、上記の疾患の発症機構の解析や、プロバイオティック乳酸菌の効果の解析に有用である。そこで本研究では、ストレス誘導性アレルギー性腸炎モデルの確立を目指した。常時振動や騒音が認められる飼育箱において、卵白アルブミン（OVA）特異的T細胞受容体の遺伝子導入マウス（D011.10）に20%OVA含有水を自由摂取させた場合、通常の飼育環境ではみられない顕著な体重減少を伴う腸炎症状が観察された。すなわち、D011.10マウスではストレス負荷とOVA摂取が同時に起こることで免疫学的機序を伴う腸炎症が起こるものと推定された。実際、4時間の拘束ストレス下でのOVA摂取を検討した結果、OVA摂取のみの群と比較して顕著な体重減少が認められた。ストレス負荷のみの群でもこのような変化は観察されなかったことから、このモデルではストレス負荷が免疫応答に変化を与え体重減少を伴う変化が生じることが示唆された。

1. 背景および目的

現代社会はストレスに満ちている。ストレス負荷による神経系の変化が免疫応答に大きな影響を与え、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患が増悪することが知られている。腸管の機能性障害である過敏性腸症候群（irritable bowel syndrome; IBS）も、ストレスにより症状の発症・増悪が起こることが特徴の疾患であり、その有病率は一般人口の10～15%にも及ぶと報告されている。

我々はこれまでに動物モデルを用いた実験で、飼育環境とアレルギー性腸炎発症の関係について次のような現象を観察している。すなわち、卵白アルブミン（OVA）に特異的なT細胞レセプター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスであるD011.10マウスに、20%OVA含有水を自由摂取させた場合、通常の飼育環境では腸炎の発症は認められないが、これを常時振動および騒音が認められる飼育装置を用いて行った場合、顕著な体重減少をともなう腸炎症状を示すという現象である。この現象は、マウスにストレスを負荷するような飼育環境では、通常ストレスがない場合には誘起されないアレルギー性腸炎が発症しうることを示唆している。一方、乳酸菌はストレス緩和作用を有することも報告されており、ここで観察された現象を抑制する可能性も期待される。

IBSに対するプロバイオティクスの抑制効果を示した臨床試験としては、360名のIBS患者にカプセル化したビフィズス菌（*B. infantis* 35624）を投与した試験で、有意な症状抑制効果が認められている（Whorwell PJ, *et al.*: *Am J Gastroenterol* 101:326-333, 2006）。IBSの原因としては

様々な要因が挙げられているが、IBS患者腸管には免疫細胞の集積が認められている (Chadwick *et al.*: *Gastroenterology* 122:1778-1783, 2002) ことから、免疫学的な機序も大きく関与していると考えられている。

本研究で扱う動物モデルは、腸管において顕著な炎症が観察される点で、厳密な意味では、器質的な変化を認めない機能性消化管障害であるIBSのモデルとは言い難い。しかしながら、IBSにおいても免疫担当細胞の変化、炎症性反応の変化が認められており、これらとストレス応答が関与する腸疾患のモデルとして、IBSや食物アレルギーのメカニズムおよびそれに対するプロバイオティクスによる抑制機構を明らかにする上で有用なモデルとなることが期待される。

特定の機能を有する乳酸菌を含む発酵乳が、有病率が高いIBSなど、ストレス誘導性の腸疾患の予防・増悪抑制に効果があることが示されれば、QOLを高める発酵乳の健康イメージを増進し、乳製品の普及に資するものと考えられる。

乳酸菌の抑制メカニズムを明らかにすることができれば、プロバイオティクスの腸管における働きの一つを明らかにすることになり、学術的意義も高い。また、ストレスが腸炎症を発症・増悪させるメカニズムの解明という点でも大きな貢献ができる。

本研究では、まずストレスが誘導するアレルギー性の腸炎症モデルを確立することを目的として、次のような実験を行った。すなわち、予備的実験で観察したD011.10マウスでの腸炎誘導が、ストレス負荷により生じたものであることを確認するため、常時振動および騒音がみられる飼育装置を用いて飼育環境によるストレスの負荷を行い、OVAの投与が腸炎症状を引き起こすか検討した。さらに、拘束ストレス負荷の検討も行い、D011.10マウスにおけるストレス負荷とOVA摂取が同時に起こった場合の現象を調査した。

2. 材料および方法

実験動物

D011.10マウスはニワトリ卵白アルブミン (OVA) の主要なT細胞抗原決定基である323残基から339残基領域をI-A^d拘束的に認識するマウスCD4⁺T細胞クローンD011.10由来のT細胞レセプター (TCR) 遺伝子が導入されたマウスで、このトランスジェニックマウスの遺伝背景はBALB/cマウスと同じである。このマウスはD. Y. Loh博士らによって樹立され (Murphy *et al.*, 1990)、その子孫を慶應大学医学部微生物学教室の石川博道教授より供与された。D011.10マウスに導入したTCRを特異的に認識するクロノタイプモノクローナル抗体KJ1.26を用い、フローサイトメーターを用いて末梢血CD4⁺T細胞におけるD011.10 TCR陽性細胞の割合を測定することにより、D011.10 TCR遺伝子陽性の判定を行った。繁殖と選定は星野試験動物飼育所 (さいたま) に委託した。BALB/cマウスは日本クレア (東京) より購入した。マウスは、24時間サイクルの自動照明のもとで飼育した。餌はガンマ線照射CE-2食 (日本クレア) を自由摂取させ、水は滅菌した水道水を自由に摂取させ、通常動物飼育施設にて維持した。

飼育環境によるストレス負荷方法

常時振動および騒音がみられる飼育装置 (N社製、動物個別飼育制御装置) によって飼育した。

拘束ストレス負荷方法

空気穴をあけた直径28 mmの50 mlファルコンチューブ (CORNING) にマウスを4時間保定した。マウスはチューブ内で前後に移動することは可能だが体の向きを変えることはできない。対照群は拘束ストレス負荷の間、絶食絶水とした。

OVA投与方法

すり鉢上で卵白アルブミン (和光純薬) を滅菌水でこねて溶解することにより20%OVA含有水を調製した。これを24時間おきに交換し、自由摂取させた。

糞便スコア

糞の状態は下記に示した表に従ってスコア化し、群内の個体の平均値を検討した。

fecal score	observation
0	normal (dry, the form kept)
1	the form kept but slightly loose
2	loose (attach to paper)
3	loose (the form unkept)
4	diarrhea (liquid)

血清の調製

マウス尾静脈より血液を回収し、1時間程室温で保持した。その後4℃で3分間遠心分離 (1000 ×g) をして、上清を回収し血清を得た。血清は酵素免疫測定法 (ELISA) に用いるまで-80℃で保存した。

腸管のサンプリング

マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、開腹して腸管を摘出した。腸管は回腸、結腸を凍結標本とし、切片の作製まで-80℃で保存した。

凍結切片の作製

凍結標本をクリオスタット (HM505E, MICRO EDGE INSTRUMENTS, 庫内温度-20℃前後) を用いて厚さ6 μmの切片を作製した。切片はAPSコートされたスライドガラス (松浪硝子工業) に貼り付け、HE染色に用いるまで-80℃で保存した。

Hematoxilin-Eosin (HE) 染色

凍結切片を室温で1時間放置し、水分を除去した。-20℃のアセトンに10分浸し固定した。10分風乾し、5分水洗いた後、マイヤーヘマトキシリン液 (和光純薬) に2分浸した。30秒流水で洗い、5分間静置した。1%エオジンアルコール (武藤化学) に1分浸し、2分ほど水洗いた。純アルコールで洗い、キシレン処理した後封入した。

酵素免疫測定法 (ELISA) による血清中の総IgE抗体濃度の測定

一次抗体 (1:500) を50 mM NaHCO₃水溶液で希釈し、96ウェルポリエチレン製マイクロタイタープレート (Nunc) に各ウェル50 μ lずつ添加して4 $^{\circ}$ Cで一晩吸着させた。0.05% Tween20 (和光純薬工業) 含有リン酸緩衝生理食塩水(日水製薬、東京, PBST)で3回洗浄した後、3%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA; 生化学工業、東京) を加えPBSTで作製したブロッキング溶液を各ウェル100 μ lずつ添加して2時間室温で放置した。PBST で3回洗浄した後、1%BSAを含むPBSTで適宜希釈した血清および標準濃度溶液を各ウェル50 μ lずつ添加して、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。PBST で7回洗浄した後、1%BSAを含むPBSTで希釈したビオチン標識抗体 (1:2000) を各ウェル50 μ lずつ添加して、遮光状態で室温で1時間放置した。その後PBST で5回洗浄した後、1%BSAを含むPBSTで希釈したストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼ (1:1000) を各ウェル50 μ lずつ添加して、遮光状態で室温で1時間放置した。PBST で7回洗浄した後、4-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (東京化成工業、東京) を基質として、1 mg/mlになるようにジエタノールアミン-塩酸緩衝液 (pH 9.8) に溶解したものを50 μ lずつ加えて発色させた。マイクロプレートリーダーModel 550 (Bio-Rad、Hercules, CA, USA) により405 nmと490 nmの吸光値を測定し、総IgE抗体濃度は標準濃度溶液を用いた検量線から算出した。

一次抗体はPurified anti mouse IgE (R35-72, BD Biosciences Pharmingen)、標準濃度溶液はPurified Mouse IgE k Isotype Control (BD Biosciences Pharmingen)、ビオチン標識抗体はAnti-IgE(ϵ), Mouse, Rat-Mono(L0-ME-2), Biotin (P.A. RIS)、ストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼはAKP Streptavidin (BD Biosciences Pharmingen) を用いた。

酵素免疫測定法 (ELISA) による血清中のOVA 特異的IgE抗体価の測定

一次抗体 (1:500) を50 mM NaHCO₃水溶液で希釈し、96ウェルポリエチレン製マイクロタイタープレート (Nunc) に各ウェル50 μ lずつ添加して4 $^{\circ}$ Cで一晩吸着させた。PBST で3回洗浄した後、3%BSAを加えPBSTで作製したブロッキング溶液を各ウェル100 μ lずつ添加して2時間室温で放置した。PBSTで3回洗浄した後、1%BSAを含むPBSTで適宜希釈した血清および標準濃度血清を各ウェル50 μ lずつ添加して、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。PBSTで7回洗浄した後、1%BSAを含むPBSTで希釈したビオチン標識抗体 (1:2000) を各ウェル50 μ lずつ添加して、遮光状態で室温で1時間放置した。その後PBST で5回洗浄した後、1%BSAを含むPBSTで希釈したストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼ (1:1000) を各ウェル50 μ lずつ添加して、遮光状態で室温で1時間放置した。PBST で7回洗浄した後、4-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (東京化成工業、東京) を基質として、1 mg/mlになるようにジエタノールアミン-塩酸緩衝液 (pH 9.8) に溶解したものを50 μ lずつ加えて発色させた。マイクロプレートリーダーModel 550 (Bio-Rad、Hercules, CA, USA) により405 nmと490 nmの吸光値を測定し、OVA 特異的IgE抗体価は標準濃度血清を用いた検量線から算出した。

一次抗体はPurified anti mouse IgE (R35-72, BD Biosciences Pharmingen) を用い、標準濃度血清はImject Alum (PIERCE) に結合させたOVA (OVA/Alum) をBALB/cマウスに1週間間隔で4回腹腔免疫することにより得た。この標準血清の抗体価は1000 units/mlとした。ビオチン標識抗体

はOVA（生化学コーポレーション）をBiotinamidohexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester（Sigma）によりビオチン標識して得た。ストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼはAKP Streptavidin（BD Biosciences Pharmingen）を用いた。

統計解析

2群間における血清中抗体量の比較は、Studentの*t*検定を用いた。群間における体重推移の比較には、Tukey検定を用いた。群間における糞便スコアの比較には、Dunn's multiple comparison testを用いた。いずれの検定法においても、危険率5%で有意差ありと判断した。

3. 結果

図1に示したスケジュールにしたがって、7から8週齢のD011.10マウス6匹を、常時振動および騒音が認められる飼育装置において7日間飼育した。その後、OVAを投与する群（OVA群）と対照群として滅菌水を投与する群（control群）の3匹ずつの2群に分け、さらに7日間同環境中で飼育した。飼育期間中は毎日体重を測定した。実験終了時に糞便および血液を採取した。糞便は、糞便スコア表に基づいて評価した。また、血清中の総IgE抗体濃度およびOVA特異的IgE抗体価を測定した。さらに腸の炎症状態を調べるために、腸管の組織切片を作製し、組織学的な観察を行った。

OVA投与群ではOVA投与直後から徐々に体重の減少がみられ（図2）、実験終了時には、control群と比べて、体重減少、毛ツヤ、糞便の状態の悪化を認めた（図3、図4）。回腸、結腸の組織学的観察を行ったところ、結腸においてはcontrol群と比べて違いは認められなかったが、回腸において、OVA水投与により絨毛の委縮が観察された（図5）。また、総IgE抗体濃度およびOVA特異的IgE抗体価ともにOVA群で有意に高い値を示した（図6）。これらの結果より、D011.10マウスにおいて、通常の飼育環境ではみられない体重減少を伴う腸症状が、飼育環境によるストレス負荷をかけた条件下でOVA水投与により発症することが示唆された。

上記の実験系では、飼育環境の振動、騒音を自由に制御して変更することができず、またここで認められたマウスにおける腸炎症の誘導にストレスが実際に関わっているかどうか不明である。そこで次に我々は、この点を明らかにするため、実験的にストレス負荷をかけた条件下でOVAを投与することにより、この現象へのストレスの関与について検討した。一般的にストレスは、物理的なストレスと精神的なストレスの二つに分けられることが知られている（*Endocrinology* 147: 4968-4976, 2006）。上記の飼育装置における騒音や振動などのストレスは、精神的なストレスに分類されている。そこで一般的に実験で用いられる精神的なストレスを負荷する方法として拘束ストレスを検討することにした。

図7に示したスケジュールにしたがって、6から8週齢のD011.10マウスを、毎日4時間拘束ストレスを与える群と拘束ストレスを与えない対照群に6匹ずつ分けて7日間飼育した。7日間の飼育の後、それぞれの群を滅菌水投与とOVA投与の3匹ずつに分け、おのおのをcontrol群、control+OVA群、stress群、stress+OVA群の4群とし、さらに7日間飼育した。飼育期間中は毎日体重と摂食量を測定し、糞の状態を観察した。最終日に採血し、血清中の総IgE抗体濃度を測定した。stress

+OVA群ではcontrol+OVA群とほぼ同量の摂食量にもかかわらず、投与直後から体重の減少がみられた(図8)。またOVA投与群(control+OVA群、stress+OVA群)で総IgE抗体濃度が高い傾向がみられた(図9)。

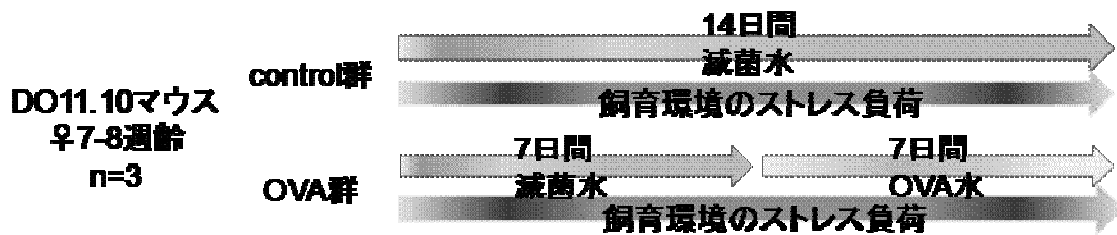


図1 常時振動および騒音が認められる飼育装置におけるD011.10マウスへのOVA水投与実験スケジュール

常時振動および騒音が認められる飼育装置において7日間飼育した。その後、OVA水を投与する群(OVA群)と対照群として滅菌した水道水を投与する群(control群)の2群に分け、さらに7日間同環境中で飼育した。実験終了時に、体重推移、糞便、毛ツヤの状態を観察し、血液および腸管を採取した。各群n = 3。

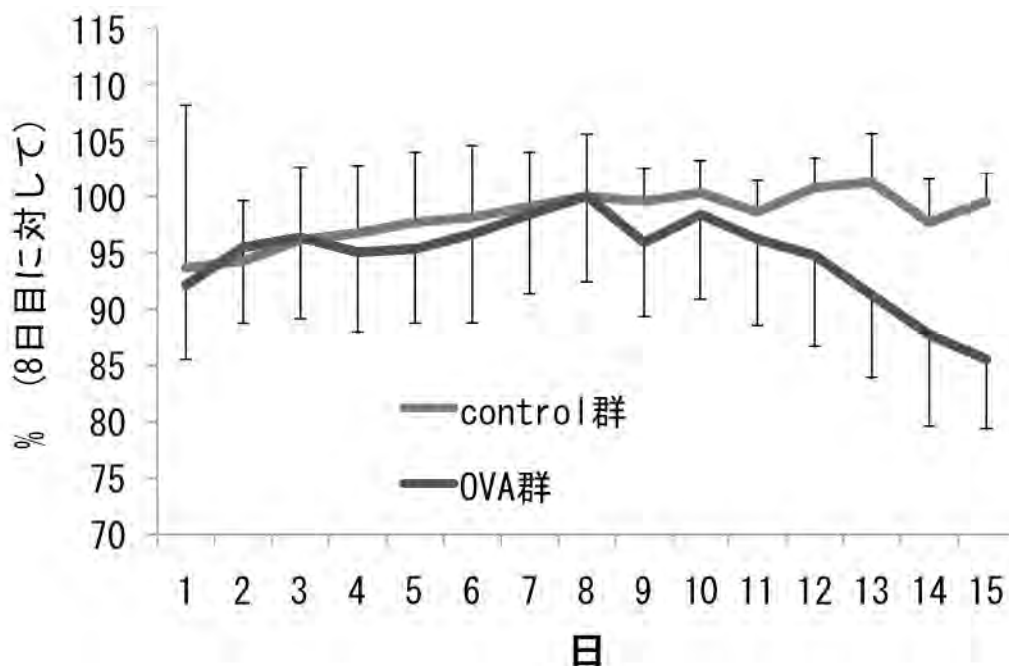


図2 常時振動および騒音が認められる飼育装置におけるD011.10マウスの滅菌水、OVA水投与時の体重推移

図1のスケジュールに従って、14日間(1日目~15日目)、常時振動および騒音がみられる飼育装置に飼育し、最後の7日間(8日目~15日目)はOVA水あるいは滅菌した水道水を自由摂取させた。実験期間中、毎日体重の推移を観察した。体重はOVA投与を開始した8日目の値に対する割合で示した。各群n = 3。

control群



OVA群

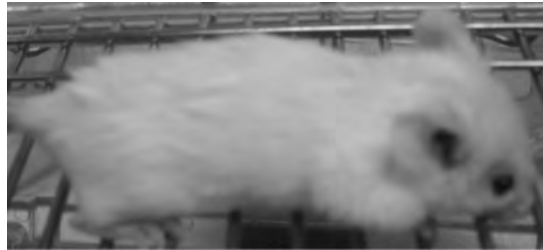


図3 常時振動および騒音が認められる飼育装置におけるD011. 10マウスのOVA水投与後のマウスの写真

図1のスケジュールに従い、実験終了時にマウスの写真を撮影した。各群で典型的なマウスの写真を載せた。

faecal score	Observation
0	Normal(dry, the form kept)
1	the form kept but slightly loose
2	loose(attach to paper)
3	loose(the form unkept)
4	diarrhea(liquid)

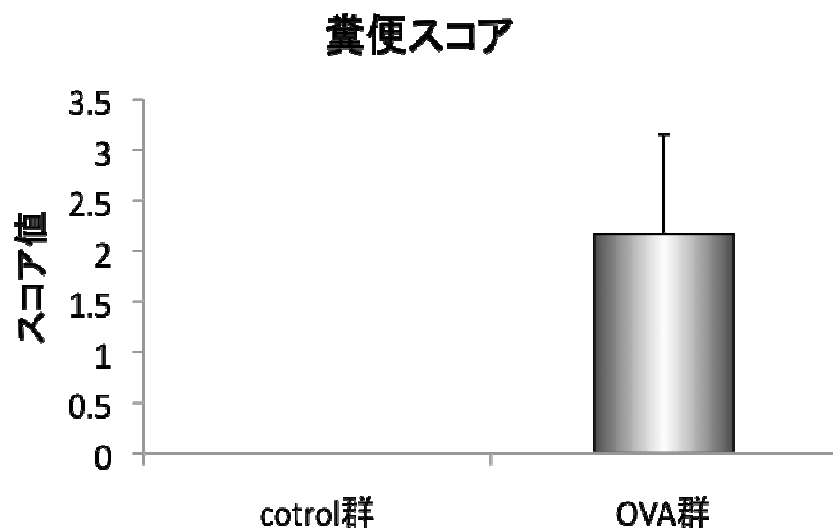


図4 常時振動および騒音が認められる飼育装置におけるD011. 10マウスのOVA水投与後の糞便スコア

図1のスケジュールに従い、実験終了時に糞便を採取し、糞便スコア表に基づいて糞便の状態を評価した。各群n = 3。

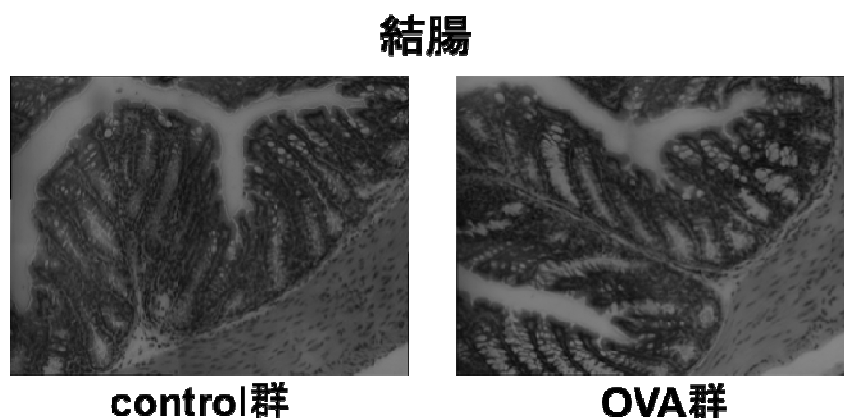
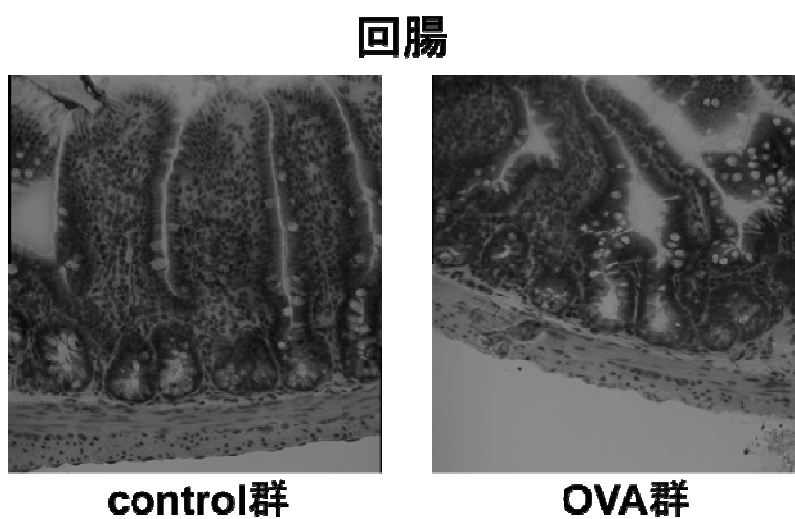


図5 常時振動および騒音が認められる飼育装置におけるD011. 10マウスのOVA水投与後のHE染色を行った腸管組織切片の顕微鏡観察

14日目に腸管を採取しクライオスタットを用いて組織切片を作成した。切片は、ヘマトキシリン・エオシン液により染色(HE染色)を行い、倒立顕微鏡により腸管の組織学的な観察を行った。写真は回腸と結腸の組織染色像で、各群で典型的なものを示した。

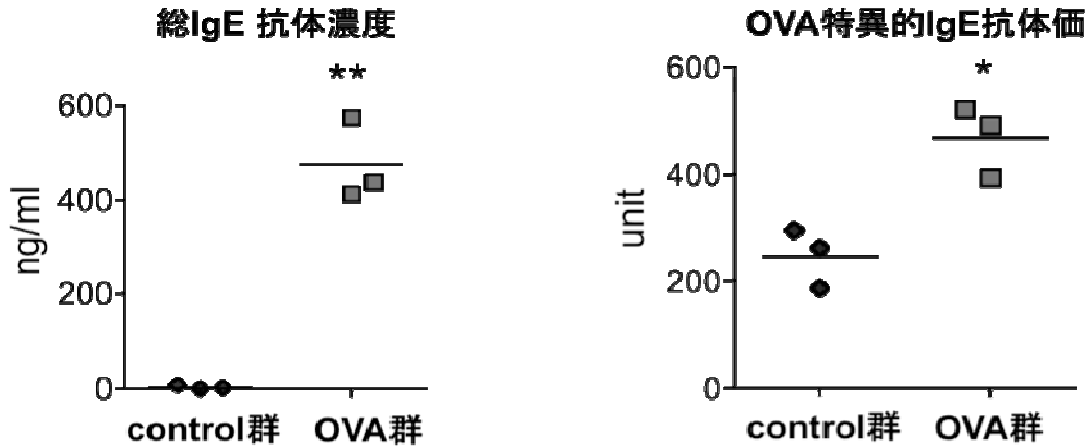


図6 常時振動および騒音が認められる飼育装置におけるD011.10マウスのOVA水投与後の血清中総IgE抗体濃度およびOVA特異的IgE抗体価

実験終了時に、血清を採取し、ELISA法を用いて総IgE抗体濃度、OVA特異的IgE抗体価を測定した。各群n = 3。

** ; Student-t 検定により危険率1%で異符号間に有意差あり
 * ; Student-t 検定により危険率5%で異符号間に有意差あり

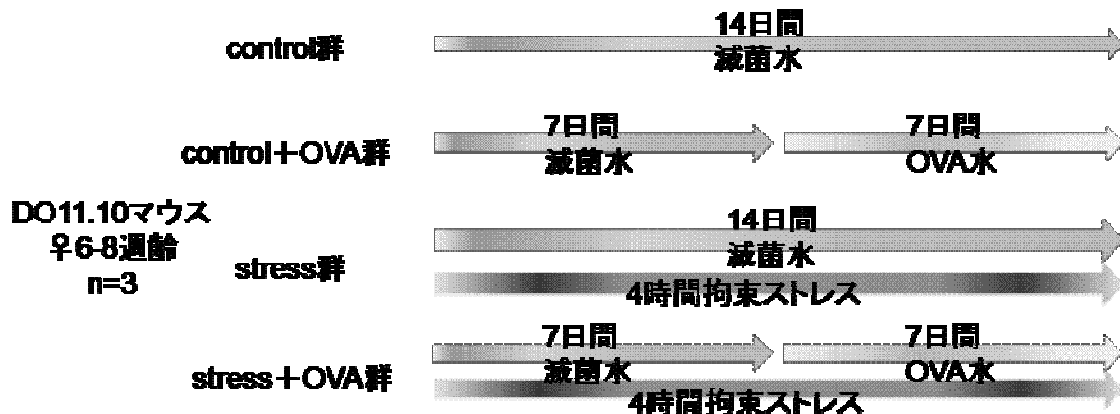


図7 D011.10マウスに対する拘束ストレス負荷およびOVA水投与実験のスケジュール

D011.10マウスを毎日4時間の拘束ストレスを与える群と、拘束ストレスを与えない対照群に分けて7日間飼育した。その後、それぞれの群をOVA水投与群と滅菌水投与群に分け、control群、control+OVA群、stress群、stress+OVA群の4群とし、さらに7日間飼育した。実験期間中、毎日、体重と摂食量を調べた。実験終了時には血液を採取した。各群n = 3。

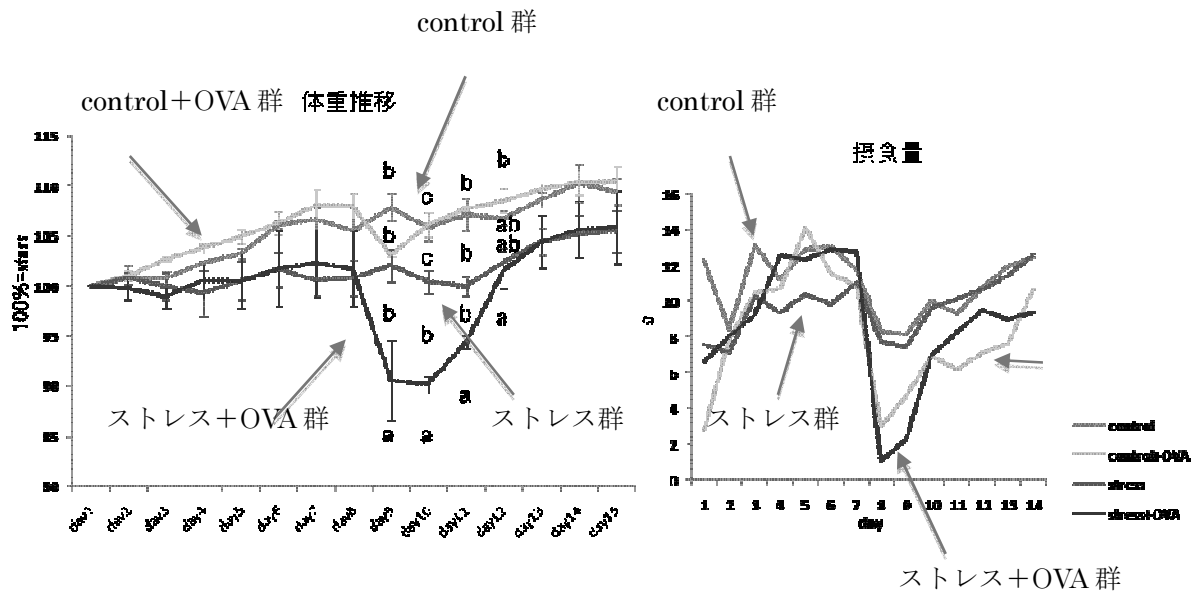


図8 拘束ストレス負荷およびOVA投与時のD011.10マウスの体重推移と摂食量

図7に示したスケジュール通りに実験を行った。実験期間中、毎日、体重および摂食量を調べた。体重は、実験開始日の体重を100%とした相対値で示した。a, b, c; Tukey検定により危険率5%で異符号間に有意差あり。各群n = 3。

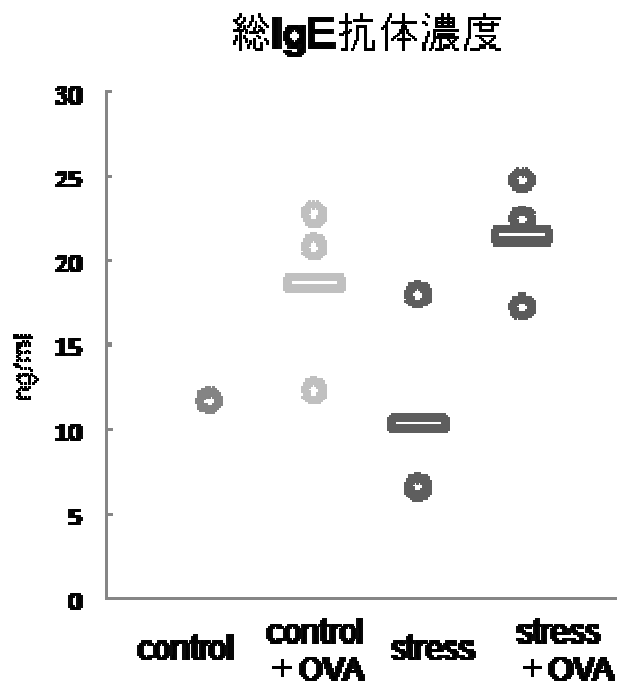


図9 拘束ストレス負荷およびOVA投与時のD011.10マウスの血清中総IgE抗体濃度

図7に示したスケジュール通りに実験を行った。実験終了時に、採血を行い、血清中総IgE抗体濃度をELISA法により測定した。丸はマウスの個体を示し、バーは平均値を示す。各群n = 3。

4. 考察

ストレスが自律神経系や内分泌系に変化をもたらし、相関する免疫系の変動も導くことが知られている。臨床的にも潰瘍性大腸炎や過敏性腸症候群などの腸疾患、アトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギー疾患の発症・増悪にストレスが関与する可能性は広く知られている。ストレスが誘導し、免疫応答が関与するアレルギー性の腸炎症モデルを確立することはこれらの疾患の解析に有用である。特に本研究では発症・増悪を抑制、予防する食品成分の探索に用いるモデルの構築を目指した。

通常の飼育環境で維持されたOVA特異的T細胞受容体の遺伝子導入マウス (D011.10) では、OVAを経口摂取しても体重の減少や糞便の異常は認められない。しかし、本実験より、常時振動や騒音などのストレスが負荷される飼育環境で7日間順化させたD011.10マウスは、20%OVA含有水を自由摂取すると極度の体重減少を伴った腸炎症状を起こすことが認められた。さらに、このときアレルギー反応の指標として知られているIgE抗体量が有意に増加した。すなわちD011.10マウスではストレス負荷とOVA摂取が同時に起こることで免疫学的機序を伴う腸炎症が起こることが示唆された。

また、4時間の拘束ストレスでストレスの指標として知られているコルチコステロン量やノルエピネフリンが上昇しIgA抗体量が減少することが報告されている (A. Jarillo-Luna *et al.*, *Psychoneuroendocrinology*. 2007, 32(6):681-92) ことから、この拘束ストレスが十分にストレスを負荷できる実験系とみなし、飼育環境のストレスに引きつづき検討を行った。その結果、拘束ストレス下でOVAを摂取した群はOVA摂取のみの群や拘束ストレス負荷の群と比較して顕著な体重減少がみられ、IgE抗体量の上昇傾向が認められた。したがって、常時振動や騒音などのストレスが負荷される飼育環境で認められたOVA投与による変化は、少なくとも体重減少はストレスの影響により起こっていることが示唆された。予備的な実験で過密ストレスを加えた場合にも同様の体重減少がみられており、現在、各種のストレス負荷試験を行い、より免疫学的機序を伴う変化が認められるモデルを検討中である。

本年度の検討では、ストレス負荷条件下でOVAを投与したD011.10マウスで生じる体重減少、IgE産生増加、腸管での炎症に対する乳酸菌投与の効果を調べるには至らなかったが、予備的な検討ではプロバイオティック乳酸菌の生菌体を経口投与すると、その腸炎症状が顕著に抑制されることを観察しており、今回検討したストレス誘導性のアレルギー性腸炎モデルにおける効果を解析していきたい。