ラットの抗体産生能および酸化ストレス指標に及ぼす運動強度の影響

大倉(加来)志保子, 桐野智美, 氏 昌未, 田嶋千恵, 岡田美津子
(熊本県立大学環境共生学部)

平成 16 年 10 月 18 日受理

*Effect of Different Exercise Intensity on Immunoglobulin Productivity
and Oxidative Stress Index of Wistar Rats*

Shihoko KAKU-OHKURA, Tomomi KIRINO, Masami UJI, Chie TAJIMA, Mitsuko OKADA

*Prefectural University of Kumamoto, Faculty of Environmental &
Symbiotic Sciences, Tsukide, Kumamoto, Kumamoto 862-8502, Japan*

Immune function is influenced by many exercise conditions, for example, exercise intensity and frequency. In this study, we compared exercise rats that trained for two weeks then exercised exhaustively, with sedentary rats that exercised suddenly and exhaustively on immunoglobulin (Ig) productivity. As a result, in exercised groups, IgA production of mesenteric lymph node (MLN) lymphocytes significantly increased. In the sedentary and exercised groups, Ig production of MLN lymphocytes was tended to decrease by exhaustive exercise. But, in the exercised group, Ig production were maintained higher concentrations than that of the sedentary group. Therefore, we expected that antioxidative ability of rat be enhanced by exercise, and increase Ig production. However, in the exercised groups, lipid peroxide concentration of lymphocyte in culture supernatant was higher value than that of the sedentary groups, and glutathione peroxidase activity in blood was significantly decreased by exhaustive exercise. Thus, training exercise increase Ig productivity and suppress the damage in gut immune system. However, that mechanism may be not related to increase of antioxidative function. On the other hand, oxidative stress by exhaustive exercise may relate to the suppression of Ig productivity. Therefore, it is suggested that the reinforcement and suppression of Ig productivity by exercise are controlled by different mechanism, respectively.

(Received October 18, 2004)

Key words: Training exercise; Exhaustive exercise; Gut immune system; IgA production; Oxidative stress

緒言

運動は免疫機能を調節する^(1~4)。激しい運動は、アスリートの上気道感染の罹患率を増大させる⁽⁵⁾ことが知られているが、これは好中球やリンパ球の減少および増殖応答の低下を通じた免疫力の低下が関与すると考えられている^(4, 6~8)。しかし、適度な運動はインターフェロン- γ 産生能の上昇⁽⁹⁾、マクロファージの細胞溶解性の増大⁽³⁾など、疾病に対する防御効果を持つと言われている。

激しい運動の後、だ液中のイムノグロブリン A (IgA) レベルが減少するという報告は多い^(10, 11)。分泌型 IgA は、粘液中に含まれる免疫グロブリンであり、多くの病原性微生物を粘膜上で排除、中和、除去することにより、

宿主の感染に対する消化管局所免疫において重要な役割を担う。また、イムノグロブリン G (IgG) は血清中に最も多く含まれる免疫グロブリンで、呼吸器や女性器の感染防御に関与する。

一方、運動選手並みの強度の運動による酸化ストレスも、酸素フリーラジカル形成を促進することでリンパ球のダメージに関与することが報告されている⁽¹²⁾。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) などの抗酸化酵素はこのような酸化ダメージを防御する^(13, 14)。

運動が免疫機能に及ぼす影響については、運動の強度、期間、頻度などの条件に応じて変化することが知られている^(10, 15)。しかし、運動トレーニングが急激な疲労困憊運動による免疫機能の低下に対してどのような効果を示すかを検討した研究はほとんどない。

本研究では、Wistar ラットを運動トレーニング群と

略号の解説: Ig, イムノグロブリン; SOD, スーパーオキシドジスムターゼ; GPx, グルタチオンペルオキシダーゼ; MLN, 腸間膜リンパ節

安静群に分け、運動トレーニングを継続的に行った後に、疲労困憊運動を負荷した群と、全く運動せずに疲労困憊運動を負荷した群のリンパ組織の抗体産生能がどのように変化するかを検討した。また、運動時の酸化ダメージおよび体内抗酸化酵素の関連についても考察した。

実験方法

1. 実験動物

実験には4週齢のWistar系雄ラット（セアック吉富）を、固形飼料MF（オリエンタル酵母製）にて飼育した。4日間の予備飼育後、1群10匹ずつに分け、それぞれ運動を負荷したのちに実験に供した。実験群は安静対照（Sc）群、安静+疲労困憊（Se）群、運動対照（Ec）群、運動+疲労困憊（Ee）群の4群とした。飼育は室温23℃、明暗が12時間サイクル（明8:00～20:00）に制御された動物室で個別ケージにて行った。飼料および水は自由摂取とした。と殺前夜は絶食とし、翌日エーテル麻酔下で断頭と殺した。ただちに血液、肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓および睾丸周辺脂肪を採取し、重量を測定した。また、脾臓および腸間膜リンパ節（MLN）を採取してリンパ球を分離した。血液を遠心分離後、得られた上清を血漿、沈澱を血球として、実験に供するまで-80℃で凍結保存した。

なお、本研究は「実験動物の飼育および保管等に関する基準」（昭和55年3月総理府告示第6号）を遵守して行われた。

2. 運動方法

運動にはトレッドミル（Columbus Instruments社製）を使用した。運動群（Ec群およびEe群）は10日間にわたり徐々に運動に慣れさせ、最終的に18 m/min、60分間のトレッドミル運動を2週間実施した。疲労困憊群（Se群およびEe群）には、と殺前日に急性運動を負荷し、疲労困憊するまで走らせた（Se群は10～25 m/minで18～61分、Ee群は18～40 m/minで70～125分）（表1）。

3. 酵素抗体法による抗体濃度の定量

Lim *et al.* の方法で脾臓およびMLNからリンパ球を分離し、24時間培養した後、培養上清中の抗体濃度を酵素抗体法により測定した⁽¹⁶⁾。

表1 ■ ラットの体重変化

	体重 (g)		体重増加量 (g)	疲労困憊運動総時間(分)
	開始時	終了時		
Sc	113±2	300±8	187±6 ^a	33.0±13.8
Se	113±2	298±7	186±6 ^{ab}	
Ec	113±2	286±4	174±3 ^{ab}	
Ee	112±2	279±6	166±4 ^b	99.8±18.9

数値は平均値±標準誤差で示した（*n*=10）。a, b 異なる文字間に有意差あり（*p*<0.05）

4. 過酸化脂質濃度の測定

血漿、血球、脾臓リンパ球およびMLNリンパ球培養上清中の過酸化脂質濃度は、過酸化脂質テストワコー（和光純薬工業）のキットを用いて測定した。

5. SOD活性およびGPx活性の測定

血球中のSOD活性および全血中のGPx活性は、それぞれSOD-525（OXIS Health Products社製）およびRS505（RANDOX社製）のテストキットを用いて測定した。

6. 統計処理

本実験のデータは平均値±標準誤差で示した。各群間の比較にはSheffeのpost hoc testを用いて検定を行い、危険率5%未満を有意差ありとした。

実験結果

1. ラットの育成と組織重量

摂食終了後の体重は、4群間で差は認められなかったが、体重増加量は、運動群で低くなる傾向が認められ、Ee群ではSc群に対して有意に低い値を示した（表1）。また、臓器重量においては、腎臓および心臓重量はいずれもEe群で最低値を示した。睾丸周辺脂肪は、運動群で低下傾向を示し、Ee群ではSc群よりも有意に低い値となった。肝臓、肺および脾臓重量に差は認められなかった（表2）。

2. リンパ球の抗体産生量

表3に血漿中の抗体レベルおよび脾臓リンパ球、MLNリンパ球の抗体産生能について示した。血漿中の抗体レベルはIgA、IgG共に各群間に有意差は認められなかった。脾臓リンパ球の抗体産生量は、IgA、IgG共にSc群で最も高い値を示し、何らかの形で運動を行った群では低下する傾向が認められた。MLNリンパ球の抗体産生量は脾臓リンパ球と異なり、IgA値は運動群で増

表 2 ■ ラットの臓器重量

	肝臓	腎臓	心臓 (g/100 g 体重)	肺 (g/100 g 体重)	脾臓	睪丸周辺脂肪
Sc	3.15±0.05	0.80±0.01 ^{ab}	0.29±0.01 ^{ab}	0.52±0.03	0.30±0.01	1.51±0.03 ^a
Se	3.27±0.06	0.81±0.02 ^{ab}	0.28±0.01 ^{ab}	0.49±0.03	0.27±0.01	1.39±0.07 ^{ab}
Ec	3.21±0.06	0.86±0.01 ^a	0.30±0.00 ^a	0.54±0.03	0.31±0.01	1.38±0.05 ^{ab}
Ee	3.14±0.08	0.79±0.01 ^b	0.26±0.02 ^b	0.51±0.04	0.28±0.01	1.23±0.03 ^b

数値は平均値±標準誤差で示した (n=10). a, b 異なる文字間に有意差あり (p<0.05)

表 3 ■ 運動強度の違いがラットの血漿抗体価, 脾臓および MLN リンパ球の抗体産生量に及ぼす影響

	血漿		脾臓リンパ球		MLN リンパ球	
	IgA (μg/ml)	IgG (mg/ml)	IgA (ng/ml)	IgG (ng/ml)	IgA (ng/ml)	IgG (ng/ml)
Sc	19.6±2.2	0.75±0.12	8.10±0.21 ^a	13.2±2.6 ^a	33.3±1.4 ^a	21.5±2.3 ^{ab}
Se	16.8±2.4	0.76±0.09	5.14±0.18 ^b	8.3±0.5 ^{ab}	28.3±0.9 ^a	17.1±1.5 ^a
Ec	19.2±2.0	0.62±0.05	5.97±0.10 ^c	7.3±0.5 ^b	71.5±2.6 ^b	26.5±1.5 ^b
Ee	18.2±1.5	0.64±0.06	7.31±0.13 ^d	11.4±0.6 ^{ab}	54.9±2.2 ^c	21.6±1.1 ^{ab}

数値は平均値±標準誤差で示した (n=10). a, b 異なる文字間に有意差あり (p<0.05)

表 4 ■ 運動強度の違いがラットの血漿, 血球, 脾臓リンパ球および MLN リンパ球の過酸化脂質濃度に及ぼす影響

	血漿 (nmol/ml)	血球 (nmol/g ヘモグロビン)	脾臓リンパ球 (nmol/dl)	MLN リンパ球 (nmol/dl)
Sc	2.72±0.26 ^a	22.6±1.1 ^a	12.2±0.1	11.1±0.5 ^a
Se	2.60±0.17 ^{ab}	24.5±1.1 ^a	11.2±0.6	10.7±0.2 ^a
Ec	3.08±0.26 ^a	26.1±0.4 ^{ab}	13.0±0.4	13.5±0.6 ^b
Ee	1.84±0.10 ^b	29.1±0.9 ^b	12.1±0.8	12.6±0.3 ^{ab}

数値は平均値±標準誤差で示した (n=10). a, b 異なる文字間に有意差あり (p<0.05)

表 5 ■ 運動強度の違いがラットの血球中の SOD 活性および血中の GPx 活性に及ぼす影響

	血球中の SOD 活性 (U/g ヘモグロビン)	血中の GPx 活性 (U/g ヘモグロビン)
Sc	9.97±0.66	370±31 ^a
Se	9.69±0.67	220±15 ^b
Ec	8.24±0.68	351±25 ^a
Ee	9.79±0.49	230±26 ^b

数値は平均値±標準誤差で示した (n=10). a, b 異なる文字間に有意差あり (p<0.05)

加した。また、安静群および運動群のいずれにおいても疲労困憊させることにより、抗体産生量は減少傾向を示したが、Ee 群は Sc 群よりも高い値を維持した。MLN リンパ球の IgG 産生量も弱いながらも IgA と同様に運動群で増加傾向、疲労困憊運動による低下傾向を示した。

3. 過酸化脂質濃度

表 4 に血漿, 血球, 脾臓リンパ球および MLN リンパ球の過酸化脂質濃度を示した。血漿では Ee 群で最低値を示した。血球では運動群で高値を示す傾向があり、Ee 群で安静群と比較して有意に高い値を示した。脾臓および MLN リンパ球では運動群で高い値を示す傾向が認められた。

4. SOD 活性および GPx 活性

表 5 に、血球中の SOD 活性と血液中の GPx 活性を示した。SOD 活性は、各群間に有意差は認められなかったが、GPx 活性は、安静群、運動群共に疲労困憊させることにより有意に低下した。

考察

運動が免疫機能を調節するかどうかについては多くの研究が行われており^(1~4)、中程度の運動により免疫機能

の増強が誘導され、疾病に対する防御効果を持つと言われている^(3,9)。一方、激しい運動はリンパ球の減少や増殖応答の低下を通して免疫力の低下をもたらす^(4,6~8)。

しかし、運動トレーニングが疲労困憊運動による免疫機能の低下に対して及ぼす影響について検討した研究は少ない。そこで我々は、ラットの脾臓リンパ球およびMLNリンパ球の抗体産生能に及ぼす運動トレーニングおよび急性運動の影響について検討した。

分泌型IgAは粘液中に多く含まれる免疫グロブリンである。多くの病原性微生物に対する局所的な初期防御に関与し、病原体の侵入や複製を阻害し、ウイルスや毒素を中和することができる。また、局所的に産生されるIgGは、気道や女性器の感染防御で重要な抗体である。

多くの研究では、トライアスロンなどの激しい運動の後、分泌型IgAレベルが減少すると報告している^(9~11)。一方、適度な運動がリンパ球の抗体産生能に及ぼす影響については良く分かっていない⁽¹⁷⁾。本研究では、脾臓リンパ球の抗体産生量はIgAおよびIgG濃度が共にSc群で最も高い値を示したのに対し、MLNリンパ球では、IgA値がトレーニング群で有意に上昇し、疲労困憊させることで低下した。IgG値も同様の傾向を示した。このことから、継続的なトレーニングによりMLNリンパ球の抗体産生能が上昇し、腸管免疫系が増強されたと考えられる。また、Ee群がSe群よりも高い値を示したことは、継続した運動トレーニングが、急激な運動による抗体産生能の低下を抑制し、腸管免疫系の機能を維持する可能性を示した。

抗酸化酵素は酸化ダメージの防御にあたって重要な役割を演じる。例えばGPxは、過酸化水素や脂質ペルオキシドを還元する酵素であり、SODはスーパーオキシドアニオンラジカルの不均化反応を触媒する。また、運動と抗酸化酵素活性の間には密接な相関があり^(12~14)、急激な運動はリンパ組織の酸化ダメージを誘導し、それがリンパ球の損傷に関与する⁽¹²⁾。一方、中程度の運動によりラットの脾臓細胞の抗酸化酵素活性が上昇し、脂質過酸化が減少したという報告もある^(18,19)。

我々は、運動群におけるMLNリンパ球の抗体産生量の増加は、体内抗酸化能の上昇と関連しているのではないかと考え、リンパ球の脂質過酸化濃度、血中の抗酸化酵素であるSOD活性およびGPx活性を測定した。しかしながら、脾臓およびMLNリンパ球の脂質過酸化濃度は、運動群で高値を示し、さらにSOD活性およびGPx活性の上昇は認められなかった。このことにより、運動トレーニングは腸管免疫系を増強し、疲労困憊運動による腸管免疫系へのダメージを抑制するが、その作用は、

体内抗酸化能の増強以外のメカニズムによる可能性が示された。一方、疲労困憊運動により、GPx活性は有意に低下し、同時にMLNリンパ球の抗体産生能も低下傾向を示していることから、運動トレーニングによるMLNリンパ球の抗体産生能増強の場合とは逆に、生体内抗酸化能低下と抗体産生能低下の間には相関があるかもしれない。

運動が免疫機能に及ぼす影響については、いまだ不明な点が多い。病原体と宿主の防御メカニズムは複雑に絡み合っており、運動による免疫強化が起こるかどうかは、運動の強度、期間および頻度によっても変化する^(10,15)。以上のことから、本研究より、運動による抗体産生能の増強と抑制は、それぞれ異なる機構で制御されていると考えられる。

要約

運動は強度、頻度などの様々な条件により、免疫機能に異なる影響を及ぼす。本研究では、ラットを運動トレーニング群と安静群に分け、2週間にわたってトレーニングを継続的に行った後に疲労困憊運動を負荷した群と、全く運動せずに疲労困憊運動を負荷した群の、リンパ組織の抗体産生能の変化について検討した。その結果、腸間膜リンパ節リンパ球のIgA産生量は、運動トレーニング群で増加した。また、安静群および運動トレーニング群のいずれにおいても、腸間膜リンパ節リンパ球のIgA産生量は疲労困憊運動により減少傾向を示したが、運動トレーニング群では安静群よりも高い値を維持した。IgG値も同様の傾向を示した。しかし、リンパ球の培養上清中の過酸化脂質濃度は運動群で高い値を示すとともに、血中のグルタチオンペルオキシダーゼ活性は疲労困憊運動で有意に低下した。従って、運動トレーニングは腸間膜リンパ節リンパ球の抗体産生を促進し、疲労困憊運動による腸管免疫系へのダメージを抑制するが、その作用機構は体内抗酸化能の増強以外のメカニズムによる可能性が示された。一方、疲労困憊運動による抗体産生能の低下には、酸化ストレスが関与している可能性があることから、運動による抗体産生能の増強と抑制は異なる機構で制御されていると考えられる。

文献

- 1) R. L. Gregory, J. P. Wallace, L. E. Gfell, J. Marks & B. A. King: *Med. Sci. Sports Exerc.*, **29**, 1596 (1997).
- 2) H. G. Fehr, H. Lotzerich & H. Michna: *Int. J. Sports Med.*, **9**, 77 (1988).
- 3) Q. Lu, M. A. Ceddia, E. A. Price, S-M. Ye & J. A. Woods: *Am. J. Physical Regulatory Integrative Comp. Physiol.*,

- 276, R482 (1999).
- 4) L. T. MacKinnon : *Sports Med.*, **7**, 141 (1989).
 - 5) D. C. Niemann : *Int. J. Sports Med.*, **18**, 91 (1997).
 - 6) B. K. Pedersen, H. Bruunsgaard, M. Jensen, K. Krzykowski & K. Ostrowski : *Proc. Nutr. Soc.*, **58**, 733 (1999).
 - 7) J. G. Cannon : *J. Appl. Physiol.*, **74**, 973 (1993).
 - 8) D. C. Nieman : *Med. Sci. Sports Exerc.*, **26**, 128 (1994).
 - 9) O. Mueller, B. Villiger, B. O. Callaghan & H. U. Simon : *Int. J. Sports Med.*, **22**, 52 (2001).
 - 10) P. A. Streerenberg, I. A. van Asperen, A. van Nieuw Amwongen, J. Biewenga, D. Mol & G. J. Medema : *Eur. J. Oral Sci.*, **105**, 305 (1997).
 - 11) M. M. Fahlman, H. J. Engels, A. L. Morgan & I. Kolkouri : *Int. J. Sports Med.*, **2**, 127 (2001).
 - 12) A. A. Azenabor & L. Hoffman-Goetz : *J. Appl. Physiol.*, **86**, 1823 (1999).
 - 13) C. P. Reddy Avula, A. R. Muthukumar, K. Zaman, R. McCarter & G. Fernandes : *J. Appl. Physiol.*, **91**, 2546 (2001).
 - 14) S. Selamoglu, F. Turgay, B. M. Kayatekin, S. Gönenc & C. Yslegen : *Acta Physiol. Hung.*, **87**, 267 (2000).
 - 15) H. Sugiura, H. Sugiura, H. Nishida, R. Inaba, S. M. Mirbod & H. Iwata : *J. Appl. Physiol.*, **90**, 789 (2001).
 - 16) B. O. Lim, K. Yamada & M. Sugano : *In Vitro Cell Develop. Biol.*, **30**, 407 (1994).
 - 17) J. B. Mitchell, A. J. Paquet, F. X. Pizsa, R. D. Starling, R. W. Holtz & P. W. Grandjean : *Int. J. Sports Med.*, **17**, 384 (1996).
 - 18) C. P. Avula & G. Fernandes : *J. Clin. Immunol.*, **19**, 35 (1999).
 - 19) C. P. Reddy Avula & G. Fernandes : *Aging (Milano)*, **11**, 246 (1999).

化学と生物

Vol. 43, No. 2 (495号)

2005年2月1日発行(月刊)

定価 1,260円(本体 1,200円)

編集 ● 社団法人 日本農芸化学会
発行

113-0032 東京都文京区弥生 2-4-16
学会センタービル内
<http://www.jsbba.or.jp/>

刊行 ● 株式会社 学会出版センター

印刷 ● 株式会社 国際文献印刷社

装幀 ● 石原雅彦

■和文誌編集委員会

委員長

太田 明德 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

委員

<企画担当委員>

饗場 浩文 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

穴澤 秀治 (協和発酵工業(株)東京研究所)

飯尾 雅嘉 (九州大学大学院農学研究科)

井上 正 (日本大学生物資源科学部)

大森 謙司 (田辺製薬(株)探索研究所)

梶原 将 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)

工藤 俊章 (理化学研究所)

小林 幹彦 (独立行政法人 農業生物資源研究所)

駒井三千夫 (東北大学大学院農学研究科)

杉本 慎一 (味の素(株)発酵技術研究所)

妹尾 啓史 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

高野 俊明 (カルビス(株)基礎研究フロンティア
ラボラトリー)

高橋 砂織 (秋田県総合食品研究所)

高橋 英樹 (東北大学大学院農学研究科)

田中 有司 (独立行政法人 農業技術研究機構 中央農業
総合研究センター 北陸研究センター)

谷田 清一 (武田薬品工業(株)医薬研究本部)

長澤 寛道 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

西森 克彦 (東北大学大学院農学研究科)

野島 博 (大阪大学微生物病研究所)

廣瀬 正明 (京都大学大学院農学研究科)

福岡英一郎 (大阪大学大学院工学研究科)

福士 幸治 (北海道大学大学院農学研究科)

藤田泰太郎 (福山大学生命工学部)

牧野 周 (東北大学大学院農学研究科)

松井 博和 (北海道大学大学院農学研究科)

松田 幹 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

松田 一寛 (東北大学大学院農学研究科)

村田 幸作 (京都大学大学院農学研究科)

渡部 終五 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

<原著論文審査担当委員>

久保田紀久枝 (お茶の水女子大学生生活科学部)

坂神 洋次 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

杉山 公男 (静岡大学農学部)

須山 享三 (尚絅学院大学)

森川 康 (長岡技術科学大学工学部)

依田 幸司 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

<編集幹事>

掛谷 秀昭 (理化学研究所中央研究所)

喜田 聡 (東京農業大学応用生物科学部)

熊谷 仁 (共立女子大学家政学部)

近藤 恵二 (キリンビール(株)研究開発部)

須貝 威 (慶應義塾大学理工学部)

鈴木 義人 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

田中 寛 (東京大学分子細胞生物学研究所)

戸塚 護 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

中島 春紫 (明治大学農学部)

堀内 裕之 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

三原 康博 (味の素(株)発酵技術研究所)

<和文誌編集理事>

井上 國世 (京都大学大学院農学研究科)

土屋 英子 (広島大学大学院先端物質科学研究科)