

運動に伴う消化器・免疫病態の解析と 予防飲料水の開発

大阪市立大学 井上正康
(共同研究者) 同 佐藤英介
同 朴雅美

Modulation of Gastrointestinal Mucosal Immunity by Exercise and Its Regulation by Energy Metabolism

by

Masayasu Inoue, Eisuke F Sato, Ah-Mee Park
Osaka City University Medical School

ABSTRACT

Although functional disorders of GI tract including abdominal pain, diarrhea and hemorrhagic stool occur after strenuous exercise, their mechanisms remain unclear. We examined the effect of strenuous exercise on intestinal mucosal immunity. Male C57BL/6j mice were given treadmill exercise (8~28 m/min, 100 min) and plasma levels of cortisol and TGF- β were analyzed. We found that plasma cortisol rapidly increased and maintained its high levels (~12 hr) while TGF- β increased 6 hr after the exercise. Mucosal IgA in the small intestine and colon increased markedly after the exercise. Furthermore, apoptotic cells were found to increase in the colon but not in the small intestine. These results suggest that strenuous exercise causes enhanced immune reactions in intestinal mucosa thereby induces apoptosis of colonic cells. These changes in mucosal immunity may underlie the functional disorders of the GI tract after strenuous exercise.

要 旨

激しい運動後には、腹痛、下痢、血便などの消化器病態が誘起されることが多いが、そのメカニズムは不明である。本研究では、過剰な運動負荷によって起こる腸管免疫系の変化と血中コルチゾールと TGF- β の濃度変化を経時的に解析した。マウスを正常群と運動負荷群に分け、運動群にはトレッドミルにて高強度のランニング運動を負荷した。疲労運動負荷後では抗炎症作用を有するコルチゾールや TGF- β の血中濃度が増加した。また、腸管免疫の中心的役割を担う IgA 抗体が、小腸や大腸粘膜組織内に著明に増加した。大腸粘膜では負荷6時間後に細胞死が有意に増加したが、他の部位では変化が見られなかった。過剰な運動により腸管粘膜の免疫反応が著しく亢進し、大腸で細胞死を誘起し、種々の腸管病態が生じることが示唆された。

緒 言

トライアスロンやフルマラソンなどの激しい運動後には、上気道の感染率増加、腹痛、下痢、血便など、様々な消化管病態が誘起される^{1,2)}。これまでに、運動後の上気道での細菌やウイルスに対する易感染性に関しては疫学調査をはじめとする多くの報告があり^{3,4)}、運動負荷動物でも肺胞マクロファージの機能低下などが報告されている⁵⁻⁷⁾。一方、消化管症状に関しては疫学調査が主体であり、その詳細な分子機構は不明である。高強度の運動中には筋肉血流が著しく増加し、消化管では低下する^{8,9)}。消化管でのこのような血流の一過性低下やエネルギー代謝変化が機能病態を誘起する一因と考えられる。また、運動後にはグラム陰性細菌由来リポ多糖の血中濃度が増加することから、腸管粘膜のバリアーが破壊されて細菌が侵入しやすくなっていると考えられる。

精神のおよび肉体的ストレスや疲労は視床下

部・下垂体・副腎軸を活性化し、コルチゾールをはじめとする多様な分子が産生増加される¹⁰⁾。最近、疲労時に脳内や血中で TGF- β が増加することも報告されており¹¹⁾、これらの分子の関与する免疫病態が運動の重要な影響因子となりうる。

本研究は、運動に伴う消化器免疫病態の実体を解明し、それを改善する運動支援飲料水を開発することを目的とする。

1. 実験方法

1. 1 実験動物と運動負荷

実験には10週齢の雄 c57BL/6j マウスにトレッドミルによる運動（登り傾斜10°，速度8 m/分から開始し、10分毎に2 m/分加速）を約100分間負荷した。

1. 2 血管透過性の解析

運動負荷直後にエバンスブルー（50 mg/kg body weight）を尾静脈内投与し、15分後に腸管各部位の色素透過性変化を解析した。

1. 3 凍結切片の作成

コントロール群および運動負荷した直後、3, 6 および12時間後（5群各5匹）にエーテル麻酔下にて全採血し、腸管を各部位に分けパラホルムアルデヒド固定し、凍結切片を作製した。

1. 4 血漿中コルチゾール、TGF- β の測定

血液を2500 rpm, 5分間遠心し、血漿を採取した。コルチゾールは蛍光法により¹²⁾、TGF- β はキット（R&D systems 社）を用いて測定した。

1. 5 免疫組織学的解析

消化管各部位の切片を用い、アポトーシスを Insitu Apoptosis Detection Kit（Takara 社）にて解析した。

腸管での IgA 発現は抗マウス IgA モノクローナ

ル抗体にて解析した。

2. 結果

2.1 血管透過性の解析

腸管の血管透過性は運動後、胃を除く全ての部位で増加したが、とくに十二指腸で強かった(表1)。

表1 Effect of strenuous exercise on vascular permeability in GI tract

stomach	duodenum	jejunum	ileum	cecum	colon
1.04	2.09	1.45	1.15	1.52	1.47

Values are ration vs control

2.2 血漿中コルチゾールと TGF-β

コルチゾールと TGF-β はいずれも運動直後に一過性に増加した。コルチゾールはその後12時間で、TGF-β は6時間後に最大に達した(図1)。

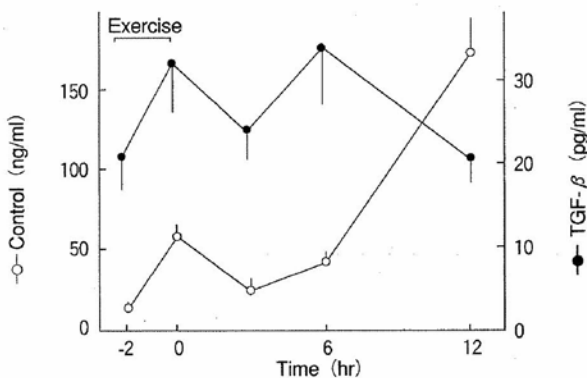


図1 Serum levels of cortisol and TGF-β

2.3 腸管の細胞死

大腸における TUNEL 染色像を図2に示した。大腸では運動6時間後に有意に増加したが、12時間後にはコントロールレベルに戻った。しかし、腸管の他の部位では変化が認められなかった(図2下)。

2.4 腸管での IgA 発現

空腸、回腸、大腸における IgA の発現動態を解析した結果、空腸(図3左)では約3時間後から増加して12時間まで高い発現が見られた。回腸

も空腸と類似の発現変化を示した (data not shown)。一方、大腸では6時間後に著明な増加が見られ、12時間後にはやや減少した。

3. 考察

本研究では、強度の運動負荷が消化管粘膜免疫系に及ぼす影響を解析した。解析の結果、運動負荷により消化管粘膜の血管透過性が亢進することが判明した。血管透過性亢進に関しては、ロイコトリエン、肥満細胞由来のヒスタミン、およびT細胞由来の血管透過性因子などの関与が知られているので、運動負荷後には免疫担当細胞が活性化されている可能性が示唆された。

最近、TGF-β は疲労時に脳内や血中で増加するサイトカインとして注目されている¹¹⁾。本実験において、運動負荷前後でその血中濃度を測定した結果、2相性に増加することが判明した。TGF-β は様々な細胞から産生され、炎症反応や免疫反応を終了させるサイトカインと考えられている。運動負荷によって増加したTGF-β は、惹起される過剰な炎症や免疫反応を抑える目的で産生された可能性が考えられる。

グルココルチコイドの一種で副腎皮質から分泌されるコルチゾールは、とくにストレス負荷や疲労時に産生分泌されることが知られている^{10, 13)}。その生理作用は糖新生促進をはじめ、非常に多様であり、医療分野では抗炎症、抗アレルギー薬として多用されている。運動負荷による炎症反応などを抑えるために本成分が長時間作用していると考えられる。一方、グルココルチコイド作用を示すデキサメタゾン Maus に投与すると腸管の透過性や Bacterial translocation が亢進することから^{14, 15)}、本研究で見られたコルチゾールの増加は腸管での細菌侵入に影響を与える可能性も考えられる。

腸管は食物と共に摂取された細菌の侵入を抑制するために厚い粘液層で覆われており、多くの免

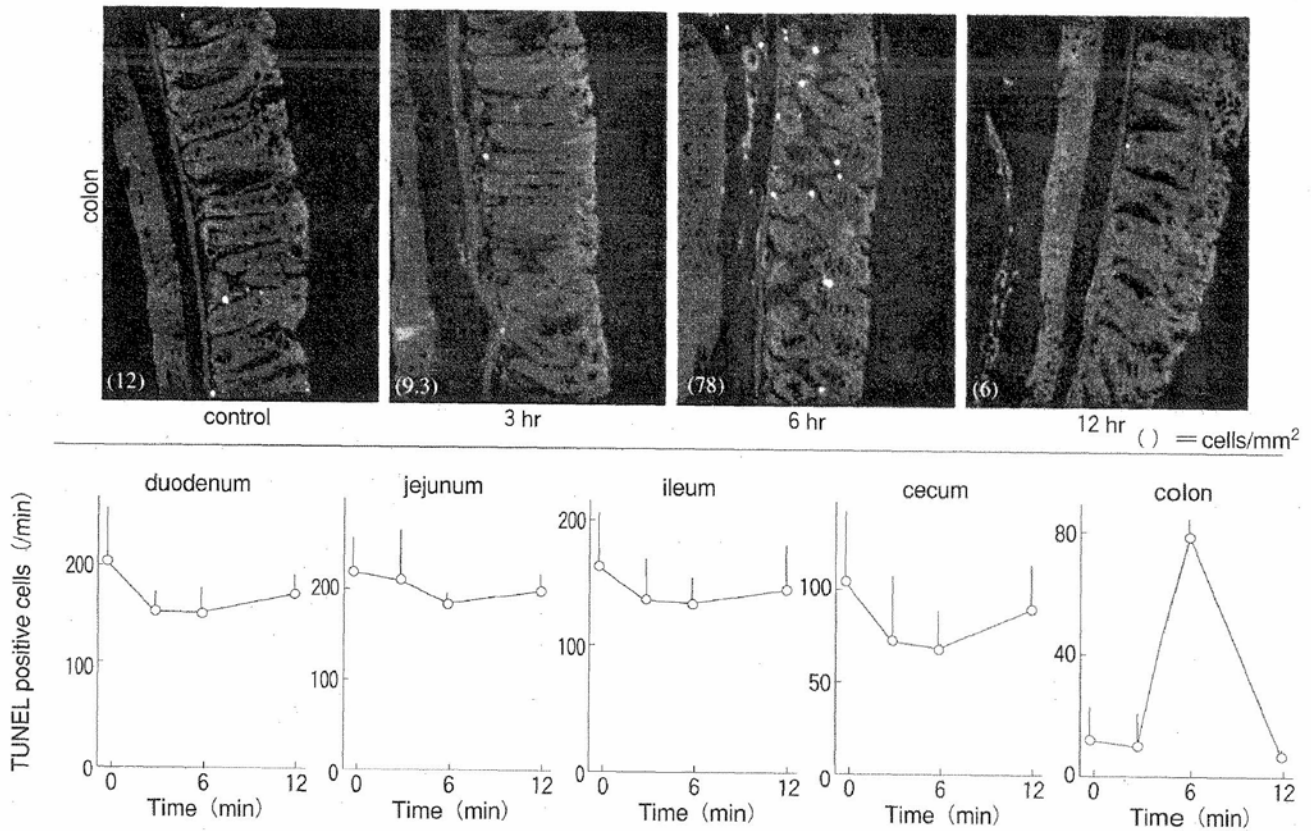


図2 Immunohistochemical detection of TUNEL positive cells in the GI tract. Pictures (upper) show time course changes in the colon and graphs (bottom) show changes of TUNEL positive cells in the GI tract.

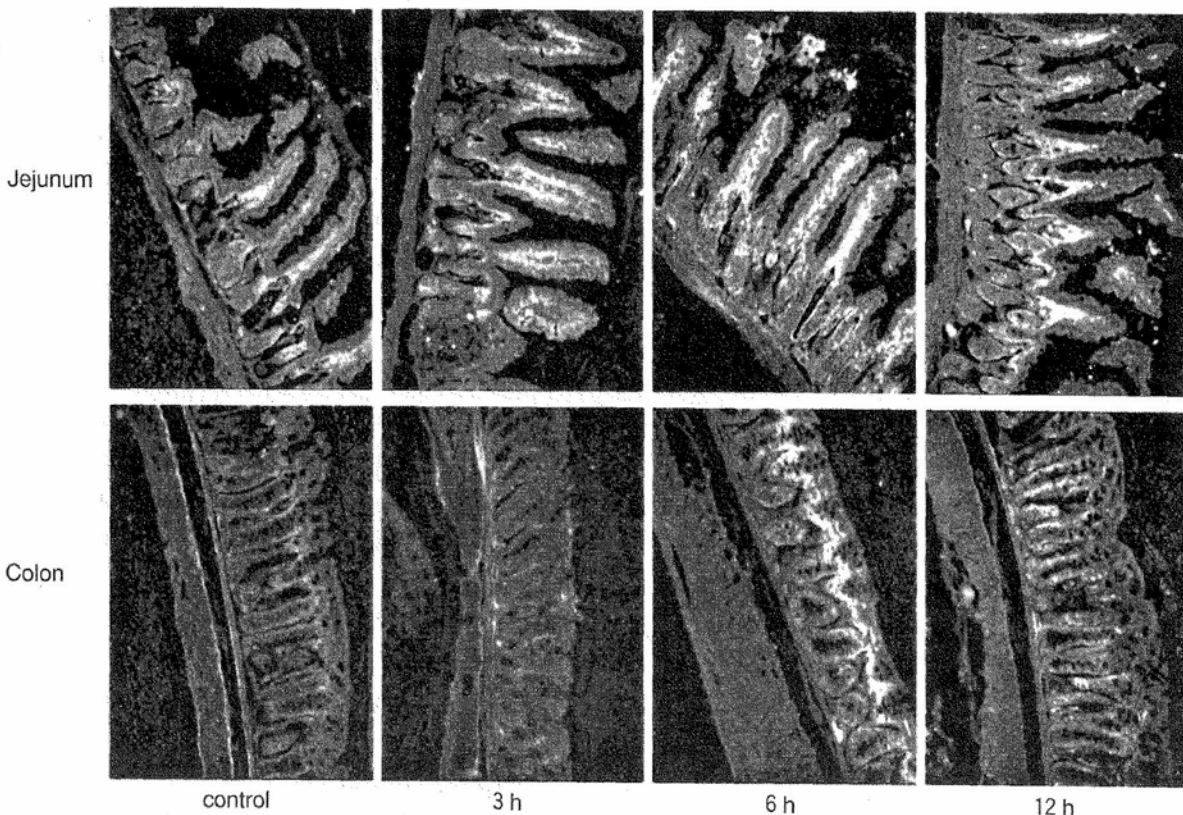


図3 Immunohistochemical detection of IgA antibody in the jejunum and colon.

疫担当細胞が存在している。そこでは液性免疫のIgAが主役を演じている¹⁶⁾。その機能としては、

粘膜上皮への病原微生物の付着侵入阻止や抗原凝集活性などがある。本研究により、強度の運動後

に腸管粘膜のIgAが増加していることが判明した。激しい運動後には、bacterial translocationが起こりやすく、血中LPS濃度が増加することなどから、腸管での強力な防御因子であるIgAが増加したと考えられる。

このような運動による腸管免疫の増強やbacterial translocationの増加によって腸管の細胞自身も傷害される可能性が考えられる。事実、TUNEL染色で消化管の細胞傷害を解析したところ、大腸では6時間後にアポトーシスが増加していた。大腸のヘマトキシリン-エオシン染色像は各時間で変化が見られず (data not shown)、著明な組織傷害は起こっていないと考えられる。グルココルチコイドはアポトーシス誘導作用を有することが知られている^{17, 18)}。今回の結果から、運動負荷後に増加するコルチゾールが、大腸でのアポトーシスを促進した可能性も考えられる。

結 語

本研究から、強度の運動によって血中および腸管での免疫反応が誘起されることや大腸での細胞死が増加することが判明した。今後、このような消化管粘膜傷害を軽減しうる機能性食品などを探求していく考えである。脂肪酸の β 酸化を加速してミトコンドリア依存性細胞死を抑制するカルニチンが、本消化管粘膜病態の改善に有効と考えられ、現在その効果を検討中である。

謝 辞

本研究に対し助成頂いた(財)石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝致します。また、本実験に多大なるご協力を頂いた平本恵一先生(大阪市立大学)に心から謝意を表します。

文 献

1) Sullivan, S.N.: The gastrointestinal symptoms of running. *N. Engl. J. Med.*, 304, 915 (1981)

- 2) Riddoch, C., Trinick, T.: Gastrointestinal disturbances in marathon runners. *Br. J. Sports Med.*, 22, 71-74 (1988)
- 3) Jeukendrup, A.E., Vet-Joop, K., Sturk, A., Stegen, J.H., Senden, J., Saris, W.H., Wagenmakers, A.J.: Relationship between gastro-intestinal complaints and endotoxaemia, cytokine release and the acute-phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men. *Clin. Sci.*, 98, 47-55 (2000)
- 4) Bosenberg, A.T., Brock-Utne, J.G., Gaffin, S.L., Wells, M.T., Blake, G.T.: Strenuous exercise causes systemic endotoxemia. *J. Appl. Physiol.*, 65, 106-108 (1988)
- 5) Peters, E.M., Bateman, E.D.: Ultramarathon running and upper respiratory tract infections. An epidemiological survey. *S. Afr. Med. J.* 64, 582-584 (1983)
- 6) Davis, J.M., Kohut, M.L., Colbert, L.H., Jackson, D.A., Ghaffar, A., Mayer, E.P.: Exercise, alveolar macrophage function, and susceptibility to respiratory infection. *J. Appl. Physiol.* 83, 1461-1466 (1997)
- 7) Kohut, M.L., Davis, J.M., Jackson, D.A., Jani, P., Ghaffar, A., Mayer, E.P., Essig, D.A.: Exercise effects on IFN-beta expression and viral replication in lung macrophages after HSV-1 infection. *Am. J. Physiol.* 275, L1089-1094 (1998)
- 8) Rowell, L.B., Blackmon, J.R., Bruce, R.A.: Indocyanine green clearance and estimated hepatic blood flow during mild to maximal exercise in upright man. *J. Clin. Invest.* 43, 1677-1690 (1964)
- 9) Clausen, J.P.: Effect of physical training on cardiovascular adjustments to exercise in man. *Physiol Rev.* 57, 779-815 (1977)
- 10) Pedersen, B.K., Hoffman-Goetz, L.: Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* 80, 1055-1081 (2000)
- 11) 渡辺恭良: 疲労の神経回路の解明に向けて-疲労の科学- (井上正康, 倉恒弘彦, 渡辺恭良編), 講談社サイエンティフィク, pp5-11 (2001)
- 12) Mattingly, D., Martin, H., Tyler, C.: Fluorimetric method for simultaneous estimation of cortisol, corticosterone, and testosterone in plasma. *J. Clin. Pathol.* 42, 661-666 (1989)
- 13) Suzuki, K., Yamada, M., Kurakake, S., Okamura, N., Yamaya, K., Liu, Q., Kudoh, S., Kowatari, K., Nakaji, S., Sugawara, K.: Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-

- priming potentials rise after endurance exercise in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 81, 281-287 (2000)
- 14) Meddings, J.B., Swain, M.G.: Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology*. 119, 1019-1028 (2000)
- 15) Alverdy, J., Aoys, E.: The effect of glucocorticoid administration on bacterial translocation. Evidence for an acquired mucosal immunodeficient state. *Ann Surg.* 214, 719-723 (1991)
- 16) 清野宏：今なぜ粘膜免疫なのか—粘膜免疫— (清野宏, 石川博通, 名倉宏編) 中山書店, pp2-30 (2001)
- 17) Hoffman-Goetz, L., Zajchowski, S.: In vitro apoptosis of lymphocytes after exposure to levels of corticosterone observed following submaximal exercise. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 39, 269-274 (1999)
- 18) Hoffman-Goetz, L., Zajchowski, S., Aldred, A.: Impact of treadmill exercise on early apoptotic cells in mouse thymus and spleen. *Life Sci.* 64, 191-200 (1999)