

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

## 2015年度 博士論文

ラット唾液 IgA への自発運動による影響

2016年3月4日

栗本 勇輝

Yuki Kurimoto

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

環境病理学講座



神奈川歯科大学大学院歯学研究科  
2015年度 博士論文

ラット唾液 IgA への自発運動による影響

2016年3月4日

栗本 勇輝  
Yuki Kurimoto

神奈川歯科大学大学院歯学研究科  
環境病理学講座

神奈川歯科大学大学院歯学研究科  
口腔科学講座  
猿田樹理准教授 指導



## 論文内容要旨

唾液中の免疫グロブリン A (IgA) は、口腔内の局所免疫の主要な因子であり、運動によって変動するマーカーとして知られている。また、上気道感染症の感染防止に大きく関与していることが既に報告されている。唾液 IgA は、唾液腺周囲組織に存在する IgA 産生形質細胞によって、多量体 IgA が合成および分泌され、唾液腺腺房細胞の基底側に発現する多量体免疫グロブリンレセプター (pIgR) と結合する。続いて、細胞内トランスサイトosisにより管腔側に送られ、そこで pIgR の一部が切り離されることにより分泌成分となり、IgA と分泌成分の複合体が分泌型 IgA として唾液中に分泌される。ヒトを対象にした運動免疫の研究は、上気道感染の罹患に対する運動による影響についての報告が多くされている。運動と上気道感染の感受性との関係については、J カーブモデルが一般に認められている。このモデルは、普段から運動を行っていない人が適度な運動トレーニングを行うと感染の危険性が低下するのに対し、過度の運動トレーニングを行った後では感染の危険性が増加することを示している。これらの機序については、過度の運動トレーニングに伴い、血中の NK 細胞や T 細胞の数や機能、さらに唾液 IgA 濃度などが一過性に低下し、免疫抑制作用のあるストレスホルモンや炎症性サイトカインが分泌されるため、易感染性となるとされている。強制運動と唾液 IgA との関係については、ラットを用いた動物実験が報告されている。トレッドミルを使用し、ラットに高強度の運動を強制的に行わせることにより、唾液 IgA 濃度が低下し、その発生機序には、顎下腺 pIgR 発現量の低下が関与していると考察されている。本研究では、非強制的な自発運動による唾液 IgA 分泌への影響が動物実験で検討されていないことに注目し、回転ホイールを付属した自発回転走行ケージを使用して、ラットの自発運動による唾液 IgA の変化を検証した。

6 週齢の雄性 Wistar 系ラットを、1 週間飼育した後、運動群については 3 週間自発運動をさせ、コントロール群については最初の 1 週間を含め 4 週間、自発運動をさせずに飼育した。実験期間終了後、ラットの顎下腺および唾液を採取し、ELISA 法により顎下腺 IgA 濃度および唾液 IgA 濃度を測定した。また、リアルタイム PCR 法により顎下腺 pIgR の遺伝子発現量を測定した。

自発運動を行ったラットにおいて、顎下腺組織中および唾液中の IgA 濃度、さらに唾液 IgA 分泌速度が、コントロール群と比較して有意に増加した。また、顎下腺組織における pIgR mRNA の発現量についてもコントロール群と比較して有意に増加した。自発運動は顎下腺組織における IgA 濃度および pIgR 発現量を増加させ、唾液中への IgA 分泌が促進されることにより、唾液 IgA 濃度および唾液分泌速度が増加することを明らかにした。本研究結果より、自発運動は唾液 IgA を上昇させ、口腔内の免疫機能を高める可能性が示唆された。

## 論文審査要旨

学位申請論文である「ラット唾液 IgA への自発運動による影響」は、ラットによる動物実験において、自発運動が口腔内局所免疫の主体である唾液 IgA 産生に及ぼす影響を測定し、自発運動と唾液 IgA を介した上気道感染防止との関与について解析することを目的とした。

唾液 IgA は、運動によって変動する事が報告されており、ヒトを対象にした運動免疫の研究では、上気道感染の罹患に対する運動の影響についての報告が多くなされている。運動と上気道感染の感受性との関係は、J カーブモデルが一般に認められており、普段から運動を行っていない人が適切な運動を行うと、感染の危険性が低下するのに対し、過剰な運動後では、感染の危険性が増加することを示している。ラットによる動物実験では、過剰な強制運動と唾液 IgA との関係については、唾液 IgA 濃度が低下し、その発生機序は顎下腺 pIgR 発現量の低下が関与していると考えられている。しかしながら、自発的な運動による動物実験の報告はない。

本研究は、6 週齢オスの Wistar 系ラット 20 匹を使用し、トレッドミルによる 3 週間の自発運動群を実験群とし、自発運動を行わない対照群と唾液 IgA について比較検討した。実験終了後、ラットの顎下腺および唾液を採取し、ELISA 法により顎下腺 IgA 濃度および唾液 IgA 濃度を測定した。また、リアルタイム PCR 法にて顎下腺 pIgR の遺伝子発現量を測定した。

自発運動を行った実験群において、顎下腺組織および唾液中の IgA 濃度、さらに唾液 IgA 分泌速度が有意に増加した。また、顎下腺組織における pIgR mRNA の発現量についても有意に増加した。自発運動は顎下腺組織における IgA 濃度および pIgR 発現量を増加させ、唾液中への IgA 分泌が促進されることにより、唾液 IgA 濃度および唾液分泌速度が増加することを明らかにした。本研究結果より、自発運動は唾液 IgA を上昇させ、口腔内の免疫機能を高める可能性を示唆した。これらの自発運動による唾液 IgA の影響は、過剰な強制運動時の唾液 IgA 濃度低下と顎下腺 pIgR の発現量低下と相反する結果であった。

考察において、自発運動による口腔内の免疫機能亢進機序について説明を求めた結果、自発運動では、神経系および内分泌系に対する過剰な生理的ストレスが作動せず、顎下腺の IgA 濃度および pIgR 発現量増加に作用したことを示唆している。すなわち、ヒトの過剰運動時には交感神経優位によるカテコールアミン分泌が増加し、内分泌系および免疫機能抑制に作用する報告を提示し、顎下腺 pIgR の発現量低下に影響したことと関連づけている。

以上のように、申請者はこれまで報告がなかった自発運動による口腔免疫機能への影響を唾液 IgA と顎下腺 pIgR 発現を解析することで新しい知見を得たこと、さらにヒトによる先行研究から自発運動と口腔免疫機能両者の関連づけをした点など、論理的であると評価できる。

今後、研究を継続し免疫機能亢進に関する運動機能の観点からリハビリテーション指導等に生かしていくことが、医療専門職における高度診療協力専門職

養成コースの研究として相応しく、本審査委員会は申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

本審査委員会は申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

2016年3月4日

主査：石井 信之 教授

副査：浜田 信城 教授

副査：山本 利春 准教授

## 目次

緒言	1
実験材料および方法	7
結果	13
考察	15
結論	19
謝辞	20
文献	21
付図表説明	30
表および図	
図 1	32
図 2	33
図 3	34
図 4	35
図 5	36
図 6	37

## 緒言

口腔は常に外界と接する呼吸器系および消化器系の入り口であり、したがって口腔粘膜は生体防御の最前線である。この防御機構において重要な役割を果たしているのが、口腔内の唾液腺より分泌される唾液である。唾液には口腔から侵入する病原体に対する一次的な防御機構において主要な役割を担う免疫グロブリン A (IgA) が多く含まれる<sup>1-3)</sup>。唾液 IgA は、免疫機能の変動を反映する指標のひとつと考えられており、運動によって変動するマーカーとしても知られている<sup>4,5)</sup>。また、唾液 IgA が上気道感染症の感染防止に大きく関与していることが既に報告されている<sup>6-8)</sup>。

IgA は、ヒトの血清中においてはほぼ全てが 2 本の重鎖 ( $\alpha$  鎖) と 2 本の軽鎖 ( $\kappa$  鎖と  $\lambda$  鎖) からなる単量体である。一方、唾液中に含まれる IgA は、その約 90%は単量体が結合鎖 (J 鎖) で連結された多量体 (二量体もしくは三量体) の形で存在する<sup>2)</sup>。つまり、唾液中の IgA には、血清由来のものはわずかしかな存在せず、ほとんどは唾液腺から分泌されたものである。唾液腺周囲組織に存在する免疫グロブリン産生形質細胞によって合成および分泌された多量体 IgA は、唾液腺腺房細胞の基底側に発現する多量体免疫グロブリンレセプター (pIgR) と結合し、細胞内トランスサイトosisにより管腔側に送られ、そこで pIgR の一部が切り離されることにより分泌成分となり、IgA と分泌成

分の複合体が分泌型 IgA として唾液中に分泌される<sup>2,9-11)</sup>。この分泌型 IgA は、侵入したウイルス、細菌、細菌毒素、アレルゲンなどと免疫結合体を作り、これらを排除する機能を持つ<sup>9-13)</sup>。

免疫グロブリン産生形質細胞の分布、また、唾液腺腺房細胞における pIgR 発現がヒトの三大唾液腺（顎下腺、舌下腺および耳下腺）において確認されており、いずれの唾液腺も唾液中に IgA を分泌している<sup>14,15)</sup>。一日における唾液分泌量は 1,000～1,500 ml であり、安静時には顎下腺から約 70%、耳下腺から約 25%および舌下腺から約 5%の割合で分泌される。分泌された唾液には 50～200 mg もの IgA が含まれている<sup>2,16)</sup>。ヒトの粘膜面に分泌される分泌液中には、IgA 以外の全アイソタイプの免疫グロブリンも存在しているが、唾液をはじめとする全ての分泌液中において IgA が最も多く含まれている<sup>2)</sup>。このように、粘膜面における IgA は、生体にとって非常に重要な防御機構を担っている。

唾液は検査試料として、①非侵襲的であること、②対象にストレスを与えないこと、③感染の危険性が低いこと、④連続採取が可能であること、⑤採取場所を選ばないこと、⑥費用が安価であること、など多数の利点があげられる<sup>17,18)</sup>。サンプリングに関して言えば、血液採取が困難な被験者、例えば、小児や障害のある患者、あるいは採血に不安の強い患者に対しても有効であり、さらには、医師、歯科医師以外でもサンプリングが可能である。そのため、臨床やスポーツの現場

において、唾液 IgA は免疫機能の評価やストレス測定のための試料として期待されている<sup>17,18)</sup>。

ヒトを対象にした運動免疫の研究の多くは、運動の上気道感染の罹患に対する影響についてのものである<sup>6-8,19,20)</sup>。運動と上気道感染の感受性との関係については J カーブモデルが一般に認められている<sup>6,21,22)</sup>。このモデルは、普段から運動を行っていない人が適度な運動トレーニングを行うと感染の危険性が低下するが、過度の運動トレーニングを行った後では感染の危険性が増加することを示している。これらの機序については、過度な運動トレーニングに伴い、血中の NK 細胞および T 細胞の数や機能、さらに唾液 IgA 濃度などが一過性に低下し、免疫抑制作用のあるストレスホルモンや抗炎症性サイトカインが分泌されるため易感染性となるとされている<sup>6,21,22)</sup>。

運動と唾液 IgA の研究についても、ヒトを対象としたものがほとんどであり、中等度の運動では唾液 IgA レベルが上昇するのに対し、高強度の運動では唾液 IgA レベルが低下し、粘膜免疫を弱めることが報告されている<sup>19,23-25)</sup>。動物を用いた実験としては、Kimura らによるトレッドミルを使用したラットの高強度強制運動モデル実験があり、運動の前後で唾液中の IgA 濃度が有意に低下することが示されている。また、顎下腺の pIgR mRNA の発現量についても有意に低下することが示されている。この機構としては、高強度の強制運動により pIgR

mRNA の発現量が低下し、その結果として顎下腺 IgA の唾液中への分泌が抑制され、唾液 IgA 濃度が低下したためであると報告されている<sup>26)</sup>。

運動免疫の動物実験を実施するにあたり、実験動物に身体運動を負荷する方法としては、トレッドミルを用いた強制的な走行運動<sup>26-29)</sup>、水槽を用いた強制的な水泳運動<sup>30)</sup>、金網ケージを半強制的に登らせるクライミングケージを用いた方法<sup>31,32)</sup>、および回転ホイールによる自発的な運動を促す自発回転走行ケージを用いた方法<sup>33-35)</sup>などが挙げられる。自発回転走行ケージを用いた方法以外はいずれも強制的な運動負荷となるため、強い生理的ストレスを実験動物に与え、それが唾液分泌にも大きく影響する可能性がある。Moraska らは、トレッドミル走は体重の減少や筋でのエネルギー代謝効率の上昇など生理学的にポジティブな影響がある一方で、副腎肥大、リンパ節の萎縮および免疫機能抑制などのネガティブな影響ももたらされると報告している<sup>29)</sup>。また柳田は、ラットにおけるトレッドミル走などの強制運動は、それ自体が強いストレス反応をもたらすものであるが、自発運動はストレス緩和など精神的に良好な状態をもたらすものであると報告している<sup>34)</sup>。自発回転走行ケージを用いた方法の利点について、Holy らは、不必要なストレスを実験動物に与える必要がないこと、運動時と非運動時の環境に変化がないこと、動物が本来身体活動を活発に行う時間帯

に自然に運動が行われることを挙げている<sup>36)</sup>。このことは、動物の自発運動はヒトにおける日常生活と同様な意味を持つことが示唆される。

自発回転走行ケージを用いた運動負荷実験がいくつか報告されている<sup>33-35)</sup>。Matsumoto らは、ラットに回転ホイールを用いて自発運動をさせると盲腸内容物中の酪酸濃度が上昇することを示し、大腸発酵によって産生された酪酸は大腸がんを抑制することが知られているため、自発運動が大腸がん発生リスクを低下させる可能性を示唆している<sup>33)</sup>。さらに、クライミングケージと回転ホイールの運動の違いについても検証されており、盲腸重量がクライミングケージによる運動負荷では有意に増加しなかったのに対し、回転ホイールによる自発運動では有意に増加したことから、運動による大腸発酵の変化は、運動の強度や種類によって効果が異なると考察されている<sup>35)</sup>。また、食餌と唾液 IgA の関係については、Yamamoto らが、難消化性糖類の摂取によって、ラットの顎下腺および唾液中の IgA が増加することを報告している<sup>37)</sup>。これは、運動と唾液 IgA の関係性を正しく検証するためには、一般的な飼料に含まれるコーンスターチやセルロースが及ぼす影響を排除する必要があることを意味する。

このような背景から、本研究では、非強制的な自発運動による唾液 IgA 分泌への影響が動物実験で検討されていないことに注目し、回転ホイールを付属した自発回転走行ケージおよび難消化性糖類を除去し

た特殊飼料を使用して、ラットの自発運動による唾液 IgA の変化を検証した。

## 実験材料および方法

本研究における全ての動物実験は、「神奈川歯科大学動物実験倫理委員会」による審査を受け、承認された（実験計画書番号 339）ものであり、「神奈川歯科大学動物実験基準」および「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」を遵守して行った。

### 1. 動物

6 週齢の雄性 Wistar 系ラット（日本クレア株式会社、東京、日本）20 匹を、 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、12 時間ごとの明暗サイクルの環境下、1 匹ずつ回転ホイールが付属したワイヤーケージ（株式会社シナノ製作所、東京、日本；直径 370 mm、幅 100 mm）で飼育した。食餌による影響を無くすため、無繊維飼料（AIN-76 改変飼料、日本クレア株式会社、東京、日本）と水を自由摂取させた。回転ホイールに通じる扉は閉めたまま 1 週間飼育し、その後、顎下腺採取および唾液採取を行うにあたり、運動群（ $n = 5$ 、2 組）とコントロール群（ $n = 5$ 、2 組）にわけた。運動群については、回転ホイールに通じる扉を開放し、実験終了までの 3 週間自発運動をさせた。コントロール群については、実験期間終了まで回転ホイールに通じる扉は開放せず飼育した。

## 2. 試料採取

運動期間終了後、ラットにペントバルビタール（65 mg/kg 体重当り；共立製薬株式会社、東京、日本）を腹腔内に注入し、それぞれ試料採取を行った。

### 1) 顎下腺および血清の採取

麻酔の効果発現を確認後、開胸して心臓穿刺により採血を行った。採取した血液を血清分離培地が含まれた真空採血管（ベノジェクト® II 真空採血管；テルモ株式会社、東京、日本）に速やかに注入し、採血管を 5～6 回転倒混和、氷冷後、遠心分離（1,200×g、20 分、4℃）することにより血清を得た。得られた血清は、液体窒素中で速やかに凍結した。採血後のラットから左右顎下腺を採取し、液体窒素中で速やかに凍結した。採取した全ての試料は、解析に用いるまで-80℃で保管した。

### 2) 唾液の採取

麻酔の効果が発現したのを確認した後、ピロカルピン（1.5 mg/kg 体重当り；ナカライテスク株式会社、京都、日本）を腹腔内に投与して唾液の分泌を誘発した。ピロカルピン投与 5 分後から、口腔内に分泌された唾液をマイクロピペットにて 10 分間採取した。採取した唾液は採取後液体窒素中で速やかに凍結し、解析に用いるまで-80℃で保管した。

### 3. IgA 濃度測定

顎下腺、血清および唾液に含まれる IgA 濃度は、Rat IgA ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories、Montgomery、Texas、USA) を用いて測定した。まず、凍結状態の顎下腺の右側全量を、凍結プレス破碎装置クライオプレス (株式会社マイクロテック・ニチオン、千葉、日本) を使用して粉碎し、1% Triton<sup>®</sup> X-100 (MP Biomedicals、LLC、Santa Ana、USA) とジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した 1 mM のフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) を添加したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS ; 0.01 M、pH 7.2-7.4、和光純薬工業株式会社、大阪、日本) に懸濁した。この懸濁溶液を遠心分離し (10,000×g、15 分、4℃)、得られた上清を IgA 濃度の測定に用いた。

ヤギ anti-rat IgA 抗体 (一次抗体) を 0.05 M 炭酸-重炭酸緩衝液 (pH9.6) で 100 倍に希釈し、それを 96 穴マイクロプレートの各ウェルに加えて室温で 1 時間静置した。その後、一次抗体溶液を除去し、洗浄溶液 (50 mM Tris、0.14 M NaCl、0.05% Tween 20、pH 8.0) で 5 回洗浄した。ブロッキング溶液 (50 mM Tris、0.14 M NaCl、1%ウシ血清アルブミン、pH 8.0) を各ウェルに加え、30 分室温で静置後、前述の洗浄溶液で 5 回洗浄した。希釈した試料溶液と rat IgA スタンダード溶液 (Bethyl Laboratories、Montgomery、Texas. USA) を各ウェルに加え、1 時間室温で静置後、洗浄溶液で 5 回洗浄した。50,000 倍希釈した西洋わさび

ペルオキシダーゼ (HRP) で標識したヤギ anti-rat IgA 検出抗体 (二次抗体) を各ウェルに加えて 1 時間室温で静置し、洗浄溶液で 5 回洗浄後、TMB 基質・発色剤溶液を各ウェルに加えた。酵素反応は遮光下、室温で 15 分間行い、反応停止液 (0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) を加えて反応を止めた。マイクロプレートリーダー (BioRad、Herchles、California、USA) を用いて 450 nm の波長で吸光度を測定した。検量線 (標準曲線) を作成し、この検量線とサンプルの吸光度の値から IgA 濃度を計算した。

#### 4. RNA 抽出と cDNA 合成

顎下腺からの RNA 抽出は、ISOGEN (RNA 抽出用試薬：株式会社ニッポンジーン、富山、日本) を使用し、製品の付属説明書の手順に従って行った。顎下腺は左側の 1/4 を使用した。RNA 濃度は、分光光度計バイオスペックナノ (株式会社島津製作所、神奈川、日本) を使用して測定した。Total RNA からの Complementary DNA (cDNA) 合成は、ファーストストランド cDNA 合成キット (Roche Diagnostics Ltd、Lewes、UK) を使用して行った。

#### 5. 顎下腺 pIgR mRNA の定量的リアルタイム PCR 法による測定

リアルタイム PCR は、LightCycler 480 システム (Roche Applied Science、Mannheim、Germany) を使用し、製品の付属説明書の手順に

従って行った。0.5  $\mu\text{mole}$  の各プライマーと 0.1  $\mu\text{mole}$  TaqMan プローブを用い、反応容量は 20  $\mu\text{L}$  とした。pIgR 遺伝子配列に対するプライマー配列は、Forward primer : 5'-TGG GAG CTA CAA GTG TGG TC-3'、Reverse primer : 5'-GGG TGT CAT TTG GGA ATC CAG -3'、プローブの配列は FAM-5' TTC GAT GTC AGC CTG GAG GTC AGC-3'-TAMRA とした。TaqMan プローブのデザインと合成は、株式会社日本遺伝子研究所に依頼した。pIgR の増幅サイクルは、95°C で 10 分加熱して変性後、95°C 10 秒、そして 62°C 30 秒の反応を 45 サイクル行った。ラット  $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量測定には、FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics Ltd、Lewes、UK) と LightCycler 480 システムを使用し、製品の付属説明書の手順に従ってリアルタイム PCR 法を行った。FastStart DNA Master SYBR Green I のプライマー配列は、Forward primer : 5'-CTT GTA TGC CTC TGG TCG TA-3'、Reverse primer : 5'-CCA TCT CTT GCT CGA AGT CT-3'であった。95°C で 10 分加熱して変性後、95°C で 10 秒、60°C で 10 秒、72°C で 10 秒の反応を 40 サイクル行った。遺伝子発現量は、各試料の pIgR mRNA と  $\beta$ -アクチン mRNA の発現量比で求めた。

## 6. 統計解析

ラットの体重増加の統計解析には Student's t 検定を行った。他の項

目の統計解析には Mann-Whitney U 検定を行った。全ての統計解析において、 $P < 0.05$  を統計学的に有意差ありとした。統計解析は、SPSS version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を使用した。

## 結果

### 1. ラットの体重増加量

運動群とコントロール群間で体重増加量に有意な差が認められた ( $P < 0.05$  : 図 1)。グラフは、平均値±標準偏差を示す。体重増加量は、コントロール群が  $113.00 \pm 19.05$  g、運動群が  $88.60 \pm 13.16$  g であった。

### 2. ラット顎下腺組織中の IgA 濃度

コントロール群と比較して、運動群において顎下腺組織中の IgA 濃度に有意な増加が認められた ( $P < 0.05$  : 図 2)。顎下腺組織中 IgA 濃度の中央値は、コントロール群が  $36.06$   $\mu\text{g/g}$ 、運動群が  $64.92$   $\mu\text{g/g}$  であった。

### 3. ラット血清中の IgA 濃度

コントロール群と比較して、運動群において血清中の IgA 濃度に有意な増加は認められなかった (図 3)。血清中 IgA 濃度の中央値は、コントロール群が  $21.74$   $\mu\text{g/ml}$ 、運動群が  $20.19$   $\mu\text{g/ml}$  であった。

### 4. ラット唾液中の IgA 濃度

コントロール群と比較して、運動群においては唾液中の IgA 濃度に有意な増加が認められた ( $P < 0.05$  : 図 4)。唾液中 IgA 濃度の中央値

は、コントロール群が 5.26  $\mu\text{g/ml}$ 、運動群が 8.51  $\mu\text{g/ml}$  であった。

#### 5. ラット唾液の IgA 分泌速度

コントロール群と比較して、運動群において唾液の IgA 分泌速度に有意な増加が認められた ( $P < 0.05$  : 図 5)。唾液における IgA 分泌速度の中央値は、コントロール群が 0.307  $\mu\text{g/min}$ 、運動群が 0.511  $\mu\text{g/min}$  であった。

#### 6. ラット顎下腺組織における pIgR mRNA 発現量

コントロール群と比較して、運動群において顎下腺組織における pIgR mRNA の発現量 (pIgR/ $\beta$ -アクチン) に有意な増加が認められた ( $P < 0.05$  : 図 6)。顎下腺組織における pIgR mRNA 発現量の中央値は、コントロール群が 0.97、運動群が 1.58 であった。

## 考察

感染症の予防面などから、運動と免疫の関係は重要であると考えられる。また、超高齢社会の到来に伴い、加齢による免疫能の低下を予防するためにも、運動はより一層注目されている。これまで、運動と免疫に関する研究は数多く報告されているが、そのほとんどはヒトを対象にしたものである<sup>6-8,19,20</sup>。適度な運動は免疫能を高め、感染症や癌の予防にも有効とされる一方、過度な運動は免疫能を低下させ、炎症やアレルギーを助長するとされる<sup>22,38-42</sup>。今回の実験では、運動しないラットに比較して、3週間の自発運動を行ったラットにおいて顎下腺組織中および唾液中のIgA濃度が有意に増加することを見出した。食餌による影響を排除した条件下での自発運動による唾液IgAの変化についての報告は今までに無く、本研究から得られた知見は全く新しいものである。この結果より、ラットの自発運動の効果は、ヒトにおける一般に中等度と言われる適度な運動の効果と同様の結果であり、唾液IgA増加のメカニズムを解明するための一助となり得る。

運動群とコントロール群のそれぞれにおいて、運動期間終了時における運動期間開始からの体重変化を計測したところ、2群間において有意な差が認められた。これは、回転ホイールによる自発運動がもたらした結果であり、コントロール群に比較して運動が効果的であったことを示している。一方、運動によって血清中のIgA濃度は増加しな

いことも明らかになった。全身系と粘膜免疫系では抗体アイソタイプの分布や生産量が異なり、互いに独立した IgA 産生機構を持ち合わせている<sup>2)</sup>。ヒトにおいても同様の報告がなされており<sup>43)</sup>、また、血清から唾液への IgA の移行はほとんどないことから、血清 IgA とは無関係に、顎下腺局所において IgA が増加したと考えられる。

運動は生理的ストレスの一種であり、運動による免疫機能の変化は、免疫系のみならず、神経系および内分泌系との相互作用により調整されている<sup>44-46)</sup>。ストレスの情報は脳皮質—辺縁系から視床下部に送られ、そこから交感神経系および視床下部—下垂体—副腎皮質系（HPA系）により全身に伝達される。交感神経系では、交感神経の緊張が起これ、副腎髄質からのカテコールアミン（アドレナリン、ノルアドレナリン）の分泌が増加し、全身に様々な影響を及ぼす<sup>45)</sup>。HPA系においても、種々のホルモンにより免疫細胞へ作用することが明らかになっている<sup>46)</sup>。したがって、強制運動と自発運動の大きな違いは、そのストレス応答の違いである。強制運動では、強いストレスを受けるためストレスホルモンが大量に分泌される。それにより、免疫細胞の数や機能が抑制され、免疫能が低下する。本研究で用いたような自発運動では、ストレスホルモンによる免疫能低下は抑えられ、運動そのものによる免疫能を上げる効果が強く影響すると考えられる。

全身的には、運動により様々なサイトカインが免疫細胞から放出さ

れることが多数報告されている<sup>47-50)</sup>。これらのサイトカインの多くは、細胞の増殖や分化を促進させ、細胞表面のレセプターと結合してその作用を発揮する。免疫細胞の1種であるヘルパーT細胞は、産生されるサイトカインの分泌パターンによって、細胞性免疫に関係するTh1型と、B細胞を中心とする液性免疫に関係するTh2型に分類される<sup>51,52)</sup>。IgA産生細胞の誘導にあたっては、Th2型のヘルパーT細胞によって分泌されるIL-5およびIL-6がIgA前駆B細胞の形質化に関与している<sup>53,54)</sup>。IL-5は、IgA実効組織において、IgA前駆B細胞をIgA産生形質細胞に誘導する機能を有している。IL-6は、活性化されたB細胞の最終分化を誘導する因子として知られている。このように、粘膜免疫の中心を担っているIgA誘導に関して、ヘルパーT細胞の産生するサイトカインが密接に関係しており、今回の実験結果についても、この機序に自発運動が影響を与えたことが考えられる。自発運動がIgA産生過程のどの段階で影響するかを明らかにする事は今後の検討課題でもある。

pIgRは、顎下腺組織中でのIgAの腺房細胞を介した細胞内輸送において重要な役割を果たしている特殊な輸送蛋白である<sup>2,9-11)</sup>。顎下腺組織内におけるpIgR発現量の減少は、唾液中へのIgA分泌を抑制し、唾液IgA濃度を減少させると報告されている<sup>26)</sup>。逆に、顎下腺組織におけるpIgR発現量の増加は、唾液中へのIgA分泌を促進し、唾液IgA濃

度を増加させると考えられる。よって、今回の実験における、自発運動による唾液 IgA 濃度の増加は、pIgR 発現の増加によるものであることが推測される。pIgR の発現には、全身における様々な要因が影響を及ぼしており、局所的には、粘膜組織や外分泌腺で産生されるサイトカインにより相加的、相乗的に発現が上昇する<sup>13)</sup>。なかでも、INF- $\gamma$  と IL-4 の相乗効果により pIgR の発現が増加することが報告されている<sup>55)</sup>。一方、運動がこれらのサイトカインやそれらを生成するヘルパーT 細胞に影響を与えることが多数報告されている<sup>49,50)</sup>。本研究の結果より、ストレスの少ない自発運動が、本来、拮抗的に作用する INF- $\gamma$  と IL-4 の相乗的な効果を生み出したものと推測される。したがって、pIgR の発現は、運動によって直接的、もしくは間接的に誘導されたサイトカインの影響を受けていることが予想され、pIgR の発現と IgA 分泌との関連を解明していくには、自発運動により引き起こされるサイトカインおよびヘルパーT 細胞の変化について、さらなる研究が必要である。

## 結論

本研究では、自発運動が、ラットの顎下腺組織および唾液中の IgA 濃度、また、顎下腺における pIgR 発現量にどのように影響するかを検討し、以下の結論を得た。

- 自発運動を行ったラットにおいて、顎下腺組織および唾液中の IgA 濃度は、コントロール群と比較して有意に増加したが、血清中の IgA 濃度は 2 群間に差がみられなかった。
- 自発運動を行ったラットにおいて、顎下腺組織における pIgR mRNA 発現量がコントロール群と比較して有意に増加した。

以上のことから、自発運動は、顎下腺局所における IgA 濃度の増加を引き起こし、分泌型 IgA として唾液中に分泌されることが明らかになった。また、自発運動が顎下腺組織における pIgR 発現に大きな影響を与え、その結果、唾液 IgA 濃度が増加していることも明らかになった。今回の発見により、自発運動は口腔内の免疫機能を高める可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、適切な御助言と御指導をいただきました槻木恵一教授（神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座唾液腺健康医学分野）に深く感謝申し上げます。また、有意義な討論の機会と多大な御助言をいただき、また、論文作成に終始ご協力いただきました猿田樹理准教授（神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座唾液腺健康医学分野）に厚く御礼申し上げます。最後に本研究を支援していただきました神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座唾液腺健康医学分野の東雅啓特任助教をはじめとする皆様に深く感謝致します。

## 文献

1. 前田勝正, 吉江弘正, 大石正道. 臨床に役立つ口腔免疫学アトラス ; 医歯薬出版株式会社, 東京, 46-62, 1991.
2. 清野宏編集. 臨床粘膜免疫学 ; 1 版, 株式会社シナジー, 東京, 246-255, 625-632, 2010.
3. Kotani Y, Shinkai S, Okamatsu H, Toba M, Ogawa K, Yoshida H, Fukaya T, Fujiwara Y, Chaves PH, Kakumoto K, Kohda N. Oral intake of *Lactobacillus pentosus* strain b240 accelerates salivary immunoglobulin A secretion in the elderly: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Immun Ageing* 7:11, 2010.
4. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M, Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A, Simon P. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 17:6-63, 2011.
5. Otsuki T, Shimizu K, Iemitsu M, Kono I. Chlorella intake attenuates reduced salivary SIgA secretion in kendo training camp participants. *Nutr J* 11:103, 2012.
6. Nieman DC. Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med Sci Sports Exerc* 26:128-139, 1994.
7. Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL, Markoff PA, Balk-Lamberton AJ,

Yang H, Chritton DB, Lee JW, Arabatzis K. The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. *Int J Sports Med* 11:467-473, 1990.

8. Nieman DC. Exercise, infection, and immunity. *Int J Sports Med* 15:S131-S141, 1994.

9. Asano M, Komiyama K. Polymeric immunoglobulin receptor. *J Oral Sci* 53:147-156, 2011.

10. Brandtzaeg P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 25:5467-5484, 2007.

11. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: Induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol* 70:505-515, 2009.

12. Corthésy B. Role of secretory immunoglobulin A and secretory component in the protection of mucosal surfaces. *Future Microbiol* 5:817-829, 2010.

13. Kaetzel CS. The polymeric immunoglobulin receptor: Bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev* 206:83-99, 2005.

14. Brandtzaeg P. Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Ann N Y Acad Sci* 1098:288-311, 2007.

15. Carpenter GH, Proctor GB, Ebersole LE, Garrett JR. Secretion of IgA by

rat parotid and submandibular cells in response to autonomic stimulation in vitro. *Int Immunopharmacol* 4:1005-1014, 2004.

16. Chicharro JL, Lucia A, Perez M, Vaquero AF, Urena R. Saliva composition and exercise. *Sports Med* 26:17-27, 1998.

17. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications. *Clin Chem* 57:675-687, 2011.

18. 槻木恵一監修．非侵襲的検体検査の最前線—唾液検査・呼気検査を中心に—；シーエムシー出版，東京，23-29，103-110，2015．

19. Klentrou P, Cieslak T, MacNeil M, Vintinner A, Plyley M. Effect of moderate exercise on salivary immunoglobulin A and infection risk in humans. *Eur J Appl Physiol* 87:153-158, 2002.

20. Tiollier E, Gomez-Merino D, Burnat P, Jouanin JC, Bourrilhon C, Filaire E, Guezennec CY, Chennaoui M, Intense training: Mucosal immunity and incidence of respiratory infections. *Eur J Appl Physiol* 93:421-428, 2005.

21. 鈴木克彦．運動と免疫．日本補完代替医療学会誌．1：31-40，2004．

22. 秋本崇之，扇原淳．疫学からみたエビデンス—特集／運動は免疫能を高めるか？臨床スポーツ医学．19：1283-1287，2002．

23. Mackinnon LT, Ginn E, Seymour GJ. Decreased salivary immune-globulin A secretion rate after intense interval exercise in elite kayakers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 67:180-184, 1993.
24. Nieman DC, Henson DA, Fagoaga OR, Utter AC, Vinci DM, Davis JM, Nehlsen-Cannarella SL. Change in salivary IgA following a competitive marathon race. *Int J Sports Med* 23:69-75, 2002.
25. Novas AM, Rowbottom DG, Jenkins DG. Tennis, incidence of URTI and salivary IgA. *Int J Sports Med* 24:223-229, 2003.
26. Kimura F, Aizawa K, Tanabe K, Shimizu K, Kon M, Lee H, Akimoto T, Akama T, Kono I. A rat model of saliva secretory immunoglobulin: A suppression caused by intense exercise. *Scand J Med Sci Sports* 18:367-372, 2008.
27. Gholamnezhad Z, Boskabady MH, Hosseini M, Sankian M, Khajavi Rad A. Evaluation of immune response after moderate and overtraining exercise in wistar rat. *Iran J Basic Med Sci* 17:1-8, 2014.
28. Shibuya T, Kaburagi T, Nagai R, Oshiro S. The effects of moderate exercise on secretory IgA production in mice depends on dietary carbohydrate intake. *J Clin Biochem Nutr* 57:44-49, 2015.

29. Moraska A, Deak T, Spencer RL, Roth D, Fleshner M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R1321-1329, 2000.
30. Morifuji M, Sanbongi C, Sugiura K. Dietary soya protein intake and exercise training have an additive effect on skeletal muscle fatty acid oxidation enzyme activities and mRNA levels in rats. *Br J Nutr* 96:469-475, 2006.
31. Matsuo T, Nozaki T, Okamura K, Matsumoto K, Doi T, Gohtani S, Suzuki M. Effects of voluntary resistance exercise and high-protein snack on bone mass, composition, and strength in rats given glucocorticoid injections. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:2518-2523, 2003.
32. Lee S, Barton ER, Sweeney HL, Farrar RP. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol* 96:1097-1104, 2004.
33. Matsumoto M, Inoue R, Tsukahara T, Ushida K, Chiji H, Matsubara N, Hara H. Voluntary running exercise alters microbiota composition and increases n-butyrate concentration in the rat cecum. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:572-576, 2008.

34. 柳田信也．肥満ラットにおける自発運動トレーニングがストレスに関連した脳内神経活動に及ぼす影響．ミズノスポーツ振興財団研究助成金報告書．2012．
35. 松本恵．エクササイズと大腸．消化管の栄養・生理と腸内細菌 Hindgut club Japan 編；アニマル・メディア社，東京，87-95，2011．
36. Holy X, Zérath E. Bone mass increases in less than 4 wk of voluntary exercising in growing rats. *Med Sci Sports Exerc* 32:1562-1569, 2000.
37. Yamamoto Y, To M, Hayashi T, Shimizu T, Kamata Y, Saruta J, Takahashi T, Tsukinoki K. Intake of indigestible carbohydrates influences IgA response and polymeric Ig receptor expression in the rat submandibular gland. *Br J Nutr* 113:1895-1902, 2015.
38. 鈴木克彦, 町田和彦, 栗山孝雄, 中路重之, 菅原和夫. Global Standard の視点からの医療：運動療法の新しい取り組み—そのメカニズムと有用性について—．*治療* 84：3037-3041，2002．
39. Quadrilatero J, Hoffman-Goetz L. Physical activity and colon cancer. A systematic review of potential mechanisms. *J Sports Med Phys Fitness* 43:121-138, 2003.

40. Suzuki K, Totsuka M, Nakaji S, Yamada M, Kudoh S, Liu Q, Sugawara K, Yamaya K, Sato K. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J Appl Physiol* 87:1360-1367, 1999.
41. Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totsuka M, Sato K, Sugawara K. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. *Exerc Immunol Rev* 8:6-48, 2002.
42. Pedersen BK, Steensberg A, Keller P, Keller C, Fischer C, Hiscock N, van Hall G, Plomgaard P, Febbraio MA. Muscle-derived interleukin-6: Lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Archiv* 446:9-16, 2003.
43. Hall-López J, Ochoa-Martínez P, Teixeira AM, Moncada-Jiménez JA, Dantas EM. Effect of hydrogymnastics physical exercise on serum level of immunoglobulin A in elderly women. *Rev Chilena Infectol* 32:272-277, 2015.
44. 松本徳子, 森谷潔. 総説・身体運動と免疫機能との関連. 北海道大学教育學部紀要 = The annual reports on educational science. 75 : 149-158, 1998.

45. Kvetnanský R, Pacák K, Fukuhara K, Viskupic E, Hiremagalur B, Nankova B, Goldstein DS, Sabban EL, Kopin IJ. Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Ann N Y Acad Sci* 771:131-158, 1995.
46. Droste SK, Chandramohan Y, Hill LE, Linthorst AC, Reul JM. Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis mainly at the adrenal level. *Neuroendocrinology* 86:26-37, 2007.
47. Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen TL, MacLean DA, Pedersen BK. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol* 499:833-841, 1997.
48. Cannon JG, Fiatarone MA, Fielding RA, Evans WJ. Aging and stress-induced changes in complement activation and neutrophil mobilization. *J Appl Physiol* 76:2616-2620, 1994.
49. Lancaster GI, Khan Q, Drysdale PT, Wallace F, Jeukendrup AE, Drayson MT, Gleeson M. Effect of prolonged exercise and carbohydrate ingestion on type 1 and type 2 T lymphocyte distribution and intracellular cytokine production in humans. *J Appl Physiol* 98:565-571, 2005.

50. Zaldivar F, Wang-Rodriguez J, Nemet D, Schwindt C, Galassetti P, Mills PJ, Wilson LD, Cooper DM. Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. *J Appl Physiol* 100:1124-1133, 2006.
51. Street NE, Mosmann TR. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J* 5:171-177, 1991.
52. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-173, 1989.
53. 高津聖志. 粘膜免疫の新展開—IL-5 と分泌型 IgA 産生. *細胞工学*. 13 : 116-123, 1994.
54. McGhee JR, Mestecky J, Elson CO, Kiyono H. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J Clin Immunol* 9:175-199, 1989.
55. Loman S, Jansen HM, Out TA, Lutter R. Interleukin-4 and interferon-gamma synergistically increase secretory component gene expression, but are additive in stimulating secretory immunoglobulin A release by Calu-3 airway epithelial cells. *Immunology* 96:537-543, 1999.

## 付図説明

### 図 1

ラットの体重増加量 (各群 n = 5)

コントロール群と運動群を比較して、ラットの体重増加量に有意な差を認めた (\*P < 0.05)。

### 図 2

ラット顎下腺組織中における IgA 濃度 (各群 n = 5)

コントロール群と比較し、運動群では顎下腺 IgA 濃度が有意に増加した (\*P < 0.05)。箱ひげ図は、中央値、第 1 四分位、第 3 四分位、最小値、最大値を示す。

### 図 3

ラット血清中における IgA 濃度 (各群 n = 5)

コントロール群と運動群を比較し、血清 IgA 濃度に有意な差は認められなかった。箱ひげ図は、中央値、第 1 四分位、第 3 四分位、最小値、最大値を示す。

### 図 4

ラット唾液中における IgA 濃度 (各群 n = 5)

コントロール群と比較し、運動群では唾液 IgA 濃度が有意に増加した (\*P < 0.05)。箱ひげ図は、中央値、第 1 四分位、第 3 四分位、最小値、最大値を示す。

図 5

ラット唾液における IgA 分泌速度 (各群 n = 5)

コントロール群と比較し、運動群では唾液 IgA 分泌速度が有意に増加した (\*P < 0.05)。箱ひげ図は、中央値、第 1 四分位、第 3 四分位、最小値、最大値を示す。

図 6

ラット顎下腺組織中における pIgR mRNA 発現量 (pIgR/β-アクチン) (各群 n = 5)

コントロール群と比較し、運動群では顎下腺 pIgR mRNA 発現量が有意に増加した (\*P < 0.05)。箱ひげ図は、中央値、第 1 四分位、第 3 四分位、最小値、最大値を示す。

表および図

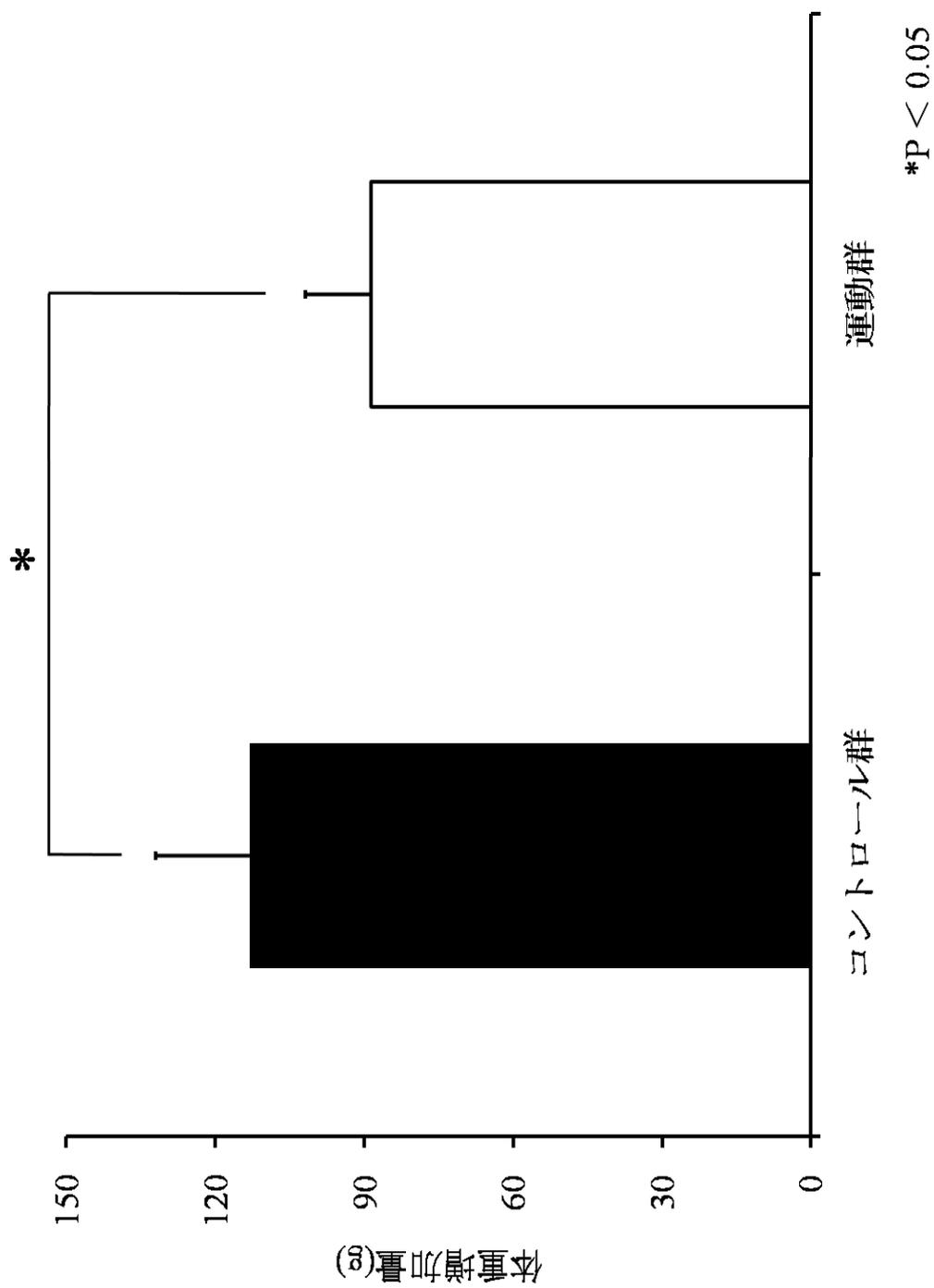
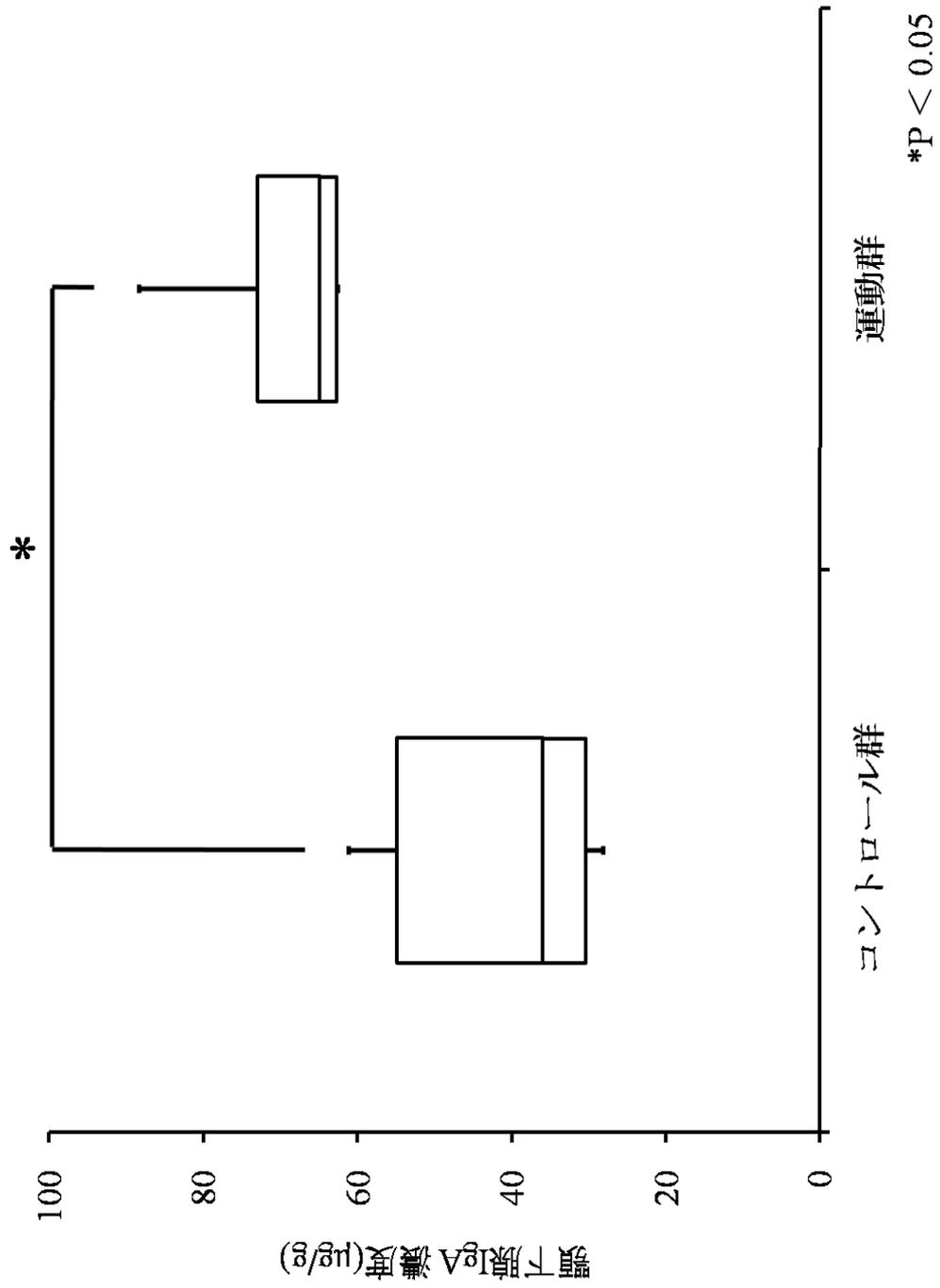


図1

図 2



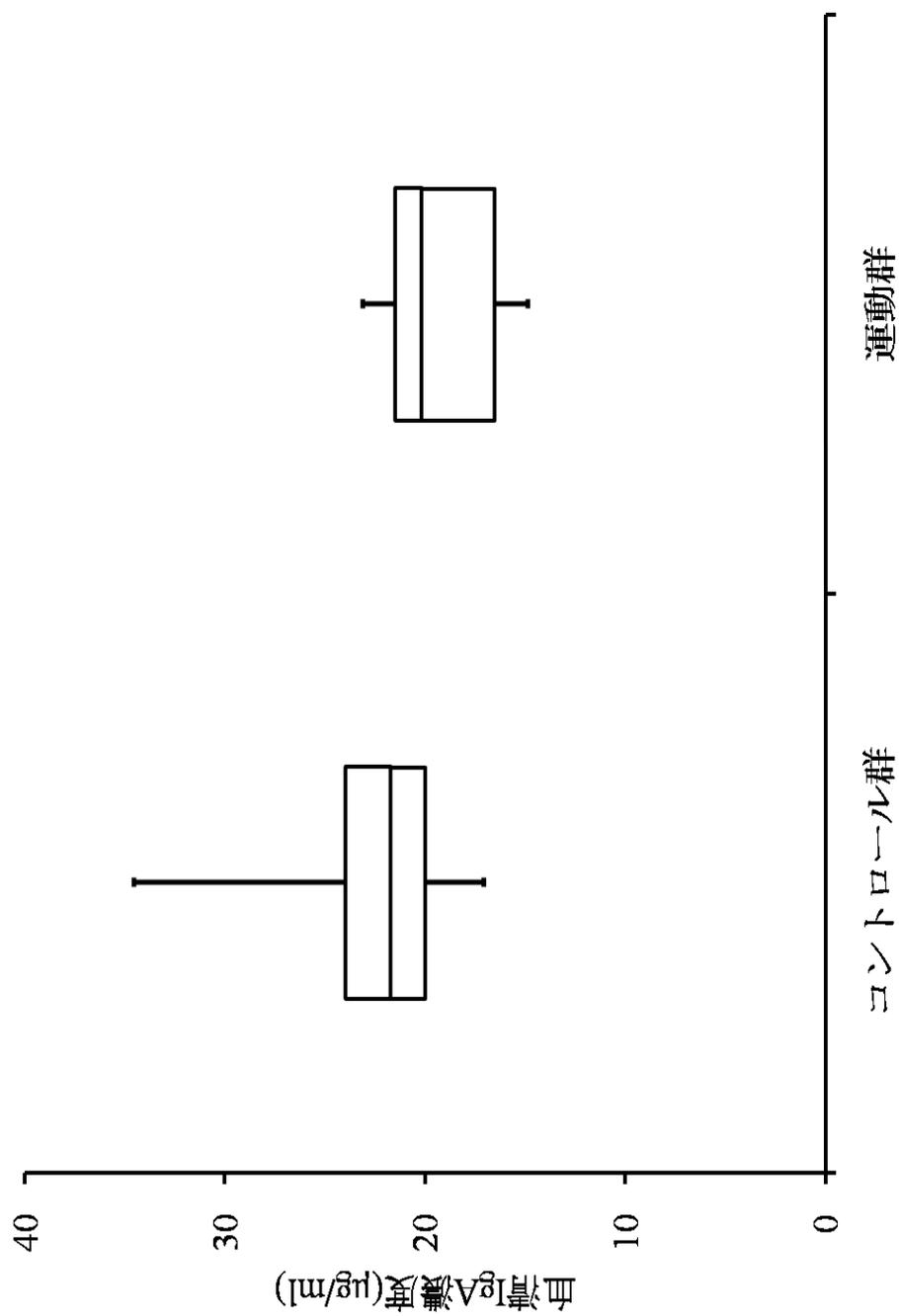


図 3

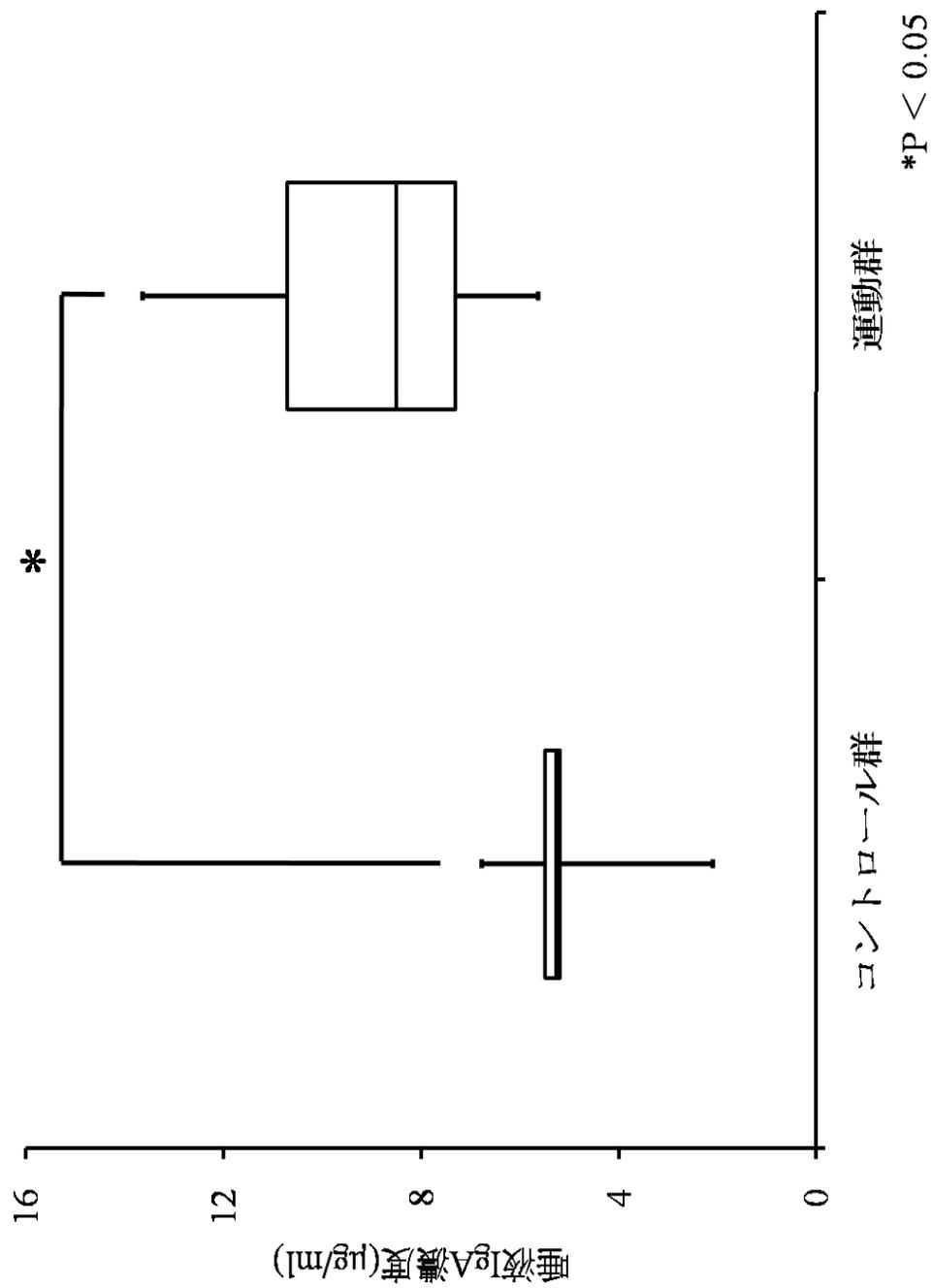


図4

図 5

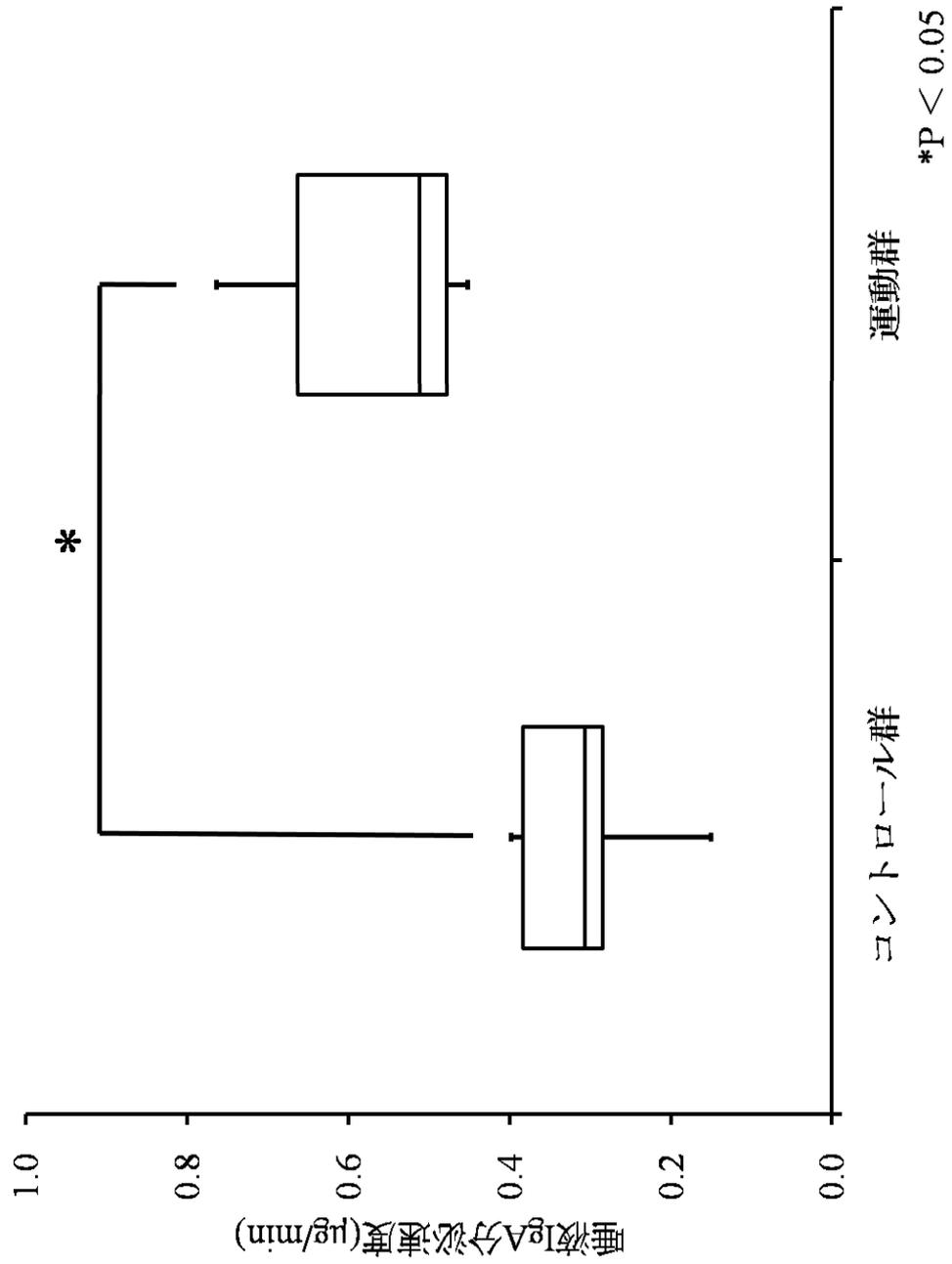


図 6

