

## アレルギー反応におけるストレスの影響

林千嘉子,\* 片岡裕美, 扇間昌規, 伊藤誉志男  
武庫川女子大学薬学部

## Effects of Stress on Allergic Reaction

Chikako HAYASHI,\* Hiromi KATAOKA, Masanori SEMMA, and Yoshio ITO  
*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University,  
11-68 Koshien Kyuban-cho, Nishinomiya 663-8179, Japan*

(Received May 8, 2001; Accepted July 6, 2001)

The purpose of the present study was to investigate the effects of stress on allergic reaction. We studied changes in the contact hypersensitivity reaction (CHR) of mice exposed to foot shock (FS) stress or psychological (PSY) stress induced by the communication box. CHR was elicited by applying antigen (2,4-dinitrofluorobenzene, DNFB) to the ear of the mice at 4 days after DNFB sensitization. In acute stress experiments, DNFB-sensitized mice were exposed for 2 h to FS or PSY stress after contact challenge with DNFB. Acute FS stress significantly inhibited CHR immediately after the end of the stress period (3 h after DNFB-challenge), and a significant enhancement of the CHR was observed at 5 h after DNFB-challenge. The concentration of the serum corticosterone level of the mice exposed to acute FS stress significantly increased compared to the control mice, immediately after stress loading. Both CHR and serum corticosterone levels after acute PSY stress loading were almost the same as those of the control groups. The temporary decrease of the inflammatory reaction at CHR caused by acute FS stress loading may have been correlated with serum corticosterone produced by the stress, and the increase of corticosterone may act as a trigger of enhancement of the CHR (delayed-type hypersensitivity). Chronic stress experiments were designed to expose mice to FS or PSY stress 2 h daily after sensitization with DNFB. These chronic stresses caused a significant reduction in the body weight of mice. The temporary decrease effect on the CHR of chronic FS stress-loaded mice was similar to the acute FS stress-loaded mice. In contrast, no significant enhancement of the CHR (late phase) at 24 h and 48 h after challenge was observed. Although the changes in body weight suggested that mice were influenced by chronic PSY stress, no significant difference from the control group for the CHR of mice exposed to chronic PSY stress was found, as in the case of acute PSY stress loading. The correlation between chronic PSY stress and CHR remains to be ascertained.

**Key words**—contact hypersensitivity reaction; foot shock stress; psychological stress; corticosterone

## 緒 言

アレルギー疾患の発症には、遺伝因子に加えて様々な環境因子が関与している。環境因子としてアレルギー性食品の増加や大気汚染などが挙げられるが、特に近年、社会の複雑化によって増大したストレスが注目されている。

種々の身体的及び心理的ストレスは、視床下部—下垂体—副腎系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA 系) と自律神経系を介した2つの経路によりアレルギー反応や免疫機能に影響している。<sup>1)</sup> 一般にストレスは HPA 系を介したグルココルチコイドの分泌増加により、免疫系を抑制する方向に作用することが知られている。ナチュラルキ

ラー (natural killer; NK) 細胞活性の抑制による癌抵抗力の低下や、抗体産生反応やリンパ球幼若化反応の抑制による感染症の罹患率の増加などがその例である。

しかし一方で、ストレスにより気管支喘息や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。<sup>2)</sup> 近年、アレルギー疾患の急激な増加に伴いこのような臨床例が数多く報告されているが、その機序に関しては十分解明されていない。

そこで著者らは、アレルギー反応に及ぼすストレスの影響について、マウスの接触過敏反応 (contact hypersensitivity reaction; CHR) を指標にして検討した。ストレスラーとしてコミュニケーションボックス<sup>3)</sup>を用い、身体的、肉体的ストレスを与え

る電気刺激ストレス，及び心理的ストレスを急性又は慢性的に負荷した時，CHRはどのように変化するかについての基礎的な研究を行った。

### 実験材料及び方法

**1. 動物** SPFの7週齢 ddY 系雄性マウス（日本 SLC 株式会社）を用いた。なお，実験に際し動物は「武庫川女子大学動物実験指針」に基づいて取り扱われた。

**2. 試薬** アセトン（和光純薬株式会社製の特級品）を，オリーブ油（日本薬局方適合品）及び 2,4-ジニトロ-1-フルオロベンゼン（DNFB）はそれぞれ丸石製薬株式会社製，ナカライテスク株式会社製を用いた。また，コルチコステロン及びコルチゾールはそれぞれ東京化成工業株式会社，Sigma 社より購入した。

**3. CHR の誘発** 剃毛したマウスの背部に，アセトン：オリーブ油（4：1）に溶解した 0.5% の DNFB を 100  $\mu$ l 塗布することによりマウスを感作し，4 日後，0.5% DNFB/アセトン：オリーブ油（4：1）溶液 20  $\mu$ l を右耳に塗布することにより惹起した。また，溶媒自身の影響の有無を確認するため，左耳にはアセトン：オリーブ油（4：1）溶液のみを塗布した。惹起後，経時的に耳の厚さを測り，惹起前の厚さと比較して浮腫率を算出した。本実験はすべて，日内変動の影響を考慮して感作及び惹起操作を午前 9：00 に行った（Fig. 1）。

**4. ストレスの負荷** ストレッサーとしてコミュニケーションボックス装置（東洋産業株式会社製）を用いた（Fig. 2）。装置は床に刺激電流が流れるステンレス製のグリッドが敷いてあり，透明の仕切り板によって 9 区画に分割されている（各区画は 10 cm  $\times$  10 cm，コミュニケーションボックスの高さは 40 cm）。それぞれの区画は直接電気刺激を受ける区画 a と，プラスチック製のショック回避プレート（プラスチック製のショック回避プレート）を敷くことにより電気刺激を受けない区画 b を交互に配置した。マウスは各区画に 1 匹ずつ入れた。区画 a のマウスは，直接電気刺激されることにより身体的，肉体的ストレスを受けることとなる（電気ショック（foot shock），FS ストレス負荷マウス）。区画 b のマウスは，直接電気刺激を受けないが隣接する FS ストレス負荷マウスの飛び跳ねやもがき，悲鳴，排尿，排便などの情動反応にさらされることにより，不安や恐れなどの心理的ストレスを受けることとなる（心理的（psychological），PSY ストレス負荷マウス）。なお，繰り返して PSY ストレスを負荷（区画 b）する場合は，区画 a の FS ストレス負荷マウス（PSY ストレス負荷マウスに情動反応を提供するために用いる）は同じ個体を用いると FS に対して馴化，感受性の低下をきたすため，毎回新しいマウスを用いた。動物は，午前 9：15 に装置内に入れ，15 分間装置に馴化させた後，2 時間（9：30～11：30）ストレスを負荷した。電気刺激は，タイマーにより 60 秒間のうち 10 秒間だ

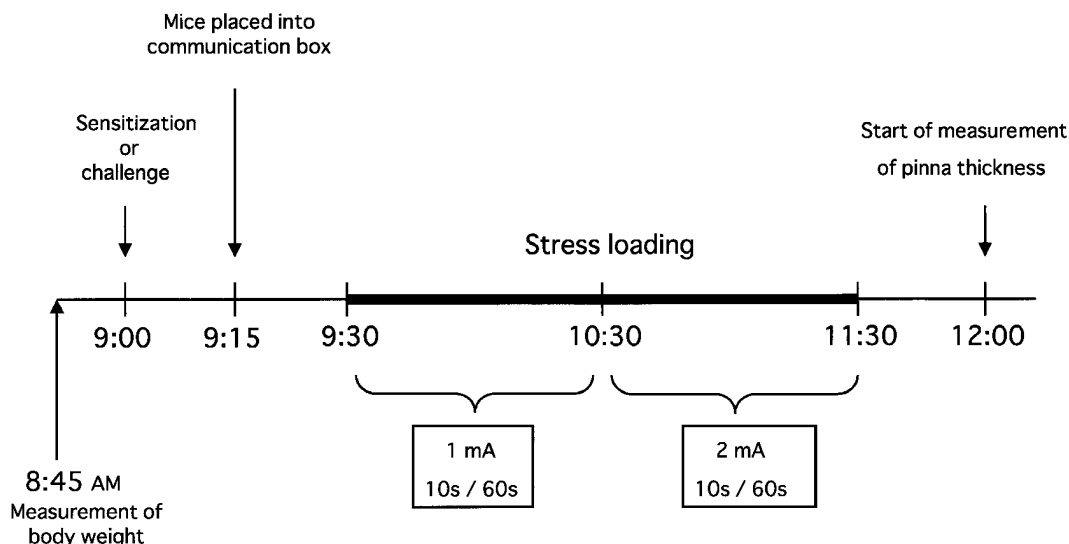


Fig. 1. Experimental Schedule of the CHR and Stress Loading  
See text for further details.

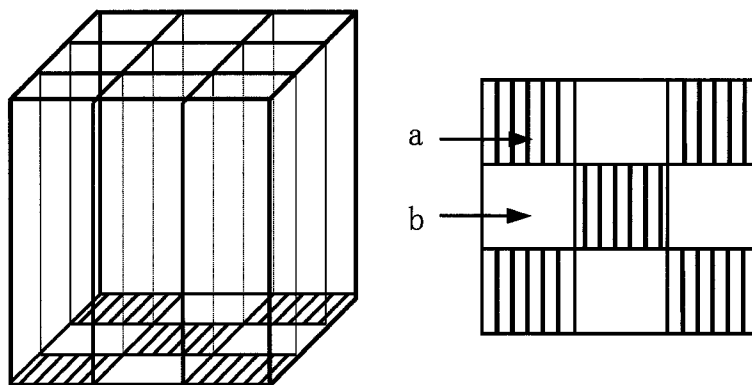


Fig. 2. Schema of the Communication Box

Foot shock (FS) stress-loaded mice were placed individually into the five shaded areas (a) and FS was delivered through the floor grids. Psychological (PSY) stress-loaded mice were placed into the four solid areas (b) insulated by plastic plate. They were prevented from receiving the direct foot shock, but exposed to various emotional conditioned stress from FS stress-loaded mice.

け電気が流れるようにセットし、電流はショックジェネレーターを用いて最初の1時間は1 mA、次の1時間は2 mAとなるように強度を調節した (Fig. 1). コントロール群の動物は、試験群の動物がストレスに暴露されている期間中もホームケージで飼育するが、午前9:15から11:30まで飼料、及び水を与えなかった。なお、照明は、通常の実験室で使用している蛍光灯の下で行った。

本研究ではアレルギー反応を惹起した直後に1回だけFSあるいはPSYストレスを負荷した場合を急性FSストレス負荷マウス、又は急性PSYストレス負荷マウス、感作した日から6日間、繰り返しFSあるいはPSYストレスを負荷した場合をそれぞれ、慢性FS又は慢性PSYストレス負荷マウスとした。また、慢性PSYストレス負荷実験では、前述したようにPSYストレス負荷マウスに情動反応を提供するマウス (区画a) は、慢性PSYストレス負荷を行うたびに毎日新しいマウスを用いた。

**5. 血清中コルチコステロン量の測定** エーテル麻酔下、マウスの心臓より採血し、10000 r.p.m.で20分間遠心分離を行い血清を得た。直ちに測定しない場合は測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。内標準としてコルチゾールを用いた。2%メタノール/生理食塩水にて $5\mu\text{g/ml}$ に調製した内標準を $50\mu\text{l}$ 加えた血清 $0.4\text{ ml}$ に、 $2\text{ ml}$ の酢酸エチルを加えて5分間振とうした。上層を分取し、 $45^{\circ}\text{C}$ の水浴上で窒素ガスにて溶媒を蒸発乾固した。残渣を移動相 $50\mu\text{l}$ に溶解したものを試験溶液とし、UV検出器付高速液体クロマトグラフィー (UV-HPLC) で測定し

た。UV波長は $242\text{ nm}$ 、カラムは室温でCrestpak C18S ( $4.6\text{ mm i.d.} \times 150\text{ mm}$ )を用いた。なお、移動相はメタノール:水(55:45)、流速 $0.8\text{ ml/min}$ 、1回の注入量は $25\mu\text{l}$ とした。検量線は、 $0.05\mu\text{g/ml} \sim 5\mu\text{g/ml}$ の範囲で $R^2=0.999$ 以上の良好な直線性を示した。

**6. 統計処理** データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。また、試験群とコントロール群の間の有意差検定は、FisherのPLSDテストを用いて行った。

## 結果及び考察

**1. CHRに対するコミュニケーションボックス自体の影響** CHRは惹起誘発後1-2時間目(即時相)と、24-48時間(遅発相)に耳介腫脹のピークを示す抗原特異的な2相性の反応である。初めに、マウスのCHRに対して、コミュニケーションボックスそのものによる影響がないかどうかについて調べた。アレルギー反応惹起後、ストレス負荷期間中、そのままホームケージで飼育したマウスをホームケージコントロール群、コミュニケーションボックスのコンパートメントaに入れるがFSを与えないマウスをコントロールa群、同様に、コンパートメントbに入れるがPSYストレスを与えないマウスをコントロールb群とし、DNFBによる耳介浮腫率を測定した。その結果、コントロールa群及びコントロールb群の両者においてホームケージコントロール群との間に有意な変化は観察されなかった (Fig. 3)。そこで、マウスCHRに対するコミュニケーションボックスそのものの影響はな

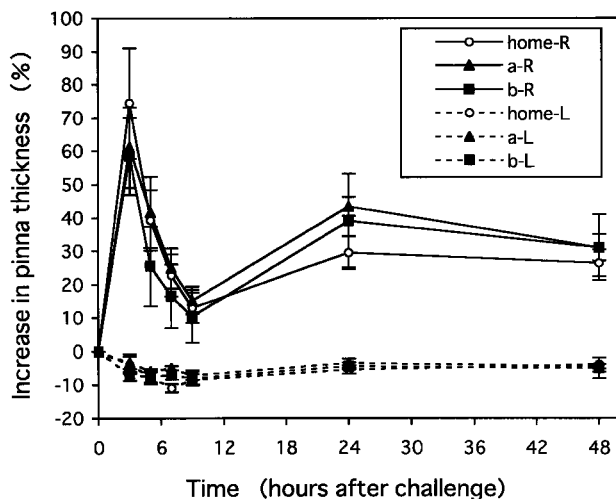


Fig. 3. Effect of the Communication Box Itself on the CHR  
All mice were sensitized with 100  $\mu$ l of 0.5% DNFB in acetone-olive oil (4 : 1) to the shaved dorsal skin on day 0. Four days after sensitization, the mice were challenged on the right pinna (R) with 20  $\mu$ l of 0.5% DNFB in acetone-olive oil (4 : 1). Acetone-olive oil (4 : 1) (20  $\mu$ l) as a vehicle was also painted to the left pinna (L). These mice were placed into the home cage or the communication box. These mice in the communication box did not receive either FS nor PSY stress. Each symbol represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 4\sim 5$ /group). home: home cage, a: compartment "a", b: compartment "b".

いとみなし、以後は、すべての試験群に対するコントロールとしてホームケージコントロール群を用いた。なお、実験を通して、溶媒のみを塗布した左耳に浮腫は観察されなかった。

**2. CHR に対する急性 FS 及び急性 PSY ストレスの影響** あらかじめ感作したマウスに、惹起直後の 2 時間、急性ストレスを負荷した時の耳介浮腫率の変化を測定した (Fig. 4)。急性 FS ストレス負荷群において、ストレス負荷期間終了から 30 分後 (すなわち惹起後 3 時間目、以下ストレス負荷直後と呼ぶ) の浮腫は有意に抑制された。その後、耳介浮腫は惹起の 5 時間目から、コントロール群と比較して有意な増強が観察された。一方、急性 PSY ストレス負荷群ではコントロール群と比較して顕著な CHR の変化は観察されなかった。

次に急性ストレス負荷直後 (12 : 00) にマウスから採血し、血清中コルチコステロン濃度を測定した。その結果、Fig. 5 に示したように急性 FS ストレス負荷群のコルチコステロン濃度はコントロール群と比較し、有意に高値を示したが、急性 PSY ストレス負荷群に変化は認められなかった。

ストレスは一般的に神経系及び内分泌系を介して生体に様々な影響を及ぼすが、免疫系に対しては、

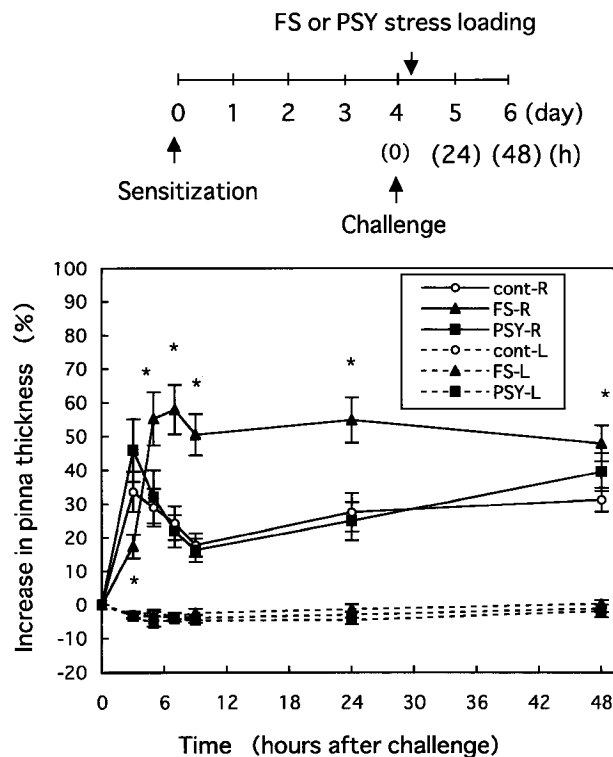


Fig. 4. Effect of Acute Stress on the CHR  
All conditions of induction of the CHR were same as described in Fig. 3. After DNFB challenge, mice were exposed for 2h to either FS or PSY stress. Control mice were left undisturbed in their home cages. Each symbol represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 12\sim 15$ /group). \*:  $p < 0.05$  vs control (Fisher's PLSD test).

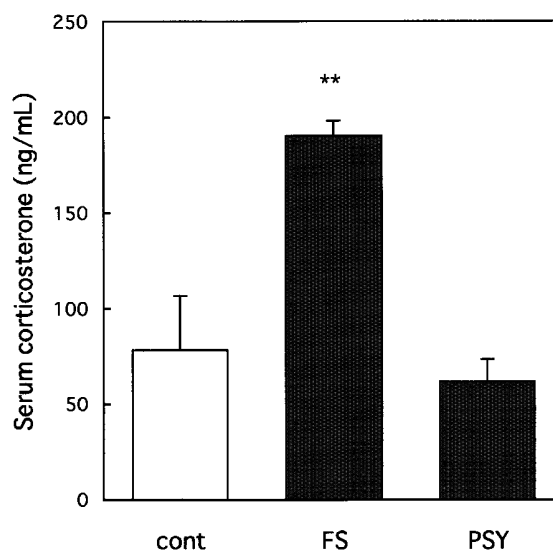


Fig. 5. Changes of Serum Corticosterone Levels in Stress-Loaded Mice  
All conditions of induction of the CHR were same as described in Fig. 3. After DNFB challenge, mice were exposed for 2h to either FS or PSY stress. Control mice were left undisturbed in their home cages. Serum was prepared 30 min after the stress period. Data represent the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3\sim 4$ /group). \*\*:  $p < 0.005$  vs control (Fisher's PLSD test).

その機能を抑制する方向に作用するといわれている。例えば、マウスに4時間の拘束ストレスを負荷した実験で、遅延型過敏反応、NK活性及びマクロファージの貪食作用が抑制されたという報告や、<sup>4)</sup> 拘束ストレスを負荷したマウスにオボアルブミン(OVA)で感作したところ、OVA特異的IgEの産生がコントロール群と比較して抑制されたという報告<sup>5,6)</sup>がある。また、コルチコステロンはげっ歯類においてストレス時に上昇するストレスホルモンとして知られており、ストレスによる免疫機能の抑制にはこのコルチコステロンが大きく影響していると考えられている。一方、このような報告に対し、臨床的にはストレスがアレルギー疾患の発症や増悪に影響していること、ステロイド剤の長期投与によりIgE値が上昇すること<sup>7)</sup>も報告されている。

本研究結果から急性FSストレスにより、遅延型過敏反応の1つであるCHRが増強され、FSストレス負荷直後には一過性の耳介浮腫の抑制が観察され、この間に血清中コルチコステロン濃度が上昇していることが確認された。本結果は、ラットにおけるコミュニケーションボックスを照明下で用いた実験において、FSストレス負荷後1—3時間に血漿中のコルチコステロン濃度が高値を示しその後低下するという報告<sup>8)</sup>並びに、拘束ストレス負荷ラットで有意なDNFB耳介浮腫の増強が観察されるが副腎摘出ラットではその増強が観察されないこと、またコルチコステロンを急性投与したラットは、DNFB耳介浮腫が有意に増強され、同時にリンパ節内のヘルパーT細胞数が上昇するという報告<sup>9)</sup>からも裏付けられた。

これらの結果を総合すると、本研究はこれらの知見が1つの生体反応として証明されたものである。すなわち、急性FSストレスによりコルチコステロンが産生され、この直接作用によって、ストレス負荷直後に一過性の炎症抑制効果が観察され、その後、このコルチコステロンがCHR増強の引き金の1つとして作用したことが推定された。ストレスはその種類や強さ、頻度によって生体に及ぼす影響は様々であるが、本結果ではFSストレス負荷による影響が再現性良く観察されており、アレルギーや免疫反応に及ぼすストレスの影響を解明していく上で重要な基礎データになるものと思われる。

### 3. CHRに対する慢性FS及び慢性PSYストレ

スの影響 感作した日から毎日1日2時間のストレスを繰り返し負荷することによる慢性ストレスがCHRに及ぼす影響を観察した。Figure 6に示したように慢性FSストレス負荷群では、コントロール群と比較してDNFBによる耳介浮腫の増強が惹起後7時間目と9時間目に観察されたが、惹起から24及び48時間後の浮腫の増強に有意な差は認められなかった。また、急性FSストレス負荷時と同様にストレス負荷直後の浮腫は有意に抑制された。一方、慢性PSYストレス負荷の場合は、耳介浮腫に有意な変化は観察されなかった(Fig. 7)。

次に本慢性ストレス負荷条件がマウスに対して本当にストレスとなっているのかを検討するための指標として、慢性ストレス負荷時のマウスの体重変化を観察し、Fig. 8に示した。まず、(a)に示したように正常マウスをコミュニケーションボックスに入れただけでは、コミュニケーションボックス内のマウスとホームケージマウス間の体重変化に有意な差は観察されなかった。一方、慢性FSストレス負荷群では体重の減少がストレス負荷開始より2日目以

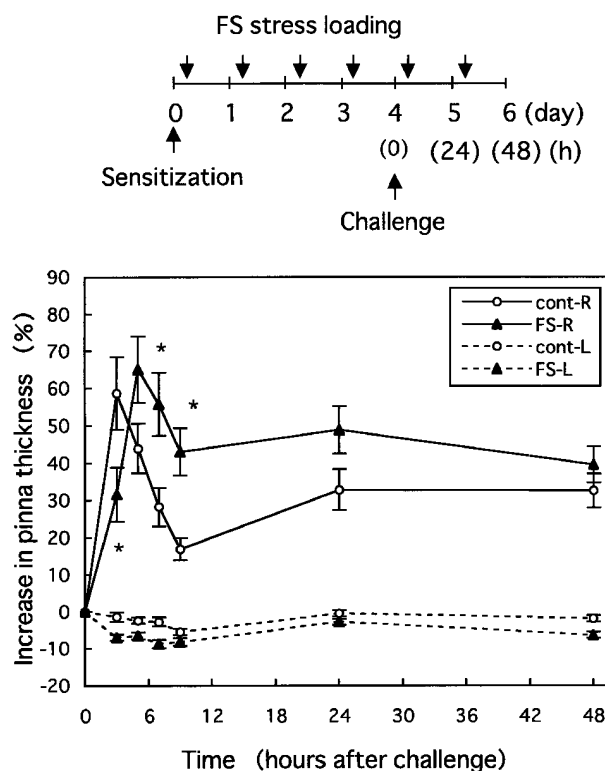


Fig. 6. Effect of Chronic FS Stress on the CHR

All conditions of induction of the CHR were same as described in Fig. 3. cont: Mice were left in their home cages. FS: Mice were exposed for 2h daily to FS stress. Each symbol represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=16\sim18$ /group). \*:  $p<0.05$  vs control (Fisher's PLSD test).

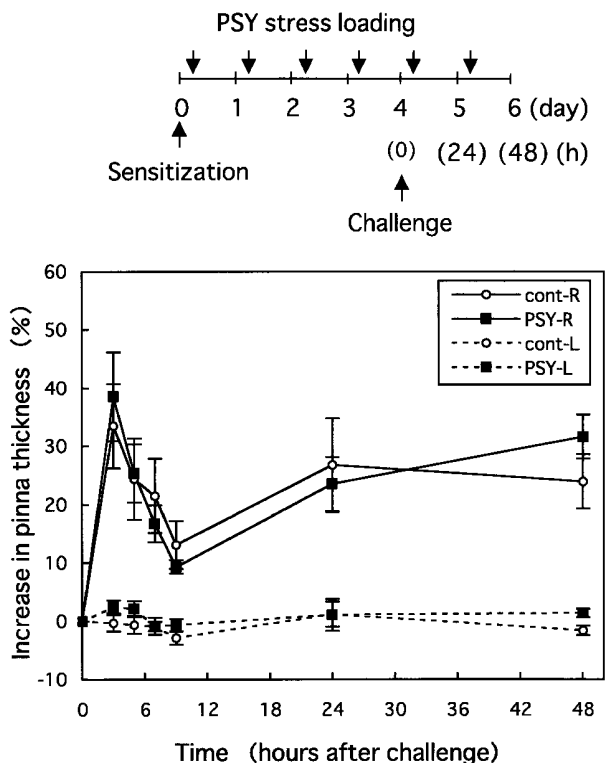


Fig. 7. Effect of Chronic PSY Stress on the CHR  
 All conditions of induction of the CHR were same as described in Fig.3. cont: Mice were left in their home cages. PSY: Mice were exposed for 2h daily to PSY stress. Each symbol represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=7\sim 10$ /group).

降認められ、コントロール群と比較して体重増加が有意に抑制された(b)。また、PSYストレス負荷群においてはストレスを負荷した翌日から体重が有意に減少したが、その後回復傾向を示した(c)。これらの体重変化から、本実験における慢性FSストレス負荷、及び慢性PSYストレス負荷条件は、マウスに対してストレスとなっていることが推察された。

以上の慢性ストレス負荷実験を総合すると、慢性FSストレス負荷はストレス負荷直後では急性FSストレス負荷と類似のCHRへの影響を示したが、惹起から24及び48時間目のCHRへの影響は明確ではなかった。本実験条件では、24時間目と48時間目の測定の直前にもFSストレスを負荷しているので、その直前のストレス負荷により一過性の腫脹抑制が起こった結果、増強されていた腫脹が相殺された可能性が示唆された。本考察の証明にはさらなる研究が必要である。慢性PSYストレス負荷の場合は、マウスの体重減少からマウスにストレスが負荷されていることは明らかと考えられるが急性PSYストレス負荷時と同様にCHRに対するPSYストレスの顕著な影響を観察することはできなかった。

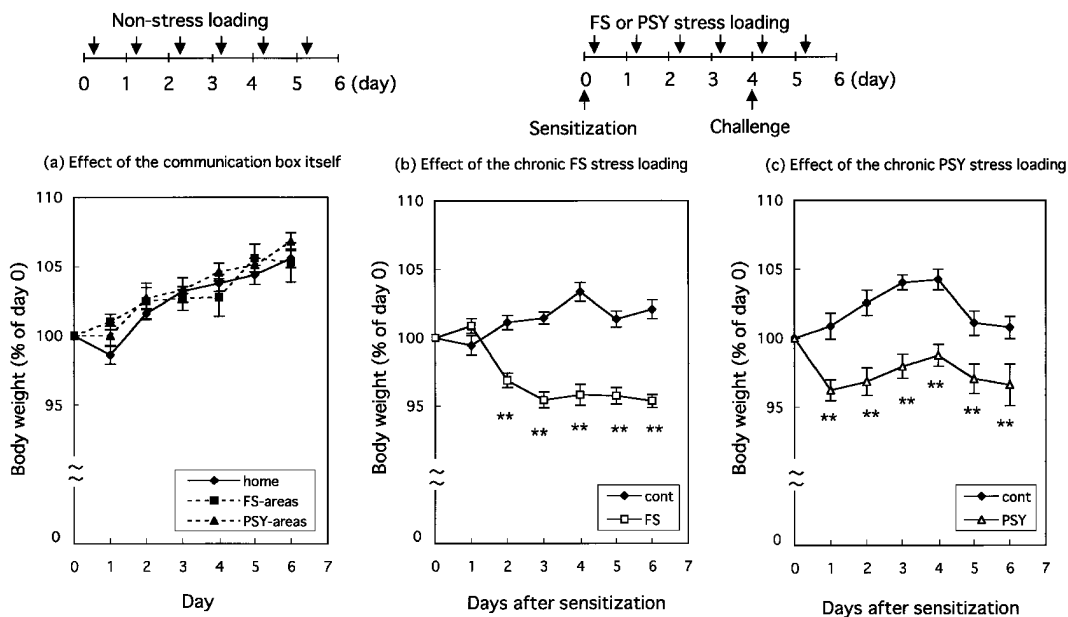


Fig. 8. Changes in Body Weight of Mice Exposed to Chronic Stress  
 (a) Effect of the communication box itself: home, Normal mice were left in the home cage. FS-areas or PSY-areas, Normal mice were placed into the communication box. These mice did not receive either FS nor PSY stress ( $n=4\sim 5$ /group). (b) Effect of the chronic FS stress loading: cont, Sensitized mice were left in their home cages. FS: Sensitized mice were exposed for 2h daily to FS stress ( $n=16\sim 18$ /group). (c) Effect of the chronic PSY stress loading: cont, Sensitized mice were left in their home cages. PSY: Sensitized mice were exposed for 2h daily to PSY stress ( $n=7\sim 10$ /group). Each symbol represents the mean  $\pm$  S.E. \*\*:  $p < 0.005$  vs control (Fisher's PLSD test).

実社会では、生活習慣や社会機構の変化、人間関係の複雑化によって生じる心理的社会的ストレスが増大し、慢性的に生じることが多い。しかし、動物実験におけるストレス、特に慢性ストレスは、その定義付けが難しく、動物の知的レベルやストレスの感受性などに大きく影響されると考えられる。コミュニケーションボックスを用いた本研究結果は、ストレスによりアレルギー反応が増悪される可能性を示した。今後は本知見を基礎に、心理的なストレス負荷方法とその応用に関して、さらに詳細な検討をする必要があると考えられる。

**謝辞** 本研究を行うに当たり、種々の御助言を賜りました武庫川女子大学薬学部・篠塚和正教授に深謝いたします。

## REFERENCES

- 1) Hori T., *Meneki • Immunology Frontier*, **8**, 333–341 (1998).
- 2) Kubo C., *Allergy*, **45**, 1–4 (1996).
- 3) Ogawa N., Kawahara K., *Jpn. J. Psychosom. Med.*, **6**, 352–357 (1966).
- 4) Okimura T., Ogawa M., Yamauchi T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **41**, 229–235 (1986).
- 5) Fukui Y., Sudo N., Yu X., Nukina H., Sogawa H., Kubo C., *J. Neuroimmunol.*, **79**, 211–217 (1997).
- 6) Loureiro I., Wada C. Y., *Physiol. Behav.*, **53**, 417–420 (1993).
- 7) Kimata H., Lindley I., Furusho K., *J. Immunol.*, **154**, 3557–3566 (1995).
- 8) Ishikawa M., Hara C., Ohdo S., Ogawa N., *Physiol. Behav.*, **52**, 475–480 (1992).
- 9) Dhabhar S. F., McEwen B. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 1059–1064 (1999).