

# Dextran Sulfate Sodium による急性期炎症性腸疾患ラットのタンパク質 飼料およびグルタミン添加によるリンパ球 CD4/CD8の発現率の変動

広井 祐三<sup>1\*</sup> 宮崎 瞳<sup>1\*</sup> 蓑原 真弓<sup>1\*</sup>  
林 加奈子<sup>1\*</sup> 森口 覚<sup>2\*</sup>

## Nutritional Effects of Proteins and Dietary Supplementation with Glutamine on Changes of Percentage Expression of CD4 and CD8 in Rats with Dextrane Sulfate Sodium-Induced Acute Colitis

<sup>1\*</sup>Yuzo Hiroi <sup>1\*</sup>Hitomi Miyazaki <sup>1\*</sup>Mayumi Minohara,  
<sup>1\*</sup>Kanako Hayashi <sup>2\*</sup>Satoru Moriguchi  
(2005年11月29日受理)

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) は狭義には潰瘍性大腸炎とクローン病を指すが、広義には感染性腸炎など原因の特定されるものを指す。20歳前後に発症し一度発症すると寛解と再燃を繰り返して完治が困難なため、長期にわたる栄養療法が重要であり、年余に渡り QOL の傷害をもたらす疾病である。現在、日本では前者は6万人、後者は2万人弱でなお増加傾向にあるといわれる。原因としては腸管における炎症異常がこれらの症状に大きくかかわっていて、腸局所の免疫反応と炎症持続が生じる。<sup>1) 2)</sup>

病因解明と治療方法の確立を目的として、これまで trinitrobenzen sulfonic acid (TNBS) で腸炎を誘発したラットの組織損傷が、少量のグルタミンの投与でそれが軽減することが報告されている。<sup>3) 4)</sup> しかし、多量のグルタミンの投与は組織損傷を増加させることも報告されている。<sup>5)</sup> 食事療法は一般的には低脂肪と低残渣が基本である。脂質の摂取に重点を置かれていて、タンパク質の種類には注意が払われていない。

今回、タンパク質飼料およびグルタミン添加による栄養条件が dextran sulfate sodium により誘発させた急性の炎症性腸疾患モデルラットのリンパ球サブセット (CD4・CD8) に及ぼす影響について

検討した。

### 実験方法

#### 1. 試薬および生化学用品

固型飼料 (CE-2) は日本クレア(株) (東京) より購入した。ミネラル混合 (AIN 76), 及びビタミン混合 (AIN 76) はオリエンタル酵母(株) (東京) より購入した。dextrane sulfate sodium 5000 (DSS, 分子量5千) はSigma(株)より購入した。ラットは九動(株) (佐賀県鳥栖市) より購入した。グルテンは和光純薬工業(株) から購入した。

#### 2. 動物の飼育

離乳直後 (3週齢) のウイスター系雄性ラット (約50g) に固形飼料を1週間自由摂取させた後、各実験飼料を3週間自由摂取させた。すなわち、1) 20% カゼイン飼料, 2) 20% グルテン飼料, 3) 20% カゼイン飼料にグリシン添加 (46.9g/kg, グリシン群), 4) 20% casein 飼料にグルタミン添加 (40g/kg, グルタミン群) である (Table 1)。また各飼料とも20%カゼイン飼料と等窒素量, 及び等エネルギー量となるように調製した。

炎症性腸疾患モデルラットは、3% dextran sul-

別刷請求先：広井祐三，中村学園大学栄養科学部，〒814-0198 福岡市城南区別府5-7-1

E-mail : yhiroii@nakamura-u.ac.jp

1\* 中村学園大学栄養科学部栄養科学科栄養生化学教室 2\* 山口県立大学生生活科学部栄養学科

fate sodium (DSS) 添加水を実験飼料投与2週間から1週間自由摂取させ作成した(図1実験のデザイン)。対照群および3%DSS投与中以外は蒸留水を与えた。ラットの飼育は中村学園大学アニマルセンターで飼育した。朝7時から夜7時を明時間とし、明暗のサイクルは12時間として、20~22℃の条件で管理し個別のケージで飼育した。実験は午前9から12時の間に行なった。

3. CD4 および CD8 リンパ球の測定方法

採血後、蛍光標識したモノクローナル抗体 mouse anti rat CD4 FITC または CD8 FITC (大日本製薬) とインキュベートし、FACS lysing solution (Becton Dickinson) を加え溶血させた。PBS で洗浄後、パラホルムアルデヒドで固定し、FACS Calibur (Becton Dickinson) でリンパ球10,000個当たりの抗原を発現する細胞割合を測定した。解析には Cell Quest を使用し、結果はパーセントで示した。

結 果

1. カゼイン飼料群およびグルテン飼料群の生存率、摂取飼料およびタンパク効率

図2に示したように、グルテン飼料の生存率が100% (10匹中10匹生存) に対して、カゼイン飼料ではDSSを1週間投与後2日目に死亡し、80% (10匹中8匹生存) に減少した。体重およびPER (タンパク効率) をTable2に示した。体重を比較すると、グルテン群はカゼイン群の約50%であった。

2. グリシン添加カゼイン飼料群およびグルタミン添加カゼイン飼料群の生存率

図3に示したように、両飼料群ともにDSS投与7日目から死亡が確認され、グリシン飼料群は生存

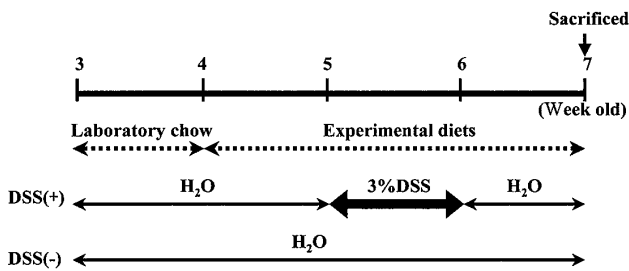


図1 実験のデザイン

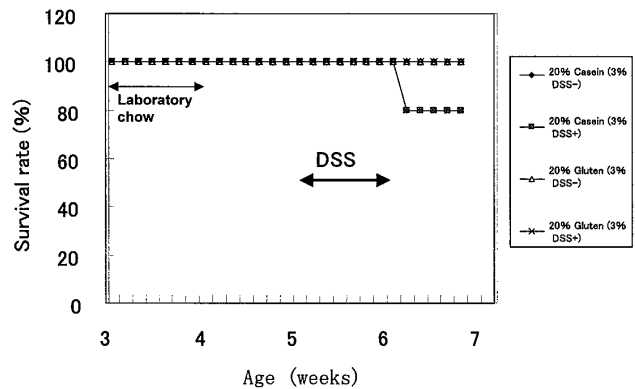


図2 Dextrane Sulfate Sodium 投与によるカゼイン飼料群およびグルテン飼料群の生存率

Table 1 Composition of experimental diets (g/kg)

Ingredient	20% Casein	20% Gluten	20% Casein	
			+Gly	+Gln
Casein	200	-	200	200
Gluten	-	200	-	-
Glycine	-	-	41.1	-
Glutamine	-	-	-	40
Carbohydrate	668	668	626.9	628
Corn oil	50	50	50	50
Mineral mixture	50	50	50	50
Vitamin mixture	10	10	10	10
Vitamin mixture (V.B <sub>6</sub> -)	-	-	-	-
Cellulose	20	20	20	20
Choline chloride	2	2	2	2

Carbohydrate, α-Cornstarch : sucrose, 2:1 ratio.

率は30% (10匹中3匹生存), グルタミン飼料群では40% (10匹中4匹生存)であった。アミノ酸の添加によって生存率が激減した。

### 3. カゼイン飼料群およびグルテン飼料群の体重変化

図4に示したように, カゼイン飼料群およびグルテン飼料群の体重変化を示した。カゼイン飼料群が順調な体重増加を示すのに対し, グルテン飼料群はわずかな体重増加しか認められなかった。飼料摂取量に有意差が認められたため, グルテン飼料摂取と同じ摂取量にした pair-feeding を行ったが, グルテン飼料を摂取したラットの体重はカゼイン飼料に比べて有意に軽かった。また, DSS 投与による体重への影響はほとんどみられなかった。

### 4. 体重変化

図5に示したように, グリシン添加カゼイン飼料

群およびグルタミン添加カゼイン飼料群の体重変化は, 両飼料群とも DSS 投与期間中にやや体重増加量の減少がみられたが, 大きな影響は無く, 順調な体重増加を示した。

### 5. CD 4 および CD 8 の発現率

Table 3 に, CD 4 および CD 8 リンパ球の発現率の測定結果を示す。カゼイン飼料群とグルテン飼料群を比較すると, CD 4 陽性細胞の割合に差は認められなかった。CD 8 陽性細胞では, カゼイン飼料に比べ, グルテン飼料が有意に高値を示し, また DSS 投与によりやや高くなる傾向がみられた。このことから, CD 4 /CD 8 の比はグルテン飼料で低く, DSS 投与によりさらに低値を示した。

グリシン飼料群とグルタミン飼料群では, CD 4 および CD 8 陽性細胞の割合に有意差はみられなかったが, DSS を投与したグルタミン飼料群の CD 4 /

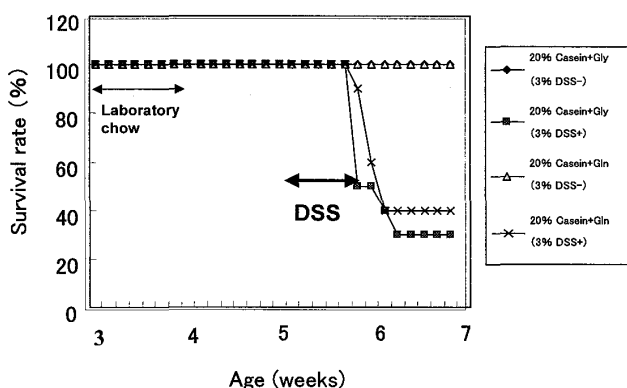


図3 Dextrane Sulfate Sodium 投与によるグリシン添加およびグルタミン添加カゼイン飼料群の生存率

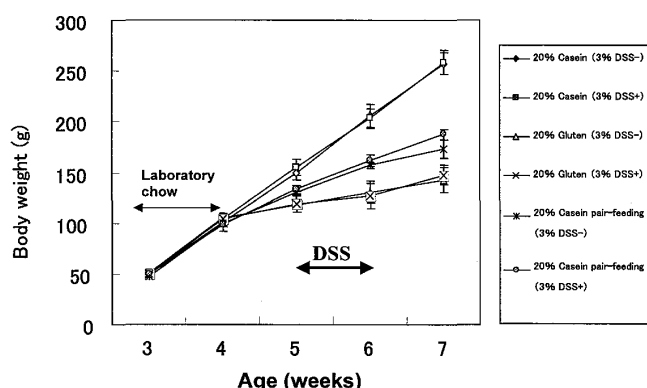


図4 Dextrane Sulfate Sodium 投与によるカゼイン飼料群およびグルテン飼料群の体重変化と pair-feeding の体重変化への影響

Table 2 Growth parameters

			Body weight gain (g/3W)	Food intake (g/3W)	Protein efficiency ratio (PER)
3% DSS					
20% Casein	(-)	n=10	211.1±9.85 <sup>a</sup>	384.1±25.8 <sup>a</sup>	2.75±0.10 <sup>a</sup>
	(+)	n=8	202.3±12.2 <sup>a</sup>	360.9±29.1 <sup>a</sup>	2.81±0.12 <sup>a</sup>
20% Gluten	(-)	n=10	94.8±11.6 <sup>b</sup>	265.9±37.0 <sup>b</sup>	1.79±0.15 <sup>b</sup>
	(+)	n=10	99.8±8.82 <sup>b</sup>	280.3±27.1 <sup>b</sup>	1.79±0.06 <sup>b</sup>
20% Casein+Gly	(-)	n=10	213.3±12.5 <sup>a</sup>	377.6±23.5 <sup>a</sup>	2.83±0.14
	(+)	n=3	200.1±8.50 <sup>a</sup>	352.4±0.62 <sup>a,c</sup>	2.84±0.12
20% Casein+Gln	(-)	n=10	226.4±9.65 <sup>b</sup>	415.8±14.9 <sup>b</sup>	2.72±0.10
	(+)	n=4	208.7±3.14 <sup>a</sup>	388.8±9.23 <sup>a,d</sup>	2.69±0.07

Values are mean±SD. Values without a common superscript letter are significantly different when tested by unpaired t test

Table 3 Percentage expression of CD 4 and CD 8 positive cells

Diet	3% DSS		CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8
20% Casein	(-)	n=6	57.36±10.37	17.03± 3.54 <sup>a</sup>	3.56±1.21 <sup>a</sup>
	(+)	n=7	59.58±14.00	22.86± 4.17 <sup>b</sup>	2.67±0.77 <sup>a,c</sup>
20% Gluten	(-)	n=6	61.43±13.73	27.60± 6.74 <sup>c</sup>	2.29±0.52 <sup>b,c</sup>
	(+)	n=9	60.58±17.02	33.19±12.97 <sup>c</sup>	2.12±1.05 <sup>a</sup>
20% Casein+Gly	(-)	n=6	43.76±13.84	22.79±11.77	2.09±0.52 <sup>a</sup>
	(+)	n=3	35.83±14.45	19.57± 7.40	1.82±0.29 <sup>a,b</sup>
20% Casein+Gln	(-)	n=6	47.97± 9.17	22.09± 5.92	2.24±0.50 <sup>a</sup>
	(+)	n=4	45.81± 5.56	20.58± 3.05	2.23±0.09 <sup>a,c</sup>

Values are mean±SD. Values without a common superscript letter are significantly different when tested by unpaired t test

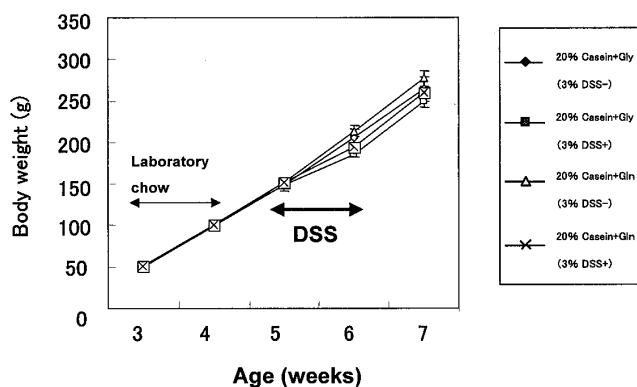


図5 Dextrane Sulfate Sodium 投与によるグリシン添加またはグルタミン添加20%カゼイン飼料群の体重変化

CD 8 の比は、グリシン飼料群と比較して有意に高値を示した。

カゼイン飼料群とグルテン飼料群を比較すると、CD 4 陽性細胞の割合に差は認められなかった。CD 8 陽性細胞では、カゼイン飼料に比べ、グルテン飼料が有意に高値を示し、また DSS 投与によりやや高くなる傾向がみられた。このことから、CD 4 / CD 8 の比はグルテン飼料で低く、DSS 投与によりさらに低値を示した。

## 考 察

DSS による炎症性腸疾患モデルラットの作成方法、分子量による炎症の相違、グルタミンの腸管に対する影響、サイトカインとの関係、その栄養的な価値、炎症と関係のある IL-8、TNF- $\alpha$  の大腸損傷部および、血清 IL-8 を下げ、免疫過敏反応を抑制すること、さらにグルタミンが腸管での必須栄養素であることなどは、すでに報告したとおりであ

る。<sup>4) 9) -18)</sup> グルタミンの炎症性腸疾患に対する影響はよく検討されていて、すでに別の論文で参照されたい。

今回、DSS を投与することにより誘発させた炎症性腸疾患モデルラットに栄養条件の異なる飼料を摂取させ、リンパ球サブセット (CD 4 · CD 8) に及ぼす影響について検討した。今回実験飼料に使用した飼料のグルタミン含量だけを比較すると、カゼインが10.9%、グルテンが33.8%のアミノ酸構成比をもっている。<sup>12)</sup>

20%カゼイン飼料群は、DSS 投与による影響は無く、順調な体重増加を示したが、グルテン飼料群では、わずかな体重増加しかみられなかった。

グリシン飼料群とグルタミン飼料群では、CD 4 および CD 8 陽性細胞の割合に有意差はみられなかったが、DSS を投与したグルタミン飼料群の CD 4 / CD 8 の比は、グリシン飼料群と比較して有意に高値を示した。

グルタミンは、体内のほとんど全ての組織で合成される非必須アミノ酸であるが、腸粘膜の最も重要なエネルギー基質であり、腸管の構造や機能維持に重要であるとされ、また、免疫系細胞でも盛んに利用されるといわれている。20%カゼイン飼料にグルタミンを添加した飼料とグリシン添加飼料を摂取させたラットの DSS 投与後の生存率を比較したところ、差は認められなかった。しかし、グルタミン含量の多いグルテンをタンパク質源とした飼料では、生存率は100%であり、カゼイン飼料に比べ高値を示した。

20%カゼイン飼料群は、DSS 投与による影響は無く、順調な体重増加を示したが、グルテン飼料群では、わずかな体重増加しかみられなかった。体重増加量および飼料摂取量に有意差が認められたため、

pair-feeding を行ったが、カゼイン飼料群と比較してグルテン飼料群の体重は有意に軽かった。このことから、グルテン飼料群の体重増加の停滞は、飼料摂取量の減少によるものだけではなく、生物価が低いことに起因すると考えられる。グリシン添加飼料群およびグルテン添加飼料群は、DSS 投与期間中にやや体重増加量の減少がみられたものの、大きな影響は無く、順調な体重増加を示した。

CD4/CD8の比において、DSS 投与ラットでは、20%カゼイン飼料が高値を示すのに対し、生存率の高かった20%グルテン飼料はやや低い値を示した。末梢血中のCD4陽性細胞は、ヘルパーT細胞と呼ばれ、抗体産生を上昇させる。それに対し、CD8陽性細胞は、サプレッサー-T細胞と呼ばれ、抗体産生を抑制するように働く。グルテン飼料では、CD8陽性細胞割合が増し、過剰な免疫反応抑制をしていると思われる。

## 文 献

- 1) 日比紀文, 井上詠: 日消誌.: 免疫機構から見た炎症性腸疾患の病態. 98: 390-398 (2001)
- 2) 土井多恵子: 慢性腸炎モデルが語る消化管のホメオスタシス維持機構. 生化学.: 72, 第11号, 1341-1334 (2000)
- 3) Kaya E, Gür ES, Özgüç H, Bayer A, Tokyay R: L-glutamine enemas attenuate mucosal injury in experimental colitis. *Dis. Colon. Rectum.*, 42, 1209-1215 (1999)
- 4) Ameho C K, Adjei A A, Harrinson E K, Akeshirta K, Morioka T, Arakaki Y, Ito E, Suzui A, Kulkarni D, Kawajiri, A. and Yamamoto S: Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor  $\alpha$  production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis., *Gut.* 41, 487-493 (1997)
- 5) Shinozaki M, Saito H, Muto T: Excess glutamine exacerbates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. *Dis. Colon. Rectum.*, 40, S59-63 (1997)
- 6) Adjei AA., Morioka T, Ameho, CK, Yamauchi K, Kulkarni AD, AL-Mansouri H, Kawajiri A, Yamamoto S: Nucleoside-Nucleotide free diet protects rat colonic mucosa from damage induced by trinitrobenzene sulphonic acid. *Gut.*, 39, 428-433 (1996)
- 7) Adjei AA, Yamauchi K, Chan YC, Konishi M, and Yamamoto S: Comparative effects of dietary nucleoside-nucleotide mixture and its components on endotoxin induced bacterial translocation and small intestinal injury in protein deficient mice. *Gut.*, 38, 531-537 (1996)
- 8) Adjei, AA and Yamamoto, S: A Dietary Nucleoside-Nucleotide Mixture Inhibits Endotoxin-Induced Bacterial Translocation in Mice Fed Protein-Free Diet. *J Nutr.*, 125, 42-48 (1995)
- 9) Ichikawa S, Gu S, Yamashita A: Correlation of rectum-associated lymph nodules with the development of experimentally induced acute colonic inflammation in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 16, 1360-7 (2001)
- 10) 中野史郎, 小原進, 久保田敏彦, 西元寺克禮, 掘田恭子: 大腸ムチンの量的変化からみたラット実験的慢性大腸炎の検討-DSS 大腸炎と NEM 大腸炎との比較検討一日消誌, 95, 513-523, (1998)
- 11) 新谷奈保子, 中島常隆, 永井仁志, 渡辺正弘, 鍵谷晶男, 滝澤英昭, 朝倉均. デキストラン硫酸投与実験大腸炎における免疫グロブリン療法の免疫学的作用機序の検討, 日消誌, 92, 1911-1921, (1995)
- 12) Gaudio E, Taddei G, Vetuschi A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R: Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci.*, 44:7 1458-75 (1999)
- 13) Adjei AA, Matsumoto Y, Oku T, Hiroi Y, and Yamamoto, S: Dietary arginine and glutamine combination improves survival in septic mice.: *Nutri Res.*, 14, 1591-1599 (1994)
- 14) Tzu-HSiu Chen', Takeshita K, Sakai K, Komatsu T, Kishino Y, and Yamamoto S: Effect of amino acid mixtures on nasal allergic responses induced by toluene diisocyanate in mice. *J. Med. Investigation*, 47., 128-137 (2000)
- 15) Yamauchi K, Komatsu T, Kulkarni AD, Ohmori Y, Minami H, Ushiyama Y, Nakayama M, Yamamoto S: Glutamine and arginine affect Caco-2 cell proliferation by promotion of nucleotide synthesis. *Nutrition*, 18., 329-33 (2002)
- 16) Adjei AA, Ameho CK, Harrison EK, Yamauchi K, Kulkarni A, Kawajiri A, Yamamoto S: Nucleoside-nucleotide-free diet suppresses cytokine production and contact sensitivity responses in rats with trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Am. J. Med. Sci.*, 314, 89-96 (1997)
- 17) Wilmore DW, Shabert JK: Role of glutamine in immunologic responses. *Nutrition.*, 14, 618-826 (1998)
- 18) Ko TC, Beauchamp RD, Townsend CM, Thompson JC: Glutamine is essential for epidermal growth factor-stimulated intestinal cell proliferation. *Surgery.*, 114, 147-154 (1993)
- 18) 熊井まどか, 林加奈子, 広井祐三, 森口覚: Dextran Sulfate Sodium による急性期炎症性腸疾患ラットの生存率におよぼすグルタミンの影響, 中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要, 145-151 (平成17年)