



Suppressive effects on delayed type hypersensitivity by fasting and dietary restriction in ICR mice

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中村, 晴信 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1658

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 381号	学位授与年月日	平成16年 1月23日
氏 名	中 村 晴 信		
論文題目	<p>Suppressive effects on delayed type hypersensitivity by fasting and dietary restriction in ICR mice (ICR マウスにおける絶食および食餌制限の遅延型過敏症に対する抑制効果)</p>		

論文題目

Suppressive effects on delayed type hypersensitivity by fasting and dietary restriction in ICR mice

(ICR マウスにおける絶食および食餌制限の遅延型過敏症に対する抑制効果)

論文の内容の要旨

[はじめに]

これまでに、動物実験において栄養不良を伴わない程度の食餌制限 (dietary restriction、DR、自由摂取群の 60-70% 摂取) が寿命延長効果を持つことがげっ歯類や霊長類で確認されている。DR は生体の内分泌・代謝・免疫系に種々の変化をもたらし、自然または放射線発癌などに対して発症抑制的に作用する。さらに、自己免疫疾患や薬剤誘発による炎症モデルなどにおいても抑制的に作用することが報告されている。

一方、100% の食餌制限である短期間絶食 (short-term fasting、SF) も食餌制限のひとつの方法として解釈できるが、長期間間歇的に SF を行っただけげっ歯類の例でも、寿命延長効果が報告されている。また、間歇的 SF による内分泌・免疫系の変化も種々報告されている。

アレルギー疾患に関しては、DR によりアトピー性皮膚炎の発症や症状の進展が抑制された報告や、SF により遅延型過敏症が抑制された報告がなされている。しかし、SF のアレルギー抑制作用について、DR との比較や炎症抑制のメカニズムについては未解明の部分が多い。

アレルギー性接触性皮膚炎は、その発症機序を遅延型過敏症に求められている皮膚炎の 1 つである。今回は、アレルギー性接触性皮膚炎を実験的に発症させた ICR マウスにおいて SF および食餌摂取量を自由摂取群の 60% に制限した DR を行い、皮膚炎症におよぼす SF の効果を 60% DR と比較するとともに、炎症に影響をおよぼすと思われる酸化ストレスや副腎皮質ホルモン関与についても検討した。

[材料ならびに方法]

7 週齢の雄性 ICR マウスを自由摂取 (ad libitum、AL) 群、SF 群、および DR 群の各群に分類し、マウスは各々個別のケージで飼育した。SF 群は、SF 期間中与える食餌量を 0% とし、それ以外の期間は自由摂取とした。AL 群の食餌摂取量を定期的に測定し、その 60% を DR 群に与えた。餌は維持食である Lab Diet EQ 5L37 を使用し、給餌は 1 日 1 回とした。水は AL、SF、および DR いずれの群にも自由に摂取させた。また、アレルギー性接触性皮膚炎は dinitrofluorobenzene (DNFB) をハプテンとして感作、惹起することによりマウス耳介に発症させた。

皮膚炎の炎症評価に関して、AL 群 (6 匹)、24 時間 SF 群 (6 匹) および 48 時間 SF 群 (5 匹) の惹起 24 時間後の耳介厚みを手動計測するとともに、耳介の病理組織像の検討を行った。さらに、組織標本の光顕像に対してデジタル画像処理を行うことにより耳介厚み、単位面積当りの浸潤細胞数、浮腫面積を定量し、手動計測した耳介厚みとの関係について検討した (本段落内容は副論文に掲載)。

異なるタイミングで SF を行うことによる炎症抑制への影響を見るために、SF を感作直前までの 24 時間 (13 匹)、感作直後から 24 時間 (13 匹)、惹起直前までの 24 時間 (12 匹)、

惹起直後から24時間(12匹)行う各群、およびAL群(13匹)の5群を設定した。各群のDNFBによる遅延型過敏反応は耳介厚みの増加率で比較した。

次に、SFによる炎症抑制効果をDRと比較検討するために、実験開始0時間後、72時間後、および144時間後から各々24時間SFを繰り返し行う群(17匹)、実験期間中60%DRを行う群(17匹)、およびAL群(17匹)の3群を設定した。遅延型過敏反応は耳介厚みの増加率で比較検討した。

また、これらの炎症抑制に対する酸化ストレスの関与について検討する目的で、DNAダメージのマーカーである8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)に対するモノクローナル抗体を用い、DNFBで炎症を惹起させたSF群(4匹)、DR群(4匹)、AL群(4匹)、および炎症を惹起させていないSF群(4匹)、DR群(4匹)、AL群(4匹)の計6群について耳介の免疫組織学的検討を行った。

さらに、SFによるアレルギー性炎症抑制に対するglucocorticoidの関与について検討する目的で、glucocorticoid受容体に対する拮抗剤であるRU-486 (mifepristone)をDNFBで惹起を行う1時間前に皮下投与を行うSF群(15匹)とAL群(15匹)、およびRU-486を投与しないSF群(16匹)とAL群(16匹)について、惹起24時間後の耳介厚みの増加率を測定した。

[結果]

DNFBで炎症を惹起させたマウスにおいて、SF群はAL群に比べ、手動計測による耳介厚みおよび耳介の組織像における細胞浸潤や浮腫等が抑制されていた。デジタル画像処理による定量評価においても、SF群はAL群に比べ、耳介厚み、単位面積当り浸潤細胞数、浮腫面積が各々抑制されていた。また、これらの定量評価の結果は手動計測による耳介厚みの結果に対して正の相関関係が見られた(本段落内容は副論文に掲載)。

感作直前・感作直後・惹起直前・惹起直後のタイミングでSFを行った各群のうち、DNFB惹起直後からSFを行った群のみが、AL群に対して、有意に耳介厚みの増加率が低値であった。

繰り返しSFを行った群は、SFの期間とre-feedingの期間を繰り返すことにより、1日あたりの食餌摂取量が変化した。実験期間を通じた食餌摂取量はDR群よりも多かった。しかしながら、繰り返しSFを行った群とDR群は、両群ともにAL群に比べ同様の炎症抑制効果を示した。さらに、SF群とDR群は、双方ともAL群に比べ8-OHdG抗体で染色された核の数が軽減されていた。しかしながら炎症を惹起させない場合には、SF、DR、AL各群間に差はみられなかった。

ステロイドホルモン受容体拮抗剤RU-486を投与しなかった場合は、SF群の耳介厚みの増加率はAL群と比べて軽減されたが、RU-486を投与した場合は、SF群とAL群の間で耳介厚みの増加率は差がみられなかった。

[結論]

遅延型過敏症に対するSFの炎症抑制効果はSFを行う時期に影響されることを確認した。また、繰り返し行ったSFおよび持続的に行われたDRは共に皮膚炎に対して抑制効果をもたらした。これらの抑制には酸化ストレスの軽減も関与している可能性が示唆された。また、SFが皮膚炎を抑制する機序として副腎皮質ホルモンが関与している可能性が示された。

過食、飽食とそれに深く関係した生活習慣病患者の増加は大きな社会的問題となっている。このような状況のなかで、食事制限あるいは絶食療法が生体の内分泌・代謝・免疫系に様々な変化をもたらすことから、生活習慣病や自己免疫疾患の治療の一環として見直されつつある。これら療法の有効性を示唆する証拠の多くは動物実験から得られている。例えば、栄養不良を伴わない程度の食餌制限(dietary restriction, DR)では通常自由摂食量の60~70%のカロリーを摂取するが、このような条件下では、齧歯類、霊長類で寿命の延長、発癌率の低下、脳血管疾患発症の危険性の減少、記憶力・学習力の向上などが観察されている。また、100%食事制限である短期の絶食を間歇的に行った場合でも、同様の現象がみられる。ヒトにおいても、長期のDRにより動物と同じような免疫・代謝機能変化が生じるため、おそらくDRや絶食を効果的に行うことにより、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経系疾患、紅斑性狼瘡などの自己免疫疾患、癌などの発症を予防したり、抑制したりする可能性が考えられている。DRや絶食が有効である理由としては、免疫力の正しい方向への調整とそれによるアレルギー・自己免疫性反応の抑制、副腎皮質ステロイドの分泌亢進、酸化ストレスの減少、レプチンの低下などが考えられるが、未だ推測の域を出ない。

申請者は、免疫・アレルギー反応の面からDRや絶食特に短期間絶食(short-term fasting, SF)の影響を検討した。すなわち、マウスに実験的な皮膚アレルギー反応をおこし、これに対するDR、SFの影響をみた。またそのメカニズムとしてどのようなものが考えられるかについて、以下の実験を行った。

ICRマウス(雄、7週齢)にハプテンであるdinitrofluorobenzene(DNFB)接触性皮膚炎を誘発し、その前後においてDRあるいはSFを24時間行い、DR/SF未実施群とのあいだで、炎症の程度を比較した。さらに、炎症部皮膚において酸化ストレスによるDNA傷害のマーカーである8-hydroxy-deoxyguanosine(8-OHdG)陽性細胞数を測定し、またグルココルチコイド受容体拮抗薬RU-486の投与による皮膚炎への影響を観察し、その結果を実施群、未実施群で比較した。実験材料および方法は、本試験の目的に照らし合わせ適切であった。

この実験から明らかになった結果は、

- (1) DNFB 惹起直後にSFをおこなった群では、感作前・後あるいは惹起直前のSF群、SF未実施群とくらべて、有意に炎症反応が抑制された。さらに、惹起反応直後の繰り返してSF群およびDR群では、未実施群にくらべて、同程度に皮膚炎が抑制されていた。これら実施群では、未実施群と比較し、8-OHdG陽性細胞の浸潤が減少していた。
- (2) RU-486投与した後、SF群、未処置群で炎症を惹起したが、その程度には差がなかった。すなわち、SFによる炎症抑制効果がRU-486により阻止された。

これらの結果から、申請者はカロリー制限による炎症とくにアレルギー反応の抑制は、酸化ストレスの軽減と副腎皮質ステロイドの関与が考えられると結論づけた。また、今後の方向性として、免疫系と酸化ストレスあるいは副腎皮質ステロイドとの関係の中で、DRあるいはSFの機序をさらに適切な近交系マウスと指標を用いて解明していくことが重要であることが確認された。本研究は、従来推測の域をでなかった絶食療法の有効性の機序について、ひとつの結論を出したものとして高く評価できる。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

1. ICR を用いた理由
2. 皮膚炎の程度をみるためのマウス耳翼厚の測定法
3. 体重あたりの制限カロリー量の決定
4. DR あるいは絶食の時間と生存率
5. DR あるいは SF による末梢血血球の変化
6. 8-OHdG 陽性細胞の計測手技
7. RU-486 を用いた理由
8. データ解析のための統計的手法とその選択

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	瀧	川	雅	浩	
	副査	寺	田	護	副査	青木伸雄