

# 1 型糖尿病発症後の病態に必須脂肪酸比率が 与える影響について

籠橋 有紀子<sup>1</sup> 大谷 浩<sup>2</sup>

(1 島根県立大学短期大学部健康栄養学科 2 島根大学医学部解剖学講座)

The dietary ratio of n-6/n-3 essential fatty acid is important for the inhibition of pathogenic progress after the onset of overt diabetes in NOD mice.

Yukiko Kagohashi, Hiroki Otani

キーワード：1 型糖尿病 必須脂肪酸 NODマウス

Key words : Type1 diabetes, Essential fatty acid, NOD mice

## 1. はじめに

ヒト1型糖尿病は、遺伝素因をもつ人に何らかの環境因子が作用して起こる自己免疫疾患である。自己免疫性の炎症により、膵臓ランゲルハンス島(以下、膵島とする)の破壊、すなわち膵島炎が起こり、膵島のインスリン分泌細胞である膵島細胞が全体の10%以下に減少すると発症する<sup>1-3)</sup>。発症初期段階では、インスリンを適切に導入すれば、まだ残存している膵島細胞の機能が一時的に回復し(または膵島破壊の進行が抑制され)、見掛け上、症状が軽快あるいは消失することがある。これがいわゆる「ハネムーン期」であり、「膵島細胞が残存していること」がその前提条件となる<sup>4-6)</sup>。しかし、やがて自己分泌されるインスリンは不足するようになり、再びインスリン注射が必要になる。その後はインスリン注射無しでは生きられない難病であるため<sup>1-3)</sup>、1型糖尿病発症早期における残存した膵島の温存、あるいは合併症の軽減について、近年様々な視点からの知見が報告されている<sup>7)</sup>。

ヒト1型糖尿病モデル動物のNOD (Non-Obese

Diabetes) マウスは、1型糖尿病発症前後の病態がヒトと酷似していることから世界中の医学的基礎研究において用いられている<sup>8)</sup>。NODマウスの糖尿病発症に関与している環境因子には、ウイルス、栄養素を含む化学物質など様々なものが挙げられ、その関与が報告されている<sup>9,10)</sup>。ヒトを対象とした疫学研究のみならず、NODマウスを用いた1型糖尿病予防に有効な栄養素に関する報告は、我々の報告を含めて近年増加しており、ビタミンD、必須脂肪酸などの関与が示唆されている<sup>9,10)</sup>。その一方で、1型糖尿病発症後の病態改善に有効な栄養素についての報告は限られている<sup>11)</sup>。

本研究では、NODマウスの顕性糖尿病の発症予防に有効だと示唆されている食物中の栄養素の一つである必須脂肪酸の影響について着目し、顕性糖尿病発症後に必須脂肪酸比率(n-6/n-3)の異なる食餌を摂取した際に、必須脂肪酸比率の違いが病態に与える影響について検討することを目的とした。

2. 材料と方法

1) 動物

1 型糖尿病モデル動物NODマウス雌 8 ~ 60週齢を使用した。日本クレアより購入後、島根大学医学部および島根県立大学短期大学部実験動物施設の規則に基づき、飼育した。本研究は、島根大学医学部実験動物委員会および島根県立大学短期大学部実験動物委員会の承認を受けた。

2) 食餌摂取と実験デザイン (表 1)

マウス用通常食 (必須脂肪酸比率 (n-6/n-3=6.8:S)、(タンパク質 (23.6%)、炭水化物 (65.0%)、脂肪 (5.3%)、カロリー (3.6 kcal/g)) を参考に (12)、必須脂肪酸比率の異なる特別食 (必須脂肪酸比率 (n-6/n-3=3: L)、タンパク質 (20.3%)、炭水化物 (66%)、脂肪 (5.0%)、カロリー (3.9 kcal/g)) (リサーチダイエツ社製) を作成し、実験に用いた<sup>12)</sup>。

通常食 S にて飼育し、顕性糖尿病発症後、6 日以内に特別食 L に変えた群 (S-L1) と 9 日以降に特別食 L に変えた群 (S-L2)、および発症後も継続して通常食 S にて飼育した群 (S-S) を設定した。顕性糖尿病発症前後の摂食量、飲水量、体重測定は一週間毎に計測した。

表 1 実験デザイン

Before overt diabetes	Overt diabetes	
S	S	S-S
S	L*	S-L1
S	L**	S-L2

S-L1 : 顕性糖尿病発症後 6 日以内に通常食 S(n-6/n-3=6.8) から特別食 L(n-6/n-3=3.0) に変えた (L\*) 群

S-L2 : 顕性糖尿病発症後 9 日以降に通常食 S(n-6/n-3=6.8) から特別食 L(n-6/n-3=3.0) に変えた (L\*\*) 群

3) 膵臓および腎臓切片の観察による病態の検討

S-S群は顕性糖尿病発症後14日、28日に、S-L1群は90日後に安楽死させた後、膵臓および腎臓を採取した。膵臓および腎臓は10%バッファーホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋後5 μmにて組織切片を作成した。膵臓はHE染色を、腎臓はPAS染色を行い、一群につき、3個体の組織を観察した。膵

臓組織は、リンパ球が未浸潤および浸潤した膵島数を計測し、浸潤膵島については浸潤面積の比率により5段階に分けて評価し、統計処理を行い、膵島炎の進行程度を2群間で比較検討した。また、腎臓組織は、糸球体メサンギウム細胞の増殖程度に応じて3段階に分けて評価し、統計処理を行い、糸球体への炎症進行程度を2群間で比較検討した。

4) 顕性糖尿病発症の確認と発症後の病態の検討

生後10週齢より、尿糖検出紙 (プレテスト3a : 和光純薬) を用いて、尿糖値を確認した。尿糖値200 mg/dl以上の個体を顕性糖尿病発症個体とした。一群につき10 - 14個体について、顕性糖尿病発症後のインスリン非投与下における尿糖値を比較検討した。

5) 糖尿病発症後の生存率

インスリン非投与下において顕性糖尿病発症後の生存日数を観察した。なお、一群につき6 - 10個体について観察した。

6) 統計処理

顕性糖尿病発症後の生存率および糖尿病発症後の生存日数については、Kaplan-Meier method (有意水準p<0.05) およびUnpaired Student's t-test (有意水準p<0.05) により比較検討を行った。いずれも統計解析ソフトSPSS15.0を用いた。また、膵臓および腎臓切片の観察による病態の検討については、Ridit analysis (有意水準T > 1.96) により比較検討を行った。

3. 結果

1) 顕性糖尿病発症後の生存日数 (図1A, 1B)

顕性糖尿病発症後インスリン非投与下では、通常食 S 摂取群 (S-S) は、21 - 48日 (平均31.7 ± 9.78日) で死亡した (Fig. 1A)。顕性糖尿病発症後 6 日以内に通常食 S から特別食 L に変えて摂取させた S-L1群は、有意に生存率日数が延び、短い個体で 58日、長い個体で119日を示した (平均81.5 ± 24.3)。また、顕性糖尿病発症後 9 日以降に通常食 S から特別食 L に変えた S-L2群は、S-S群と変わらず、生存日数は平均27.9 ± 5.17日であった。なお、顕性糖尿病発症時の週齢による結果の偏りはみられなかった。

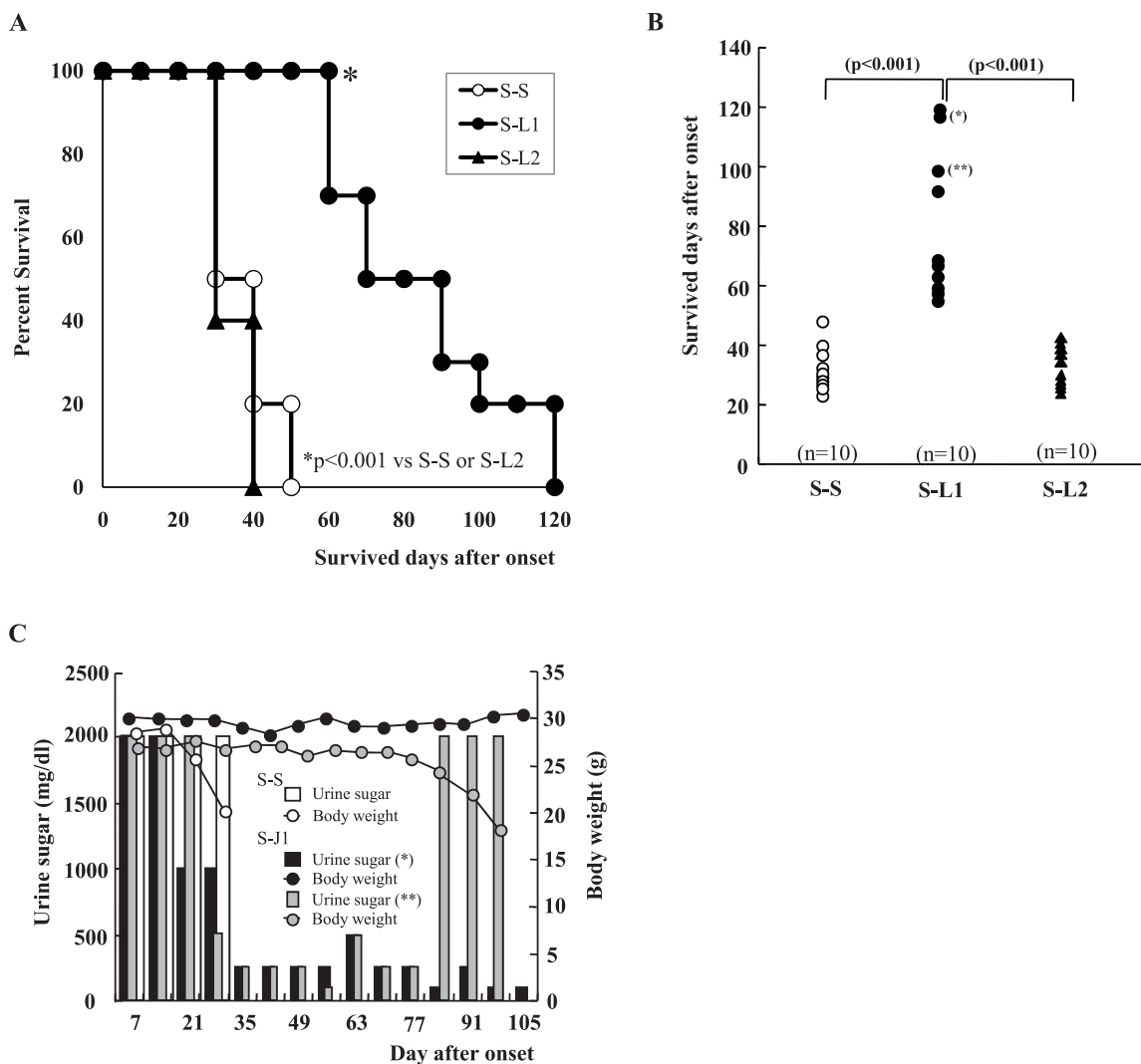


図1. 顕性糖尿病発症後のNODマウスにおける生存率および体重・尿糖の変化

A: 顕性糖尿病発症後6日以内に通常食Sから特別食Lに変えた群の生存率は高く推移したが、9日以降に変えた群は、食餌を変更しなかった群と同様に生存率は有意に低かった。統計処理はKaplan-Meier curves および log-rank test を用いた。B: 3群の生存日数通常食S (n=6/n=3=6.8) (S-S group, white circle) を継続して摂取した群は顕性糖尿病発症後21 - 48日で死亡した。(mean ± SD, 31.7 ± 9.78 days)。顕性糖尿病発症後6日以内に通常食Sから特別食L (n=6/n=3=3.0) に変えた群 (S-L1 group, black circle) は、生存日数が短い個体で58日、長い個体で119日を示し、S-S群と比較して平均生存日数が延長された。(81.5 ± 24.3 days, p<0.001)。しかしながら、顕性糖尿病発症後9日以降に通常食Sから特別食L (n=6/n=3=3.0) に変えた群 (S-L2 group, black triangle) は、生存日数がS-S群と比較して変わらなかった (27.9 ± 5.17 days)。C: 顕性糖尿病発症前後ともに通常食Sを摂取した群は、継続して尿糖値が高く推移し (white column for a representative mouse)、体重も死亡に至るまで急速に減少した (white circle)。顕性糖尿病発症後6日以内に通常食Sから特別食Lに変えた群のなかで、100日以上生存した個体 (indicated by the asterisk (\*) in B) は、体重の減少はみられず (black circle)、また、尿中の糖の濃度も減少した (black column)。顕性糖尿病発症後6日以内に通常食Sから特別食Lに変えた群のなかで、98日生存した個体 (indicated by the asterisk (\*\*) in B) は、顕性糖尿病発症後70日間は、体重減少はみられず (gray circle)、尿糖値は減少した (gray column) が、その後急激に体重が減少し、尿糖値も上昇し、死亡に至った。

2) 顕性糖尿病発症後の体重、摂食量・飲水量、尿糖の変化 (図1C)

顕性糖尿病発症後の摂食量、飲水量はS-S群およびS-L2群においては有意に増加し、S-L1群においては、徐々に通常量に近づいた (data not shown)。S-S群およびS-L2群の体重は有意に減少し、S-L1群の体重はほとんど減少しなかった。S-S群およびS-L2群における尿糖値は、生存期間を通じて2000 mg/dlという高値を示したが、S-L1群は、発症後3週間以降、徐々に尿糖値の有意な低下が認められ、その後の生存期間においても、個体差はみられたが、継続して有意に低い値を保った。

3) 糖尿病発症後の膵臓ラ氏島 (図2)

S-S群およびS-L2群は、発症直後においてはわずかに残存細胞が認められたが、発症後14日ではリンパ球浸潤程度が進行し、リンパ球が細胞を覆い尽くす様子が観察され、残存細胞はほとんど見られなくなった。発症後28日においては、外分泌細胞

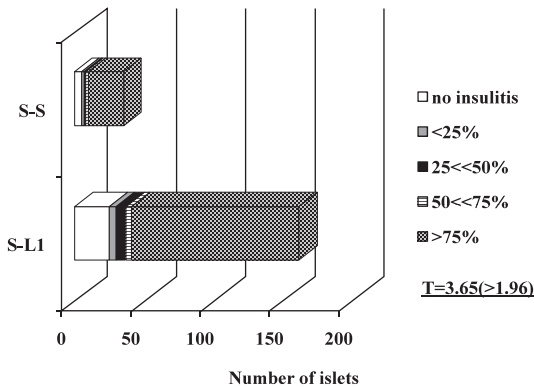


図2. 膵島数および膵島炎の程度

膵島数を計測し、浸潤膵島については浸潤面積の比率により5段階に分けて (no insulinitis, <25%, 25<<50%, 50<<75%, >75%) 評価し、Ridit analysis (有意水準  $T > 1.96$ ) により統計処理を行った。全膵島数は顕性糖尿病発症後14日経過したS-S群と比較して、S-L1群のなかで生存日数が90日を越えた群において有意に増加し、膵島炎の程度はS-L1群において有意に進行が抑制された ( $T = 3.65$ )。S-L1群において、膵管に隣接した小さな膵島の出現が認められた。(novel islets)。S-S群では、小さな膵島の出現が認められず、膵管から離れて存在する膵島のみ観察された (no insulinitis)。

のみが認められた (data not shown)。S-L1群のなかで、生存日数が90日を超えた個体の膵島を観察した結果、膵管と近接して小さな膵島の出現が観察された。発症後90日を超えたS-L1群の膵島炎の程度をリジット解析にて統計処理した結果、発症後14日のS-S群と比較して有意に膵島炎の進行が抑制された ( $T = 3.65 > 1.96$ ) (図2)。

4) 糖尿病発症後の腎臓 (図3)

S-S群は、発症後28日の腎臓においてメサンギウム基質の増殖が認められる糸球体が数多く観察された。S-L1群のなかで、生存日数が90日を超えた個体の腎臓糸球体を観察した結果、S-S群と比較して、有意に糸球体への炎症が抑制された ( $T = 2.82 > 1.96$ )。

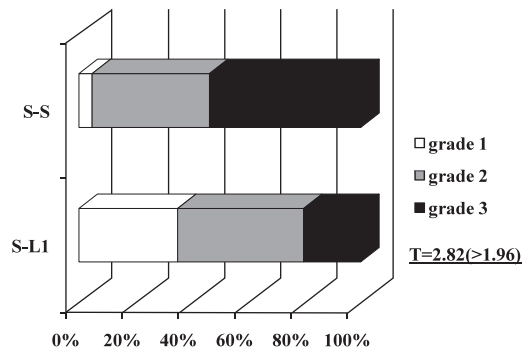


図3. 腎臓糸球体のメサンギウム基質の増殖程度

腎臓糸球体のメサンギウム基質の増殖程度について3段階に分けて (grade 1, grade 2, grade 3) 評価し、Ridit analysis (有意水準  $T > 1.96$ ) により統計処理を行った。S-L1群のなかで生存日数が90日を越えた群の腎臓糸球体は、顕性糖尿病発症後14日経過したS-S群と比較してメサンギウム基質の増殖が抑制された。

4. 考察

1型糖尿病発症後のハネムーン期についての報告はあるが<sup>4-6)</sup>、ハネムーン期を含めた段階に応じた栄養素の影響について扱った研究はほとんど無い<sup>11)</sup>。本研究では、1型糖尿病モデル動物NODマウスを用いて、顕性糖尿病発症後の病態に対する栄養成分の中でも特に、摂取する必須脂肪酸比率の役割について治療学的側面から検討を行った。

現在、欧米を中心として摂取する食餌中の必須脂

脂肪酸比率 (n-6/n-3) が上昇し始め、アメリカでは平均12といった高い比率を示している<sup>14-17)</sup>。日本では、現在、推奨比率は設けていないが、魚をよく食べる日本人は2から3の比率を保っている一方で、食生活の欧米化に伴い、若年者層においては8から9へと上昇しつつある<sup>14-17)</sup>。近年のアレルギー、血管系の疾患、自己免疫疾患の増加の一つの要因とする報告もある<sup>17)</sup>。

1型糖尿病の発症は、何らかの環境要因が契機となり、膵臓の膵島に炎症が起こること(膵島炎)から始まるが、膵島炎は1型糖尿病発症のかなり以前から始まり、進行しているとされている<sup>1-3)</sup>。1型糖尿病は、若年性糖尿病ともいわれ、乳幼児から20歳までの間に発症するケースが多い<sup>1-3)</sup>。欧米の大規模疫学調査においても、発症予防における乳幼児期からの栄養摂取の検討は重要であることが示唆されている<sup>18-22)</sup>。その中でも、Norrisらが1型糖尿病の発症リスクが高い小児(平均年齢6.2歳)を対象に行った大規模調査により、小児期に摂取するn-3系多価不飽和脂肪酸の量が多いグループでは、1型糖尿病発症を抑えられる可能性が示唆されている<sup>18)</sup>。我々のNODマウスを用いた研究においては、ライフステージを通じてn-6/n-3が14.5の食餌を摂取させると1型糖尿病発症時期が早まり、最終発症率も抑制されないが、n-6/n-3が3.0の食餌を摂取すると、1型糖尿病発症が著しく抑制されることが示唆されている<sup>10)</sup>。さらに、離乳前の胎児期・新生児期に母獣を介してn-6/n-3が3.0の食餌を摂取させると、離乳後にn-6/n-3が14.5の食餌を摂取しても、1型糖尿病発症が抑制されることが示唆されており、離乳前が重要な時期であることが示唆されている<sup>10)</sup>。本研究において、マウス用通常食で、n-6/n-3が14.5と3.0の間となるn-6/n-3が6.8の食餌を用いて、NODマウスの病態に対する影響について検討した。n-6/n-3が6.8の食餌を摂取させた群の顕性糖尿病の発症時期はn-6/n-3が14.5の食餌を摂取させた群と比較して遅くなる傾向が認められたが、最終発症率は同様の傾向であった(data not shown)。NODマウスの1型糖尿病発症を予防するためには、ライフステージを通じて摂取する食餌中のn-6/n-3は6.8で

も高い可能性が示唆されたため、さらに今後の検討が必要である。

1型糖尿病発症に関わる食餌中の必須脂肪酸比率(n-6/n-3)は、膵島炎の発症前後から顕性糖尿病発症前の病態に対してだけでなく、顕性糖尿病発症後の病態の進行にも、大きく影響を与えている<sup>11)</sup>。1型糖尿病発症を早期に誘導し発症率も高いことが認められているn-6/n-3が14.5の食餌を摂取させたマウスに、顕性糖尿病発症後n-6/n-3が3.0の食餌を摂取させると病態の進行が緩やかになることが示唆されている<sup>11)</sup>。したがって、本研究では、n-6/n-3が6.8の食餌を摂取させた群の顕性糖尿病発症後の病態に対する食餌の影響を検討した。顕性糖尿病発症後に摂取する必須脂肪酸のn-6/n-3を6.8から3に下げると、インスリン非投与下で、尿糖値が下がり、体重の減少が抑えられるなどの全身的な変化が認められた。組織病理学的に詳細を検討した結果、膵島組織に対して膵島炎の進行抑制がみられ、また、膵管に隣接した新規の膵島様の組織を認めた。以上より、顕性糖尿病発症後に摂取する食餌中のn-6/n-3を3程度に下げることにより、膵島炎の進行抑制がみとめられ、尿糖値の低下により、ハネムーン期が延びる可能性が示唆され、生存率が高くなると考えられる。また、本研究では、顕性糖尿病発症後の高血糖による合併症に対する検討も行った。NODマウスの顕性糖尿病発症後は、糖尿病性腎症の指標となるメサンギウム領域の拡大がみられたが、顕性糖尿病発症後に摂取する必須脂肪酸のn-6/n-3を6.8から3に下げると、これらの症状も軽減された。

本研究結果より、ヒト1型糖尿病モデル動物のNODマウスにおいて、顕性糖尿病発症後の病態進行を抑制し、残存した膵島の保持する効果のある必須脂肪酸バランスが存在すると考えられ、ハネムーン期の延長に対して食餌中の必須脂肪酸バランスが関与していることが示唆された。

以上より、ヒト1型糖尿病発症後の病態進行を抑制する要因の一つとして、摂取する必須脂肪酸比率(n-6/n-3)が挙げられ、発症後の治療食を考える上で適切な必須脂肪酸摂取バランスを検討する必要があることが示唆された。

## 5. 謝辞

本稿作成にあたり、お世話になった島根県立大学短期大学部健康栄養学科、ならびに島根大学医学部解剖学講座の皆様にご感謝の意を表す。

本研究の一部は科学研究費補助金 (22791012) および島根県立大学短期大学部学術教育研究特別助成金の補助を受けている。

## 6. 引用文献

1. Eisenbarth GS, Jeffrey J. The natural history of type 1A diabetes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 2002;1(3):146-155.
2. Itoh M. Immunological aspects of diabetes mellitus: prospects for pharmacological modification. *Pharmacol Ther* 2004;4(10):351-406.
3. Dotta F, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes mellitus: a predictable autoimmune disease with interindividual variation in the rate of beta cell destruction. *Clin Immunol Immunopathol* 2008;41(1):S85-S95.
4. Williams G. IDDM: long honeymoon, sweet ending. *Lancet*. 1994 Mar 19;343(8899):684-5.
5. Abdullah N, Al-Khalidi O, Brown KJ, Reid J, Cheetham TD. Prolonged honeymoon phase in an adolescent with diabetes and thyrotoxicosis provides support for the accelerator hypothesis. *Pediatr Diabetes*. 2008;9(4 Pt 2):417-9.
6. Aly H, Gottlieb P. The honeymoon phase: intersection of metabolism and immunology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009 Aug;16(4):286-92.
7. Akirav E, Kushner JA, Herold KC. Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone? *Diabetes* 2008;57(11):2883-2888.
8. Chaparro RJ, Diloranzo TP. An update on the use of NOD mice to study autoimmune (Type1) diabetes. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010;6(6):939-55.
9. Kagohashi Y, Abiru N, Kobayashi M, Hashimoto M, Shido O, Otani H. Maternal dietary n-6/n-3 fatty acid ratio affects type 1 diabetes development in the offspring of non-obese diabetic mice. *Congenit Anom*. 2010;50(4):212-20.
10. Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(2):419-46.
11. Kagohashi Y, Otani H. Diet with a low n-6/n-3 essential fatty acid ratio when started immediately after the onset of overt diabetes prolongs survival of type 1 diabetes model NOD mice. *Congenit Anom*. 2010 Dec;50(4):226-31.
12. The National Academy of Science: Nutrient Requirements of Laboratory Animals. Washington, DC, National Academy Press 1995
13. Sermeus W, Delesie L. Riddit analysis on ordinal data. *West J Nurs Res* 1996;18:351-359.
14. Fritsche K. Fatty acids as modulators of the immune response. *Annu Rev Nutr* 2004;11(1):45-73.
15. Harbige LS. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids* 2001;213(2):323-341.
16. Lands WEM, Hamazaki T, Yamazaki K, Okuyama H, Sakai K, Goto Y, Hubbard VS. Changing dietary patterns. *Am J Clin Nutr* 1990;51:991-993.
17. Okuyama H, Kobayashi T, Watanabe S. Dietary fatty acids - The n-6/n-3 balance and chronic elderly diseases. Excess linoleic acid and relative n-3 deficiency syndrome seen in Japan. *Prog Lipid Res* 1997;35(4):409-457.
18. Norris JM, Yin X, Lamb MM, Barriga K, Seifert J, Hoffman M, Orton HD, Baron AE, Clare-Salzler M, Chase HP, Szabo NJ, Erlich

- H, Eisenbarth GS, Rewers M. Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. *JAMA* 2007 ;298(12): 1420-8.
19. Lamb MM, Myers MA, Barriga K, Zimmet PZ, Rewers M, Norris JM. Maternal diet during pregnancy and islet autoimmunity in offspring. *Pediatr Diabetes*. 2008;9(2):135-41.
20. Siscovick DS, Raghunathan TE, King I, Weinmann S, Wicklund KG, Albright J, Bovbjerg V, Arbogast P, Smith H, Kushi LH. Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *JAMA*. 1995;274(17):1363-7.
21. Hummel S, Hummel M, Banholzer J, Hanak D, Mollenhauer U, Bonifacio E, Ziegler AG. Development of autoimmunity to transglutaminase C in children of patients with type 1 diabetes: relationship to islet autoantibodies and infant feeding. *Diabetologia*. 2007;50(2):390-4.
22. Stene LC, Ulriksen J, Magnus P, Joner G. Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of type 1 diabetes in the offspring. *Diabetologia*. 2000;43:1093-1098.