

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：32309

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350903

研究課題名(和文)高齢者におけるリンパ球サブセットの新基準の設定

研究課題名(英文)Setting new standards for lymphocyte subsets in the elderly

研究代表者

藤本 友香 (Fujimoto, Yuka)

群馬パーズ大学・保健科学部・助教

研究者番号：60713336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：20代から90代までの健常者を対象に生活習慣調査とCD4陽性T細胞の測定を行い、加齢による変化、生活習慣との関連性の検討及び、高齢者独自のCD4陽性T細胞分画の基準値の設定を行った。その結果、CD8陽性T細胞比率と制御性T細胞(Treg)比率は青壮年期、中年期群に比して後期高齢期群で有意に増加した。よって、CD8陽性T細胞比率とTreg細胞比率は高齢者群独自の基準値の設定を行った。健康度・生活習慣診断調査(DIHAL.2)とCD4陽性T細胞の関連性を検討したところTh2細胞数は「食事」と、Treg細胞比率は「規則的な睡眠」が影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We conducted a survey on lifestyle and CD4+ T counts in healthy volunteers aged 20-99 years. We then evaluated CD4+ T cell counts to determine the correlation with age and elements of lifestyle. With these data, we determined a standard value range for CD4+ T cell counts in the elderly. We observed that the ratio of CD8+ T cells to regulatory T cells (Treg) was significantly higher in the elderly than in adolescents and those in the middle-age group. We used these data to set a standard value for the ratio of CD8+ T cells to Treg cells in the elderly. We also examined the relationship between CD4+ T cell counts and the results of the Development of Health and Life Habit Inventory.2 (DIHAL.2) survey. The results suggested that the number of Th2 cells is primarily influenced by diet, and the ratio of CD8+ T cells to Treg cells is most influenced by the regularity of sleep pattern.

研究分野：血液学、免疫学

キーワード：加齢 生活習慣 CD4/CD8 Th1/Th2 制御性T細胞 免疫能

1. 研究開始当初の背景

T細胞はCD4陽性T (CD4+T:ヘルパーT)細胞とCD8陽性T (CD8+T:細胞障害性T)細胞に分けられている。CD4+細胞の中には細胞性免疫を司るTh1細胞と液性免疫を司るTh2細胞があり、Th1/Th2比やCD4/CD8比の均衡が崩れることによって自己免疫疾患や感染症などの疾病リスクが増加する。また、制御性T細胞(以下Treg)はCD4陽性CD25陽性かつ転写因子Foxp3の発現があり、免疫抑制の役割を担っている細胞である。これらの細胞が恒常性を保つことで健康維持がなされるため、免疫の指標として重要とされている。

T細胞の分化、成熟を促す胸腺は60代には、最大時の40%にまで委縮するため、加齢に伴って免疫能は顕著に変化する。しかし、現在一般的に使用されている免疫能の基準値は60歳までの成人を対象としており、高齢者独自の基準値は存在していない。高齢者は様々な合併症や日常生活活動能の差が検査値に影響を与える可能性があるため、高齢者の基準値を設定することは困難と考えられていた。加齢によって免疫能は変化し、様々な疾病リスクが増加するにも関わらず、健常高齢者の免疫能の基準値がないため、現在の一般的基準値を用いての免疫能評価では限界があると考えた。

申請者は*Helicobacter Pylori*感染が末梢血に及ぼす影響の報告(Health. 6.4.236-242,2014)を行った際、CD4/CD8比、Th1/Th2比、Treg細胞比率の測定方法を確立している。よってこれらの技術を用い健常高齢者の末梢血リンパ球サブセットの基準値を設定し、予防医学に貢献したいと考え本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、健常高齢者と65歳以下の被験者の末梢血リンパ球サブセットの測定、問診票調査及び、健康度・生活習慣診断調査(DIHAL.2)調査を行い、以下の3項目について検討を行う。

(1) 日常生活習慣が末梢血免疫能(CD4/CD8比、Th1/Th2比、Treg細胞比率)に及ぼす影響について検討をおこない、免疫学的見解から、より望ましいと考えられる生活習慣を明確にする。

(2) 65歳未満の健常者を青壮年期(44歳以下)、中高年期(45~64歳)にわけ、更に65歳以上の健常高齢者を前期高齢期(65~74歳)と後期高齢期(75歳以上)に分けて検討し、加齢に伴う末梢血免疫能の変化を検討する。

(3) 健常高齢者の免疫能の基準値の設定をする。1, 2で加齢や生活習慣が免疫能に与える影響の調査を行ったうえで、高齢者の末梢

血免疫能の基準値を明らかにし、高齢者の健康状態の把握、経過観察、予後の判定を行うための新たな指標を定めることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 倫理・対象者

群馬パース大学研究倫理審査委員会の承認(PAZ14-14)を受けた後、被験者に対し研究の説明を行った。被験者は本学学生、教職員、大学関連病院の健康診断受診者、老人ホーム居住者及びスポーツクラブに所属している高齢者の中から同意の得られた者を対象とした。

(2) 実験方法

被験者には健康状態と生活習慣を把握するため問診票とDIHAL.2の調査、血圧の測定を行い、その後採血を行った。血液検査項目は全血算(CBC)、CD4/CD8比、Th1/Th2比、Treg細胞比率及び、健康状態把握のための生化学検査生化学検査を実施した。問診票にてリウマチや糖尿病など免疫機能に影響を与える可能性のある疾患をもつ被験者は除外している。

CD4/CD8比はリンパ球細胞の表面抗原を染色し、Th1/Th2比は培養法を用いて求めた。また、Treg細胞比率はCD4、CD25は細胞表面の抗原の染色後、透過処理を行い細胞内のFoxp3を染色してフローサイトメーター(FACS Verse™ BD Bioscience)にて解析を行った。

(3) 統計解析

統計解析にはアーテック社のStat Flex ver.6を使用した。非喫煙かつ飲酒習慣のない群と喫煙かつ飲酒習慣がある群、2群間における末梢血リンパ球サブセットの比較検討はMann-Whitney U検定を用いた。また、青壮年期、中高年期、前期高齢期、後期高齢期の4群に分けた末梢血リンパ球サブセットの検討では、独立多群多重比較法(Tukey法)を使用した。DIHAL.2とリンパ球サブセットの相関はSpearman順位相関を用い、更に交絡因子を排除するために重回帰分析を使用して解析を行った。また、64歳未満の群と65歳以上の群の末梢血リンパ球サブセットの比較検討では、t検定を用いた。高齢者の基準値は基本統計にて中央値、95%CIより求めた。

4. 研究成果

(1) Th1/Th2比測定のための基礎検討

一般的にTh1/Th2比の測定法は細胞をPMA、ionomycin、Brefeldin-Aを加え、37°C7%の炭酸ガス培養器にて4時間培養した後、染色を行うというのが主流である。しかし、培養法では多くの検体の測定を同時に行うのは困難なため、細胞表面のケモカインレセプターを染色して測定を行う方法の検討を予

備実験として行った。Th1はCCR5、Th2はCCR3が発現しているため、それらを染色する測定方法と培養法を用いた場合でTh1,Th2比率の検討を行った。しかし、ケモカイン測定法ではTh2細胞比率の割合が高値を示すため、正確な測定を行うことは困難と判断し、実際の実験で使用するに至らなかった。

(2) 生活習慣が及ぼす末梢血リンパ球サブセットへの影響

問診票にて非喫煙かつ飲酒習慣がないと回答した被験者群(A群)と喫煙かつ飲酒習慣があると回答した群(B群)にわけ、リンパ球サブセットに検討した。CD4/CD8比の中央値(95%信頼区間)はA群1.4(0.3-4.7)、B群0.9(0.2-7.2)となり、有意差は認められなかった。また、Th1/Th2比においてもA群10.4(2.8-99.3)、B群9.8(1.4-46.3)、Treg細胞比率はA群2.8%(0.4-6.2%)、B群3.2%(1.3-8.1%)となりいずれの項目においても有意差はなかった。

(3) DIHAL.2の各項目とリンパ球サブセットに相関があるかを検討した。その結果、Th1/Th2比は「3. 食事」($p<0.05$, $rS=0.278$)と「⑦食事の規則性」($p<0.05$, $rS=0.246$)で有意な正相関を認めた(図1)。また、Treg細胞比率は「⑧嗜好品」($p<0.05$, $rS=-0.253$)との間に有意な負の相関を示した(図2)。それ以外の項目ではいくつか相関傾向を示すものはあったものの有意差は認められなかった。

次に交絡因子の影響を除外するため、重回帰分析にてDIHAL.2の各項目と末梢血リンパ球の解析を行った。Th2細胞数は「3. 食事」($p<0.05$, $t=2.09$)、「⑥食事バランス」($p<0.05$, $t=2.37$)との間に有意な関連がみられた(表1)。また、Treg細胞比率では「⑩睡眠の規則性」($p<0.05$, $t=2.18$)の項目との間に有意な関連があった(表2)。

Th2細胞数において有意差はなかったものの「3. 食事」との負の相関傾向があった。また、交絡因子を排除した重回帰分析でも「3. 食事」と「⑥食事のバランス」に有意な関連が認められた。以上から食生活の充実が液性免疫に關与するTh2細胞数を減少させ、アレルギー反応の改善につながる可能性が考えられた。Treg細胞比率は「4. 休養」と「⑩睡眠の充足度」の項目に正の相関傾向を認め、重回帰分析では「⑩睡眠の規則性」で有意な関連が認められた。よって、規則正しく睡眠をとることはTreg細胞比率を増加させ、過剰な免疫応答の抑制に關与する可能性がある。これらのデータをとりまとめ、第24回日本未病システム学会学術総会にて発表し、優秀演題賞を受賞した。

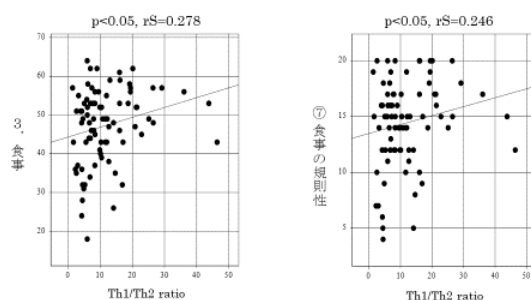


図1.Th1/Th2比とDIHAL.2の相関
外れ値を除いて示したもの

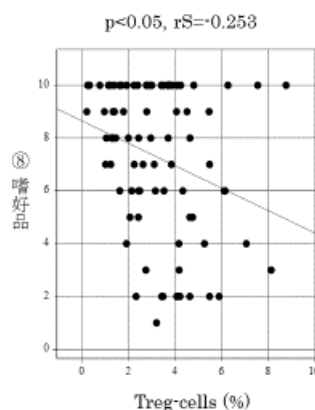


図2. Treg細胞比率とDIHAL.2の相関

表1. DIHAL.2とTh2細胞数を目的変数とした重回帰分析

尺度名	t値	p値	因子名	t値	p値
1. 健康度	1.14	0.28	①身体的健康度	0.87	0.39
2. 運動	0.20	0.84	②精神的健康度	0.49	0.62
3. 食事	2.09	0.04*	③社会的健康度	0.28	0.78
4. 休養	0.90	0.37	④運動行動・条件	0.32	0.75
			⑤運動意識	0.05	0.96
			⑥食事のバランス	2.37	0.02*
			⑦食事の規則性	0.67	0.51
			⑧嗜好品	1.72	0.09
			⑨休息	0.88	0.38
			⑩睡眠の規則性	2.18	0.03*
			⑪睡眠の充足度	1.04	0.30
			⑫ストレス回避	0.30	0.77

表2. DIHAL.2とTreg細胞比率を目的変数とした重回帰分析

尺度名	t値	p値	因子名	t値	p値
1. 健康度	1.27	0.21	①身体的健康度	1.25	0.22
2. 運動	0.27	0.78	②精神的健康度	0.74	0.46
3. 食事	1.01	0.32	③社会的健康度	0.82	0.42
4. 休養	1.94	0.06	④運動行動・条件	0.49	0.63
			⑤運動意識	0.09	0.93
			⑥食事のバランス	0.33	0.74
			⑦食事の規則性	0.42	0.68
			⑧嗜好品	0.78	0.44
			⑨休息	1.69	0.10
			⑩睡眠の規則性	2.18	0.03*
			⑪睡眠の充足度	0.28	0.78
			⑫ストレス回避	0.49	0.62

(4) 加齢に伴う末梢血リンパ球サブセットの変化

末梢血リンパ球サブセットをそれぞれ青壮年期、中高年期、前期高齢期、後期高齢期に分けて独立多群多重比較法を用いて検討を行った。結果、CD8+T 細胞比率は青壮年期と中高年期に比して、後期高齢期で有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。Treg 細胞比率は後期高齢者で有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。

以上の結果を第 57 回日本臨床化学会学術集会にて発表した。

(5) 高齢者を対象とした末梢血リンパ球サブセットの基準値の設定

高齢者独自の基準値の必要性を確認するため、被験者を 65 歳未満の群と 65 歳以上の群 (高齢者群) の 2 群にわけて末梢血リンパ球サブセットの比較検討を行った。CD8+T 細胞比率において、高齢者群は 65 歳未満の群に比して有意に増加した ($p < 0.05$)。また、Treg 細胞比率も同様に高齢者群は 65 歳未満の群に比して有意な増加がみられた ($p < 0.01$)。

これは、(4) で行った「加齢に伴う末梢血リンパ球サブセットの変化」と同様の結果を得ている。それ以外の CD4+T 細胞比率、CD4/CD8 比、Th1、Th2 細胞比率、Th1/Th2 比においては 65 歳未満の群と高齢者群の間に有意差はなかった。よって、CD8+T 細胞比率と Treg 細胞比率は 65 歳未満とは別に高齢者独自の基準値を設定する必要があると考えた。よって、95%CI を用いて末梢血リンパ球サブセット (CD4+T 細胞比率、CD8+T 細胞比率、CD/CD8 比、Th1 細胞比率、Th2 細胞比率、Th1/Th2 比、Treg 細胞比率) の基準値を明らかにした。

高齢者の CD8+細胞比率は低下するという報告 (*Immun Aging*, 7:4,2010) があるが、本研究で CD8+T 細胞比率は高齢者群が 65 歳未満の群に比して増加しているため、今後更に検体数を増やし、検討していきたいと考える。また、Treg 細胞は加齢とともに細胞抑制の活性が低下するという報告 (*J Immunol*, 181:1835-1848,2008) があることから、高齢者の場合、活性が低下した Treg 細胞が末梢血中に増加し、免疫能に変化が起こる可能性が考えられた。本研究では Treg 細胞の活性測定は行っていないため、今後の検討課題としていきたい。

以上の研究成果をとりまとめ、The 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPalm2017) にて発表を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

藤本友香, 浅見知市郎, 白土佳子, 古田島伸雄, 長田誠, 時田佳治, 柳川益美, 村上正巳, 小河原はつ江, 生活習慣が末梢血リンパ球サブセットに及ぼす影響、日本末病システム学会 (査読有), (2018) (掲載予定)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 佐藤友香 (研究代表者旧姓), 浅見知市郎, 北村弘文, 小河原はつ江, 藤田清貴, 生活習慣が末梢血リンパ球サブセットに及ぼす影響, 第 22 回日本末病システム学会 2015.10.10, 北海道大学学術交流館 (北海道)
- ② 藤本友香, 浅見知市郎, 古田島伸雄, 町田哲男, 村上正巳, 小河原はつ江, 藤田清貴, 加齢に伴う末梢血リンパ球サブセットの変動について, 第 57 回臨床化学会年次学術集会, 2017.10.8, 北海道大学, 学術交流会館 (北海道)
- ③ 藤本友香, 浅見知市郎, 白土佳子, 古田島伸雄, 柳川益美, 北村弘文, 町田哲男, 村上正巳, 時田佳治, 小河原はつ江, 生活習慣が末梢血リンパ球サブセットに及ぼす影響 第 2 報, 第 24 回末病システム学会学術総会, 2017.10.5, ワークピア横浜 (神奈川県)
- ④ Yuka fujimoto-satoh, Hatsue Ogawara, Tomoichirou Asami, Nobuo Kotajima1, Hirofumi Kitamura, Yoshiharu Tokita, Masumi Yanagawa, Tetsuo Machida, Masami Murakami, Setting of the new standard value of T lymphocyte subset in healthy subjects over the age of 60 years. The 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine WASPaLM2017, 2017.11.16, 国立京都国際会館 (京都府)
- ⑤ 藤本友香, 浅見知市郎, 古田島伸雄, 長田誠, 白土佳子, 小河原はつ江, 生活習慣が血液細胞に及ぼす影響, 第 58 回日本臨床化学会年次学術集会, 2018.8.25, 名古屋国際会議場 (愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 友香 (Fujimoto Yuka)
群馬パース大学保健科学部・助教
研究者番号：60713336

(2) 研究分担者

小河原 はつ江 (Ogawara Hatsue)

群馬パース大学保健科学部・教授
研究者番号：60134293

浅見 知市郎 (Asami Tomoichirou)
研究者番号：群馬パース大学教養共通教育
部・教授
研究者番号：60320652

(4) 研究協力者

白土 佳子 (Shiratsuchi Yoshiko)
群馬パース大学保健科学部・講師

古田島 伸雄 (Kotajima Nobuo)
群馬パース大学保健科学部・准教授