

ているものの、この場合には全く Detergent 不溶性分画には CD3 ζ 鎖は検出されなかった。このことから、正常な TCR を介する活性化においては、リン酸化された CD3 ζ 鎖はおそらくアクチンのような細胞骨格と会合するようになるのにたいして、酸化ストレスによってはリン酸化 CD3 ζ 鎖は細胞骨格とは会合しないと思われる。酸化ストレスによる刺激によって CD3 ζ 鎖がプロテオソーム依存的に蛋白分解を誘導される結果を得たことから、両者を総合すると、活性化された後に細胞骨格と会合しないことが分解の方向に導いていると考えられる。

では、TCR 刺激と酸化ストレスとの違いによって CD3 ζ 鎖にどのような違いが生じるのであろうか。一つの可能性は、リン酸化部位の相違である。アクチンなどの細胞骨格と会合するには特異的なリン酸化が必要であるかもしれない。もう一つの可能性として、活性化される細胞膜上の部位の違いが考えられる。最近、T 細胞の活性化では Detergent insoluble なマイクロドメイン(DIG, GEM, Raft と呼ばれる)に多くのシグナル分子が会合して活性化シグナルを伝達することが報告されている。TCR 活性化によって Triton 不溶性の分画に移行するのはこの Raft/GEM に移行するのであって、そこでアクチンなどと会合することも考えられる。すると、酸化ストレスでは CD3 ζ 鎖を含むこれらシグナル分子を Raft/GEM に誘導できないまま、フォスファターゼや Src キナーゼの活性化が起こり CD3 ζ 鎖をリン酸化させるが、細胞骨格との会合がないままに分解へと誘導される、というシナリオが考えられる。これらはまだ想像の域を脱しないが、Raft との関係は今後解析して行くことによって明らかに出来ると考えられる。

正常な TCR を介する活性化では分解しな

い CD3 ζ 鎖が、酸化ストレスによって分解されて行くことは、老化に伴って酸化ストレスが様々な形で増加し、T 細胞にも降り注がれるようになると、T 細胞に機能不全を起こす一員になっていると考えられる。更に、一つの可能性としては、老化に伴って活性化に重要な Raft/GEM 自体の構造・機能が変化し、正常な活性化を誘導できないことである。これらの観点から、今後 Raft/GEM を介する活性化における酸化ストレスと老化の影響を解析して行く予定である。

E. 結論

正常な TCR 刺激では CD3 ζ 鎖はリン酸化されて細胞骨格と会合するのに対して、酸化ストレスによって誘導される T 細胞活性化によっても、CD3 ζ 鎖はリン酸化はされるものの細胞骨格との会合は起こらず、分解されて行くことが示唆された。老化に伴って増加する酸化ストレスによって T 細胞の機能障害が誘導される可能性があり、その T 細胞活性化機構を詳細に解析する必要がある。

F. 引用文献

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①. Nakano, H., Yamazaki, T., Miyatake, S., Nozaki, N., Kikuchi, A. and Saito, T.: Specific interaction between topoisomerase II β and CD3 ϵ chain of the T cell receptor complex. *J. Biol. Chem.*, 271:6483-6489, 1996.
- ②. Takahashi, H., Nakagawa, Y., Leggatt, G., Ishida, Y., Saito, T., Yokomuro, K. and Berzofsky, J.: Inactivation of HIV-1 envelope-specific CD8⁺ cytotoxic T

- lymphocytes by free antigenic peptide: A self-veto mechanism? *J. Exp. Med.* 183:879-889, 1996.
- ③. Arase, H., Arase, N. and Saito, T.: Interferon γ production by natural killer cells and NK1.1⁺T cells upon NKR-P1 cross-linking. *J. Exp. Med.* 183: 2391-2396, 1996.
- ④. van Vugt, M. J., Heijnen, I. A. F. M., Capel, P. J. A., Park, S. Y., Ra, C., Saito, T., Verbeek, J. S. and van de Winkel, J. G. J.: Fc γ R chain is essential for both surface expression and function of human Fc γ RI (CD64) *in vivo*. *Blood* 87:3593-3599, 1996.
- ⑤. Otsuji, M., Kimura, Y., Aoe, T., Okamoto, Y. and Saito, T. : Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 ζ chain of T cell receptor complex and antigen-specific T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 93:13119-13124, 1996.
- ⑥. Saijo, K., Park, S.Y., Ishida, Y., Arase, H. and Saito, T.: Crucial role of Jak3 in negative selection of self-reactive T cells. *J. Exp. Med.* 185:351-356, 1997.
- ⑦. Yamazaki, T., Arase, H., Ono, S., Ohno, H., Watanabe, H. and Saito, T.: A shift from negative to positive selection of autoreactive T cells by the reduced level of TCR signal in TCR-transgenic CD3 ζ -deficient mice. *J. Immunol.* 158:1634-1640, 1997.
- ⑧. Poole, A., Gibbins, J.M., Turner, M., van Vugt, M.J., van de Winkel, J., Saito, T., Tybulewicz, V.L.J. and Watson, S.P. : The Fc receptor γ -chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J.* 16:2333-2341, 1997.
- ⑨. Shiratori, T., Miyatake, S., Ohno, H., Nakaseko, C., Isono, K., Bonifacino, J.S. and Saito, T. : Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity* 6:583-589, 1997.
- ⑩. Miyatake, S., Sakuma, M., and Saito, T.: Induction of interleukin-2 unresponsiveness and down-regulation of the JAK-STAT system upon activation through the T cell receptor. *Eur. J. Immunol.* 27:1816-1823. 1997.
- ⑪. Takase, K., Wakizaka, K., von Boehmer, H., Wada, I., Moriya, S. and Saito, T. : A novel 12kd dimer associated with pre-TCR complex and clonotype-independent CD3 complex on immature thymocytes. *J. Immunol.* 159:741-747. 1997
- ⑫. Watanabe, N., Arase, H., Kurasawa, K., Iwamoto, I., Kayagaki, N., Yagita, H., Okumura, K., Miyatake, S. and Saito, T. : Th1 and Th2 subsets equally undergo Fas-dependent and independent activation-induced cell death. *Eur. J. Immunol.* 27:1858-1864. 1997.
- ⑬. Watanabe, H., Shiratori, T., Shoji, H., Miyatake, S., Okazaki, Y., Ikuta, K., Sato, T. and Saito, T. : A novel acyl-CoA thioesterase enhances its enzymatic activity by direct binding with HIV nef. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238: 234-239, 1997.
- ⑭. Arase, N., Arase, H., Park, S.Y., Ohno, H., Ra, C. and Saito, T.: Association with Fc γ R is essential for activation signal through NKR-P1(CD161) NK cells and NK1.1⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 186:1957-1963, 1997.
- ⑮. Wakizaka, K., Masuda, Y. and Saito, T. : A novel 90kDa tyrosine-phosphorylated

protein associated with TCR complex in thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 28:636-645, 1998.

- ⑩. Saito, T. : Negative regulation of T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 10:313-321, 1998.
- ⑪. Park, S.Y., Ueda, S., Ohno, H., Hamano, Y., Tanaka, M., Shiratori, T., Yamazaki, T., Arase, H., Arase, N., Karasawa, A., Satoh, S-I., Ledermann, B., Kondo, Y., Okumura, K., Ra, C. and Saito, T. : Resistance of Fc receptor-deficient mice to fatal glomerulonephritis. *J. Clin. Inv.* 102:1229-1238, 1998.
- ⑫. Ohno, H., Aguilar, R. C., Yeh, D., Taura, D., Saito, T., and Bonifacino, J. S., :The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *J. Biol. Chem.* 273:25915-25921, 1998.
- ⑬. Gibbins, J. M., Briddon, S., Shutes, A., Vugt, M. J., van de Winkel, J. G. J., Saito, T. and Watson, S. P.: The p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase associates with the Fc receptor γ -chain and LAT in platelets stimulated by collagen and convulxin. *J. Biol. Chem.* 273:34437-34443, 1998.
- ⑭. Takase, K., Okazaki, Y., Wakizaka, K., Shevchenko, A., Mann, M. and Saito, T.: Molecular cloning of pTAC12, an alternative splicing product of the CD3 γ chain as a component of the pre-T cell antigen-receptor complex. *J. Biol. Chem.* 273:30675-30679, 1998.

老化で増加する胸腺外分化 T 細胞の生理機能と分子機構の解析

安保 徹 (新潟大学医学部医動物学講座教授)

高齢者の末梢血においては、胸腺外分化 T 細胞と共に好中球が増加している。胸腺外分化 T 細胞では IFN- γ 産性能が亢進していた。好中球機能では、貪食能、IL-1 β 及び TNF- α 産性能が亢進していた。従って、高齢者の免疫能は系統的に古いリンパ球や炎症性サイトカインによって維持されているものと考えられた。

キーワード：百歳高齢者、胸腺外分化 T 細胞、好中球機能

A. 研究目的

ヒトおよびマウスにおいて、加齢に伴い種々の免疫機能が低下することは広く知られている。それらは胸腺の退縮にともなう胸腺由来 T 細胞の変化であり、T 細胞数、サブセットの比率や細胞内情報伝達系の障害による質的变化であると言われている^(1,2)。また、NK 細胞の機能低下についても検討されている⁽³⁻⁵⁾。一方、B 細胞やマクロファージは加齢による変化はあまり示さない。しかし、ヒトの加齢に伴う免疫機能を経時的に調べた報告、特に百歳以上の高齢者の解析は少ない^(3,5)。

前年度、我々は加齢マウスで得られた知見をもとに、百歳高齢者の胸腺外分化 T 細胞の解析を行った。胸腺外分化 T 細胞は、T 細胞でありながら NK 細胞の細胞表面抗原を有し、しかも NK 細胞と同様な細胞障害活性を持つことから、NK 細胞と T 細胞の間

の細胞集団として位置づけられることから、第 4 のリンパ球とも呼ばれている。マウスにおける胸腺外分化 T 細胞と同様に、ヒトでも NK 細胞のもつ細胞表面抗原を発現している細胞が認められる。ヒト NK 細胞マーカーである CD56、あるいは CD57 を発現している T 細胞である。これらの細胞はマウスと同様に T 細胞の胸腺外分化の場合である肝臓に多く認められ、しかも種々の性質が類似していることから、これがヒトにおける胸腺外分化 T 細胞と考えられる。がん患者の末梢血や腫瘍局所に浸潤するリンパ球 (TIL)^(6,7)、妊娠中毒症患者の末梢血や胎盤、慢性リウマチ患者の関節腔⁽⁸⁾など、ヒトの種々の病態でこの細胞が増加している。

前年度の解析結果より、百歳高齢者では、NK 細胞とともに胸腺外分化 T 細胞である CD3⁺CD57⁺T 細胞が増加

することから、そのリンパ球構成が胸腺由来のT細胞からNK細胞や胸腺外分化T細胞へと変化することを明らかにした⁹⁾。本年度は、加齢にともなう免疫能を、胸腺外分化T細胞と生体防御を担う好中球に焦点をあて、加齢の免疫システムをさらに詳細に解析した。

B. 研究方式

対象者は沖縄県在住の100~106歳の高齢者34例(男性6例、女性28例)、対照として同40~60歳の健常者(middle aged)18例を解析した。高齢者は日常生活自立度(ADL: activities of daily living)の評価指標により、日常生活自立者(ランクJとA、healthy群)25例、寝たきりの要介護者(ランクBとC、unhealthy群)9例に分類した。

高齢者の末梢血は抗凝固剤添加で採取した後、血しょう成分を分離し、コリンエステラーゼ、GOT、GPT活性の測定に用いた。リンパ球と顆粒球はモノポリ分離液(大日本製薬)を用い、同時に分離した。分離した末梢血リンパ球(PBL)は、種々の抗体で多重染色を行いフローサイトメトリーで解析を行った。細胞内サイトカインは、PBLをPMAとionomysineで5時間の刺激後、常法に従い解析した。好中球機能としては、貪食能、活性酸素及びサイトカインの産生能を解析した。貪食能の測定: ヒトAB血清でオプソニン化した加熱処理ドライイースト

を、顆粒球と共に1時間の培養を行った後、塗末標本を作成し、ギムザ染色により貪食細胞数を算定した。活性酸素(superoxide: $H^+ + O_2^-$)の測定: 顆粒球をPMAで刺激後、ルミノール試薬で化学発光をさせ、ルミノメーターで測定した。サイトカインの産生能: 顆粒球を*P. acness*死菌で約12時間刺激後、その培養上清中のTNF- α 及びIL-1 β をELISAで測定した。

C. 研究結果

①解析に用いた百歳高齢者の末梢血は1.5~2.0mlと少量のため、モノポリ分離液を用いてもリンパ球と顆粒球の分離は困難であった。そこで遠心操作により血しょうを分離後、血球成分にヒトAB血清を添加し末梢血を所定の量(3.5ml)に増量することにより、分離が可能となった。分離に用いる末梢血量が少ない場合は、リンパ球である上部細胞層と顆粒球の下部細胞層との分離が悪く、顆粒球層へのリンパ球の混入が多い。我々の方法を用いることにより、顆粒球の純度を80~90%以上に保つことができた。

②百歳高齢者では胸腺外分化T細胞であるCD3⁺CD57⁺T細胞が増加することはすでに報告した。マウスの胸腺外分化T細胞は、特定のTCRのレパートワーであるV α 14をもつことが知られており、ヒトの胸腺外分化T細胞はV α 24を発現しているとの報告がある。そこでCD3⁺CD57⁺T細胞のV α 24の発現をflow cytometryで解析した。対照としたmiddle age群は0.5%程度であったが、百歳高齢者群では約

1%が V α 24 を発現しており、有意差が認められた。

③胸腺外分化 T 細胞である CD56⁺T 細胞や CD57⁺T 細胞は約 80%の $\alpha\beta$ T 細胞と 20%の $\gamma\delta$ T 細胞とで構成されている。 $\gamma\delta$ T 細胞は特定の組織分布と特定のクラスター形成をすることが知られている。ヒト末梢血に存在する $\gamma\delta$ T 細胞は V γ 9/V δ 2/C γ 1 の末梢血型であり、胸腺の $\gamma\delta$ T 細胞は V δ 1/C γ 2 である。我々は、TCR V γ 9 に対する抗体を用いて百歳高齢者の末梢血 $\gamma\delta$ T 細胞の解析を行った。middle age 群では V γ 9 陽性の $\gamma\delta$ T 細胞（末梢血型）が優位であったが、百歳高齢者では V γ 9 陰性の $\gamma\delta$ T 細胞（胸腺型）が優位となり、その比率は逆転していた。そこで小児（0~15 歳）と成人（20~35 歳）の末梢血 $\gamma\delta$ T 細胞を解析すると、小児は胸腺型であり成人は末梢血型であった。すなわち、末梢血 $\gamma\delta$ T 細胞は年齢に従って、胸腺型から末梢血型へ、さらに百歳高齢者になると再度胸腺型へと変化することが明らかとなった。胸腺では 0 歳児でも胸腺が萎縮している 70 歳高齢者でも、 $\gamma\delta$ T 細胞は胸腺型であり年齢による変化は見られなかった。一方、成人の肝臓や腸管の $\gamma\delta$ T 細胞は末梢血リンパ球とは異なり胸腺型であったが、骨髄の $\gamma\delta$ T 細胞は胸腺型と末梢血型の中間型であった。このように百歳高齢者の末梢血 $\gamma\delta$ T 細胞が胸腺型であることは、高齢者の生体防御における $\gamma\delta$ T 細胞の機能

変化と考えられ、高齢者の免疫システムを解析する上で重要な知見と思われた。

④加齢に伴う T 細胞のサイトカイン産性能は、Th1 細胞より産性される IL-2 は減少するが、Th2 細胞の IL-4 や IL-6 は増加すると言われている⁽¹⁰⁾。そこで CD57⁺T 細胞のサイトカイン産性能を、細胞内サイトカインを染色することで解析した。CD57⁺T 細胞は、胸腺由来の T 細胞に比べて、Th1 タイプのサイトカインである IFN- γ 産性は高い。高齢者の CD57⁺T 細胞の IFN- γ 産性能は、対照に対して有意に亢進していた。IL-4 産性能については、検体数が少ないものの有意な差は見られていない。

⑤高齢者では、生体防御に係わるリンパ球が胸腺由来の T 細胞から、胸腺外分化 T 細胞や好中球へと変化することをすでに報告した。一方、好中球機能の加齢変化は少ないと言われているが、百歳高齢者の好中球機能を解析した報告は見られない。好中球の基本的機能である貪食能は、middle age 群が約 50%であるのに対し、百歳高齢者では約 80%とその機能亢進が見られた。しかし、healthy と unhealthy グループ間での有意差は認められなかった。好中球は細菌などの外来の異物を貪食することにより、NO（一酸化窒素）、活性酸素や種々のサイトカインを産性し、抗微生物作用をもたらすとともにマクロファージや T 細胞の

活性化を促す。しかし、ヒト好中球は NO 合成酵素である i-NOS を産性しないため、NO 活性は保持していない。百歳高齢者の活性酸素の産性能は、middle age 群の約 50%と低下していたが、サイトカインである TNF- α や IL-1 β 産性能は逆に亢進していた。healthy と unhealthy グループ間では、TNF- α では差が見られなかったが、IL-1 β では unhealthy グループで低下していた。これらの結果は、middle age 群に比べて百歳高齢者の好中球機能が質的に大きく変化していることを示唆している。すなわち、直接的な抗微生物作用よりも TNF- α や IL-1 β などのサイトカイン産性を促し、マクロファージあるいは胸腺外分化 T 細胞などを活性化させることにより、生体防御システムを維持しているものと考えられた。

⑤顆粒球がアドレナリン受容体を多く発現し、リンパ球はアセチルコリン受容体を発現していることが知られている⁽¹¹⁾。すなわち、顆粒球とリンパ球の動態は自律神経系により制御されていると考えられる。百歳高齢者では顆粒球優位であることから、リンパ球へのアセチルコリンのターンオーバーが、コリンエステラーゼにより抑制されていることが考えられた。百歳高齢者の血清コリンエステラーゼ量は、middle age 群に比べて有意に減少しており、また、GOT や GPT も低下していることから、コリンエステラ

ーゼ値の低下は、肝臓機能の加齢変化を反映しているものと考えられた。

D. 考察

百歳以上の高齢者では、そのリンパ球構成が胸腺外分化 T 細胞へと変化するとともに、好中球の役割も重要であることが明らかとなった。加齢による免疫システムの変化は胸腺由来 T 細胞の解析のみでは一面的であり、生体の初期防御を担う $\gamma\delta$ T 細胞を含む胸腺外分化 T 細胞と好中球が主体であると考えられた。すなわち、これらの細胞の形質的・機能的変化が加齢における免疫システムの維持に深く関与していることが示唆された。

E. 結論

加齢にともない胸腺が退縮すると、生体の各リンパ系器官で胸腺外分化 T 細胞が増加するとともに、好中球の増加も顕著となってくる。胸腺由来の T 細胞は自己応答性のクローン（禁止クローン）が消去されており、それゆえに外来抗原の処理を主体に行っている。一方、胸腺外分化 T 細胞は形態やその機能から、NK 細胞と胸腺由来 T 細胞の中間の段階のリンパ球と考えられ、より primitive な T 細胞である。生体防御の初期に立ち向かうリンパ球としては NK 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞を含む胸腺外分化 T 細胞であるが、自己応答性をもつ胸腺外分化 T 細胞の過剰活性化は逆に自己免疫疾患をも誘発する。

しかし、好中球を含む白血球の増加は機能的変化をともない、胸腺外分化 T 細胞の過剰活性化を制御している可能性が示唆される。加齢にともない増加する胸腺外分化 T 細胞や好中球は、機能低下のみられる胸腺由来の T 細胞の単なる代償ではなく、加齢により出現する異常自己細胞の処理に働くとともに、primitive な炎症性サイトカインの産性能を亢進させ、免疫システムの維持に深く関与していると考えられる。

F. 引用文献

- 1) Utsuyama, M., Hirokawa, K. et al. : Differential age-change in the number of CD4⁺CD45RA⁺ and CD4⁺CD29⁺ T cell subsets in human peripheral blood, *Mech Age Dev*, 63 : 57-68, 1992.
- 2) Utsuyama, M., Varga, Z. et al. : Influence of age on signal transduction of T cells in mice, *Int Immunol*, 5 : 1177-1182, 1993.
- 3) Sansoni, P., Cossarizza, A. et al. : Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians, *Blood*, 82 : 2767-2773, 1993.
- 4) Abo, T., Cooper, M. D. et al. : Postnatal expansion of the natural killer and killer cell populations in humans identified by the monoclonal HNK-1 antibody, *J Exp Med*, 155 : 321-326, 1982.
- 5) 園田 啓、高田 肇他 : 加齢に伴う NK 活性および LAK 活性の変動—健康成人 (22~104 歳) における検討— *消化器と免疫*, 21 : 203-207, 1988.
- 6) Takii, Y., Hashimoto, S. et al. : Increase in the population of granulated CD56⁺ T cells in patients with malignancy, *Clin Exp Immunol*, 97 : 522-527, 1994.
- 7) Okada, T., Iiai, T. et al. : Origin of CD57⁺ T cells which increase at tumor sites in patients with colorectal cancer, *Clin Exp Immunol*, 102 : 159-166, 1995.
- 8) Arai, K., Yamamura, S. et al. : Increase of CD57⁺ T cells in knee joints and adjacent bone marrow of rheumatoid arthritis (RA) patients: implication for an anti-inflammatory role, *Clin Exp Immunol*, 111 : 345-352, 1998.
- 9) Miyaji, C., Watanabe, H. et al. : Numerical and functional characteristics of lymphocyte subsets in centenarians. *J Clin Immunol*, 17: 420-429, 1997.
- 10) Hirokawa, K. : Immunity and ageing. *Principles and Practice of Geriatric Medicine*, 3rd Edition. (Pathy, MSJ. ed.), John Wiley & Sons Ltd. pp35-47, 1998.
- 11) Toyabe, S., Iiai, T. et al. :

Identification of nicotinic acetylcholine receptors on lymphocytes in periphery as well as thymus in mice. *Immunology*, 92: 201-205, 1997.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawamura, T., Takeda, K., Mendiratta, S. K., Kawamura, H., Van Kaer, L., Yagita, H., Abo, T. and Okumura, K. : Critical role of NK1⁺T cells in IL-12-induced immune responses in vivo. *J. Immunol.*, 160: 16-19, 1998.
- 2) Arai, K., Yamamura, S., Seki, S., hanyu, T., Takahashi, H. E. and Abo, T. : Increase of CD57⁺ T cells in knee joints and adjacent bone marrow of rheumatoid arthritis (RA) patients: implication of an anti-inflammatory role. *Clin. Exp. Immunol.*, 111: 345-352, 1998.
- 3) Yamagiwa, s., Sugahara, S., Shimizu, T., Iwanaga, T., Yoshida, Y., Honda, S., Watanabe, H., Suzuki, K., Asakura, H. and Abo, T. : The primary site of CD4⁻8⁻B220⁺αβT cells in *lpr* mice-the appendix in normal mice. *J. Immunol.*, 160: 2665-2674, 1998.
- 4) Narita, J., Miyaji, C., Watanabe, H., Honda, S., Koya, T., Umezu, H., Ushiki, T., Sugahara, S., Kawamura, T., Arakawa, M. and Abo, T. : Differentiation of forbidden T cell clones and granulocytes in the

parenchymal space of the liver in mice treated with estrogen. *Cell. Immunol.*, 185: 1-13, 1998.

- 5) Suzuki, S., Sugahara, S., Shimizu, T., Tada, T., Minagawa, M., Maruyama, S., Watanabe, H., Saito, H., Ishikawa, H. and Abo, T. : Low level of mixing of partner cells seen in extrathymic T cells in the liver and intestine of parabiotic mice: Its biological implication. *Eur. J. Immunol.*, 28: 3719-3729, 1998.
- 6) Musha, N., Yoshida, Y., Sugahara, S., Yamagiwa, S., Koya, T., Watanabe, H., Hatakeyama, K. and Abo, T. : Expansion of CD56⁺NKT and γδ T cells from cord blood of human neonates. *Clin. Exp. Immunol.*, 113: 220-228, 1998.
- 7) Tomiyama, K., Watanabe, H., Seki, S., Ito, M. and Abo, T. : Phenotypic and functional modulation of T cells *in vivo* by extrathymic T cells when T cells with MHC class II disparity were injected into athymic nude mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 112: 196-204, 1998.
- 8) Tsukahara, A., Iiai, T., Moroda, T., Tada, T., Suzuki, S., Takeda, K., Hatakeyama, K. and Abo, T. : Allogeneic microenvironments influence the phenotype of intermediate T cell receptor cells expanding in MRL-*lpr/lpr* mice. *Immunology*, 94: 149-159, 1998.
- 9) Yahata, T., Kurabayashi, T., Honda, A., Takakuwa, K., Tanaka, K.

and Abo, T. : Decrease in the proportion of granulated CD56⁺ T-cells in patients with history of recurrent abortion. J. Reproduct. Immunol., 38: 63-73, 1998.

10) Sugahara, S., Kuwano, Y., Sato, K., Hasegawa, K., Yamagiwa, S., Kawamura, T., Yoshida, Y., Asakura, H. Abo, T. : Oligoclonality of TCR^{int} cells with a low diversity of TCR complimentarity-determining region 3 in mice with graft-versus-host disease. Scand. J. Immunol., 48: 592-604, 1998.

シェーグレン症候群老化モデルマウスに おける自己抗原の解析

林 良夫 (徳島大学歯学部教授)

シェーグレン症候群疾患モデルNFS/sld老化マウスは10ヶ月齢を過ぎると多臓器にわたる自己免疫病変の発症が認められ、血中サイトカインのTh1型へのシフトやリウマトイド因子の増加が観察された。老化マウスでは末梢におけるアポトーシス感受性の著明な低下が認められ、老化に伴う免疫調節異常が自己免疫病変の発生に関与している可能性が示唆された。

キーワード：老化、自己抗原、アポトーシス、シェーグレン症候群

A. 研究目的

老化に伴う免疫機能の低下はよく知られているが、生体内における自己免疫病変の発症機序に関しては不明な点が多い。自己免疫性唾液腺炎・涙腺炎を発症するシェーグレン症候群疾患モデルNFS/sldマウス(1)の自己抗原が120 KD α -フオドリンであり、ヒト・シェーグレン症候群患者にも共通する自己抗原であることを明らかにした(2)。本モデルマウスは老化とともに多臓器の自己免疫病変を随伴することから、自己抗原120 KD α -フオドリンが老化に伴う全身性自己免疫病変の発症に関与している可能性について検討を加えた。シェーグレン症候群患者はしばしば全身性エリテマトーゼス (SLE) や慢性関節リウマチ (RA) など他の全身性自己免疫疾患へ移行することが知られているが、そのメカニズムに関しては全く不明である。本研究は、老化モデルマウスを用い、老化に伴う全身性自己免疫病変の発症機序と自己抗原との関連性について明かにすることを目的とする。

B. 研究方法

NFS/sldマウス(3)に生後3日目の胸腺摘出(3d-TX)を施すことにより自己免疫性唾液腺炎・涙腺炎が自然発症することから原発性シェーグレン症候群の疾患モデルとして確立された(1)。3d-TX NFS/sldマウスの長期観察(6ヶ月齢

n=10、10ヶ月齢 n=10、12ヶ月齢 n=15、18ヶ月齢 n=23)を実施し、若齢マウス(3ヶ月齢: n=8、4ヶ月齢: n=8)、他系統の老化C57BL/6マウス(20ヶ月齢: n=10)と比較した。全身諸臓器の光顕的観察の他、唾液腺・涙腺を含む主要臓器の凍結材料を用いて浸潤細胞の免疫組織化学的解析を実施した(CD3, B220, CD4, CD8, Mac-1)。脾細胞を分離して細胞表面マーカー、クラスII発現(I-A_q)、活性化マーカー、アポトーシス関連蛋白などについてFACS解析を実施した(CD3, B220, CD4, CD8, CD44, CD45RB, Mel-14, Fas, FasL, Bcl-2, CD40, CD40L)。Con A及び唾液腺自己抗原に対する脾細胞の増殖能を比較検討した。脾細胞のアポトーシス能はTUNEL法を用いたFACS解析で実施した。培養脾細胞のサイトカイン産生能をELISA法で測定した(IL-2, IL-4, Interferon γ)。また、血清リウマトイド因子(RF)、及びIgGサブクラス(IgG1, IgG2a)の測定をELISA法で実施した。病態形成に関与するサイトカインの発現異常を明らかにする目的でIL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-4, Interferon(IFN) γ , IL-6, IL-10, IL-12のmRNAの発現についてRT-PCR法により検討した。自己抗原としてヒト α -フオドリンcDNAクローン(JS-1:1-1784)より得られたGST融合蛋白を用いウエスタンブロット法, ELISA法で解析した。

C. 研究結果

6ヶ月齢から18ヶ月齢まで経時的に解析を行った結果、若齢マウスにはみられなかった他臓器の自己免疫病変が、老化NFS/sldマウスにおいて多くの臓器に雌優位に認められた。即ち、甲状腺、肺細気管支、肝内細胆管、腓ラ氏島、腎間質、胃粘膜、関節など多臓器にわたる炎症性病変がみられた。凍結材料を用いた浸潤細胞の免疫組織化学的解析により、これら臓器への浸潤細胞の主体はCD4+T細胞であり、少数のCD8+T細胞、B220+B細胞、Mac-1+マクロファージを混えていた。サイトカインの遺伝子発現を解析した結果、IL-2, IFN- γ , IL-12などTh1型のサイトカインmRNAの発現増強が認められた。脾臓から分離した単核細胞を用いたFACS解析では、CD4+T細胞の多くが加齢に伴いCD44high, CD45RBlow, Mel-14low優位の活性化T細胞であること、及び細胞内サイトカインパターンのTh1型へのシフト(IL-2, IFN- γ)が認められた。脾細胞培養上清のELISA法による測定でも老化マウスではTh1型サイトカイン産生へのシフト(IL-2, IFN- γ)が確認された。さらに血清免疫グロブリンIgGサブクラスの測定でもIgG1からIgG2aへのシフトがみられ、末梢におけるTh1型へのシフトが明かとなった。また、老化マウス脾細胞のCon Aに対する反応性はNFS/sld, C57BL/6老化マウスでともに低下していたが、唾液腺自己抗原 α -フオドリリンに対する細胞増殖能はNFS/sld老化マウスで著明に増強していることが明かとなった。脾細胞のFas/FasLの発現を若齢マウスと比較すると、FACS解析では著変はみられないが、抗Fas抗体で刺激した脾細胞のアポトーシスを観察したところ、老化マウスでは末梢におけるアポトーシス感受性の著明な低下が認められた(Fig. 1)。ELISA法にて老化マウスの血中抗JS-1自己抗体が有意に増加していることが判明した。また、ウエスタンブロット法にて老化マウスでは唾液腺・涙腺のほか多くの臓器ホモジネート中(肺、肝、膵、腎、胃)に120 KD α -フオドリリンの発現が観察された。10ヶ月齢以降の老化マウスに肉芽組織の形成を伴った慢性関節炎が出現するが、その時期と一致して血清リウマトイド因子の増加が確認された。

D. 考察

老化に伴う免疫調節異常が全身的な自己免疫

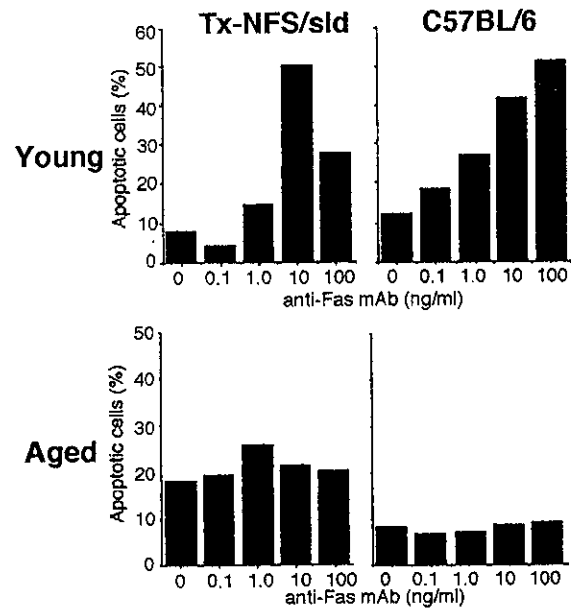


Fig 1. Fas-mediated apoptosis of spleen cells (TUNEL assay)

疾患の発症に関与していることが知られているがその詳細は不明である。シェーグレン症候群モデルNFS/sldマウスは老化に伴い多臓器に炎症性病変が認められ、血中自己抗体の増加と臓器内120 KD α -フオドリリンの出現を伴っていた。老化に伴う免疫調節異常が臓器における自己抗原の発現を誘導し、全身性病変の発症に関与している可能性が示唆された。シェーグレン症候群はドライアイ、ドライマウスに代表される乾燥症候群を主徴とする原因不明の自己免疫疾患とされている。また、原発性シェーグレン症候群はしばしばSLEやRAなど他の全身性自己免疫疾患へ移行することが知られているがそのメカニズムは全く不明である。最近、筆者らは本モデルマウスの臓器特異的自己抗原が120 KD α -フオドリリンであり、ヒト・シェーグレン症候群患者にも共通することを明らかにした(2)。またこのモデルマウスは老化とともに多臓器の腺外性自己免疫病変を随伴することから、自己抗原120 KD α -フオドリリンが老化に伴う自己免疫病変の発症に何らかの関連性を有している可能性が強く示唆された。自己免疫疾患のモデルマウスにおいて老化に伴う自己抗原の役割について検討されたことはないが、今回生体内における加齢に伴う自己免疫病変の動態について解析した結果、老化マウスにおいて多臓器にリンパ球浸潤性病変が雌優位に認められ、自己抗原

120 KD α -フオドリンの発現を伴っていた。これらの臓器病変は原発性シェーグレン症候群が腺外性に全身波及する際の臓器分布に類似しており、老化に伴う全身性自己免疫疾患の発症に関する有用な動物モデルになり得ると考えられた。本研究において老化マウスの末梢T細胞はCD44high, CD45RBlow, Mel-14lowなどいわゆる活性化マーカーを有しており、唾液腺特異的自己抗原に対する細胞増殖能は著明に増強していることが明らかとなった。また、老化マウス血中には自己抗原に対する特異的な自己抗体の産生が認められた。このことは末梢における自己トランス維持機構の破綻が生体内で老化とともに進行し、サイトカインの産生異常などを介してより活性化された自己反応性T細胞の浸潤が多くの標的臓器へ誘導されるというメカニズムが示唆された。NFS/sld若齢マウスにおけるTh1型サイトカインの異常は既に報告したが(4,5)、今回の検討から老化マウスで局所におけるTh1型サイトカインの産生異常が増強されていることが明らかとなった。老化マウス脾細胞における細胞内サイトカインパターンはTh1型ヘシフト(IL-2, IFN- γ)していることが明らかになった。また、脾細胞の培養上清のELISA法による測定でも老化マウスではTh1型へのシフト(IL-2, IFN- γ)が確認された。さらに、血清免疫グロブリンIgGサブクラスの測定ではIgG1からIgG2aへのシフトがみられTh1型へのシフトを示していた。脾細胞のCon Aに対する反応性はNFS/sld, C57BL/6老化マウスでともに低下していたが、唾液腺自己抗原 α -フオドリンに対する細胞増殖能はNFS/sld老化マウスで著明に増強していることが明らかとなった。脾細胞のFas/FasLの発現はFACS解析では著変はみられないが、抗Fas抗体で刺激した脾細胞のアポトーシスを観察したところ、老化マウスでは末梢におけるアポトーシス感受性の著明な低下が認められた。末梢におけるアポトーシス機構の破綻がサイトカインネットワークの不均衡をもたらしている可能性が示唆された。老化マウスには血清リウマトイド因子の増加がみられ関節病変の出現との関連性が示唆された。従来まで、MRL/lprマウスやNZB/WF1マウスなどのループスマウスと呼ばれる自己免疫マウスでは多臓器に自己免疫病変が出現することが知られているが、非自己免疫マウスにおいて関節病変を含めて多臓器に発症する自己免疫病変は報告がない。

本老化マウスはヒト・シェーグレン症候群が初期の唾液腺・涙腺など外分泌腺に限局する病期から腎・関節・肺・甲状腺・膵ラ氏島など全身性自己免疫病変へ移行する際のメカニズムの全容を解明するうえで極めて有用なモデル動物と考えられた。

E. 結論

原発性シェーグレン症候群の疾患モデルの長期観察を実施した結果、老化マウスにおいて多臓器にリンパ球浸潤性病変が雌優位に認められた。シェーグレン症候群疾患モデル(NFS/sld)は老化に伴い唾液腺、涙腺のみならず多臓器に炎症性病変が認められ、血中自己抗体の増加と臓器内120 KD α -フオドリンの出現を伴っていた。老化マウスでは末梢におけるアポトーシス感受性の著明な低下が認められ、老化に伴う免疫調節異常が臓器における自己抗原の発現を誘導し全身性自己免疫病変の発生に関与している可能性が示唆された。

F. 引用文献

- 1) N. Haneji et al: A new animal model for primary Sjogren's syndrome in NFS/sld mutant mice. *J Immunol*, 153:2769-2777, 1994.
- 2) N. Haneji et al.: Identification of α -fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjogren's syndrome. *Science* 276:604-607, 1997.
- 3) Y. Hayashi et al.: A new mutation involving the sublingual gland in NFS/N mice. *Am J Pathol*, 123:271-279, 1986.
- 4) Y. Hayashi et al.: Effector mechanism of experimental autoimmune sialadenitis in the mouse model for primary Sjogren's syndrome. *Cell Immunol*, 171:217-225, 1996.
- 5) M. Takahashi et al.: Mechanism of the development of autoimmune dacryoadenitis in the mouse model for primary Sjogren's syndrome. *Cell Immunol*, 170:54-62, 1996.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Yanagi, Y. Hayashi et al: In vivo role of IL-10 and IL-12 during development of Sjogren's syndrome in MRL/lpr mice. *Cell. Immunol.* 168:243-250, 1996.
- 2) Y. Hayashi: Cytokine, adhesion molecules, and

- immune deviation in autoimmune salivary gland disease. *Oral Med. Pathol.* 1:3-10, 1996.
- 3) S.Iseki, Yoshio Hayashi et al: Sonic hedgehog is expressed in epithelial cells during development of whisker, hair, and tooth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218:688-693, 1996.
 - 4) M. Takahashi, Y. Hayashi et al: Mechanisms of the development of autoimmune dacryoadenitis in the mouse model for primary Sjogren's syndrome. *Cell.Immunol.* 170:54-62,1996.
 - 5) E.Koyama, Y. Hayashi et al: Polarizing activity, Sonic hedgehog, and tooth development in embryonic and postnatal mouse. *Devlop. Dynamics* 206:59-72, 1996.
 - 6) Y. Hayashi et al: Effector mechanism of experimental autoimmune sialadenitis in the mouse model for primary Sjogren's syndrome. *Cell. Immunol.* 171:217-225, 1996.
 - 7) Y. Hayashi et al: Cytokine gene expression and autoantibody production in Sjogren's syndrome in MRL/lpr mice. *Autoimmunity* 23:269-277, 1996.
 - 8) K. Yanagi, Y. Hayashi et al:Immuno-pathological analysis of mucosal melanocyte distribution in the human lower lip of the elderly. *Pathobiology* 64: 156-160, 1996.
 - 9) N. Ishimaru,Y. Hayashi et al: Accelerated onset of age-related autoimmune lesions in MRL/+ mice. *Mech. Age. Develop.* 93:145-156, 1996 .
 - 10) M. Takahashi, Y. Hayashi et al: Role of the ICAM-1/LFA-1 pathway during development of autoimmune dacryoadenitis in an animal model for Sjogren's syndrome. *Pathobiology* 64: 269-274, 1996.
 - 11) H. Hamano, Y. Hayashi et al: Expression of HLA-DR and cytokine genes on interferon- γ -stimulated human salivary gland cell line. *Pathobiology* 64:255-261, 1996.
 - 12) N. Haneji, Y. Hayashi et al: Identification of α -fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjogren's syndrome. *Science* 25:604-607, 1997.
 - 13) M. Takahashi, Y. Hayashi et al: High incidence of autoimmune dacryoadenitis in male non-obese diabetic (NOD) mice depending on sex steroid. *Clin. Exp. Immunol.* 109:555-561:1997.
 - 14) K. Yanagi, Y. Hayashi et al: Analysis of T cell receptor V β usage in the autoimmune sialadenitis of non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin. Exp. Immunol.* 110:440-446, 1997.
 - 15) M.Azuma, Y. Hayashi et al: Role of cytokines in the destruction of acinar structure in Sjogren's Syndrome salivary glands. *Lab. Invest.* 77: 269-280, 1997.
 - 16) H. Iga, Y. Hayashi et al: Metastatic prostate carcinoma to the mandible. *Oral. Med. Pathol.* 3: 85-88, 1997.
 - 17) 林良夫：シェーグレン症候群における免疫機構 *BIO Clinica* 653:81-84:1997.
 - 18) 羽地則雄、林良夫：シェーグレン症候群モデルマウスにおける臓器特異的自己抗体 リウマチ：95-101, 1997.
 - 19) 林良夫：シェーグレン症候群原因自己抗原の解明 *難病と在宅ケア* 3：8-11, 1997.
 - 20) 林良夫：Sjogren症抗群モデルと臓器特異的自己抗原 *Molecular Medicine.*34:1425-1429, 1997.
 - 21) K. Yangi, Y. Hayashi et al: Anti-120-kDa α -fodrin immune response with Th-1-cytokine profile in the NOD mouse model of Sjogren's syndrome. *Eur. J. Immunol.* 28: 3336-3345, 1998.
 - 22) K. Tsubota, Y. Hayashi et al: Use of topical cyclosporin A in a primary Sjogren's syndrome mouse model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39: 1551-1559, 1998.
 - 23) S. Miyagawa, Y. Hayashi et al: Neonatal lupus erythematosus: Maternal IgG antibodies bind to a recombinant NH2-terminal fusion protein encoded by human α -fodrin cDNA. *J. Invest. Dermatol.* 111:1189-1192, 1998.
 - 24) K. Saegusa, Y. Hayashi et al: Mechanisms of transfer into SCID mice reconstituted with tissue-infiltrating cells from murine model for Sjogren's syndrome. *Oral. Med. Pathol* 3: 67-74, 1998.
 - 25) 林良夫、柳久美子、羽地則雄：Sjogren症候群の新たな自己抗原 *最新医学* 3月増刊号：41-50, 1998.
 - 26) 林良夫：シェーグレン症候群における臓器特異的自己抗原の同定 *生化学* 5月 381-385, 1998.
 - 27) 林良夫：シェーグレン症候群とその病因の解明 *モダンメディア別冊* 44：

- 151-156, 1998.
- 28) 林 良夫: シェーグレン症候群の原因抗原: 感染・炎症・免疫: 28: 60-62, 1998.
- 29) 林 良夫: シェーグレン症候群における自己抗原 α -フオドリンの同定とその意義 臨床免疫 30: 967-970, 1998.
- 30) 齋藤一郎, 林良夫: Sjogren症候群の臓器特異的自己抗原の検出とその成立機序 Annual Review 免疫 1999, 307-313, 1998.
- 31) 林 良夫: Sjogren症候群のターゲット、 α -フオドリン 内科 83(1):116-118, 1999.
- 32) I. Saito, Y. Hayashi et al: Fas ligand-mediated exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in mice transgenic for IL-10. J. Immunol. 162:2488-2494, 1999.
- 33) T. Watanabe, Y. Hayashi et al: Anti- α -fodrin antibodies in Sjogren's syndrome and lupus erythematosus. (in press):1999.
- 34) Y. Hayashi: The immunology of Sjogren's syndrome: emphasis on the role of salivary gland autoantigen. Biomedical Reviews (in press):1999.
- 35) M. Takahashi, Y. Hayashi et al: Requirement for splenic CD4+ T cells in the immune privilege of the anterior chamber of the eye. Clin. Exp. Immunol. (in press):1999.
2. 学会発表
- 36) 羽地則雄, 林 良夫, シェーグレン症候群モデルマウスにおける臓器特異的自己抗原の解析, 第40回日本リウマチ学会総会, 1996
- 37) 石丸直澄, 羽地則雄, 浜野弘規, 柳久美子, 齋藤一郎, 林 良夫, シェーグレン症候群モデルマウスにおけるエストロジェンの役割, 第26回日本免疫学会, 1996
- 38) 柳久美子, 羽地則雄, 東山浩之, 石丸直澄, 齋藤一郎, 林 良夫, シェーグレン症候群モデルマウスにおける唾液腺自己抗原エピトープの解析, 第26回日本免疫学会, 1996
- 39) 羽地則雄, 浜野弘規, 柳久美子, 石丸直澄, 齋藤一郎, 林 良夫, シェーグレン症候群における唾液腺自己抗原の特性, 第26回日本免疫学会, 1996
- 40) 羽地則雄, 石丸直澄, 柳久美子, 浜野弘規, 林 良夫, シェーグレン症候群モデルマウスにおける唾液腺自己抗原の特性, 第85回日本病理学会, 1996
- 41) 高橋真理子, 柳久美子, 羽地則雄, 石丸直澄, 浜野弘規, 林 良夫, 雄に好発するNODマウス自己免疫性涙腺炎の発症機序の解析, 第85回日本病理学会, 1996
- 42) 柳久美子, 羽地則雄, 石丸直澄, 浜野弘規, 林 良夫, NODマウス自己免疫性唾液腺炎における初期浸潤T細胞クロナイプの解析, 第85回日本病理学会, 1996
- 43) 石丸直澄, 柳久美子, 羽地則雄, 浜野弘規, 林 良夫, シェーグレン症候群モデルマウスにおけるエストロジェンの役割, 第85回日本病理学会, 1996
- 44) 浜野弘規, 石丸直澄, 柳久美子, 羽地則雄, 林 良夫, ヒト唾液腺導管上皮細胞における細胞接着分子誘導能および異所性クラスII抗原発現制御の解析, 第85回日本病理学会, 1996
- 45) 高橋麻理子, 三村康男, 林 良夫, 雄に好発するNODマウス自己免疫性涙腺炎の病態解, 第100回日本眼科学会総会, 1996
- 46) 羽地則雄, 石丸直澄, 柳久美子, 三枝かおる, 齋藤一郎, 林 良夫, シェーグレン症候群モデルのSCIDマウスへの再建, 第27回日本免疫学会総会, 1997
- 47) 石丸直澄, 羽地則雄, 柳久美子, 三枝かおる, 齋藤一郎, 林 良夫, シェーグレン症候群モデルマウスにおけるtoleranceの誘導, 第27回日本免疫学会総会, 1997
- 48) 三枝かおる, 石丸直澄, 羽地則雄, 柳久美子, 齋藤一郎, 林 良夫, シェーグレン症候群モデルマウスにおける自己トレランス破綻機構の解析, 第27回日本免疫学会総会, 1997
- 49) 林 良夫, 羽地則雄, 石丸直澄, 三枝かおる, 柳久美子, 齋藤一郎, シェーグレン症候群における自己抗原 α -fodrinの発現機序, 第27回日本免疫学会総会, 1997
- 50) 柳久美子, 羽地則雄, 石丸直澄, 齋藤一郎, 林 良夫, シェーグレン症候群における唾液腺特異的自己抗原エピトープの解析, 第27回日本免疫学会総会, 1997
- 51) 浜野弘規, 石丸直澄, 柳久美子, 三枝かおる, 羽地則雄, 齋藤一郎, 林 良夫, シェーグレン症候群モデルマウスにおける加齢の影響, 第86回日本病理学会, 1997

- 52) 石丸直澄、羽地則雄、柳久美子、三枝かおる、浜野弘規、齋藤一郎、林 良夫、シェーグレン症候群疾患モデルのSCIDマウスへの再建、第86回日本病理学会、1997
- 53) 林 良夫、羽地則雄、石丸直澄、柳久美子、浜野弘規、齋藤一郎、シェーグレン症候群モデルマウスにおける自己抗原の発現機構、第86回日本病理学会総会、1997
- 54) 柳久美子、羽地則雄、石丸直澄、三枝かおる、齋藤一郎、林 良夫、シェーグレン症候群における唾液腺特異的T細胞エピトープの解析、第87回日本病理学会総会、1998
- 55) 柳久美子、羽地則雄、石丸直澄、三枝かおる、齋藤一郎、林 良夫、シェーグレン症候群における唾液腺特異的B細胞エピトープの解析、第87回日本病理学会、1998
- 56) 石丸直澄、羽地則雄、柳久美子、三枝かおる、齋藤一郎、林 良夫、シェーグレン症候群モデルマウスにおけるトレランスの誘導とそのメカニズム、第87回日本病理学会、1998
- 57) 三枝かおる、石丸直澄、羽地則雄、柳久美子、齋藤一郎、林 良夫、シェーグレン症候群モデルマウスにおけるCD28^{low} populationの意義、第87回日本病理学会総会、1998
- 58) 石丸直澄、羽地則雄、柳久美子、三枝かおる、齋藤一郎、林 良夫、シェーグレン症候群モデルマウスの自己抗原における誘発、第87回日本病理学会、1998
- 59) 石丸直澄、林 良夫、シェーグレン症候群モデルマウスにおけるホスホマイシン投与の影響、第46回日本化学療法学会総会、1998
- 60) 矢野淳也、米田智子、石丸直澄、三枝かおる、柳久美子、齋藤一郎、林 良夫、放射線照射正常マウスへのシェーグレン様病変の誘導、第28回日本免疫学会総会、1998
- 61) 石丸直澄、三枝かおる、米田智子、柳久美子、齋藤一郎、林 良夫、シェーグレン症候群疾患モデルにおけるFas依存性アポトーシスのエストロジェンによる調節機、第28回日本免疫学会総会、1998
- 62) 米田智子、石丸直澄、三枝かおる、柳久美子、齋藤一郎、林 良夫、シェーグレン症候群疾患モデルにおける加齢変：自己免疫性涙腺炎・唾液腺炎の病態増強、第28回日本免疫学会総会、1998
- 63) 三枝かおる、石丸直澄、羽地則雄、柳久美子、齋藤一郎、林 良夫、シェーグレン症候群モデルマウスにおける自己トレランスの破綻とCD28^{low}の役割、第28回日本免疫学会総会、1998
- 64) 柳久美子、羽地則雄、石丸直澄、三枝かおる、齋藤一郎、林 良夫、シェーグレン症候群特異的自己抗原α-フォドリンにおける抗原エピトープの解析、第28回日本免疫学会総会、1998