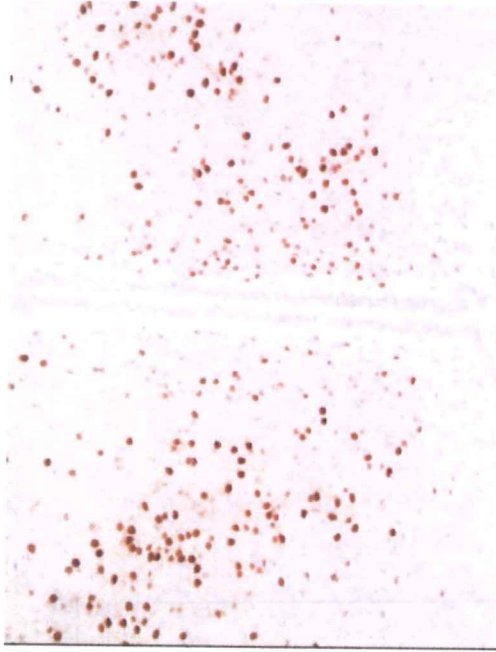


Fig.3 ER α 陽性細胞の雌雄差

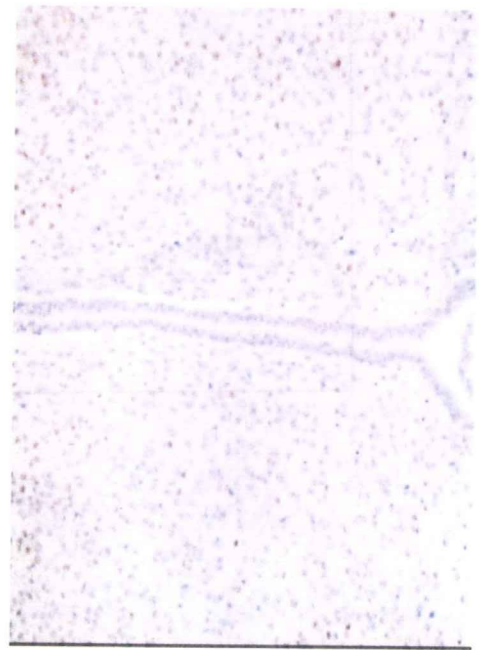
5日齡雌



5日齡雌



5日齡雄



5日齡雄



前腹側室周囲核

内側視索前核

Table1 新生児ラットの内側視索前核におけるER α 陽性細胞数

Posterior part		1	5	7	10	21	10
Age(day)							
Sex	(W)						
Female	15.7	25.5	22.5	28.5	34.3	24.0	
	± 3.8	± 11.2	± 16.4	± 16.7	± 28.3	± 17.9	
Male	4.3	26.0	26.0	22.3	30.8	19.8	
	± 2.3	± 13.1	± 20.1	± 5.6	± 8.0	± 7.2	

Anterior part		1	5	7	10
Age(day)					
Sex					
Female	155.5	204.0	224.0	207.7	
	± 3.5	± 70.4	± 32.5	± 35.8	
Male	130.5	156.3	132.3	97.5 *	
	± 0.7	± 3.5	± 45.0	± 17.7	

mean \pm SD *:Statistical Significance $p > 0.05$

Table2 Ethinyl Estradiol 投与後の新生児ラットの内側視索前核後部における
ER α 陽性細胞数

Dose(μ g/kg/day)	Day after treatment			
	1	5	16	16
Female				
0	31.0 \pm 5.6	30.4 \pm 11.1	35.8 \pm 10.3	35.8 \pm 10.3
0.5	58.0 \pm 23.2	35.5 \pm 16.2	31.6 \pm 12.0	31.6 \pm 12.0
5	76.0 \pm 12.1*	40.5 \pm 12.9	42.2 \pm 19.4	42.2 \pm 19.4
50	134.7 \pm 59.5	42.5 \pm 23.4	42.2 \pm 6.14	42.2 \pm 6.14
Male				
0	29.0 \pm 2.7	26.0 \pm 5.2	41.8 \pm 3.0	41.8 \pm 3.0
0.5	54.0 \pm 19.7	26.3 \pm 9.3	42.5 \pm 16.3	42.5 \pm 16.3
5	69.8 \pm 43.3	40.3 \pm 7.3*	49.0 \pm 8.3	49.0 \pm 8.3
50	106.3 \pm 58.2	43.3 \pm 4.8*	49.0 \pm 13.0	49.0 \pm 13.0
mean \pm SD	*: Statistical Significance P>0.05			

Table 3 Ethinyl Estradiol 投与後の新生児ラットの内側視索前核前部と後部におけるER α 陽性細胞数の比較

Ethinyl Estradiol Dose(μ g/kg/day)	Anterior part		Posterior part	
	Female	Male	Female	Male
0	202.5 \pm 35.8	120.0 \pm 56.6	31.0 \pm 5.6	29.0 \pm 2.7
0.5	235.8 \pm 45.8	162.0 \pm 96.2	58.0 \pm 23.2	54.0 \pm 19.7
5	252.5 \pm 0.70	143.7 \pm 16.1	76.0 \pm 12.1*	69.8 \pm 43.3
50	357.3 \pm 26.8*	214.3 \pm 58.6	134.7 \pm 59.5	106.3 \pm 58.2
mean \pm SD				

*: Statistical Significance P>0.05

2) 免疫

5. 内分泌かく乱化学物質の免疫異常に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 林 良夫 徳島大学大学院 教授

研究協力者 石丸 直澄 徳島大学大学院 助教授

研究要旨 シェーグレン症候群は涙腺・唾液腺を中心とする外分泌腺を標的臓器として発症し、ドライアイ・ドライマウスなどの乾燥症状を特徴とする難治性自己免疫疾患である。当研究室ではシェーグレン症候群疾患モデルを開発し、その病因・病態解析を実施してきた。NFS/sld マウスは PND 3 の胸腺摘出を施すことにより自己免疫病態を呈することから、EDCs 投与によって *in vivo* における免疫異常の誘導が可能か否かについて検討を加えた。新生児期に EDCs ダイオキシン (TCDD) を投与した結果、投与後 4 週目、8 週目に T 細胞分画の異常が認められ、唾液腺・腎臓・肺・肝臓など多臓器に炎症性病変が誘導された。

A. 研究目的

シェーグレン症候群は涙腺・唾液腺を中心とする外分泌器官を標的臓器として発症し、ドライアイ・ドライマウスなどの乾燥症状を臨床的特徴とする原因不明の難治性自己免疫疾患であるが、極めて高率に女性優位に発症することから性ホルモンとの関連が指摘されている。当研究室では NFS/sld ミュータントマウスを用いてシェーグレン症候群疾患モデルを開発し、その病因・病態解析を実施してきた。NFS/sld マウスは PND 3 の胸腺摘出 (3d-Tx) を施すことにより 4 週目以降、涙腺・唾液腺に限局する自己免疫病変を必発し涙液・唾液分泌障害を伴うヒト・シェーグレン症候群に極めて類似した病態を呈することから、薬剤などの治療効果の判定に有用な疾患モデルマウスである。従来から、EDCs が免疫機能に及ぼす影響が指摘されているが実験動物を用いた *in vivo* における詳細については不明である。そこで、本研究は、新生児期

NFS/sld ミュータントマウスに TCDD を投与することによって 3d-Tx を施すことなく免疫異常の誘導による自己免疫病態の発症が可能か否かについて明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) マウスおよび投与方法

新生児期雌雄 NFS/sld マウスを使用 (全 92 匹、うち有効匹数 75 匹)。NFS/sld マウスは舌下腺粘液細胞に分化異常をきたすミュータントマウスとして樹立され、当施設にて SPF (specific pathogen-free) 下で繁殖飼育されている。雌 NFS/sld マウスは PND 3 の胸腺摘出を施すことにより 4 週目以降、涙腺・唾液腺に限局する自己免疫病変を発症しヒト・シェーグレン症候群類似の病態を呈する。新生児期 NFS/sld マウスに対し、PND 1、2、3 に代表的なダイオキシン類として 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, Cambridge Isotope Lab. Ins.) を各濃度 (0.1, 1.0, 10.0, 20.0

ng/head/day)にて腹腔内投与後、4週後、8週後の変化を対照群（コーンオイル投与）と比較した。各々のマウスにつき体重測定を実施し、全身臓器の湿重量測定を行った。なお、TCDDを用いた動物実験は国立医薬品食品衛生研究所毒性部（菅野純部長）との共同研究のもとで同研究所内特殊実験施設において実施した。

2) 病理組織学的検索

全身諸臓器は臓器重量を測定後、10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、有機溶媒に浸染したのち軟パラフィン包埋後4 μ の組織切片を作成してヘマトキシリン・エオジン染色を施した。唾液腺における炎症性病変の組織学的評価はWhiteらの分類に準じた。

3) フローサイトメトリー解析

各群における全てのマウスから胸腺および脾臓を摘出し、ホモジナイズ、溶血、洗浄後各種抗体(CD4, CD8, B220, CD44, CD25, CD45RB, Mel-14; Pharmingen)と反応させた後に3%パラホルムアルデヒドにて固定し、有機溶媒に浸染したのち細胞自動解析装置(FACSCanto, BD)にて解析した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会および国立医薬品食品衛生研究所において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。

C. 研究結果

NFS/sldマウス新生児期(PND1、2、3)にTCDD(0.1、1.0、10.0、20.0 ng/head/day)を腹腔内投与した後、4週、および8週後の変化を

検討し、それぞれ対照群と比較した。

1) 死亡率

TCDDの新生児期投与により、特に高濃度投与群(10.0、20.0 ng/head)における死亡率が高く、TCDD投与後4週から8週までの間に10.0 ng/head群で約45%、20.0 ng/head群では約75%が死亡した。

2) 体重および臓器湿重量に対する影響

TCDDの新生児期投与による体重および臓器湿重量に対する影響について検討を加えた。体重の変動については、4週齢では20.0 ng/head投与群において雌雄マウスとも50~75%の減少率がみられ、8週齢では対照と比較して約30%とやや回復傾向がみられた。臓器湿重量については、20.0 ng/head投与群での雄マウスの副腎、下垂体を除く各臓器重量の著明な減少が認められた。胸腺では雌雄マウスとも4週群で対照群と比較して約70%の重量減少がみられ、8週目では約30%と回復傾向がみられた。脾臓重量への影響は雌雄マウスとも4週群で対照群と比較して約80%の減少が見られたが、8週齢では雄マウスに強い変化が認められ、10.0 ng/head投与群で約150%と異常な重量増加(脾腫)がみられた(図1)。その他の臓器では20.0 ng/head投与群4週齢で、唾液腺・涙腺・腎臓・心臓・肺・肝臓・膵臓・性腺(睾丸・卵巣)の各重量に著明な減少傾向が現れていたが、8週齢では各臓器重量の減少率は4週齢ほど目立たなかった。また、脳・下垂体・副腎における重量減少は軽微であった

2) 免疫担当細胞への影響

TCDDの新生児期投与による免疫担当細胞への影響について明らかにするため、胸腺および脾細胞を分散し、フローサイトメトリーに

よる解析を実施した。TCDD の新生児期投与による胸腺、脾臓の総細胞数の変動に関しては臓器重量の変化とほぼ同様の傾向を示していた。

(図2)。

脾臓：脾臓における CD4 陽性 T 細胞は TCDD の投与量に伴い減少傾向が認められ、逆に CD8 陽性 T 細胞は TCDD 高濃度投与により増加していることが明らかにされた。雌マウスでは TCDD 投与による CD4 陽性 T 細胞への影響は認められず、CD8 陽性 T 細胞の増加が認められた。雌雄マウスともに8週齢脾臓では CD4 陽性 T 細胞の減少、CD8 陽性 T 細胞の増加が高濃度 TCDD 投与群で目立ち、CD44^{high} 陽性 T 細胞も増加していた。

一方、雌マウスでは CD4、CD8 陽性 T 細胞ともに TCDD 暴露による影響は殆んど観察されなかった(図3)。CD4 陽性 CD25 陽性抑制性 T 細胞への影響もみられなかった。また、末梢 T 細胞の活性化機構における TCDD 投与の影響について T 細胞活性化マーカー(CD44, CD45RB, Mel-14)の動態解析を実施した。その結果、CD4、CD8 における CD44^{high} 陽性 T 細胞の漸増が観察された。

3) 病理組織学的変化

全身諸臓器について臓器重量を測定後、有機溶媒に浸染したのち組織切片を作成して病理組織学的検討を実施した。その結果、唾液腺(顎下腺、耳下腺)、腎臓、肺、肝臓に病理組織学的な変化が認められた。

胸腺：TCDD の新生児期投与により4週齢では雌雄マウスとも胸腺内 CD4SP (シングルポジティブ) 細胞および DP (ダブルポジティブ) 細胞への分化が抑制され、逆に CD8SP 細胞への分化促進および集積が観察されたが、雌マ

ウス8週齢では回復傾向がみられた。逆に雄マウス8週齢では CD8SP 細胞が TCDD 濃度依存的に顕著な集積増加が認められた唾液腺：4週群で雌雄マウスともに TCDD 投与により唾液腺(顎下腺、耳下腺)に軽度のリンパ球浸潤が認められた(White らの分類の grade 1 または grade 2)。炎症性病変は導管周囲の巣状単核細胞浸潤として観察された。一方、涙腺炎の出現はいずれの実験群でもみられなかった。TCDD 0.1 ng/head 群では雌雄マウスとも耳下腺炎が対照群に比較してやや強い変化がみられたが、有意な差ではなかった。8週群では雌雄マウスともに4週群と比較し顎下腺、耳下腺により高度なリンパ球浸潤性病変(grade 3)が誘導された。0.1、1.0、10.0 ng/head 群のいずれにおいても対照群に比較して高度な変化がみられ、やや雌マウスに強い変化が認められた。

腎臓：腎臓の間質を中心に慢性のリンパ球浸潤が認められ、間質性腎炎類似の病理組織像を呈していた。雌マウスと比較して雄マウスにより高度な腎病変がみられた。特に、雄マウス 1.0、10.0 ng/head 投与群において顕著な間質性腎炎の出現がみられた。さらに高度な腎病変では thyroid-like appearance に類似した尿細管病変がみられ、一部で嚢胞形成を伴っていた。

肺：肺の細気管支周囲、および血管周囲にリンパ球浸潤性病変がみられ、雌マウスと比較して雄マウスにより顕著に認められた。特に8週群の雄マウス 10.0 ng/head 投与群において高頻度であった。

肝臓：肝内グリソン鞘細胆管周囲に軽度のリンパ球浸潤病変が観察され、やや雄マウスに高頻度に認められた。特に雄マウス 10.0

ng/head 投与群において顕著であった。

D. 考察

ダイオキシンを含む EDCs の免疫機能に及ぼす影響が *in vitro* の解析に基づいて指摘されているが実験動物を用いた詳細な検討は為されていない。原因不明の自己免疫疾患シェーグレン症候群の疾患モデル NFS/sld マウスは PND 3 の胸腺摘出によって 8 週齢以降、自己免疫性唾液腺炎・涙腺炎が雌マウス優位に必発する。さらに加齢の進行とともに自己免疫性唾液腺炎・涙腺炎の病態増強が認められること、及び 12 ヶ月以降の老齢雌マウスに関節リウマチ様病変や間質性肺炎様病変が発症することを明らかにしている。また、本疾患モデルを用いて卵巣摘出の影響を検討した結果、エストロゲン欠乏状態が免疫担当細胞の機能障害を誘導すると同時に、標的細胞の Fas 依存性アポトーシスを亢進している事実を明らかにした。今回、新生児期雌雄 NFS/sld マウスに対し、PND 1、2、3 に TCDD を投与した後、4 週目、8 週目の変化を観察した。

EDCs の新生児期投与による体重の変動に関しては、4 週齢では 20.0 ng/head 投与群において雌雄マウスとも 50-75% の減少率がみられ、8 週齢では対照群と比較して約 30% とやや回復傾向がみられた。臓器湿重量については、20.0 ng/head 投与群で各臓器重量の著明な減少傾向が認められた。胸腺では雌雄マウスとも 4 週群で対照群と比較して約 70% の重量減少がみられ、8 週目では約 30% と回復傾向がみられた。

脾臓重量への影響は雌雄マウスとも 4 週群で対照群と比較して約 80% の減少が見られたが、8 週齢では雄マウスに強い変化が認めら

れ、10.0 ng/head 投与群で著明な脾腫がみられた。この脾腫の原因として TCDD による胸腺・脾臓における CD8 陽性 T 細胞分画への分化亢進と関連している可能性が示唆された。免疫担当細胞への影響について胸腺細胞および脾細胞を用いてフローサイトメトリーによる解析を実施した結果、TCDD の新生児期投与により胸腺内 CD4SP 細胞および DP 細胞への分化が抑制され、CD8SP 細胞への分化促進および集積が観察された。4 週齢では雌雄マウスとも胸腺における CD4SP 細胞の TCDD 濃度に依存して減少傾向が認められ、逆に CD8SP 細胞は高濃度群で増加していた。脾臓においても CD4 陽性 T 細胞は TCDD の投与量に伴い減少傾向が認められ、これらの減少傾向は 8 週目以降回復がみられ、新生児期投与による影響は 4 週目までの初期段階に末梢 T 細胞分画の障害として出現する可能性が示唆された。雌雄マウスともに 8 週齢脾臓では CD4 陽性 T 細胞の減少、CD8 陽性 T 細胞の増加が高濃度 TCDD 投与群で目立ち、このことから TCDD 投与により CD8 側に分化した T 細胞は増殖能が亢進している可能性が示唆された。胸腺の細胞構成のうち、CD4SP 細胞と CD8SP 細胞との比率が減少すること、すなわち、SP 細胞の分化が CD8 側に偏ることが明らかとなり、この過程が TCDD に対して感受性が高いことが示された。一般に、ダイオキシン類による細胞障害がエストロゲン受容体 (ER) との結合を介したものとされることから、ヒトやマウスにおいて CD8 陽性 T 細胞のエストロゲン受容体発現量が CD4 陽性 T 細胞と比較して著しく高いことと関連しているのかも知れない。新生児期 TCDD 投与後 4 週目、8 週目にみられる T 細胞分画への影響、特に雄マウス胸腺・脾臓における CD8

陽性 T 細胞の集積がどのような機能異常を伴っているのか今後の詳細な検討が必要である。

全身諸臓器の病理組織学的検索の結果、TCDD を投与したいずれの実験群においても 4 週齢、8 週齢において唾液腺炎（顎下腺炎・耳下腺炎）の出現が認められた。PND 3 の胸腺摘出によって成立する自己免疫病変に比較するとやや軽度の変化であるが、これらの炎症性病変が自己免疫に起因するの否かについて細胞移入実験などによってさらに詳細に解析することが必要と考えられた。また、いずれの実験群においても涙腺炎の出現がみられなかったが、その理由として唾液腺と涙腺における AhR や ER の発現量の違い等が考えられ、この点に関しても解明する必要がある。さらに、TCDD 投与により腎臓の間質を中心にび慢性のリンパ球浸潤が認められ、間質性腎炎類似の病理組織像を呈していた。この変化は雌マウスと比較して雄マウスにより激烈であった。また、肺の細気管支周囲のリンパ球浸潤性病変、肝グリソン鞘細胆管周囲のリンパ球浸潤病変も雄マウスにより強い変化が観察された。ラットの雄性生殖器官は TCDD に対して感受性が高いことは既に知られているが、マウスの腎臓、肺、肝臓においても雌と比較して雄マウスが TCDD 高感受性である可能性が示唆された。

現在までに EDCs の免疫機能に及ぼす *in vitro* における影響が検討されている。ヒト末梢リンパ球への影響についてはリンパ球を刺激するマイトージェン（コンカナバリン A）に EDCs を加え、リンパ球増殖反応が検討されている。その結果によると Nonylphenol、BPA などの EDCs が末梢リンパ球の増殖反応を抑制すると報告されている。また、マクロファ-

ージの分化能への影響について BPA がマクロファージ前駆細胞からの分化誘導能を促進する作用のあることが報告されている。ヒトを含めた哺乳類の免疫系は胎児期も含め、生後まもない時期に完成することが知られている。この時期に胸腺内 T 細胞分化を中心とする自己と非自己の識別機構に何らかの障害が生じることによって免疫異常を基盤とした自己免疫疾患の発症に至ることが推定される。胎児期に低用量 TCDD を暴露されたラットの免疫関連臓器への影響が検討されている。妊娠 15 日の Holtzman ラットを用い 12.5~800 ng/kg 体重の TCDD を 1 回経口投与、PND 5~120 まで解析した。胸腺細胞の数及び CD4 と CD8 を指標とした胸腺細胞 population はいずれの時期においても投与による影響はみられていないが、脾細胞数は PND 49 の 12.5 ng/kg 以上の実験群で用量依存性に減少が認められている。従って、周産期低用量 TCDD 暴露は AhR 非依存性に児動物の免疫臓器に影響を与える可能性も示唆されている。

ダイオキシン類は発がん作用をはじめとした様々な毒性作用を持つ環境汚染物質であり、エストロゲン攪乱作用が注目されてきた。エストロゲンの生理作用は ER α 、 β を介した標的遺伝子の転写制御により発揮される。一方、ダイオキシン類は AhR に結合して同様に遺伝子の転写を制御する作用を持ち、転写制御の段階でダイオキシンとエストロゲンのシグナルが相互作用している可能性が検討された。ダイオキシンと結合して活性化した AhR が、エストロゲンを結合していない状態の ER に直接結合することにより、不活性化状態の ER を活性化するという分子機構が明らかにされている。即ち、AhR との複合体形成が起こる

と、エストロゲンと結合していない状態でも ER が活性化され、正常なエストロゲンシグナル伝達を攪乱することが報告された。

胸腺摘出を施すことにより成立するシェーグレン症候群疾患モデル NFS/sld マウスを用いて、胸腺摘出を施すことなく新生児期に TCDD を投与した今回の検討結果から、投与後 4 週目、8 週目にみられた胸腺萎縮、T 細胞分画の異常、および唾液腺・腎臓・肺・肝臓における炎症性病変の出現は出生直後に EDCs が体内に取り込まれることによって免疫機能障害が誘導されたことに起因するものと考えられた。

筆者らは以前にエストロゲン欠乏状態が免疫担当細胞の機能障害を誘導すると同時に標的細胞のアポトーシスを亢進している事実を明らかにしている。エストロゲンと類似した作用を示す TCDD が、ER を介して遺伝子を活性化し、様々な生体反応を起こすことが知られていることから、今後は T 細胞、B 細胞のアポトーシス関連分子を含む機能解析に加え、サイトカインとそのレセプター、AhR、ER 及び AhR 依存性に発現するとされる CYP1A1 の動態解析を実施する予定である。

E. 結論

PND 3 の胸腺摘出(3d-Tx)を施すことにより成立するシェーグレン症候群疾患モデル NFS/sld 雌雄マウスを用いて新生児期に EDCs として TCDD を投与した結果、投与後 4 週目から T 細胞分画の異常が認められ、4 週後および 8 週後に唾液腺、腎臓、肺、肝臓における炎症性病変の出現が認められた。

F. 健康危惧情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kurobe H, Cunlan Liu C, Ueno T, Saito F, Ohigashi I, Seach N, Arakaki R, Hayashi Y, Kitagawa T, Lipp M, Richard L. Boyd R, Takahama Y: CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is dispensable for T-cell maturation and thymic export but is essential for establishing central tolerance. *Immunity* in press, 2006.
- 2) Katunuma K, Ohashi A, Sano E, Ishimaru N, Hayashi Y, Murata E: Catechin: Specific inhibitor for caspase-3, 7, and 2, and the prevention of apoptosis at the cell and animal levels. *FEBS Let.* in press, 2006.
- 3) Shiari R, Kobayashi I, Toita N, Hatano N, Kawamura N, Okano M, Hayashi Y, Kobayashi K, Ariga T: Epitope mapping of anti- α -fodrin autoantibody in juvenile Sjogren's syndrome: epitope spreading and difference in major epitope between primary and secondary cases. *J. Rheumatol.* in press, 2006
- 4) Miyazaki K, Takeda N, Ishimaru N, Omotehara F, Arakaki R, Hayashi Y: Analysis of in vivo role of α -fodrin autoantigen in primary Sjogren's syndrome. *Am. J. Pathol.* 167:1051-1059, 2005.
- 5) Takei M, Shiraiwa H, Azuma T, Hayashi Y, Seki N, Sawada S: The possible etiopathogenic genes of Sjogren's syndrome.

- Autoimm. Rev.* 4:479-484, 2005.
- 6) Entesarian M, Matsson H, Klar J, Bergendal B, Olson L, Arakaki R, Hayashi Y, Ohuchi H, Falhat B, Bolstad AI, Jonsson R, Wahren-Herlenius M, Dahl N, Mutations in the fibroblast growth factor 10 gene are associated with aplasia of lacrimal- and salivary glands (ALSG). *Nature Genetics*, 37:125-127, 2005
- 7) Kuroda N, Mitani T, Takeda N, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y, Bando Y, Izumi K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S, Ueno T, Takahama Y, Uchida D, Sun S, Kajiura F, Mouri Y, Han H, Matsushima A, Yamada G, Matsumoto M, Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J Immunol.* 174:1862-1870, 2005
- 8) Kobayashi M, Yasui N, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y, Development of autoimmune arthritis in Sjogren's syndrome mouse model with aging via bystander T cell activation. *Arthritis Rheum.* 50:3974-3984, 2004 .
- 9) Ishimaru N, Arakaki R, Katunuma N, Hayashi Y, Critical role of cathepsin-inhibitors for autoantigen processing and autoimmunity. *Adv. Enzyme. Regul.* 44:309-320, 2004..
- 10) Hayashi Y, Ishimaru N, Arakaki R, Tsukumo S, Kishihara K, Shiota H, Yasutomo K, Hayashi Y, Effective treatment of Sjogren's syndrome mouse model by eye drop administration with anti-CD4 monoclonal antibody. *Arthritis Rheum.* 50:2903-2910, 2004.
- 11) Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, Kobayashi M, Izawa T, Moriyama K, Hayashi Y, Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with RANKL-mediated osteoclastogenesis. *Endocrinol.* 145:2384-2391, 2004.
- 12) Hayashi Y, Arakaki R, Ishimaru N, Apoptosis, and estrogen deficiency in primary Sjogren's syndrome. *Cur. Opin. Rheumatol.* 16:522-526, 2004.
- 13) Maruyama T, Saito I, Hayashi Y, Kompfner E, Fox RI, Burton DR, Ditzel HI, Molecular analysis of the human autoantibody response to α -fodrin in Sjogren's syndrome reveals novel apoptosis-induced specificity. *Am. J. Pathol.* 165:53-61, 2004.
- 14) Hayashi Y, Arakaki R, Ishimaru N: Crucial role of tissue-specific apoptosis on the development of Sjogren's syndrome. *Oral Sci. Int.* 1:55-64, 2004.
- 15) Fujibayashi T, Sugai S, Miyasaka N, Hayashi Y, Tsubota K: Revised Japanese criteria for Sjogren's syndrome (1999): availability and validity. *Modern Rheumatol.* 14:425-434, 2004.
- 16) Nagata Y, Inoue H, Yamada K, Higashiyama H, Mishima K, Kizu Y, Takeda I, Mizuno F, Hayashi Y, Saito I: Activation of Epstein-Barr virus by saliva from Sjogren's syndrome patients. *Immunol.* 111:223-229, 2004.
- 17) Ishimaru N, Arakaki R, Watanabe M, Kobayashi M, Miyazaki K, Hayashi Y,

Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome of healthy background. *Am. J. Pathol.* 163:1481-1490, 2003.

- 18) Arakaki R, Ishimaru N, Saito I, Kobayashi M, Yasui N, Sumida T, Hayashi Y, Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in adoptively transferred mice with autoreactive CD4+ T cell. *Arthritis Rheum.* 48:3603-3609, 2003.
- 19) Ogawa K, Nagahiro S, Arakaki R, Ishimaru N, Kobayashi M, Hayashi Y, Anti- α -fodrin autoantibodies in Moyamoya disease. *Stroke* 34:244-246, 2003.
- 20) Katunuma N, Matsunaga Y, Himeno K, Hayashi Y, Insights into the roles of cathepsins in antigen processing and presentation revealed by specific inhibitors. *Biol. Chem.* 384:883-890, 2003.
- 21) Hayashi Y, Arakaki R, Ishimaru N: The role of caspase cascade on the development of primary Sjogren's syndrome. *J. Med. Invest.* 50:32-38, 2003.

2. 学会発表

- 1) シェーグレン症候群モデルマウスにおけるレバミピドの治療効果の検討、日本免疫学会総会学術集会記録、35巻 p.33, 2005.
- 2) シェーグレン症候群モデルマウスにおける間質性肺病変の解析、日本免疫学会総会学術集会記録、35巻 p.6, 2005.
- 3) Ni アレルギーにおける樹状細胞及びT細胞の活性化機構、日本免疫学会総会学術集会記録、35巻 p.140, 2005.
- 4) RANKL 刺激活性化 DC を介した MRL/lpr マ

ウス関節炎の病態修飾、日本免疫学会総会学術集会記録、35巻 p.248, 2005.

- 5) Immunoregulation of NF- κ B for T cell activation in autoimmune disease、日本免疫学会総会学術集会記録、35巻 p.275, 2005.
- 6) シェーグレン症候群発症の分子基盤、日本病理学会雑誌、94巻1号 p.159, 2005.
- 7) RANKL 刺激樹状細胞移入による MRL/lpr マウス関節リウマチ病変の解析、日本病理学会雑誌、94巻1号 p.197, 2005.
- 8) シェーグレン症候群発症における自己抗原 120kDa-フォドリンの意義、本病理学会雑誌、93巻1号 p.206, 2005.
- 9) RbAp48 遺伝子導入マウスにみられるシェーグレン症候群類似病変の解析、日本病理学会雑誌、94巻1号 p.206, 2005.
- 10) 自己免疫疾患における NF- κ B を介した T 細胞活性化機構の解析、日本病理学会雑誌、94巻1号 p.224, 2005.
- 11) シェーグレン症候群唾液腺における RbAp48 発現の意義、日本免疫学会総会学術集会記録、34巻 p.76, 2004.
- 12) 遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子 AIRE(autoimmune regulator)の機能解析、日本免疫学会総会学術集会記録、34巻 p.77, 2004.
- 13) RbAp48 遺伝子導入マウスにおけるシェーグレン症候群類似病変の出現、日本免疫学会総会学術集会記録、34巻 p.78, 2004.
- 14) シェーグレン症候群患者における RbAp48 遺伝子の解析、日本病理学会雑誌、93巻1号 p.234, 2004.
- 15) シェーグレン症候群患者における自己抗原 α -フォドリン反応性、日本病理学会雑誌、

93巻1号 p.295, 2004.

16) シェーグレン症候群標的臓器における RbAp48 遺伝子の役割、日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p.286, 2003.

17) NiC12 感作マウス接触性皮膚炎における p38 経路を介した樹状細胞の役割、日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p.58, 2003.

18) 関節リウマチ滑膜細胞におけるアポトーシス感受性に関する検討、日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p.222, 2003.

19) RNAKL 刺激樹状細胞移入による MRL/lpr マウス自己免疫性関節炎の病態修飾、日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p.225, 2003.

20) シェーグレン症候群における RbAp48 発現とアポトーシス、日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p.286, 2003.

21) シェーグレン症候群患者末梢Tリンパ球の自己抗原 α -フオドリン反応性の解析、日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p.285, 2003.

22) シェーグレン症候群の涙腺炎に対する抗 CD4 抗体点眼療法の開発、日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p.286, 2003.

23) シェーグレン症候群患者における自己抗原 α -フオドリン反応性、日本病理学会雑誌、93巻1号 p.295, 2004.

24) シェーグレン症候群の発症におけるエストロジェンの役割、日本病理学会雑誌、92巻1号 p.167, 2003.

25) シェーグレン症候群発症機構に関与する

エストロジェン欠乏による Class II 発現調節の解析、日本病理学会雑誌、92巻1号 p.204, 2003.

26) RNAKL 刺激樹状細胞移入による MRL/lpr マウス自己免疫性関節炎の病態修飾、日本病理学会雑誌、92巻1号 p.223, 2003.

27) もやもや病患者血清中に認められた α -フオドリンに対する自己抗体に関する検討、日本病理学会雑誌、92巻1号 p.268, 2003.

28) 金属アレルギーにおける RANKL を介したマウス樹状細胞活性化機構の解析、日本病理学会雑誌、92巻1号 p.364, 2003.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1) 特願平 9-104873・林 良夫「 α -フオドリンまたは α -フオドリン断片蛋白を含む製剤」
林 良夫、武田国雄；平成9年4月22日

2) Patent Number. 6,121,057 Hayashi Y, Hiromu Sugino: 「Methods of Detecting Antibodies to α -fodrin and Fragments Thereof in Diagnosing Sjogrens'」 Yoshio Hayashi. September 19, 2000

3) 特願 2003-123959・林 良夫「自己免疫疾患の予防・治療剤及びそのスクリーニング方法」

林 良夫、興和株式会社；平成15年4月28日

4) Patent Number. US6,703,021 B2 Hayashi Y, Hiromu Sugino: 「Composition containing α -fodrin or α -fodrin fragment protein」
Yoshio Hayashi March 9, 2004

図 説明

- 図-1 TCDD の新生児期投与による体重および臓器湿重量に対する影響
体重 (g) の変動は4週齢では20.0 ng/head 投与群において雌雄マウスとも50~75%の減少率がみられ、8週齢では回復傾向がみられた。臓器湿重量 (mg) は、20.0 ng/head 投与群で胸腺では雌雄マウスとも4週群で対照群と比較して約70%の重量減少がみられ、8週目では約30%と回復傾向がみられた。脾臓重量は雌雄マウスとも4週群20.0 ng/head 投与群において約80%の減少が見られたが、逆に8週齢雄マウス10.0 ng/head 投与群では約150%と著明な重量増加がみられた。
- 図-2 TCDD の新生児期投与による胸腺内T細胞サブポピュレーションへの影響
4週齢では雌雄マウスともTCDD濃度に依存してCD4SP細胞の減少傾向が認められたが、8週齢では回復傾向がみられた。CD4SP細胞およびDP細胞への分化が抑制され、8週齢雄マウスでCD8SP細胞への分化促進および集積が観察された。特に高濃度群でCD8SP細胞が増加していた。
- 図-3 TCDD の新生児期投与による脾臓T細胞サブポピュレーションへの影響
CD4陽性T細胞はTCDDの投与量に伴い減少傾向が認められ、逆にCD8陽性T細胞は高濃度投与により増加していた。雌マウスではTCDD投与によるCD4陽性T細胞への影響は認められず、CD8陽性T細胞の増加が認められた。雌雄マウスともに8週齢ではCD4陽性T細胞の減少、CD8陽性T細胞の増加が高濃度投与群で目立っていた。

Figure 1

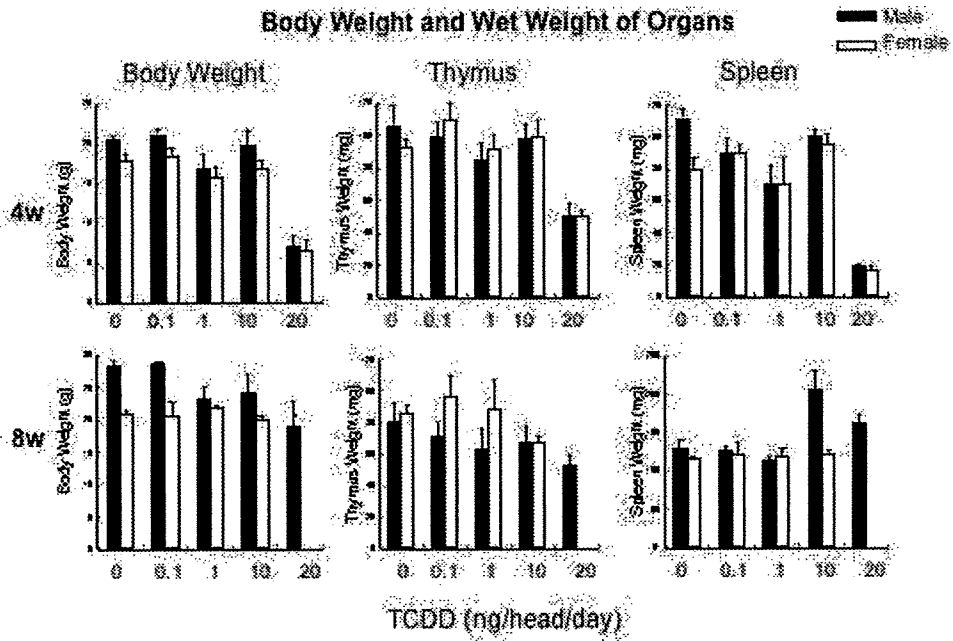
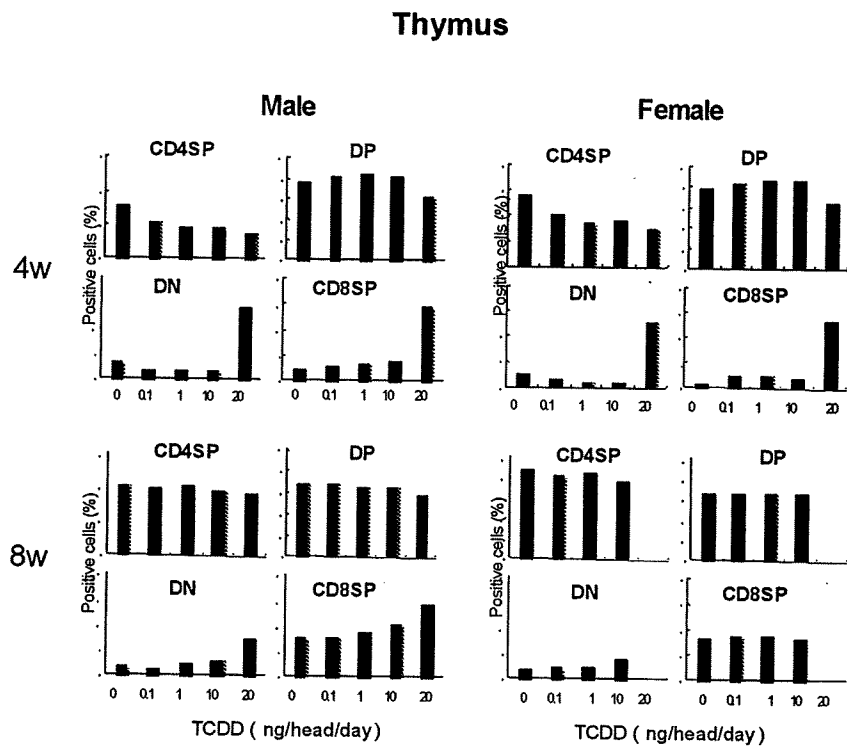


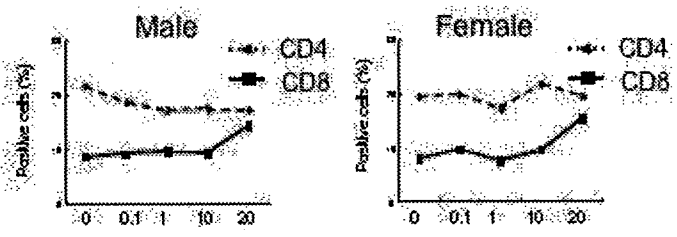
图-2



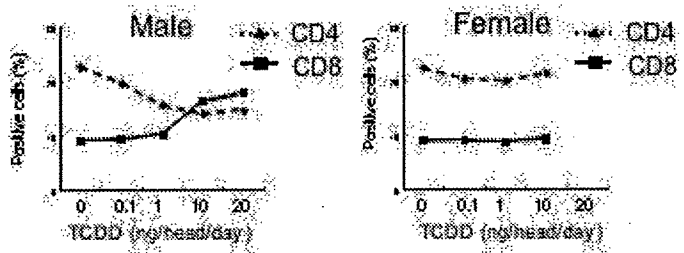
3

Spleen

4w



8w



6. 内分泌かく乱化学物質の免疫系への影響評価

分担研究者 武吉正博、財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所 課長

研究要旨 CBA/JN マウスに1あるいは10 μ g/kg/dayの用量でEEを経胎盤・経乳汁曝露した結果、出産数、妊娠期間、産仔数などの生殖毒性学的指標には影響はみられなかったが、出生仔をTh1誘導抗原(Dinitrochlorobenzene)及びTh2誘導抗原(Trimellitic anhydride)を用いて刺激を行ったところ、10 μ g/kg/day投与群の出生仔において、いずれの抗原に対しても初期応答性の亢進が認められた。また、離乳時の胸腺細胞をPhorbol 12-myristate 13-acetate及びionomycinで刺激した後の分化状況を解析した結果、対照群と比較して10 μ g/kg/day投与群において、CD4/CD8(+/+)細胞の減少、CD4/CD8(-/-)細胞の増加がみられ、EEの経胎盤・経乳汁曝露による胸腺細胞の分化能への影響が示唆された。

A. 研究目的

EDCsの影響は動物の生殖能に対するものではなく神経系、免疫系に対する影響も示唆されている。そこで化学物質の動物の免疫系に対する影響評価法としてのマウス局所リンパ節増殖試験(Local Lymph Node Assay, LLNA)の有用性を検討する。

B. 研究方法

1)交配

CBA/JN Crj(日本チャールスリバー株式会社)を雄11週齢、雌7週齢で購入し、5日以上検疫を行った後、雄1匹、雌2匹を一晩同居させ交配させた。交尾確認はプラグが確認できた雌について交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠0日とした。

2)被験物質、投与期間および投与経路

EE(Lot No. KSN3933、純度99.0%、和光純薬工業株式会社)を用い、媒体としてオリーブ油(Lot No. 032OTM、株式会社フヂミ製作所)を用いた。

投与は妊娠5日からEE 1、10 μ g/kg/dayを

母動物に経口投与し、媒体対照群(VC)としてオリーブ油を投与する群を設けた。各群の母動物数はVC群 35匹、1および10 μ g/kg/day群は各50匹とし、投与は毎日午前中に、離乳日(分娩21日)まで行った。

3)離乳

仔動物は分娩後21日に離乳を行った。

4)検査

a)母動物

一般状態および哺育状態は投与開始日から解剖日まで毎日1回以上観察した。体重はP0、5、12、19日、分娩後0、4、7、14、21日に測定した。妊娠動物は全例を自然分娩させ出産率、妊娠期間を求めた。

b)仔動物

出生日に産仔数、死産仔数、出産死亡仔数、性別の検査を行った。一般状態については離乳日まで毎日1回以上観察した。体重は出生日から1週間に1回測定した。

c)統計学的手法

母動物の体重、妊娠期間については一元配置分散分析を行った。分散分析において

有意差が認められた場合は、対照群と各用量群の間において、Dunnett法による検定を行った。母動物の出産率についてはカイ二乗検定で対照群との間の有意差検定を行った。

F1出生仔の出生日から離乳日までの体重は1腹を標本単位として処理した。試験成績の評価に当っては有意水準1%又は5%で対照群との差が認められた場合に有意の変動とした。

6) LLNA

雌仔動物12週齢時に同一投与群の仔動物内で体重層別無作為抽出法にて群分けを行い、アセトン/オリーブ油混液(AOO)、Th1誘導抗原(2,4-dinitrochlorobenzene、DNCB)の0.25%、0.5%、1%溶液、またはTh2誘導抗原(Trimelliticanhydride、TMA)の2.5%、5%及び10%を動物の両耳介に25 μ Lずつ3日間連続塗布を行った。最終感作の約48時間後に10mg/mLの5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を腹腔内投与した後、その約24時間後に解剖し、耳介リンパ節を採取した。ELISA法により採取したリンパ節におけるBrdU取り込み量の測定を行った。

各個体のBrdU測定値の平均値を算出した後、各F0投与群の媒体対照群の平均値を算出した。各個体のBrdU測定値の平均値を同一F0投与群の媒体対照群の平均値で除した数値(Stimulation Index、SI)を算出した後、各用量群の平均SI値及び標準誤差を算出し、各感作抗原のSI値についてF0のEE投与量及び各F1の抗原投与量を要因として二元配置分散分析(Two-way ANOVA)を実施し有意差の有無を検討した。

7) 胸腺細胞の分化能解析

a) 胸腺細胞浮遊液作製

雄仔動物を離乳時に頸椎脱臼で安楽死させた後、胸腺を採取し、非働化した牛胎児

血清(FBS、インビトロジェン株式会社)を10%含むRPMI1640培地(インビトロジェン株式会社)(以下 培地)中に保存した。各個体の胸腺を3 mLの培地中でフロスト付スライドガラス2枚を用い組織をすりつぶし、70#のナイロンメッシュ(Falcon)を通過させ、細胞浮遊液を作製した。

b) CD4⁺CD8⁺細胞からCD4⁺CD8⁻細胞への分化

細胞浮遊液を培地で 4×10^6 cells/mLに調整した後、24 well培養プレートに2 mL/wellで播種し、終濃度 0.2 μ g/mL のIonomycin (IM、和光純薬工業株式会社)、0.2 ng/mL のPhorbol 12-myristate-13- acetate (PMA、Sigma)を添加して20時間、CO₂インキュベータ(37°C、5% CO₂)内で培養した(Step A)。

細胞を回収し、培地で2回遠心、洗浄を行い、2 mLの培地に再浮遊して24 well培養プレートで、さらに24時間、CO₂インキュベータ(37°C、5%CO₂)内で培養した(Step B)。

c) CD4⁺CD8⁻細胞から Th1 及び Th2 細胞への分化

Step B 後の細胞を回収し、培地で再浮遊して細胞数を計測し、 5×10^6 cells/mLに調整した後、24 well 培養プレートに1 mL/wellで播種し、最終濃度0.2 μ g/mL IM、3.0 ng/mL PMA を添加して16時間、CO₂インキュベータ(37°C、5%CO₂)内で培養した(Step C)。

細胞を回収し、培地で2回遠心、洗浄を行い、培地で再浮遊して 1×10^6 cells/mLに調整した後、24 well 培養プレートに1 mL/wellで播種し、最終濃度50 U/mL recombinant mouse IL-2 (和光純薬工業株式会社)、80 U/mL recombinant mouse IL-4 (和光純薬工業株式会社)、0.01 ng/mL recombinant mouse IL-12 (和光純薬工業株式会社)を添加

して4日間、CO₂インキュベータ(37℃、5%CO₂)内で培養した(Step D)。

d)フローサイトメトリーによる表面抗原解析

離乳時(胸腺採取直後の細胞浮遊液)及びCD4⁺CD8⁺細胞への分化操作後(StepB 後)の細胞それぞれについて、1.5 mL マイクロチューブに回収し、1%BSA、0.1%NaN₃ 含むPBS で遠心、洗浄を行い、1%BSA、0.1%NaN₃ 含むPBS 100 μL に再浮遊した。FITC 標識抗マウス CD4 抗体(Beckman Coulter)、PE 標識抗マウス CD8 抗体(BD Biosciences Pharmingen)をそれぞれ1検体当たり5 μL ずつ加え、軽く攪拌し、4℃で1時間反応させた。反応終了後、1%BSA、0.1%NaN₃ 含むPBS 1 mL を加えて攪拌し、1000 rpm、4℃、5分間遠心後、上清を吸引除去する洗浄操作を3回行った。洗浄後、1%BSA、0.1%NaN₃ 含むPBS 1 mL に再浮遊し、測定まで氷中に保存した。測定試料は測定直前に70#メッシュ(FALCON)を通過させた後、フローサイトメーター(EPICS XL, Beckman Coulter)を用いて細胞の各蛍光強度を測定し、細胞表面のCD4及びCD8の発現状態を測定した。1検体当たり10⁴個の細胞を測定した。

e)細胞内サイトカイン測定

Step D 後の細胞を回収し、培地で2回遠心、洗浄を行い、2×10⁶ cells/mL に調整した後、24 well 培養プレートに1 mL/well で播種し、最終濃度0.4 μg/mL IM、10 ng/mL PMA を添加して3時間、CO₂インキュベータ(37℃、5%CO₂)内で培養した。細胞内タンパク輸送を阻害するために monensin を添加し、さらに2時間、培養した。細胞を1.5 mL マイクロチューブに回収し、1%BSA、0.1%NaN₃ 含リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で遠心、

洗浄を行い、Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences Pharmingen)を用いて細胞の固定、膜透過処理を行った。kit 附属の Perm/wash solution 100 μL に再浮遊後、PE 標識抗マウス IL-4 抗体(Beckman Coulter)又はPE 標識抗マウス IL-10 抗体(Beckman Coulter)、FITC 標識抗マウス IFN-_γ 抗体(Beckman Coulter)、PE-Cy5 標識抗マウス CD4 抗体(BD Biosciences Pharmingen)をそれぞれ1検体当たり5 μL ずつ加え、軽く攪拌し、4℃で1時間反応させた。反応終了後、1%BSA、0.1%NaN₃ 含むPBS 1 mL を加えて攪拌し、1000 rpm、4℃、5分間遠心後、上清を吸引除去する洗浄操作を3回行った。洗浄後、1%BSA、0.1%NaN₃ 含むPBS 1 mL に再浮遊し、測定まで氷中に保存した。測定試料は測定直前に70#メッシュ(FALCON)を通過させた後、フローサイトメーター(EPICS XL, Beckman Coulter)を用いて細胞の各蛍光強度を測定し、細胞表面のCD4、細胞内サイトカインのIL-4又はIL-10及びIFN-_γの発現状態を測定した。細胞表面にCD4の発現している細胞を1検体当たり5000個測定した。

C. 研究結果

1. 母動物

媒体対照群、1 μg/kg/day群及び媒体対照群、1 μg/kg/day群、10 μg/kg/day群で分娩した動物はそれぞれ16/35匹、31/50匹、23/50匹であり、媒体対照群と比較していずれの群においても出産率、妊娠期間、産仔数は媒体対照群と比較していずれの群においても有意差は認められなかった(表1-3)。

2. 仔動物

いずれの群も出生時の出生仔外表に異常はみられなかった。