

Table 3-2 Body weight of female animals after wearing

Unit : g

<i>p</i> -tert-octylphenol_50 mg/kg/day											
Animal ID-No.	Vaginal Opening (day)	1	35	42	49	56	63	70	77	84	
2313	180.3(39)	6.29	154.9	186.3	214.8	236.7	256.8	274.3	285.3	304.2	
2314	113.1(33)	5.46	126.3	150.1	174.6	190.8	208.5	220.2	235.9	240.6	
2315	157.4(39)	6.38	133.6	174.5	200.3	226.4	247.6	270.7	282.8	287.7	
Mean	150.3	6.04	138.3	170.3	196.6	218.0	237.6	255.1	268.0	277.5	
S.D.	34.2	0.51	14.9	18.5	20.4	24.1	25.6	30.2	27.8	33.0	

<i>p</i> -tert-octylphenol_500 mg/kg/day											
Animal ID-No.	Vaginal Opening (day)	1	35	42	49	56	63	70	77	84	
2415	120.5(36)	5.83	114.3	156.0	190.4	216.1	240.6	257.7	266.2	277.0	
Mean	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Values in parentheses represent the observed day of vaginal opening

Table 4-1 Observations of vaginal smear in female rats

Animal ID-No.	Days																												Mean estrous cycle	Irregular estrous cycle			
	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76			77	78	
Non-treated																																	
1	D	P	E	E	M	D	E	E	M	D	P	E	E	M	D	D	E	M	D	D	E	M	D	D	E	M	D	D	E	M	4.0	-	
2	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	5.0	-	
3	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	4.5	-	
	4.5 a) 0/3 b)																																
	± 0.5																																
Vehicle control																																	
2013	E	E	M	D	D	P	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	4.2	-	
2014	D	D	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	4.0	-
2015	E	M	D	D	P	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	D	4.3	-	
	4.2 ± 0.2																													0/3			
Diethylstilbesterol 0.5g/kg/day																																	
2113	D	D	P	E	E	M	D	P	E	M	D	D	P	E	M	D	D	P	E	M	D	D	P	E	M	D	D	P	E	M	D	4.6	-
2114	D	E	M	D	D	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	P	E	4.0	-
2115	D	E	M	D	D	E	M	D	D	P	E	M	D	D	E	E	M	D	D	P	E	M	D	D	P	E	M	D	D	D	5.0	+	
	4.5 ± 0.5																													1/3			
Diethylstilbesterol 1.5g/kg/day																																	
2213	D	E	M	D	D	P	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	E	M	D	D	5.6	+	
2214	D	D	D	D	P	E	M	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	9.0	+	
2215	D	E	M	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	9.0	+	
	7.9 ± 2.0																													3/3			

P : Proestrus
E : Estrus
M : Metestrus
D : Diestrus
E : The day used for calculation of estrous cycle
a) Mean ± S.D.
b) No. of animals having irregular estrous cycles / no. of animals examined

Table 4-2 Observations of vaginal smear in female rats

Animal ID-No.	Days																												Mean estrous cycle	Irregular estrous cycle
	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76		
<i>p</i> -tert-octylphenol 50 mg/kg/day																														
2313	M	D	D	E	M	D	D	P	M	D	D	P	E	M	D	D	P	E	M	D	D	P	E	M	D	D	P	E	M	
2314	D	E	E	M	D	D	E	M	D	D	E	M	D	P	E	E	M	D	D	E	M	D	D	E	M	D	P	E	M	D
2315	M	D	D	E	M	D	D	E	M	D	D	E	M	D	D	E	M	D	D	P	E	M	D	D	E	M	D	D	E	M
	5.4 a) 1/3 b)																													
	± 0.8																													
<i>p</i> -tert-octylphenol 500 mg/kg/day																														
2415	D	E	M	D	D	E	E	E	E	M	D	D	P	E	E	E	E	M	D	D	P	E	E	E	E	M	D	E	M	D
	9.0																													+
	±																													1/1

P : Proestrus
E : Estrus
M : Metestrus
D : Diestrus
E : The day used for calculation of estrous cycle
a) Mean ± S.D.
b) No. of animals having irregular estrous cycles / no. of animals examined

Fig. 1 6日齡雌の視床下部前腹側室周囲核におけるER α 陽性細胞

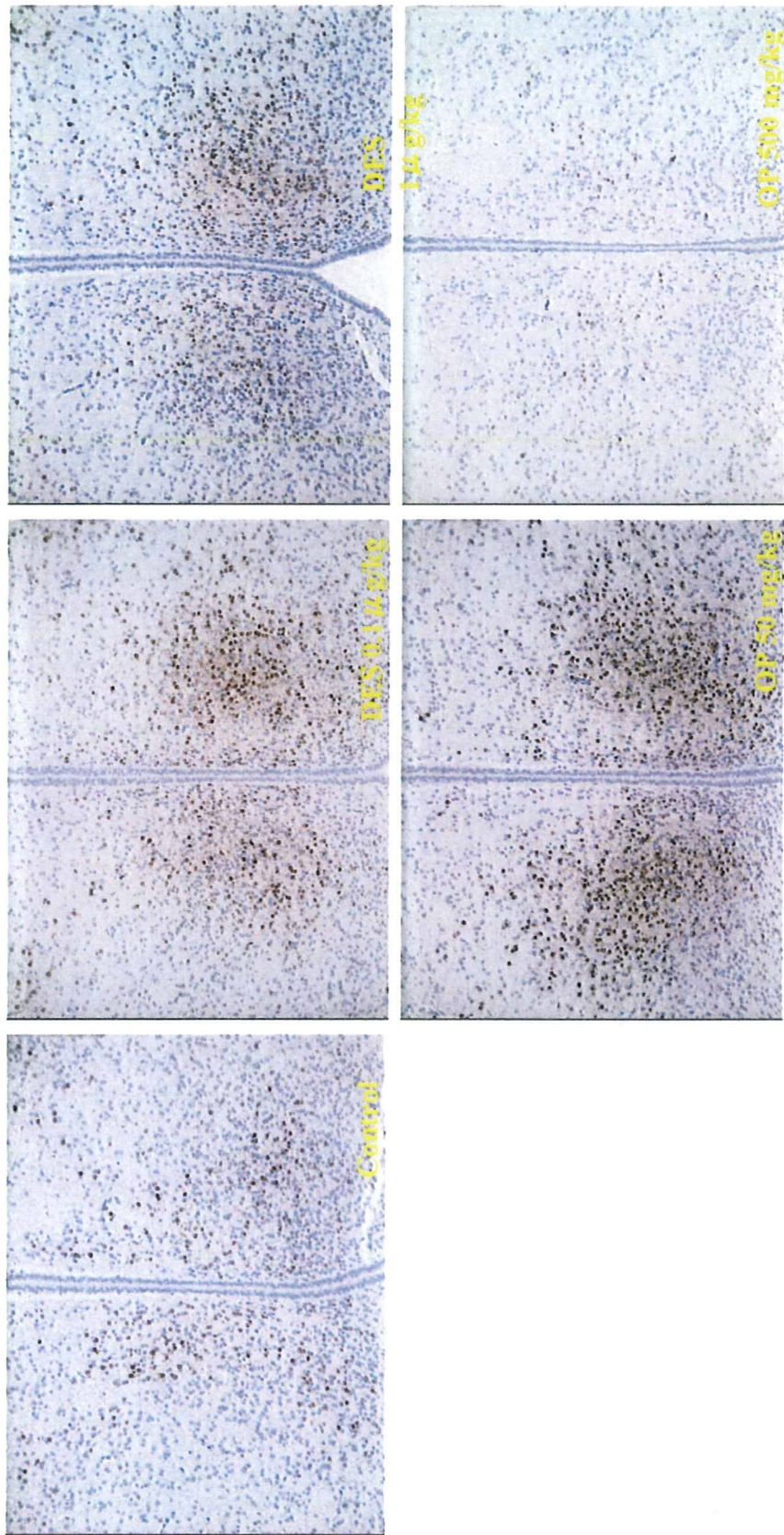
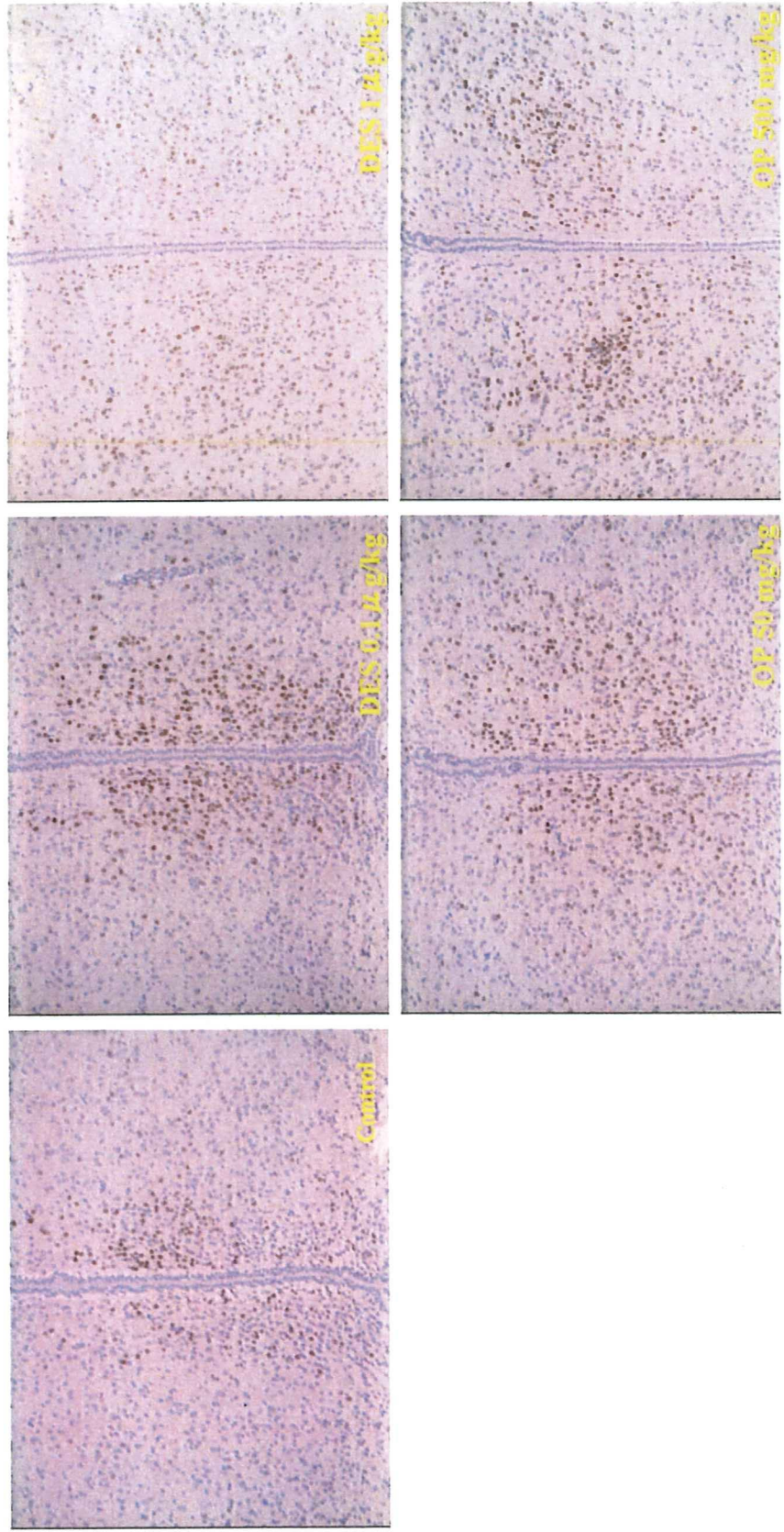


Fig. 2 21日齡雌の視床下部前腹側室周困核におけるER α 陽性細胞



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

研究協力者 石丸直澄

徳島大学大学院 口腔分子病態学分野 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マウスは生後3日目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、本年度は妊娠マウスへの内分泌かく乱化学物質ダイオキシン (TCDD) 投与によって *in vivo* における次世代への免疫異常の誘導が可能か否かについて検討を加えた。妊娠後期 (15日) にTCDDを投与した結果、生後4週目、8週目の次世代マウスにT細胞活性化の異常やサイトカイン産生の亢進が認められ、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マウスは生後3日目の胸腺摘出(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、内分泌かく乱化学物質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、本年度は妊娠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を施すことなく経胎盤的に免疫異常が誘導される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

NFS/*sld*マウスを使用。妊娠15日にTCDD腹腔内投与を実施し、次世代マウス生後4週目と8週目に解析した（有効匹数全53匹、雌29匹、雄24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*マウスは生後3日目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。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(100、1000ng/kg体重)にて妊娠マウス15日に腹腔内投与後、出生4週後、8週後の次世代マウスの変化を対照群（コーン油投与）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、CD62L; 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。

4) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

実験マウスにおける末梢 T 細胞の interleukin (IL)-2、IL-4、IL-10、interferon (IFN)- γ など各種サイトカイン産生能の測定を実施した。TCDD 投与マウスの脾細胞を用い、磁気ビーズ (Dynal) と抗 B220 抗体、抗 CD11b 及び抗 CD11c 抗体 (eBiosciences) にて T 細胞を調整 (90% < CD3 陽性 T 細胞) した。96 穴培養プレートに抗 CD3 抗体 (1 μ g/ml) 及び抗 CD28 抗体 (20 μ g/ml) を固相化後、 1×10^5 個の T 細胞を 36 時間培養した。培養上清中の各種サイトカイン (IL-2、IL-4、IL-10、IFN γ) の濃度を ELISA にて定量化した。即ち、96 穴マイクロタイタープレートに各抗サイトカイン抗体を固相化後、1% 子牛血清アルブミン (BSA) でブロッキングし、希釈した培養上清 ($\times 5$) 及び標準サイトカインを加え反応させた。洗浄後、ビオチン標識各サイトカイン抗体を添加反応させ、ストレプトアビジン標識ホースラダ

イッシュペルオキシダーゼを加えた後、基質として o-phenylenediamine を用い発色させ、マイクロプレートリーダー (BioRad) にて 490nm における吸光度を検出した。

(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

妊娠 NFS/*sld* マウス (15 日) に TCDD (100、1000ng/Kg 体重)を腹腔内投与した後、出生後 4 週、および 8 週の次世代マウスの変化を検討し、それぞれ対照群と比較した。

1) 体重および臓器湿重量に対する影響

TCDDの妊娠マウスへの投与による出生後の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 (g) の変動については、4週齢、8週齢とも雌雄マウスにおい約5%前後の体重減少率がみられたが、特に性差は見られなかった。臓器湿重量については、100 ng/Kg投与群での8週齢雄マウス胸腺において対照群と比較して約20%の重量減少がみられたが、雌マウスでは著変はなかった。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10%の減少が見られ、8週齢では雌マウス100 ng/Kg投与群で約25%の重量減少がみられた (図-1)。その他の臓器では4週齢、8週齢とも各重量減少率は目立たなかった。

2) 免疫担当細胞への影響

TCDDの妊娠マウスへの投与による次世代マウス出生後の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。

胸腺：次世代マウス 4 週齢、8 週齢への影響に関しては雌雄マウスとも胸腺内 CD4SP/CD8SP (シングルポジティブ) 細胞および DP (ダブルポジティブ) 細胞への分化に特に異常は観察されなかった (図-2)。T 細胞活性化マーカー (CD44、CD45RB、CD62L) の動態を観察した結果、雌雄マウスともに 8 週齢胸腺で CD4 陽性 T 細胞のうち CD44^{high} 陽性 T 細胞の軽度増加が見られた (図-3)。

脾臓：脾臓における CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞は妊娠マウス TCDD 投与による次世代マウスへの影響は殆ど認められなかった (図-4)。しかし、雌マウスにおいて TCDD100ng/Kg 投与による CD8 陽性 T 細胞の減少が認められた。また、末梢 T 細胞の活性化機構における TCDD 投与の次世代マウスへの影響について T 細胞活性化マーカー (CD44、CD45RB、CD62L) の動態解析を実施した。雌雄マウスともに 8 週齢脾臓では CD4 陽性 T 細

胞のうち CD44^{high} 陽性 T 細胞の軽度増加が見られた (図-5)。次に、脾臓 T 細胞のサイトカイン産生能を ELISA にて検討した結果、8 週齢マウスでは雌雄ともに次世代マウスにおける末梢 T 細胞の IL-2 の産生能が増強され、特に雄マウスで顕著であった。一方、IL-4、IFN- γ 産生能は雌マウス T 細胞で著明な産生亢進が認められた。IL-10 産生については雄雌マウスともに著変が見られなかった (図-6)。

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)、腎臓、肺、肝臓に病理組織学的な変化が認められた (図-7、8)。

唾液腺：4 週群で雌雄ともに TCDD 投与妊娠マウスから生まれた次世代マウス唾液腺 (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。妊娠マウスへの TCDD 投与 100ng/Kg、1000 ng/Kg 群のいずれにおいても次世代マウスに对照群に比較して高度な変化がみられ、雌マウスにより強い変化が認められた。8 週群では雌雄マウスともに 4 週群と比較し顎下腺に高度なリンパ球浸潤性病変 (grade 3) が誘導された。

肺：妊娠マウスへの TCDD 投与 100ng/Kg、1000ng/Kg 群ともに肺の細気管支周囲、および血管周囲にリンパ球浸潤性病変がみられ、雌雄マウスとも高頻度であった。肺の間質性病変は 1000ng/Kg 投与群でやや高頻度に発生した。

肝臓：TCDD 投与群の次世代マウス肝内グリソン鞘細胆管周囲に軽度から中等度のリンパ球浸潤病変が観察された。特に 8 週齢雌マウスの 1000ng/Kg 投与群で高頻度で肝内胆管炎の発生が認められた。

腎臓：TCDD 妊娠時期投与群マウス腎臓の間質を中心に慢性のリンパ球浸潤が軽度認められ、間質性腎炎類似の病理組織像を呈していた。しかし、新生児投与実験でみられた高度な間質性腎病変は今回確認されなかった。

D. 考察

ダイオキシンを含む内分泌かく乱化学物質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 マウスは生後 3 日目の胸腺摘出によって 4 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が亢進されている事実を明らかにした。今回、妊娠NFS/sldマウスに対し、妊娠後期（15日）にダイオキシン(TCDD)を投与した後、生後4週目、8週目における経胎盤を介した次世代マウスにおける全身の変化を観察した。体重(g)の変動については、4週齢、8週齢とも雌雄マウスにおい約5%前後の体重減少率がみられたが、特に性差は見られなかった。臓器湿重量については、100 ng/Kg投与群での8週齢雄マウス胸腺において対照群と比較して約20%の重量減少がみられたが、雌マウスでは著変はなかった。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10%の減少が見られ、8週齢では雌マウス100 ng/Kg投与群で約25%の重量減少がみられた。

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の妊娠マウス投与による次世代マウス4週齢、8週齢への影響に関しては雌雄マウスとも胸腺内CD4SP/CD8SP（シングルポジティブ）細胞およびDP（ダブルポジティブ）細胞への分化に特に異常は観察されなかった。T細胞活性化マーカー（CD44、CD45RB、CD62L）の動態を観察した結果、雌雄マウスともに8週齢胸腺でCD4陽性T細胞のうちCD44^{high}陽性T細胞

の軽度増加が見られた。脾臓におけるCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞は妊娠マウスへのTCDDの投与による影響は殆ど認められなかった。僅かに、雌マウスにおいてTCDD100ng/ Kg投与によるCD8陽性T細胞の減少が認められた。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明らかにするためT細胞活性化マーカーの動態解析を実施した。雌雄マウスともに8週齢脾臓ではCD4陽性T細胞のうちCD44^{high}陽性T細胞の軽度増加が見られた。CD4陽性CD44^{high}T細胞はメモリー型とされていることから妊娠マウスへのTCDD投与により次世代マウスにT細胞活性化の亢進がもたらされたものと考えられる。さらに、脾臓T細胞のサイトカイン産生能をELISAにて検討した結果、8週齢マウスでは雌雄ともに妊娠マウスへのTCDD投与により次世代マウスにおける末梢T細胞IL-2の産生が増強され、特に雄マウスで顕著であった。一方、IL-4、IFN- γ 産生能は雌マウス細胞で著明な産生亢進が認められた。

前回実施したTCDDの新生児期投与実験では、4週齢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細胞分面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、このことから新生児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。今回、妊娠マウスへTCDDを投与し、次世代マウスへの免疫系の影響を検討した結果、T細胞活性化の異常、IL-2やIFN- γ などサイトカイン産生の異常が明らかとなり、さらに、全身諸臓器の病理組織学的検索からいずれの実験群においても4週齢、8週齢に唾液腺炎（顎下腺炎）の出現が認められた。生後3日目の胸腺摘出によって成立する自己免疫病変と比較すると軽度の変化であるが、これらの炎症性病変がT細胞活性化の亢進やサイトカイン産生の異常と関連している可能性が示唆された。さらに、肺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、腎臓の間質を中心にリンパ球浸潤が観察された。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TCDD高感受性であるかも知れない。

現在までに内分泌かく乱化学物質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）に内分泌かく乱化学物質を加え、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 などの内分泌かく乱化学物質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、生後 5 日から 120 日まで解析された。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、脾細胞数は生後 49 日の 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 暴露はダイオキシン受容体 (AhR) 非依存性に児動物の免疫臓器に影響を与える可能性が示唆されている。

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妊娠後期に TCDD を投与した後の次世代マウスへ免疫異常が誘導可能か否かを検討

した。今回の検討結果から、4週目、8週目にみられたT細胞活性化の異常、IL-2やIFN- γ などサイトカイン産生の異常、および唾液腺・腎臓・肺・肝臓における炎症性病変の出現は経胎盤的に内分泌かく乱化学物質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ジェ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、エストロゲンレセプター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、ダイオキシンレセプター (AhR)、エストロジェンレセプターの動態解析を解明する必要がある。

E. 結論

生後3日目の胸腺摘出(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マウスを用いて妊娠後期にTCDDを投与した後の次世代マウスへ免疫異常が誘導可能か否かを検討した結果、投与後4週目からT細胞活性化の異常、サイトカインの産生異常が認められ、4週齢および8週齢マウスに唾液腺、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

現在の時点で該当なし。

G. 研究発表 (過去3年間)

1. 論文発表

- 1) Ishimaru N, Kishimoto, Hayashi Y, Sprent J: Regulation of naïve T cell function by the NF- κ B2 pathway. *Nature Immunol.*, 763-771, 2006.
- 2) Ishimaru N, Arakaki R, Omotehara F, Yamada K, Mishima K, Saito I, Hayashi Y: Novel role of RbAp48 for tissue-specific estrogen deficiency-dependent apoptosis in the exocrine glands. *Mol. Cell. Biol.* 26:2924-2935, 2006.
- 3) 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* 24:1-13, 2006.
- 4) Katunuma N, Le QT, Murata E, Matsui A, Majima E, Ishimaru N, Hayashi Y, Ohashi A: A novel apoptosis cascade mediated by lysosomal lactoferrin and its participation in hepatocyte apoptosis induced by D-galactosamine.

- FEBS Let. 580:3699-3705, 2006.
- 5) 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. 580:741-746, 2006.
 - 6) Miyazaki K, Takeda N, Ishimaru N, Omotehara F, Arakaki R, Hayashi Y: Analysis of in vivo role of a-fodrin autoantigen in primary Sjogren's syndrome. *Am. J. Pathol.* 167:1051-1059, 2005.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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
 - 10) 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..
 - 11) Hayashi Y, Arakaki R, Ishimaru N: Critical role of tissue-specific apoptosis on the development of primary Sjogren's syndrome. *Oral Sci. Int.* 1:55-64, 2004.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) Maruyama T, Saito I, Hayashi Y, Kompfner E, Fox RI, Burton DR, Ditzel HI: Molecular analysis of the human

- autoantibody responses to α -fodrin in stimulated dendritic cells on on Sjogren's syndrome reveals novel autoimmune arthritis in MRL/lpr mice apoptosis-induced specificity. *Am. J. Pathol.* 165:53-61, 2004. 日本免疫学会総会学術集会記録、36巻 p. 284, 2006.
- 15) 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. 6) The crucial signaling pathway of dendritic cells in metal allergy 日本免疫学会総会学術集会記録、36巻 p. 294, 2006.
- 16) Hayashi Y, Arakaki R, Ishimaru N: Apoptosis, and estrogen deficiency in primary Sjogren's syndrome. *Cur. Opin. Rheumatol.* 16:522-526, 2004. 7) シェーグレン症候群加齢モデルマウスにおける自間質性肺病変の解析 日本病理学会雑誌、95巻1号 p. 211, 2006.
- 8) NFS/sldマウス舌下腺におけるNkx2.3の発現・機能解析 日本病理学会雑誌、95巻1号 p. 288, 2006.
- 9) NF- κ Bシグナルを介した自己免疫疾患の発症機序 日本病理学会雑誌、95巻1号 p. 201, 2006.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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,
2. 学会発表 (過去3年間)
- 1) Development of exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in RbAp48 transgenic mice 日本免疫学会総会学術集会記録、36巻 p. 189, 2006.
- 2) Effect of rebamipide administration on Sjogren's syndrome mouse model 日本免疫学会総会学術集会記録、36巻 p. 194, 2006.
- 3) NF- κ B2 pathway in T cell activation for autoimmunity 日本免疫学会総会学術集会記録、36巻 p. 261, 2006.
- 4) Taking advantage of saliva for immune test 日本免疫学会総会学術集会記録、36巻 p. 280, 2006.
- 5) Immunoregulatory role RANKL-

- 2005.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) シェーグレン症候群発症における自己抗原120kD α -フオドリンの意義 日本病理学会雑誌、93巻1号 p. 206, 2005.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 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.
- 25) 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 93巻 1号 p. 295, 2004.

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:

Hayashi Y, Hiromu Sugino: or α -fodrin fragment protein]
[Composition containing α -fodrin Yoshio Hayashi March 9, 2004

図説明

図-1 TCDDの妊娠マウスへの投与による出生後の体重および臓器湿重量に対する影響
体重 (g) の変動については、4週齢、8週齢とも雌雄マウスにおいて約5%前後の体重減少率がみられたが、性差は見られなかった。臓器湿重量については、100 ng/Kg投与群での8週齢雄マウス胸腺において対照群と比較して約20%の重量減少がみられたが、雌マウスでは著変はなかった。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10%の減少が見られ、8週齢では雌マウス100 ng/Kg投与群で約25%の重量減少がみられた

図-2 TCDDの妊娠マウスへの投与による次世代マウス胸腺内T細胞サブポピュレーションへの影響

次世代マウス4週齢、8週齢への影響に関しては雌雄マウスとも胸腺内CD4SP/CD8SP (シングルポジティブ) 細胞およびDP (ダブルポジティブ) 細胞への分化に特に異常は観察されなかった。

図-3 TCDDの妊娠マウスへの投与による次世代マウス胸腺内T細胞活性化マーカーへの影響

T細胞活性化マーカー (CD44、CD45RB、CD62L) の動態を観察した結果、雌雄マウスともに8週齢胸腺でCD4陽性T細胞のうちCD44^{high}陽性T細胞の軽度増加が見られた。

図-4 TCDDの妊娠マウスへの投与による次世代マウス脾臓T細胞サブポピュレーションへの影響

脾臓におけるCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞は妊娠マウスTCDD投与による次世代マウスへの影響は殆ど認められなかった。雌マウスにおいてTCDD 100 ng/Kg投与によるCD8陽性T細胞の減少が認められた。

図-5 TCDDの妊娠マウスへの投与による次世代マウス脾臓T細胞活性化マーカーへの影響

末梢T細胞の活性化機構におけるTCDD投与の次世代マウスへの影響についてT細胞活性化マーカー (CD44、CD45RB、CD62L) の動態解析を実施した。雌雄マウスともに8週齢脾臓ではCD4陽性T細胞のうちCD44^{high}陽性T細胞の軽度増加が見られた。

図-6 次世代マウス脾臓T細胞サイトカイン産生能への影響

脾臓T細胞のサイトカイン産生能をELISAにて検討した結果、8週齢マウスでは雌雄ともに次世代マウスにおける末梢T細胞のIL-2の産生能が増強され、特に雄マウスで顕著であった。一方、IL-4、IFN- γ 産生能は雌マウスT細胞で著明な産生亢進が認められた。IL-10産生については雄雌マウスともに著変が見られなかった。

図-7 TCDDの妊娠マウスへの投与による次世代マウス唾液腺炎、肺細気管支炎、肝細胞胆管炎、間質性腎炎の発症

TCDD 投与100ng/Kg、1000 ng/Kg群いずれも次世代マウス唾液腺に高度な変化がみられ、雌マウスにより強い変化が認められた。その他、肺細気管支周囲、肝内グリソン鞘細胆管周囲のリンパ球浸潤病変、間質性腎炎類似の病変が発症した。

図-8 次世代マウス炎症性病変の病理組織所見

次世代マウス唾液腺に軽度のリンパ球浸潤が認められた。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。その他の臓器では、肺細気管支周囲にリンパ球浸潤性病変、肝内グリソン鞘細胆管周囲に軽度から中等度のリンパ球浸潤病変、間質性腎炎類似の病変が観察された (HE染色)。

☒-1

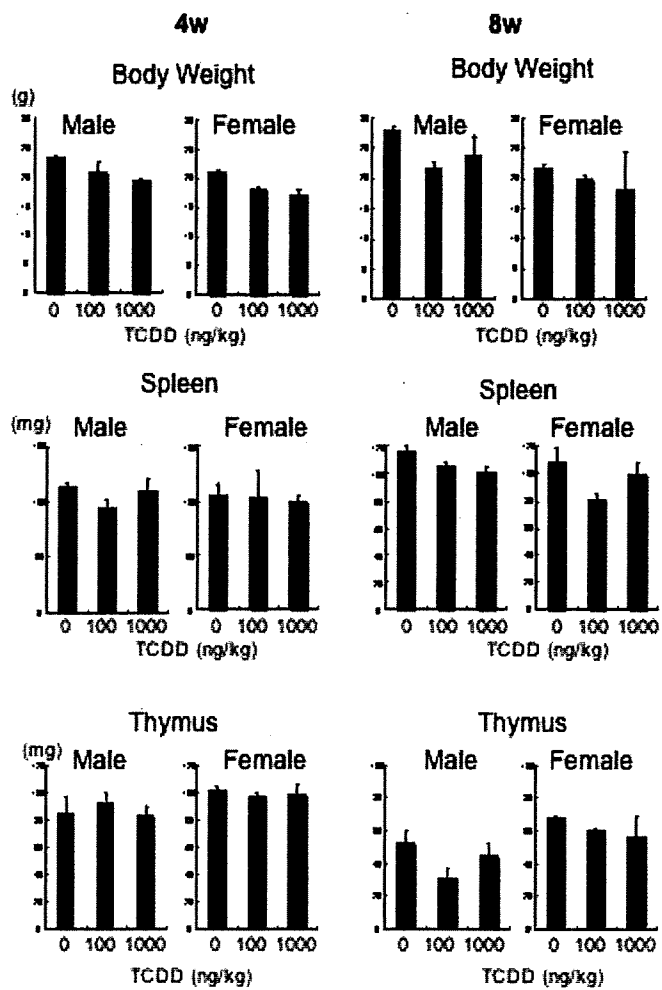


図-2

