

2007 年度 修士論文

加齢によるラット免疫機能の変化に
運動が与える影響

Effects of moderate exercise on age-associated
changes of immune functions in rats

早稲田大学 大学院スポーツ科学研究科
スポーツ科学専攻 スポーツ医科学研究領域

5006A055-1

野倉 圭輔

Nokura, Keisuke

研究指導教員： 赤間 高雄 教授

目次

I. 緒言	・・・ 1
A. 背景	・・・ 1
1. 免疫系の加齢変化	・・・ 1
2. 運動による免疫系の変化	・・・ 4
B. 本研究の目的	・・・ 5
II. 方法	・・・ 7
A. 動物	・・・ 7
B. 運動スケジュール	・・・ 7
C. 脾臓細胞と腸間膜リンパ節の調製	・・・ 8
D. リンパ球分画測定	・・・ 8
E. 統計処理	・・・ 9
III. 結果	・・・ 10
A. 脾臓細胞中リンパ球サブセットの変動	・・・ 10
1. CD3+/CD4+リンパ球の割合	・・・ 10
2. CD3+/CD8+リンパ球の割合	・・・ 11
3. CD3+/CD28+リンパ球の割合	・・・ 12
4. CD3+リンパ球中の CD28 陽性率	・・・ 13
5. CD45+リンパ球の割合	・・・ 14
B. 腸間膜リンパ節中リンパ球サブセットの変動	・・・ 15
1. CD3+/CD4+リンパ球の割合	・・・ 15
2. CD3+/CD8+リンパ球の割合	・・・ 16
3. CD45+リンパ球の割合	・・・ 17
4. B リンパ球中の IgA 発現 B リンパ球の割合	・・・ 18
IV. 考察	・・・ 19
A. 脾臓細胞中リンパ球サブセット	・・・ 19
B. 腸間膜リンパ節中リンパ球サブセット	・・・ 21
V. 総括	・・・ 23
謝辞	・・・ 24
参考文献	・・・ 25

I．緒言

A．背景

1．免疫系の加齢変化

近年、多くの先進諸国や一部の発展途上国において、全人口中に占める高齢者の割合（高齢者率）が急速に高まっている。中でも日本はその傾向が顕著であり、慢性的に続く出生率の低下と相まって、2045年には人口中に占める65歳以上人口の割合が4割近くになると予測されている¹⁾。一方で高齢者の割合が増加するのに伴い、労働人口（15~64歳の人口）の割合は急速に低下することが予測されている²⁾。これら人口構成比率の変化によって、介護福祉問題や医療費の負担増など新たな問題がすでに浮上してきている。今後更なる高齢者率の高まりが予測されている中で、高齢者の健康維持、すなわち健康寿命の延伸は社会的な課題であると言える。

しかし実際には、年齢を重ねるにつれて健康の維持は困難になっていく。高齢者の健康が損なわれる原因はさまざまである。例えば加齢に伴う筋肉量の減少により、転倒のリスクが高くなる。また骨密度の低下により、骨折のリスクが高くなる。免疫系に関しても、加齢により免疫機能が低下し、さまざまな感染症への感染リスクが高まると考えられている。実際に、インフルエンザによる死亡率は60歳を超えてから急激に上昇するという報告がある³⁾。

加齢による免疫機能の低下について、そのメカニズムはまだ明

らかになってはいないものの、Tリンパ球の機能低下が密接に関わっていると考えられている⁴⁾。免疫系は自然免疫系と獲得免疫系に分類されるが、Tリンパ球は獲得免疫系を担当している。自然免疫系は、異物と認識された外来抗原に対して無差別に素早く反応を起こし、排除する機構であり抗原の侵入から数時間以内に働く。これを担うのはマクロファージ、好中球及び一部のリンパ球などであり、感染に対する最初の防御線であると言える。一方で獲得免疫系は、一度でも感染した抗原を記憶し、次に同じ抗原が進入してきた際により強い反応を起こす機構である。自然免疫系とくらべて働き始めるまでに時間が掛かるものの、標的の抗原に対して高い特異性を発揮する。これを担うのはTリンパ球、Bリンパ球、およびBリンパ球が産生する抗体などである。

リンパ球は末梢血中、脾臓、リンパ節や腸間膜リンパ節(Mesenteric Lymph Nodes: MLN)に存在し、血流によって体中を絶え間なく循環している。リンパ球には多くの種類があり、それぞれ働きが異なっている。それらを区別同定するため、リンパ球の細胞表面に表出している蛋白抗原を元にCD(Cluster of Differentiation)によって分類されている。

Tリンパ球はCD3分子を発現しているが、分化の過程でCD4分子とCD8分子を同時に発現するようになる。その後続く分化で、主要組織適合複合体(Major Histocompatibility Complex: MHC)によってMHCクラスII分子提示抗原に反応するTh(helper T)細胞と、MHCクラスI分子提示抗原に反応するTc(cytotoxic T)細胞とに成熟する。Th細胞はサイトカインを産生し、Bリンパ球による抗体産生やマクロファージを活性化させ

る。また、Tc 細胞の働きを補助する働きも持つ。Tc 細胞は CD8 分子を発現し、ウィルスや細胞侵入性の病原体に感染した細胞を認識し、死滅させる働きを持つ。

T リンパ球が活性化し、本来の働きを示すためには二つの刺激を受け取る必要がある。一つは抗原ペプチドと MHC 分子の複合体が T 細胞レセプタを介して伝達する刺激であり、もう一つは CD28 と B7 を介する補助刺激シグナルである。この補助刺激シグナルがないと、T リンパ球の活性化が起こらず、免疫寛容にも影響を及ぼす⁵⁾。すべての T リンパ球が CD28 を発現しているわけではなく、CD28 を発現していない T リンパ球は十分な働きをすることができないと考えられる。

リンパ球の加齢による変化については、ヒトやラットを対象としてすでにいくつかの報告がなされている^{6・7)}。T リンパ球が成熟する胸腺は年齢とともに縮小し、T リンパ球の産生も減少することが知られている^{8・9)}。このことが加齢による免疫系の機能低下に関連していると考えられている¹⁰⁾。また、B リンパ球と抗原との親和性が低下すること¹¹⁾や、加齢に伴い自己抗体が増加することが知られている。脾臓におけるリンパ球の加齢変化に関する研究はそれほど多くないが、Connoy らはマウスを対象とした実験で、脾臓細胞中の B リンパ球の割合が加齢によって上昇することを報告した⁷⁾。同時に、脾臓細胞中の T リンパ球の割合は変化しないとの結果が得られている。このことは、胸腺の退縮に伴う末梢血中 T リンパ球数の減少という報告^{8・9)}と一致していないように感じられる。しかし、リンパ球は血液、リンパ液と組織とを循環しており、分布の様子によってこの違いは説明できるかも

しれない。

骨髄や胸腺など、リンパ球が分化成熟する場合は一次リンパ組織として分類される。これに対してリンパ節など、リンパ球が抗原提示を受けて反応する組織は二次リンパ組織として分類される。組織に侵入した抗原は、マクロファージや樹状細胞によって捕捉され、リンパ管を通過して近くのリンパ節へ運ばれてくる。リンパ節ではリンパ球に抗原が提示されて、獲得免疫系の反応が開始される。また抗原との反応により分化したリンパ球の一部は、リンパ管と血管を通過して他の組織へと移動する。抗原と反応しなかったリンパ球は、リンパ管を通過してリンパ節を出て再循環を始める。脾臓や腸間膜リンパ節も二次リンパ組織であり、リンパ節と同様に免疫反応の場となる。ただし脾臓は、リンパ管から独立しているという点でリンパ節と異なっている。脾臓で応答するリンパ球、病原体ともに、体を循環する血液によって運ばれてきたものである。またリンパ球が脾臓から出て行く際も、血管を通過する。腸間膜リンパ節は粘膜関連リンパ組織の一部であり、抗原を取り込む経路がその他の二次リンパ組織とは異なっている。脾臓でもリンパ節でも、マクロファージや樹状細胞が抗原を捕捉してリンパ組織へと運搬してくるのに対し、腸間膜リンパ節ではM細胞と呼ばれる粘膜上皮細胞を通過して抗原が直接リンパ組織へと入る。リンパ球は血液を通過して腸間膜リンパ節へと入り、リンパ管を通過して出て行く。

2. 運動による免疫系の変化

免疫系は、内分泌系や神経系と密接に関係し、身体の恒常性維

持に貢献している。運動は生理的ストレスのひとつであり、自律神経系や視床下部、および下垂体系を刺激し、免疫系に影響を与える¹²⁾。運動強度と免疫機能との関係については、すでにいくつかの報告がなされている。Nieman らは、中程度の運動を続けることでナチュラルキラー(NK)細胞の活性の上昇と、上気道感染症(Upper Respiratory Tract Infection: URTI)罹患率の低下が見られ¹³⁾、高強度の運動を続けると、運動をしない場合よりも URTI の罹患リスクが上昇することを報告している¹⁴⁾。また、粘膜免疫系で重要な役割を担う分泌型免疫グロブリン A(Secretory Immunoglobulin A: SIgA)¹⁵⁾は 12 ヶ月の中程度トレーニングによって向上するという報告がある¹⁶⁾。リンパ球についても、Simpson ら¹⁷⁾はヒトを対象とした実験で、血中の T リンパ球数が一過性高強度運動の直後に増加し、運動終了後一時間後には運動前よりも低下したことを報告した。T リンパ球の中でも、特に細胞傷害性 T リンパ球の変動が大きいことが知られている。末梢血中の B リンパ球では、急性運動により一時的に増加し、運動終了後に低下するものの、その変動は T リンパ球や NK 細胞と比べて小さい¹⁸⁾。また 8 週間の中程度運動によって、高齢マウス脾臓細胞中ヘルパー T リンパ球の機能が向上したという報告がある¹⁹⁾。

B. 本研究の目的

リンパ球は免疫機能の中心的な役割を担う細胞であり、また運動によって変化すること、加齢によって機能が低下することが知

られている。しかしこれまで、運動によるリンパ球の変動について、高齢者を対象とした報告は少ない。本研究では高齢ラットを用い、8週間の運動トレーニングによるリンパ球の変動について検討した。サンプルには脾臓および腸間膜リンパ節を用いた。本研究の目的は、運動トレーニングが高齢ラットのリンパ球に与える影響について検討することである。

II. 方法

A. 動物

2 ヶ月齢の SD 系ラットを購入し (Oriental Bioservice, Tsukuba, Japan)、飼育して、実験開始時点で 20 ヶ月齢となったラット 18 匹 (うち雄性ラット 10 匹、雌性ラット 8 匹) をトレーニング群として用いた。動物を一匹ずつ個別のケージに入れ、以下の条件で飼育した。室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12 時間の明暗サイクル。飼料は AIN-93G 固形飼料 (Oriental Bioservice)、飲料は水道水を 24 時間自由に摂取させた。コントロール群として、同じく 2 ヶ月齢から飼育し、実験開始時点で 20 ヶ月齢の SD ラット 9 匹 (雄性ラット 5 匹、雌性ラット 4 匹) を用いた。すべての実験手法は、筑波大学動物実験委員会の承認のもと実施した。

B. 運動スケジュール

本実験の一週間前より、小動物用トレッドミルを用いて運動を実施した。速度は 14.4m/min で開始し、 21m/min を上限とした。1 日 30 分間、週に 5 日間の運動を 10 週間継続した。電気刺激はストレスとなる可能性を考慮して用いず、手やブラシによる刺激で走行を促した。コントロール群のラットには運動をさせなかったが、トレッドミルの稼動時には稼動音を聞かせ、トレーニング群がトレッドミルの稼動音から受ける影響を同一条件とした。

C. 脾臓細胞と腸間膜リンパ節の調製

運動期間終了後、ジエチルエーテルを用いて麻酔しながら心臓採血によって失血死させた。開腹し、脾臓を採取した。スライドガラスを用いて脾臓を細かく圧砕し、培地（RPMI、GIBCO社）に懸濁した。セルストレーナー（ベクトン・ディッキンソン社）を用いて組織と脾細胞懸濁液とを分離した。細胞懸濁液を2200rpm、4℃で5分間遠心分離し、上清を捨てた後RPMIに再懸濁した。先程と同じ条件で再び遠心分離し、上清を捨てた後に細胞凍結用保存液（セルバンカー、十慈フィールド株式会社）に懸濁して-80℃で冷凍保存した。

腸間膜リンパ節も、上記と同様に処理した。

D. リンパ球分画測定

フローサイトメーター（FACSCalibur, Becton&Dickinson Immunocytometry Systems 社製、CA, U.S.A）を用いて、脾細胞中のリンパ球サブセットを測定した。使用した抗体は FITC 標識抗ラット CD3（Biolegend）、APC 標識抗ラット CD4（Biolegend）、PE 標識抗ラット CD8a（Biolegend）、APC 標識抗ラット CD28（Biolegend）、PE 標識抗ラット CD45RA（Biolegend）FITC 標識抗ラット IgA（GeneTex）であった。

冷凍保存していたサンプルを 37℃の温水中で解凍し、各抗体を加えて 30 分間暗所静置した。0.1%BSA/PBS を 1 ml 加えて 4℃、2200rpm で 5 分間遠心後、真空ポンプ（KNF Neuberger GmbH 社製、Freiburg, Germany）にて上清を吸引した。0.1%BSA/PBS を 300 μ l 加え、FACS 用チューブに分注した。

フローサイトメーターによりサンプルにレーザー光を照射し、散乱光及び蛍光を検出した。散乱光のうち、前方散乱光により細胞の直径、側方散乱光により細胞の内部構造を判別し、リンパ球を分画した。分画されたリンパ球のみを抽出し、細胞表面に結合した各蛍光抗体の発光限度を蛍光より検出した。リンパ球数が10000 カウントに達したところで検出を停止した。ネガティブコントロール（FITC/PE 標識抗ヒト IgG1）をもとに、陽性および陰性を判定した。

E. 統計処理

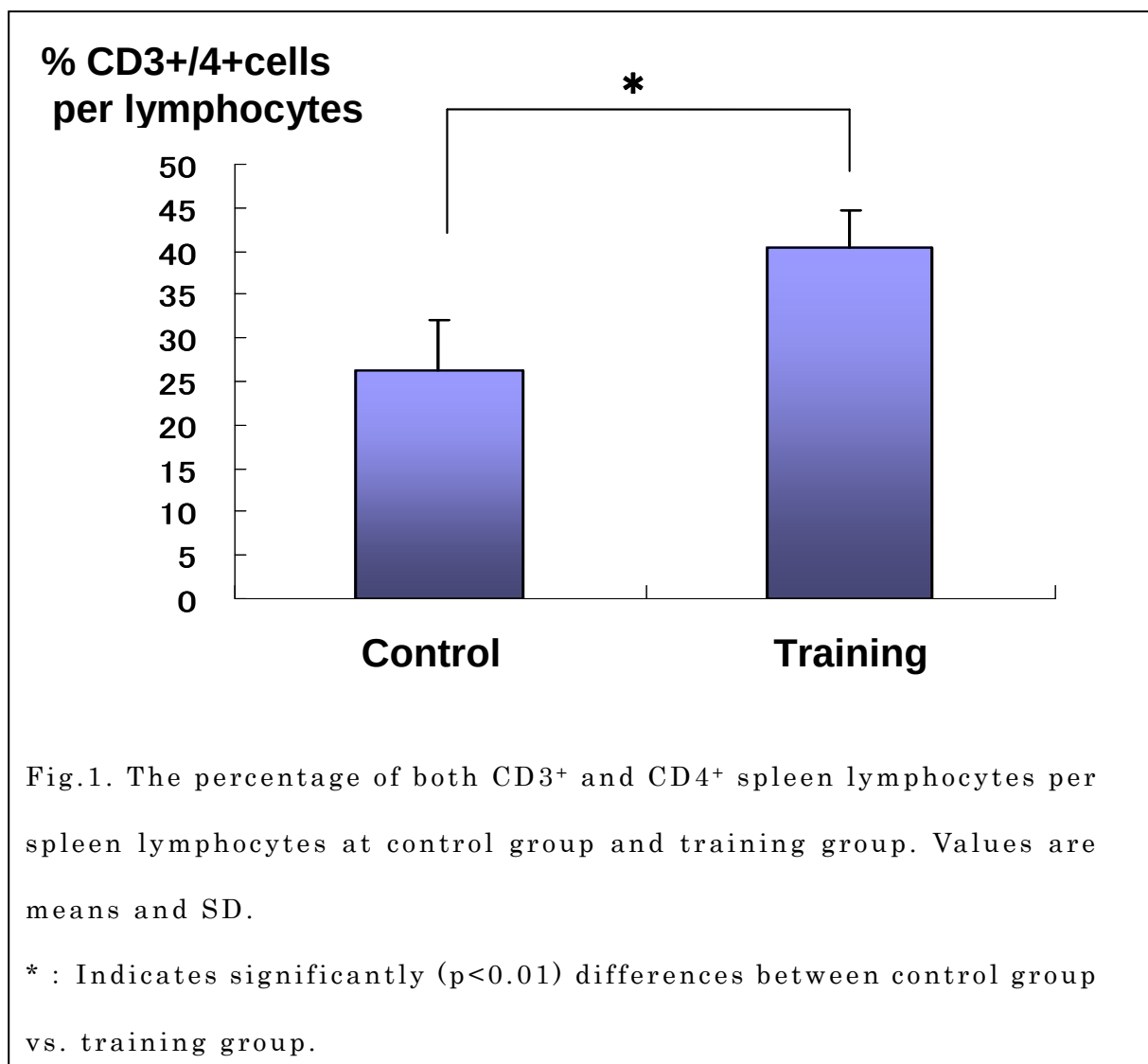
各測定値は、平均値±標準偏差で示した。二群間の比較には統計解析ソフト SPSS for Windows を用い、対応の無い Student t-test を行った。有意水準は 5%未満とした。

Ⅲ．結果

A. 脾臓細胞中リンパ球サブセットの変動

1. CD3+/CD4+リンパ球の割合

脾臓細胞中のリンパ球に占める、CD3+/CD4+リンパ球の割合を Fig.1 に示す。コントロール群では $26.16 \pm 5.88\%$, トレーニング群では $40.35 \pm 4.38\%$ であり、トレーニング群で有意に高い値が認められた ($p < 0.01$)。



2. CD3+/CD8+リンパ球の割合

脾臓細胞中のリンパ球に占める、CD3+/CD8+リンパ球の割合を Fig.2 に示す。コントロール群では $11.28 \pm 1.75\%$, トレーニング群では $15.59 \pm 4.61\%$ であり、トレーニング群で有意に高い値が認められた ($p < 0.01$)。

**% CD3+/8a+cells
per lymphocytes**

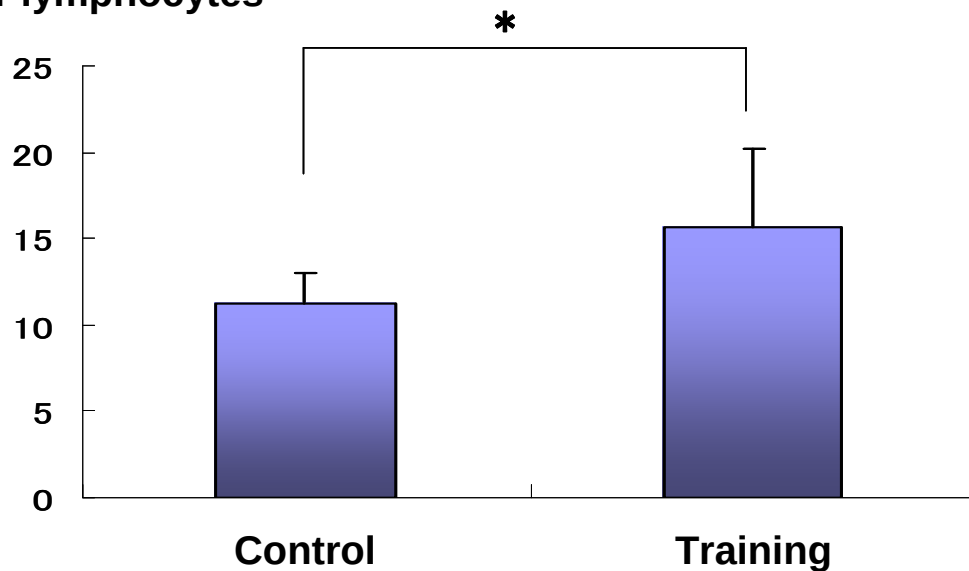


Fig.2. The percentage of both CD3⁺ and CD8⁺ spleen lymphocytes per spleen lymphocytes at control group and training group. Values are means and SD.

* : Indicates significantly ($p < 0.01$) differences between control group vs. training group.

3. CD3+/CD28+リンパ球の割合

脾臓細胞中のリンパ球に占める、CD3+/CD28+リンパ球の割合を Fig.3 に示す。コントロール群では $14.56 \pm 6.66\%$, トレーニング群では $29.35 \pm 8.12\%$ であり、トレーニング群で有意に高い値が認められた ($p < 0.01$)。

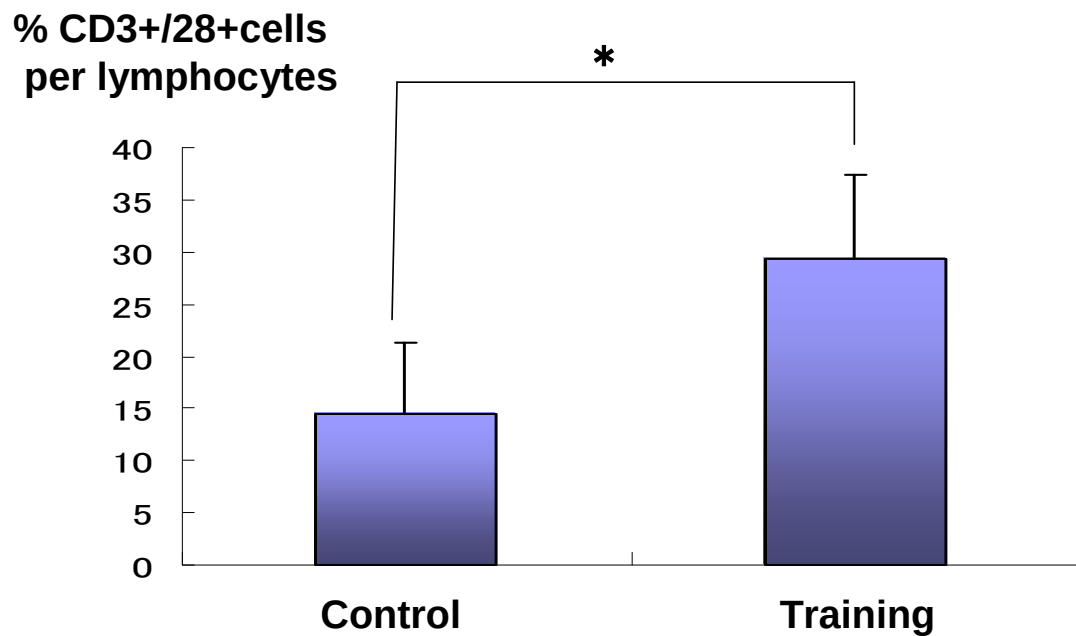


Fig.3. The percentage of both CD3⁺ and CD28⁺ spleen lymphocytes per spleen lymphocytes at control group and training group. Values are means and SD.

* : Indicates significantly ($p < 0.01$) differences between control group vs. training group.

4. CD3+リンパ球中の CD28 陽性率

脾臓細胞中のリンパ球において CD3 を発現しているもののうち、CD28+であるリンパ球の割合を Fig.4 に示す。コントロール群では $63.95 \pm 5.71\%$, トレーニング群では $65.18 \pm 6.81\%$ であり、両群間には有意な差は認められなかった ($p>0.05$)。

**% CD3+/28+
per CD3+ cells**

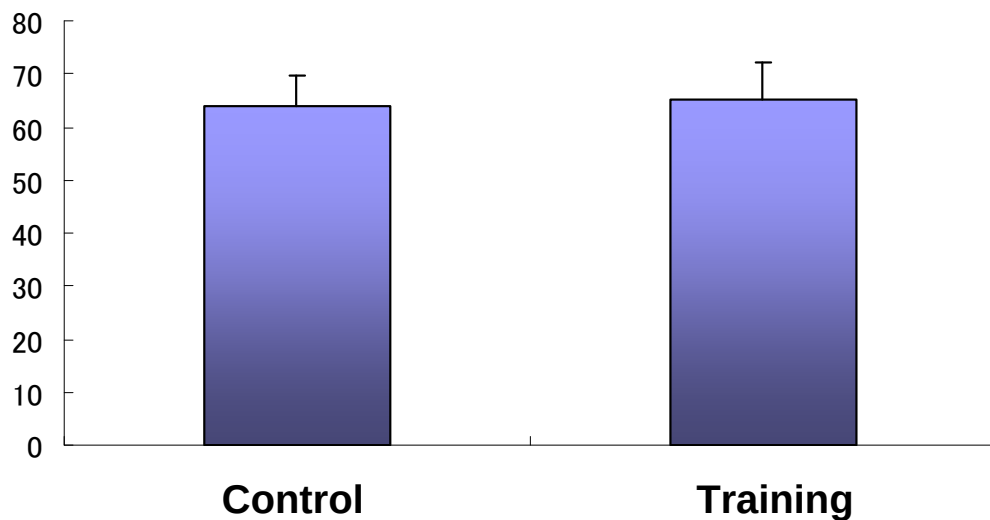
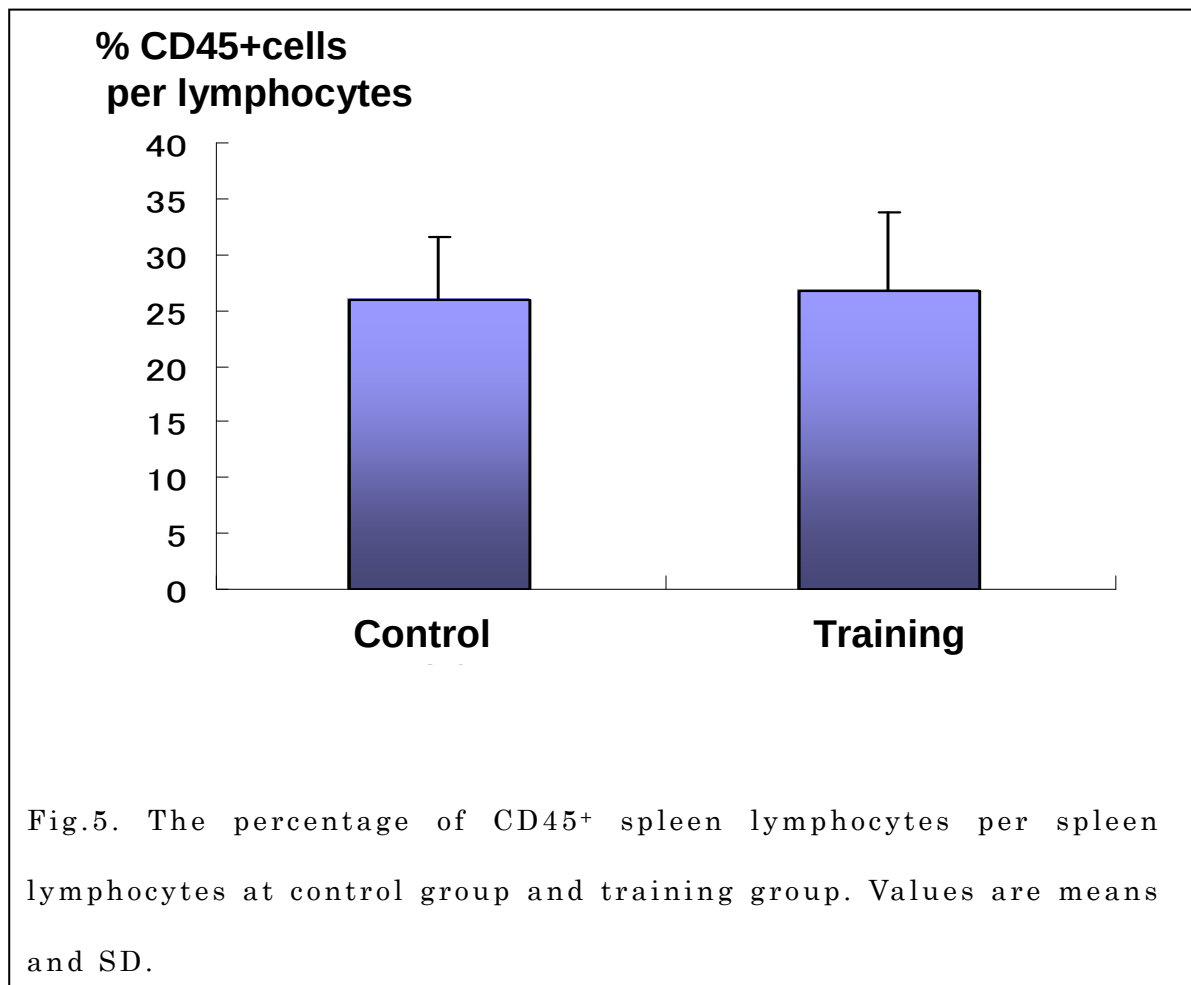


Fig.4. The percentage of both CD3⁺ and CD28⁺ spleen lymphocytes per CD3⁺ spleen lymphocytes at control group and training group. Values are means and SD.

5. CD45RA+リンパ球の割合

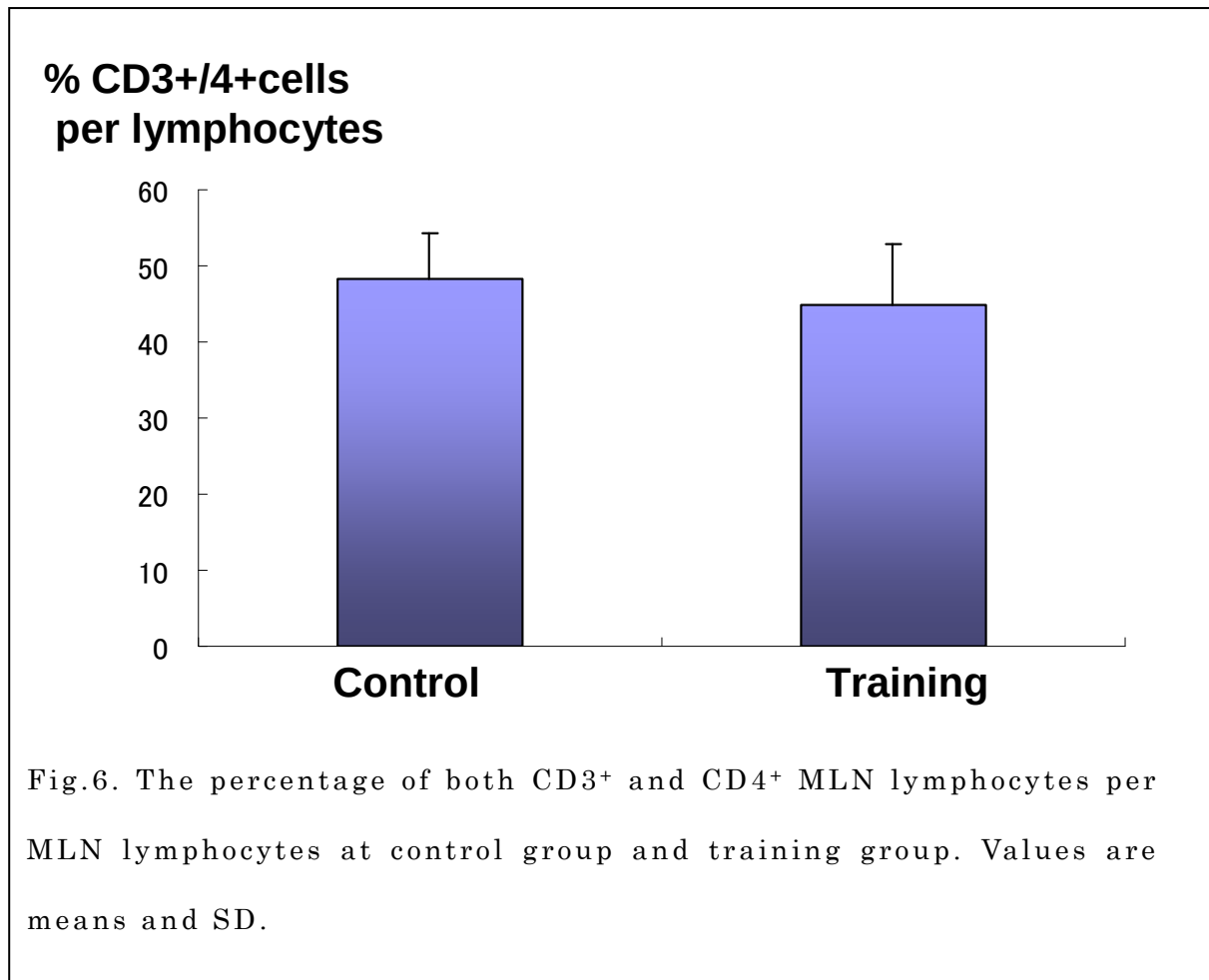
脾臓細胞中のリンパ球に占める、CD45RA+リンパ球の割合を Fig.5 に示す。コントロール群では $25.84 \pm 5.68\%$, トレーニング群では $26.81 \pm 6.99\%$ であり、両群間における有意な差は認められなかった($p>0.05$)。



B. 腸間膜リンパ節中リンパ球サブセットの変動

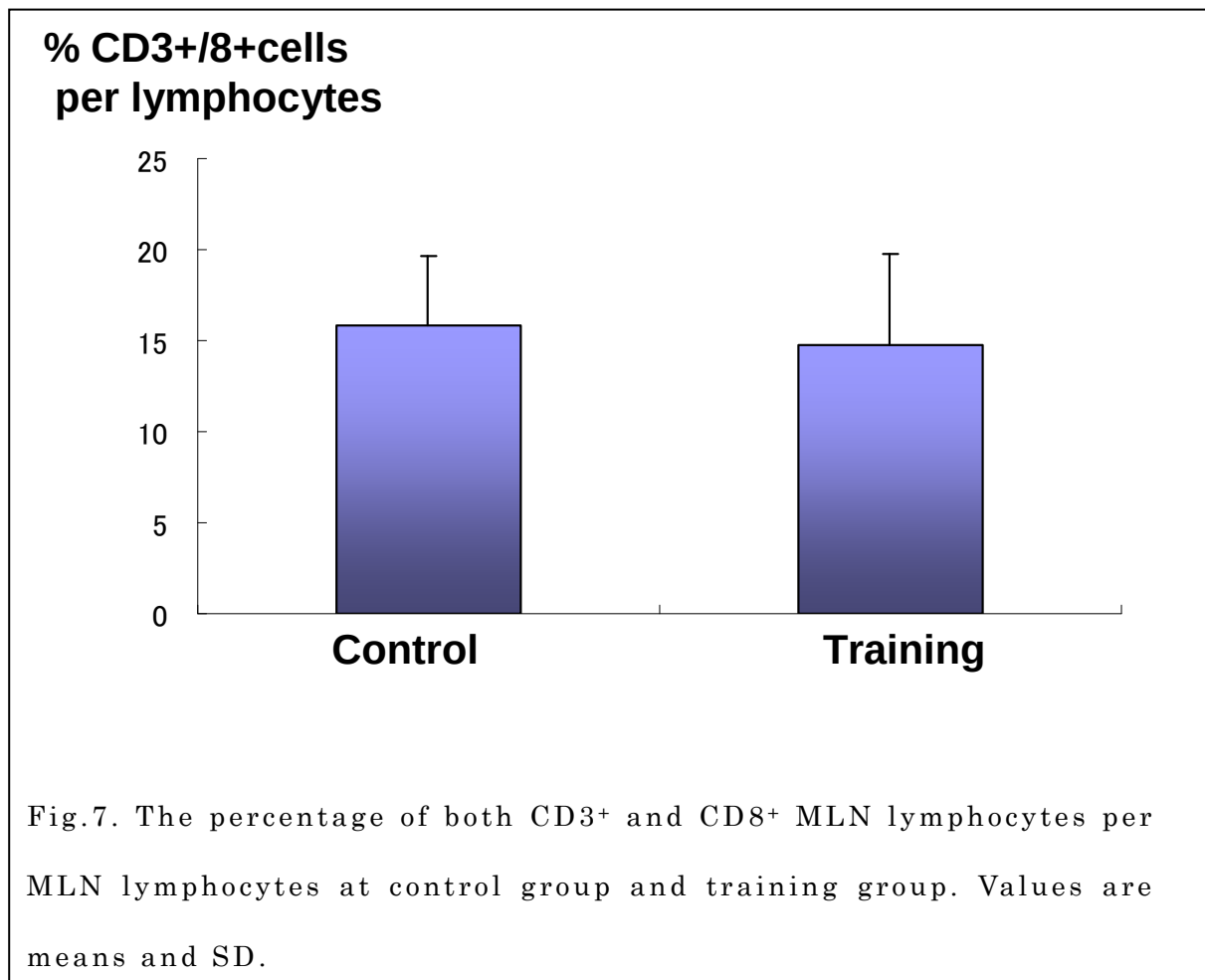
1. CD3+/CD4+リンパ球の割合

腸間膜リンパ節中のリンパ球に占める、CD3+/CD4+リンパ球の割合を Fig.6 に示す。コントロール群では $48.30 \pm 5.87\%$, トレーニング群では $44.75 \pm 8.13\%$ であり、両群間における有意な差は認められなかった ($p>0.05$)。



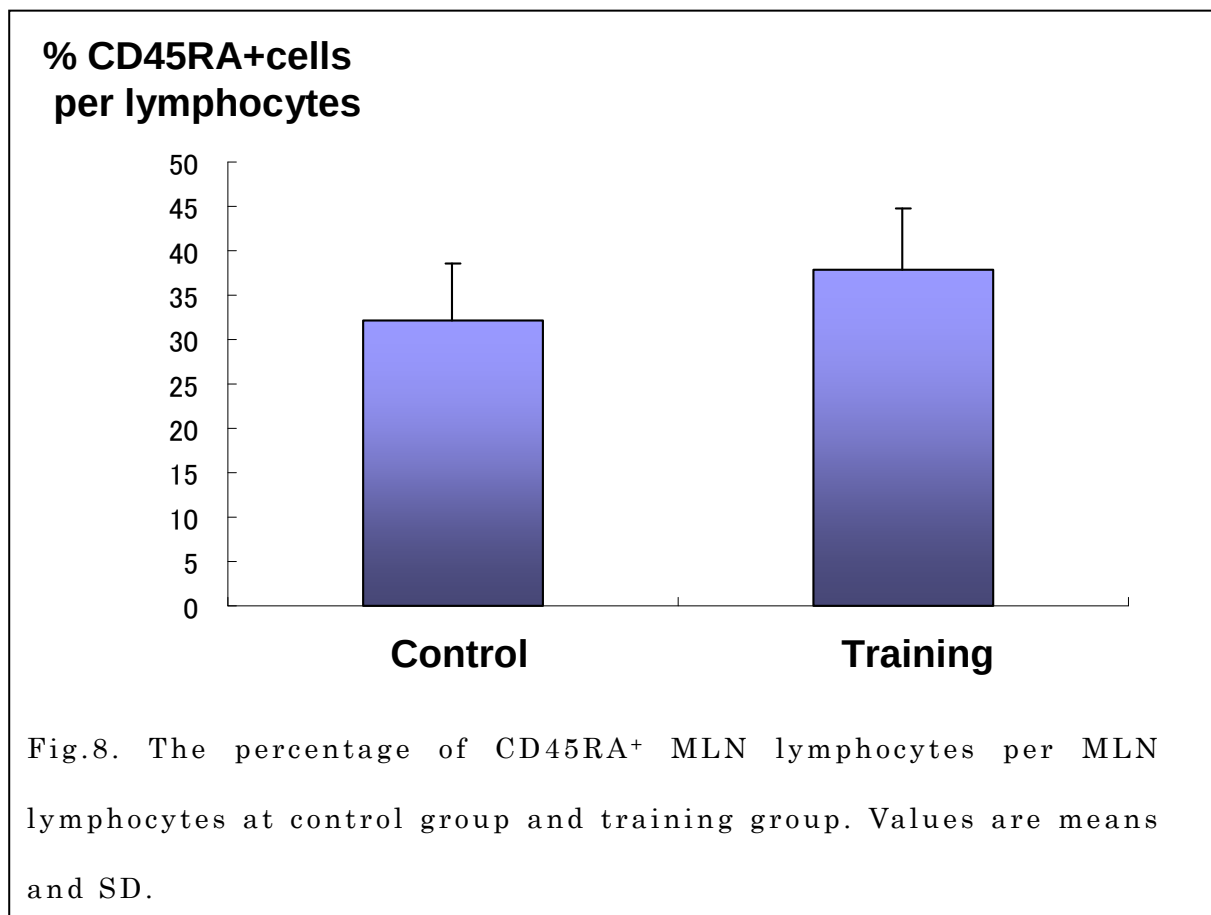
2. CD3+/CD8+リンパ球の割合

腸間膜リンパ節中のリンパ球に占める、CD3+/CD8+リンパ球の割合を Fig.7 に示す。コントロール群では $15.87 \pm 3.74\%$, トレーニング群では $14.82 \pm 4.98\%$ であり、両群間における有意な差は認められなかった ($p>0.05$)。



3. CD45RA+リンパ球の割合

腸間膜リンパ節中のリンパ球に占める、CD45RA+リンパ球の割合を Fig.9 に示す。コントロール群では $32.24 \pm 6.44\%$, トレーニング群では $37.94 \pm 6.78\%$ であり、両群間における有意な差は認められなかった($p>0.05$)。



4. B リンパ球中の IgA 発現 B リンパ球の割合

腸間膜リンパ節中の B リンパ球に占める、IgA 発現 B リンパ球の割合を Fig.9 に示す。コントロール群では $9.10 \pm 3.08\%$, トレーニング群では $9.90 \pm 2.41\%$ であり、両群間における有意な差は認められなかった ($p>0.05$)。

% CD45+/IgA+ per CD45+ cells

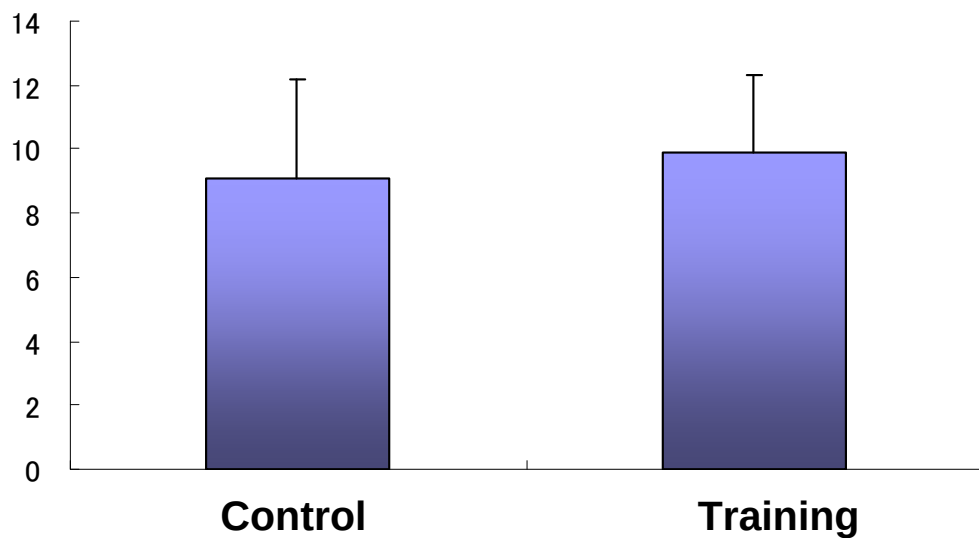


Fig.9. The percentage of CD45RA⁺ and IgA⁺ MLN lymphocytes per CD45RA⁺ MLN lymphocytes at control group and training group. Values are means and SD.

IV. 考察

A. 脾臓細胞中リンパ球サブセット

脾臓細胞のリンパ球中に占めるヘルパーT リンパ球の割合は、トレーニング群で有意に高い値を示した。ヘルパーT リンパ球数は、ヒト末梢血中において加齢によって減少することが報告されている⁶⁾。またマウス脾臓細胞中のT リンパ球は、加齢によって変化しないという報告がある⁷⁾。今回の結果は、運動はT リンパ球に対して加齢とは異なる影響を及ぼすことを示している。また一方で、ヘルパーT リンパ球はマウスの脾臓を対象とした実験で、加齢によってサイトカイン産生能が低下することが報告されている²⁰⁾。今回の研究では、ヘルパーT リンパ球の機能に関しては検討していない。より実際的な免疫機能を評価するため、今後は数だけでなく機能も測定する必要がある。

細胞傷害性T リンパ球が脾臓細胞中のリンパ球に占める割合は、トレーニング群で有意に高い値を示した。ヒト末梢血中においては、細胞傷害性T リンパ球数は加齢によって変化しないことが報告⁶⁾されている。またマウス脾臓細胞を用いた研究では、B リンパ球の割合は加齢によって増加することが報告されている⁷⁾。したがって今回の結果は、運動が加齢の影響をより大きくする可能性を示唆している。加齢に伴う細胞傷害性T リンパ球の機能低下を報告した研究はいくつか存在する^{21),22)}。細胞傷害性T リンパ球の活性はヘルパーT リンパ球に強く依存している。今回の測定で増加していたヘルパーT リンパ球の機能を測定するこ

とは、細胞傷害性 T リンパ球による免疫機能を評価することにもつながるかもしれない。

補助刺激シグナル受容体である CD28 を発現している T リンパ球は、脾臓細胞中の割合がトレーニング群で有意に高い値を示した。Fagnoni らは、高齢者の末梢血液中で CD28 を発現していない T リンパ球が増加していることを報告している²³⁾。なかでも細胞傷害性 T リンパ球においてその増加は顕著であり、これは加齢に伴う細胞傷害性 T リンパ球の機能低下^{21),22)}の一因となっているのかもしれない。本研究において CD28 発現 T リンパ球の増加が見られたことは、加齢による免疫機能低下を運動によって抑制した効果と見ることができるかもしれない。しかし一方で、T リンパ球全体での CD28 発現 T リンパ球の割合は変わっていなかった。このことは、運動による CD28 発現 T リンパ球の増加は、トータルの T リンパ球が増加したためであるということを示している。つまり、運動が直接 CD28 の発現に影響を及ぼしたとは言えない。今後の研究では、T リンパ球のうちヘルパー T リンパ球、および細胞傷害性 T リンパ球のそれぞれについて CD28 発現の割合を検討する必要がある。

脾臓細胞中に占める B リンパ球の割合は、トレーニング群とコントロール群で差が見られなかった。マウスの脾臓を用いた研究では、B リンパ球の割合が加齢に伴って上昇するという報告⁷⁾がある。しかし、この現象が免疫機能を向上させているのか低下させているのかは明らかでない。一方、コレラ毒素に感作させたラットの血液を用いた実験においては、B リンパ球は高齢ラットで多く見られたものの、コレラ毒素特異的な IgA を発現している B

リンパ球は若齢ラットで多く観察された²⁴⁾。このことは、Bリンパ球の数と機能とは独立に加齢の影響を受ける可能性を示唆している。今回の研究では、割合に関しては運動の効果が見られなかった。今後はBリンパ球の機能に関しても検討していく必要がある。

B. 腸間膜リンパ節中のリンパ球サブセット

腸間膜リンパ節を用いて免疫機能を評価した報告は、主にラットを対象としていくつかなされている²⁴⁻²⁸⁾。Oginoら²⁹⁾は、腸間膜におけるリンパの流量には若齢ラットと高齢ラットとで差がないものの、リンパ球の流入量は高齢ラットにおいて大きく減少していることを報告した。つまり腸管関連のリンパ組織において、循環しているリンパ球が加齢によって少なくなることを示している。循環せず組織にとどまっているリンパ球数の変動は明らかでないが、このことは腸間膜リンパ節における免疫機能が加齢によって低下していることを示唆しているのかもしれない。

本研究において、腸間膜リンパ節中のリンパ球に占めるヘルパーTリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球の割合は、トレーニング群とコントロール群とで差が見られなかった。またラットの腸間膜リンパ節を用いた先行研究では、若齢期から高齢期までヘルパーTリンパ球が占める割合は変わらなかったという報告がある²⁹⁾。腸間膜リンパ節のヘルパーTリンパ球は、運動や加齢による影響を受けにくいのかもしれない。

腸間膜リンパ節中のリンパ球に占めるBリンパ球の割合は、ト

レーニング群とコントロール群とで差が見られなかった。また腸間膜リンパ節の B リンパ球のうち、IgA を発現しているものの割合はトレーニング群とコントロール群とで差が見られなかった。Thoreux ら²⁵⁾はコレラ毒素に感作させたラットの腸間膜リンパ節を用いて IgA、および IgA 発現細胞の割合を測定したが、いずれも若齢ラットと高齢ラットで差が無かったことを報告している。今回のトレーニングは B リンパ球の割合、および IgA 発現に対して影響しなかったようである。今後の研究では、実際に抗原へ感作させた場合の反応を検討する必要がある。

V. 総括

8週間の運動トレーニングが脾臓細胞中、および腸間膜リンパ節中のリンパ球に与える影響を解析した。脾臓細胞中のリンパ球に対しては、ヘルパーTリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球、および補助刺激シグナル受容体発現Tリンパ球の割合がトレーニング群において有意に高値を示した。一方で脾臓細胞中のBリンパ球、および腸間膜リンパ節中のリンパ球に対しては、両群間に差は見られなかった。

以上より、運動トレーニングがラット脾臓細胞中のTリンパ球数に影響を与えることが示された。しかし免疫機能を評価するためには、リンパ球の数だけでなく機能についても検討しなければならない。今後は、運動トレーニングがリンパ球の機能に与える影響を解析する必要がある。

謝 辞

本論文の作成にあたり、指導教官としてご指導を賜りました早稲田大学スポーツ科学学術院赤間高雄教授に深甚なる感謝を申し上げます。

本論文に対し、多くのご助言を賜りました早稲田大学スポーツ科学学術院坂本静男教授、樋口満教授に心から感謝いたします。

また本研究を遂行するにあたり、貴重なご意見・ご指導・激励を賜りました筑波大学木村文律氏、清水和弘氏に心から深謝いたします。

本研究の進行にあたって、早稲田大学鈴木智弓氏、阿部絢子氏、莊雅筑氏からは適切なご指導を賜りましたのみならず、研究に専念出来るよう多大なるご助力を賜りました。心から感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、犠牲となった実験動物へ心から追悼と感謝の意を表します。

最後に、何らの不自由なく二年間の学生生活を送らせてくださった両親へ、心からの感謝を捧げます。

参考文献

1. 総務省「国勢調査」、国立社会保障・人口問題研究所資料(2006)
2. 国連「世界人口予測」(2004)
3. 厚生労働省大臣官房統計情報部編(2003) 人口動態統計(平成十三年度)
4. Sonya Vasto, Marco Malavolta and Graham Pawelec: Age and immunity. *Immunity & Ageing*, (2006) Feb 24;3:2
5. Wang Shengdian, Chen Lieping: Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes and Infections*, (2004) Jul;6(8):759-66
6. Mascart-Lemone F, Delespesse Guy, Servais Gerard, Kunstler M: Characterization of immunoregulatory T lymphocytes during ageing by monoclonal antibodies. *Clinical and experimental immunology*, (1982) Apr;48(1):148-54
7. Abbie C. Connoy, Melissa Trader and Kevin P. High: Age-related changes in cell surface and senescence markers in the spleen of DBA/2 mice: A flow cytometric analysis. *Experimental Gerontology*, (2006) Feb;41(2):225-9.
8. Bodey Bela, Bodey Bela Jr, Siegel Stuart E, Kaiser Hans E. Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging. *In Vivo*. (1997), 11:421-440.

9. Andrew J.T. George and Mary A. Ritter. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunology Today*, (1996) Jun;17(6):267-72.
10. Haynes Laura, Swain Susan L. Why aging T cells fail: implications for vaccination. *Immunity*. (2006), 24:663-666.
11. Gonçalo. Doria, Giacomo. D'Agostaro, Andrea. Poretti, Age dependent variations of antibody avidity, *Immunology* 35 (1978) 601-6111.
12. 赤間 高雄、木村 文律、秋本 崇之、河野 一郎 (2003) 高齢者の免疫機能に及ぼす運動の影響. 体力科学. 52, 65-72.
13. Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL, Markoff PA, Balk-Lamberton AJ, Yang H, Chritton DB, Lee JW, Arabatzis K. The Effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections: *International Journal of Sports Medicine*, (1990) Dec;11(6):467-73.
14. Nieman DC. Exercise, infection, and immunity: *International Journal of Sports Medicine*, (1994) Oct;15 Suppl 3:S131-41.
15. Tiollier E, Gomez-Merino D, Burnat P, Jouanin JC, Bourrilhon C, Filaire E, Guezennec CY, Chennaoui M. Intense training: mucosal immunity and incidence of respiratory infections: *European Journal of Applied Physiology*, (2005) Jan;93(4):421-8. Epub 2004 Oct 14

16. Panagiota Klentrou, Thomas Cieslak, Melanie MacNeil, Angela Vintinner, Michael Plyley. Effect of moderate exercise on salivary immunoglobulin A and infection risk in humans: *European Journal of Applied Physiology*, (2002) Jun;87(2):153-8.
17. Simpson Richard J, Florida-James Geraint D, Whyte Greg P, Guy Keith. The effects of intensive, moderate and downhill treadmill running on human blood lymphocytes expressing the adhesion/activation molecules CD54 (ICAM-1), CD18 (α L integrin) and CD53: *European Journal of Applied Physiology* (2006) 97: 109-121
18. 赤間 高雄. 運動が免疫機能に及ぼす影響. 臨床検査 (2003) 45 卷 13 号, 別刷
19. M.L. Kohut, G.W. Boehm, J.A. Moynihan. Moderate exercise is associated with enhanced antigen-specific cytokine, but not IgM antibody production in aged mice: *Mechanisms of Ageing and Development*, (2001) 122. 1135-1150
20. Haynes, Laura., Linton, Phyllis-Jean., Eaton, Sheri M., Tonkonogy, Susan L., and Swain, Susan L. IL-2, but not other common γ chain (γ c)-binding cytokines, can reverse the defect in generation of CD4 effector T cells from naive T cells of aged mice. *Journal of Experimental Medicine*, (1999) 190, 1013-1023.
21. Yongxin Zhang, Catherine L. Acuna, Kirsten C. Switzer, Ling Song, Robinlyn Sayers, Innocent N. Mbawuike.

- Corrective Effects of Interleukin-12 on Age-Related Deficiencies in IFN-*gamma* Production and IL-12R*beta*2 Expression in Virus-Specific CD8⁺ T Cells: *Journal of Interferon & Cytokine Research*, (2000), 20(2): 235-245
22. Yongxin Zhang, Ying Wang, Xyanthine Gilmore, Keyi Xu, Innocent N. Mbawuike. Independent and Synergistic Effects of Interleukin-18 and Interleukin-12 in Augmenting Cytotoxic T Lymphocyte Responses and IFN- γ Production in Aging: *Journal of Interferon & Cytokine Research*, (2001), 21(10): 843-850
23. Fagnoni F.F, Vescovini R, Mazzola M, Bologna G, Nigro, E, Lavagetto, G, Franceschi, C, Passeri M, Sansoni P. Expansion of cytotoxic CD8⁺ CD28⁻ T cells in healthy ageing people, including centenarians: *Immunology*, (1996), 88, 501-507.
24. Thoreux Karine, Owen Robert L, Schmucker Douglas L. Intestinal lymphocyte number, migration and antibody secretion in young and old rats: *Immunology*, (2000), Sep;101(1):161-7
25. Douglas L. Schmucker. Intestinal mucosal immunosenescence in rats: *Experimental Gerontology*. (2002), Jan-Mar;37(2-3):197-203
26. Douglas L. Schmucker, Karine Thoreux and Robert L. Owen, Aging impairs intestinal immunity: *Mechanisms of Ageing and Development*. (2001), Sep 15;122(13):1397-411

27. Schmucker DL, Owen RL, Outenreath R, Thoreux K. Basis for the age-related decline in intestinal mucosal immunity: *Clinical & Developmental Immunology*. (2003), Jun-Dec;10(2-4):167-72.
28. Fló Juan, Massouh Ernest. Age-related changes of naive and memory CD4 rat lymphocyte subsets in mucosal and systemic lymphoid organs: *Developmental & Comparative Immunology*, (1997), Sep-Oct;21(5):443-53
29. Takashi Ogino, Soichiro Miura, Shunsuke Komoto, Yuriko Hara, Ryota Hokari, Yoshikazu Tsuzuki, Chikako Watanabe, Seiichiro Koseki, Hiroshi Nagata, Satoshi Hachimura, Shuichi Kaminogawa and Hiromasa Ishii. Senescence-associated decline of lymphocyte migration in gut-associated lymphoid tissues of rat small intestine: *Mechanisms of Ageing and Development*, (2004), March;125(3):191-9.