

分担課題：骨髄由来樹状細胞の移入による金属アレルギーの感作成立と TLR シグナリング

分担研究者：西屋 禎 北海道大学大学院医学研究科 生理系薬理学講座 細胞薬理学分野 講師

研究要旨

T 細胞性金属アレルギーの発症では、金属イオンの情報を持つ MHC class II-ペプチド複合体を発現する抗原提示細胞による T 細胞への抗原提示が重要なステップとして位置付けられているが、金属アレルギーを解析するモデル動物が存在しなかったことから、いまだ不明な点が多い。最も強力な抗原提示能力を持つ樹状細胞 (以下、DC) は、Toll 様受容体 (TLR) ファミリー分子を発現しているため、各種病原体成分により活性化されると、T 細胞への抗原提示に必要な CD80、CD86、MHC class II といった分子の発現レベルが増大することから、金属アレルギーの発症にも DC が深く関与していることが推測される。我々の研究班では、金属アレルギー発症マウスモデルの作製に成功している。このモデル系は、金属イオンと TLR4 リガンドの LPS をマウスの腹腔内に同時投与することにより、金属アレルギーを感作することができることを示した。本研究では、*in vitro* で金属塩と LPS を暴露した骨髄由来樹状細胞をマウスに移入することにより、金属アレルギーの感作が成立するか否かを検討した。その結果、金属塩のみを暴露した BMDC の移入では金属アレルギーの感作は成立しなかったが、金属塩と LPS を暴露した BMDC の移入により、金属アレルギーの感作が成立する可能性が示唆された。今後、この *in vitro* 活性化 BMDC と金属アレルギー発症マウスから得た T 細胞との反応性を検討する予定である。

A. 研究目的

ニッケルやコバルト、パラジウムといった金属が引き起こす金属アレルギー発症の分子メカニズムとして、金属イオンにより影響を受けた蛋白質由来ペプチド-MHC 複合体の T 細胞への抗原提示とその活性化が深く関与することが示唆されている。一般的に、T 細胞への抗原提示は、マクロファージや DC、さらには皮下に存在するランゲルハンス細胞といったプロフェッショナル抗原提示細胞により行われ、その際に MHC や T 細胞受容体の他に補助刺激分子 (CD28 と B7 (CD80 および CD86)) が重要な役割を果たしている。B7 は抗原提示細胞に発現しており、これらの発現は各種細菌成分の存在下で著しく増大することがわかっている (図 1)。抗原提示細胞に発現する TLR は各種細菌成分を認識し、自然免疫および獲得免疫反応を活性化する。

このように、TLR により活性化された抗原提示細胞が T 細胞伝達性の金属アレルギー発症に

関与することが示唆されているが、金属アレルギーを解析するモデル動物が存在しなかったことから、いまだ不明な点が多い。本研究では、DC と TLR signaling の活性化が如何に金属アレルギーの発症に関与するのかを、我々の研究班が開発した金属アレルギーモデルマウスを用いて検討した。

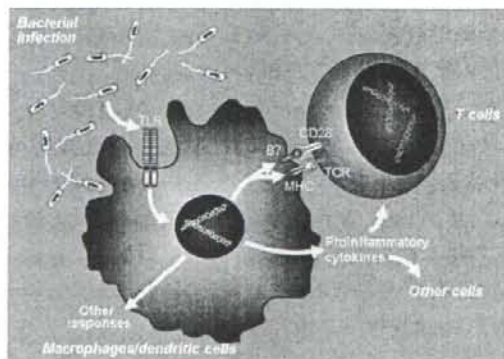


図 1. 細菌感染における抗原提示細胞と T 細胞の相互作用。

B. 方法

1) 骨髄由来樹状細胞 (BMDC) の調製

C57BL/6 マウス (7 週齢雌) の骨髄から細胞を回収し、赤血球除去後に残った細胞を 10 ng/ml GM-CSF 存在下で十二日間培養した。この細胞を回収し、CD11c の発現を調べたところ、ほぼ 100% の細胞が CD11c 陽性であった。また、20 ng/ml LPS 24 時間処理により、CD80、CD86、MHC class II などの分子の発現が増大することを確認した。

2) BMDC に対する金属塩の毒性の検討

1 で調製した BMDC を図 2 に示した濃度の塩化パラジウム (PdCl_2) を含む培地で 24 時間培養した。細胞を洗浄した後、DAPI を用いて細胞を染色し、蛍光顕微鏡により DAPI 陽性細胞を観察した。

3) BMDC の移入による金属アレルギー発症とその評価

1 で調製した BMDC を PdCl_2 (0.2 mM)、または PdCl_2 + LPS (10 ng/ml) で 24 時間処理した。細胞を培地で 3 回洗浄して PdCl_2 及び LPS を除去した後、 5×10^5 cells/マウスの量を尾静脈注射により C57BL/6 マウス (7 週齢雌) に移入した。10 日後に誘導 (challenge) として PBS または PdCl_2 溶液 (1 mM) 15 μl をマウスの右耳の耳介に皮内注射し、以後右耳の腫脹を DIAL THICKNESS GAUGE (PEACOCK OZAKI MFG. CO., LTD) を用いて 24 時間おきに 4 日間測定した。

C. 研究結果

1) BMDC に処理する金属塩の至適濃度

BMDC を金属塩で処理することにより、金属イオンの情報を T 細胞に提示する活性型の BMDC を *in vitro* で調製することが可能か否かを検討するために、まず BMDC を処理する金属イオンの至適濃度をその細胞毒性を指標に検討した。その結果、0.3 mM 以上の PdCl_2 を 24 時間処理すると BMDC の細胞死が誘導されることがわかった (図 2)。従って、0.3 mM を越えない濃度の PdCl_2 で BMDC を処理する必要があることがわかった。

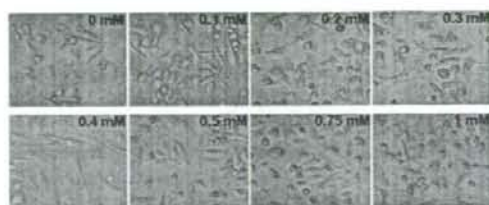


図 2. BMDC に対する PdCl_2 の毒性の検討。 PdCl_2 0.3 mM 以上で DAPI 陽性細胞 (= 死細胞) が観察された。

2) 金属塩及び LPS 処理 BMDC の移入による金属アレルギーの感作成立の可能性の検討

PBS で challenge したマウスにおいて、PBS 処理 BMDC 移入群、 PdCl_2 処理 BMDC 移入群、及び PdCl_2 + LPS 処理 BMDC 移入群の間に優位な腫脹の差は観察されなかった (図 3、図 4)。一方、 PdCl_2 で challenge したマウスにおいて、 PdCl_2 + LPS 処理 BMDC 移入群は、PBS 処理 BMDC 移入群や PdCl_2 処理 BMDC 移入群と比較して優位な腫脹の増大を示した。 PdCl_2 処理 BMDC 移入群は、PBS 処理 BMDC 移入群と比較して 48 時間以降の腫脹が増大する傾向を示した。なお、皮内注射を行わなかった左耳に関しては、全てのマウスでいかなる腫脹も観察されなかった (データ未提示)。

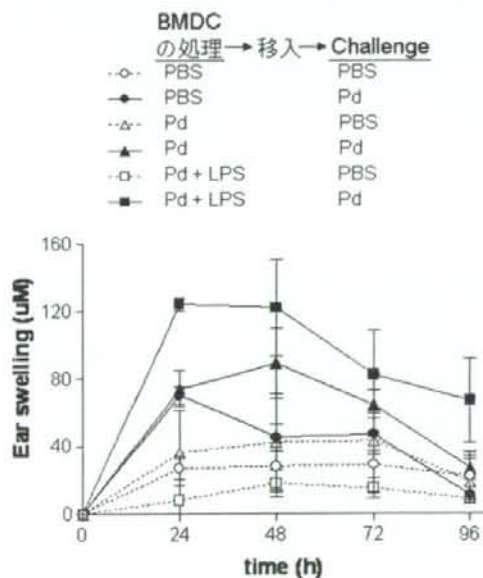


図 3. BMDC の移入による金属アレルギーの感作成立。 PdCl_2 と LPS の両方で処理された BMDC を移入することにより、 PdCl_2 challenge 後に顕

著な耳介の腫脹が観察された。

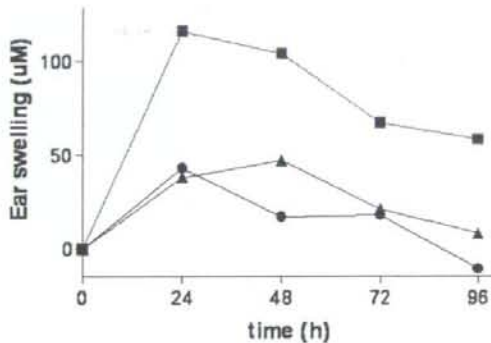


図4. BMDCの移入による金属アレルギーの感作成立. 図3の実験結果を、(Pd皮内注射群の腫脹) - (PBS皮内注射群の腫脹) = Ear swellingとして再計算したグラフ。●, PBS; ▲, PdCl₂; ■, PdCl₂+LPS処理BMDCをそれぞれ移入。

D. 考察

PdCl₂ + LPS処理BMDC移入群がPBS処理BMDC移入群よりも優れた腫脹の増大を示したことから、*in vitro*で金属イオンを処理したBMDCを移入することにより感作を成立させることが可能であることが示唆された。また、PdCl₂単独では感作成立が不十分であったことから、感作の成立にはTLR signalingの活性化、すなわち自然免疫反応の活性化が重要であることが示唆された。BMDCにおいて、LPS-TLR4 signalingの活性化により、CD80、CD86、MHC class II分子の発現が効果的に増強することと合わせて、*in vitro*で金属イオンの情報を持つMHC class II-ペプチド複合体を細胞表面に発現する活性化型BMDCが得られることが示唆された。この*in vitro*金属イオン-LPS処理BMDCが金属イオンと反応するT細胞の同定や検出に利用可能かどうかを調べるために、金属アレルギーをすでに発症したマウスのT細胞との反応性を検討することが今後の課題である。

E. 結論

*In vitro*で金属イオンとTLRリガンドを同時処理した骨髄由来樹状細胞を移入することにより、金属アレルギーの感作が成立する可能性を示唆

した。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

1. Horinouchi T, Miyake Y, Nishiya T, Nishimoto A, Morishima S, Muramatsu I, Miwa S. Functional role of Na⁺/H⁺ exchanger in Ca²⁺ influx mediated via human endothelin type A receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells (2007). *J. Pharmacol. Sci.* 107(4), 456-459.

1) 総説論文

1. 著者: Tadashi Nishiya, Anthony L. DeFranco
題名: Signaling by Toll-like receptors
出版社: CRC Press
年月: 2008

2. 学会発表

国外学会

該当無し

国内学会

1. 三宅由美恵、堀之内孝広、西屋禎、西本新、三輪聡一: エンドセリンA型受容体を介して活性化されるCa²⁺シグナリングの多様性、第22回北海道薬物作用談話会、札幌、2008年7月26日
2. 藤井俊輔、朝野拓史、片山貴博、堀之内孝広、西屋禎、西本新、南雅文、三輪聡一: タバコ煙に含まれる血管壁構成細胞障害因子の性状解析、第21回北海道薬物作用談話会、第22回北海道薬物作用談話会、札幌、2008年7月26日
3. 三宅由美恵、堀之内孝広、西屋禎、西本新、三輪聡一: エンドセリンA型受容体を介した細胞内Ca²⁺濃度上昇反応に関与するシ

グナルカスケードの多様性、第 59 回日本薬理学会北部会、仙台、2008 年 9 月 27 日

4. 西本新、魯凌云、西屋禎、堀之内孝広、三輪聡一：エンドセリン A 型受容体 (ET_AR) 結合蛋白質 Jab1 による ET_AR 蛋白質分解制御機構の解明、第 59 回日本薬理学会北部会、仙台、2008 年 9 月 27 日
5. 西本新、魯凌云、西屋禎、堀之内孝広、三輪聡一：エンドセリン A 型受容体 (ET_AR) 結合蛋白質 Jab1 による ET_AR レベルの調節、第 18 回日本循環薬理学会、千葉、2008 年 11 月 21 日
6. 堀之内孝広、西屋禎、西本新、森島繁、村松郁延、三輪聡一：エンドセリン A 型受容体により誘発される持続性 Ca²⁺流入の分子機構、第 18 回日本循環薬理学会、千葉、2008 年 11 月 21 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

分担課題：金属アレルギー発症に関与する自己抗原ペプチド精製とそのアッセイ系の確立

分担研究者：菅原 俊二 東北大学大学院歯学研究科 口腔分子制御学分野 教授

研究協力者：永井 康裕 東北大学大学院歯学研究科 口腔分子制御学分野 助教

田中 志典 東北大学大学院歯学研究科 口腔分子制御学分野 大学院生

研究要旨

金属アレルギー発症には、金属イオンと結合する自己タンパク質の存在が不可欠であるが、抗原提示のメカニズムについてはいまだ解明されていないのが現状である。そこで、本研究では、金属アレルギーマウスモデルを用いて金属アレルギー発症に関与する自己抗原ペプチド同定することを最終目標とし、昨年度はニッケルイオン感作マウスの抗原提示細胞の MHC クラス II 分子の溝に收容されている自己抗原ペプチドの精製方法を確立した。今年度は、自己抗原ペプチドの本格的な精製を完了させ、精製ペプチド活性評価のための *in vitro* アッセイ系をほぼ確立した。

A. 研究目的

金属アレルギー発症には、金属イオンと結合する自己タンパク質の存在が不可欠であるが、抗原提示のメカニズムについてはいまだ解明されていないのが現状である。そこで、本研究では、金属アレルギーマウスモデルを用いて金属アレルギー発症に関与する自己抗原ペプチド同定することを最終目標とし、昨年度はニッケルイオン感作マウスの抗原提示細胞の MHC クラス II 分子の溝に收容されている自己抗原ペプチドの精製方法を確立した。今年度は、自己抗原ペプチドの本格的な精製と、精製ペプチドの活性を評価するためのアッセイ系の確立を目指した。

B. 方法

1. 自己抗原ペプチドの精製

参考文献 1 の方法に準じて、以下の方法で行った。

1) BALB/c マウス (メス 4 W, n = 100) をニッケルイオンと LPS で感作し、10 日後、脾細胞を調整し、MACS カラムにて CD90 (Thy1.2) 陽性細胞を除去した。コントロールとして非感作マウス (n = 100) を使用

した。精製した抗原提示細胞を界面活性剤 (MEGA8 と MEGA9) で処理し、可溶化画分を調整した。

- 2) 抗マウス MHC クラス II モノクローナル抗体産生ハイブリドーマをヌードマウスに腹腔注射し、腹水を得た。精製の後、CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow に結合させ、上記の可溶化画分と反応させた。その後、0.1% トリフルオロ酢酸 (pH 1.9) にて MHC クラス II 分子と收容溝のペプチドを溶出した。溶出画分は直ちに 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) で中性域に調整した。
- 3) 溶出画分を限外濾過法 (10 kDa) により分画し、10 kDa 以下の低分子画分を得た。
- 4) 精製した試料を、逆相 HPLC カラムにて分析した。

2. アッセイ系の確立

遠藤らの方法 (参考文献 2) に従い、以下の手順で行った。

- 1) BALB/c マウス (メス 6 週令) をニッケルイオンと LPS で腹腔内感作 10 日後、生理食塩水あるいはニッケルイオンで尾根部筋肉内にチャレンジした。5 日後、腸骨リンパ節と脾臓からリンパ球を調整した。

2) リンパ球を 5% FCS と 5% 正常マウス血清加 RPMI 1640 培地にて、ニッケルイオン±IL-2 存在下で 3 日間培養し、リンパ球の増殖を³Hチミジン取込み法にて検討した。陽性コントロールとしてコンカナバリン A を用いた。

C. 結果

1. ニッケル感作マウスから精製したサンプルで 3 のピークが得られた。コントロールマウスから精製したサンプルでも同じようなパターンのピークが得られた (図 1)。

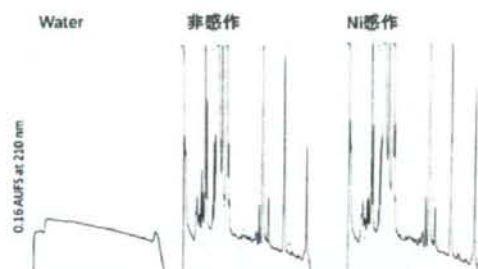


図 1 逆相 HPLC カラムによる分析結果

蒸留水をアプライした場合は全くピークが現れなかった (左)。非感作マウス (中) とニッケル感作マウス (右) から精製したサンプルをアプライした場合は約 3 の明確なピークが得られた。

2-1. ニッケル感作/チャレンジ群のリンパ節細胞は、感作のみの群と比較し、10 と 100 μ M のニッケルイオンに対して明確な増殖反応を示した。増殖反応の感度を充進させるために添加した IL-2 の効果はほとんどなかった。

2-2. 脾細胞においても同様の傾向が見られたが、リンパ節細胞ほど明確な反応ではなかった。

D. 考察

1. 昨年の予備実験と比較して、精製精度が格段に向上した。逆相 HPLC カラムの結果だけでは、コントロールとの差が判別しにくいいため、精製ペプチドの活性評価が必要となった。

2. 活性評価のための最適の条件を得るために、培養時間や血清濃度などの課題を克服する必要がある。また、別のアッセイ系として、マウスに感作あるいはチャレンジする際に精製ペプチド各分画を投与し、耳介の腫脹を指標とする *in vivo* の系も検討中である。

E. 結論

ニッケルイオン感作マウスの抗原提示細胞の MHC クラス II 分子の溝に収容されている自己ペプチドを同定するという最終目標の達成に近づいた。

参考文献

1. Suri A, Walters JJ, Kanagawa O, Gross ML, Unanue ER. Specificity of peptide selection by antigen-presenting cells homozygous or heterozygous for expression of class II MHC molecules: The lack of competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 5330-5, 2003.
2. Sato N, Kinbara M, Kuroishi T, Kimura K, Iwakura Y, Ohtsu H, Sugawara S, Endo Y. Lipopolysaccharide promotes and augments metal allergies in mice, dependent on innate immunity and histidine decarboxylase. *Clin. Exp. Allergy* 37 (5): 743-751, 2007.

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

1. Kuroishi T, Endo Y, Muramoto K, Sugawara S. Biotin deficiency up-regulates TNF- α production in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 83 (4): 912-920, 2008.
2. Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T, Sasano T, Sugawara S. Identification of IL-18 and

Th17 cells in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *J. Immunol.* 181 (4): 2898-2906, 2008.

3. Kuroishi T, Kinbara M, Sato N, Tanaka Y, Nagai Y, Iwakura Y, Endo Y, Sugawara S. Exacerbation of metal allergy by biotin deficiency via up-regulation of IL-1 β production in mice. *J. Nutri.* in press.

2)総説論文

1. 著者：佐藤直樹、金原正敬、高橋春江、黄 玲、船山ひろみ、黒石智誠、山本照子、佐々木啓一、高田春比古、菅原俊二、遠藤康男
題名：ニッケルアレルギーの自然免疫を背景とした発症機序
掲載誌：臨床免疫・アレルギー科 Vol 50 (5) 頁：618-624 年月：2008年11月

2.学会発表 国外学会

1. Kuroishi T, Endo Y, Muramoto K, Sugawara S. Biotin deficiency up-regulates tumor necrosis factor- α production in murine macrophages. The 95th Annual Meeting of the American Association of Immunologists, San Diego, USA, 2008年4月5-9日
2. Nagai Y, Kuroishi T, Ohki A, Sugawara S. Induction of Treg from PBMC by interacting with immunosuppressive molecules on oral mesenchymal stem cells from human gingival fibroblasts. The American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, USA, 2008年12月13-18日

国内学会

1. 菅原俊二, (シンポジウム、免疫制御の科学) 口腔粘膜疾患発症の分子機構とその制御. 第62回日本口腔科学会学術集会(福岡)2008年4月17、18日
2. 佐藤恭子、黒石智誠、菅原由美子、笹野高嗣、菅原俊二, IL-18 Tgマウスにおける唾液腺の組織学的変化と浸潤リンパ球の解析. 第62回日本口腔科学会学術集会(福岡)2008年4月17、18日
3. 酒井梓、菅原由美子、黒石智誠、笹野高嗣、菅原俊二. シェーグレン症候群の唾液腺における病態発現にはIL-18とTh17が関与する. 第62回日本口腔科学会学術集会(福岡)2008年4月17、18日
4. 大泉文史、山口晃史、川村仁、黒石智誠、菅原俊二、遠藤康男. 骨吸収抑制薬 bisphosphonates (BP) による壊死作用：窒素含 BP (NBP) と窒素非含有 BP (non-NBP) の作用の違い. 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム(仙台)2007年5月19日
5. 大木(小澤)亜紀子、小峯健一、黒石智誠、小峯優美子、南 匠、島内英俊、菅原俊二. 歯周疾患における診断指標としての唾液中炎症性ラクトフェリン・ポリペプチド(「第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム優秀研究賞」受賞). 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム(仙台)2007年5月19日
6. 鈴木 淳、小川祐平、山田雄大、天野一字、田浦勝彦、井川恭子、丹田奈緒子、齋藤恵一、相田潤、渋谷芳郎、伊藤恵美、小峯健一、小坂 健、菅原俊二、小関健由. 安静時唾液と歯科疾患との関連性の解析. 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム(仙台)2007年5月19日
7. 酒井梓、菅原由美子、黒石智誠、笹野高嗣、菅原俊二. シェーグレン症候群

- の唾液腺における病態発現には IL-18 と Th17 が関与する。第 5 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007 年 5 月 19 日
8. 高橋春江、金原正敬、黒石智誠、高田春比古、佐々木啓一、菅原俊二、遠藤康男。マウスにおけるニッケルアレルギー：感作過程における各種微生物成分および炎症性物質の効果。第 5 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007 年 5 月 19 日
 9. 四釜洋介、島内英俊、高田春比古、菅原俊二、遠藤康男。Muramyl-dipeptide によるマウス組織における IL-1 β の産生：Endotoxin shock 増強効果との関連性。第 5 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007 年 5 月 19 日
 10. 金原正敬、黒石智誠、山本照子、菅原俊二、遠藤康男。マウスにおけるニッケルアレルギー：交差反応および LPS のニッケル濃度におよぼす効果。第 5 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007 年 5 月 19 日
 11. 田中志典、黒石智誠、菅原俊二、遠藤康男。LPS と好中球によりマウスに誘導されるアナフィラキシー様ショック。第 5 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007 年 5 月 19 日
 12. 黒石智誠、金原正敬、遠藤康男、菅原俊二。ビオチンによる金属アレルギー炎症の制御。第 5 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007 年 5 月 19 日
 13. 田中志典、黒石智誠、菅原俊二、遠藤康男。LPS と好中球によりマウスに誘導されるアナフィラキシー様ショック。第 53 回東北大学歯学会 (仙台) 2008 年 6 月 27 日
 14. 酒井 梓、菅原由美子、黒石智誠、笹野高嗣、菅原俊二。シェーグレン症候群の唾液腺における IL-18 と Th17 の関与。第 18 回日本口腔粘膜学会総会・学術集会 (東京) 2008 年 9 月 19、20 日
 15. 佐藤燕子、黒石智誠、田中志典、伊藤あゆみ、菅原由美子、笹野高嗣、菅原俊二。IL-18 Tg マウスにおける唾液腺の組織学的変化と自己抗体の解析。第 18 回日本口腔粘膜学会総会・学術集会 (東京) 2008 年 9 月 19、20 日
 16. 四釜洋介、島内英俊、菅原俊二、高田春比古、遠藤康男。Muramyl-dipeptide (MDP) による炎症性サイトカイン産生及びエンドトキシンショック増強効果とそのメカニズムの解析。第 50 回歯科基礎医学会学術大会 (東京) 2008 年 9 月 23~25 日
 17. 永井康裕、黒石智誠、白石大祐、大木亜紀子、菅原俊二。ヒト歯肉線維芽細胞からの間葉系幹細胞の樹立と共刺激分子の発現解析。第 50 回歯科基礎医学会学術大会 (東京) 2008 年 9 月 23~25 日
 18. 西岡貴志、黒石智誠、菅原由美子、田中志典、笹野高嗣、遠藤康男、菅原俊二。Keratin 5(K5)/IL-18 トランスジェニックマウスにおける唾液腺障害の発現と制御性 T 細胞の関与。第 50 回歯科基礎医学会学術大会 (東京) 2008 年 9 月 23~25 日
 19. 高橋春江、黒石智誠、菅原俊二、佐々木啓一、遠藤康男。歯科用レジンアレルギーモデルマウス作製の試み：アレルギー成立における H2O2 の効果。第 50 回歯科基礎医学会学術大会 (東京) 2008 年 9 月 23~25 日
 20. 木山朋美、土谷昌広、遠藤康男、西岡貴志、菅原俊二、渡辺 誠。咀嚼様運動によるマウス咬筋での IL-6 発現とその意義に関する考察。第 50 回歯科基礎医学会学術大会 (東京) 2008 年 9 月 23~25 日
 21. 大泉丈史、山口晃史、川村 仁、菅原

- 俊二、遠藤康男。窒素含有 bisphosphonates (NBPs) の壊死作用：グラム陰性菌細胞壁成分 lipopolysaccharide (LPS) による増強。第 50 回歯科基礎医学会学術大会（東京）2008 年 9 月 23～25 日
22. 田中志典、黒石智誠、遠藤康男、菅原俊二。LPS と好中球によりマウスに誘導されるアナフィラキシー様ショック。第 50 回歯科基礎医学会学術大会（東京）2008 年 9 月 23～25 日
23. 佐藤恭子、黒石智誠、田中志典、西岡貴志、菅原由美子、菅原俊二。IL-18 遺伝子導入マウスにおける唾液腺障害と自己抗体の解析。第 50 回歯科基礎医学会学術大会（東京）2008 年 9 月 23～25 日
24. 船山ひろみ、黄 玲、金原正敬、柴田健一郎、朝田芳信、菅原俊二、高田春比古、遠藤康男。マウスにおけるニッケルアレルギー：elicitation step における自然免疫の関与。第 50 回歯科基礎医学会学術大会（東京）2008 年 9 月 23～25 日
25. 金原正敬、黒石智誠、山本照子、菅原俊二、遠藤康男。マウスにおけるニッケルアレルギーとその交差反応における金属イオン濃度：LPS の効果。第 50 回歯科基礎医学会学術大会（東京）2008 年 9 月 23～25 日
26. 永井康裕、黒石智誠、大木亜紀子、菅原俊二。口腔間葉系幹細胞の制御性 T 細胞誘導。第 38 回日本免疫学会総会・学術集会（京都）2008 年 12 月 1～3 日
27. 佐藤恭子、黒石智誠、田中志典、星野友昭、西岡貴志、菅原由美子、菅原俊二。K5/IL-18 遺伝子導入マウスにおける唾液腺障害と自己抗体の解析。第 38 回日本免疫学会総会・学術集会（京都）2008 年 12 月 1～3 日
28. 四釜洋介、島内英俊、高田春比古、菅原俊二、遠藤康男。Muramyl-dipeptide (MDP) による炎症性サイトカイン産生及びエンドトキシンショック増強効果。第 38 回日本免疫学会総会・学術集会（京都）2008 年 12 月 1～3 日
29. 大木（小澤）亜紀子、島内英俊、菅原俊二。歯肉線維芽細胞における IL-15 発現の変動。第 38 回日本免疫学会総会・学術集会（京都）2008 年 12 月 1～3 日
30. 田中志典、永井康裕、黒石智誠、高田春比古、遠藤康男、菅原俊二。LPS と好中球によりマウスに誘導されるアナフィラキシー様ショック。第 38 回日本免疫学会総会・学術集会（京都）2008 年 12 月 1～3 日
31. 永井康裕。口腔粘膜の免疫寛容機構と舌下免疫療法。第 54 回東北大学歯学会（仙台）2009 年 2 月 27 日

H. 知的所有権の取得状況

該当無し

分担課題：マウス Ni アレルギーモデルの惹起相における自然免疫の役割

分担研究者：高田春比古 東北大学大学院 歯学研究科 口腔微生物学分野 教授

研究協力者：船山ひろみ 東北大学大学院 歯学研究科 口腔微生物学分野
黄 玲 東北大学大学院 歯学研究科 口腔分子制御学分野
金原正敬 東北大学大学院 歯学研究科 口腔分子制御学分野
柴田健一郎 北海道大学大学院 歯学研究科 口腔分子微生物学
遠藤康男 東北大学大学院 歯学研究科 口腔分子制御学分野

研究要旨

遠藤康男らによって開発されたマウス Ni アレルギーモデル(Sato *et al.*; *Clin Exp Allergy* 37:743-751, 2007) を使って、細菌関連自然免疫リガンドによる金属アレルギー反応惹起増強作用を検討した。その結果、Toll-like receptor (TLR)4 リガンドの *E. coli* LPS ばかりでなく NOD1 リガンドの FK565、NOD2 リガンドの MDP、更には歯周病原菌と目される *Porphyromonas gingivalis* ならびに *Prevotella intermedia* の LPS や *P. gingivalis* のリポペプチド(LP)にも明確な惹起反応増強作用が認められた。TLR2 KO マウスを供試する実験によって、*P. gingivalis* ならびに *P. intermedia* LPS は LP と同様に TLR2 依存的に作用することが証明された。

A. 研究目的

本研究班の遠藤康男らによって開発されたマウス Ni アレルギーモデル(Sato *et al.*; *Clin Exp Allergy* 37:743-751, 2007)は金属アレルギー成立機序の解明に資する動物モデルとして注目されている。アレルギー反応は感作相 priming (or sensitization) phase と惹起相 elicitation phase からなっている。遠藤らは内毒素性リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) が感作相で Ni アレルギーの成立を著しく促進するばかりでなく、惹起相の炎症反応も促進・増強することを報告している。本研究では、惹起相に着目して種々の菌体成分、特に歯周病関連細菌に特徴的な Toll-like receptor (TLR)2 リガンドの効果を解明しようとした。

B. 方法

NiCl₂ 溶液 (1 mM) と LPS (*Escherichia coli* O55:B5 由来、Sigma) 溶液の 1:1 混合液を BALB/c マウス (6-7 週齢雌) に腹腔内注射 (0.25 ml/mouse) し、10 日後に NiCl₂ 溶液とテスト標品の 1:1 混合液を耳介に皮内注射 (20 μl) して、以後その腫脹を測定した。なおテスト標

品として、*E. coli* LPS の他、*Prevotella intermedia* ATCC 25611 の LPS 画分、*Porphyromonas gingivalis* 381 の LPS 画分とリポペプチド画分、合成 MDP (NOD2 リガンド) ならびに FK565 (NOD1 リガンド) を供試した。また、TLR2 KO マウスを供試する実験も実施した。

C. 研究結果

① NiCl₂ 溶液と *E. coli* LPS を混じて腹腔内投与すると LPS の濃度 (0.04 -1 μg/ml) 依存的に耳介反応が増強された(図 1)。② NiCl₂ 溶液による惹起注射に先立って *E. coli* LPS を投与すると同時投与に比較して更に反応は増強された。特に 4 時間前投与が最強の作用を示した(図 2)。なお、LPS 後投与では増強作用は認められなかった。③ *P. intermedia* LPS 画分、*P. gingivalis* LPS 画分とリポペプチド(LP)画分、MDP および FK565 (各 100 μg/ml) も明確な増強作用を示した(図 3 と 4)。④ *P. intermedia* ならびに *P. gingivalis* 由来標品の作用は TLR2 KO マウスでは殆ど認められなくなったが、*E. coli* LPS は TLR2 KO マウスでも通常のマウスと同程度の作用を示した(図 5)。

D. 考察

①様々な菌体成分が惹起反応を増強することが証明された。実験成績から、TLR4 リガンド(*E. coli* LPS)に加えて、少なくともTLR2 リガンド(後述)、NOD1 ならびに NOD2 リガンドにも増強作用が認められた。②TLR2 KO マウスを供試した実験結果は、歯周病原細菌と目される *P. intermedia* ならびに *P. gingivalis* の LPS 画分が *P. gingivalis* のリポペプチド画分と同様に TLR2 依存的に作用していることを示している。この成績は、両菌 LPS 画分の作用が LPS そのものよりもむしろ混入したリポペプチドに起因することを示唆している。③歯周病が動脈硬化を始めとして様々な全身疾患を増悪するとの知見が集積している。その機序に歯周病関連菌の TLR2 活性化作用が係わるとの説が有力視されている。今回の成績は、歯周病関連菌の TLR2 活性化因子としてのリポペプチドの重要性を裏付ける成績といえる。

E. 結論

自然免疫を活性化する各種 TLR 系ならびに NOD 系リガンドが、マウス Ni アレルギーモデルの惹起反応を増強した。特に歯周病関連細菌の *P. intermedia* ならびに *P. gingivalis* の菌体成分では TLR2 リガンドのリポペプチドの重要性が示された。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

1. Uehara A, Naito M, Imamura T, Potempa J, Travis J, Nakayama K, Takada H (2008) Dual regulation of interleukin-8 production in human oral epithelial cells upon stimulation with gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *J Med Microbiol* 57(4):500-507.
2. Uehara A, Imamura T, Potempa J, Travis J, Takada H. (2008) Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* synergistically

induce the production of proinflammatory cytokines through protease-activated receptors with Toll-like receptor and NOD1/2 ligands in human monocytic cells. *Cell Microbiol* 10(5):1181-1189.

3. Uehara A, Takada H. (2008) Synergism between TLRs and NOD1/2 in oral epithelial cells. *J Dent Res* 87(7):682-686.
 4. Uehara A, Hirabayashi Y, Takada H. (2008) Antibodies to proteinase 3 prime human oral, lung, and kidney epithelial cells to secrete proinflammatory cytokines upon stimulation with agonists to various Toll-like receptors, NOD1, and NOD2. *Clin Vaccine Immunol* 15(7):1060-1066.
 5. Yano T, Mita S, Ohmori H, Oshima Y, Fujimoto Y, Ueda R, Takada H, Goldman WE, Fukase K, Silverman N, Yoshimori T, Kurata S. (2008) Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nat Immunol* 9(8):908-916.
 6. Nemoto E, Honda T, Kanaya S, Takada H, Shimauchi H. (2008) Expression of functional Toll-like receptors and nucleotide-binding oligomerization domain proteins in murine cementoblasts and their upregulation during cell differentiation. *J Periodont Res* 43(5):585-593.
 7. Natsuka M, Uehara A, Yang S, Echigo S, Takada H. (2008) A polymer-type water-soluble peptidoglycan exhibited both Toll-like receptor 2- and NOD2-agonistic activities, resulting in synergistic activation of human monocytic cells. *Innate Immunity* 14(5):298-308.
- ##### 2) 総説論文
1. 佐藤直毅 金原正敬 高橋春江 黄玲 船山ひろみ 黒石智誠 山本照子 佐々木啓一 高田春比古 菅原俊二 遠藤康男 (2008) ニッケルアレルギーの自然免疫を背景とした発症機序. 臨床免疫・アレルギー

2.学会発表

1. 青沼 智 上原亜希子 山本照子 高田春比古 : ヒト歯根膜細胞(PDL)の Toll-like receptor (TLR) 系分子および NOD1/NOD2 分子の発現とその機能 第50回歯科基礎医学学会総会 (東京) 2008.9.23-25.
J Oral Biosci 50(suppl):152, 2008.
2. 四釜洋介 島内英俊 菅原俊二 高田春比古 遠藤康男 : Muramyl-dipeptide (MDP)による炎症性サイトカイン産生及びエンドトキシンショック増強効果とそのメカニズムの解析 第50回歯科基礎医学学会総会 (東京) 2008.9.23-25.
J Oral Biosci 50(suppl):155, 2008.
3. 船山ひろみ 黄 玲 金原正敬 柴田健一郎 朝田芳信 菅原俊二 高田春比古 遠藤康男 : マウスにおけるニッケルアレルギー elicitation step における自然免疫の関与 第50回歯科基礎医学学会総会 (東京) 2008.9.23-25.
J Oral Biosci 50(suppl):205, 2008.
4. 青沼 智 上原亜希子 山本照子 高田春比古 : ヒト歯根膜細胞(PDL)の自然免疫系 Toll-like receptor (TLR) 系分子、NOD1 および NOD2 分子の発現とその機能 第14回日本エンドトキシン研究会(仙台) 2008.10.24-25.
プログラム・講演抄録集 36, 2008.
5. 佐藤 匡 遠藤康男 島内英俊 高田春比古 : NOD1 アゴニスト FK565 の鎮痛作用 第14回日本エンドトキシン研究会(仙台) 2008.10.24-25.
プログラム・講演抄録集 40, 2008.
6. Shikama Y, Shimauchi H, Takada H, Sugawara S, Endo Y.: Muramyl-dipeptide (MDP) augments LPS-induced pro-inflammatory cytokine productions and endotoxin-shock. 38th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Kyoto, 2008.
学術集会記録 38:153, 2008.12.1-3.
7. Tanaka Y, Nagai Y, Kuroishi T, Takada H, Endo Y.: Anaphylaxis-like shock induced by LPS plus anti-neutrophil antibodies in mice. 38th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Kyoto, 2008.12.1-3.
学術集会記録 38:255, 2008.
8. Sato T, Endo Y, Shimauchi H, Takada H: Analgesic effects of NOD1 and NOD2 agonists. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science, Sendai, 2009.1.15-16.
Program and Abstracts 62-63, 2009.
9. Tanaka Y, Nagai Y, Kuroishi T, Takada H, Endo Y, Sugawara S: Anaphylaxis-like shock induced by LPS plus anti-neutrophil antibodies in mice. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science, Sendai, 2009.1.15-16.
Program and Abstracts 63, 2009.
10. Shikama Y, Kuroishi T, Nagai Y, Shimauchi H, Takada H, Sugawara S, Endo Y.: Muramyl-dipeptide augments the actions of LPS via multiple fashions in mice. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science, Sendai, 2009.1.15-16.
Program and Abstracts 64, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

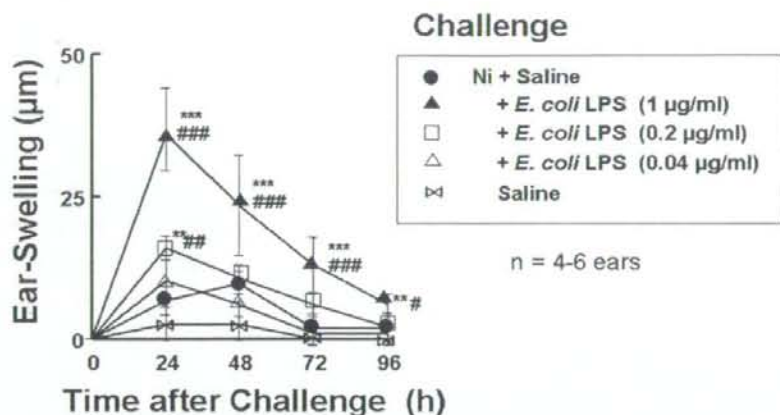


図1 *E. coli* LPS の耳介反応惹起増強作用(dose-response)

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. Saline
 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. Ni + Saline

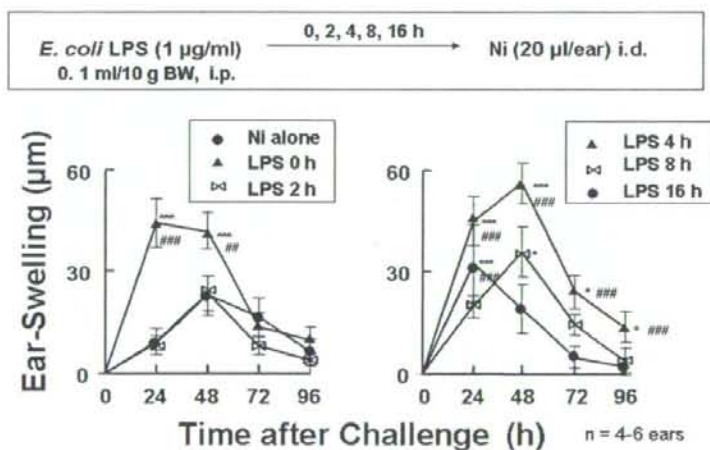


図2 *E. coli* LPS と Ni の投与間隔

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. Ni alone.
 ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. LPS 0 h.

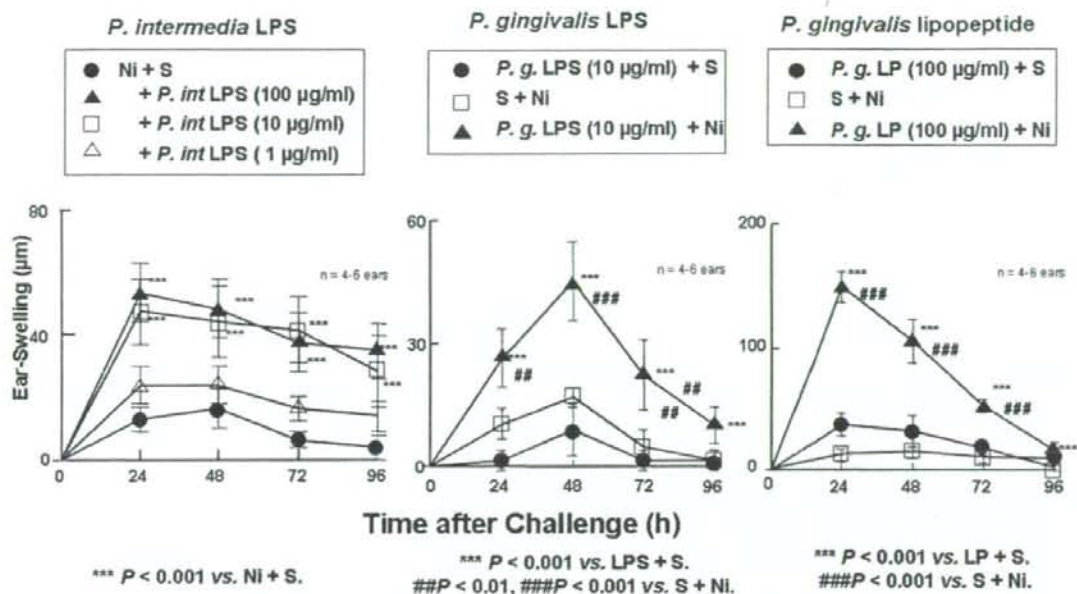


図3 歯周病関連細菌菌体成分の耳介反応惹起増強作用

LP: lipopeptide, S: saline

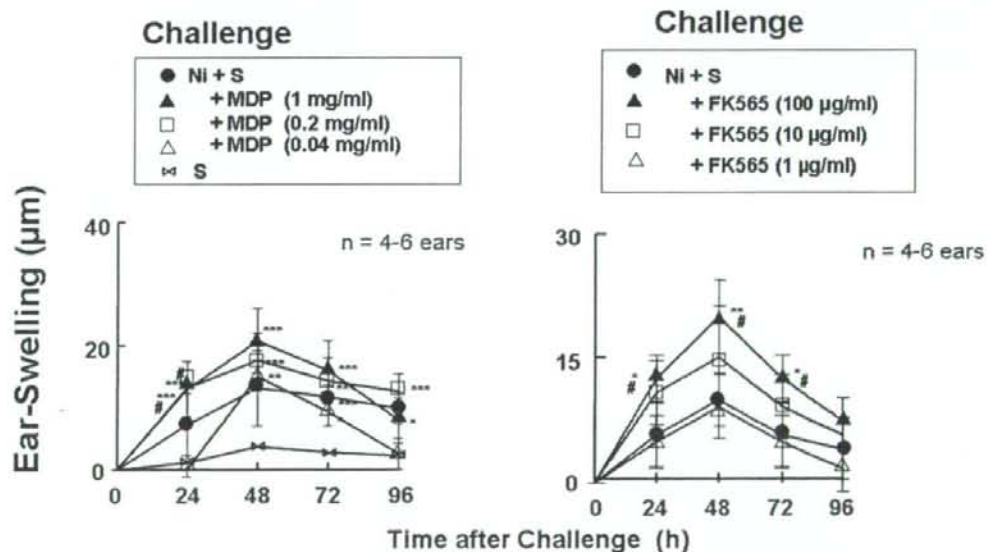


図4 MDPとFK565の耳介反応惹起増強作用

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. S. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, vs. Ni + S.

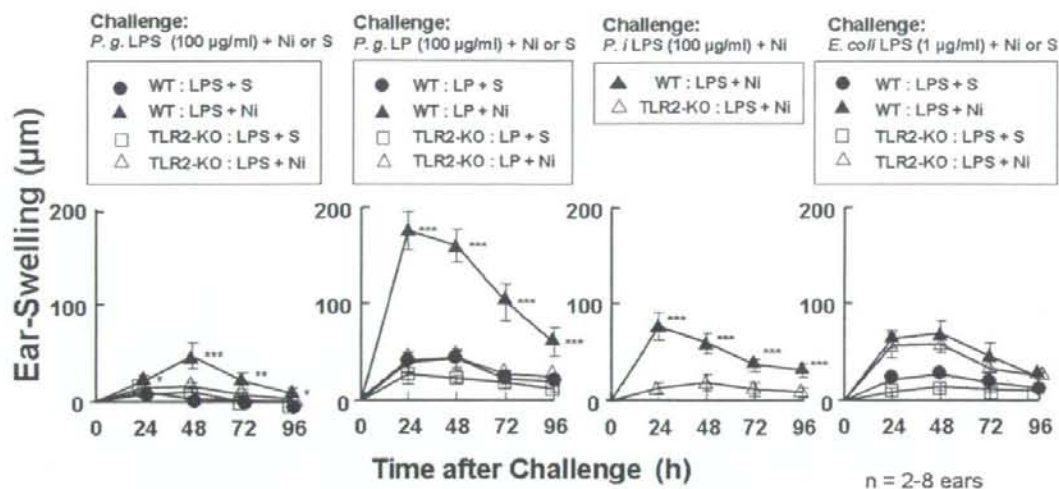


図5 TLR2 KO マウス (C57BL/6) での *P. gingivalis* LPS, *P. gingivalis* LPS および lipopeptide (LP), *P. intermedia* LPSならびに *E. coli* LPSの耳介反応惹起増強作用

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. WT: LPS or LP + Ni vs. TLR2 KO: LPS or LP + Ni.

分担課題：金属アレルギーでの微生物環境の重要性

分担研究者：遠藤康男 東北大学大学院歯学研究科 非常勤講師

研究協力者：金原正敏 東北大学大学院歯学研究科 大学院学生

高橋春江 東北大学大学院歯学研究科 大学院学生

研究要旨

私達はグラム陰性菌細胞壁成分のLPSがsensitization (S)とelicitation (E)の両ステップでNiなどの金属アレルギーの成立を著しく促進することを見いだした(Sato et al 2007; Clin Exp Allergy 37:743-751)。昨年一本年度で以下の結果を得た。(a) LPS以外にも、種々の微生物関連物質がSとEの両ステップでNi-allergyを促進し、炎症作用が極めて弱いマンナン(真菌成分)も、かなり強い効果を示す。(b) Ni+LPSで感作したマウスは、Niは勿論、Pd、Cr、Coのいずれとも交差反応し、それらの反応を誘導する最少濃度は、-LPSで 1×10^{-6} Mであるが、+LPS (*E. coli*)で $1 \times 10^{-14} \sim 10^{-12}$ Mであった。以上の結果は、感染や微生物成分が極めて重要な金属アレルギー促進因子であり、いったん感作が成立すると、極めて低い濃度で、Niのみならず、Ni以外の種々の金属イオンもアレルギー反応を誘導する可能性を示唆する。

A. 研究目的

金属アレルギーは通常のアレルゲンによる接触過敏症と同様に、T細胞主役の疾患と考えられており、研究の多くはヒト感作リンパ球を用いたin vitro実験で行われている。通常のアレルゲンは、パートナータンパク分子と共有結合して非可逆的複合体を形成して抗原になるのに対し、金属イオンはパートナータンパクと“可逆的”な配位結合により抗原複合体を形成する。従って、抗原プロセッシングも含め、金属アレルギーでの抗原認識機構は単純ではなく、パートナー分子の同定も含め、解決すべき多くの問題が残されている。アレルギー反応はsensitization(感作)とelicitation(炎症惹起)の2つのステップからなる。私達はLPS(グラム陰性菌細胞壁成分)が両ステップでNiアレルギーの成立を著しく促進することを見だし、このモデルをNi(+LPS)-allergyと呼んでいる(Sato et al 2007; Clin Exp Allergy 37:743-751)。Ni(+LPS)-allergyはヌードマウ

スやSCIDマウスでも起る。昨年度は以下を明らかにした。(a) Ni + LPSで感作したマウスは、Pd、Cr、Co、Cu、Agに対して交差反応を示し、Pd、Cr、Ag、Cuは本来の抗原であるNiと同等かむしろ強い炎症を誘導する。(b) Elicitationステップでアレルギー炎症を誘導する最少Ni濃度は、-LPSで μM レベル(1×10^{-6} M)であるが、+LPSではpMレベル(1×10^{-12} M)であった(Table 1)。

Ni concentration (M)			
Sensitization		Elicitation	
-LPS	+LPS	-LPS	+LPS
1×10^{-2}	1×10^{-5}	1×10^{-6}	1×10^{-12}
1 / 1,000		1 / 1,000,000	

Table 1. Niアレルギーを誘導する最少有効Ni濃度におよぼすLPSの効果。LPSはNiに対する感受性を、sensitization stepでは1,000倍、elicitation stepでは1,000,000倍に充満する。

これらの知見は、金属アレルギー促進要因とし

で感染が極めて重要であることを意味している。本年度は①グラム陰性菌以外の微生物成分の効果、また、②交差反応における各金属イオンの濃度におよぼす LPS の効果を検討した。

B. 方法

NiCl₂ 溶液 + 微生物関連物質溶液 (1:1 混合液) をマウス腹腔内注射し、10 日後、試験金属塩溶液 + 微生物関連物質溶液 (1:1 混合液) を耳介に皮内注 (20 μl) して、以後その腫脹を測定した。テスト標品として、*E. coli* LPS、*P. intermedia* LPS 画分、*P. gingivalis* の LPS 画分とリポペプチド画分、合成 MDP (NOD2 リガンド)、FK565 (NOD1 リガンド)、mannan (真菌成分) などを検討した (Table 2)。

C. 研究結果

(a) 上記の微生物関連物質はいずれも sensitization と elicitation の両ステップで Ni-allergy を促進した (elicitation での効果の詳細については分担研究者の高田が報告)。とくにそれ自体の炎症作用が極めて弱いマンナンが、かなり強いアジュバント効果をもつことが注目された (Table 2)。

被験物質	最少有効濃度 (μg/ml)
LPS	
<i>Escherichia coli</i>	TLR4-ligand 0.01
<i>Prevotella intermedia</i>	TLR4-ligand + TLR2-ligand? 0.01
Pam3Cys-SKKKK	synthetic TLR2-ligand 10
Mannan	TLR4-ligand and/or TLR2-ligand 10
Poly I:C	TLR3-ligand 1,000
<i>Propionibacterium acnes</i>	heat-killed gram(+) bacterium >1,000
MDP	NOD-2-ligand 1,000
Biophosphonates	
Alendronate	chemical substance (IL-1-producing) 200
Zoledronate	chemical substance (IL-1-producing) 100
Concanavalin A	T cell mitogen (IL-1-producing) 1,000

Table 1. Sensitization ステップで Ni アレルギー促進効果を示す細菌および関連物質の最少有効濃度。種々の濃度の被験物質と NiCl₂ (1 mM) の等量混 合液 (0.25 ml) を BALB/c マウス腹腔に注射し、10 日後、NiCl₂ (5 mM) 20 μl を耳介に皮内注射 (challenge) した。Challenge 後の耳での腫脹反応をもとに被験物質の最少有効濃度を求めた。

(b) Ni+LPS 感作マウスは、Pd、Cr、Co のいずれとも交差反応し、交差反応を示すそれらの最少濃度は、-LPS で 1×10^{-6} M、+LPS (*E. coli*) では、 $1 \times 10^{-14} \sim -12$ M であった (Fig. 1 および 2)。

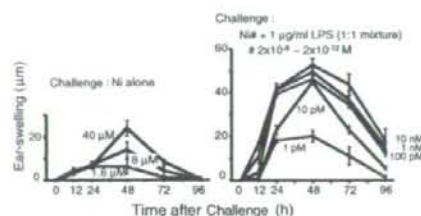


Fig. 1. Elicitation step での Ni 濃度とそれにおよぼす LPS の効果。最少有効 Ni 濃度は -LPS で 1×10^{-6} M (mM) + LPS で 1×10^{-12} M (pM)

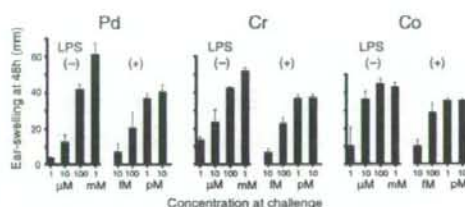


Fig. 2. 各種金属との交差反応とそれにおよぼす LPS の効果。Ni+LPS 感作マウスは Pd, Cr, Co のいずれとも交差反応し、これらの最少濃度は -LPS で 1×10^{-6} M + LPS で $1 \times 10^{-14} \sim 10^{-12}$ M

D. 考察

本研究において、LPS 存在下での金属アレルギーの交差反応はかなり広く、かつ、極めて低濃度 ($1 \times 10^{-14} \sim -12$ M) で起るという結果を得た。これがヒト金属アレルギーにおいても事実であるとすれば、金属アレルギーの診断や治療を考える上で極めて重要である。現行パッチテストの条件の見直しも必要になると思われる。ただし、上記の研究結果は市販 (和光純薬) の金属塩 (純度 95-99%) を用いて得られた実験結果である。そのため、使用した金属塩に他の金属などの微量混入を否定できず、またマウスモデルとヒトの病態との類似性の確認も必要である。早急な結論は危険であるため、今後は超高純度の金属塩を用いた確認が必要であると考える。幸い、いくつかの金属については 99.999% の試料が入手可能であるため、これらを用いた再確認を行う予定である。

E. 結論

高純度の試薬を用いた確認が必要ではある

が、以上の結果は、感染や微生物成分が極めて重要な金属アレルギー促進因子であること、また、いったん感作が成立すると、極めて低い濃度で、Ni はもちろん、Ni 以外の種々の金属イオンもアレルギー反応を誘導することを示唆する。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

1. Kuroishi T, Endo Y, Muramoto K, Shunji Sugawara. Biotin deficiency up-regulates TNF- α production in murine macrophages. *J Leukocyte Biol* 2008;83:912-920.
2. Oizum T, Yamaguchi K, Funayama H, Kuroishi T, Kawamura H, Sugawara S, Endo Y. Necrotic Actions of Nitrogen-Containing Bisphosphonates (NBPs) and Their Inhibition by Clodronate (a non-NBP) in Mice: Potential for Utilization of Clodronate as a Combination Drug with an NBP. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* (in press)
3. Deng X, Tamai R, Endo Y, Kiyoura Y. Alendronate augments interleukin-1 β release from macrophages infected with periodontal pathogenic bacteria through activation of caspase-1. *Toxicol Appl Pharmacol*. (in press)

2) 総説論文

1. ニッケルアレルギーの自然免疫を背景とした発症機序. 佐藤直毅, 金原正敬, 高橋春江, 黄玲, 船山ひろみ, 黒石智誠, 山本照子, 佐々木啓一, 高田春比古, 菅原俊二, 遠藤康男. 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) 2008;50(5):618-624.

3) 他

3. 酵素ハンドブック (第3版) 八木達彦
他編集, 執筆分担, 朝倉書店 (2008) (分担執筆)

2. 学会発表

1. 田中志典, 黒石智誠, 菅原俊二, 遠藤康男. LPS と好中球によりマウスに誘導されるアナフィラキシー様ショック. 東北歯学会 2008. 6. 27, 仙台
2. 大泉丈史, 山口晃史, 川村仁, 菅原俊二, 遠藤康男. 窒素含有 bisphosphonates (NBPs) の壊死作用: グラム陰性菌細胞壁成 lipopolysaccharide (LPS) による増強. 歯科基礎医学会 2008. 9. 23-25, 東京
3. 山口晃史, 大泉丈史, 遠藤康男. 骨粗鬆症患者における bisphosphonates (BPs) による顎骨壊死: 進行阻止と骨吸収抑制維持の試み. 歯科基礎医学会 2008. 9. 23-25, 東京
4. 四釜洋介, 島内英俊, 高田春比古, 菅原俊二, 遠藤康男, Muramyl-dipeptide (MDP) による炎症性サイトカイン産生及びエンドトキシンショック増強効果とそのメカニズムの解析. 歯科基礎医学会 2008. 9. 23-25, 東京
5. 金原正敬, 黒石智誠, 山本照子, 菅原俊二, 遠藤康男. マウスにおけるニッケルアレルギーとその交差反応における金属イオン濃度: LPS の効果. 歯科基礎医学会 2008. 9. 23-25, 東京
6. 船山ひろみ, 黄玲, 金原正敬, 柴田健一郎, 菅原俊二, 高田春比古, 遠藤康男. マウスにおけるニッケルアレルギー: elicitation step における自然免疫の関与. 歯科基礎医学会 2008. 9. 23-25, 東京
7. 高橋春江, 黒石智誠, 菅原俊二, 佐々木

- 啓一, 遠藤康男. 歯科用レジニアレルギーモデルマウス作製の試み: アレルギー成立における H_2O_2 の効果. 歯科基礎医学会 2008.9.23-25, 東京
8. 木山朋美, 土谷昌広, 西岡貴志, 渡辺誠, 遠藤康男, 菅原俊二. 持続的咀嚼様運動によるマウス咬筋での IL-6 発現. 歯科基礎医学会 2008, 9, 23-25, 東京
9. Takahashi H, Kinbara M, Kuroishi T, Takada H, Sasaki K, Sugawara S, Endo Y. Nickel allergy in mice: effects of microbial milieu or inflammation on its priming phase (Kim-Jim Symposium). The Korean Institute of Metals and Materials 2008 Fall Conference. 2008.9.23-24, 韓国 (仁川)
10. 佐藤匡, 遠藤康男, 島内英俊, 高田春比古. NOD1 アゴニスト FK565 の鎮痛作用. 日本エンドトキシン研究会. 2008.10.24-25, 仙台
11. 金原正敬, 遠藤康男. マウスにおけるニッケルアレルギー: 自然免疫系の関与. 薬物活性シンポジウム/日本ヒスタミン学会, 2008.10.23-25, 徳島
12. 大泉丈史, 山口晃史, 船山ひろみ, 川村仁, 菅原俊二, 遠藤康男. Bisphosphonates (BPs) の炎症・壊死作用: マウスでの基礎研究に基づく発症機序および予防・治療に関する提案. 日本骨代謝学会, Bisphosphonate-update 2008.10.29-31, 大阪
13. 山口晃史, 大泉丈史, 遠藤康男. 骨粗鬆症患者における窒素含有 bisphosphonate (NBP) による顎骨壊死: 進行阻止と骨吸収抑制維持を目指した etidronate (non-NBP) への切り換えの試み. 日本骨代謝学会 2008.10.29-31, 大阪
14. 大泉丈史, 山口晃史, 遠藤康男. 窒素含有 bisphosphonates (NBPs) の壊死作用: グラム陰性菌細胞壁成分 lipopolysaccharide (LPS) による増強. 日本骨代謝学会 2008.10.29-31, 大阪
15. Tanaka Y, Nagai Y, Kuroushi T, Takada H, Endo Y, Sugawara S. Anaphylaxis-like shock induced by LPS plus anti-neutrophil antibodies in mice. 日本免疫学会 2008.12.1-3, 京都
16. Deng X, Tamai R, Endo Y, Kiyoura Y. Alendronate augments oral bacteria-induced IL-1 β production by macrophages through caspase-1 activation. 日本免疫学会 2008.12.1-3, 京都
17. Shikama Y, Shimauchi H, Takada H, Sugawara S, Endo Y. Muramyl-dipeptide (MDP) augments LPS-induced pro-inflammatory cytokine productions and endotoxin-shock. 日本免疫学会 2008.12.1-3, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無

分担課題：金属アレルギーの新しい診断技術開発に向けた工学的アプローチ HDC レポーター動物の作製

分担研究者：大津 浩 東北大学大学院工学研究科 応用量子医工学分野 教授

研究協力者：平澤 典保 東北大学大学院薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野 教授

成島 尚之 東北大学大学院工学研究科 医用材料工学分野 教授

研究要旨

1) 金属アレルギーが発症する最初のステップとして、金属のイオン化による溶出がある。溶出した金属の濃度を定量的に測定できるシステムがあると診断や重症度および治療効果、予後の判定などに大いに役立つ。そこで、ICP-AES 法および X 線回折法、SEM-EDX 法を用いて生体中に溶出したイオン化金属の量、金属表面の元素の状態、金属表面の性状について検討した。その結果、ICP-AES 法にて Ni イオンは容易に溶出すること、SEM-EDX 法にて生体内物質の Ni 表面への付着あるいは浸潤がみられ、X 線回折法にて金属表面の酸化はほとんどないことが判明した。2) また、アレルギー発症の際にヒスタミンが産生されるため、ヒスタミンの産生細胞をモニターするためにその合成酵素のレポーター動物を作製中である。当初プラスミッドを使ったトランスジェニックマウスの作製を試みたが、ヒスタミン産生細胞以外の細胞も蛍光発光を認めたため、BAC(bacterial artificial chromosome)を使ったトランスジェニックマウスを作製することとした。今後、1)臨床的に良く使われる金属そのものでイオン化、表面性状の変化を観察し、2)BAC を用いたレポーターマウスやレポーターフィッシュの作製を行なう予定である。

A. 研究目的

1. 金属アレルギーは汗、唾液などの体液によってイオン化した金属が体内に取り込まれることによって開始すると考えられている。取り込まれた金属は体内のたんぱく質と結合し、これによって生体内が感作され、再び同じ金属が体内に入ってタンパク質と結合すると皮膚や粘膜を破壊することが金属アレルギーのメカニズムと考えられている。従って、溶出した金属の濃度を定量的に測定できるシステムがあると診断や重症度および治療効果、予後の判定などに大いに役立つため、工学的な機器開発の現状と問題点について検討を進めていこうと考えている。

2. ヒスタジン脱炭酸酵素は、生体内における唯一のヒスタミン合成酵素であり、金属による炎症反応においてその遺伝子の発現が誘導されることが示されている(遠藤論文)。この遺伝子のプロモーターによってコントロールされる

ように蛍光蛋白遺伝子を繋ぎ、トランスジェニック動物を作製し、ヒスタミンの産生細胞が金属アレルギーのどのような相のどの場所に存在するかについて、研究するつもりである。

B. 方法

1) 金属ワイヤーの Maus への植え込み実験
Maus の背部皮下に直径 0.8mm 長さ 5mm の種々の金属性のワイヤーを植え込み、その後経時的に Maus を処理し、金属周辺における組織の変化の観察や溶出金属の測定を行なう。炎症反応を惹起させると、金属特異的に血漿成分の漏出や組織の壊死などがおきるので、エバンスブルーによる血漿成分漏出反応の程度や、組織に対する毒性の程度を観察する。本年度は Ni の植え込みを中心に観察する。

2) 溶出金属イオンおよび金属表面の分析

ICP-AES 法