

厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
分担研究報告書

分担課題：マウス金属アレルギーモデルを用いた金属アレルギー特異的 T 細胞解析

分担研究者 小笠原 康悦 東北大学加齢医学研究所 加齢生体防御学研究分野 教授
国立国際医療センター研究所 地域保健医療研究部 特任研究員

研究協力者 笹月 健彦 国立国際医療センター 名誉総長
中山 勝文 東北大学加齢医学研究所 加齢生体防御学研究分野 助教
川野 光子 東北大学加齢医学研究所 加齢生体防御学研究分野 非常勤講師

研究要旨

金属アレルギーは T 細胞依存性の IV 型（遅延型）アレルギー反応であると考えられているが、その分子機構は不明のままである。我々は、当研究班で開発した金属アレルギーマウスモデルを用い、金属暴露と養子移入を繰り返すことで、アレルギー特異的な T 細胞を濃縮し、エフェクター細胞の同定を試みた。また、高濃度の金属を投与した際に見られる炎症と、金属アレルギーを誘導した際に見られる炎症について組織化学的な解析を行い、その違いを明らかにした。移入を繰り返したマウス耳介に金属を投与し、24 時間後のマウス耳介を比較したところ、金属アレルギーを誘導した場合には T 細胞の浸潤が明らかに認められたのに対し、金属による炎症を誘導したマウス耳介においては、好中球の著しい浸潤が認められた。耳介への T 細胞の浸潤をフローサイトメトリーにより解析したところ、金属アレルギー誘導マウスにおいて、CD4+T 細胞および CD8+T 細胞の両方の細胞の浸潤が確認された。さらに IFN- γ がアレルギーの発症に関与するののかについて追究した。IFN- γ ノックアウトマウスに金属アレルギーを誘導したところ、ノックアウトマウスでは明らかに耳介の腫脹が軽減されており、金属アレルギーの発症が抑制された。また、耳介への T 細胞の浸潤をフローサイトメトリーにより解析したところ、IFN- γ ノックアウトマウスでは明らかに T 細胞の割合が低下しており、金属アレルギーの発症段階において IFN- γ の関与が示唆された。

A. 研究目的

金属アレルギーは、遅延型過敏反応とされ T 細胞主体のアレルギー反応とされている。我々は、金属アレルギーマウスモデルを用いて、金属アレルギーの病態、発症における分子の変化を時系列的に解析し、新規診断、予防、治療法の開発を目指すことを目的としている。前回、金属アレルギーの発症により変化する T 細胞集団を報告した。今回エフェクター細胞としてアレルギー発症部位に浸潤している T 細胞を検出するべく、蛍光免疫染色を行った。また、IFN- γ KO マウスを用いてパラジウム (Pd) アレルギーの発症について検討した。

B. 方法

- 1) 蛍光免疫染色
金属アレルギーを誘導後 24 時間のマウスの耳介を採取、未固定のまま freeze block を作製し、クライオスタットにより 10 μ m にて薄切、-80°C に保存した。染色時に冷アセトンにて固定後、blocking を行い、蛍光標識抗体にて染色、DAPI にて counter staining 後、観察を行った。
- 2) IFN- γ KO マウスを用いた Pd アレルギーの誘導
IFN- γ KO マウス (6 wks) に PdCl₂/LPS を感作し、7 日後に耳介に PdCl₂ を challenge してアレルギーの誘導を行った。ポジティブコントロールとして C57BL/6

マウスに同様に感作・challengeを行った。アレルギー誘導後、24時間ごとに96時間まで耳介の腫脹測定を行うと共に、24時間目の耳介・脾臓・顎下リンパ節を採取し、FACSにより解析した。

C. 結果

- 1) Pdアレルギーを発症したマウスの耳介切片において、T細胞の明らかな集積が認められた。これは、フローサイトメトリーの結果と同様であった。また、Pdアレルギーを誘導した際、フローサイトメトリーにてV α 、V β のTCRは検出できたものの定量化までは至らなかった。
- 2) IFN- γ KOマウスにPdで感作・誘導を行ったが、耳介の腫脹は認められなかった。

D. 考察

- 1) アレルギーを起こしている耳介の蛍光免疫染色によりCD4+T細胞、CD8+T細胞の集積が確認されたことから、PdアレルギーにおいてT細胞が重要な役割を担っていると考えられる。
- 2) IFN- γ KOマウスではPdアレルギーが起こらないことから、最終的な耳介の腫脹にはIFN- γ が関わっていることが考えられる。

E. 結論

- 1) PdアレルギーではCD4+T細胞、CD8+T細胞とも重要である。
- 2) Pdアレルギーにおいて、アレルギー誘導部位における炎症には、IFN- γ が関与している。

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. Honda T, Nakajima S, Egawa G, Malissen B,

Ogasawara K, Miyachi Y, Kabashima K. Compensatory role of Langerhans cells and Langerin positive dermal dendritic cells in the sensitization phase of mouse contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* (in press)

2. Mori T, Ishida K, Mukumoto S, Yamada Y, Imokawa G, Kabashima K, Kobayashi M, Bito T, Nakamura M, Ogasawara K, Tokura Y : Comparison of skin barrier function and sensory nerve electric current perception threshold between IgE-high extrinsic and IgE-normal intrinsic types of atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* (in press).
3. Mitsuko Kawano, Junkyu Han, Mohamed Elyes Kchouk and Hiroko Isoda: Hair growth regulation by the extract of aromatic plant *Erica multiflora*. *J. Nat. Med.* 63: 335-339 (2009)
4. Talorete TPN, Limam A, Kawano M, Ben Rejeb Jenhani A, Ghrabi A, Isoda H. (2008) Stress response of mammalian cells incubated with landfill leachate. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 27: 1084-1092
5. Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, Yagita H, Okumura K. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation *Blood.* 113, 3821-3830 (2009)

2) 総説論文、著書

なし

2. 学会発表

国外学会

なし

国内学会

1. Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Ogasawara K. CD8 α ⁺ CD α use Tim-3 for phagocytosis of dying cells and

cross-presentation. The 39th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Osaka, Dec. 2009.

2. Kawano M, Takeda K, Nakayama M, Kumagai K, Kobayashi H, Suzuki R, Ogasawara K. Increased specific T cells in the inflammation are of the metal allergy. The 39th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Osaka, Dec. 2009.

H.知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1：金属アレルギーによる炎症
HE染色

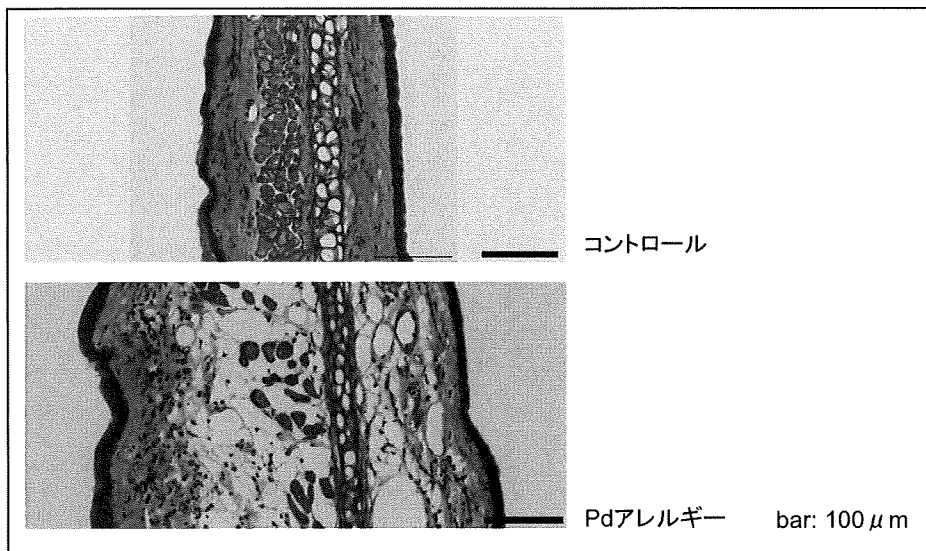


図2：金属による炎症
HE染色

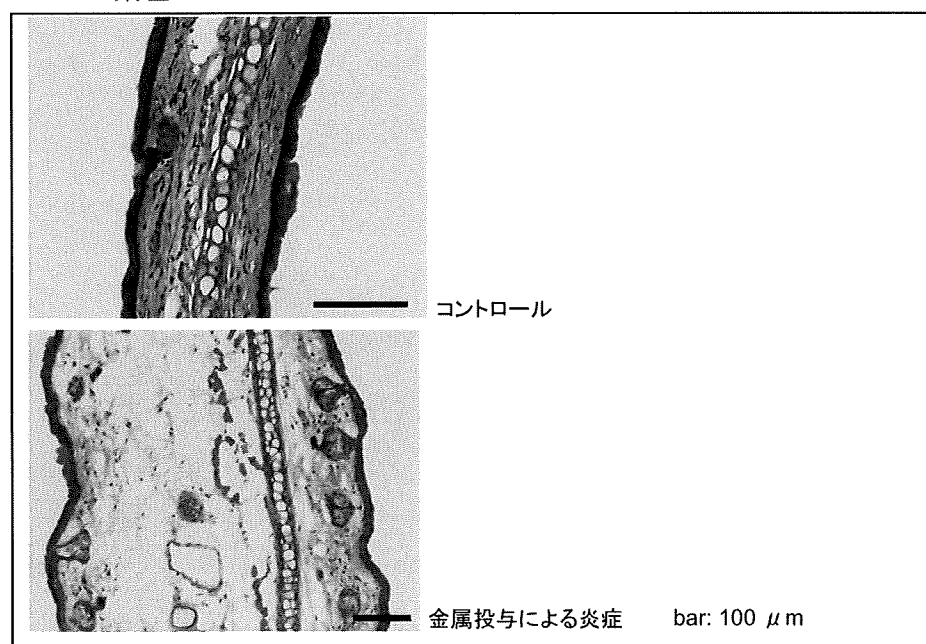


図3：金属アレルギー誘導マウス耳介へのT細胞浸潤

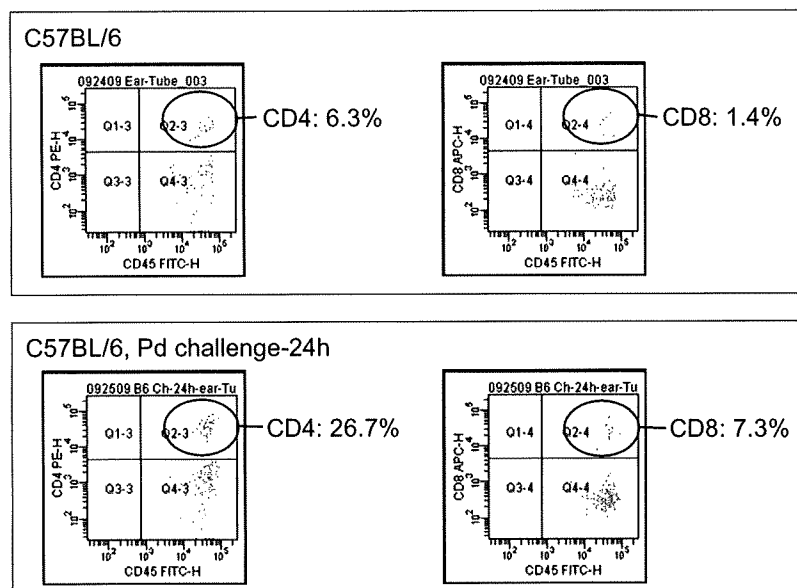


図4：IFN- γ ノックアウトマウスへの金属アレルギーの誘導

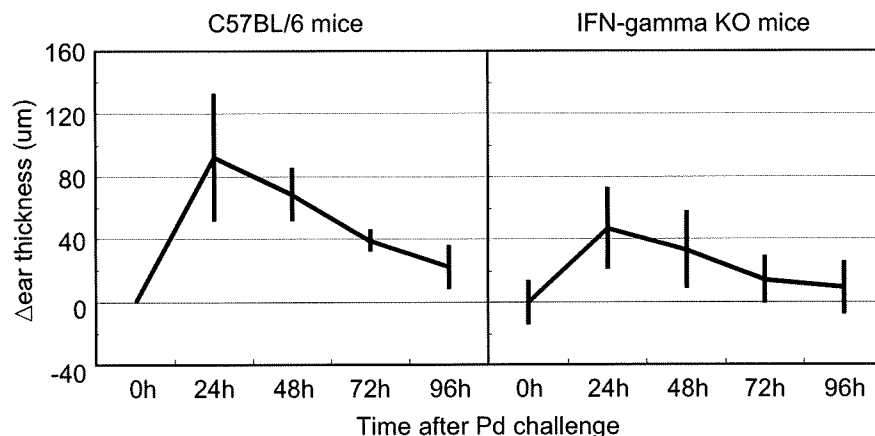
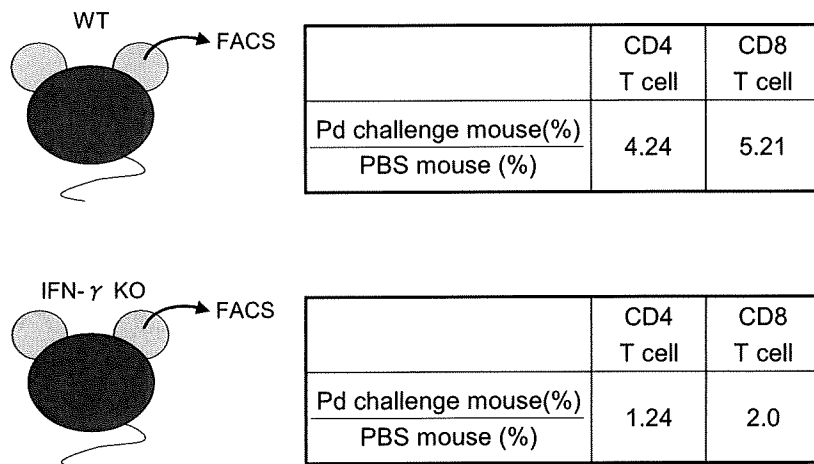


図5：IFN- γ ノックアウトマウス耳介へのT細胞の浸潤



厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
分担研究報告書

分担課題：金属アレルギー発症モデルマウスにおける網羅的T細胞レセプター解析

分担研究者：鈴木 隆二 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 診断治療研究室 室長

研究協力者：熊谷 賢一 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 研究員
鶴見大学歯学部 口腔外科学第一講座 大学院生

小林 浩 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 研究員
鶴見大学歯学部 口腔外科学第一講座 大学院生

江口 貴紀 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 研究員
鶴見大学歯学部 口腔外科学第一講座 大学院生

研究要旨：本研究では金属アレルギーの病因論に基づいた新たな診断および治療法の開発の端緒となることを目的としており、本研究班が作製した金属アレルギー発症モデルマウスを用いてアレルギー反応における獲得免疫機構、即ち病変部に浸潤するT細胞の動態を検証する。その実験手法として、モデルマウスの病変部および所属リンパ節に浸潤するT細胞の受容体(TCR)網羅的レパトア解析ならびに定量PCR法を用いた遺伝子発現の解析を行った。網羅的TCRレパトア解析の結果より、モデルマウスの炎症局所には、所属リンパ節と同じTCR V α 遺伝子を持つeffector T細胞が誘導されていた。また、定量PCR法においても金属アレルギー炎症局所においてIL-4およびIFN- γ の高発現、Fas分子を介したアポトーシスがT細胞によって誘導されており、アレルギー炎症局所でCD8およびTh1 CD4陽性T細胞による細胞障害性遅延型過敏反応が発生していることが明らかになった。本網羅的TCRレパトア解析を用いることで、これまで困難であった金属アレルギーの発症機序に関わる免疫応答の解明および診断治療体系の開発に大きく貢献する可能性が示唆された。

A. 研究目的

金属アレルギーは、口腔粘膜に直接接触する歯科用金属材料や皮膚に直接触れるピアスや腕時計などの金属製装飾品に含まれる金属が原因となり様々なアレルギー症状を引き起こす疾患として知られているが、生体内の免疫系が修飾された金属抗原をどのように認識して応答しているか不明であり、金属アレルギーの病因論に基づいた診断、治療法の確立が急務とされている。

これまでの基礎的研究により、金属をマウスに多量に投与することで自己免疫疾患を引き起こすことが知られており(Vas J *et al*, J Immunol, 2008)、金属による免疫系の攪乱は

未だ解明されていない。そのため、特異性および交差性を含めた金属に対する生体反応の解明にはモデルマウスを用いた免疫応答の詳細な検討が必要であると考えられる。

本研究では、金属アレルギーが発症した状態での獲得免疫機構、すなわち病変部および所属リンパ節に浸潤するT細胞の動態に着目し、「T細胞の活性化を端緒とした免疫応答が金属アレルギー発症に関与している」という仮説のもとに、本研究班で作製した金属アレルギー発症モデルマウス(Sato N *et al*, Clin Exp Allergy, 2007)の所属リンパ節をヌードマウスに養子移入を繰り返すことで、高効率なエフェクターT細胞の純化を促し、金属に特異

的に反応しているエフェクターT細胞の動態をT細胞受容体(TCR)の見地から解明していくことを目的とした。

B. 研究方法

1) 金属アレルギーモデルマウスの作製

本研究班で作製した金属アレルギーモデルマウスより所属リンパ節を摘出し、single cellに調整後、BALB/c nu-nu マウスへ i.v. により移入した。続いて金属暴露および養子移入を繰り返し、エフェクターT細胞の濃縮が行われた状態で再度耳介部への金属感作を行い、感作24時間後の耳介部、顎下リンパ節、脾臓の各組織を採取した。

2) TCR 遺伝子発現頻度ライブラリーの構築

2-a) TCR レパトア解析：各組織から抽出した total RNA をサンプルとして、cDNA を合成した後、adaptor を付加した。次いで消化酵素処理により adaptor 付加 cDNA を適当な形にし、adaptor および TCR 定常領域にそれぞれ相補的なプライマーセットを用いて nested PCR を行った。これにより、全ての TCR をコードする遺伝子を同一条件下で特異的に増幅した。得られた PCR 産物を全ての TCRV α ファミリーおよび TCRV β ファミリーにそれぞれ相補的なオリゴ DNA を固層化したマイクロプレートに播種してハイブリダイズさせた後、酵素反応を用いて発色させ吸光度の測定を行った。得られた吸光度から各 TCR V ファミリーの存在率を算出することにより、mRNA レベルにおける各組織浸潤 T 細胞の TCR V ファミリーの偏在性を検討することが可能となる。(図 1 A)

2-b) T細胞 clonality および CDR3 シークエンス解析：金属アレルギーモデルマウスにおける TCR レパトアに偏りが見られた場合には、CDR3 size spectratyping (Matsutani T. *et al*, Hum Immunol, 1997) によりフラグメント解析を行い、T細胞の clonality を確認する。さらに各 TCR 遺伝子を TA-cloning 法によりプラスミドにクローニングし、塩基配列を解析す

ることにより CDR3 シークエンスレベルの発現頻度の解析を行った。これにより、金属アレルギーの各組織浸潤 T 細胞における TCR 遺伝子発現頻度をライブラリーとして構築することが出来る。(図 1 B)

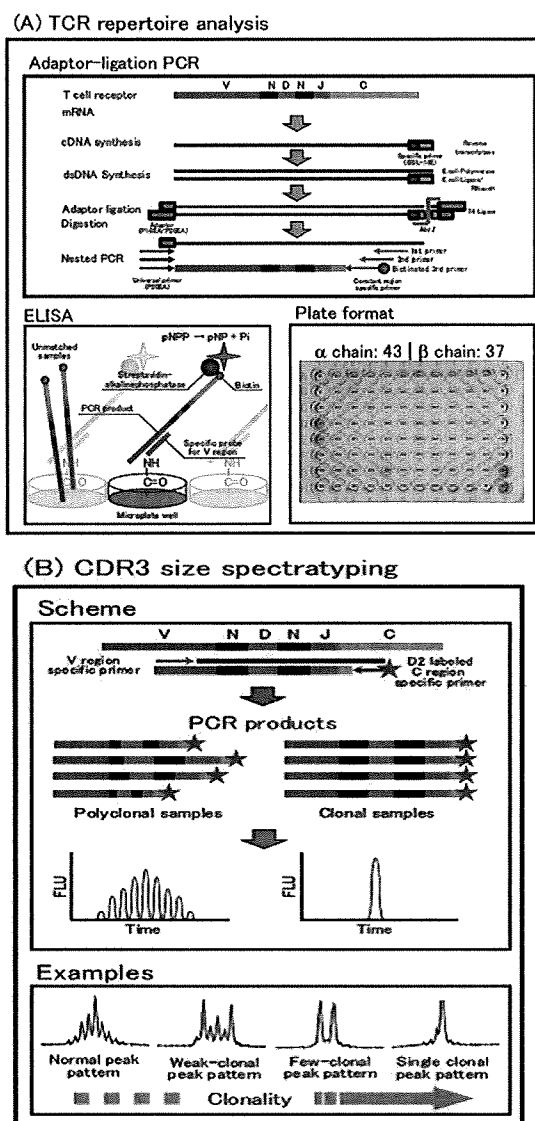


図 1. 網羅的 TCR レパトア解析系

3) 定量的 PCR によるサイトカインの定量

RNA 安定化試薬に保存した組織から RNA を抽出し cDNA を合成した後、適切なプライマーを用いて TNF- α 、INF- γ 、IL-4、IL-5 などのサイトカイン mRNA 発現量の定量を real-time PCR 法により実施した。定量評価としては内部標準として GAPDH を用いて遺伝子発現量の補正を行った。

(倫理面への配慮)

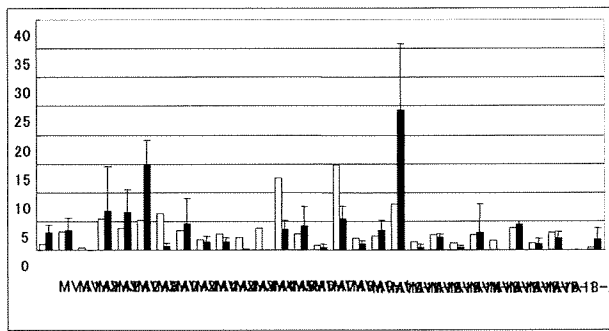
本研究における動物実験の生命倫理・安全対策に対する取り組みに関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律（平成 17 年法律第 68 号）」による「実験動物の使用及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成 18 年度環境省告示第 88 号）」及び文部科学省が策定した「研究機関等における動物実験等の実施に関する基準（平成 18 年 6 月 1 日告示）」に基づき、日本学術会議が作成した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（平成 18 年 6 月 1 日通知）」を踏まえて、国立病院機構 相模原病院臨床研究センターで定めた「動物実験管理運営規定」を遵守して行った。

組換え DNA 実験に関しては、独立行政法人国立病院機構相模原病院においては遺伝子組換え実験計画書を独立行政法人国立病院機構相模原病院遺伝子組換え実験案委員会に提出し、承認を得て、「独立行政法人国立病院機構相模原病院遺伝子組換え実験案全実施規則」に従って実施した。

C. 研究結果

(1) TCR レパトア解析

・ TCR V α 鎖については特定の V α が炎症局所に誘導されていたが、V β 鎖に関しては金属特異的な family の高発現は認められなかった。



(a) 耳介部における TCR V α 鎖 レパトア

(2) 定量 PCR 法による解析

・ T 細胞が存在しないヌードマウスに養子移入を繰り返すことで、アレルギー炎症局所の

耳介部に CD3・CD4・CD8 陽性の各 subset の T 細胞が発現してきており、effector T 細胞の誘導が確認された。

・ 移入に伴って移入により炎症局所の耳介部では、IL-4・IFN- γ ともに発現量が増加し Th1 へのシフトが認められること（図 2）から、Th1 の遅延型過敏反応が耳介部で起きていることが明らかになった。

・ 移入後の耳介部で TNF α および Fas の発現が増加しており、炎症局所でのアポトーシスが誘導されていた。

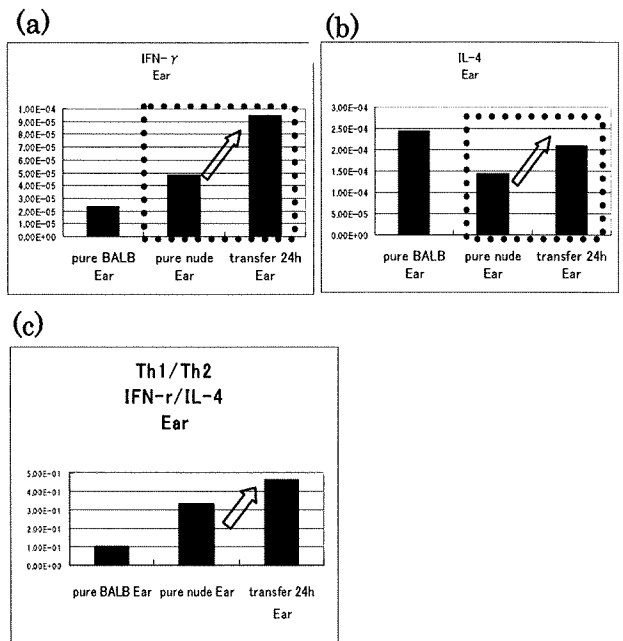


図 2. Balb/c マウス、ヌードマウス、および移入 24 時間後ヌードマウスの耳介部における Th1/Th2 産生サイトカイン発現量

D. 考察

養子移入を繰り返したヌードマウスの耳介部組織中に、所属リンパ節と同じ TCR クローンを持つエフェクター T 細胞が認められたことより、金属による感作で特異的な T 細胞が耳介部に誘導されていると考えられた。さらに、IL-4 および IFN- γ の高発現、Fas 分子を介したアポトーシスが T 細胞によって誘導されていることから CD8 および Th1CD4 陽性 T 細胞による細胞障害性遅延型過敏反応が起こっているが明らかになった。

E. 結論

ヌードマウスへの移入を繰り返すことにより、金属を認識しているエフェクターT細胞が濃縮され、また本研究で用いた網羅的TCRレパトア解析によりT細胞の金属への直接の認識には特定のTCR V α が関与していると考えられた。本解析法を用いることで、これまで困難であった金属アレルギーの発症機序に関わる免疫応答の解明および診断治療体系の開発に大きく貢献する可能性が示唆された。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

Kumagai K, Hamada Y, A. Holmlund, Gotoh A, Nakaoka K, Arai Go, Yamane S, Suzuki R. The levels of vascular endothelial growth factor in the synovial fluid correlated with the severity of arthroscopically observed synovitis and clinical outcome after temporomandibular joint irrigation in patients with chronic closed lock. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 (in press)

Kitaura K, Kanayama K, Fujii Y, Shiobara N, Tanaka K, Kurane I, Suzuki S, Itoh T, Suzuki R. T cell receptor repertoire in BALB/c mice varies according to tissue type, sex, age, and hydrocortisone treatment. Exp Anim. 2009 Apr;58(2):159-68.

Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R. The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in

LIGHT-mediated inflammatory bone destruction. Immunology. 2009 Sep;128(1Suppl):e315-24.

Gotoh A, Hamada Y, Shiobara N, Kumagai K, Seto K, Horikawa T, Suzuki R. Polyclonal expansion of T cells bearing restricted T cell receptor repertoires in lesions of oral lichen planus without hepatitis C virus infection. Clin Exp Immunol. 154(2):192-201 2008

Hamada Y, Holmlund AB, Kondoh T, Nakaoka K, Sekiya H, Shiobara N, Gotoh A, Kumagai K, Suzuki R, Seto K. Severity of arthroscopically observed pathology and levels of inflammatory cytokines in the synovial fluid before and after visually guided temporomandibular joint irrigation correlated with the clinical outcome in patients with chronic closed lock. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 106 (3): 343-349, 2008.

Tanaka K, Horikawa T, Suzuki S, Kitaura K, Watanabe J, Gotoh A, Shiobara N, Itoh T, Yamane S, Suzuki R, Fukui N, Ochi T. Inhibition of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 reduces the severity of collagen-induced arthritis. J Rheumatol. 2008 ;35(12):2316-24.

Ishida S, Yamane S, Ochi T, Nakano S, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Suzuki R. LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor. J Rheumatol. 2008 ;35(6):960-8.

Yamane N, Tanaka Y, Ohayabu N, Yamane S,

Maekawa K, Ishizaki J, Suzuki R, Itoh T, Takemoto H.

Characterization of novel non-peptide thrombopoietin mimetics, their species specificity and the activation mechanism of the thrombopoietin receptor. Eur J Pharmacol. 2008 31;586(1-3):44-51.

Fujii Y, Kitaura K, Nakamichi K, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I.

Accumulation of T-cells with selected T-cell receptors in the brains of Japanese encephalitis virus-infected mice. Jpn J Infect Dis. 2008 ;61(1):40-8.

Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Masuda R, Tanaka K, Shiobara N, Yamane N, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R.

Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients
Journal of Inflammation 2008 Apr 27;5:5

Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Tanaka N, Hikita A, Mitomi H, Mori T, Juji T, Katsuragawa Y, Yamamoto S, Sawabe M, Yamane S, Suzuki R, Sandell LJ, Ochi T.

Regional differences in chondrocyte metabolism in osteoarthritis: a detailed analysis by laser capture microdissection. Arthritis Rheum. 2008 ;58(1):154-63.

Shiobara N, Suzuki Y, Aoki H, Gotoh A, Fujii Y, Hamada Y, Suzuki S, Fukui N, Kurane I, Itoh T, Suzuki R.

Bacterial superantigens and T cell receptor beta-chain-bearing T cells in the immunopathogenesis of ulcerative colitis. Clin Exp Immunol. 2007 ;150(1):13-21.

Matsutani T, Ohmori T, Ogata M, Soga H, Kasahara S, Yoshioka T, Suzuki R, Itoh T. Comparison of CDR3 length among thymocyte subpopulations: impacts of MHC and BV segment on the CDR3 shortening. Mol Immunol. 2007 Mar;44(9):2378-87.

2. 学会発表

国内学会

川野光子、武田加奈、中山勝文、熊谷賢一、小林浩、鈴木隆二、小笠原康悦

金属アレルギー炎症部位における特異的 T 細胞の増加

第 39 回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）
2009. 12. 2-4

藤井克樹、北浦一孝、鈴木さつき、松谷隆治、高崎智彦、伊藤恒敏、倉根一郎、鈴木隆二

コモンマーモセット T 細胞受容体 α 鎖および β 鎖配列の網羅的解析

第 39 回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）
2009. 12. 2-4

熊谷賢一、濱田良樹、後藤哲人、川口浩司、堀江彰久、山田浩之、金井郁代、池谷進、石田璃久磨、瀬戸暎一、鈴木隆二

口腔癌リンパ節転移における網羅的 T 細胞レセプター解析

第 53 日本口腔外科学会総会（徳島）
2008. 10. 20-21

後藤哲人、濱田良樹、熊谷賢一、小早川元博、亀井和利、齋藤知之、瀬戸暎一、鈴木隆二

口腔扁平苔癬における特異的な TCR レパトアを有する T 細胞のポリクローナル様増殖

第 53 日本口腔外科学会総会（徳島）
2008. 10. 20-21

亀井和利、濱田良樹、堀江彰久、後藤哲人、熊谷賢一、近藤壽郎、瀬戸暎一。

関節突起骨折患者の上関節腔鏡視所見と滑液中の炎症性サイトカイン量

第 52 回日本口腔外科学会総会（名古屋）
2007. 9. 29-30

濱田良樹、近藤壽郎、斎藤知之、中岡一敏、
堀江彰久、熊谷賢一、後藤哲人、瀬戸皖一。
慢性顎関節クローズドロックに対する顎関節
有視下洗浄療法の予後に関連する関節鏡視所
見ならびに炎症性サイトカインの検索
第 20 回日本顎関節学会総会・学術大会（仙
台）2007. 7. 14-15

熊谷賢一、濱田良樹、後藤哲人、斎藤知之、
中岡一敏、堀江彰久、瀬戸皖一。
慢性顎関節クローズドロックに対する顎関節
洗浄療法の治療成績と滑液中における血管内
皮細胞増殖因子（VEGF）含有量の変化との関
連性
第 20 回日本顎関節学会総会・学術大会（仙
台）2007. 7. 14-15

海外学会

Kumagai K, Hamada Y, Kobayashi H, Gotoh A,
Yamada H, Kawaguchi K, Horie A, Suzuki R.
T Cell Receptor Analysis of Lymph Node

Metastasis in Head and Neck Squamous Cell
Carcinoma

AAOMS 91st Annual Meeting and Scientific
Session in conjunction with the Canadian
Association of Oral and Maxillofacial
Surgeons, Toronto, CANADA October 15-17
2009

Kamei K, Hamada Y, Horie A, Goto A, Kumagai
K, Kondoh T,
Seto K.

Arthroscopic findings and inflammatory
cytokine levels in the synovial fluid of
the superior joint compartment in patients
with condyle fracture.

AAOMS 89th Annual Meeting and Scientific
Session in conjunction with JSOMS and KAOMS,
Honolulu, USA October 8-14 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当せず

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

金属イオンの情報を含む MHC-ペプチド複合体を細胞表面に発現する抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示することが金属アレルギー発症の重要なステップとして位置付けられているが、いまだ不明な点が多い。我々の研究班が開発した金属アレルギー発症マウスモデル系では、金属塩と LPS の混合液をマウスの腹腔内に投与することにより、10 日間で金属アレルギーを感作することができる。さらに、我々は *in vitro* で金属塩と LPS を処理した骨髄由来樹状細胞 (DC) をマウスに移入することで、同様に金属アレルギーを感作できることを以前の班会議で報告した。本研究は、*in vitro* で金属塩と LPS を処理した骨髄由来 DC が金属アレルギーを誘発するメカニズムを明らかにすることにより、金属アレルギーの感作機構や金属アレルギーの発症における自然免疫の役割を解明することが目的である。本年度は、金属アレルギーの感作成立における DC 移入の時間的影響、DC の局所移入による感作成立の有無、及び DC 移入により活性化される T 細胞の局在について検討を行った。その結果、従来の金属イオンと LPS の混合液を腹腔内に投与する方法と比較して、金属イオンと LPS を処理した DC を移入した場合には、感作がより早期に成立することがわかった。また、DC の局所移入では、移入した局所に限定的に感作が成立すること、さらに、DC 移入により顎下リンパ節において金属イオンと反応する T 細胞が生じる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ニッケルや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、金属イオンの情報を持つ MHC-ペプチド複合体の 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 TLR リガンドの存在下で著しく増大することがわかっている。このように、TLR を介した抗原提示細胞の活性化が金属アレルギーの発症に関与することが示唆されるが、金属アレルギーのモデル動

物が存在しなかったことから、不明な点が多いのが現状である。我々の研究班が開発した金属アレルギー発症マウスモデル系では、金属塩と LPS (TLR4 リガンド) の混合液をマウスの腹腔内に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。さらに、我々は *in vitro* で金属塩と LPS を処理した骨髄由来樹状細胞 (DC) をマウスに移入することで、同様に金属アレルギーを感作できることを明らかにしている (図 1)。本研究は、*in vitro* で金属塩と LPS を処理した DC が金属アレルギーを誘発するメカニズムを明らかにすることにより、金属アレルギーの感作機構や金属アレルギーの発症における自然免疫の役割を解明することを目的とする。

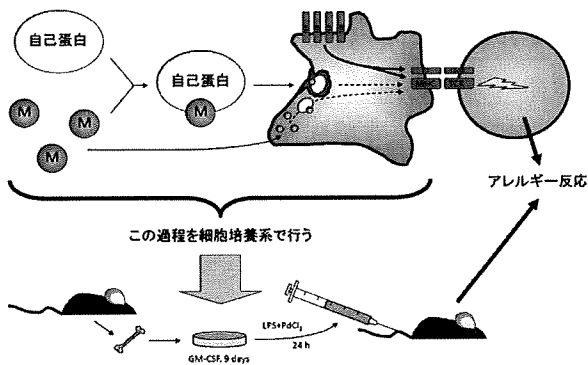


図 1. 金属塩+LPS 処理 DC の移入による金属アレルギーの感作法。

B. 研究方法

1) 骨髄由来樹状細胞 (DC) の調製

C57BL/6 マウス (7 週齢雌) 又は C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)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) DC 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 DC を PdCl₂ (0.2 mM)、または PdCl₂ + LPS (20 ng/ml) で 24 時間処理した。対照の DC には PBS を処理した。これらの細胞を培地で 3 回洗浄して PdCl₂ 及び LPS を除去した後、5x10⁵ 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 PdCl₂ 溶液 (1 mM) 15 μl をマウスの耳介に皮内注射し、以後耳の腫脹を 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。また、DC の耳介への移入による感作実験では、2x10⁵ 個の DC を右耳の耳介に皮内注射し、その 10 日後に PdCl₂ 溶液をマウスの両耳の耳介に皮内注射して、以後その腫脹を 24 時間おきに 3 日間測定した。

3) DC 移入マウスのリンパ節細胞を用いた金属アレルギーの発症とその評価

PBS 処理 DC または PdCl₂ + LPS 処理 DC を移入して 10 日後のマウスの顎下リンパ節を採取し、5x10⁵ 個のリンパ節細胞を非感作 B6 マウスに尾静脈注射により移入し、24 時間後に 1 mM PdCl₂ 溶液 15 μl をマウスの耳介に皮内注射して、以後その腫脹を 24 時間おきに 3 日間測定した。

C. 研究結果

1) DC 移入による感作成立に要する時間

我々の研究班が開発した金属アレルギーマウスモデルにおいて、PdCl₂ + LPS 混合液の腹腔内投与による金属アレルギーの感作成立には約 10 日間を要する。そこで、PdCl₂ + LPS 処理 DC の移入による感作成立にどれくらいの期間を要するのかを検討した。その結果、骨髄由来 DC 移入の翌日に challenge した場合、PBS 処理 DC 移入群と Pd+LPS 処理 DC 移入群との間に差は見られなかった。一方、DC 移入の 3 日後に challenge した場合、Pd+LPS 処理 DC 移入群で腫脹が見られるようになり、この腫脹は移入の 7 日後及び 10 日後に challenge した場合にさらに増大した (図 2)。

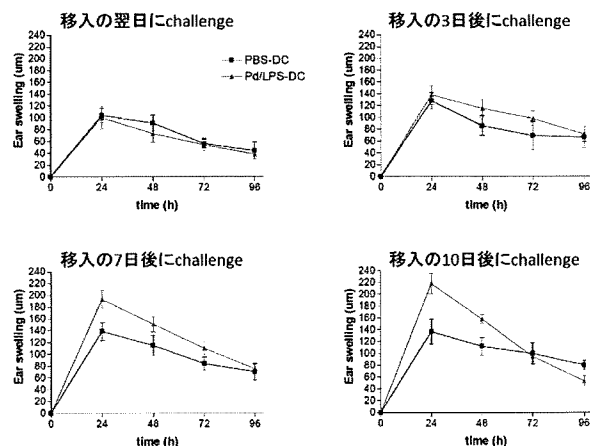


図 2. 金属塩+LPS 処理 DC の移入と感作に要する時間の検討。■, PBS 処理 DC 移入群; ▲, PdCl₂+LPS 処理 DC 移入群。

2) DC の局所移入による感作成立について

DC を尾静脈注射により移入した場合、両方の耳介でアレルギー反応が誘導されるが、DC を

局所的に移入した場合ではどうかを次に検討した。PdCl₂ + LPS 処理 DC を右耳の耳介に移入し、その 10 日後に両耳の耳介に PdCl₂ 溶液を処理したところ、DC を移入した右耳の腫脹は、PBS 処理 DC 移入群と比較して Pd+LPS 処理 DC 移入群で優位な差が認められた。一方、DC を移入しなかった左耳の腫脹に関しては、両者の間に優位な差は認められなかった (図 3)。

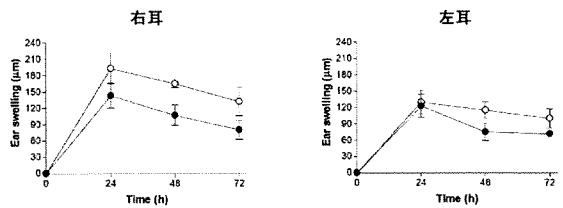


図 3. DC の局所移入による金属アレルギーの感作成立。●, PBS 処理 DC 移入群; ○, PdCl₂+LPS 処理 DC 移入群。

3) DC 移入により活性化される T 細胞の局在の検討

PdCl₂ + LPS 処理 DC の静脈内移入及び局所移入の両方において、金属アレルギー反応が感作されることがわかったが、それぞれの移入法により感作される T 細胞の局在に違いがあるか否かを調べる方法として、PdCl₂ + LPS 処理 DC を移入したマウスの各リンパ組織から T 細胞を回収し、それを非感作マウスに移入した際に見られるアレルギー反応の大きさを測定する実験系を考案し、この方法が実際にうまくいくか否かを検討した (図 4)。

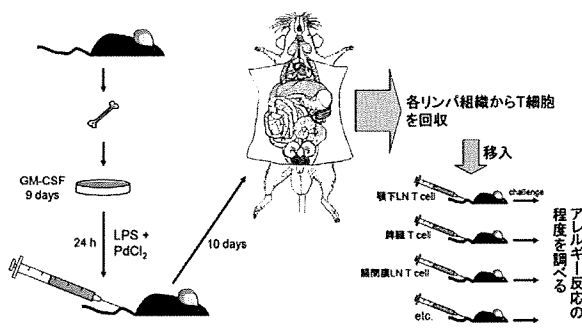


図 4. 金属イオンに反応する T 細胞の局在を調べる方法。

すなわち、DC 移入感作マウスの顎下リンパ節 (耳介の一番近くに存在するリンパ組織) 内の細胞を非感作マウスへ移入した際に、アレルギー反応が起こるか否かを調べた。その結果、PBS 処理 DC を移入したマウスの顎下リンパ節細胞を移入したマウスと比較して Pd+LPS 処理 DC を移入したマウスの顎下リンパ節細胞を移入した群で優位な腫脹の差が認められた。従って、少なくとも、DC 移入により顎下リンパ節内に金属イオンと反応する T 細胞が生じる可能性が示唆された (図 5)。

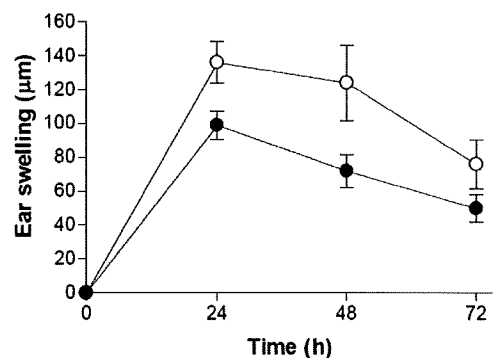


図 5. DC 移入マウスの顎下リンパ節細胞を移入したマウスにおける金属アレルギーの発症。●, PBS 処理 DC 移入マウスの顎下リンパ節細胞を移入したマウス群; ○, PdCl₂+LPS 処理 DC 移入マウスの顎下リンパ節細胞を移入したマウス群。

D. 考察

従来の金属アレルギーモデルマウス系では、感作成立に PdCl₂+LPS の混合液投与から 10 日を要したが、PdCl₂+LPS を処理した骨髄由来 DC を移入した場合には、移入後 3 日目に感作成立が確認された。従って、DC を移入した場合には従来の感作方法よりも速やかに感作が成立することが示唆された。遠藤らの報告によると、金属塩と LPS の混合液を腹腔内ではなく耳介に皮内投与した際にも感作が成立することが示されているが、DC の局所移入の場合にも感作は成立するが、それは局所に限定さ

れ全身性の感作は成立しないことが示唆された。

また、PdCl₂+LPS 処理 DC を移入したマウスの顎下リンパ節細胞を移入すると金属アレルギーが誘導されたことから、PdCl₂+LPS 処理 DC は移入後顎下リンパ節へ移動し、そこで T 細胞に金属イオンの情報を抗原提示することが示唆された。

E. 結論

PdCl₂+LPS で処理した骨髄由来 DC を移入した場合、従来のモデル系よりも早期に感作が成立する。また、DC の局所移入では、局所的に感作が成立する。さらに、DC 移入により、顎下リンパ節内に金属イオンと反応する T 細胞が生じる。

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. Horinouchi T, Asano H, Higa T, Nishimoto A, Nishiya T, Muramatsu I, Miwa S : Differential coupling of human endothelin type A receptor to Gq/11 and G12 proteins: the functional significance of receptor expression level in generating multiple receptor signaling. **J. Pharmacol. Sci.** 111(4), 338-351, 2009.
2. Nishimoto A, Lu L, Hayashi M, Nishiya T, Horinouchi T, and Miwa S : Jab1 regulates levels of endothelin type A and B receptors by promoting ubiquitination and degradation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 391, 1616-1622, 2010.

2) 総説論文

該当なし。

2. 学会発表

国外学会

38. Nishimoto A, Lu L, Hayashi M, Nishiya T, Horinouchi T, Miwa S : Regulation of cell surface endothelin type A receptor level by a novel receptor-interacting protein, JAB1 : The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009), Kyoto, 2009

国内学会

1. 比嘉綱己、堀之内孝広、朝野拓史、西本新、西屋禎、三輪聡一 : エンドセリン A 型受容体作動性 C a 2 + 流入に関する T R P C チャンネルの同定、第 23 回北海道薬物作用談話会、札幌、2009 年 7 月 11 日
2. 西本新、西屋禎、堀之内孝広、三輪聡一 : 受容体結合蛋白質 Jab1 によるエンドセリン受容体の発現レベル調節機構、第 60 回日本薬理学会北部会、富山、2009 年 9 月 26 日
3. 堀之内孝広、比嘉綱己、朝野拓史、西本新、西屋禎、三輪聡一 : 蛍光タンパク質構成法を用いたエンドセリン A 型受容体作動性 T R P C チャンネルの分子間相互作用の可視化、第 60 回日本薬理学会北部会、富山、2009 年 9 月 26 日
4. 三輪聡一、西本新、西屋禎、堀之内孝広 : 受容体結合蛋白質 Jab1 によるエンドセリン A 型受容体の発現レベル調節機構とその病態的意義、第 37 回薬物活性シンポジウム、仙台、2009 年 10 月 9~10 日
5. 堀之内孝広、比嘉綱己、朝野拓史、西本新、西屋禎、三輪聡一 : エンドセリン A 型受容体作動性 T R P C チャンネルの活性制御機構、第 37 回薬物活性シンポジウム、仙台、2009 年 10 月 9~10 日
6. Nishimoto A, Nishiya T, Horinouchi T, Miwa S : Jab1, an ET_AR-interacting protein, regulates ET_AR level by promoting its degradation、第 26 回国際心臓研究学会日本部会、札幌、2009 年 12 月 4~5 日
7. Horinouchi T, Asano H, Higa T, Nishimoto A, Nishiya T, Miwa S : Molecular analysis

of ET_AR-operated Ca²⁺ entry via TRPC channels and visualization of homo- and heterophilic TRPC3/6 interaction in living cells using BiFC、第 26 回国際心臓研究学会日本部会、札幌、2009 年 12 月 4～5 日

H.知的財産権の出願・登録状況
該当無し

厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
分担研究報告書

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

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) 金属アレルギー発症の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-MS法を用いて生体中に溶出したイオン化金属の量について検討した。マウスを用いた金属埋植モデルにおいて、炎症所見が明らかになる前に、Pd, Ag, Auなどの貴金属も溶出していることが判明した。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BAC(bacterial artificial chromosome)を使ったレポーター動物を作製している。3) マクロファージ細胞株をNiプレートの上で培養すると、細胞の存在部位に一致して、プレート表面に金属の溶出像が見られ、組織中における金属の溶出には細胞成分が必須であることが判明した。今後、1) 臨床的に良く使われる金属そのものでイオン化について測定し、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。3) 細胞が金属イオン溶出を促す機序についてさらに薬理的に明らかにする。

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、溶出した金属を定量的に測定できるシステムがあると診断や重症度、治療効果、予後の判定などに大いに役立つため、工学的な機器開発を進めていこうと考えている。

2. ヒスチジン脱炭酸酵素は、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。この遺伝子の発現制御を模倣すべく蛍光蛋白遺伝子を発現

するようにトランスジェニック動物を作製し、その動物に金属アレルギーを引き起こし、蛍光発光を観察することにより、ヒスタミンの産生細胞が金属アレルギー病態において、どの段階でどの場所に存在するかについて研究する。

B. 方法

1) 金属ワイヤーのマウスへの植え込み実験
マウスの背部皮下に直径 0.8mm 長さ 5mm の種々の金属性のワイヤーを植え込み、その後経時的にマウスを処理し、金属周辺における組織変化の観察や溶出金属イオンの測定を行なう。この際、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同時に観察する。本年度は Ni や Pd の植え込みを中心に観察する。また、炎症反

応の金属溶出に対する作用を明らかにするために、ワイヤーの近傍にLPS(Lipopolysaccharide)を注射しその後溶出する金属を測定した。

2) 皮膚組織の溶解

溶出金属の測定のために、皮膚組織の溶解が必要である。金属を持ち込まないために、セラミック製のはさみやピンセットを用いて、皮膚を摘出後 10 倍量の濃硝酸中で加温し、 H_2O_2 を加えてさらに過熱し皮膚組織を完全に溶解後、超純水で希釈してサンプルとした。

3) 溶出金属イオンおよび金属表面の分析

ICP-MS 法

Inductively coupled plasma mass spectrometry (誘導結合質量分光法) 放電を利用する溶液試料の質量分析法。高感度で多くの元素を同時定量ができるため急速に発展普及している。ICP 放電で生じたイオンを質量分析計と結合させきわめて高感度(数 pg/g)であり、今回の植え込み実験に使用した。

4) レポーター動物の作製

現在 BAC を利用したトランスジェニックマウスの作製に移行している。この目的のために BAC との相同組換えを起こすように、蛍光色素遺伝子の入った HDC 遺伝子のプラスミッドも構築完了した。近々相同組換えを予定している。またトランスジェニックフィッシュも作製する予定である。

C. 研究結果

1. 溶出金属イオンの測定法の開発

マウスの背部皮下に種々の金属を植え込み炎症反応を惹起させると、ニッケルに特異的に血漿成分の漏出や組織の壊死などがおきる。正常のマウス皮膚からは、Na, K, Ca, P, Mg, Zn, Fe, Mn が検出されたほか、Ti, Ni は微量ながら検出された。Pd, Co, Cr や Ni については正常皮膚での含量が低いため埋め込んだ金属からの溶出は測定可能であることが確認された。今回、実用金属である NiTi (形状記憶合金)、SUS316L (ステンレス)、Ag-Pd (銀パラ)などを植え込んだ結果、NiTi からは Ti

が、SUS316L からは Ni や Mo が、Ag-Pd からは Pd, Ag, Au, Cu が溶出してることが判明した。(図 1 参照)

2. レポーター動物の作製について

トランスジェニックマウス

HDC promoter+ZsGreen1.1 マウスは肥満細胞が発光するものの、その発光強度は弱く、非特異的な部位における発光も見られるため、金属アレルギー反応において使用に耐えるものであるかどうかには疑問がある。現在 BAC を用いた遺伝子導入について実験を開始し、プラスミッドの構築を終えた。今後、大腸菌内で相同組み換えを起こすことによって、BAC を改変しトランスジェニックマウスを作製する。

トランスジェニックフィッシュ

緑色の蛍光はゼブラフィッシュの場合、色素細胞の自家発光と重なってしまい、特異的な発光と非常に区別しにくいことがわかった。そのため、赤色の蛍光である mCherry という遺伝子を HDC promoter に繋いだプラスミッドをトランスジェニックしたフィッシュを作製したがフィッシュは躯間部の筋組織も発光し特異性に乏しかった。現在は、コンストラクト内に 1st Intron や 5' UTR も加えることによって、生体に近い反応を起こしうるトランスジェニックフィッシュも作製中である。

3. 細胞の金属プレート上での培養実験

マウスマクロファージの細胞株である RAW264 細胞を Ni プレートの上で培養すると、細胞の存在部位に一致して金属プレートの腐食が起きたことから、金属の溶出には細胞成分の存在が重要であると考えられた。さらにこの際の溶出機構に薬理学的な実験結果から、 Na^+-H^+ exchanger や V-ATPase や lysosome の細胞外への放出が重要であることが判明した。

D. 考察

1. 溶出金属イオンの測定法の開発

今回、生体内のしばしば用いられるステンレス鋼である SUS316L を植え込んだ周囲に Ni や Mo の溶出が測定され、臨床的には問題がないと考えられているステンレス鋼からも金属イオンの溶出があることが明らかになった。このことを含めて、炎症反応が組織学的に明らかでなくても既に金属溶出が起きており、特に今まで臨床的には問題ないと思われる「安全」な合金でも溶出反応があることから、生体内で金属の溶出を正確に評価することによって、金属アレルギー発症のメカニズムの研究や発症の予防に役に立つと考えられる。

2. HDC promoter-reporter 動物の作製

BAC を用いた新しいレポーターマウス作製は最終段階まで進んでいる。このマウスを用いた金属植え込み実験によって、ヒスタミン産生細胞が病態のどの時期に出現し、どのような種類の細胞であるかについて考察を深めることが出来るようになる。

また、ゼブラフィッシュにおいては 1st Intron や 5' UTR を含んだプラスミッドを用いたレポーターフィッシュの作製を目指す。

E. 結論

金属の溶出は局所の炎症が起きうる種類の金属ばかりではなく、従来「安全」と言われる金属にも溶出反応が起きていることが判明した。本実験系は金属アレルギーにおける安全な評価系であり、金属医用材料に関する重要な生体内評価系となると考えられる。生体反応が起きるより早期に溶出金属を測定できることは、今後の金属アレルギーの研究にとって大きく役立つ。

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. Seike M, Furuya K, Ohmura M, Watanabe K, Ohtsu H. Histamine H4 receptor antagonist ameliorates chronic allergic contact dermatitis induced by repeated challenge. **Allergy** in press
2. Hirasawa N, Goi Y, Tanaka R, Ishihara K, Ohtsu H, Ohuchi K. Involvement of prostaglandins and histamine in nickel wire-induced acute inflammation in mice. **Journal of Biomedical Materials Research Part A** in press
3. Carlos D, Fremont C, Samarina A, Vasseur V, Maillet I, Ramos SG, Erard F, Quesniaux V, Ohtsu H, Silva CL, Faccioli LH, Ryffel B. Histamine Plays an Essential Regulatory Role in Lung Inflammation and Protective Immunity in the Acute Phase of Mycobacterium tuberculosis Infection. **Infect Immun** in press
4. Shen Y, He P, Fan YY, Zhang JX, Yan HJ, Hu WW, Ohtsu H, Chen Z. Carnosine protects against permanent cerebral ischemia in histidine decarboxylase knock-out mice through reducing glutamate excitotoxicity. **Free Radic Biol Med**. 48, 727-735, 2010
5. Anacleto C, Parmentier R, Ouk K, Guidon G, Buda C, Sastre JP, Akaoka H, Sergeeva OA, Yanagisawa M, Ohtsu H, Franco P, Haas HL, Lin JS. Orexin/Hypocretin and Histamine: Distinct Roles in the Control of Wakefulness Demonstrated Using Knockout Mouse Models. **J Neurosci** 29, 14423-14438, 2009
6. Rajasekaran N, Solomon S, Watanabe T, Ohtsu H, Gajda M, Braeuer R, Illges H. Histidine decarboxylase but not histamine receptor 1 or 2 deficiency protects from K/BxN serum-induced Arthritis. **Int Immunol** 21, 1263-8, 2009
7. Carter M, Adamantidis A, Ohtsu H, Deisseroth K, de Lecea L. Sleep homeostasis modulates Hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. **J Neurosci** 29, 10939-49, 2009
8. Ishihara K, Goi Y, Hong JJ, Seyama T, Ohtsu H, Wada H, Ohuchi K, Hirasawa N. Effects of nickel on eosinophil survival. **Int Arch Allergy**

Immunol 149, 57-60, 2009

9. Beghdadi W, Porcherie A, S Schneider B, Dubayle D, Peronet R, Huerre M, Watanabe T, Ohtsu H, Louis J, Mécheri S. Role of histamine and histamine receptors in the pathogenesis of Malaria. **Med Sci (Paris)** 25, 377-381, 2009

10. Musio S, Pedotti P, Mantegazza R, Ohtsu H, Boon L, Steinman L, Galli SJ, Pedotti R. Anaphylaxis to a self-peptide in the absence of mast cells or histamine. **Lab Invest** 89, 398-405, 2009

11. Andou A, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kamada N, Kobayashi T, Hashimoto M, Okutsu T, Shimbo K, Takeda T, Matsumoto H, Sato A, Ohtsu H, Suzuki M, Hibi T. Dietary histidine ameliorates murine colitis by inhibition of pro-inflammatory cytokine production from macrophages. **Gastroenterol** 136, 567-574, 2009

12. Brabant C, Alleva L, Grisar T, Quertemont E, Lakaye B, Ohtsu H, Lin J-S, Jatlow P, Picciotto M, Tirelli E. The H₃ inverse agonist thioperamide potentiates cocaine-induced locomotion: role of the histaminergic system and potential pharmacokinetic effects **Psychopharmacology** 202, 673-687, 2009

13. Shiohara M, Shigemura T, Suzuki T, Tanaka M, Morii E, Ohtsu H, Shibahara S, Koike K. MITF-CM, a newly identified isoform of microphthalmia-associated transcription factor, is expressed in cultured mast cells. **Int J Lab Hematol** 31, 215-226, 2009

14. Leite-de-Moraes MC, Diem S, Michel ML, Ohtsu H, Thurmond RL, Schneider E, Dy M. Histamine receptor H4 Activation Positively Regulates *in vivo* IL-4 and IFN- γ Production by invariant natural killer T cells. **J Immunol** 182, 1233-1236, 2009

15. Yamauchi K, Piao HM, Nakadate T, Shikanai

T, Nakamura Y, Ito H, Mouri T, Kobayashi H, Maesawa C, Sawai T, Ohtsu H, Inoue H. Enhanced Goblet Cell Hyperplasia in HDC Knockout Mice with Allergic Airway Inflammation. **Allergology International** 58, 125-134, 2009

2)書籍

著書：Robin L. Thurmond(編者), **Histamine in inflammation** (タイトル), Landes Bioscience (出版社) Austen Texas, A chapter “Histamine synthesis and lessons learned from histidine decarboxylase deficient mice.” written by Hiroshi Ohtsu in press in November (ページはまだ不詳) (2010) May 1 出版

2.学会発表

1. Tanaka R, Goi Y, Ishihara K, Ueda K, Narushima T, Ohtsu H, Ohuchi K, Hirasawa N. Release of nickel from the implanted wire *in vivo* and enhancement by lipopolysaccharide. The 9th World Congress of Inflammation (Tokyo, 2009, July 6-10)

2. 田中里奈、五井嘉明、石原研治、上田恭介、成島尚之、大津浩、大内和雄、平澤典保。生体内における金属からのニッケル溶出の簡易測定法の確立と溶出機序の解析
日本薬学会第129年会(京都、2009年3月26-28日)

H.知的財産権の出願・登録状況
該当なし