

- 松永佳世子: Hevb6(プロヘベイン)により感作された職業性ラテックスアレルギーの1例. 第63回日本皮膚科学会西部支部学術大会
32. 太田理会、西村景子、佐野晶代、岩田洋平、矢上晶子、松永佳世子: 納豆(発行大豆)により遅発性アレルギーの一例. 第63回日本皮膚科学会西部支部学術大会
33. 松永佳世子: 女性であることを10倍楽しむには! ~実際の診療現場において~. 第6回BMW研究会.
34. 松永佳世子: 最近話題の皮膚アレルギー-茶のしずく石鹼による即時型小麦アレルギー, 接触皮膚炎2010の動向-. 第18回岐阜アレルギー疾患研究会.
35. 松永佳世子: 思いもよらぬ接触皮膚炎の原因. 第75回日本皮膚科学会東京支部学術大会.
36. 戸倉新樹: 紫外線による免疫抑制を考える. 日本皮膚科学会愛媛地方会佐山浩二教授就任記念第54回学術大会. 2011.9.24. 松山市.
37. 戸倉新樹: 外因性・内因性という分別はアトピー性皮膚炎に必要なか. 第16回アトピー性皮膚炎治療研究会シンポジウム. 2011.2.5. 小倉市.
38. 戸倉新樹, 澤田雄宇: 成人T細胞性白血病/リンパ腫の皮疹型と予後の解析. 第27回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会. 2011.6.4. 東京都.
39. 戸倉新樹: Th17細胞と皮膚疾患. 第39回日本臨床免疫学会総会. 2011.9.15-17. 東京都.
40. 戸倉新樹: 外来性物質に対する皮膚アレルギー反応機構. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2011.11.11. 東京都.
41. 戸倉新樹: 内因性アトピー性皮膚炎. 第62回日本皮膚科学会中部支部学術大会. 2011.11.20. 四日市.
42. 戸倉新樹, 杉田和成, 川上千佳, 中島大毅, 中村元信: 成人T細胞白血病・リンパ腫患者における正常CD8陽性T細胞による苔癬型皮疹の多様性. 西部支部地区日本皮膚科学会第53回愛媛地方会. 2011.3.19. 松山市.
43. 戸倉新樹: ATLL患者に起こるCADの機序は? UV-ABClub-40. 2011.3.6. 熱海市.

H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

II. 分担研究報告

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
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	生体防御学分野	助教
	川野 光子	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	研究員
	中村 恭平	東北大学大学院医学系研究科	血液免疫学分野	大学院生
	青島 有佑	東北大学大学院工学研究科	医用材料工学分野	大学院生
	樋口 繁仁	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	非常勤講師
	佐藤 直毅	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	非常勤講師
	鈴木 忍	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	非常勤講師
	佐藤 隆	ノベルサイエンス株式会社		

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。NK 細胞が樹状細胞から MHC class II を獲得するという現象を捉えたことから、MHC class II⁺ NK 細胞が遅延型アレルギー反応誘導においてどのような作用を及ぼすか検討したところ、NK 細胞が MHC class II を獲得することで抗原提示を抑制する可能性が示唆された。また、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。これまでに金属アレルギーの発症には IFN- γ の関与が示唆されたことから、IFN- γ 産生細胞の同定を行った。また、T 細胞の特異的な反応のためには、共刺激分子の関与が必須であることから、金属アレルギーの発症に関わる共刺激分子の関わりを調べた。その結果、金属投与部位において発現誘導される共刺激分子のリガンドから T 細胞上の共刺激分子へのシグナル伝達を介した IFN- γ 産生が重要であることが示唆された。

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。①NK 細胞が樹状細胞から MHC class II を獲得することから、MHC class II⁺ NK 細胞が遅延型アレルギー反応誘導においてどのような作用を及ぼすか検討した。②これまでに金属アレルギーの発症に IFN- γ の関与が示唆されたことから、今回金属アレルギー発症に伴う IFN- γ 産生細胞の同定と、T 細胞が抗

原特異的に反応するためには、共刺激分子の関与が必須であることから、金属アレルギーの発症における共刺激分子およびそのリガンドの同定を試みた。

B. 方法

- 1) C57BL/6 マウス脾臓から NK 細胞および樹状細胞を採取し、NK 細胞を IL-2 存在下で培養後、96 well plate にて樹状細胞と共培養した。その後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。
- 2) OT-II マウスから CD4⁺ T 細胞を採取・調整後、OVA₃₂₃₋₃₃₉ 存在下で 3 日間培養した骨髄樹状細胞（OVA-loaded BMDC）と共

に C57BL/6 マウス足蹠に皮下注射により移殖し、遅延型アレルギー反応を誘導した。その際、MHC class II⁺ NK 細胞または MHC class II⁻ NK 細胞を同時に移植し、コントロール (OVA-unloaded BMDC) 移殖群と足蹠の腫脹を比較した。

- 3) BALB/c (WT) マウスにパラジウム (Pd) を用いて感作・惹起を行い Pd アレルギー誘導後、その所属リンパ節細胞をヌードマウスに養子移入した。ヌードマウスへの移入・惹起を繰り返し、エフェクター T 細胞の濃縮を行った。この移入繰り返しマウスを用いて Pd にて惹起後、所属リンパ節細胞を採取し、フローサイトメトリーにより IFN- γ 産生細胞を解析した。
- 4) WT マウス耳介に Pd を皮内投与後、耳介組織を採取し totalRNA を抽出、cDNA を合成後、real-time PCR により、共刺激分子のリガンドの発現を評価した。
- 5) 共刺激分子の発現が抑制されているマウスまたは C57BL/6 マウス (コントロール) に Pd アレルギーを誘導し、耳介の腫脹を測定した。

C. 結果

- 1) NK 細胞と樹状細胞との共培養により、MHC class II⁺ NK 細胞が出現した (図 1)。
- 2) OT-II マウスから得た CD4⁺ T 細胞を OVA-loaded BMDC と共移殖した場合、足蹠の腫脹が観察された。これに対し MHC class II⁺ NK 細胞を共移殖した場合、足蹠の腫脹は有意に減少した。MHC class II⁻ NK 細胞を共移殖した場合には、腫脹の軽減が抑えられた (図 2)。
- 3) 金属アレルギーの誘導に伴い T 細胞において共刺激分子の発現が誘導され、その細胞から IFN- γ 産生を検出した。
- 4) 組織への金属投与により、共刺激分子のリガンドの発現が有意に上昇した。
- 5) 共刺激分子の発現抑制マウスにおいて、金属アレルギーの発症が有意に抑制された。

D. 考察

- 1) NK 細胞と樹状細胞の共培養により MHC class II⁺ NK 細胞が出現したことから、NK

細胞が樹状細胞から MHC class II 分子を獲得していると考えられる。

- 2) MHC class II⁺ NK 細胞を共移殖した場合に、足蹠の腫脹が抑えられたこと、MHC class II⁻ NK 細胞の共移殖ではその抑制が解除されたことから、NK 細胞が MHC class II 分子を獲得することが遅延型アレルギー反応における抗原提示を抑制する可能性が示唆された。このことから、金属アレルギーの抗原提示においても、MHC class II⁺ NK 細胞が関与する可能性が考えられる。
- 3) 共刺激分子が発現した T 細胞から IFN- γ の産生が見られたことから、共刺激分子を介したシグナルにより IFN- γ が誘導されることが、Pd アレルギー誘導において重要であることが考えられる。
- 4) 金属投与により共刺激分子のリガンドの発現が上昇したことから、金属接触部位において T 細胞上の共刺激分子へのシグナル伝達が重要であることが示唆された。
- 5) 共刺激分子の発現が抑制されたマウスにおいて Pd アレルギーの誘導が抑制されたことから、共刺激分子が Pd アレルギーの誘導において重要な役割を持つことが示唆された。

E. 結論

- 1) 遅延型アレルギー反応において、NK 細胞が MHC class II 分子を獲得することが抗原提示を抑制する可能性がある。
- 2) Pd アレルギーにおいて金属投与部位において発現誘導される共刺激分子リガンドからの T 細胞上の共刺激分子へのシグナル伝達を介した IFN- γ 産生が重要である。

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. Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. Natural Killer

(NK)-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108 (45): 18360-18365 (2011)

2) 総説論文、著書

1. 川野光子、小笠原康悦：金属アレルギーの免疫学 Up-to-date. *Visual Dermatology* 10 (11): 1208-1212 (2011)

2. 学会発表

国外学会

なし

国内学会

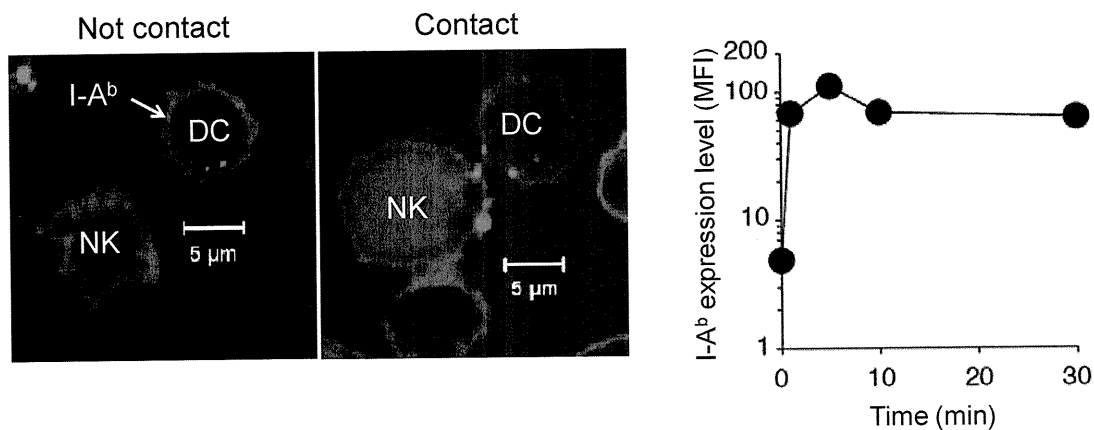
1. Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. NK-dendritic cell

interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4+ T cells. The 40th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Makuhari, Nov. 2011.

2. Kawano M, Kumagai K, Kobayashi H, Nakayama M, Suzuki R, Ogasawara K. Investigation of metal allergy using mouse model. The 40th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Makuhari, Nov. 2011.

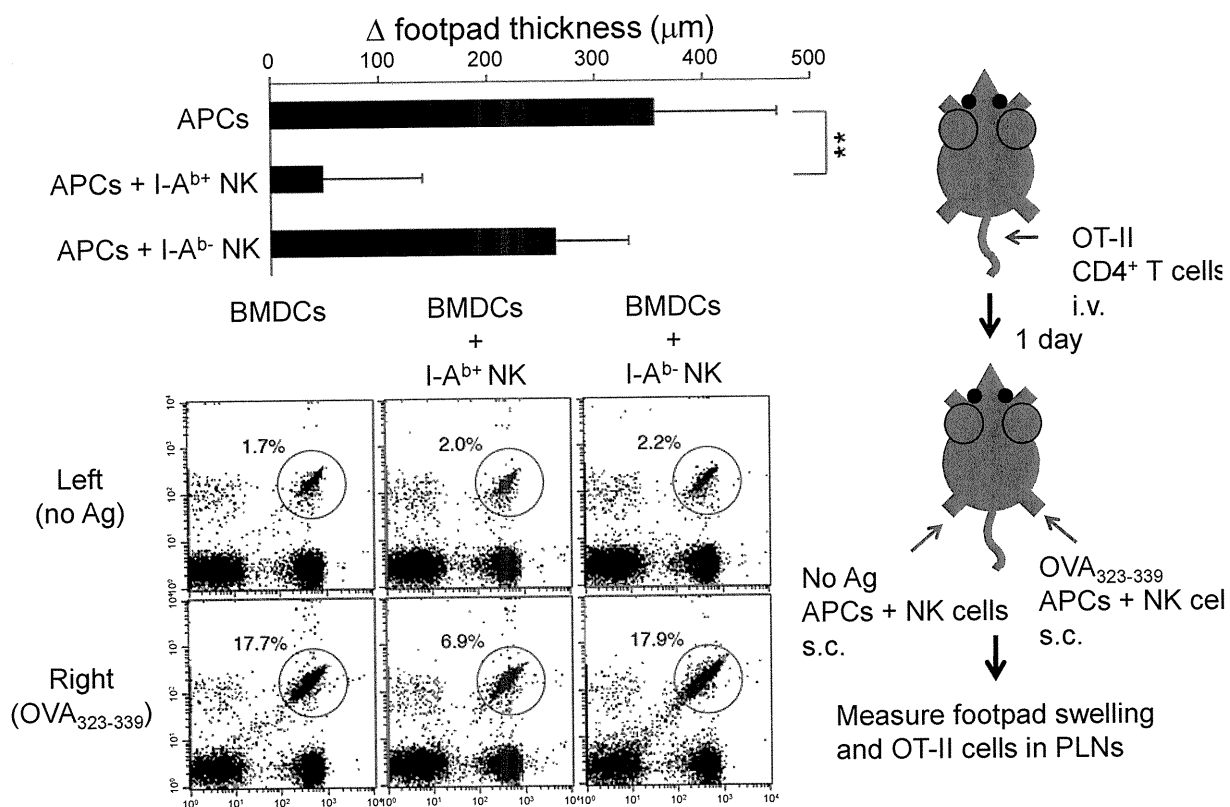
H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

図 1 : 樹状細胞からの MHC class II の獲得



Nakayama et al. *Proc Natl Acad Sci USA* (2011)

図 2 : MHC class II+ NK 細胞による遅延型アレルギー反応の抑制



Nakayama et al. *Proc Natl Acad Sci USA* (2011)

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 助教

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

重松 宏昭 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

我々は前回の報告で、既存の金属アレルギーモデルマウス(Sato N et al, Clin Exp Allergy, 2007)系を一部改変しFootpad swelling (足蹠腫脹)を指標とする反復暴露型金属アレルギーモデルマウスを確立した。本モデルの特徴はヒト金属アレルギーと類似してT細胞の皮下・皮内への浸潤が観察される事を報告した。今回、ヒト金属アレルギーの病態と我々の作製したこのモデルマウス系の相同性を明らかにするために、金属感作後の時間経過に伴う病理組織学的検討、病変部組織のサイトカインプロファイルの調査、そして浸潤したT細胞の特異性に関する詳細な検討(相補性決定領域3(CDR3) size spectratyping、CDR3 アミノ酸配列解析)を行った。その結果、①病変部に多量に浸潤したT細胞像、②Th1タイプへの病変部免疫状態の偏向性、そして③特定のTCR subfamilyのskewとそのクローナルな増殖が認められた。これらの結果はヒトの金属アレルギーと極めて高い類似性を示していることを示唆していた。さらに興味深い点は、TCRのCDR3アミノ酸配列解析結果から、金属複合体抗原の認識にはTCR α 鎖が重要に関与している可能性が示されたことである。

A. 研究目的

我々は金属アレルギーにおけるT細胞と病態形成の因果関係を明らかにすることにより新規診断および治療に寄与する事を目的としている。

前回、既存のモデル系マウスをより安定した系に一部改変し、ヒト金属アレルギーで報告されているような特異的T細胞(TCR α V18-1、3-2 etc)の浸潤が確認される事を報告した。今回、ヒトにおける金属アレルギーと我々の作製したモデルマウスの相同性を明らかにするために、時間経過に伴う病理組織学的検討、病変部組織のサイトカインプロファイル、そして浸潤したT細胞の特異性に関する詳細な検討を行った。

B. 方法

1) 改変金属アレルギーモデルマウス作製
Balb/c マウス(6週齢、♀)に金属(PdCl₂)・LPS混合溶液(10mM PdCl₂+10ug/mL LPS)を左右の鼠径部へ250uL(各125uL)の皮内注射する事で感作し、一週間のインターバル後に金属(10mM PdCl₂)溶液単体を左右足蹠部(Footpad)にそれぞれ25uLずつ皮内注射することでアレルギーを誘導し足蹠腫脹を指標として測定を行った。
感作・誘導回数については条件検討を行った(溶液濃度は不変)。また、各条件下での病変部T細胞浸潤の有無を定量RT-PCR解析にて確認した。

※コントロール群は PBS 25uL を Footpad に誘導注射したマウスを用いた。(感作条件は同一)。

2) 病理学的解析

各感作・誘導条件下における Control (PBS 注射) 群・金属溶液注射後 24h 群・72h 群・1w 群のマウス Footpad で HE 染色及び免疫組織学的染色 (CD3, CD4, CD8) を施行し、経時的組織変化を調査した。

3) 定量的 PCR による病変部局所のサイトカインプロファイル調査

炎症部局所である Footpad (PdCl₂ 誘導注射後 1 週間) における以下のサイトカインプロファイルを調査した。

※コントロール群は PBS 25uL を Footpad に誘導注射したマウスを用いた。(感作条件は同一)。

- Th1-Type cytokine
- Th2-Type cytokine
- Chemokines
- T cell markers
- Apoptosis factors

4) T 細胞の特異性解析

炎症部局所に存在する T 細胞の抗原特異性を評価するため、TCR レパトア解析を行い、結果において skew を認めたサブファミリーにおいて、相補性決定領域 3 (CDR3) size spectratyping、CDR3 アミノ酸配列解析を実施した。

C. 結果

1) 改変金属アレルギーモデルマウス作製

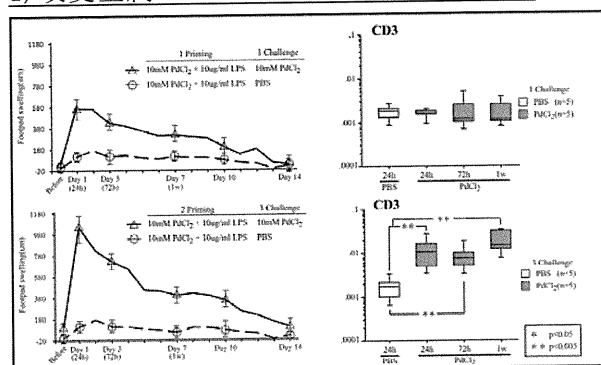


図 1 : Footpad の腫脹と T 細胞遺伝子 (CD3) 発現量

感作 2 回誘導 3 回 (2Priming 3Challenge) の条件下において Footpad の腫脹は最大値を示し、さらに T 細胞マーカー (CD3) の遺伝子発現量はコントロール群に比べて有意な増加を認めた (図-1)。

2) 病理組織学的解析

感作 2 回誘導 3 回 (2Priming 3Challenge) の条件下の誘導注射後 1 週間のマウス Footpad は T 細胞の明らかな上皮内・上皮浸潤と上皮組織構造の破壊を認めた (図-2A,B)。また、CD4・CD8 の割合に関しては CD4 の優位な浸潤所見を認めた。

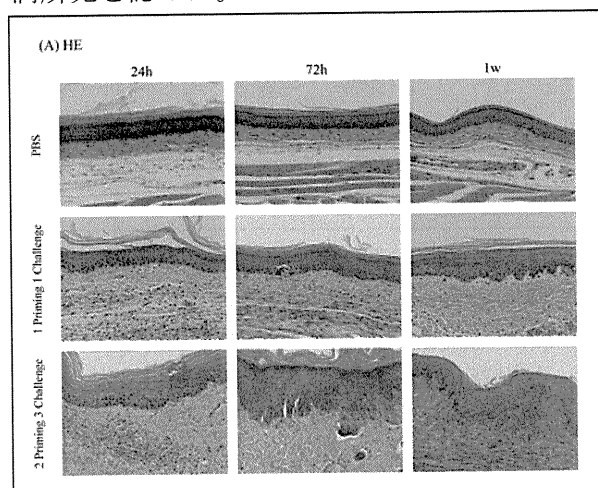


図 2 A : HE 染色像

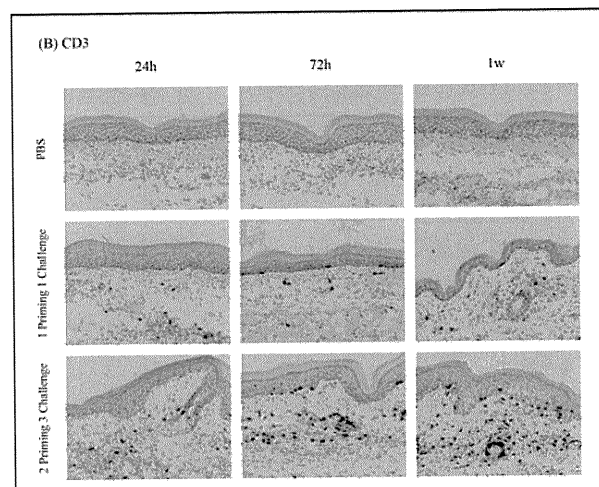


図 2 B : 免疫染色 (CD3)

3) 定量的 PCR による病変部局所のサイトカインプロファイル調査

定量 RT-PCR 解析において、金属アレルギーを誘導されたマウス Footpad (条件: 2Priming 3Challenge、最終誘導注射後 1w) は Th1 夕

D. 考察

我々の作製した金属アレルギーモデルマウスは、炎症部である足蹠部組織の破壊像や同部への CD3+CD4+細胞浸潤など、ヒト金属アレルギーにおいて観察される典型的な炎症像を呈していた。この結果は CD3、CD4 mRNA 発現量の増加とも相関していた。リアルタイム定量 RT-PCR 解析の結果は、金属アレルギー惹起による炎症部の免疫状態が Th1 タイプで、IL-2 により活性化された CD4 T cell がその病態形成に参与することを示唆している。

TCR レパトア解析の結果から、金属アレルギーモデルマウスの炎症部浸潤 T 細胞は、特定の TCR ファミリーを高度に使用し、金属アレルギー抗原特異的であることが考えられる。また個体間で共通して得られた TCR クローンが、複数の CDR3 配列を有していることは、生体が認識しえる金属によって修飾された抗原エпитープが複数に及ぶことを反映しているものと推測する。さらにクローンレベルの解析において、TCR α 鎖が限定的であるのに対して、TCR β 鎖が多様である炎症部浸潤 T 細胞の傾向から、金属複合体抗原の認識において TCR α 鎖が重要であることが考えられる。興味深いことに、近年、ヒト金属アレルギーにおける T 細胞クローン研究は、特異的 TCR α 鎖によるスーパー抗原様の反応が病態形成に寄与する可能性を報告している (J Exp Med 2003 May 19;197(10):1345-53)。金属アレルギーは T 細胞主体の IV 型アレルギー反応に分類されるが、既存の金属アレルギーモデル動物において病変部への T 細胞浸潤を呈する病理組織像や、その浸潤 T 細胞の特異性についての報告したものはほとんど存在しない。今回我々の作製したモデルマウスは上記の観点からヒトの金属アレルギーと相関性が高く新規性があると考えられる。今後はこれら特異的 T 細胞の機能的側面について調査を行う。また、Pd 以外の金属に関しての炎症部 T 細胞動態についても調査予定である。

E. 結論

- 1) 金属アレルギーモデル動物において、炎症部局所へ T 細胞浸潤をもたらすには複数回の反復感作・誘導による金属暴露が必要である。

ある。

- 2) 我々の作製した金属アレルギーモデルマウスはヒト金属アレルギーと相関性が高いと考えられる。
- 3) 金属複合体抗原の認識において TCR α 鎖が重要であることが考えられる。

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. Kitaura K, Fujii Y, Hayasaka D, Matsutani T, Shirai K, Nagata N, Lim CK, Suzuki S, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I: High Clonality of Virus-Specific T Lymphocytes Defined by TCR Usage in the Brains of Mice Infected with West Nile Virus. *J Immunol.* 187 (8): 3919-30, 2011.
2. Fujii Y, Hayasaka D, Kitaura K, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I: T-Cell Clones Expressing Different T-Cell Receptors Accumulate in the Brains of Dying and Surviving Mice After Peripheral Infection with Far Eastern Strain of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Viral Immunol.* 24 (4): 291-302, 2011.
3. Kumagai K, Horikawa T, Gotoh A, Yamane S, Yamada H, Kobayashi H, Hamada Y, Suzuki R.: Up-regulation of EGF receptor in keratinocytes and its ligands in infiltrating lymphocytes in the lesions of oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 110 (6): 748-54, 2010.
4. Kumagai K, Hamada Y, Gotoh A, Kobayashi H, Kawaguchi K, Horie A, Yamada H, Suzuki R: Evidence for the changes of antitumor immune response during lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 110 (3): 341-50,

2010.

5. Yamada H, Hamada Y, Fujihara H, Fukami K, Mishima K, Nakaoka K, Kumagai K, Imamura E: Solitary fibrous tumor of the buccal space resected in combination with coronoidectomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* (in press)

2) 総説論文、著書
なし

2. 学会発表

国外学会

1. Hamada Y, Saito T, Nakaoka K, Arai G, Horiuchi T, Kumagai K: Simple surgical removal of interfering osteophytes in patients with chronic closed lock of the temporomandibular joint. XX Congress for the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery, September 14-17, 2010 (P-2308) Bruges, Belgium
2. Kumagai K, Gotoh A, Shiobara N, Kobayashi H, Eguchi T, Yamamoto H, Ishii T, Hamada Y, Suzuki R: Unbiased usage of T cell receptor alpha and beta variable regions genes in nasal polyps of chronic rhinosinusitis patients: no correlation with superantigen effect. XX Congress for the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery, September 14-17, 2010 (O-3605) Bruges, Belgium
3. Kumagai K, Horikawa T, Gotoh A, Yamane S, Yamada H, Kobayashi H, Eguchi T, Hamada Y, Suzuki R: The pathogenesis of oral lichen planus via epidermal growth factor receptor signaling. The 14th International Congress of Immunology, August 22-27, 2010 (PP-066) Kobe

国内学会

1. 熊谷賢一, 鈴木さつき, 藤井恵介, 鈴木隆二, 濱田良樹: STR/Ort マウスにおける変形性顎関節症モデルとしての有用性について 第24回一般社団法人日本顎関節学会総会・学術大会 2011.7.22 広島
2. 小林浩, 熊谷賢一, 江口貴紀, 重松宏昭, 和気昌宏, 濱田良樹: 口腔白板症および口腔扁平苔癬の病態形成に関わる EGFR family の発現解析 2011.10-21-23 (2P.28-6) 大阪
3. 熊谷賢一, 小林浩, 江口貴紀, 重松宏昭, 濱田良樹, 鈴木さつき, 鈴木隆二: 網羅的 T細胞レセプター解析による口腔癌リンパ節転移機構の解明 第9回比較歯科医学研究会学術大会 2011.3.6 (2) 東京
4. 熊谷賢一, 堀川達弥, 後藤哲人, 山田浩之, 小林浩, 江口貴紀, 濱田良樹, 鈴木隆二: 口腔扁平苔癬における EGFR シグナル伝達機構の解明 第64回日本口腔科学会学術集会 2010.5.20-21(1-P-7) 札幌
5. 北浦一孝, 藤井克樹, 早坂大輔, 高島郁夫, 高崎智彦, 鈴木隆二, 倉根一郎: ダニ媒介性脳炎感染マウスにおける脳炎発症に関わる脳内浸潤 T細胞の解析 第40回日本免疫学会学術集 2011.11.27-29 千葉

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担課題：DC 移入型金属アレルギーマウスモデルを用いた金属アレルギー発症機構の解析

分担研究者：西屋 禎 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 薬効解析学分野 准教授

研究要旨

金属アレルギーは、T 細胞性の遅延型過敏反応であることが示唆されているものの、有用な動物実験モデルが存在しなかったことから、その発症のメカニズムは依然として不明な点が多い。特に、金属の抗原提示や交差反応の分子機構はほとんど明らかにされていない。我々は、金属塩とリポ多糖 (LPS) で処理した骨髄由来樹状細胞 (DC) をマウスに移入することにより、金属アレルギーを感作することができる動物実験モデル (DC 移入型金属アレルギーマウスモデル) を確立した。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感作する分子機構を明らかにすることにより、金属アレルギーの感作や交差反応の分子機構を明らかにすることを目的とする。本年度は、DC 移入型金属アレルギーマウスモデルを用いて、金属アレルギーの感作反応における DC の MHC class I を介した抗原提示の重要性を検討した。また、DC に処理した金属と異なる金属でマウスを challenge することにより、金属アレルギーの交差反応における DC の役割を検討した。その結果、PdCl₂+LPS 処理 DC の移入による Pd アレルギーの感作と NiCl₂+LPS 処理 DC の移入による Ni アレルギーの感作では、MHC class I 依存性に差があることが示唆された。また、PdCl₂+LPS 処理 DC の移入により Pd アレルギーを感作されたマウスが、Pd だけではなく Ni や Co に対する反応性も獲得しうることが示唆された。

A. 研究目的

ニッケル (Ni) やパラジウム (Pd) といった金属が引き起こす金属アレルギー発症において、金属イオンの情報を持つ MHC-ペプチド複合体の T 細胞受容体への抗原提示が重要であ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、DC やマクロファージ、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が担う。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は以前から示唆されている。しかし、その分子機構や金属アレルギーの交差反応のメカニズムについては、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、未だに不明な点が多い。

我々の研究班は、金属塩とリポ多糖 (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金属アレルギー発症マウスモデル系を開発した。さらに、本分担研究者は *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

により、上記のモデル系と同様に金属アレルギーを感作することができることを示した (図 1)。本研究は、このマウスモデル (DC 移入型金属アレルギーマウスモデル) を用いて、金属アレルギーの感作機構、並びに金属アレルギーの交差反応の分子機構の解明を試みた。

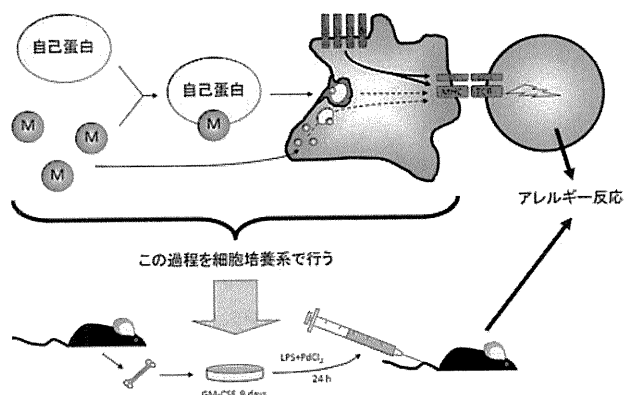


図 1. 金属塩+LPS 処理 DC の移入による金属アレルギーの感作法 (DC 移入型金属アレルギーマウスモデル)

B. 方法

1) 骨髄由来樹状細胞 (DC) の調製

8~12週齢雌の C57BL/6 マウスまたは $\beta 2M^{-/-}$ マウス (B6 background) の骨髄から細胞を回収し、赤血球除去操作後に残った細胞を 10 ng/ml GM-CSF を含む RPMI-10%FBS 培地にて 9 日間培養した。得られた DC の表面上に発現する CD11c, CD80, CD86, MHC class I, 及び MHC class II 分子の発現レベルをフローサイトメーターを用いて解析した。

2) 金属アレルギーの発症とその評価

1) で調製した DC を PdCl_2 (0.2 mM) + LPS (20 ng/ml) または NiCl_2 (0.1 mM) + LPS 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 PdCl_2 、 NiCl_2 、及び LPS を完全に除去した後、 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 PdCl_2 溶液 (0.5 mM) 15 μl 、 NiCl_2 溶液 (1 または 5 mM)、及び 1 mM CoCl_2 15 μl をマウスの耳介に皮内注射し、その 24 時間後に耳の腫脹を DIAL THICKNESS GAUGE (PEACOCK OZAKI MFG. CO.; LTD) を用いて測定した。

C. 結果

1) 金属アレルギーの発症に対する MHC class I を介した抗原提示の関与について

DC の移入による金属アレルギーの発症に MHC Class I 分子がどの程度関与するのかを明らかにするために、コントロールの B6 マウス由来の DC と $\beta 2M^{-/-}$ マウス由来の DC を PdCl_2 と LPS で処理し、それらの DC を B6 マウスに移入した。移入直前の各 DC の表面分子の発現レベルを確認した結果、MHC class I 分子が $\beta 2M^{-/-}$ マウス由来の DC で検出されなかったこと以外は、B6 マウス DC と $\beta 2M^{-/-}$ マウス DC との間に大きな発現レベルの違いは観察されなかった (図 2)。続いて、各 DC を移入した B6 マウスを PdCl_2 で challenge した結果、B6 マウス由来の DC を移入したマウスでは耳の腫脹が観察されたが、 $\beta 2M^{-/-}$ マウス由来の DC を移入したマウスでは、優位な耳の出張は観察されなかった (図 3)。

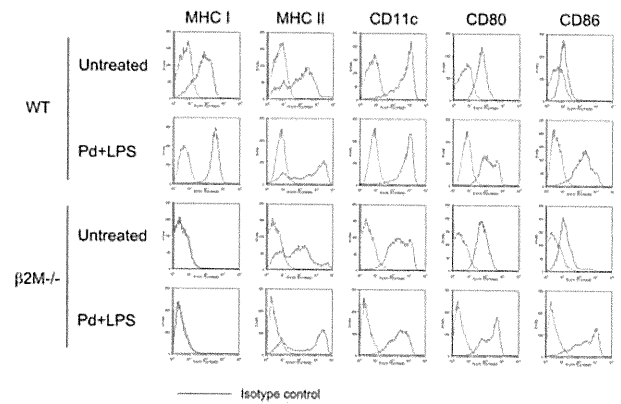


図 2 マウスに移入する直前の DC 表面上分子の発現レベルの検討

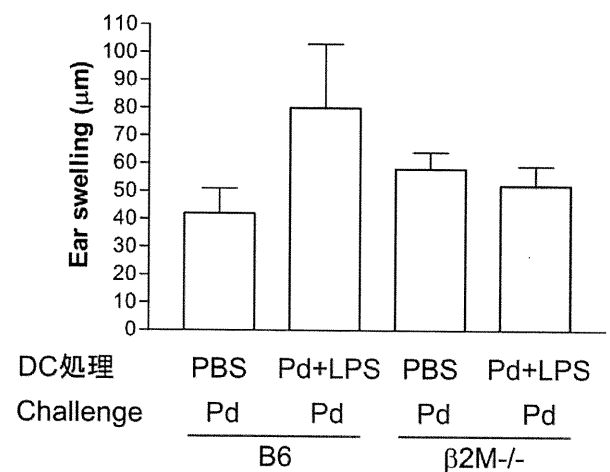


図 3 PdCl_2 + LPS 処理 DC の移入により感作される Pd アレルギー反応における MHC class I 分子の関与

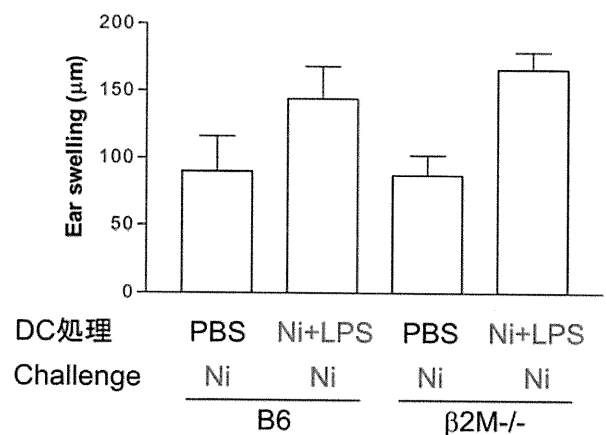


図 4 NiCl_2 + LPS 処理 DC の移入により感作される Ni アレルギー反応における MHC class I 分子の関与

同様の実験を NiCl₂ において行ったところ、コントロールと比較して同程度の耳の腫脹が β2M^{-/-}マウス由来の DC を移入したマウスでも観察された (図 4)。

2) 金属アレルギーの交差反応に対する DC の役割についての検討

金属アレルギーは、異なる金属間で交差反応を起こすことが広く知られているが、そのメカニズムは不明な点が多い。そこで、金属アレルギーの交差反応における DC の役割について検討した。PdCl₂+LPS で処理した DC を移入した B6 マウスを PdCl₂, NiCl₂ 及び CoCl₂ で challenge したところ、全てにおいて耳の腫脹が観察された (図 5)。特に、CoCl₂ で challenge した場合に著しい耳の腫脹が誘発された。

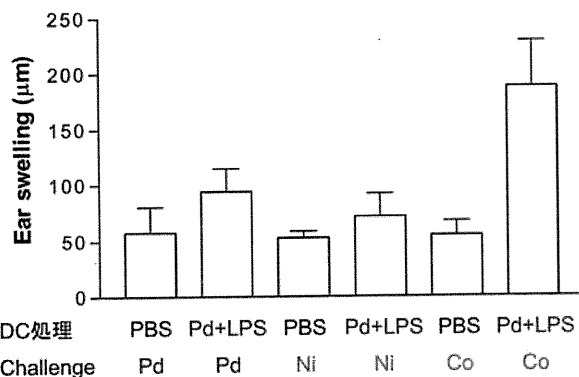


図 5. PdCl₂+LPS 処理 DC の移入により感作されマウスの Pd, Ni, 及び Co に対する反応性の検討。

D. 考察

PdCl₂ と LPS を処理した DC の移入による Pd アレルギーの発症には、MHC class I を介する抗原提示が重要であることが示唆された。一方、NiCl₂ と LPS を処理した β2M^{-/-}マウス由来の DC がコントロールと同様に Ni アレルギーを感作したことから、Pd と Ni 間で抗原提示の機構が異なる可能性が示唆された。但し、移入後に β2M^{-/-}マウス由来 DC が wild-type DC から MHC class I 分子を受け取って、Ni の抗原提示を行った可能性も否定できない。というのは、最近、DC 間で細胞膜をやり取りすることで、細胞膜上の受容体が他の DC に移り、

DC が抗原提示能を獲得する現象 (cross-dressed DC) が報告されている。従って、今後より詳細な解析が必要と考えられる。

パッチテストの結果などから、Pd は Ni や Co と交差反応を起こすことが知られている。PdCl₂ と LPS で処理した DC を移入したマウスが、Pd のみならず Ni や Co に対する反応性も獲得したことから、交差反応における DC の関与が明らかとなった。この交差反応が、他の金属を処理した DC を移入したマウスにおいても起こるか否かを今後明らかにする必要がある。

E. 結論

1. Pd アレルギーと Ni アレルギー間では、アレルギー反応の感作に対する MHC class I 依存性に差が有ることが示唆された。
2. Pd の情報を持つ DC に感作された場合、Pd だけではなく Ni や Co に対する反応性も獲得しうることが示唆された。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

1. Horinouchi T, Higa T, Aoyagi H, Nishiya T, Terada K, Miwa S : Adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A signaling pathway inhibits endothelin type A receptor-operated Ca²⁺ entry mediated via TRPC6 channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 340(1), 143-151, 2012.
2. Horinouchi T, Terada K, Higa T, Aoyagi H, Nishiya T, Suzuki H, Miwa S : Function and regulation of endothelin type A receptor-operated transient receptor potential canonical channels. *J. Pharmacol. Sci.* 117(4), 295-306, 2011.
3. *Numajiri N, *Takasawa K, *Nishiya T,

Tanaka H, Ohno K, Hayakawa W, Asada M, Matsuda H, Azumi K, Kamata H, Nakamura T, Hara H, Minami M, Lipton S, Uehara T : On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of PTEN. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(25), 10349-10354, 2011. *Equal contribution.

4. Matsumoto K, Nishiya T, Maekawa S, Horinouchi T, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S : The ECS(SPSB) E3 ubiquitin ligase is the master regulator of the lifetime of inducible nitric-oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409(1), 46-51, 2011.

2) 総説論文、著書

1. Uehara T, Nishiya T : Screening systems for the identification of S-nitrosylated proteins. *Nitric Oxide* 25(2), 108-111, 2011.

2. 学会発表

国外学会

なし

国内学会

1. 西屋禎、前川聡、松本一馬、堀之内孝広、藤室雅弘、小笠原康悦、上原孝、三輪聡一：誘導型 NO 合成酵素の分解制御機構、第 11 回日本 NO 学会、東京、2011 年 5 月 13～14 日
2. 松本一馬、西屋禎、前川聡、堀之内孝広、

藤室雅弘、小笠原康悦、上原孝、三輪聡一：誘導型 NO 合成酵素のユビキチン・プロテアソーム依存的分解制御機構、第 25 回北海道薬物作用談話会、江別、2011 年 7 月 30 日

3. 堀之内孝広、比嘉綱己、青柳裕之、西屋禎、寺田晃士、三輪聡一：Phos-tagTM biotin を用いたエンドセリン A 型受容体作動性 TRPC6 チャンネルの PKA によるリン酸化部位の同定エンドセリン A 型受容体作動性 TRPC チャンネルの多様な機能制御機構、第 62 回日本薬理学会北部会、仙台、2011 年 9 月 29～30 日
4. 西屋禎：新規 iNOS 分解系の発見とその心血管系への治療標的としての可能性、第 21 回日本循環薬理学会、岡山、2011 年 12 月 2 日
5. 比嘉綱己、堀之内孝広、青柳裕之、西屋禎、寺田晃士、三輪聡一：プロテインキナーゼ A による TRPC6 チャンネルを介したエンドセリン A 型受容体作動性 Ca²⁺流入の抑制性制御の分子機構、第 21 回日本循環薬理学会、岡山、2011 年 12 月 2 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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と 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：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
研究協力者：上田 恭介 東北大学大学院工学研究科 医用材料工学分野 助教
研究協力者：佐藤 睦 東北大学大学院工学研究科 応用量子医工学分野 技術補佐員

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。金属の腐食とともに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。さらに実際に臨床検体を測定するための予備実験として血清中の金属も測定しうることを確認した。現在、実際のヒト・サンプルを測定すべく工夫を重ねている。臨床サンプルである汗、血液、尿、唾液などを集めている。実際の測定前に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回収率、感度などの改善のために、前処理の工夫や測定機器の選択を進めている。2) 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た。トランスジェニック用の構築は終えて、2系統のマウスを維持している。現在、実際のマクロファージや肥満細胞で GFP を発現するかどうか FACS を用いた解析を進めている。今後 BAC を用いたレポーターマウスの金属皮下埋入モデルを作製し、ヒスタミン産生細胞の病理学的な解析を進める。

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経皮的に体内に取り込まれたり、食事性に吸収されたりすることによって感作が開始する。金属は体内のたんぱく質と結合後、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発症機構と考えられている。従って、溶出した金属を鋭敏に定量的に測定できるシステムがあると早期診断や重症度、治療効果、予後の判定などに大いに役立つ。このため工学的な生体内金属測定機器開発を進めていこうと考えている。

2. ヒスタミンは金属アレルギーの症状を悪化させる生体内物質であることが明らかにされている。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。この遺伝子の転写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マウスを作製し、そのマウス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明らかにする。

B. 方法

1) ヒトのサンプルの金属濃度測定：

添加実験：ヒト・サンプルは貴重であり、実験全体の精度および感度を理想的な状態にしてから測定することが重要である。そのため

に市販の牛乳（デイリーヤマサキ 3.6牛乳）を購入し、ニッケルおよびパラジウムの添加実験をおこなう事とする。そのために、ニッケル標準液（100ppb）あるいはパラジウム標準液（1000ppm）を添加し、最終濃度を 0ppb、1ppb、10ppb、100ppb、1000ppb(=1ppm)にする。冷凍にしていた牛乳資料 1ml に硝酸 6ml を添加、マイクロウェーブにて 140℃ 5min→170℃ 5min→200℃ 10min→220℃ 15min 処理する。これによって、牛乳は分解され超純水を加えて 25ml とする。サンプルの分析は工学研究科技術部合同計測分析班に依頼し、ICP/MS にて測定する。その後、同じサンプルを成島研の ICP/MS と、ICP/AES で測定し、それぞれの方法の精度、感度を比較する。
実際のサンプル：加古川医療センター皮膚科足立厚子先生に検体を送ってもらい冷凍保存中である。サンプル 2 例を ICP/MS にて測定予定。

1 例：母乳採取し（20ml）、今後東北大に送付され冷凍保存した。

1 例：掌蹠膿疱症の中年女性 ニッケルパラジウム強陽性 1 カ月制限後の汗を再度採取し、冷凍保存。

2) 溶出金属イオン測定法

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS 法) (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現在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。

3) レポーター動物の作製

以前プラスミッドを用いたトランスジェニックマウスを作製していたが、組織特異的な発現を再現できないため現在 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 BAC 遺伝子も構築完了し、マウスの受精卵に注入し、個体を発生させ PCR による遺伝子解析を行ない、2 系統のマウスを維持している。

C. 研究結果

1. 添加実験

ニッケル、パラジウムともに添加量を増やすにしたがって感知する金属濃度も増加した(図 1)。100ppb 以上では測定結果に満足できる程度であったものの、それ以下ではサンプルごとのばらつきも多く、実際の検体の測定には適さない。現在、成島研の ICP/MS での結果待ちであり、結果が満足するものなら成島研で測定することとする。また、それでもバラつきが多く見られるときは、濃縮するなどの工夫が必要である。

さらに、検量線のデータを考察します。検量線は純粋の Ni, Pd のものについて表しました(図 2)。

さらにニッケル、パラジウムの添加検体を 3 本ずつ用意して技術部にて ICP/MS による測定を依頼した(図 3)。

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

現在 BAC を用いたレポーター遺伝子の構築を終え受精卵に注入した。今回のレポーター遺伝子の構築方法は 22 年度の報告書に記載した通りである。その後構築された BAC construct を受精卵に注入し、それぞれの受精卵から発生した 9 個体の尾を PCR を用いて genotyping した結果、2 個体(No. 569, 572)が positive であった。Positive な個体を founder として、現在 2 系統のマウスを維持している。それぞれの系統のマウスの腹腔細胞を FACS にかけて、c-kit あるいは Mac-1 と GFP で解析した結果(図 4)、c-kit positive な細胞の中に、GFP が強い細胞があり、肥満細胞とかがえられた。また、Mac-1 陽性細胞の中にも GFP positive な細胞があり、macrophage のうち HDC が positive な細胞であると考えら

れた。腹腔内に LPS を注入して同様に腹腔細胞を採取して FACS による解析を行ったが、GFP が陽性になった細胞はわずかに増加する程度であった。

D. 考察

1. 添加実験

検量線を見ると 1ppb level から測定可能であるに、実際の検体では 100ppb level にならないと精度をもって測定できていない。この原因について考察すると、1) 検体の場合は 25 倍に希釈されている、2) 検体には前処理（硝酸添加、マイクロウェーブ処理）が施されている、3) 前処理が施されていても夾雑物によって正確な測定が出来ていない、などが考えられる。技術部での測定と成島研での ICP-MS の精度を比較する実験を遂行すると同時に、1)-3) に対してアプローチしようと考えている。具体的には、1) 検体量を増やして、希釈率を下げる、2)3) 前処理の方法を工夫して、夾雑物の混入を下げる。感度が上がったところで、実際のサンプルでの測定に着手する。

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。2 系統のトランスジェニックマウスを維持し始めている。FACS により腹腔内細胞の解析では、GFP を強く発現している細胞が見られた。さらに腹腔中に LPS を注入して、GFP の誘導を試みたが、わずかに GFP 陽性細胞が増えるのみであ

った。今後、E.coli による腹膜炎モデルを再現してみる計画である。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。

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、金属医用材料に関しても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臨床にとって大いに役立つ。現在臨床検体を使った測定を進め始めている。

レポーターマウスの作製は最終段階まで来ており、完成されたのちに、動物に金属アレルギーを発症させればどの時期にヒスタミン産生細胞が活性化しているのかが判明し、抗ヒスタミン剤の投与方法について工夫できるようになると考えている。

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. He G, Hu J, Li T, Ma X, Meng J, Jia M, Lu J, Ohtsu H, Chen Z, Luo X.: The arrhythmogenic effect of sympathetic histamine in mouse hearts subjected to acute ischemia. *Mol Med.* in press
2. Aisa Chepkova, Evgenij Yanovsky, Regis Parmentier, Hiroshi Ohtsu, Helmut L. Haas, Jian-Sheng Lin and Olga A.: Sergeeva

Histamine Receptor Expression, Hippocampal Plasticity and Ammonia in Histidine Decarboxylase Knockout Mice. *Cell Mol Neurobiol.* in press

3. Nijijima-Yaoita F, Tsuchiya M, Ohtsu H, Yanai K, Sugawara S, Endo Y, and Tadano T.: Roles of Histamine in Exercise-Induced Fatigue: Favouring Endurance and Protecting Against Exhaustion. *Biol Pharm Bull.* 35: 91-97, 2012.
4. Krusong K, Ercan-Sencicek AG, Xu M,

Ohtsu H, Anderson GM, State MW, Pittenger C.: High levels of histidine decarboxylase in the striatum of mice and rats. *Neurosci Lett.* 495:110-4, 2011.

5. Tanaka R, Goi Y, Ishihara K, Ueda K, Narushima T, Ohtsu H, Hiratsuka M, Hirasawa N.: Enhancement of nickel elution by lipopolysaccharide-induced inflammation. *J Dermatol.* 62: 50-57, 2011.
6. Wang KY, Tanimoto A, Guo X, Yamada S, Shimajiri S, Murata Y, Ding Y, Tsutsui M, Kato S, Watanabe T, Ohtsu H, Hirano K, Kohno K, Sasaguri Y.: Histamine deficiency decreases atherosclerosis and inflammatory response in ApoE-KO mice independently on serum cholesterol level. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31:800-807, 2011.
7. Fan YY, Hu WW, Dai HB, Zhang JX, Zhang LY, He P, Shen Y, Ohtsu H, Wei EQ, Chen Z.: Activation of the central histaminergic system is involved in hypoxia-induced stroke tolerance in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 31: 305-314, 2011.
8. Tanaka, R., Goi, Y., Ishihara, K., Ueda, K., Narushima, T., Ohtsu, H., Ohuchi, K., Hiratsuka, M., Hirasawa, N.: Assessment of the release of nickel from biomaterials in vivo and in vitro: enhancement by lipopolysaccharide. *Inflam. Regene.* 31: 302-306, 2011.

2)総説論文

1. Ohtsu H.: Pathophysiologic Role of Histamine; Evidence Clarified by Histidine Decarboxylase Gene Knockout Mice. *Int Arch Allergy Immunol.* in press

3)書籍

著書

1. Robin L. Thurmond (編者), Histamine in inflammation Series: Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol.

709 1st Edition, 2011, XVIII, 144 p. ISBN: 978-1-4419-8055-7 (タイトル) Landes Bioscience (出版社) Austen Texas, Chapter 3 “Histamine synthesis and lessons learned from histidine decarboxylase deficient mice.” written by Hiroshi Ohtsu 21-31 (2011) **April 28** 出版

2.学会発表

1) 国際学会

1. Ohtsu H, Sato A, Moriguchi T, Takai J, Yamamoto M. HDC-GFP transgenic mouse (oral presentation) European Histamine Symposium Belfast (Northern Ireland) May 2-5 2012
2. Ramsey LCB, Crowley M, Hughes Z, Ohtsu H, Araujo ID, State M, Mayes L, Pittenger C. Behavioral and neurochemical analysis of HDC-KO mice, a model of a genetic form of Tourette Syndrome (oral presentation), International Behavioral Neuroscience Society, June 5-10, Hawaii 2012

2) 国内学会

1. 佐藤 睦、大津 浩、大腸菌人工染色体 (BAC)を用いたヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC)レポーターマウスの作製 日本薬理学会 (京都) 2012年3月14-16日

3) 招待講演、シンポジウム

特別講演

1. 大津浩 『ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子改変マウスを用いた病態モデルの研究』アレルギー好酸球研究会 2011年6月18日 於 大手町サンケイプラザ (口頭)

招待講演

1. Ohtsu H “Phenotypic Character of Histidine Decarboxylase Gene-Knockout Mice” Temple University, Texas, September 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1 Ni, Pd の牛乳への添加実験

ニッケル

ミリQ水	水 Ni0	<0.24
	水 Ni1	0.79
	水 Ni10	8.67
	水 Ni100	91.95
	水 Ni1000	963.90
牛乳	Ni0	63.25
	Ni1	55.00
	Ni10	167.25
	Ni100	136.00
	Ni1000	1011.50
冷凍牛乳	Fro Ni0	52.25
	Fro Ni1	62.25
	Fro Ni10	60.50
	Fro Ni100	251.75
	Fro Ni1000	1130.00

パラジウム

ミリQ水	水 Pd0	<0.03
	水 Pd1	0.18
	水 Pd10	1.85
	水 Pd100	60.92
	水 Pd1000	933.30
牛乳	Pd0	9.00
	Pd1	7.00
	Pd10	17.25
	Pd100	124.00
	Pd1000	1069.75
冷凍牛乳	Fro Pd0	2.25
	Fro Pd1	3.25
	Fro Pd10	15.25
	Fro Pd100	115.50
	Fro Pd1000	1123.50

図2 ICP/MSによるNi, Pdの検量線

