

アレルギー発症にはCD8⁺ T細胞が関与すると考えられる。またβ2m欠損マウスおよびIFN-γ欠損マウスにおいて耳介の腫脹は観察されなかったこと、IFN-γ産生細胞がCD8⁺ NKG2D⁺ T細胞であったこと、金属投与部位においてNKG2Dリガンドの発現が誘導されることから、金属アレルギーの誘導によりCD8⁺ T細胞上にNKG2Dが誘導され、NKG2Dが共刺激分子として機能し、IFN-γの産生を通じた免疫応答により炎症が起こっていることが示唆された。

- 3) 三次元立体構築計算処理により、Pdアレルギーに関与するTCR α chainは、それ単独ではMHC class IIと相互作用することで安定な状態となることが示唆された。さらにPdアレルギーに関与するTCR Vβについての解析を行うことで、TCR αβとMHC分子との相互作用を*in silico*で解析することにより、抗原ペプチドのアンカー部分の予測が可能となる。
- 4) ワイヤーに含まれるNiの量（つまりワイヤーから溶出されるNiの量）に応じて炎症・線溶系関連分子の発現が誘導される可能性が示唆された。

E. 評価

1) 達成度について

金属アレルギーの診断・予防・治療に役立つ理論的基盤の確立を目指すことを目的とし、我々は特に、金属アレルギー動物モデルからの病態解明を目指してきた。これまでの成果として、

- ① 金属アレルギーの誘導によりCD8⁺ T細胞上にNKG2Dが誘導され、NKG2Dが共刺激分子として機能し、IFN-γの産生を通じた免疫応答が起こることが明らかとなった。また、TCRレパトアの解析により、Pdアレルギーに関わるTCR α chainのskewが認められ、*in silico*解析により、エネルギー状態を計算することで、抗原ペプチドアンカー部分の予測の可能性が示唆された。
- ② MHC分子を獲得したNK細胞が金属アレルギーに代表される遅延型過敏反応を調節している可能性が示唆された。

- ③ 実際に生体内に金属ワイヤーを埋め込んだ際に、Ni含有量が高い素材ほどその周辺組織において炎症・線溶系関連分子の発現が誘導されることが判明した。

このように金属アレルギーの診断・予防・治療に役立つ理論的基盤となる成果が得られたことから、当初の目的は十分達成できたと考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

金属アレルギーは、国際的に広く知られる疾患であり、罹患者数の増大は日本のみならず欧米においても深刻な問題となっている。その診断法は世界的にもパッチテストが主流であるが、パッチテスト試薬のメーカーごとにテスト金属の濃度が異なる、形状が異なるなど、一定の診断は非常に難しいと言わざるを得ない。また、十分な経験を積んだ医師によるパッチテストの実施と診断が必要であり、より簡便で的確な予測・診断法の確立が必要である。当研究班による金属応答性T細胞の同定解析は、患者自身の血液サンプルを解析することにより金属への感作の可能性の予測や、感作状況の診断に繋がるものであり、非侵襲性の診断法確率に向けて大変意義のあるものと考えられる。

3) 今後の展望について

これまでの研究成果を基盤に、臨床応用を見据えた開発研究を行う。特に我々は、モデル動物からアプローチし、研究を遂行する。当研究班が確立したT細胞レパトア網羅的解析法を発展させ、霊長類を用いて金属アレルギーモデルを構築し、T細胞レパトア解析を行う。マウスモデルで集積した情報を、今度はヒトにより近く、ヒトと同様に遺伝的多型が存在する霊長類にフィードバックすることで、金属に感作されやすいTCRや、金属に感作された場合のTCRの偏り等を細かく解析し、金属への感作予測および金属感作の診断へ向けた研究を展開していく。また、霊長類に直接金属を投与することで、金属結合ペプチドのライブラリー作製を通して、抗原ペプチドの探索を行う。以上により、研究修了時には金属種ごとに

答する T 細胞集団が特定され、発症の分子機構が判明し、革新的金属アレルギー予測・診断法が開発できると考えられる。

4) 研究内容の効率性について

実験技術・試薬等に関して研究代表者・分担研究者間で積極的に情報を交換することにより効率的に研究を遂行するできた。

F. 結論

- 1) 組織へ浸潤する T 細胞の定量解析はこれまで困難であったが、病理切片の免疫組織化学染色を行った病理切片を用いた Image cytometry 解析により可能となった。
- 2) Pd アレルギーにおいて、MHC class I を介した抗原提示により CD8⁺ T 細胞がエフェクター細胞として機能し、その際の共刺激分子は NKG2D である。また、金属投与により、CD8⁺ NKG2D⁺ T 細胞から IFN- γ が産生され、これにより免疫応答が起こる。
- 3) 三次元立体構築の結果、Pd アレルギーに関与する TCR α chain は MHC class II との interaction により安定であることが示唆された。
- 4) 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。
- 5) Ni が含まれる金属ワイヤーを生体に埋入することで、埋入部分において炎症・線溶系関連分子の発現が誘導される。

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表	5 件
原著論文による発表	0 件
それ以外（レビュー等）の発表	3 件
そのうち主なもの	
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. 中山勝文：Tim ファミリー分子を介したアポトーシス細胞貪食機構 2010 年 12 月

日本農芸化学学会誌

3. 垣生園子、中山勝文：免疫学研究者のための工具箱 翻訳 免疫生物学（原著第 7 版）2010 年 4 月 南江堂

学会発表

1. Ogasawara K. Immune-regulation in metal allergy. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, Dec., 2012
2. Nakayama M., Takeda K, Nakamura K, Ogasawara K. Trogocytosis-mediated generation of regulatory MHCII-dressed NK cells. The 41st Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Kobe, Dec., 2012.
3. Kawano M., Nakayama M, Aoshima Y, Sonofuchi K, Nakamura S, Watanabe M, Ogasawara K. Analysis of T cells on development of metal allergy. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, Dec., 2012
4. 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.
5. 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.

2) 海外

口頭発表	2 件
原著論文による発表	4 件
それ以外（レビュー等）の発表	0 件
そのうち主なもの	
論文発表	
原著論文	

1. Nakayama M, Kurokawa K, Nakamura K, Lee BL, Sekimizu K, Kubagawa H, Hiramatsu K, Yagita H, Okumura K, Takai T, Underhill DM, Aderem A, Ogasawara K. Inhibitory receptor paired Ig-like receptor B is exploited by *Staphylococcus aureus* for virulence. *J.Immuno.* 189 (12): 5903-5911 (2012).
2. Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, and 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: 18360-18365 (2011).
3. Kojima Y, Nakayama M, Nishina T, Nakano H, Koyanagi M, Takeda K, Okumura K, Yagita H. Importin b1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells. *J. Biol. Chem.* 286: 43383-43393 (2011).
4. Takeda K, Nakayama M, Sakaki M, Hayakawa Y, Imawari M, Ogasawara K, Okumura K, Smyth MJ. IFN- γ production

by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. *J. Leukoc. Biol.* 90: 777-785 (2011).

総説論文、著書

なし

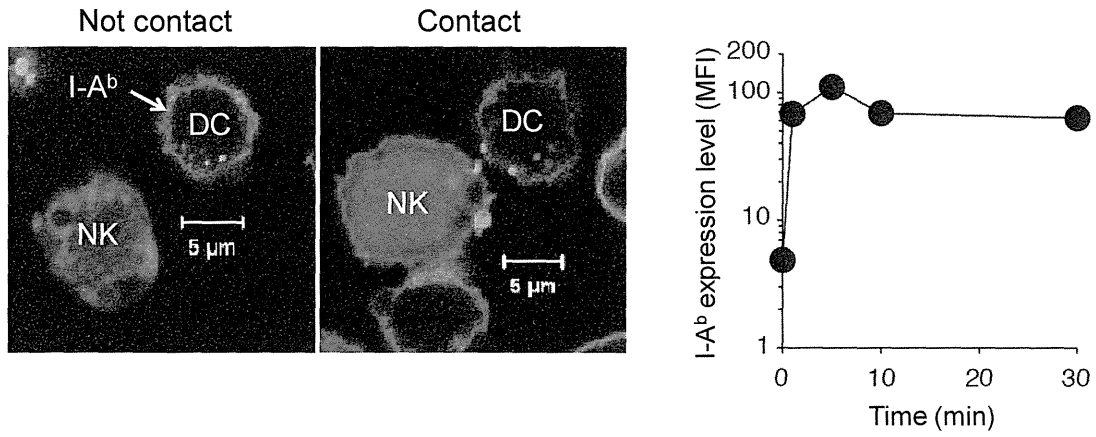
学会発表

1. Nakayama M, Aderem A, Kawano M, Okumura K, Takai T, Ogasawara K. *Staphylococcus aureus* binds to paired Ig-like receptor-B to suppress the innate immune response. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug., 2010.
2. Kawano M, Nakayama M, Ogasawara K. Specific T cells increased by metal allergy. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug., 2010.

H.知的財産権の出願・登録状況

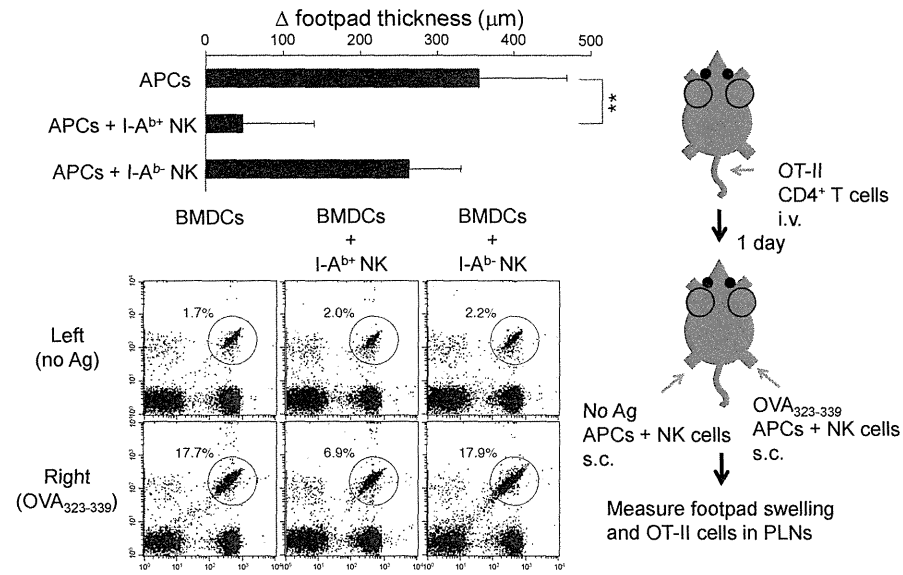
該当なし

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顎顔面外科学講座 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顎顔面外科学講座 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顎顔面外科学講座 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顎顔面外科学講座 大学院生

研究要旨

金属アレルギーは T 細胞によって引き起こされる遅延型アレルギー反応であるが、その抗原特異性ならびに病態発症メカニズムについては不明な点が多く、ヒトの病態解明に外挿性のある適切なモデル動物の確立が望まれている。我々は本研究において、既存の金属アレルギーマウスモデル(Sato N et al, Clin Exp Allergy, 2007)を一部改変し、パラジウム (Pd) とニッケル (Ni) 2 種金属アレルギーのモデルマウスを作製した。具体的には、金属を反復暴露させることによって、ヒト金属アレルギーで報告されている上皮内の T 細胞の浸潤、病変部組織のサイトカインプロファイル、そして浸潤 T 細胞に対する特異性に関する詳細な検討 (TCR repertoire 解析・CDR3 size spectratyping 解析・CDR3 アミノ酸配列解析) を可能とした。その結果、病変部組織では Pd・Ni ともに上皮内の T 細胞浸潤を認め、Th1 タイプのサイトカインの亢進を認めた。Pd では TCRAV18-1 の有意な上昇とクローナルな増殖を認め、Ni では NKT 細胞の有意な上昇を認めた。Ni アレルギーはヒトにおいても KNT 細胞の関与が報告されており、我々が作製したモデルマウスはヒト金属アレルギーと相溶性が高いと考えられた。現在までに、モデルマウスを用いて詳細な T 細胞解析を報告したものはほとんど存在せず、我々が作製したモデルマウスは新規性があり、今後アレルギーの診断・治療に寄与することと考えられた。

A. 研究目的

金属アレルギーは、歯科用金属や、金属装飾品など、身の回りにある様々な金属が原因となりアレルギー症状を引き起こす疾患として知られている。近年、金属装飾品をつける人口の増加や、補綴治療やインプラント治療などの医療技術の発展による金属曝露の機会の増大に伴って患者の数は増加している。その一方で、抗原特異性ならびに病態発症メカニ

ズムなど、金属アレルギーには不明な点が多く、ヒトの病態解明に外挿性のある適切なモデル動物の確立が望まれている。我々は、Pd を用いて既存の金属アレルギーマウスモデルを一部改変し、ヒト金属アレルギーに類似した新規金属アレルギーマウスモデルを確立した。続いて、金属アレルギーの原因金属として最も頻度の高い Ni を用いて、Ni と lipopolysaccharide (LPS) による感作、および

金属溶液による誘導を繰り返し行うことで Ni アレルギーマウスモデルを作製した。Pd と Ni それぞれのモデルマウスにおいて、病理組織学的検討、TCR レパトア、および各種サイトカインを解析することによって、アレルギー発症に関わる特異的な T 細胞を明らかにし、アレルギーの診断、治療に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

1) アレルギーモデルマウス作製

動物：Balb/c マウス (6 週齢、♀)

感作：Pd アレルギーモデルマウス：10 mM PdCl₂ + 10 µg/ml LPS を 125 µl ずつ左右の鼠径部に皮内注射。

Ni アレルギーモデルマウス：10 mM NiCl₂ + 10 µg/ml LPS を 125 µl ずつ左右の鼠径部に皮内注射。

誘導：Pd アレルギーモデルマウス：10 mM PdCl₂ を 25 µl ずつ左右の足底部に皮内注射。

Ni アレルギーモデルマウス：10 mM NiCl₂ を 25 µl ずつ左右の足底部に皮内注射。
条件検討：感作と誘導の適切な条件を明らかにするために、様々な条件で感作と誘導を行い、足底部腫脹の経時的変化及び、T 細胞浸潤の有無を解析した。足底部腫脹は誘導後から 24 時間毎に測定し、T 細胞浸潤の有無は、定量 PCR 法にて足底部における CD3 の mRNA の発現量の変化を測定することで評価した。尚、感作、誘導に生理食塩水を用いた個体を対照群とした。

2) 病理組織学的解析・免疫組織化学的解析

条件検討によって得られた、CD3 の発現量が最も多い感作 2 回、誘導 3 回後 7 日目の足底部を、HE 染色による病理組織学的解析ならびに、CD3、CD4、CD8 免疫染色による免疫組織化学的解析を行った。

3) TCR repertoire 解析

足底部に浸潤した T 細胞にどのような T 細胞が限局して集積しているかを明らかに

するために、T 細胞の特異性を決定している TCR repertoire を解析し、さらに抗原認識に大きな役割を担っている V ドメインに関して、各サブファミリーの発現頻度を網羅的に解析した。T 細胞浸潤が最も多く、ヒト金属アレルギーの病態に類似した感作 2 回、誘導 3 回後 7 日目のマウスの足底部を検体とした。対照群として感作、誘導を生理食塩水でおこなったマウスの脾臓を検体とした。各検体から Total RNA 抽出後、Adaptor-ligation PCR と Microplate hybridization assay を施行し、各 V ファミリーの蛍光強度を対照群と比較して有意に発現頻度の高いものを検出した。

4) Complementarity determining region 3 (CDR3)領域におけるシークエンス解析

TCR repertoire 解析によって、対照群より発現頻度が有意に高かった V ファミリーにおける CDR3 領域を明らかにするために、シークエンス解析を行った。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 領域シークエンスレベルの発現頻度を解析し、clonotyping を行った。

5) 各種サイトカインの解析

炎症部局所である Footpad (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 25 µL 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
- NKT cell markers
- Apoptosis factors

C. 研究結果

1-1) Pd アレルギーモデルマウス作製

感作2回誘導3回(2 Priming 3 Challenge)の条件下においてFoot pad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)。

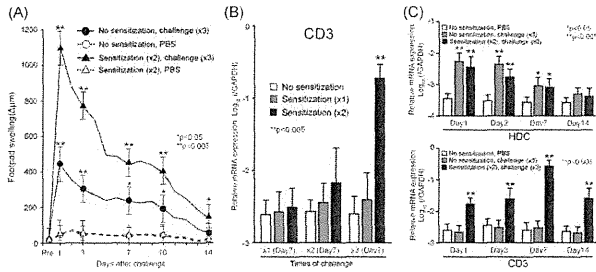


図1: Foot padの腫脹とT細胞遺伝子発現量

1-2) Niアレルギーモデルマウス作製

感作2回、誘導3回の条件では足底部の腫脹が他の条件と比較した中で最大であった。また、CD3の発現量を解析したところ感作2回、誘導3回の条件では、対照群と比べて誘導後3日目から有意に上昇し7日目で最大となった。他の条件では対照群と比較して有意な変化は無かった(図2)。

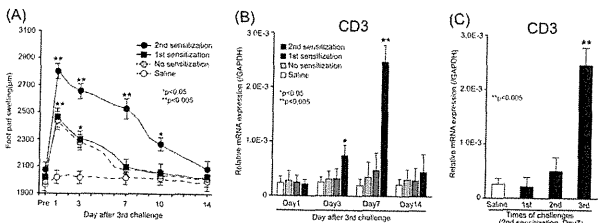


図2: Foot padの腫脹とT細胞遺伝子発現量

2) 病理組織学的解析・免疫組織化学的解析

Pdアレルギーモデルマウス

感作2回誘導3回(2 Priming 3 Challenge)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。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3)。

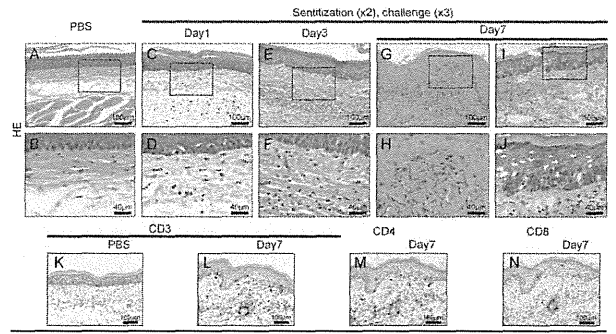


図3: HE染色および免疫染色

Niアレルギーモデルマウス

CD3の発現量が最大であった感作2回、誘導3回後7日目の足底部をHE染色による病理組織学的解析ならびに、CD3、CD4、CD8免疫染色による免疫組織化学的解析を行った。細胞浸潤を広範囲に認め、CD3のシグナルはヒト金属アレルギーと同じく上皮基底層周囲に認めた。興味深いことに上皮基底層周囲のT細胞はCD4、CD8共にnegativeであった。

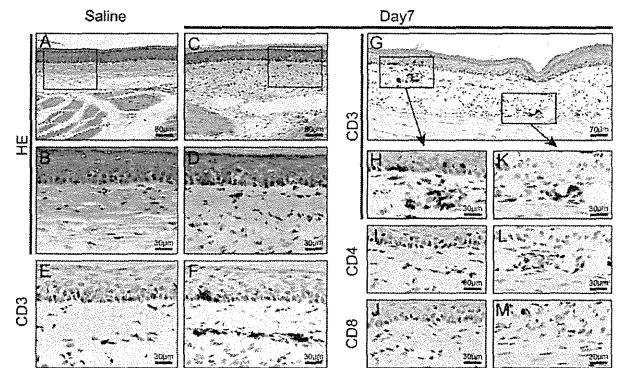


図4: HE染色および免疫染色

対照群 (A, B, E)、実験群(C, D, F-M)

3) TCR repertoire 解析

Pdアレルギーモデルマウス

TCRACV18-1、BV8-2が有意に増加していた。(図5)

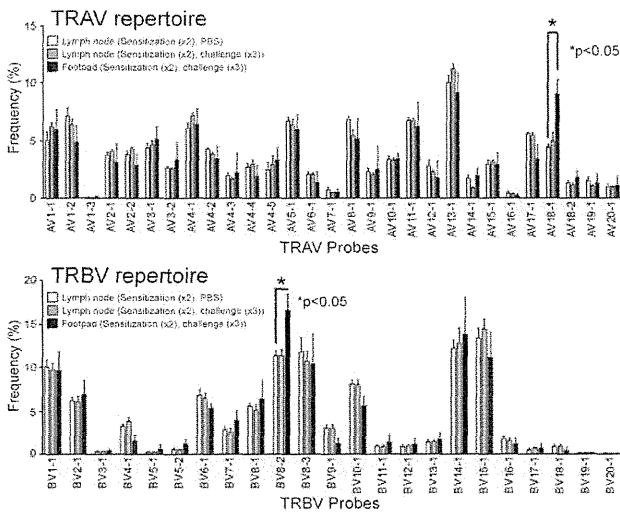


図 5 : TCR repertoire 解析

Ni アレルギーモデルマウス

TCRAV14-1、BV8-2 の発現頻度が有意に上昇していた (図 6)。

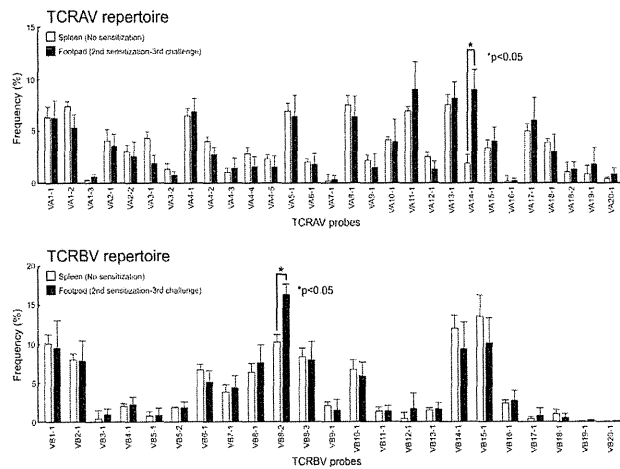


図 6 : TCR repertoire 解析

4) Complementarity determining region 3 (CDR3)領域におけるシークエンス解析

Pd アレルギーモデルマウス

CDR3 アミノ酸配列解析においては、TCRAV18-1 は複数の同一クローンを個体間で認めた。一方、TCRBV8-2 では同一クローンは認められなかった (表 1)。

AV18-1					BV8-2						
Clonal frequency	AV18-1	V	J	J gene	Clonal frequency	BV8-2	V	J	J gene		
#1	12/17	CAT	LYSGGS	NAKLFY	AJ42	↑	4/17	CAS	GRVAAGA	GNLYGF	BJ1.3
	3/17	GAP	HNTMNN	TGKLFY	AJ27		4/17	CAS	GRVAAGA	TGOLYGF	BJ2.2
	2/17	CAT	ERGGGS	NYKLFY	AJ55		3/17	CAS	GGRRRGR	AGYGF	BJ2.1
#2	7/17	CAT	LYSGGS	NAKLFY	AJ42	↑	3/17	CAS	GGRRRGR	TEVGF	BJ1.1
	5/17	CAT	VTGG	NYKLFY	AJ25		1/17	CAS	GDADRQ	SNEIFGF	BJ1.4
	2/17	CAT	DYSGGS	NAKLFY	AJ52		1/17	CAS	GGWGG	SGNLYGF	BJ2.2
#3	6/20	CAH	YNTN	TGKLFY	AJ27	↑	1/17	CAS	SDA	NLYGF	BJ2.4
	5/20	CAT	LYSGGS	NAKLFY	AJ42	↑	1/17	CAS	SGQD	QDYOYGF	BJ2.5
	2/20	CAT	GATH	TGKLFY	AJ27	↑	4/18	CAS	GEPLYWF	SGNLYGF	BJ2.4
#4	8/17	CAT	LYSGGS	NAKLFY	AJ42	↑	2/18	CAS	GRYGA	SGNLYGF	BJ1.3
	2/17	CAT	INSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	3/18	CAS	GERTGV	VEYGF	BJ2.7
	1/17	CAT	ATSS	QDKLFV	AJ10		1/18	CAS	GR	NLYGF	BJ1.2
#5	6/20	CAH	YNTN	TGKLFY	AJ27	↑	1/18	CAS	GVSGR	NLYGF	BJ1.3
	3/20	CAT	FYSGGS	NYKLFY	AJ55	↓	1/18	CAS	GDRYK	NLYGF	BJ1.2
	1/20	CAT	GATH	TGKLFY	AJ27	↑	1/18	CAS	SEGTGK	QDYOYGF	BJ2.5
#6	1/17	CAT	GOSA	LSRFLH	AJ18	↑	1/18	CAS	GDGLGRR	VEYGF	BJ2.7
	1/17	CAH	YNTN	TGKLFY	AJ27	↑	3/17	CAS	GDVO	NYAEGYGF	BJ2.1
	1/17	CAL	SSN	TDKLVV	AJ34		3/17	CAS	GDAPGG	AEIYGF	BJ2.3
#7	1/17	CAT	LYSGGS	NAKLFY	AJ42	↑	2/17	CAT	GEQG	SPLVYF	BJ1.6
	1/20	CAT	INSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	3/17	CAS	GR	EQYGF	BJ2.7
	1/20	CAT	GGSS	NYKLFY	AJ52	↓	1/17	CAS	GGGTSQ	NLYGF	BJ1.3
#8	1/20	CAT	INSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	1/17	CAS	GLTDSG	NLYGF	BJ1.3
	1/20	CAT	NSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	5/15	CAS	GGAPGGG	EQYGF	BJ2.7
	1/20	CAT	GGSS	NYKLFY	AJ52	↓	3/15	CAS	GGGGF	SYNSLYGF	BJ1.5
#9	1/20	CAT	NSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	3/15	CAS	GDARVGA	VEYGF	BJ2.7
	1/20	CAT	NSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	2/15	CAS	KRSGG	SDTYGF	BJ1.2
	1/20	CAT	NSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	2/15	CAS	SDIV	NQDYOYGF	BJ2.5
#10	1/20	CAT	NSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	3/18	CAS	GDVVTGD	NTEVGF	BJ1.1
	1/20	CAT	NSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	4/18	CAS	GRDVA	ETLYGF	BJ2.3
	1/20	CAT	NSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	4/18	CAS	GLFE	AEIYGF	BJ2.3
#11	1/20	CAT	NSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	2/18	CAS	GEVAD	GNLYGF	BJ2.4
	1/20	CAT	NSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	1/18	CAS	GA	NERFGF	BJ1.4
	1/20	CAT	NSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	1/18	CAS	PGG	QDPLGF	BJ1.5
#12	1/20	CAT	NSGGG	NYKLFY	AJ55	↓	1/18	CAS	GLL	PVLDDGH	BJ1.7

表 1: TCRAV18-1 TCRBV8-2 における CDR3 アミノ酸配列解析

Ni アレルギーモデルマウス

Va14-1 においては全ての個体で高頻度で invariant なアミノ酸配列である Va14Ja18 が検出された (表 2-A)。Vb8-2 では全ての個体で全く同じアミノ酸配列は検出できなかったが、Jb2.7 が高頻度に検出された (表 2-B)。この結果は NKT 細胞が誘導されたことを示唆する結果であった。

Footpad	Clonal frequency	V	N	J	J gene
#1	14/14	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
#2	12/13	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
	1/13	CVG	LL	NSGGSNYKLTFG	AJ53
#3	13/14	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
	1/14	SVV	W	ASSFSKLVFG	AJ50
#4	16/16	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
	9/11	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
#5	1/11	CVV	G	ATGGNNKLTFG	AJ56
	1/11	CVV	GA	DSGYNKLTFG	AJ11
	15/15	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
#6	12/15	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
	1/15	CVV	V	DRGSALGRLHFG	AJ18
	1/15	CAV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18
#7	1/15	CV	V	VNTGNYKYVFG	AJ40

^{a)}Identical sequences were detected in different individual mice.

表 2-A: Va14-1 CDR3 領域シークエンス

Sample	Number of clone	TCRBJ gene usage in TCRBV8-2 (%)													
		1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.7	
Footpad	#1	12	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0	8.3	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	75.0
	#2	15	0.0	0.0	13.3	13.3	0.0	13.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.3	46.7
	#3	14	21.4	0.0	14.3	0.0	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	14.3	0.0	42.9
	#4	12	8.3	0.0	41.7	0.0	0.0	8.3	0.0	8.3	0.0	0.0	8.3	0.0	25.0
	#5	14	14.3	0.0	35.7	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.1	0.0	35.7
	#6	11	9.1	9.1	9.1	0.0	0.0	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	63.6
	#7	16	18.8	0.0	12.5	0.0	6.3	6.3	0.0	6.3	0.0	6.3	0.0	0.0	43.8
	mean	10.3	1.3	18.1	4.1	0.9	7.5	0.0	3.3	0.0	0.9	6.2	0.0	47.5	
	SD	8.5	3.4	15.0	5.5	2.4	4.0	0.0	4.1	0.0	2.4	6.3	0.0	16.8	
Spleen	#1	12	8.3	0.0	50.0	8.3	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	16.7	0.0	8.3
	#2	14	14.3	7.1	14.3	7.1	0.0	21.4	14.3	0.0	7.1	7.1	0.0	7.1	0.0
	#3	16	0.0	12.5	6.3	0.0	12.5	6.3	12.5	6.3	12.5	6.3	6.3	12.5	0.0
	#4	11	9.1	0.0	9.1	9.1	0.0	18.2	0.0	9.1	18.2	9.1	9.1	9.1	0.0
	#5	12	0.0	16.7	8.3	16.7	8.3	0.0	16.7	8.3	8.3	0.0	8.3	0.0	8.3
	#6	14	14.3	0.0	14.3	7.1	7.1	0.0	7.1	0.0	14.3	14.3	0.0	0.0	0.0
	#7	15	13.3	6.7	0.0	0.0	13.3	0.0	6.7	13.3	13.3	6.7	6.7	13.3	6.7
	mean	8.5	6.1	14.6	6.9	5.9	8.8	6.3	7.2	7.6	7.1	8.8	5.1	5.1	
	SD	6.3	6.7	16.4	5.7	5.9	8.3	7.0	5.4	6.6	5.6	5.5	5.3	5.1	

^{a)}TCRBJ 2.7 gene usage of footpad was significantly increased than those of spleen (unpaired t-test $p < 0.05$).

表 2-B:Vb8-2 における Jb 領域発現頻度

5) 各種サイトカインの解析

Pd アレルギーモデルマウス

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: 2 Priming 3 Challenge、最終誘導注射後 1w) は Th1 タイプのサイトカインの亢進を認めた。さらに CD3、CD8、CD25 (IL-2R)、CD69、Fas の発現レベルがコントロール群に比べて有意に増加した (図 7)。

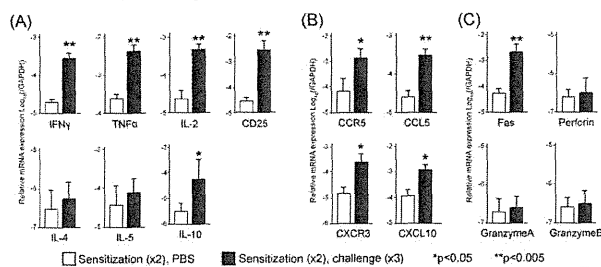


図 7: 誘導注射後 1 週間での Footpad サイトカインプロファイル

Ni アレルギーモデルマウス

NKT 細胞関連分子 (Va14Ja18、NKG2D、CD161c)、Th1 サイトカイン(IFN- γ 、TNF- α 、IL-2)及び、細胞障害性因子(FasL、perforin、granzymeA、granzymeB)は誘導後 3 日目では対照群と比較して有意に上昇し 7 日目で最大となった (図 8-A, B, D)。一方 Th2 サイトカインは対照群と比較して有意な変化は無かった (図 8-C)。以上より NKT 細胞は誘導後期に局所に集積し、Th1 偏性で細胞障害を誘導していることが示唆された。

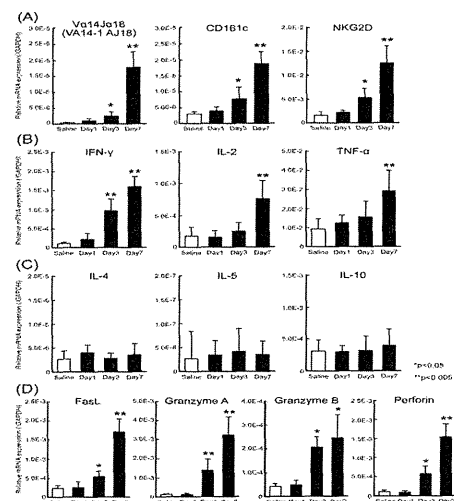


図 8: NKT 細胞関連分子 (A), Th1 サイトカイン (B), Th2 サイトカイン (C), 細胞障害性因子 (D)

D. 考察

マウスに感作、誘導を繰り返し行うことによって Pd・Ni とともに足底部に T 細胞誘導を認めるアレルギーモデルマウスを確立した。IV 型アレルギー反応は、様々な抗原や環境アレルゲンに繰り返し曝露されることによって惹起される疾患である。金属アレルギーモデルマウスの確立には一般的なアレルギー惹起の過程と同じように抗原である金属を繰り返し感作、誘導することが必要であると考えられた。

Pd アレルギーモデルマウスにおいては、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 細胞が、特定の TCR ファミリーを高度に使用し、抗原特異的であることが考えられた。また個体間で共通して得られた TCR クローンが、複数の Va 鎖、V β 鎖から構成されたことは、生体が認識しえる金属によって修飾されたエピトープが複数に及ぶことを反映しているものと推測された。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た。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)。

Ni によって集積した T 細胞は TCR レパトア解析の結果から NKT 細胞であることが示唆された。近年、ヒトのアレルギー性接触性皮膚炎において NKT 細胞の関与が報告されており (Gober MD et al, J Invest Dermatol. 2008 Jun; 128 (6): 1460-9.)、また、無症状の皮膚に活性化した NKT 細胞を注射すると症状を誘発することから、NKT 細胞は病態惹起に深く

関わっていると考えられている (Brian J. Nickoloff et al: Arch Dermatol. 1999; 135 (5): 546-552.)。本研究における Ni アレルギーマウスモデルにおいても NKT 細胞が局所炎症巣に誘導され、Th1/Th2 バランスは Th1 偏性で、細胞障害性因子の発現量が NKT 細胞の発現頻度と比例して増加していることから、NKT 細胞が組織傷害を誘発し病態を惹起している可能性が考えられた。

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。
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同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。
4. Ni アレルギーでは NKT 細胞が局所炎症巣に誘導され、病態を惹起している可能性が考えられる。

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, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R. A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. *J Immunol Methods*. 2012 Oct 31; 384 (1-2): 81-91.
2. Kurane I, Matsutani T, Suzuki R, Takasaki T, Kalayanarooj S, Green S, Rothman AL, Ennis FA. T-cell responses to dengue virus in humans. *Trop Med Health*. 2011 Dec; 39(4 Suppl): 45-51.
3. Wake M, Hamada Y, Kumagai K, Tanaka N, Ikeda Y, Nakatani Y, Suzuki R, Fukui N. Up-regulation of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor-A in the synovial fluid of temporomandibular joints affected by synovial chondromatosis. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Apr 2. [Epub ahead of print]
4. 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*. 2012 Jul; 114 (1): e9-14.
5. Kazutoshi Nakaoka, Hiroyuki Yamada, Toshikatsu Horiuchi, Tomoyuki Saito, Go Arai, Kenichi Kumagai, Ko Ito, Yoshiki Hamada. A case of simple bone cyst in the mandible with remarkable tooth resorption. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*. 2012, in press.
6. Minoru Ito, Kenichi Kumagai, Nobuoki Sakai, Yutaka Fukushima, Yoshiki Hamada. Penetrating transoral cranial injury by a chopstick through the jugular foramen: report of a case. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*. 24 (2): 101-105, 2012
7. 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.* 2011; 187 (8): 3919-30.

8. Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R. Immune-related gene expression profile in laboratory common marmosets assessed by an accurate quantitative real-time PCR using selected reference genes. *PLoS One.* 2013; 8 (2): e56296.
9. Kobayashi H, Kumagai k, Gotoh A, Eguchi T, Yamada H, Hamada Y, Suzuki S, Suzuki R. Upregulation of epidermal growth factor receptor 4 in oral leukoplakia. *Int J Oral Sci* 2013, in press

2. 学会発表

国内学会

1. 熊谷賢一, 藤井恵介, 北浦一孝, 江口貴紀, 重松宏昭, 岸 悠太, 山田浩之, 川口浩司, 鈴木隆二, 濱田良樹 口腔癌の頸部リンパ節転移における腫瘍免疫応答の解明 第25回日本口腔診断学会・第22回日本口腔内科学会 合同学術大会 2012.9.21-22
2. 江口貴紀, 小林浩, 熊谷賢一, 重松宏昭, 後藤哲人, 濱田良樹, 鈴木隆二 新規金属アレルギーモデルマウスの作製とT細胞発現解析 第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会 2012.5.17-18 広島国際会議場(若手優秀ポスター賞受賞)
3. 小林浩, 江口貴紀, 熊谷賢一, 重松宏昭, 後藤哲人, 濱田良樹, 鈴木隆二 新規金属アレルギーモデルマウスにおける網羅的T細胞レセプター解析 第66回

NPO 法人日本口腔科学会学術集会
2012.5.17-18 広島国際会議場(若手優秀
ポスター賞受賞)

3. 海外学会

1. Hiroyuki Yamada, Kazutoshi Nakaoka, Toshikatsu Horiuchi, Kenichi Kumagai, Tomoko Ikawa, Yuko Shigeta, Mitsuyoshi Iino, Takumi Ogawa, Yoshiki Hamada. CAD-ASSISTED MANDIBULAR RECONSTRUCTION USING CUSTOM-MADE TITANIUM MESH TRAY AND PARTICULATE CANCELLOUS BONE AND MARROW HARVESTED FROM BILATERAL POSTERIOR ILIA. XXI Congress of the European Association for Cranio-Maxillo- Facial Surgery, Dubrovnik, Croatia, 11-15 September 2012.
2. Kenichi Kumagai, Hiroshi Kobayashi, Akito Gotoh, Takanori Eguchi, Hiroyuki Yamada, Ryuji Suzuki, Yoshiki Hamada. Synchronous modulation of epidermal growth factor receptor family genes in oral premalignant lesions. 20th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. Santiago, Chile, November 1-4, 2011.
3. Yoshiki Hamada, Masahiro Wake, Kenichi Kumagai, Kazutoshi Nakaoka, Hiroyuki Yamada, Nakatani Yasunori, Ryuji Suzuki, Naoshi Fukui. Up regulation of IL-6 and VEGF-A in the synovial fluid of temporomandibular joint affected by synovial chondromatosis. 20th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. Santiago, Chile, November 1-4, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず

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
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
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。その結果現在実際のヒト・サンプルを測定できるようになった。臨床サンプルである汗、血液、尿、唾液などで金属イオンを測定している。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た。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。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た。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た。さらにヒスタミン産生細胞の病理学的な解析を進めている。

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抗原として作用し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、予後の判定などに役立つ。このため工学的に生体内金属測定し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) 金属ワイヤーのマウスへの植え込み実験

C57BL/6 マウス (雄性、6 wks)の背部皮下に金属ワイヤー (直径 0.8 mm、長さ 5 mm)

を埋入し、72 時間後、ケタラル麻酔下頸動脈切断により全血を採血し致死させた。ワイヤーを中心として直径 15 mm の皮膚組織をセラミック製のハサミおよびピンセットを用いて採取、重量を測定し、ドラフト内で皮膚サンプルに 69 %硝酸 3 mL を加えて、80°C で約 20 分間インキュベートした。その後、氷上で 30 %過酸化水素水 0.3 mL を加えて突沸に気を付けながら約 10 分間かけて加温し、皮膚サンプルを完全に溶解した。これを MilliQ 水で全量 10 mL とし、ICP-MS により金属濃度を測定した。血清中の金属濃度は、0.1 ml の血清に 69 %硝酸 3 mL を加え、以下同様に測定した。

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。

2) 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（100 ppb）あるいはパラジウム標準液（1000 ppm）を添加し、最終濃度を 0 ppb、1 ppb、10 ppb、100 ppb、1000 ppb (=1 ppm) 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 °C, 5 min → 170 °C, 5 min → 200 °C, 10min → 220 °C, 15 min 処理する。これによって、牛乳は分解され超純水を加えて 25 ml 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。

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 にて測定する。

3) 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。

4) 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、蛍光色素遺伝子が入った 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。マウスは、腹腔内に大腸菌を植え込む実験をして肥満細胞やマクロファージに蛍光発光が見られることを FACS を使って確認している。

C. 研究結果

1) マウスにおける金属ワイヤー埋め込み実験

ニッケルワイヤーを埋入して 3 日後では、組織中のニッケル濃度は 4000 ppb (4000 ng/g tissue) と著しく増加した。このときニッケルワイヤー周囲組織では強い炎症反応が生じていた。このとき血清中のニッケル濃度も増大し、ワイヤー周囲組織の 8~10 分 1 の濃度を示した。

2) 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。100 ppb 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。そこで、前処理に硝酸に加えて過酸化水素水を加えることによりさらに分解を進

めたことにより、測定精度が増した。また、金属イオンを真空部に送るインターフェイスに Ni, Pd を用いない材料を使用し測定中の持ち込みをなくすことで、さらに精度を増すこととなった。(表 1 および表 2)。

図 1 は上記の改善点を加えた実験で、ばらつきの点ではまだ問題があるが、添加したニッケルおよびパラジウムの量を反映した実験結果が出てきており、母乳の測定が可能であった。

3) レポーター動物

トランスジェニックマウス

当初、プラスミッドを使用してトランスジェニックマウスの作製に取り掛かった。プラスミッドを使って作成した 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られるものであるかどうかには疑問がある。そこで方針を転換し、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図 1 の通りであり、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、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 2)、c-kit positive な細胞の中に、GFP が強い細胞があり、肥満細胞と考えた。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。

私たちは、以前ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子ノックアウトマウス (以下 HDC-KO mouse) を用いて、大腸菌を用いた腹腔炎モデルマウスを作製した。その結果、このノックアウト

マウスは、大腸菌の排除速度を上げることから、ヒスタミンは感染においても重要な働きをすることを示唆していると考えた。今回のトランスジェニックマウスを用いて、同様に腹腔内に大腸菌を注入した後で、腹腔内の細胞を採取し、その蛍光発光を観察すると (図 3)、蛍光発光が強まることを観察している。従って、大腸菌は腹腔内において腹腔細胞におけるヒスタミンの合成酵素遺伝子の転写を高めることが推察された。

D. 考察

1. 添加実験

検量線を見ると 1 ppb level から測定可能であるに、実際の検体では 100 ppb 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。今回、前処理の条件を変化させ、インターフェイスの材質を変えることによってある程度の感度を獲得できることが出来た。現在、感度が上がったところで、実際のサンプルでの測定を行なっている。

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し、2 系統のトランスジェニックマウスを維持している。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。さらに腹腔中に大腸菌を注入して、GFP の誘導が確認された。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出現することまで確かめているが、今後どのような種類の細胞であるかについて考察を深める。

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おこない、サンプル数を増やしている段階まで来ている。

レポーターマウスの作製は終了した。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

G.研究発表

1.論文発表

1)原著論文

1. Hu WW, Fang Q, Xu ZH, Yan HJ, He P, Zhong K, Fan YY, Yang Y, Zhang XN, Zhang CY, Ohtsu H, Xu TL, Chen Z. Chronic H1-Antihistamine Treatment Increases Seizure Susceptibility After Withdrawal by Impairing Glutamine Synthetase. *CNS Neurosci Ther* 18: 683-90, 2012
2. Matsushita, Ayuko; Seike, Masahiro; Okawa, Haruka; Kadowaki, Yayoi; Ohtsu, Hiroshi. Advantages of histamine H4 receptor antagonist usage with H1 receptor antagonist in murine allergic contact dermatitis. *Exp Dermatol*. 21: 714-5, 2012
3. 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*. 32:17-25, 2012
4. 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*. 18: 1-9, 2012
5. Fukie Nijjima-Yaoita, Masahiro Tsuchiya, Hiroshi Ohtsu, Kazuhiko Yanai, Shunji Sugawara, Yasuo Endo, and Takeshi Tadano. Roles of Histamine in Exercise-Induced Fatigue: Favouring Endurance and Protecting Against Exhaustion. *Biol Pharm Bull* 35: 91-97, 2012
6. 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*.

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。

F. 研究危険情報

なし

- 495:110-4, 2011
7. 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*. 62:50-7, 2011
8. Ke-Yong Wang, Akihito Tanimoto, Xin Guo, Sohsuke Yamada, Shohei Shimajiri, Yoshitaka Murata, Yan Ding, Masato Tsutsui, Seiya Kato, Teruo Watanabe, Hiroshi Ohtsu, Ken-Ichi Hirano, Kimitoshi Kohno, and Yasuyuki Sasaguri. Histamine deficiency decreases atherosclerosis and inflammatory response in ApoE-KO mice independently on serum cholesterol level. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol*. 31: 800-807, 2011
9. 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: 305-14, 2011
10. 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
11. Gong YX, Shou WT, Feng B, Zhang WP, Wang HJ, Ohtsu H, Chen Z. Ameliorating effect of histamine on impairment of cued fear extinction induced by morphine withdrawal in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Acta. Pharmacol. Sin*. 31: 1431-1437, 2010
12. 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

13. Noriyasu Hirasawa, Yoshiaki Goi, Rina Tanaka, Kenji Ishihara, Hiroshi Ohtsu, Kazuo Ohuchi. Involvement of prostaglandins and histamine in nickel wire-induced acute inflammation in mice. *J Biomed Mater Res A* 95: 1306-1311, 2010
14. Masahiro Seike, Kanako Furuya, Momoyo Ohmura, Kumiko Watanabe, Hiroshi Ohtsu. Histamine H4 receptor antagonist ameliorates chronic allergic contact dermatitis induced by repeated challenge. *Allergy* 65: 319-326, 2010

2) 総説論文

1. Hiroshi Ohtsu. Pathophysiologic Role of Histamine; Evidence Clarified by Histidine Decarboxylase Gene Knockout Mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (minireview) 158 (suppl 1): 2-6, 2012

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. Histamine H₄ receptor: a novel drug target for immunoregulation and inflammation. Chapter 5. Histamine in atopic disorders. W. Bäumer, T. Werfel, R. Seifert, M. Kietzmann, D. Neumann, R. Khanferyan, H. Ohtsu, E. Masini, S.E. Dahlén, B. Dahlén, A. Sydbom, R. Gutzmer (in press)

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
2. 東北大工 大津 浩 「W1-1 生体内イオン化金属の定量と金属アレルギーにおけるヒスタミンの役割」第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (招待講演) ワークショップ 1 金属アレルギーの発症メカニズムと対策 座長 山内広平、高橋一夫 東京国際フォーラム 2010 年 11 月 25~27 日 (発表 25 日)
3. 東北大工 (院生) 青島有佑, 東北大工 上田恭介, 大津浩, 成島尚之, 東北大加齢研 小笠原康悦, 東北大薬 平澤典保 「金属系材料のマウス皮下における腐食挙動」日本金属学会 第 147 回大会 (2010 年秋期) 北海道大学 2010 年 9 月 25~27 日 (発表 26 日)

3) 招待講演、シンポジウム

招待講演

1. European Histamine Research Society: COST action: Nov. 18, 2012 Malaga, Spain **Plenary Lecture** The biological activity of histamine clarified using histidine-decarboxylase gene -manipulated mice. -----The power of interaction with Japanese colleagues

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1 今回の Ni, Pd の牛乳への添加実験

(前処理に硝酸を加え、インターフェイスに Ni, Pd 以外の素材を使用)

添加金属最終濃度(μg/L)	Ni	Pd
0	55.2	20.6
0	32.8	15.8
0	73.2	16.8
1	38.0	18.2
1	53.2	16.8
1	46.2	17.4
10	65.0	27.8
10	60.0	27.8
10	68.6	27.0
100	161.4	132.4
100	122.6	92.6
100	159.2	137.8
1000	1037.8	1094.2
1000	1030.6	1047.2
1000	1044.8	965.8

表 2 前回の牛乳への Ni, Pd の添加実験

添加金属最終濃度(μg/L)	Ni	Pd
0	81.50	11.50
0	87.75	11.25
0	133.25	12.25
1	42.25	12.75
1	61.00	12.75
1	31.75	10.25
10	41.50	21.50
10	34.00	19.00
10	53.50	9.50
100	168.25	112.50
100	147.25	122.75
100	139.75	90.50
1000	986.25	1098.50
1000	1031.00	987.25
1000	951.25	1004.00

図 1

BAC を用いた HDC 転写レポーターマウスの作製過程

BAC DNA modification

BAC Homologous recombination and Neomycin-resistant gene (neo) deletion

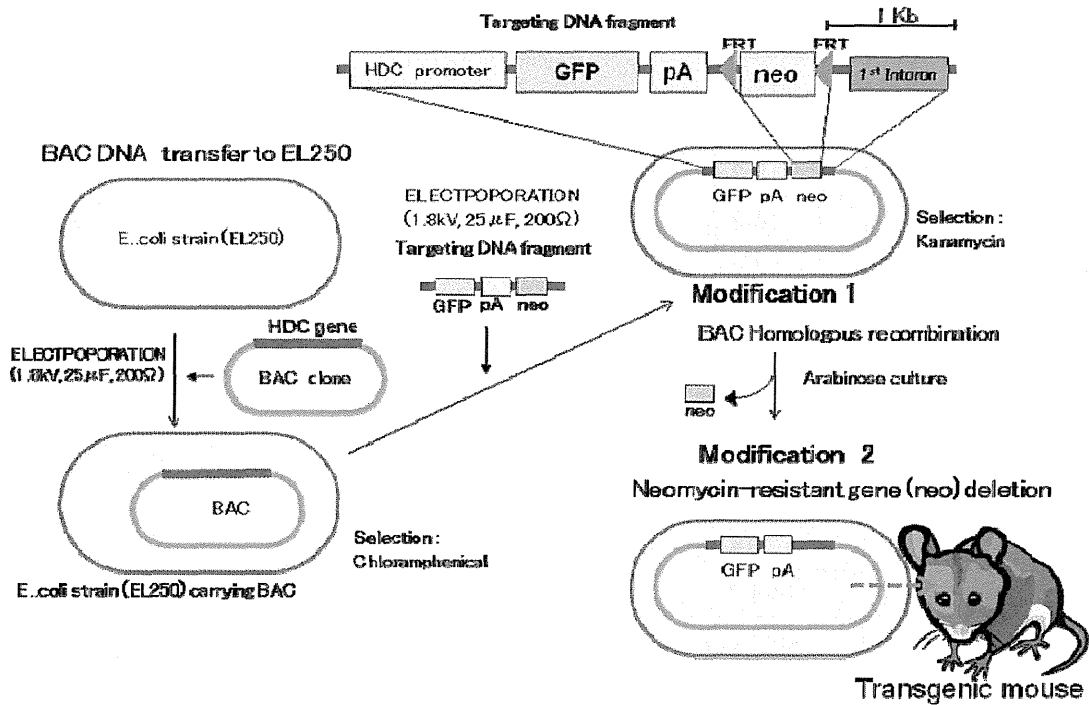
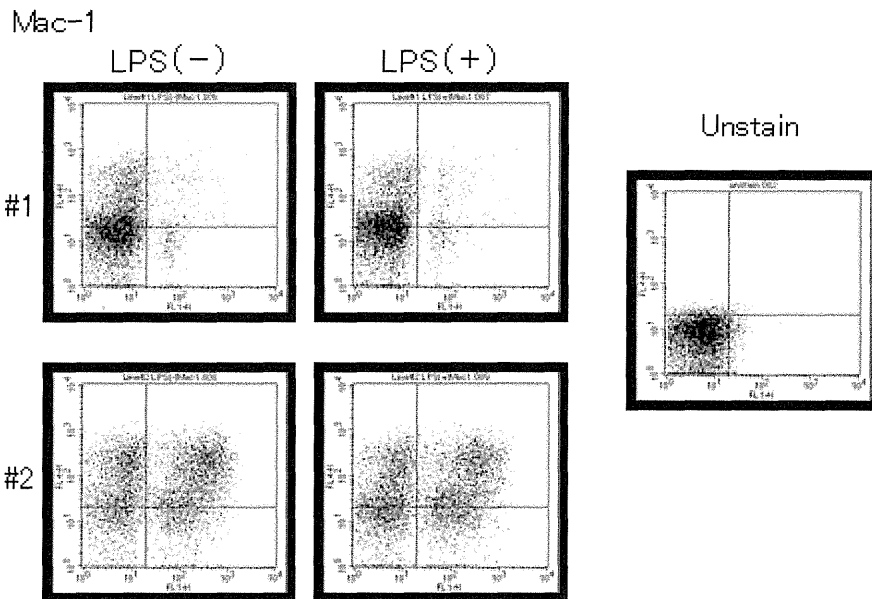


図 2. 腹腔細胞の LPS 刺激前後における GFP の発現



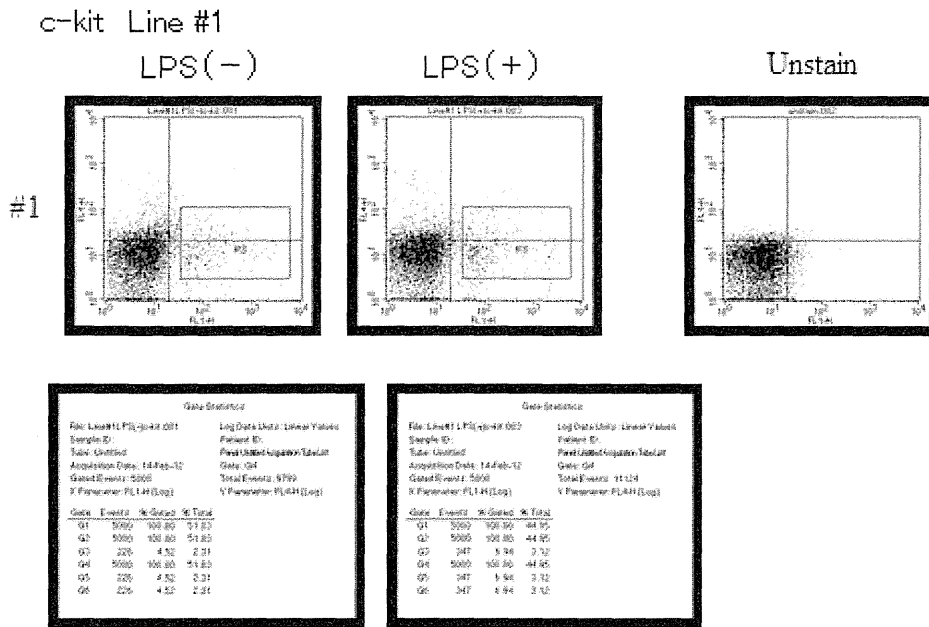
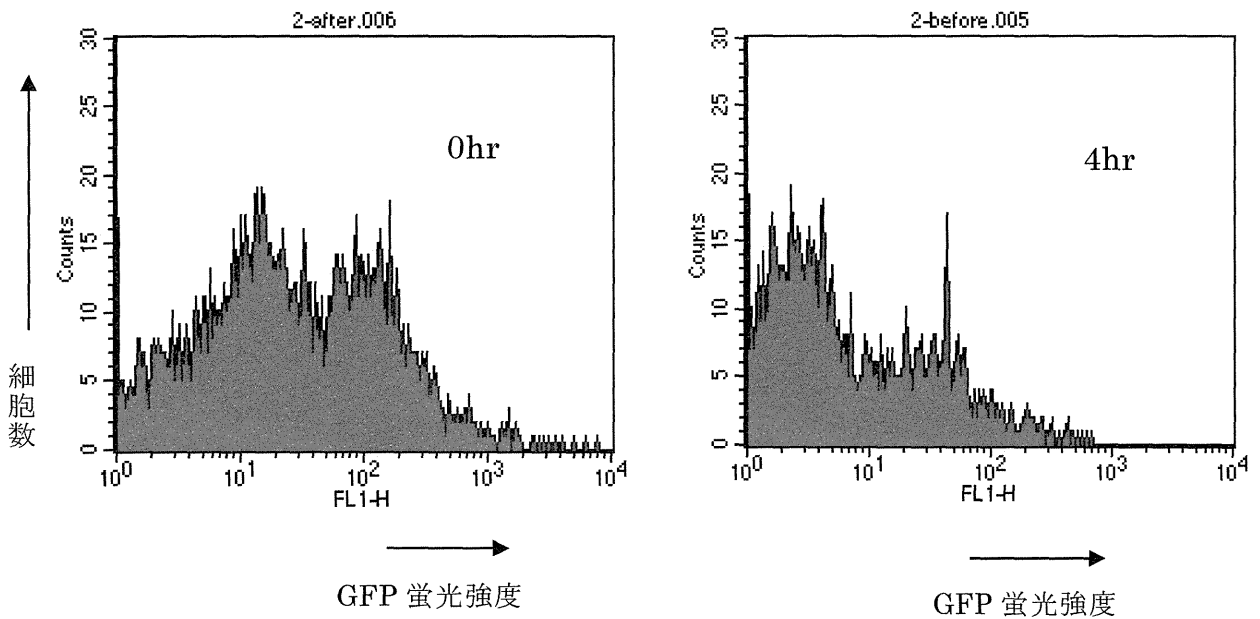


図 3. E.coli 腹膜炎モデルにおける腹腔細胞の蛍光発光



HDC-GFP BAC マウスの腹腔内の細胞を Tyrode バッファーを用いて Lavage する。さらにそのマウスの腹腔内に E.coli を 1×10^8 CFU 注入し、4 時間後に再度 Tyrode バッファーを用いて Lavage し FACS にて解析した。