

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500431

研究課題名（和文） GATA-3分子を基盤とした金属アレルギー誘導能と形状記憶合金の生体適合性評価

研究課題名（英文） Examination of metal allergy induction ability and biocompatibility assessment of a shape memory alloy based on GATA-3 molecule

研究代表者

玉内 秀一（TAMAUCHI HIDEKAZU）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：60188414

研究成果の概要（和文）： 金属アレルギーへの Th2 型免疫反応の関わりを Th2 型免疫反応をより著明に示す GATA-3 遺伝子導入トランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、Th1 型免疫反応を有意とすると考えられていた金属アレルギーの発症機序に、Th2 型免疫反応も関与していることが示唆されたと共に、GATA-3 遺伝子導入トランスジェニックマウスをば生体材料の開発に有用なマウスになることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： The precise roles of T helper (Th)1-type and Th2-type cytokine responses in nickel (Ni)-induced allergic contact dermatitis have not yet been clearly defined. We investigated the involvement of Th2 cytokines in Ni-induced contact hypersensitivity reaction using GATA-3 transgenic (Tg) mice. We confirmed the participation of Th2-type immune reactions in Ni-induced allergy using GATA-3 Tg mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード： 金属アレルギー、生体適合材料 GATA-3、形状記憶合金、 Th2

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は、GATA-3 転写因子が Th2 型アレルギー疾患の制御に重要な役割を担っていることを *in vivo* に於いて喘息・寄生虫感染モデルを用いて明らかにした。Th1/Th2 パラダイムの概念に基づいて多くの疾患の誘導機序が考察されてきたが、我々のこれまでの実験結果からはどちらかへのシフトは観察されるものの、全身レベルに於いて決して Th1/Th2 の機能が減弱されておらず正常レベルで維持されていることや Th1/Th2 のどちらかへの偏りは、*in vitro* での人為的な誘導により観察される反応であることが示唆された。また、近年 ES 細胞や iPS 細胞を用いた再生医療が話題となりその分野における研究に大きな進歩がみうけられるが、臨床応用までにはしばらく時間を要することは事実である。この問題を解決する手段として、現在一般的に用いられている方法は生体材料を用いた代用臓器の開発である。しかし、生体材料に対する宿主の生体反応が大きな問題となっている。その生体反応とは、生体材料を構成する成分、種々の金属に対するアレルギーで、そのアレルギー反応の低減は生体材料開発にとって非常に重要な課題である。金属アレルギーはこれまでに Th1 型免疫反応を介した反応であるとされていたが、Th1/Th2 パラダイムの概念への疑問から、再度金属アレルギー反応への Th2 型免疫反応の関わりを Th2 型免疫反応をより著明に示す GATA-3 遺伝子導入トランスジェニックマウスを用いて、金属アレルギーの発症機序について検討することを本研究課題の目的とした。特に生体材料として注目を浴びている金属、チタンニッケル合金について検討を加えた。

2. 研究の目的

金属アレルギーは、歯科及び整形外科領域で頻繁に用いられる生体材料の開発にとって重要な問題で、その軽減化は必須である。我々は形状記憶合金（ニッケルチタン）の生体材料への試みから、ニッケルイオン溶出低減化に酸素拡散処理を用いた表面改質を行っている。これまでの研究から、金属イオンの溶出量 (*in vitro*) とアレルギー誘導能に相関関係が明らかになったが、その結果が *in vivo* でのアレルギー誘導能に反映されるかは未だ不明な点が多い。以上の事から、本研究期間中に①イオン溶出度の異なる酸素拡散処理試験片（ニッケルチタン合金）のアレルギー誘導能を GATA-3 Tg マウス生体適合性評価システムを用いて明らかにする。②イオン溶出度と組織内 IL-4 サイトカイン産生（IL-4 と組織への繊維化の関係が報告されている）から見た炎症反応の慢性化について検討し、研究総括として生体材料開発における本 GATA-3 Tg マウスの有用性を再確認し、生体材料による金属アレルギー誘導能の低減化を進める為の情報を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

1. GATA3-Tg 及びGATA3/TCR-Tg マウスの作製
当大学施設実験動物施設（高次機能センター布設）内SPFにてGATA3 遺伝子導入マウス（GATA3-Tg）は、C57BL/6 マウスと交配する。その確認は、生後4 週目の各々のマウスの tailより genomic DNA を抽出し、DNA-PCR 法にてそれぞれのタイプを確認する。

2. 抗原・感作及び惹起方法

(1)感作抗原に金属ディスク試験片（Ni, Ni-Ti）を用いる。金属ディスク試験片の大きさは直径4mm 厚さ2mm とし、市販の丸棒材より切り出す。資料の表面は研磨により鏡面状

態に仕上げる。必要に応じて高温酸化処理 (300-800°C) を施したディスク試験片を作成準備する。

(2) ディスク試験片はGATA-3 及びWT マウスをペントバルビタール(80mg/Kg)で麻酔し、背部被毛をバリカンにて剃毛する。剃毛部をイソジン消毒液にて消毒後メスにて部分的に切開し、金属タブレットを皮下に移入する。その後、外科用クリップにて切開部を縫合する。

(3) 金属ディスク試験片移植後より、1ヶ月経過したGATA-3 及びWT マウスの左耳介の皮内に10 μ lの金属溶液(1000ppm)を投与し、経時的に腫脹をdial Thickness gauge にて測定する。本実験は高次機能センター内実験室で、マウスにエーテルを吸入させて行う。

3. 抗原惹起部位のサイトカインプロファイルの検討

各々の抗原で惹起された耳介組織を摘出し (惹起後18-24 時間及び72 時間以降)

0.1%Tween20加PBS溶液内で摘出組織を細切りホモジナイズする。液体窒素にて凍結融解をくり返し、さらに超音波にて処理を行い遠心して上清を回収し、サイトカイン産生量 (IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ) をELISA キットにて測定する。

4. 金属種の生体内溶解率の検討

本実験に用いた、各種金属の腐食度とその表面加工における関係を明らかにすると共に金属アレルギー誘発との関係を検討する。金属試験片の腐食の度合いを検討するために、表面を走査型電子顕微鏡により詳細に観察し、孔食の有無と実験条件の関係を明確にする。孔食の量や大きさに関しては、レーザ顕微鏡を用いて定量的に評価する。また、酸化処理による腐食抑制効果を検討して、イオン溶出度を原子吸光光度計で測定しアレルギー反応の有無との関係も再度検討を加える。

4. 研究成果

(1) GATA-3Tgマウスでは、Ni再刺激後24-72時間まで対照マウスの約3倍の耳介腫脹(図1)と総IgE量は約2倍高くなった。他アイソタイプについては明らかな違いは認められなかった(図2)。

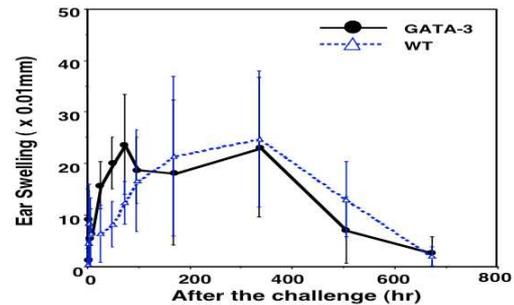


図1. Ni-Ti試験片移植GATA-3 遺伝子導入トランスジェニックマウスのNi再刺激耳介腫脹反応

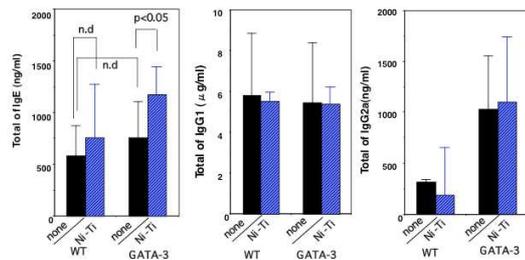


図2. Ni-Ti試験片移植GATA-3遺伝子導入トランスジェニックマウス血清中の抗体量の検討

(2) 再刺激24時間目の組織内サイトカインはIL-4 の増加・IFN- γ の減少を認めた(図3)。この傾向は再刺激1ヶ月まで持続すると共に強い繊維化が認められた。

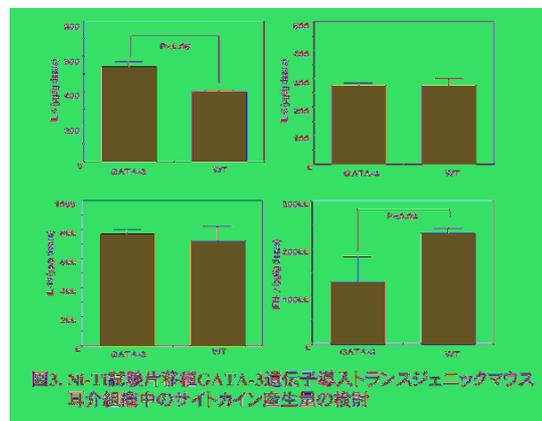


図3. Ni-Ti試験片移植GATA-3遺伝子導入トランスジェニックマウス耳介組織中のサイトカイン産生量の検討

(3) 組織学的検索に於いて表紙の剥離および皮膚組織の肥厚が観察された(図4)。

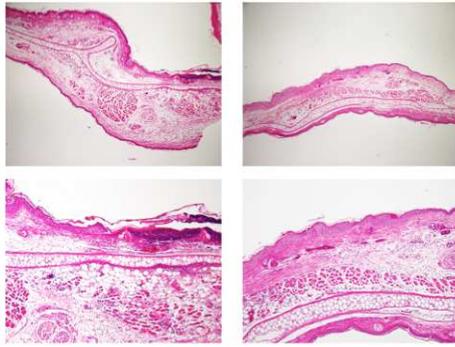


図4. Ni-Ti試験片移植GATA-3遺伝子導入トランスジェニックマウス耳介の病理組織学的検索

左(上,下) : GATA-3, 右(上,下) : WT

(4) この皮膚反応は、CD4+陽性細胞を主体とする反応であることが、Ti-Ni移植GATA-3 Tg CD4+陽性脾臓細胞のRAG2KOマウスへの移入により明らかになった (図5, 図6)。

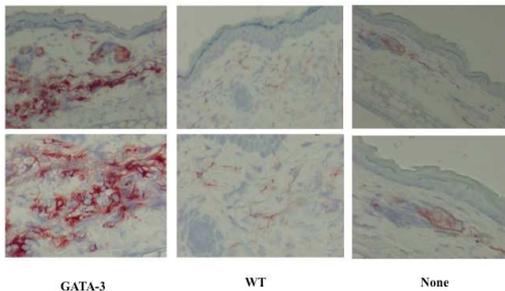


図5. Ni感作CD4陽性細胞移入RAG2KOマウスにおけるNi刺激による耳介腫脹反応

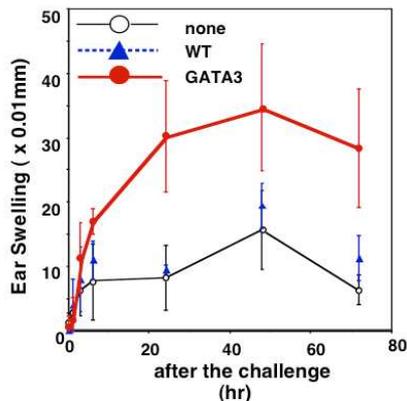


図6. Ni-Ti試験片移植GATA-3トランスジェニックマウスCD4+脾細胞移入RAG2KOマウス耳介腫脹反応

(5) 酸素拡散処理試験片では、腫脹は約1/5 (図7)、総IgE抗体量は低値を示した (図8)。金属の溶出度は未処理試験片で1/2に減少した (表1)。

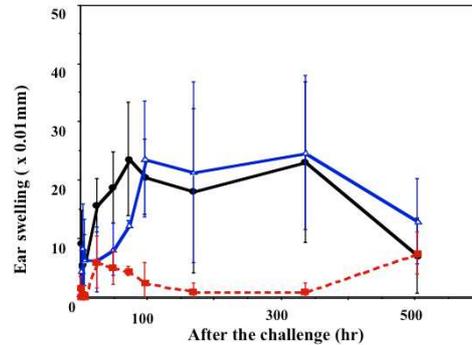


図7. Ni-Ti(#500)試験片移植GATA-3遺伝子導入トランスジェニックマウス耳介腫脹反応の経時的観察

表1. Ni-Ti(#500)試験片移植GATA-3トランスジェニックマウスの血清中IgE抗体価の検討

Ni-Ti (Treatment)	Total IgE (ng/ml)	% Reduction
-	762.0 ± 343.7	
+ (None)	1489.8 ± 843.1	0
+ (#500)	605.3 ± 592.0	59.3

以上の結果、(1)Niアレルギー誘導にTh2型免疫反応の関与 (2)酸素拡散処理合金の低アレルギー誘導が確認され、GATA-3Tgマウスが低アレルギー誘導能金属開発に有用なモデル検定系になる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

①Ogawa A, Okuda N, Hio K, Kanematsu H, Tamauchi H. The monitoring possibility of some mammalian cells for zinc concentrations on metallic materials. 査読有 Cytotechnology. 2012. DOI 10.1007/s10616-012-9433-6

- ②Ogawa A, Akatsuka R, Tamauchi H, Hio K, Kanematsu H. Influence of the nickel-titanium alloy components on biological functions. BMC Proc. 査読有, 2011 22:5 Suppl 8:P79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22373219>
- ③ Ale MT, Maruyama H, Tamauchi H, Mikkelsen JD, Meyer AS. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 in vitro. Mar Drugs. 査読有 2011. 9(12):2605-2621. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363242>
- ④Tamauchi H, Amoh Y, Itoh M, Terashima M, Masuzawa M, Habu S, Katsuoka K, Iwabuchi K. GATA-3 regulates contact hyperresponsiveness in a murine model of allergic dermatitis. 査読有. Immunobiology. 2012. 217(4):446-54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22112437>
- ⑤Ale MT, Maruyama H, Tamauchi H, Mikkelsen JD, Meyer AS. Fucoïdan from Sargassum sp. and Fucus vesiculosus reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells in vitro and activates natural killer cells in mice in vivo. Int J Biol Macromol. 2011 Oct 1;49(3):331-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21624396>
- ⑥ Kosaka S, Tamauchi H, Terashima M, Maruyama H, Habu S, Kitasato H. IL-10 controls Th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. Immunobiology. 2011. 216(7): 811-20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257225>
- ⑦ Niiyama S, Tamauchi H, Amoh Y, Terashima M, Matsumura Y, Kanoh M, Habu S, Komotori J, Katsuoka K. Th2 immune response plays a critical role in the development of nickel-induced allergic contact dermatitis. Int Arch Allergy Immunol. 2010. 153(3):303-14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484930>
- ⑧ Masayoshi Mizutani, Yukiko Matsumura, Jun Komotori and Hidekazu TAMAUCHI, Effects of Thermal Oxidation on Biocompatibility of Ni-Ti Shape Memory Alloy, TRANSACTIONS OF THE JAPAN SOCIETY OF MECHANICAL ENGINEERS Series A, Vol. 77, No. 784 (2011), pp2144-2152. http://www.jstage.jst.go.jp/article/ikaaia/77/784/77_2144/_article
- [学会発表] (計5件)
(国内)
- ①小川亜希子, 玉内秀一, 兼松秀行, 樋尾 勝也. ニッケルチタン合金の材料特性と生体への影響. 材料とプロセス Vol. 23 (2) (第160回日本鉄鋼協会・秋季講演大会 2010.9.26 札幌)
- ②丸山 弘子, 川上文貴, 玉内秀一, 蓮沼良一, 吉永 恵子, 仲野隆久, 北里英郎. フコイダンのヒト腸内細菌による分解と生理活性について 第13回 北里微生物アカデミー 講演要旨 p88 (2010.8.6 十和田)
- ③ 玉内秀一「金属アレルギーについて」第5回HACCP対応抗菌環境福祉材料開発研究会 (2009.6.5 名古屋) 招待講演
- ④丸山弘子, 玉内秀一, 吉永恵子, 仲野隆久. メカブフコイダンの経口投与による紫外線障害に対する抑制効果についての検討 第63回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集 p221. (第63回日本栄養・食糧学会大会学術集会 2009.5.22 長崎)
- (国外)
- ① Hidekazu Tamauchi, Shiro Niiyama, Yasuyuki Amoh, Masazumi Terashima, Yukiko Matsumura, Maho Kanoh, Sonoko Habu, Jun Komotorr, Kensei Katsuoka Th2

immune response plays a critical role in the development of nickel-induced allergic contact dermatitis. 14th International Congress of Immunology 2010.8.26 (Kobe, Japan)

〔図書〕 (計3件)

- ① 玉内秀一：「死生観からみたいのち」-医学原論演習を振り返って
日本医事新報 4516：93-95. 2010
(11月13日号) 日本医事新報社

- ② 玉内秀一、丸山弘子. フコイダンと免疫 (特集 免疫と機能性食品)
Functional food 4(1): 48-55. 2010.
フジメディカル出版

- ③ 玉内秀一「免疫学の観点からみた浄化槽業務にかかわる感染症」特集
浄化槽業務に関わる感染症とその対策 月刊浄化槽 2010(5): 4-11
日本環境整備教育センター (2010年5月10日) (分担)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉内 秀一 (TAMAUCHI HIDEKAZU)
北里大学・医学部・助教
研究者番号：60188414

(2) 研究分担者

小茂鳥 潤 (KOMOTORI JUN)
慶応義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：30225586