

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 - 2008 年度
 課題番号：19590120
 研究課題名（和文） メタロチオネインが化学物質・金属アレルギーの増悪化に関するメカニズムの解明
 研究課題名（英文） Elucidation of mechanism on augmentation of chemical or metal allergy By metallothioneine
 研究代表者
 永瀬 久光 (NAGASE HISAMIRSU)
 岐阜薬科大学・薬学部・教授
 課題番号：40141395

研究成果の概要：

本研究では、生体内に存在し重金属毒性などに対し防御的な役割を果たすタンパク質として知られているメタロチオネイン（MT）が、化学物質や金属アレルギーなどの接触性皮膚炎を悪化させることを MT 欠損マウスの実験から見出し、その機構は、MT の欠損が抗原特異的 T 細胞の増殖を抑制し、炎症性サイトカイン等の産生量が減少し、耳介組織の炎症性細胞の浸潤量が抑制されること、また、MT は T 細胞集団のサブタイプバランスに影響を与え、CD8⁺の分化を促進することによるものであることを解明できた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：メタロチオネイン (2) アレルギー (3) ジニトロフルオロベンゼン (4) メタロチオネインノックアウトマウス (5) T 細胞サブタイプ (6) 接触性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

我々は日々の生活の中で界面活性剤、抗菌剤、有機溶媒などの化学物質に接触している。そしてこれらの化学物質がアトピー性皮膚炎などのアレルギーを引き起こしたり、増悪化させたりしている可能性があり、これらの

影響を明らかにすることは、化学物質に囲まれた生活を快適なものとするのに極めて重要である。申請者も 型アレルギーの系で環境中化学物質による修飾作用を検討している研究を行っており、平成 17-18 年度基盤研究 C 「難燃剤テトラプロモビスフェノール A

による接触性過敏症の増悪化機構の解明」で研究助成を受け、マウス耳介にテトラプロモビスフェノールA (TBBPA)を塗布することにより、ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) 誘発接触性過敏反応によるマウスの耳介腫脹反応は増強し、その作用は投与量依存的ではなく、逆U字曲線を示した。その機構の一つとして、所属リンパ節からの抗原特異的T細胞が異常増殖することなどの成果をあげている。国内外を問わず、接触性皮膚炎に対し環境汚染物質の免疫学的修飾能に関する研究はほとんどない。Sakazakiら¹⁾は17 エストラジオールが接触性皮膚炎を促進する例を報告しているが、更年期障害治療薬の経皮投与による副作用としてのものである。

申請者らの研究室ではメタロチオネイン (MT) の研究を以前より行っており、野生型(WT)マウスとそのMT / 欠損(KO)マウスを用いた比較研究によりMTの生理学的役割を明らかにしてきた。化学物質及び金属アレルギーによる接触性皮膚炎を考えると、そこにメタロチオネインの関与があるのではとの発想から、このWTとKOマウスにDNFBで腹部に感作した7日後、マウス耳介にDNFBを塗布したところ、WTマウスの方がKOマウスよりも耳介腫脹が著しいことを見出している。

MTはこれまで生体に対して防御的役割を果たすタンパク質として捉えられているが、本現象は防御的とはいえむしろ増悪化に関与していることを示唆しており、極めて興味深い新規な知見といえるが、今のところ、そのメカニズムは解明できていない。このメカニズムが解明されることによって、MTの免疫毒性学上の重要な役割を示すことの可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究では、金属アレルギーによる接触性皮膚炎を考えると、そこにメタロチオネイン(MT)の関与があるのではとの発想から、野生型(WT)マウスとそのMT / 欠損(KO)マウスを用いた実験からMTが関与

し、しかも本来防御的に働くMTがその悪化に関与している可能性を示唆する現象を見出した。従来知られていた、MTの生態防御機能とは違った一面となることから、MTのアレルギー増悪化に関するメカニズムを解明しようとするものである。本研究では(1) 抗原特異的T細胞の増殖に対する影響、(2) リンパ節及び脾臓からのサイトカイン産生量及びサイトカインmRNA発現量、(3) 耳介組織の病理像とMTの局在性、などをKO及びWTマウスを用いて比較検討する。

このメカニズムが解明できれば、MTの免疫・アレルギーに関わる新規な生理的役割を明らかにできるかもしれない。また、金属アレルギーを想定しながら、実際には金属による接触性皮膚炎とMTとのかかわりは証明していないので、これを明らかにし、さらに「化学物質による接触性皮膚炎」と「金属による接触性皮膚炎」とに違いがあるのか、またそれらとMTとの関与に程度の違いがあるのかも明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) 誘発接触性過敏反応を用いたKOマウスとWTマウスの耳介腫脹による比較検討

単回塗布実験：2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB) 溶液をマウスの腹部に塗布して感作し、7日後にDNFB溶液をマウスの耳介に塗布して、耳介腫脹反応を惹起させ、耳介の厚みを経時的(耳介塗布0, 24, 30, 36, 48, 72時間後)に測定し評価した。

反復塗布実験：DNFB溶液の濃度を変え、単回塗布実験と同様に感作し、7日後に、耳介腫脹反応を惹起させ、耳介の厚みを経時的(耳介塗布0, 1, 4, 30時間後)に測定し、7日間隔で同様の操作を合計4回繰り返し、耳介塗布1時間後および30時間後の腫脹をそれぞれ即時相および遅延相として評価した。

(2) MTが抗原特異的T細胞増殖性に及ぼす影

響

0.5 % DNFB 25 μ L を K0 マウスおよび野生型 (WT) マウスの剃毛腹部に 2 日連続で塗布して感作し、最終塗布 7 日目に鼠径部リンパ節を採取し、 5×10^5 cells/well の細胞に対して dinitrobenzene sulfonic acid sodium salt (DNBS) を抗原として 50 μ g/mL となるように加え 2 日間培養した。その後 H^3 -チミジンを加え更に 16 時間培養し、その取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

(3) 病理組織学的評価：

単回及び反復塗布実験によって、耳介腫脹のピークとなった惹起 30 時間後の耳介を切除した。その耳介のパラフィン包埋切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色及び MT の免疫染色を行った。HE 染色においては、顕微鏡下で浸潤するリンパ球や顆粒球数を計測し、表皮や真皮の損傷を観察し評価した。また、MT の免疫染色により、組織炎症部位における MT の局在性を顕微鏡下で観察した。

(4) MT が感作リンパ節細胞移入による耳介腫脹反応に及ぼす影響

0.5 % DNFB 25 μ L を K0 マウスおよび WT マウスの剃毛腹部に 2 日連続で塗布して感作し、最終塗布 7 日目に採取した鼠径部リンパ節細胞を無感作の K0 マウスまたは WT マウスの耳介に注射し、直ちに 0.25 % DNFB を 25 μ L 塗布して耳介腫脹反応を惹起した。反応惹起後 24、48、72、96 時間後の耳介の厚さを測定した。なお、コントロールとして vehicle (acetone:olive oil = 4:1) のみを塗布した群についても同様の検討を行った。

(5) T 細胞サブタイプ解析

0.5 % DNFB 25 μ L を K0 マウスおよび WT マウス剃毛腹部に 2 日連続で塗布して感作したマウスおよび無感作マウスよりリンパ節

細胞を採取し、CD3⁺細胞中の CD4⁺細胞数および CD8⁺細胞数、ならびに CD3⁺細胞中の CD25⁺細胞数と CD69⁺細胞数をフローサイトメトリーにより計数した。

(6) ニッケルによる金属アレルギー (アレルギー性接触性皮膚炎) の誘発

腹部に 2 回感作による耳介腫脹

硫酸ニッケル混合液または塩化ニッケル混合液 100 μ L を毛剃り済みのマウスの腹部に 1 日 1 回 2 日間塗布して感作を行い、2 回目の感作から 7 日後、左耳にニッケル溶液 30 μ L を塗布して耳介腫脹反応を惹起させ、測定を行った。また、コントロールとしてニッケルを含まない溶媒のみの混合液を右耳に塗布した。耳介腫脹の測定は惹起の 0、24、48、72 時間後に行った。また、同時に、WT マウスと K0 マウスにおける腫脹反応の比較も行った。各ニッケル混合液

腹部に反復 (4 回) 感作による耳介腫脹

20% 塩化ニッケル混合液 50 μ L を隔日に計 4 回、毛剃り済みのマウスの腹部に塗布して感作を行い、最終感作から 7 日後、左耳に 15% 塩化ニッケル混合液 30 μ L を塗布して耳介腫脹反応を惹起させ、測定を行った。また、コントロールとして塩化ニッケルを含まない溶媒のみの混合液を右耳に塗布した。耳介腫脹の測定は惹起の 0、24、48、72 時間後に行った。また、感作時に塩化ニッケル混合液の代わりにコントロールを塗布した群ももうけ、同様に惹起させ耳介腫脹を測定した。

4. 研究成果

(1) ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) 誘発接触性過敏反応を用いた K0 マウスと WT マウスの耳介腫脹による比較検討

単回塗布実験では、耳介塗布 30 時間後をピークとし、WT マウスの方が K0 マウスよりも耳介腫脹反応が顕著に現れた。反復塗布実

験では、耳介への塗布回数を重ねるにつれ、即時相および遅延相ともに WT マウスの方が K0 マウスよりも耳介腫脹は大きく現れるようになった。これらの結果は MT が遅延型アレルギーに関して何らかの影響を与えることを示している。

(2) 抗原特異的 T 細胞の増殖に対する影響の比較検討

抗原特異的 T 細胞増殖試験において、WT マウスの方が K0 マウスに比べ ^3H -チミジン取り込み量が多くなった。

(3) 病理組織学的評価

炎症部位である耳介における病理組織学的評価では、HE 染色により、単回及び反復塗布実験のどちらもリンパ球や好中球等の炎症性細胞の浸潤が観察され、その面積当たりの細胞数は、K0 マウスの方が WT マウスに比べ有意に抑制された。

(4) MT が感作リンパ節細胞移入による耳介腫脹反応に及ぼす影響

感作リンパ節細胞の移入実験では、レシピエントの種類を問わず、感作 K0 マウスのリンパ節を移入した群に比べ、WT マウスのリンパ節細胞を移入した群において反応惹起 72 時間後の耳介腫脹が有意に増加した。このことから、MT は *in vivo* における抗原特異的 T 細胞の働きに促進的に関与している可能性が示唆された。

(5) T 細胞サブタイプ解析

CD25⁺細胞数には両マウス間で有意な変化が認められなかったものの、CD4⁺細胞数は無感作群、感作群ともに K0 マウスに比べて WT マウスの方が有意に減少した。逆に、CD8⁺細胞数および CD69⁺細胞数は WT マウスで有意に増加した。

(6) ニッケルによる金属アレルギー（アレルギー性接触性皮膚炎）の誘発

腹部に 2 回感作による耳介腫脹

それぞれの耳介腫脹の測定結果によると、硫酸ニッケルにおける耳介腫脹の度合いは WT の方が大きく、24 時間後において 5% 以下の有意差がついた。塩化ニッケルにおける耳介腫脹については WT と K0 の間には有意な差は認められなかった。

すべてのニッケル混合液において、惹起の 24 時間後から 48 時間後に耳介腫脹が現れ、72 時間後にはおさまった。また、コントロールについては耳介腫脹が現れなかった。このような経時的耳介腫脹変化は、DNFB 誘発接触性過敏反応でみられるような耳介腫脹反応に類似しており、遅延型アレルギー反応と同様であると考えられる。しかし、ニッケル混合液による反応性にもあまり違いもなく、全体として腫れの度合いが小さいため、今回の条件を金属アレルギーモデルとして評価に用いるにはいたらないと考えられる。耳介腫脹が弱かった原因のひとつとして、塗布溶液中の抗原であるニッケルの濃度が 5% では不十分であった可能性が考えられる。今回使用した実験系とは塗布溶液の溶媒や惹起の方法は異なるが、10% 硫酸ニッケル溶液では十分な耳介腫脹が現れなかったという報告²⁾も過去にある¹⁾。ニッケル混合液を調整の際の可溶性で比較すると、硫酸ニッケルよりも塩化ニッケルの方が優れていて、より高濃度のニッケル混合液を確保することができる。

腹部に反復（4 回）感作による耳介腫脹

耳介腫脹の測定結果から、20% 塩化ニッケルによる感作を 4 回行ったことで、2 回の感作を行った場合に比べ、耳介腫脹が増大した。これは、塩化ニッケルの塗布を繰り返したことで、ニッケルが抗原として認識されやすくなったためと考えられる。したがって、ニッケルによる金属アレルギー感作成立には、適当な濃度のニッケルが反復してマウスの皮膚と接触することが必要と考えられる。また

、感作時にコントロールを塗布した群ではほとんど腫脹が起こらず、塩化ニッケル反復塗布群で起こった耳介腫脹が遅延型アレルギーに基づく反応であることが確認された。

以上のことから、MT は、アレルギー性接触性皮膚炎を増悪化するのではなく、MT の欠損により抗原特異的T細胞の増殖が抑制されたために、炎症性サイトカイン等の産生量が減少し、耳介組織において炎症性細胞の浸潤量が抑制され、その結果、真皮の浮腫や表皮の炎症が抑えられ、耳介腫脹反応が抑制されたとするメカニズム、また、MT はT細胞集団のサブタイプバランスに影響を与え、CD8⁺の分化を促進することで耳介腫脹反応に対する感受性が変化したとするメカニズムを解明、提示することができた。

参考文献

- 1) Sakazaki, H. Ueno, K. Nakamuro, *Toxicology Letter*, **166**, 60-66 (2006)
- 2) 丸山登久子, 片岡裕美, 扇間昌規, 伊藤誉志男. 薬学雑誌 **123**, 707-715 (2003)

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)

[学会発表](計 4 件)

小林亮、渡邊将作、臼田春樹、畑勝友、佐藤雅彦、中西剛、永瀬久光、アレルギー性接触性皮膚炎の進展におけるメタロチオネインの関与、日本薬学会第129年回、平成21年3月26-28日、国立京都国際会議場

米原麻衣、武田涉、小林亮、佐藤雅彦、中西剛、永瀬久光、メタロチオネインが即時型アレルギーに及ぼす影響
平成 20 年度日本薬学会東海支部例会、

平成 20 年 12 月 6 日、静岡県立大学

米原麻衣、小林亮、佐藤雅彦、中西剛、永瀬久光、即時型アレルギーに及ぼすメタロチオネインの影響

第 10 回東海メタロチオネイン研究会、

平成 20 年 12 月 13 日、岐阜薬科大学

臼田春樹、河合沙友里、佐藤雅彦、永瀬久光、メタロチオネインノックアウトマウスにおけるアレルギー性接触性皮膚炎抑制機構のメカニズムに関する研究、フォーラム 2007 衛生薬学・環境トキシコロジー、2007 年 11 月 1-2 日、大阪

6 . 研究組織

(1)研究代表者

永瀬 久光 (NAGASE HISAMIRSU)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

(研究者番号 40141395)

(2)研究分担者

佐藤 雅彦 (SATO MASAHIKO)

愛知学院大学・薬学部・教授

(研究者番号 20256390)

(3)連携研究者