

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792091

研究課題名(和文)チタンに対する過敏反応を検証する

研究課題名(英文)Analysis of hypersensitivity reactions to titanium

研究代表者

渡邊 恵 (WATANABE, Megumi)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号：40380050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに確立しているニッケルアレルギーモデルマウスを作製方法を応用して、チタンを抗原としたアレルギーを誘導できるかどうか検討した。酸化チタンをマウス腹腔内に投与した後、耳介皮膚でアレルギーを発症させようとしたが、ニッケルのような抗原性の高い金属と同等の炎症症状を惹起することができなかった。次に、*in vitro*でチタンの抗原性を検討した。マウス骨髄由来樹状細胞を酸化チタンで刺激した後、金属アレルギー発症時に確認されるサイトカイン産生と種々の遺伝子発現を網羅的に解析したが、*in vivo*実験と同様に、ネガティブコントロールと比較して有意な差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We applied the method of nickel allergy mouse model to induce allergic reactions to titanium. To induce a hypersensitivity reaction to titanium, titanium oxide with IFA was intraperitoneally injected into B6 mice for initial immunization. Two weeks later, mice were administered intradermal injections of titanium, titanium oxide with CFA for a recall immune response. Any inflammatory reactions were not detected in titanium-injected mice compared with controls. Next we observed immune cell responses to titanium *in vitro*. Bone marrow derived dendritic cells were stimulated with titanium oxide and then inflammatory gene expressions and cytokine productions were analysed. However there were no significant changes between titanium injected mice and controls.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：金属アレルギー 樹状細胞 歯科金属 チタン

1. 研究開始当初の背景

生体材料は QOL の維持，向上に不可欠なものとなっている．歯科では，顎顔面の形態修正，歯科用インプラント，義歯，矯正器具等にこのような生体材料が利用されており，セラミック，高分子材料，金属などが用途に応じて使われているが，中でも歯科用インプラント材料に用いられるチタンは硬組織代替器具構成用金属材料としての需要が大きい．

チタンは高い生体親和性，低アレルギー性を有していることから生体材料として使用されるが，頻度は少ないもののチタンにアレルギー様反応を示す患者が存在することが最近報告され始めた．チタンも生体に対してアレルゲンとなる何らかのメカニズムを有している可能性が考えられるが，それに関する決定的な事象はまだ解明されていない．

申請者は平成 12 年より金属アレルギーにおける樹状細胞の役割に関する研究を進めており，抗原提示細胞として生体内で強力な活性を持つ樹状細胞 (Dendritic Cell: DC) がニッケルアレルギー発症過程において MAP キナーゼカスケードを介してアレルギー反応を制御していることを明らかにした．(渡邊，四国歯誌，第 17 巻，第 1 号，2004，渡邊ら，アレルギー科，第 15 巻，第 6 号，2003，臨床免疫・アレルギー科，第 46 巻，第 3 号，2006，Watanabe M et al，PLoS One. 2011 Apr 22;6(4):e19017)

筆者らのこれまでの研究で用いたニッケルはアレルギー誘発率が極めて高い歯科金属であるが，その実験に用いたチタンでは DC および T 細胞を刺激してサイトカイン産生を促すこともアレルギーを誘発することもできていない．

2. 研究の目的

本研究では，アレルゲンとして一般的なニッケル等の金属とチタンを比較することで生体内でのチタン固有の動態の有無を検討し，チタンがアレルゲンとしてはたらく条件を明らかにすることを目的とする．

3. 研究の方法

(1) in vivo における原感作後のアレルギー発症の検討

チタンおよび各種アレルゲン金属試薬を作製し，正常 C57BL/6J マウス腹腔に投与して感作する．2 週間後，同金属試薬を耳介皮下に投与し，48 時間後に耳介腫脹反応を測定してアレルギー発症の有無を確認する．このような通法でアレルギーを誘導した場合，高い生体親和性から考えると，チタンに対する遅延型過敏反応は，ほとんど起こらないと予想される．

(2) アレルギー発症マウス全身検索

チタン以外の金属に対するアレルギーを発症したマウスの病態を，免疫組織科学，

蛍光抗体法等を利用して光学顕微鏡下，あるいは電子顕微鏡下で病理組織学的に観察する．また，所属リンパ節や脾臓を中心とした全身組織におけるサイトカイン，および炎症誘導物質の発現様式を RT-PCR 法，ウエスタンブロット法，免疫組織学を用いて比較検討し，金属アレルギー特有の病態，現象を検索する．

(3) DC への遺伝子導入

(2) の結果から，金属アレルギー発症を促進する，あるいは病態増悪を導くと考えられる遺伝子を選択する．その遺伝子を DC にトランスフェクションした後，チタンによる抗原刺激を加え，DC のチタンに対する反応性の変化の有無をウエスタンブロット法，ELISA 法，フローサイトメトリーを用いて観察する．遺伝子導入により抗原に対する細胞の感受性が上昇することが考えられるため，チタンのような抗原としての機能が弱い金属に対しても，DC は過敏に反応する，もしくは少なくとも反応性が上昇すると予想される．

(4) チタンアレルギー誘導に対する試み

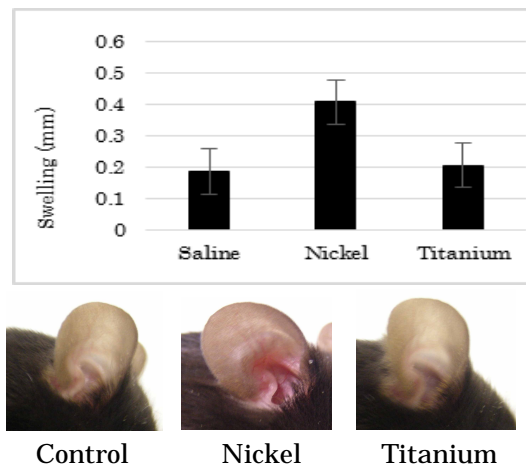
(3) で選択した遺伝子をトランスフェクションした C57BL/6J マウス由来 DC に 48 時間チタン刺激を加えた後，48 時間 T 細胞と共培養する．抗原提示を受けてチタンを記憶した T 細胞，もしくはチタンに対する反応性が上昇した遺伝子導入 DC を無感作正常 C57BL/6J マウスに移入し，2 週間後にアレルギーが誘導されるか否かを観察する．

その後，(3) と同様に全身検索を行い，チタンアレルギー症状の特異性の有無を検討する．

4. 研究成果

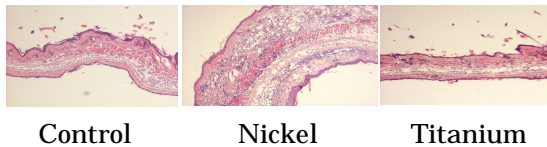
(1) これまでの方法でチタンと他の金属に対するアレルギー発症を検討した．

その結果，通法ではチタンでアレルギーを誘導することはできなかった (図 1)．



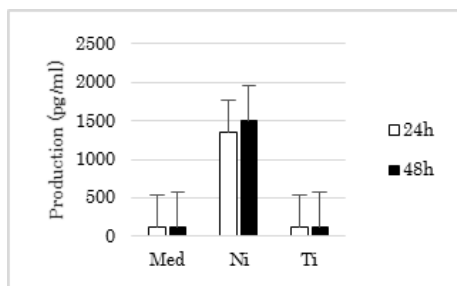
(図 1) チタンに対するマウス耳介腫脹反応

(2) (1)のマウスの耳介組織に対する検索および全身検索を行った。わずかに炎症所見を認めるものもあったが、ニッケルなどの抗原性の高い金属と比較して炎症性細胞浸潤が軽度であった(図2)。

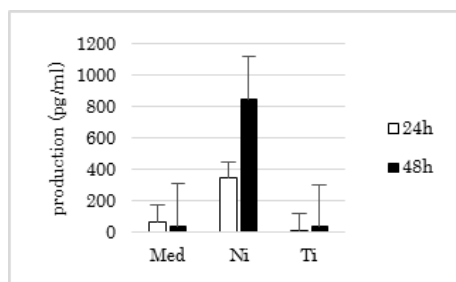


(図2) チタンに対するマウス耳介組織写真

(3) 発現が上昇する適当な遺伝子が見つからなかったため、ニッケルに対して発現が増強する MKK6 遺伝子を DC へ導入し、チタンに対してどのような影響を与えるのか検討した。遺伝子導入後、チタンで刺激した DC が産生するサイトカイン量を ELISA 法で測定した。(図3, 4)

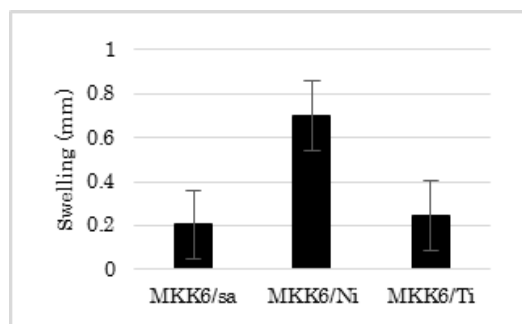


(図3) DC の IL-12 産生量



(図4) DC の IFN-γ 産生量

(4) MKK6 遺伝子を導入した DC を用いてチタンアレルギーの誘導を試みた。ニッケルアレルギー群と比較して、チタン投与群では目立った炎症所見が認められなかった(図5)。



Control MKK/Ni MKK/Ti

(図5) MKK6 導入後のチタンに対するマウス耳介腫脹反応

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2件)

A critical role for thymic stromal lymphopoietin in nickel-induced allergy in mice. Ashrin MN, Arakaki R, Yamada A, Kondo T, Kurosawa M, Kudo Y, Watanabe M, Ichikawa T, Hayashi Y, Ishimaru N, Journal of Immunology May 1;192(9): 4025-4031, 2014 (査読有)

渡邊 恵, 皮膚免疫機構を利用した金属アレルギー検査方法開発へのアプローチ, 日本補綴歯科学会雑誌 6(1), 41-43, 2014 (査読有)

[学会発表](計6件)

Megumi Watanabe, Tetsuo Ichikawa, Extremely Low Frequency Pulsed Magnetic Fields Accelerate Osteoblast Differentiation, The 3rd ASEAN Plus and Tokushima Joint International Conference, 平成 26 年 12 月 6 日, マカッサル(インドネシア)

Megumi Watanabe, Tetsuo Ichikawa, Analysis of small GTPases in keratinocytes during nickel allergy development, 38th Annual Conference of the European Prosthodontic Association, 平成 26 年 9 月 26 日, イスタンブール(トルコ)

Megumi Watanabe, Tetsuo Ichikawa, Analysis of small GTPases in dendritic cells and kin nickel allergy mouse model, 15th Biennial Meeting of the International College of Prosthodontics, 平成 25 年 9 月 21 日, トリノ(イタリア)

渡邊 恵, イブニングセッション 2 臨床イノベーションのための若手研究者の挑戦: 治療, 検査法の新たな展開, (公社)日本補綴歯科学会第 122 回学術大会, 平成 25 年 5 月 18 日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Megumi Watanabe, Dental implant

failure; related factors and clinical cases,
DENTISPHERE 2ND, 平成 24 年 11 月 9 日,
スラバヤ (インドネシア)

渡邊 恵, ニッケルアレルギーモデルマ
ウス樹状細胞における Rho ファミリー低分
子量 G 蛋白質の動態解析, (社) 日本補綴歯
科学会第 121 回学術大会, 平成 24 年 5 月 27
日, 神奈川県民ホール (神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 恵 (WATANABE, Megumi)
徳島大学・病院・講師
研究者番号 : 40380050

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :