

## 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：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791996

研究課題名(和文) 独創的動物モデルを用いた金属アレルギーの免疫学的解析

研究課題名(英文) Immunological analysis of metal allergy by original animal model

研究代表者

佐藤 直毅 (Sato, Naoki)

東北大学・加齢医学研究所・非常勤講師

研究者番号：50625043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：金属アレルギーは、遅延型アレルギーに属し、金属に接触してから24時間以上経ってから症状が出現する。そのため、金属アレルギーの原因の特定が難しく、金属アレルギーの研究は進んでいない。最近、我々は、細菌の菌体成分と金属溶液をマウスに接種することにより、独創的な金属アレルギー動物モデルを開発した。この動物モデルはヒト金属アレルギー疾患ときわめて類似しているため、このモデルを用いて金属アレルギーの病態解析を進めている。我々は、金属特異的T細胞が存在すること、金属特異的T細胞が金属アレルギーの病原性T細胞であることを発見した。病原性T細胞はパラジウム接種で活性化することもわかった。

研究成果の概要(英文)：Metal allergy is categorized in the delayed allergy, because the emerging symptoms to wait at least 24 hours after contact with the metal. Therefore, it has been difficult to determine the cause of metal allergy and the study of metal allergy has not been progressing. Recently, we have originally developed new metal allergy animal models by inoculating the bacterial component and a metal solution of bacteria in mice. Since the animal model is very similar to the diseases of human metal allergies, we performed the pathological analysis by using this model. We found that the metal-specific T cells are present and the metal-specific T cells are pathogenic T cells of metal allergy. The pathogenic T cells are activated by palladium inoculation.

研究分野：歯学

キーワード：アレルギー・ぜんそく

### 1. 研究開始当初の背景

近年の生体金属材料を用いた医学の進歩、ならびにピアスやネックレスなどの装飾品をつける人の割合の増加により、金属によるアレルギーを訴える人々が増えている。金属は、材料学的特性からも扱いやすく、歯科領域では、補綴治療をはじめとして金属が多用され、患者の QOL を高めてきた。しかしその一方で、金属による口腔疾患、アレルギー性皮膚炎が誘導される場合があり、その危険性は以前から指摘されてきた。金属炎症やアレルギーは症状が重篤なわけではなく、世界的に注目されていなかったという背景もあり基礎および臨床面でも研究がすすんでいるとは言えない。

最近、申請者らは、「口腔内には常在菌が多く存在し、この口腔内環境が金属アレルギーの発症、増悪にかかわっているのではないか。」という独創的な発想のもと、細菌の菌体成分と金属溶液をマウスに投与することにより、ヒト疾患と類似した新規金属アレルギー動物モデルを開発し、金属アレルギーの病態解析を進めている。

### 2. 研究の目的

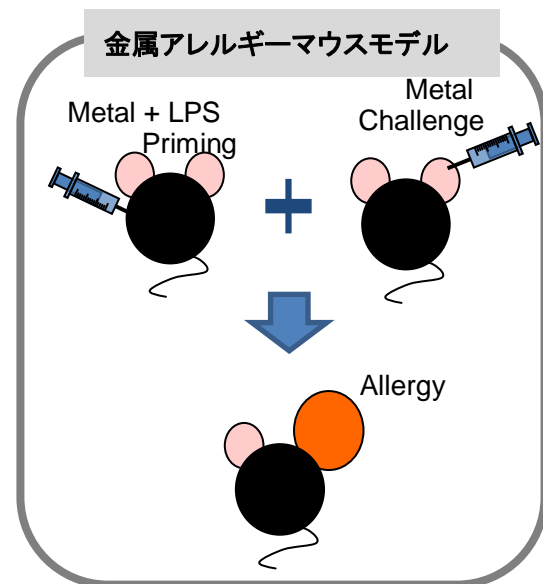
これまで金属アレルギー研究は、適切な動物モデルが存在しなかったという経緯から、世界的にもヒト患者サンプルを用いた抹消血から分離したリンパ球を培養して、金属の添加により増殖反応を調べたり、サイトカインを調べたりする、試験管内での研究が主流であって、生物個体の時系列的解析は不可能であった。申請者らの開発した動物モデルにより、金属アレルギーの発症前後も含めた時系列的解析が可能となり、免疫学的側面から病態を分子レベルで追究できるようになった。

したがって、本研究は、申請者らが開発した独創的新規動物モデルを用いて、金属アレルギーの病態を分子レベルで免疫学的側面から解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 金属アレルギーマウスモデルを用いた免疫細胞動態の解析

申請者らの開発したマウスモデルを用いて(図)、金属による遅延型過敏反応(金属アレルギー)を誘導する。これまでの結果から、耳介に皮内投与する金属溶液濃度が高いと炎症が引き起こされることから、金属炎症と遅延型過敏反応との間で応答する免疫細胞集団の違いをフローサイトメトリー法、免疫組織染色法を用いて解析し、T細胞、B細胞など免疫細胞の局在とそれぞれの細胞が発現する表面抗原について詳細に検討する。



#### (2) 金属アレルギーマウス T細胞の病原性の検討

金属アレルギーに反応するT細胞を特定するために、マウスモデルで金属アレルギーが明らかに認められた個体の所属リンパ節からリンパ球(T細胞が多い集団)を採取し、ヌードマウス(BALB/c nu-nu)へ移入後、金属溶液を耳介へ皮内注射することにより金属アレルギーの誘導を行う。

#### (3) 金属アレルギーマウス T細胞の濃縮

さらに、この「リンパ球移入～金属アレルギー誘導」を繰り返すことで、金属アレルギー

特異的に増殖・活性化される T 細胞を濃縮する試みを行う。T 細胞を濃縮できた場合には、これら細胞をとりだし、エフェクター細胞として機能する T 細胞を特定する。

#### (4) 金属イオンの動態の検討

金属イオンの動態を観察するため、蛍光色素をもちいて、金属イオンの可視化を行う。金属イオンはニッケルを用いて、まずは、培養細胞にニッケル添加の有無の蛍光を観察できるか検討する。次に、本当にニッケルが検出できているかを確認するために、誘導結合プラズマ質量分析計を用いて検証実験を行い、ニッケルイオンの可視化の成否を検証する。

### 4. 研究成果

#### (1) 金属アレルギーマウスモデルを用いた免疫細胞動態の解析

金属アレルギーを引き起こしたマウス耳介の病理標本作製し、T 細胞マーカーである CD3、CD4、CD8 の各抗原に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、金属アレルギーによって疾患患部に T 細胞が浸潤、集積していることが判明した。この病理像は、ヒト金属アレルギーに極めて類似していることが判明した。T 細胞の集積は、24 時間後でも認められるものの、48 時間後でも観察された。また、耳介の腫脹は 24 時間をピークとすることも明らかとなった。また、T 細胞の中でも CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、の両方の T 細胞が集積していることがわかった。

#### (2) 金属アレルギーマウス T 細胞の病原性の検討

金属アレルギーを誘導して、T 細胞が患部に集積することが判明したが、これら T 細胞が本当に金属アレルギーを引き起こす細胞集団か否かは不明である。これを明らかにするために、リンパ球の養子移入実験を行った。耳介の腫脹が認められ、腫脹している耳介に T 細胞が集積しているので、免疫学的には、

耳介の所属リンパ節で、金属刺激により、抗原提示されて、リンパ節で金属反応性 T 細胞が増殖して、耳介へ集積しているはずである。そこで、耳介の所属リンパ節からリンパ球を採取し、T 細胞の存在しない、かつ金属で免疫していない、ヌードマウスにそのリンパ球を移入した。その後、金属を耳介に接種したところ、金属アレルギーを発症した。この結果は、耳介の所属リンパ節に金属反応性 T 細胞が存在していたことを示し、金属アレルギーの原因となる T 細胞の存在を意味するものである。

(3) 金属アレルギーマウス T 細胞の濃縮さらに、この「リンパ球移入～金属アレルギー誘導」を繰り返した。結果、金属アレルギー特異的に増殖・活性化される T 細胞を濃縮することができ、金属特異的に反応する病原性 T 細胞の存在が明らかになった。

これらの結果から、金属アレルギーでは、金属特異的 T 細胞が存在すること、その T 細胞は、金属による免疫で活性化すること、免疫と養子移入を繰り返すことにより、金属特異的 T 細胞を濃縮できることが明らかとなった。

#### (4) 金属イオンの動態の検討

蛍光色素をもちいて、金属イオンの可視化を行った。マウスマクロファージ系細胞株 RAW 細胞をもちいて、培養上清にニッケルを加え培養を行い、その後細胞を回収して蛍光色素で染色し可視化を試みた。イオンを可視化するためには、イオンと蛍光物質と結合させること、および細胞内にイオンより大型の分子量をもつ蛍光物質を取り込ませることに困難を極めた。しかし、蛍光物質のみならず、誘導結合プラズマ質量分析計を用いて検証実験も並行して行ったため、金属イオンの存在が明らかとなり、金属イオンの可視化に成功した。この可視化によって、蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーといった細胞分析装置が利用でき、金属イオンを定量的かつ視

量的に解析することが可能となった。

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 3 件)

1. Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Nakamura K, Ono M, Nishiya T, Nakamura S, Takeda Y, Dobashi A, Takahashi A, Endo M, Ito A, Ueda K, Sato N, Higuchi S, Kondo T, Hashimoto S, Watanabe M, Watanabe M, Takahashi T, Sasaki K, Nakamura M, Sasazuki T, Narushima T, Suzuki R, Ogasawara K NKG2D+ IFN- $\gamma$ + CD8+ T cells are responsible for palladium allergy **PLoS One** 2014 Feb 12;9(2):e86810 (査読有)
2. 橋元 亘、中村恭平、遠藤実里、島田栄理遣、小笠原康悦、中山勝文、佐藤直毅、樋口繁仁. 免疫抑制にはたらくドレス NK 細胞の発見. 炎症と免疫 21:297-304, 2013 (査読無)
3. 川野光子、遠藤実里、佐藤直毅、樋口繁仁、小笠原康悦「金属アレルギー研究：動物モデルによる免疫学的解析」実験医学 増刊. 31 (17) 2013. (査読無)

[学会発表] (計 0 件)

[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

佐藤直毅 (SATO naoki )

東北大学 加齢医学研究所・非常勤講師

研究者番号：50625043

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：