

Title	Nickel-induced oral tolerance affects in vitro lymphocyte proliferation with nickel sulfate in a murine DTH model
Author(s)	武田, 瞬
Journal	歯科学報, 111(6): 650-651
URL	http://hdl.handle.net/10130/2672
Right	

氏名(本籍)	武田 隣 (秋田県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1839号(甲第1110号)
学位授与の日付	平成21年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Nickel-induced oral tolerance affects in vitro lymphocyte proliferation with nickel sulfate in a murine DTH model
掲載雑誌名	日本口腔診断学会雑誌 第24巻 1号 123~132頁 2011年
論文審査委員	(主査) 山根 源之教授 (副査) 井上 孝教授 柴原 孝彦教授 石原 和幸教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

金属アレルギーの診断においてパッチテストとリンパ球幼若化試験(LTT)の判定結果の不一致を経験する。特にニッケル抗原はスクリーニング検査の偽陽性率が高いとの報告がある。Rustemeyerらはヒト末梢血を対象としたニッケルのLTTにおいて、寛容化個体はパッチテスト判定(陽性/陰性)の結果に関わらず、LTTの結果に差異がなかったことを報告している。しかしながら、ヒトにおいて臨床的に未感作な状態と寛容な状態を区別することは不可能である。当講座の藤本らはニッケル口腔感作によるDelayed type hypersensitivity(DTH)マウスモデルとその寛容化を確立し、実験の中で、抗原刺激を受けた寛容化マウスの脾臓細胞は、感作マウスのそれと同等な増殖能を示すことを認めた。そこで本研究では同マウスモデルを用いて感作個体と寛容化個体に分け、ニッケルに寛容な個体がLTTに与える影響を検証することを目的とした。また、感作および寛容化個体におけるニッケル刺激を受けたリンパ球の性質を比較するために、これらの分泌するCytokineの測定を行った。

2. 研究方法

実験は東京歯科大学動物実験指針に基づき行った。藤本らの方法に準じてニッケルDTHモデルマウスを作製し、感作前の $1\mu\text{mol NiSO}_4$ 50 μl の経口単回投与にて寛容化マウスを作製した。Mouse earswelling testにてマウスのDTH反応および免疫寛容の誘導を評価した後、脾臓および頸部・鼠径リンパ節を摘出した。検体から細胞懸濁液を調整し、通法に従いLTTを行った(Stimulation Index(SI)>300%を陽性)。また、感作あるいは寛容化されたマウスにDTH反応を惹起した場合と惹起を行わない場合の2通りの抗原刺激条件を設定し、培養上清中の5種類のCytokine(IL-2, 4, 10, IFN- γ およびTGF- β)をELISAにて測定した。

3. 研究成績および結論

脾臓細胞におけるLTTの結果、口腔感作グループにおける寛容化マウス脾細胞のSIは、感作マウスに比較し抑制された。感作部位、また、DTH反応の惹起の有無に関わらず、感作マウスと寛容化マウスの脾臓細胞はいずれも陽性を示した。また、所属リンパ節細胞の比較では、重量測定とLTTの結果から、感作部位の所属リンパ節における抗原特異的な細胞の局在が示唆された。寛容化マウスの脾臓細胞は感作マウスに比較し、IL-10を有意に誘導し、ニッケルへの経口免疫寛容化とTr1 cellsとの関連性が示唆された。一方で、一部のin vi-

tro 条件下に寛容化マウスにおける IFN- γ の抑制が見られた。感作マウスと寛容化マウス間の IL-2, 4 および TGF- β における産生量の差は認めなかった。以上の結果, DTH マウスモデルの脾細胞はニッケルに寛容化されたマウスにおいても感作マウスと同等の増殖反応が示された。

ニッケル LTT の偽陽性率が比較的高いとされる理由として, 寛容化された個体における高い測定結果が影響している可能性が考えられた。これらの結果より, ニッケル寛容化個体は, 細胞増殖試験よりもそれらのニッケルに特異的な Cytokine 産生に基づいて同定される可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 要 旨

金属アレルギー診断に使用されるニッケル金属刺激リンパ球幼若化試験(LTT)の精度に関する問題点において, 寛容な個体が検査へ与える影響を指摘したヒトでの研究報告があるが, 本論文は, ニッケル感作による Delayed type hypersensitivity(DTH)マウスモデルを用いることで感作個体と寛容化個体を区別し, ニッケルに寛容な個体の示す結果が LTT に与える影響について検討することを目的としたものである。さらに両個体がニッケル刺激を受けたときのリンパ球から分泌される Cytokine の特性を検証している。また, 感作部位に所属する抗原特異的なリンパ球動態の比較を行っている。その結果, 感作マウスと寛容化マウスの脾細胞は感作部位, また, DTH 反応の惹起の有無に関わらず, いずれも陽性を示した。また, 所属リンパ節細胞の比較では, 重量測定と LTT の結果から, 感作部位の所属リンパ節における抗原特異的な細胞の局在が示唆された。寛容化マウスの脾細胞は感作マウスに比較し, IL-10を有意に誘導したことより, ニッケルへの経口免疫寛容化と Tr1 cells との関連性が示唆された。

本審査委員会は, 1) 口腔粘膜と皮膚の感作部位の差異による結果の考察, 2) 感作部位における特異的なリンパ節の腫大および SI 増加の仮説と今後の展望, 3) 今回分析した脾臓細胞, リンパ節細胞と実際に臨床に用いられる末梢血の違いについて質疑が行われ, 概ね妥当な回答が得られた。また, 本文および図構成, 記載方法など修正すべき点が指摘され訂正が行われた。

以上より, 現行のニッケル LTT の精度の低さには寛容な個体の示す偽陽性が関与している可能性を示唆する本研究で得られた結果は, 今後の歯科医学の進歩, 発展に寄与するところ大であり, 学位授与に値する者と判定した。