

Title	Histamine regulates IFN- production from T cells in palladium allergy mice model
Author(s)	井口, 直彦
Journal	, (): -
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3627">http://hdl.handle.net/10130/3627</a>
Right	

氏名	井口 直彦
学位	博士 (歯学)
学位記番号	第 2 1 0 7 号 (甲 第 1320 号)
学位授与年月日	平成 2 7 年 3 月 3 1 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項
論文審査委員	主査 井上 孝 教授 副査 片倉 朗 教授 副査 吉成 正雄 教授 副査 笠原 正貴 教授
学位論文名	Histamine regulates IFN- $\gamma$ production from T cells in palladium allergy mice model

## 学位論文内容の要旨

### 1. 研究目的

近年、歯科領域ではパラジウム (Pd) アレルギー患者の増加が指摘されている。しかし、金属アレルギー発症において T 細胞が重要な役割を担うことは知られているが、適切な動物モデルが存在せず未だ詳しい分子機構は不明である。また、近年、Histamine が免疫応答における T 細胞の機能を調節することが報告されている。そこで本研究では、新たな Pd アレルギーモデルマウスの作製および、そのモデルを用い Pd アレルギーにおける Histamine の関与について T 細胞に着目し検証した。

### 2. 研究方法

Pd アレルギーモデルマウスの作製では、金属は塩化パラジウム (PdCl<sub>2</sub>)、マウスは BALB/c を用いた。感作は PdCl<sub>2</sub> とリポ多糖 (LPS) の混合液をマウス鼠径部へ 2 回、7 日おきに皮内注射した。惹起は 2 回目の感作より 7 日後に PdCl<sub>2</sub> 溶液を足底に皮内注射し、感作 2 回・惹起 1 回で Pd アレルギーの発症を図った。コントロール群は、感作を PBS (リン酸緩衝生理食塩水)、惹起を PdCl<sub>2</sub> 溶液とし同様の操作を行った。評価として足蹠測定 (Footpad test) を行った。また、Pd アレルギーにおける膝窩リンパ節細胞のサイトカイン産生をフローサイトメトリーにて解析した。次に、T 細胞における Histamine の関与を in vitro にて検証した。検体は、健常マウス脾細胞から T 細胞を濃縮、培養を行い、Histamine および抗 Histamine 薬 (H1 受容体拮抗薬: Olopatadine Hydrochloride) の効果をサイトカイン産生にて評価した。最後に、Pd アレルギーモデルマウスにおける抗 Histamine 薬 (Olopatadine Hydrochloride) の効果を検証した。薬剤投与法は、感作前日より惹起当日まで連日腹腔内注射を行っ

た。また、感作、惹起当日は、感作、惹起を行う1時間前に薬剤投与を行った。コントロール群としてPBSを同様に投与した。評価として足蹠測定 (Footpad test), サイトカイン測定を行った。

### 3. 研究成績および結論

Pdアレルギーモデル作製において、足蹠腫脹 (Footpad test) はPd惹起後24時間で最大となり、コントロール群と比較し有意差が認められた ( $P < 0.05$ : t検定)。サイトカイン測定ではIFN- $\gamma$ に関してPd惹起後15時間でコントロール群と比較し有意な産生の差を認めた ( $P < 0.05$ : t検定)。また、IFN- $\gamma$ 産生細胞の約90%がCD8+T細胞であった。これよりPdアレルギーモデルマウスの作製およびフローサイトメトリーでの確認が行えた。次に、in vitroにてHistamineはCD4+, CD8+T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を促進させた。また、抗Histamine薬 (Olopatadine Hydrochloride) はCD4+, CD8+T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を抑制した。最後に、Pdアレルギーモデルマウスにおいて抗Histamine薬 (Olopatadine Hydrochloride) は、コントロール群と比較し有意に足蹠腫脹および、Pd惹起後15時間でCD8+T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を抑制した ( $P < 0.05$ : t検定)。

以上のことから、HistamineはT細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を促進し、Pdアレルギー発症に関与することが示唆された。

最終試験の結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第1320号	氏名	井口 直彦
最終試験担当者	主 査	井上 孝	教 授
	副 査	片倉 朗	教 授
		吉成 正雄	教 授
		笠原 正貴	教 授
最終試験施行日	平成27年 2月 5日		
試験科目	オーラルメディシン・口腔外科学		
試験方法	口頭試問		
試験問題	主題ならびに関連問題		
<p><u>結果の要旨</u></p> <p>本審査委員会は主題ならびに関連問題について最終試験を行った結果、十分な学識を有することを認め、合格と判定した。</p>			

## 学位論文審査の要旨

近年、歯科領域ではパラジウム (Pd) アレルギー患者の増加が指摘されている。しかし、金属アレルギー発症において T 細胞が重要な役割を担うことは知られているが、適切な動物モデルが存在せず未だ詳しい分子機構は不明である。また、近年、Histamine が免疫応答における T 細胞の機能を調節することが報告されている。

本研究は、新たな Pd アレルギーモデルマウスの作製および、そのモデルを用い Pd アレルギーにおける Histamine の関与について T 細胞に着目し検証したものである。

実験では、PdCl<sub>2</sub> 溶液を用いマウス鼠径部 (感作)、足蹠 (惹起) へ皮内注射を行い、Pd アレルギーモデルマウスを作製し、足蹠測定およびサイトカイン測定にて Pd アレルギー発症が確認できた。また、in vitro にて T 細胞に対し Histamine、抗 Histamine 薬 (H1 受容体拮抗薬: Olopatadine Hydrochloride) 刺激を行い、フローサイトメトリーにてサイトカイン産生を評価した。さらに、本モデルにおいて抗 Histamine 薬 (H1 受容体拮抗薬: Olopatadine Hydrochloride) の効果を検証した。その結果、Pd アレルギーモデルにおいて Histamine が T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を調節していることが in vitro, in vivo で確認された。これらの結果から、Histamine が T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を促進し、Pd アレルギー発症に関与していることが有意差をもって確認された。また、H1 受容体の遮断により IFN- $\gamma$  産生および Pd アレルギーマウスの足蹠腫脹を抑制することができた。

本審査委員会では、1) これまで報告された Pd アレルギーモデルマウスの問題点・本モデルの改良点 2) モデルマウス作製においてコントロール群でも足蹠腫脹を認める理由 3) Pd 以外の金属アレルギーにおける Histamine の関与 に関して質疑が行われ、1) 過去に 2 種類モデルが報告されており、1 種目は、耳を評価するものであり注射・測定など手技が困難であること、2 種目は、足に惹起を 3 回行うため純粋な金属アレルギーを誘導できているか疑問が残るという問題点がある。また、本モデルは、感作 2 回・惹起 1 回とし、足に金属アレルギーを誘導することでこれらの問題点を改善した 2) 惹起として PdCl<sub>2</sub> 溶液を足底に皮内注射しており、金属刺激により一時的に急性炎症が起こるため 3) Ni アレルギーにおいて Histamine 合成酵素: histidine decarboxylase (HDC) 欠損マウスではアレルギー発症が軽微であることが報告されている との回答を得た。また、論文タイトル、文章構成、英語表現、図表の表記、参考文献の追加などの修正すべき点についても指摘がなされ、修正が行われた。

以上より、本研究で得られた結果は今後の歯科医学の進歩、発展に寄与すること大であり、学位授与に値するものと判定した。