

J Invest Dermatol 2005; 124:786-792.

- 3) Palmer CN, Irvine CN, Terron-Kwiatkowski, et al: Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006; 38: 441-6.
- 4) Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, et al: Specific Filaggrin Mutations Cause Ichthyosis Vulgaris and Are Significantly Associated with Atopic Dermatitis in Japan. *J Invest Dermatol* (in press).
- 5) Thestrup-Pedersen K: Atopic eczema. What has caused the epidemic in industrial countries and can early intervention modify the natural history of atopic eczema? Treatment strategies and compliance for the adult patient with atopic eczema. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 2005; 215: 36-40.
- 6) Giordano-Labadie F, Rancé F, Pellegrin F, Bazex J, Dutau G, Schwarze HP: Frequency of contact allergy in children with atopic dermatitis: results of a prospective study of 137 cases. *Contact Dermatitis* 1999; 40: 192-195.
- 7) Ma HL, Liang S, Li J, et al: IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest* 2008; 118: 597-607.
- 8) Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y: Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* (in press).
- 9) Mori T, Kabashima K, Yoshiki R, Sugita K, Shiraishi N, Onoue A, Kuroda E, Kobayashi M, Yamashita U, Tokura Y. Cutaneous Hypersensitivities to Hapten Are Controlled by IFN-gamma-Upregulated Keratinocyte Th1 Chemokines and IFN-gamma-Downregulated Langerhans Cell Th2 Chemokines. *J Invest Dermatol* (in press).

演題：金属アレルギーの新規診断法と治療法の開発に向けた理論的基盤の開発

演者：梶島 健治

所属：京都大学・医学研究科・皮膚科 准教授

A. 研究目的

金属アレルギーの原因は歯科金属やピアス・時計などの装飾品など多岐にわたり、臨床症状も、遅延型過敏反応の代表である接触皮膚炎から掌跖膿疱症など多彩である。またパッチテストは比較的簡便な金属アレルギーのスクリーニング方法であるが、検査による感作誘導のリスクや検査期間中入浴できないなど患者のQOLの低下を招く。そこで安全かつ患者にとって負担のかからない *in vitro* でのスクリーニングのアッセイ系を確立することを目的とする。また、各金属アレルギーの臨床症状に伴う原因ヘルパー、細胞障害性T細胞サブセットの同定を行い、発症機序の原因に迫りたい。

B. 方法

パッチテスト(patch test; PT)で陽性を確認した金属アレルギー患者の臨床症状を、接触皮膚炎、肉芽腫、掌跖膿疱症などの臨床症状別に分類する。さらに各患者の末梢血から ficoll により PBMC を分離し、PT 陽性の NiSO_4 , NiCl_2 , MnCl_2 , CrCl_3 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ などの金属イオンを 1, 10, 100 μM の濃度で混合培養 (1×10^5 cells/well:96 穴) し、トリチウムでラベルした thymidine を培養 4 日目に加え、その後 24 時間における取り込みをセルハーベスターにより測定し、金属の細胞増殖刺激能を評価する (=lymphocyte transformation test; LTT)。

C. 結果

接触皮膚炎、肉芽腫性口唇炎、歯科金属アレルギー、金属プレート挿入後の蕁麻疹、人工関節置換術後の皮膚炎の計 13 症例(前回は 6 症例)において各金属と混合培養し、LTT を施行した。Ni, Fe, Cr による LTT は陽性を示したが、その他の金属では明らかな陽性を示さなかった。

同一患者を異なる time point で LTT assay を行ったが、いずれも陰性となった。

D. 考察

パッチテスト陽性の金属に対して LTT アッセイが陽性になる金属とならない金属の 2 種類あることが示唆された。また、金属パッチテストで陽性であっても LTT で陰性となるケースが多い。原因として、optimal dose で金属刺激ができなかった、金属の毒性の方が stimulation よりも強く出た、Treg などの抑制系のサイトカインが産生され LTT 反応が mask された、ある種の金属では PBMC 分画では LTT が誘導されない、incubation period が短かすぎた、などがあげられる。今後も詳細な optimal dose と toxicity に関する検討や培養液中の IL-10 などの抑制系サイトカインの定量、PBMC に分離せず、whole blood を用いた LTT アッセイなどを行いたい。

LTT の系の立ち上げが完了した後に、金属との混合培養液中の Th1 cytokine (IFN- γ , IL-2), Th2 cytokine (IL-4, 5, 13), Th17 cytokine (IL-17, IL-22), Treg cytokine (IL-10, TGF- β)

などをELISAやflowcytometryを用いたbeads arrayなどにより評価し、臨床症状とTh1, Th2, Th17との関連を検証し、金属によって誘発される各臨床症状の発症機序に関与するTリンパ球サブセットの同定を行いたい。

E. 結論

金属アレルギーにおけるパッチテスト陽性の患者由来の末梢血において少なくともNi, Fe, Cr(?)においてLTTアッセイによる検出が可能であることが示された。今後はより感度の高いアッセイ系を確立し、パッチテストに変わる安全性の高い検査法を開発していく必要があると考えられる。

厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

金属アレルギーの克服へ向けた効果的診断・予防・
治療法の開発研究

平成20年度
第2回 班会議
抄録集

日時：平成20年11月14日（金）

13：00より

場所：北海道大学医学部1F 第3会議室

連絡先：（小笠原、西屋、川野、田中、浦野）

プログラム

開会の挨拶 研究代表者 小笠原康悦 13:00-13:10

本年度の研究成果発表

セッション1.

「金属アレルギー発症に関与する自己抗原ペプチド同定のためのアッセイ系の確立」

菅原俊二 (分担研究者) 13:15-13:35

東北大学大学院歯学研究科・口腔分子制御学

「金属アレルギーの新しい診断技術開発に向けた工学的アプローチとHDCレポーター動物の作製」

大津 浩 (分担研究者) 13:40-14:00

東北大学大学院工学研究科・応用量子医工学

「金属アレルギーの新規診断法と治療法の開発に向けた理論的基盤の確立」

椎島 健治 (分担研究者) 14:05-14:25

京都大学・医学研究科・皮膚科

Break 14:25-14:40

本研究事業の連絡事項

小笠原康悦 (研究代表者) 14:40-15:00

国立国際医療センター研究所

難治性疾患研究部・臨床免疫研究室

セッション2.

「マウス金属アレルギーモデルを用いた金属アレルギー特異的T細胞解析」

小笠原康悦 (代表・分担研究者) 15:05-15:25

国立国際医療センター研究所

難治性疾患研究部・臨床免疫

「金属アレルギーでの微生物環境の重要性」

遠藤康男 (分担研究者)

15:30-15:50

東北大学大学院歯学研究科・口腔分子制御学

Break

15:50-16:10

セッション3.

「アトピー皮膚炎における金属アレルギーの関与とTh17細胞による増強」

戸倉新樹 (分担研究者)

16:10-16:30

産業医科大学・皮膚科

「マウスNiアレルギーモデルの惹起相における自然免疫の役割」

高田春比古 (分担研究者)

16:35-16:55

東北大学大学院歯学研究科・口腔細菌学

「骨髄由来樹状細胞の移入による金属アレルギーの感作成立とTLRシグナリング」

西屋禎 (分担研究者)

17:00-17:20

北海道大学大学院医学研究科・細胞薬理学

Break

17:20-17:35

総合討論

17:35-18:35

閉会

18:35-18:45

発表は時間厳守でお願いいたします。目安として、発表時間15分、質疑応答5分、計20分と考えております(演題の間に5分の余裕はありますが、時間厳守でお願いいたします)。スライドはパワーポイントファイルで作成し発表してください。

演題：金属アレルギー発症に関与する自己抗原ペプチド同定のためのアッセイ系の確立

分担研究者 菅原 俊二 東北大学大学院歯学研究科 口腔分子制御学分野 教授
研究協力者 永井 康裕 東北大学大学院歯学研究科 口腔分子制御学分野 助教
田中 志典 東北大学大学院歯学研究科 口腔分子制御学分野 大学院生

A. 研究目的

金属アレルギー発症には、金属イオンと結合する自己タンパク質の存在が不可欠であるが、抗原提示のメカニズムについてはいまだ解明されていないのが現状である。そこで、本研究では、金属アレルギーマウスモデルを用いて金属アレルギー発症に関与する自己抗原ペプチド同定することを最終目標とし、昨年度はニッケルイオン感作マウスの抗原提示細胞の MHC クラスⅡ分子の溝に収容されている自己抗原ペプチドの精製方法を確立した。今年度は、精製ペプチドの活性を評価するためのアッセイ系の確立を目指した。

B. 方法

遠藤らの方法 (Clin. Exp. Allergy 37: 743-751, 2007) に従い、以下の手順で行った。

1. BALB/c マウス (メス 6 週令) をニッケルイオンと LPS で腹腔内感作 10 日後、生理食塩水あるいはニッケルイオンで尾根部筋肉内にチャレンジした。5 日後、腸骨リンパ節と脾臓からリンパ球を調整した。
2. リンパ球を 5% FCS と 5% 正常マウス血清加 RPMI 1640 培地にて、ニッケルイオン±IL-2 存在下で 3 日間培養し、リンパ球の増殖を [³H]チミジン取込み法にて検討した。陽性コントロールとしてコンカナバリン A を用いた。

C. 結果

1. ニッケル感作/チャレンジ群のリンパ節細胞は、感作のみの群と比較し、10 と 100 μM のニッケルイオンに対して明確な増殖反応を示した。増殖反応の感度を充進させるために添加した IL-2 の効果はほとんどなかった。
2. 脾細胞においても同様の傾向が見られたが、リンパ節細胞ほど明確な反応ではなかった。

D. 考察

最適の条件を得るために、培養時間や血清濃度などの課題を克服する必要がある。また、別のアッセイ系として、マウスに感作あるいはチャレンジする際に精製ペプチド各分画を投与し、耳介の腫脹を指標とする *in vivo* の系も考えられる。この点を含めて、さらに検討していく予定である。

E. 結論

金属アレルギー発症に関与する自己抗原ペプチド同定のための *in vitro* アッセイ系をほぼ確立した。

演題：金属アレルギーの新しい診断技術開発に向けた工学的アプローチと HDC レポーター動物の作製

演者：大津 浩

所属：東北大学大学院工学研究科・応用量子医工学 教授

発表要旨：

A. 研究目的

1. 溶出金属イオンの測定法の開発

金属アレルギーが発症する最初のステップとして、金属のイオン化による溶出がある。溶出した金属の濃度を定量的に測定できるシステムがあると診断や重症度および治療効果、予後の判定などに大いに役立つ。工学的な機器開発の現状と問題点について検討する。

2. HDC promoter-reporter 動物の作製

ヒスタジン脱炭酸酵素は、生体内における唯一のヒスタミン合成酵素であり、金属による炎症反応においてその遺伝子の発現が誘導されることが示されている。この遺伝子のプロモーターによってコントロールされるべく蛍光蛋白遺伝子を繋ぎ、トランスジェニック動物を作製する。

B. 方法

1. 溶出金属イオンおよび金属表面の分析

ICP-AES 法

Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (誘導結合プラズマ発光分光法) 放電を利用する溶液試料の発光分析法。高感度で多くの元素を同時定量ができるので急速に発展普及した。ICP 放電で生じたイオンを質量分析計と結合させた ICP-MS 法も開発され、きわめて高感度(数 pg/g)である。ICP-AES 高温でプラズマとなったアルゴンガスによって試料溶液が噴霧器から噴霧され出てきた元素を炎色反応のようにとらえる方法であり感度は数 ng/g 程度である。

2. 金属表面の分析

XRD (X-ray diffraction) 法による解析

金属の表面の相を X 線分析にて解析する。

X 線を材料の表面に入射させ、回折された X 線を観測すると固体の結晶構造を分析できる。その結果表面の酸化状態を検討できる。

SEM-EDX (Scanning electron microscopy/energy dispersed X-ray analysis)

Ni を植え込んだ実験系では生体反応を起こしたマウスの Ni wire のみが黒く見える。走査型電子顕微鏡とエネルギー分散型 X 線分光法を用いて Ni wire および Ni plate の表面の組成について分析する。

2. レポーター動物の作製

HDC promoter 1.0kb+pZsGreen1.1 を構築し、フィッシュ受精卵に注入し、蛍光を観察する。また、場合によっては違った蛍光蛋白との構築も行なう。

C. 結果

1. 溶出金属イオンの測定法の開発

マウスの背部皮下に種々の金属を植え込み炎症反応を惹起させると、ニッケルに特異的に血漿成分の漏出や組織の壊死などがおきる。周辺組織中のニッケル濃度を Newport Green を用いた蛍光法と ICP-AES 法で測定した。その結果、Newport Green による測定では特異性がなかったニッケルと亜鉛を ICP-AES 法では分けて測定することができることがわかった。測定の感度はほぼ同程度であった。

2. トランスジェニックマウスについて

HDC promoter+ZsGreen1.1 マウスは肥満細胞が発光するものの、その発光強度は弱く、金属アレルギー反応において使用に耐ええるものであるかどうかには疑問がある。BAC を用いた遺伝子導入について実験を開始した。

3. フィッシュの作製

緑色の蛍光はゼブラフィッシュの場合、色素細胞の自家発光と重なってしまい、特異的な発光と非常に区別しにくいことがわかった。そのため、赤色の蛍光である mCherry という遺伝子を HDC promoter に繋いだプラスミッドをトランスジェニックしたフィッシュを作製した。このフィッシュでは脳の深部まで見えるものの、躯間部の筋組織も発光し特異性に乏しかった。

D. 考察

1. 溶出金属イオンの測定法の開発

Ni wire を使った系では、今まで行われている Newport Green を用いた蛍光色素を用いた解析でも Ni の

量を定量することが可能であると思われる。今回、SUS316 を植え込んだ周囲に Ni の溶出が測定され、臨床的には問題がないと考えられているステンレス鋼からも Ni の溶出があることが明らかになった。このことは、臨床的に問題となってくる Ni の溶出には閾値があるか、あるいは、臨床的には問題にならない程度でも組織において反応している可能性があると考えられる。したがって、動物体内でのニッケルの溶出を正確に評価する必要性が確認された。

2. HDC promoter-reporter 動物の作製

マウスにおいては、ZsGreen1.1 の発光の特異性に問題があり、プロモーター内にすべての制御領域がはいっているかどうか問題がある。

F. 今後の方針

1. 金属アレルギーの新しい診断技術開発に向けた工学的アプローチに関して分担研究者と相談をして、必要な技術開発的を絞る。今後は、実際に生体内で使用されている金属について生体への溶出量について検討を進めるとともに、金属を使用したときに鋭敏に感知する動物側のモデルについても検討する余地があると考えられる。

2. マウス、フィッシュ共にプロモーター 1 kb によって、内在性の遺伝子の発現を模倣できない可能性が高く、BAC によるリポーター動物の作製を開始している。

金属アレルギーの新規診断法と治療法の開発に向けた理論的基盤の確立

分担研究者 梶島 健治 京都大学・医学研究科 皮膚科 准教授
研究協力者 杉田 和成 産業医科大学 皮膚科 助教

A. 研究目的

金属アレルギーの原因は歯科金属やピアス・時計などの装飾品など多岐にわたり、臨床症状も、遅延型過敏反応の代表である接触皮膚炎から掌跖膿疱症など多彩である。またパッチテストは比較的簡便な金属アレルギーのスクリーニング方法であるが、検査による感作誘導のリスクは避けられず、また検査期間中入浴できないなど患者の QOL の低下を招く。そこで安全かつ患者にとって負担のかからない *in vitro* でのスクリーニングのアクセシ系を確立することが重要な課題である。

昨年度我々は、金属アレルギーにおけるパッチテスト陽性の患者由来の末梢血において少なくとも Ni, Fe, Cr において *in vitro* による lymphocyte transformation test (LTT) アクセシによる検出が可能であることが示したが、パッチテストに比べ感度が劣る傾向があった。本年度は、LTT アクセシ系の感度の高めることを主目的とする。

B. 方法

パッチテスト (patch test; PT) で陽性を確認した金属アレルギー患者、あるいは健康人の末梢血から ficoll により末梢血単核球を分離する。これらの細胞から autoMACS を用いて、CD25 強陽性の制御性 T 細胞を除去するグループと同操作を行わないグループを準備し、PT 陽性の Ni 金属イオンを 1, 10, 100 μM の濃度で混合培養 (1×10^5 cells/well; 96 穴) し、トリチウムでラベルした thymidine を培養 4 日目に加え、その後 24 時間における取り込みをセルハーベスターにより測定し、金属イオンによる LTT を評価した。

C. 結果

健康人においては、Ni に対する LTT は CD25 陽性制御性 T 細胞除去の有無にかかわらず不変であった。一方、Ni アレルギーの患者において、Ni に対する LTT の高値を認めた。また、SI は CD25 陽性制御性 T 細胞を除去することにより上昇した。

D. 考察

LTT アクセシは、末梢血より制御性 T 細胞を除去することにより、金属特異的増殖が増加するのみならず、SI も上昇した。すなわち、LTT アクセシにおける感度が制御性 T 細胞を除去することにより高まることを示唆する。一方、健康人では制御性 T 細胞を除去しても陽性とならなかったことより、擬陽性とはならない。今後、更なる症例数を重ねて、本コンセプトの正しさを検証する必要がある。

また、現法では、制御性 T 細胞を除去するという手順の煩雑が問題点と考えられるため、IL-10 や CTLA-4 といった抑制系サイトカインや表面抗原を中和抗体などにより阻害するなどの改良点も今後の課題である。

E. 結論

金属に対する LTT アクセシにおいて、制御性 T 細胞を除去することにより、感度を高めることを示唆する所見を得た。

マウス金属アレルギーモデルを用いた金属アレルギー特異的 T 細胞解析

分担研究者	小笠原 康悦	東北大学加齢医学研究所 加齢生体防御学研究分野 教授 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部 特任研究員
研究協力者	笹月 健彦 川野 光子 田中 和沙 浦野 奈央子	国立国際医療センター 名誉総長 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部 協力研究員 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部 特任研究員 東北大学大学院歯学研究科 大学院生

A. 研究目的

金属アレルギーは、遅延型過敏反応とされ T 細胞主体のアレルギー反応とされている。我々は、金属アレルギーマウスモデルを用いて、金属アレルギーの病態、発症における分子の変化を時系列的に解析し、新規診断、予防、治療法の開発を目指すことを目的としている。本班会議では、NKG2D⁺/CD8⁺細胞がアレルギー発症に関与していること、プロテアソームが治療標的となりうること、金属アレルギーの発症により TCR レパトアが変化することを見出したので、報告したい。

B. 方法

- 1) C57BL/6 マウス、または BALB/c マウスに、10 mM PdCl₂ / 50 µg/ml LPS x 250 µl/head i.p.により Pd 感作を行い 7~10 日後に 1 mM PdCl₂ を耳介に challenge して金属アレルギーを誘導した。
- 2) 上記の方法により金属アレルギーを耳介に誘導した BALB/c マウスの顎下リンパ節を採取し、single cell に調整後 B cell depletion を行った細胞を BALB/c nu·nu マウスへ i.v.により移入する。移入したマウス耳介に 4~5 回 challenge を行った後、同様に顎下リンパ節を採取・調整し、同様に BALB/c nu·nu マウスへ i.v.により移入する。これを繰り返すことで金属アレルギー特異的な T 細胞の濃縮を行った。
- 3) Pd 感作を行ったマウスに、抗 NKG2D 抗体 (clone: CX5) を 100 µg/head、または、プロテアソームインヒビター-MG132 を 100 µg/head 投与し、その後に 1 mM PdCl₂ を耳介に challenge し、耳介の腫脹の程度を検討した。

C. 結果

移入を繰り返したマウスの顎下リンパ節において、TCRβ⁺/CD8⁺細胞および NKG2D⁺/CD8⁺細胞が出現することが明らかとなった。抗 NKG2D 抗体を投与したマウスでは、金属アレルギーの発症が有意に抑制された。また、プロテアソームインヒビターの投与によっても、金属アレルギーの発症が有意に抑制できた。さらに、移入を繰り返したマウスの顎下リンパ節において TCR Vβ8 の割合が WT の BALB/c マウス顎下リンパ節に比べて低く、TCR レパトアが変化していることが判明した。

D. 考察

BALB/c nu·nu マウスには αβ 型 T 細胞が存在しないことから、移入されたマウスに存在する TCRβ⁺/CD8⁺細胞は金属アレルギーを発症した WT BALB/c マウス由来細胞が増殖・分化したものと考えられる。さらに、金属アレルギー炎症が繰り返されるにつれて NKG2D の発現が増強すること、抗 NKG2D 抗体の投与により炎症が軽減されることから、NKG2D は金属アレルギーの新たな治療標的となりうるということが判明した。また、クラス I への抗原提示にはプロテアソームが必須であり、プロテアソームインヒビターにより発症を有意に抑制できることから、プロテアソームも治療標的となりうるということが判明した。金属アレルギーによりマウス TCR レパトアに変化が見られることから、今後、金属アレルギー特異的 T 細胞の TCR を解明し、相対的なヒト TCR を同定する。この結果を患者サンプルと比較することにより、TCR レパトアの検出がヒト金属アレルギーの新規診断法として有用か追究する。

E. 結論

①金属アレルギーの発症において TCRβ⁺/CD8⁺細胞に NKG2D の発現が誘導されること、②NKG2D 抗体の投与により、金属アレルギーの発症を抑えることが出来ること、③プロテアソームインヒビター投与でも発症を有意に抑制できること、④金属アレルギーの発症に伴い、所属リンパ節に存在する αβ 型 T 細胞において、TCR レパトアが変化することが判明した。

金属アレルギーでの微生物環境の重要性

分担研究者	遠藤康男	東北大学大学院歯学研究科	非常勤講師
研究協力者	金原正敬	東北大学大学院歯学研究科	学生
	高橋春江	東北大学大学院歯学研究科	学生

A. 研究目的

金属アレルギーは通常のハプテンによる接触過敏症と同様に、T細胞主役の疾患と考えられており、研究の多くはヒト感作リンパ球を用いた *in vitro* 実験で行われている。通常ハプテンは、パートナータンパク分子と共有結合して非可逆的複合体を形成して抗原になるのに対し、金属イオンはパートナータンパクと“可逆的”な配位結合により抗原複合体を形成する。従って、抗原プロセッシングも含め、金属アレルギーでの抗原認識機構は単純ではなく、パートナー分子の同定も含め、解決すべき多くの問題が残されている。アレルギー反応は sensitization (感作) と elicitation (炎症惹起) の2つのステップからなる。私達は LPS (グラム陰性菌細胞壁成分) が両ステップで Ni アレルギーの成立を著しく促進することを見だし、このモデルを Ni(+LPS)-allergy と呼んでいる (Sato et al 2007; Clin Exp Allergy 37:743-751)。Ni(+LPS)-allergy はヌードマウスや SCID マウスでも起る。昨年度は以下を明らかにした。(a) Ni + LPS で感作したマウスは、Pd, Cr, Co, Cu, Ag に対して交差反応を示し、Pd, Cr, Ag, Cu は本来の抗原である Ni と同等かむしろ強い炎症を誘導する。(b) Elicitation ステップでアレルギー炎症を誘導する最少 Ni 濃度は、-LPS で μM レベル (1×10^{-6} M) であるが、+LPS では pM レベル (1×10^{-12} M) である。これらの知見は、金属アレルギー促進要因として感染が極めて重要であることを意味している。本年度はグラム陰性菌以外の微生物成分について検討し LPS との比較を行っている。

B. 方法

NiCl₂ 溶液 + 微生物関連物質溶液 (1:1 混合液) をマウス腹腔内注射し、10日後、試験金属塩溶液 + 微生物関連物質溶液 (1:1 混合液) を耳介に皮内注 (20 μl) して、以後その腫脹を測定した。テスト標品として、*E. coli* LPS, *P. intermedia* LPS 画分, *P. gingivalis* の LPS 画分とリポペプチド画分, 合成 MDP (NOD2 リガンド), FK565 (NOD1 リガンド), mannan (真菌成分) などを検討している。

C. 結果

(a) 上記の微生物関連物質はいずれも sensitization と elicitation の両ステップで Ni-allergy を促進した (elicitation での効果については分担研究者の高田が報告)。とくにそれ自体の炎症作用が極めて弱いマンナンが、かなり強いアジュバント効果をもつことが注目される。

(b) Ni+LPS 感作マウスは、Pd, Cr, Co のいずれとも交差反応し、その最少濃度は、-LPS で 1×10^{-6} M, +LPS (*E. coli*) で $1 \times 10^{-14} \sim -12$ M であった。

D. 結論

以上の結果は、感染や微生物成分が極めて重要な金属アレルギー促進因子であること、また、いったん感作が成立すると、極めて低い濃度で、Ni はもちろん、Ni 以外の種々の金属イオンもアレルギー反応を誘導することを示唆する。

E. 考察

LPS 存在下では金属アレルギーの交差反応が極めて低濃度 ($1 \times 10^{-14} \sim -12$ M) で起るという知見は、以下の様に現行パッチテストの再評価をせまるものである。現行パッチテストの濃度は高過ぎ、それ自体が感作を促進する危険性がある。また、金属塩の純度は妥当か? という疑問も湧く。患者皮膚に存在する微生物の影響も考慮すべきである。私達の実験結果は“金属アレルギーの診断・予防・治療で最も重要なことは、金属イオンの種類ではなく、ある金属が生体環境で金属イオンをどの程度放出するかである”ことを示唆している。この観点から、従来とは異なる診断キットを開発する必要がある。例えば、マンナンと種々の濃度の超高純度 NiCl₂ を配合したパッチテストである。これにより、金属の種類ではなく、患者の金属に対する感受性を診断し、それに基づいた対策を講じるべきである。

演題:アトピー皮膚炎における金属アレルギーの関与と Th17 細胞による増強

演者:戸倉 新樹

所属:産業医科大学医学部皮膚科学 教授

発表要旨:

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)は均一の集団ではなく、大きくは外因性(extrinsic)ADと内因性(intrinsic)ADに分けられる(図1)。外因性ADは外来蛋白アレルギーが原因とされ、IgEが高値であり、内因性ADはIgEが正常である。両者間での根本的な差違が何であるかは必ずしも明確ではなかったが、最近のAD研究の進歩はこの2分別法に新たな光を当てようとしている。

皮膚バリア異常とアレルギー反応の先行性は無いと思われていたが^{1,2)}、2006年にAD患者にはフィラグリン遺伝子の変異があるという報告がなされ³⁾、20%以上の日本人ADでもフィラグリンの遺伝子変異をもつという⁴⁾。つまり外因性ADではフィラグリンを典型とするバリア異常があって、アレルギーが皮膚を通過しやすくなり、アレルギーが起こり、IgEは高値となる。

一方、IgE値が正常を示すADの成因は、特異的IgEの出現がないことから、恐らくアレルギーの経表皮透過性の亢進によるものではなく、その他の機序によるものと考えられて、外因性に対して内因性ADと呼ばれてきた。内因性ADの病態は明確に判っていないが、AD患者には金属アレルギーが多いという古くからの観察とともに^{5,6)}、金属が原因の一重要因子と目されている(図2)。加えて内因性ADではかゆみのメカニズムの異常、すなわちかゆみ過敏があるとも考えられる。かゆみ機構には、ヒスタミン、トリプターゼ、サブスタンスP、神経成長因子(NGF)、神経反撥因子、IL-31等々多くの分子が関わっている。内因性ADにおいて、金属アレルギーと恐らくそれが関わるかゆみ過敏が重要な病態因子となっている。

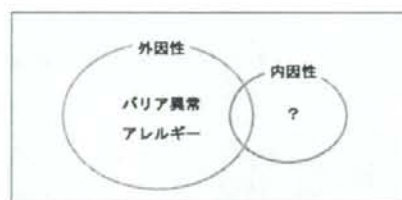


図1. 2つのタイプのアトピー性皮膚炎

硫酸クロム

重クロム酸
カリウム

図2. 29歳女性
内因性アトピー性皮膚炎の例。IgE 43, 好酸球11%
クロムのパッチテスト陽性

最近我々は、ADの免疫学的機序に関連する重要な知見を見出した。Th17細胞はAD症状の initiator あるいは amplifier となることである。Th17細胞はIL-23などに生存・活性を維持され、IL-17、IL-22を産生する。Th17細胞は皮膚科領域ではまず乾癬において注目されたが⁷⁾、ADにおいても重要である。我々が調べた結果では、Th17細胞はADの急性期病変では慢性期の3倍以上浸潤し、末梢血では病勢に応じてその割合が高まる⁸⁾。IL-17は皮膚での炎症の起爆剤的な存在である。もし金属アレルギーが内因性ADの原因的要素であるならば、1) 金属が抗原として働き、その接触過敏症反応の amplifier としてTh17細胞が関わっている、2) 金属が抗原として、あるいは他の何らかの機序でTh17細胞の活性化を誘導している、3) 金属がTh17細胞の活性化・生存に重要な樹状細胞の機能を高めている、4) 金属が表皮角化細胞(ケラチノサイト)のサイトカイン・ケモカイン産生を促進させT細胞性反応を増強している、などの可能性がある。

本研究の目的は、1) 内因性ADの存在と頻度を臨床的に明らかにすること、2) バリア機能とかゆみについて、内因性ADを外因性ADと比較検討すること、3) 末梢血と皮膚でのTh17細胞割合について、内因性ADを外因性ADと比較検討すること、4) 金属アレルギーの頻度について、内因性ADを外因性ADと比較検討すること、2) そうした患者において原因金属はTh17細胞を活性化させるか検討すること、である。

B. 方法

上記の目的を具現化するための研究項目は下記のようなになる。

1) AD重症度およびかゆみ程度に関する項目

AD重症度: SCORAD, 好酸球数, LDH, TARC

かゆみ程度: VAS, CPT (electric current perception threshold, Neurometerによる測定)、血漿中 substance P

2) 外因性と内因性の分別項目

IgE, TEWL, skin surface hydration

3) 金属アレルギー検査項目

金属パッチテスト, 金属に対するリンパ球幼弱化反応

4) Th1, Th2, Th17項目

細胞内サイトカイン FACS, 培養上清サイトカイン測定

本研究については産業医科大学倫理委員会の承認を得た。産業医科大学病院皮膚科を受診した患者につき、インフォームド・コンセントを得て以下を行う。

1. 皮膚症状, かゆみ

ADの重症度は severity scoring system for atopic dermatitis (SCORAD)で評価する。かゆみの強さは visual analogue scale (VAS)で測定する。皮疹の性状については、特に内因性ADでは痒疹 (prurigo) タイプが多いとの仮定に基づき痒疹の有無と程度を記載する。

2. 一般血液検査

総IgE (RIST), ヤケヒョウヒダニ RAST, 白血球数, 好酸球数, LDH, TARC (thymus and activation-related chemokine, CCL17) を測定する。IgE RISTとRASTは外因性と内因性のADを分ける指標とする。好酸球数, LDH, TARCは検査値上の重症度の指標とする。

3. 金属パッチテスト

ニッケル(Ni), コバルト(Co), 六価クロム(Cr), マンガン(Mn), 亜鉛(Zn), 金(Au), 鉄(Fe), スズ(Sn), 水銀(Hg), 銅(Cu), 白金 (Pt), アルミニウム (Al), 銀 (Cu), インジウム (In), イリジウム(Ir)を選択した。トリイのパッチテスト試薬により、スタンダードの濃度でパッチテストを用いて行う。

4. 皮膚生理学的検査

角層のバリア機能を transepidermal water loss (TEWL), skin surface hydration を用いて行う。外因性ADではこれらの機能の低下があると予測される。

5. 末梢血リンパ球免疫検査

Ficoll 比重遠心法にて患者末梢血単核球 (PBMC) を得て、以下の測定を行う。

1) リンパ球サブセット

CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD20, CD25, CD56, CD45R0, CD45RA, HLA-DR, CXCR3, CCR4, Foxp3 陽性細胞の割合(%)をそれぞれの標識モノクローナル抗体で3重染色した後にフローサイトメトリにて解析する。Foxp3は細胞内染色を用いる。特に, CXCR3+CD4+細胞:Th1, CCR4+CD4+細胞:Th2, CD4+CD25+Foxp3+細胞:regulatory T(Treg) 細胞, について検討する。

2) Th1, Th2, Th17 細胞割合

細胞内サイトカイン染色を, IFN- γ , IL-4, IL-17 に対する抗体を用いて行う。PBMCを phorbol ester (PMA) と Ca ionophore で刺激したのち, CD3 あるいは CD8 の表面染色と上記3種それぞれの細胞内サイトカイン染色を行い, フローサイトメトリ解析する。この刺激により CD4 発現は減弱するため, IFN- γ +CD8-:Th1 細胞, IL-4+CD8-:Th2 細胞, IL-17+CD8-:Th17 細胞, としてそれぞれの割合を測定する。

3) 金属に対するリンパ球幼弱化反応

金属パッチテスト陽性患者に対して, PBMC (2×10^5 /well) を 96 穴プレートで金属を希釈系列添加で3日間培養し, 培養の最後12時間に ^3H -チミジン ($1 \mu\text{Ci}/\text{well}$) を添加する。細胞をハーベスト後, 液体シンチレーションカウンターにて ^3H -チミジンの取り込みを測定する。この際, Treg 細胞を抗 CD25 抗体を使用して除去した場合の反応性の増強方法にすいても検討を加える。

4) 金属に対するT細胞反応の転写レベル解析

Th1:T-bet/STAT4, Th2:GATA3/STAT6, Treg:Foxp3, Th17:ROR γ t/STAT5, それぞれの転写因子活性を real-time PCR で検討する。

5) ダニ抗原に対するリンパ球幼弱反応

上記 3)と同様の方法で希釈系列でのダニ抗原に対するリンパ球の反応性を検討する。

金属, ダニに反応する T 細胞のサイトカイン産生

金属パッチテストあるいはダニ抗原陽性患者に対して, PBMC を金属あるいはダニ抗原添加で 24 穴プレートで 5 日間培養した後, 培養上清中のサイトカイン(IFN- γ , IL-4, IL-17, TNF- α)を CBA あるいは ELISA にて測定する。

6) かゆみ関連物質

神経ペプチドの代表としてサブスタンス P(SP)の血中濃度を測定する。SP については末梢知覚神経である C 線維が産生し, その受容体である NK1 を肥満細胞やケラチノサイトが表出していることから, AD のかゆみに重要とされる。なお SP を正しく測定するために, この分解酵素を不活化した方法を取り入れて行う。

Neurotrophin の代表的なものに nerve growth factor (NGF) があるが, 血中での測定が低値であるため, BDNF を測定することにする。

C. 結果

1. 内因性 AD の臨床的特徴

IgE が 436-30,000 (mean, 5,035) の外因性 AD32 名と, IgE が 11-219 (mean, 111) の内因性 AD17 名を比較したところ, 平均年齢は 30.0 歳 vs 33.3 歳と有意差なく, 女性の占める割合は 33% vs 76% と内因性で圧倒的に高く, SCORAD は 41.8 \pm 19.0 vs 27.1 \pm 20.6 と内因性で重症度が軽い傾向があった。この集団は内因性の数が元来少ないために, 内因性の患者を多く含めている。表1は過去の報告を含めて, 内因性 AD の特徴をまとめている。

表 1. 内因性アトピー性皮膚炎の特徴

IgEが正常域
バリア機能が保たれている
AD全体の20%あるいはそれ以下
女性に多い (7,8割)
他のアレルギー疾患の合併がない
発症が遅い
外因性に比べ皮疹が軽め
かゆみが強い (痒疹を作り易い)

2. 内因性 AD の角層状態とかゆみとの関連

我々の検討した集団において、Skin surface hydration (capacitance) は正常人コントロールに比べ、外因性 AD では有意に低く、内因性 AD では変わらなかった。従ってよく知られるように外因性 AD では皮膚が乾燥した状態にあるが、内因性 AD では正常人と変わらない水分量を角質にもつことが判明した。SCORAD と VAS の相関を皮膚部で検討したところ、両タイプとも正の相関を示し、重症度においてかゆみが強いことには変わりがなかった。電気刺激による皮膚感受性はかゆみの感じ方の指標とされる。そこで CPT (電気刺激知覚閾値) と角質水分量 (Skin surface hydration) の相関を両タイプで検討した。正常人は角質水分量と CPT が正の相関、すなわち水分量が少ないほどかゆみを感じ易くなる、を示す。内因性 AD も同じ相関を示したが、外因性 AD は相関がなかった。このことは内因性 AD は正常人と同じ角層状態を保っていることを示唆する。

3. 内因性 AD における Th1/Th2/Th17 細胞割合

細胞内 IL-17、IFN- γ 、IL-4 染色により、末梢血の Th17 細胞、Th1 細胞、Th2 細胞の割合を検討した。Th17 細胞は、AD の重症度に応じて AD 患者末梢血リンパ球中での割合が高かった⁹⁾。AD 患者全体では乾癬に比べ Th17 細胞割合は少ないが、重症 AD においては乾癬患者に比べ有意差無く高値であった (図3)。皮膚浸潤細胞での IL-17 産生細胞の割合は、AD の急性病変において慢性病変より高かった。

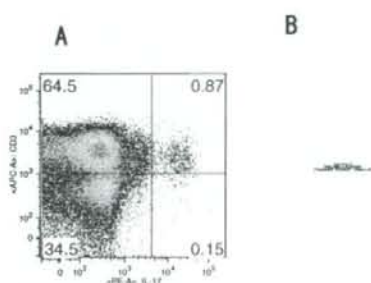


図3. Th17はAD患者の末梢血で増加し (A)、急性のAD皮膚病変で増加 (B)

内因性と外因性の AD において末梢血 Th17 細胞割合は同等であった (表2)。

表 2. 内因性、外因性ADにおける末梢血T細胞割合 (%)

AD	IL-17+細胞	IFN-g+細胞	IL-4+細胞
内因性 (n=16)	0.81 ± 0.50	12.35 ± 6.57	0.40 ± 0.16
外因性 (n=13)	0.79 ± 0.45	10.74 ± 7.37	0.30 ± 0.13
	P=0.9298	P=0.5414	P=0.071

4. 内因性 AD と金属アレルギーとの関連

現在 AD 患者 5 例について金属パッチテストを実施している。1 例において重クロム酸カリウムと硫酸クロムに陽性反応をみた。これは典型的な内因性 AD 患者であった(図1)。

リンパ球幼弱化試験を行っているが、Cr 添加による増殖反応の促進は観察されていない。一般にニッケルは *in vitro* の増殖反応に適した金属であるが、その他の金属は培養系の工夫であろう。そこで Treg 細胞を抗 CD25 抗体で除去した PBMC に金属を添加することを試みた。Treg を除くことにより全体の増殖バックグラウンドが上昇するため、特異的な反応が逆に隠蔽される現象がみられることが確認された。

金属パッチテスト部位で Th17 細胞が浸潤していることが直接的な方法であり、現在これについて検討を加えようとしている。

5. かゆみ関連物質との関連

現在、血中サブスタンス P の量について、内因性 AD と外因性 AD での解析を進めている。

D. 考察

期待される研究成果は以下である。

第1に、外因性 AD と内因性 AD を判別する方法の確立である。外因性 AD は「角層バリア機能の破綻による外来抗原に対する反応亢進」、内因性 AD は「バリア異常に基づかないかゆみの亢進」というのが基本的概念である。これを数字に還元するために、IgE の他に、角層機能 (skin surface hydration) が有用な分別方法になり、さらにはかゆみ関連の測定項目 (SP) が補助以上の診断項目になれば、大きな成果が得られる。

第2に、内因性 AD の原因としての金属アレルギーである。古くから、Ni、Cr、Co はアレルギーを起こす3大金属と言われており、その他 Sn、Mn、Zn、Hg なども AD あるいは自家感受性皮膚炎などで陽性率が高いと言われてきた。AD での高陽性率が、内因性 AD 患者での貢献であるかは、現在まで知られていない。そうであるならば内因性 AD の原因として金属アレルギーが形を変えて浮上する可能性があり、大きな研究成果となろう。

第3に、ADとTh17細胞の関連である。皮膚科領域ではTh17細胞は乾癬においてまず注目された。しかし我々はTh17細胞の多寡によりADの重症度が決定されることを発表している⁹⁾。Th17細胞の関与がさらに、金属アレルギーと結びついていけば、内因性ADにおけるTh17細胞の重要性を明らかにすることができる。

現在まで、ADの研究を以上のように統括的に行うことは、必ずしもされてこなかった。本研究は新しい基礎臨床研究を融合的に取り入れたものであり、成果が期待できる。

E. 結論

内因性ADの原因・病態は明確において金属アレルギーが原因の一重要因子である可能性がある。加えてかゆみ過敏があると考えられる。

ADはTh2病といわれる。しかしそれだけでは病態を説明できない。全身の免疫状態がTh2に変調しているのは確かとしても、皮膚炎形成にはTh1サイトカインとくにIFN-gの存在なくしては成立するのが困難だからである。病原性T細胞は、IFN-gのソースであるべきこと、Th2細胞の性格をもつことを満足させねばならない。あるいはTh1・Th2両者を統合して促進させるT細胞、例えばTh17細胞を病態に参加させることが必要となる。

ADは遅発型反応(late phase reaction)と遅延型反応(delayed-type reaction)の間を揺れ動く疾患と捉えることができる。遅発型反応は、臨床的には浮腫性紅斑であって好酸球とTh2細胞が媒介する。一方、遅延型反応は湿疹を形成しTh1細胞とTc1細胞が媒介する。Th17細胞は遅発型から遅延型に移行する場面で機能を発揮するかもしれない。IFN-gはケラチノサイトのTh1ケモカイン産生を増強させるが、Langerhans細胞(LC)のTh2ケモカイン産生は減弱させる⁹⁾。すなわちTh17細胞の設定する環境下で、IFN-gはTh1ケモカインの産生を促しADの慢性病変としての遅延型反応を先導することを示唆する。

以上の知見を踏まえると、ADにおける金属アレルギーの関与について次のような作業仮説が成り立つ。金属は樹状細胞やケラチノサイトを介してTh17細胞を活性化する。この際、樹状細胞もケラチノサイト自身も金属によって活性化される。Th17細胞は産生するIL-17やIL-22によりケラチノサイトを刺激し、サイトカイン・増殖因子・かゆみ関連物質の産生を亢進させる。樹状細胞よりのTh2ケモカイン(CCL17, CCL22)、ケラチノサイトよりのTh1ケモカイン(CXCL10, CXCL9, CXCL11)が、ADを悪化させる。さらに、かゆみ関連物質等がケラチノサイトから放出され、さらなる病状悪化を導くことが発想される。

F. 今後の方針

以上の全体計画に基づき、主に金属アレルギー関連の研究項目について上記計画に則り研究を遂行する。

参考文献

- 1) Nishijima T, Tokura Y, Imokawa G, et al: Altered permeability and disordered cutaneous immunoregulatory function in mice with acute barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 175-182.
- 2) Hatano Y, Terashi H, Arakawa S, Katagiri K: Interleukin-4 suppresses the

- enhancement of ceramide synthesis and cutaneous permeability barrier functions induced by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in human epidermis. *J Invest Dermatol* 2005; 124:786-792.
- 3) Palmer CN, Irvine CN, Terron-Kwiatkowski, et al: Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006; 38: 441-6.
 - 4) Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, et al: Specific Filaggrin Mutations Cause Ichthyosis Vulgaris and Are Significantly Associated with Atopic Dermatitis in Japan. *J Invest Dermatol* (in press).
 - 5) Thestrup-Pedersen K: Atopic eczema. What has caused the epidemic in industrial countries and can early intervention modify the natural history of atopic eczema? Treatment strategies and compliance for the adult patient with atopic eczema. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 2005; 215: 36-40.
 - 6) Giordano-Labadie F, Rancé F, Pellegrin F, Bazex J, Dutau G, Schwarze HP: Frequency of contact allergy in children with atopic dermatitis: results of a prospective study of 137 cases. *Contact Dermatitis* 1999; 40: 192-195.
 - 7) Ma HL, Liang S, Li J, et al: IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest* 2008; 118: 597-607.
 - 8) Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y: Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2625-2630..
 - 9) Mori T, Kabashima K, Yoshiki R, Sugita K, Shiraishi N, Onoue A, Kuroda E, Kobayashi M, Yamashita U, Tokura Y. Cutaneous Hypersensitivities to Hapten Are Controlled by IFN-gamma-Upregulated Keratinocyte Th1 Chemokines and IFN-gamma-Downregulated Langerhans Cell Th2 Chemokines. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1719-27.