

- cells. Taiwan dermatology association annual meeting, Kaohsiung, Taiwan, 2009.
22. Sakabe J, Kabashima K, Yoshiki R, Nakamura M, Tokura Y : Impaired profilaggrin processing in the flaky tail mouse. The 34th Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Fukuoka, 2009.
23. Yasuda H, Yasuda J, Miyake T, Takenaka H : Treatments for facial benign skin tumors using CO2 laser with Computed scanner. The 4th Fukuoka-Busan Over-Seas Society of Plastic Surgeons. Kurume, 2009.
24. Miyake T, Yasuda J, Yasuda H : A case of perianal condyloma acuminatum who is turned out HIV-positive in the screening. The 4th Fukuoka-Busan Over-Seas Society of Plastic Surgeons. Kurume, 2009.
25. Miyake T, Yasuda J, Matsumoto H, Yasuda H : The effects of long-pulsed alexandrite laser for skin rejuvenation in Orientals. The 10th Congress of the International Confederation for Plastic and Reconstructive and Aesthetic Surgery –Asian Pacific Section- . Tokyo, 2009.
26. Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Tokura Y, Miyaxhi Y, Amagai M, Kabashima K : Flaky tail mouse as a possible model of atopic dermatitis;pruritis-associated response induced in flaky tail mouse. 5th International Workshop for the Study of Itch. Tokyo, 2009.

H.知的財産権の出願・登録状況
該当なし

分担課題：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に関する研究

分担研究者： 梶島 健治 京都大学医学研究科 准教授

研究協力者 本田 哲也 京都大学医学研究科 助教

研究要旨

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、検査そのものにより感作を誘導するリスクがあることや患者のQOLを低下させることが問題となっている。そこで我々は各臨床症状の原因T細胞サブセットの同定を行い、さらに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系を確立することを本研究の目的とした。そこで、金属アレルギーを有する患者の末梢血に金属を添加し、細胞増殖への影響を調べたところ、Ni などに対するアレルギーを有する患者の末梢血が Ni の添加により有意に細胞増殖が増強されることを見出し、パッチテストに変わる簡易な *in vitro* assay の確立の可能性を示唆させた。ところが、さらに症例を重ねていくと、パッチテストが陽性であるにもかかわらず MLTT が陰性である症例を多く経験した。そこで、偽陰性を少なくすることを目的に末梢血リンパ球から制御性 T 細胞を除去したところ偽陰性の割合が減少した。ところが、制御性 T 細胞を除去する操作は簡便とは言えないため、ルーティンに行うべき検査としては不向きであると考えられる。制御性 T 細胞除去に変わる簡易な方法を見出すため、IL-10, TGF-beta, CTLA-4 の中和抗体を用いて MLTT の偽陰性の改善を試みたが、期待される結果は得られなかった。以上より、感度はパッチテストには及ばないが、MLTT は患者にとって負担も少なく、QOL の低下を引き起こさない *in vitro* アッセイ法であることが示唆された。

A. 研究目的

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法であるが、検査による感作誘導のリスクや入浴制限を受けるなど患者のQOLを低下させることが課題となっている。そこで金属アレルギーの発症機序を解明することにより、理論基盤を確立し、それを基に、安全かつ患者にとって負担がかからず、さらに好感度の *in vitro* でのスクリーニングの系を確立することを目的とする。

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の臨床症状を、臨床症状別に分類する。患者からの informed consent を得た上で、各患者の末梢血から ficoll により PBMC を分離し、PT 陽性の金属

(NiSO₄, NiCl₂, MnCl₂, CrCl₃, K₂Cr₂O₇などを1, 10, 100 μMの濃度にて)と混合培養(1×10⁵ cells/well:96穴)し、³[H]-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(=metal-induced lymphocyte transformation test; MLTT)。この際に、IL-10, TGF-beta, CTLA-4等の中和抗体により制御性T細胞の機能阻害を行い感度の向上を図る。

C. 研究結果

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の17症例において金属パッチテスト陽性反応を示した各金属と混合培養した。表記は stock

solution(10 mM)の希釈倍率(あるいは金属濃度)とした。Ni(1000 から 10000 倍希釈), Fe(10000 倍希釈), Cr(0.5-5 μ M)によるMLTTにて陽性を示した。また、Niに対する反応も装飾品による接触皮膚炎を発症した患者では陽性であったが、肉芽腫性口唇炎やプレートの金属による蕁麻疹様のものでは陰性であった。一方、その他の金属では明らかな陽性を示さなかった(図1)。

一方、制御性T細胞を除去すると、健常患者では、細胞増殖に影響を与えないが、Niアレルギーの患者において、Ni添加による増殖効果が40%程であった患者の増殖率が60-80%へと上昇した。ところが、IL-10, TGF- β , CTLA-4などの制御性T細胞の抑制機能に関することが示唆されるサイトカインを阻害しても有効な結果は得られなかった(図2)。

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。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、などが挙げられる。確かに制御性T細胞を除去すると感度が上昇するものの、培養液中のIL-10などの抑制系サイトカインの中和抗体ではむしろ健常コントロールの反応が上昇したことより注意が必要である。ただし、Tregを除去する方法は煩雑であるため、IL-10やCTLA-4などの中和抗体をMLTTのアッセイ系に添加する、等のより簡便な系に期待がかかったが、その系では感度が必ずしも上がるわけではないことが判明した。

以上よりMLTTは、感度はパッチテストには及ばないもの、患者にとって負担も少なく、QOLの低下を引き起こさないin vitroアッセイ法であることが示唆された。制御性T細胞

を除去することで感度は上がるものの、手技が貧雑にあるため、ルーティンに行う検査としては疑問が残る。

E. 結論

アレルギーの診断法として、MLTTは、感度はパッチテストには及ばないもの、患者にとって負担も少なく、QOLの低下を引き起こさないin vitroアッセイ法であることが示唆された。今後更なる症例の蓄積による検討が待たれる。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

11. Honda T, Nakajima S, Egawa G, Malissen B, Ogasawara K, Miyachi Y, Kabashima K*. Compensatory role of Langerhans cells and Langerin positive dermal dendritic cells in the sensitization phase of mouse contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* (in press)
12. Tomura M, Honda T, (他10名), Kabashima K*. Activated regulatory T cells are major T cell type emigrating from sensitized skin. *J Clin Invest* (in press)
13. Honda T, Matsuoka T, Ueta M, Kabashima K, Miyachi Y, Narumiya S. 2009. Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* (in press)
14. Sugita, K., Kabashima, K. *, Yoshiki, R., Ikenouchi-Sugita, A., Tsutsui, M., Nakamura, J., Yanagihara, N., and Tokura, Y. 2009. Inducible Nitric Oxide Synthase Downmodulates Contact Hypersensitivity by Suppressing Dendritic Cell Migration

- and Survival. *J Invest Dermatol* (in press)
15. Yoshiki, R., Kabashima, K., Sugita, K., Atarashi, K., Shimauchi, T., and Tokura, Y. 2009. IL-10-producing Langerhans cells and regulatory T cells are responsible for depressed contact hypersensitivity in grafted skin. *J Invest Dermatol* 129:705-713.
 16. Nishio, D., Nakashima, D., Mori, T., Kabashima, K., and Tokura, Y. 2009. Induction of eosinophil-infiltrating drug photoallergy in mice. *J Dermatol Sci* 55:34-39.
 17. Kobayashi, M., Yoshiki, R., Sakabe, J., Kabashima, K., Nakamura, M., and Tokura, Y. 2009. Expression of toll-like receptor 2, NOD2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes. *Br J Dermatol* 160:297-304.

学会発表

4. What's new in immunology of metal allergy K Kabashima (17th International Contact Dermatitis Symposium 2009)
5. K Kabashima (symposist). Langerhans cells and prostaglandins: contribution to the etiology and pathogenesis of atopic dermatitis and related disorders. **5th Georg Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis**, April 2008
6. K Kabashima (symposist). Actin cytoskeleton formation through mDial is essential for DC-T cell interaction and T cell motility in the lymph nodes. **The 39th annual meeting of the Japanese Society for Immunology**, Dec 2009.

H.知的財産権の出願・登録状況
該当無し

図1：パッチテスト陽性患者における MLTT の結果のまとめ

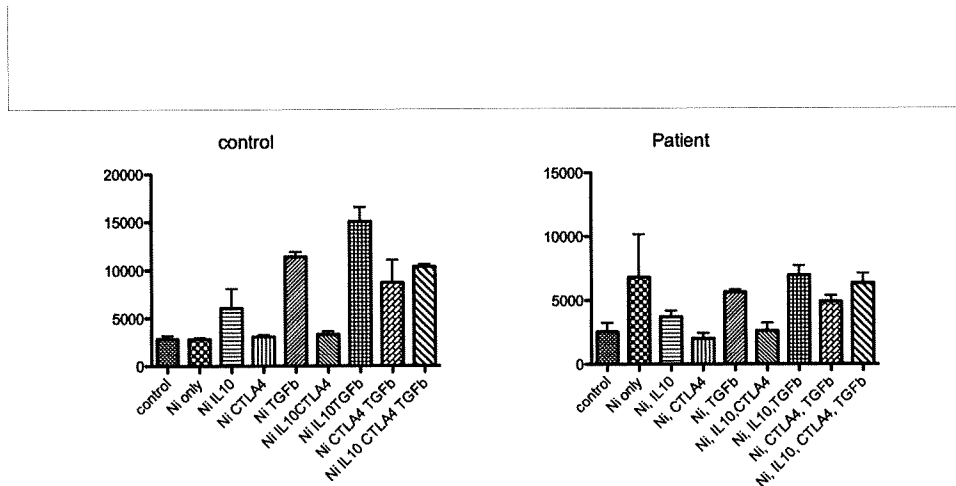
MLTT陽性となりうる金属

- ・ NiSO_4 ：パッチテスト陽性全9症例 → MLTT陽性4例（4症例とも1/1万希釈濃度-1 $\mu\text{g/ml}$ でSI比>1.8倍）
- ・ K_2CrCl_3 ：パッチテスト陽性全5症例 → MLTT陽性2例（2症例とも5 μM -12 $\mu\text{g/ml}$ でSI比>1.2倍、>4.8倍）
- ・ FeCl_3 ：パッチテスト陽性全1症例 → MLTT陽性1例（1/1万倍希釈濃度-0.5 $\mu\text{g/ml}$ でSI比>1.8倍）

MLTT陰性であった金属

- ・ CuSO_4 ：パッチテスト陽性全2症例（1/1万～1/100万倍希釈濃度）
- ・ MnCl_2 ：パッチテスト陽性全3症例（1/1万～1/100万倍希釈濃度）
- ・ PdCl_2 ：パッチテスト陽性全3症例（100 μM 、150 μM ）
- ・ H_2PtCl_6 ：パッチテスト陽性全3症例（1/1000～1/10万倍希釈濃度）
- ・ SnCl_2 ：パッチテスト陽性全2症例（1/1000～1/10万倍希釈濃度）
- ・ Co ：パッチテスト陽性全2症例（1/10000）

図2：ニッケルに対するパッチテスト陽性の患者と健常人における Ni 添加時における MLTT の結果。Ni 添加に加え、抗 IL-10、TGF-beta, CTLA-4 中和抗体を添加してチミジン取り込みに変化があるかどうかを検討した。



III. 班会議プログラム

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21年度
第1回 班会議
抄録集

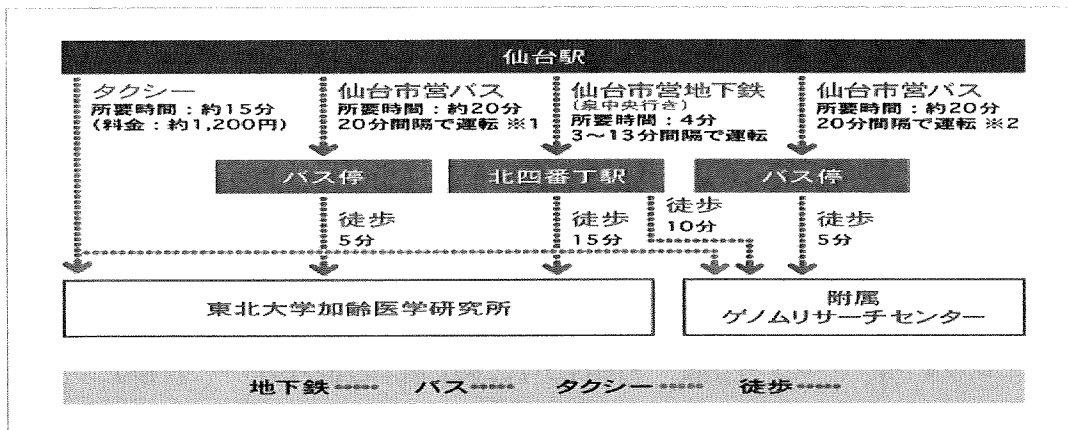
日時：平成21年5月22日（金）

13：00より

場所：東北大学加齢医学研究所1F 小会議室（内線8480）

連絡先： 022-717-8579（小笠原、中山、川野）

アクセス

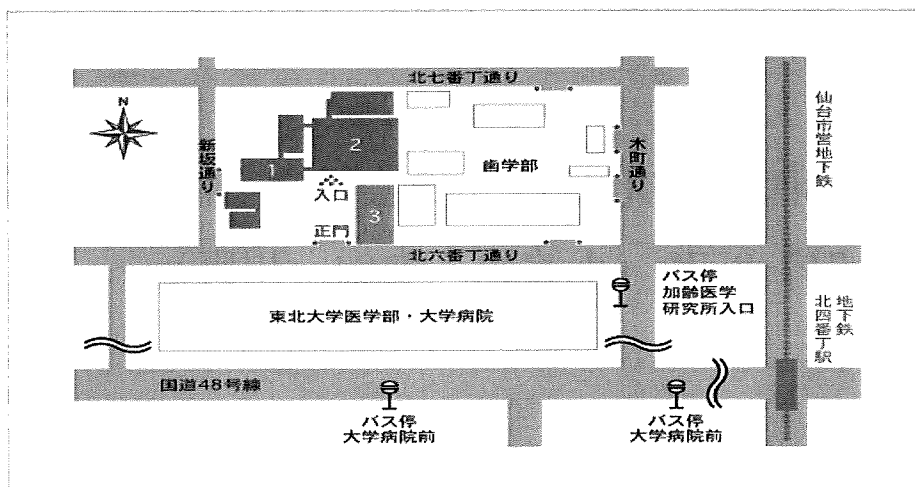


※1 仙台駅バスのりば案内(東北大学加齢医学研究所)

のりば番号	経路地・行先	下車停留所	所要時間
10	{大学病院・八幡町経由} 作並温泉、白沢車庫、定義、折立・西花苑、茂庭	大学病院前	所要時間 20分-25分 待ち時間 10分-30分
	{南町通り・大町西公園経由} 八幡町・川内営業所		
15	{大学病院・八幡町経由} 南吉成、貝ヶ森、国見が丘、葛岡霊園		
16	{大学病院経由} 交通公園・川内営業所、交通公園循環		

・10番、15番、16番のりば は仙台駅西口バスプールです。

加齢医学研究所 配置図



会議は1の建物（研究棟）の1階、小会議室で行います。

プログラム

開会、本研究事業の概要 研究代表者 小笠原康悦 13:00-13:25

本年度の研究成果および研究計画の発表

セッション1.

「骨髄由来樹状細胞の移入による金属アレルギーの感作とその機構について」

西屋 禎 (分担研究者) 13:25-13:45

北海道大学大学院医学研究科・細胞薬理学

「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) 13:50-14:10

東北大学大学院工学研究科・応用量子医工学

「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」

川野 光子 (代理・研究代表者 小笠原康悦) 14:15-14:35

東北大学加齢医学研究所・加齢生体防御学

Break 14:35-14:50

本研究事業の連絡事項

小笠原康悦 (研究代表者) 14:50-15:10

東北大学加齢医学研究所・加齢生体防御学

セッション2.

「金属アレルギーモデルマウスにおける網羅的T細胞レセプター解析」

鈴木 隆二 (分担研究者) 15:15-15:35

国立病院機構相模原病院・臨床研究センター

「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」

梶島 健治 (分担研究者)

15:40-16:00

京都大学・医学研究科・皮膚科

Break

16:00-16:20

セッション3.

「金属パッチテストおよびヒト末梢血単球を用いた金属アレルギー診断方法確立」

松永 佳世子 (分担研究者)

16:20-16:40

藤田保健衛生大学・医学部・皮膚科

「金属アレルギー患者における金属反応性T細胞の解析」

瀬尾尚宏 (代理・分担研究者 橋爪秀夫)

16:45-17:05

浜松医科大学・医学部・皮膚科

「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」

尾藤利憲 (代理・分担研究者 戸倉新樹)

17:10-17:30

産業医科大学・皮膚科

Break

17:30-17:50

総合討論

18:00-20:30

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。

骨髄由来樹状細胞の移入による金属アレルギーの感作とその機構について

分担研究者 西屋 禎 北海道大学大学院医学研究科 細胞薬理学分野 講師

A. 研究目的

金属イオンの情報を含む MHC-ペプチド複合体を細胞表面に発現する抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示することが金属アレルギー発症の重要なステップとして位置付けられているが、いまだ不明な点が多い。我々の研究班が開発した金属アレルギー発症マウスモデル系では、金属塩と LPS の混合液をマウスの腹腔内に投与することにより、10 日間で金属アレルギーを感作することができる。さらに、我々は前回の班会議において、*in vitro* で金属塩と LPS を処理した骨髄由来樹状細胞 (DC) をマウスに移入することで、同様に金属アレルギーを感作できることを報告した。本研究は、*in vitro* で金属塩と LPS を処理した骨髄由来 DC が金属アレルギーを誘発するメカニズムを明らかにすることにより、金属アレルギーの感作機構や自然免疫の果たす役割を解明することが目的である。今回は、金属アレルギーの感作成立における骨髄由来 DC 移入の時間的影響と移入した骨髄由来 DC の体内動態について検討した。

B. 方法

C57BL/6 マウスの骨髄細胞を GM-CSF (10 ng/ml) で 9 日間処理し、骨髄由来 DC を得た。この細胞を PdCl₂ (0.2 mM)、または PdCl₂ + LPS (20 ng/ml) で 24 時間処理した。この細胞を洗浄後、B6 マウス (7~8 週齢雌) に 5x10⁵ cells/マウスの量を尾静脈注射により移入した。移入後、1, 3, 7, 及び 10 日後に PdCl₂ 溶液 (1 mM) をマウスの耳介に皮内注 (15 µl) して、以後その腫脹を 24 時間おきに 4 日間測定した。また、GFP トランスジェニックマウスの骨髄由来 DC を PdCl₂ + LPS で 24 時間処理した後、野生型マウスに移入し、その 1, 3, 7, 及び 10 日後に脾臓及び顎下リンパ節から CD11c 陽性細胞を MACS を用いて分離した。CD11c 陽性細胞中の GFP 陽性細胞を FACS を用いて解析することにより、移入した骨髄由来 DC の脾臓及び顎下リンパ節への移動を検討した。

C. 結果

骨髄由来 DC 移入の翌日に challenge した場合、PBS 処理 DC 移入群と Pd+LPS 処理 DC 移入群との間に差は見られなかった。一方、DC 移入の 3 日後に challenge した場合、Pd+LPS 処理 DC 移入群で腫脹が見られるようになり、この腫脹は移入の 7 日後及び 10 日後に challenge した場合にさらに増大した。また移入した DC は、移入の翌日に脾臓でごく少数が確認されたが、顎下リンパ節では確認されなかった。さらに、移入後 3, 7, 及び 10 日後には脾臓及び顎下リンパ節両方で確認されなかった。

D. 考察

従来の金属アレルギーモデルマウス系では、感作成立に金属塩と LPS の混合液投与から 10 日を要したが、金属塩と LPS を処理した骨髄由来 DC を移入した場合には移入後 3 日目に感作成立が確認されたことから、DC を移入した場合には速やかに感作が成立することが示唆された。また、尾静脈注射により移入した DC が移入翌日から脾臓や顎下リンパ節でほとんど確認されなかったことから、移入した DC のほとんどがリンパ器官に移動しないか、又は移入以後の半減期が非常に短いことが示唆された。

E. 結論

金属塩と LPS で処理した骨髄由来 DC を移入した場合、従来のモデル系よりも早期に感作が成立することがわかった。また、移入した骨髄由来 DC は移入後早期に脾臓でごく少数が確認されたが、顎下リンパ節では確認されなかった。

F. 今後の方針

1. 骨髄由来 DC の移入方法の検討 (耳介への皮内投与など)、2. 移入 DC の体内動態の詳細な検討、3. Pd+LPS 処理 DC と反応する T 細胞の同定、を行う予定である。

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

分担研究者：大津 浩（東北大学大学院工学研究科・応用量子医工学 教授）

研究協力者：平澤 典保（東北大学大学院薬学研究科・生活習慣病治療薬学 教授）

研究協力者：成島 尚之（東北大学大学院工学研究科・医用材料工学分野 教授）

A. 研究目的

1. 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組織内への溶出がある。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. ヒスチジン脱炭酸酵素は、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、レポーター動物を作製する。

B. 方法

1. マウスの背部皮下に金属ワイヤーを埋め込み一定時間後に周囲の組織における金属イオン濃度を測定。金属ワイヤーの変化も分析する。これとともに皮下組織そのものの変化について観察する。

ICP-AES 法 ICP-AES 法を使って測定した Ni イオンと、ICP-MS 法を使って測定したイオンとの定量性について検討する。

2. レポーター動物の作製：

a. reporter mouse: BAC を用いた HDC reporter mouse の作製

b. reporter fish: plasmid を用いた HDC reporter fish の作製

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ワイヤーを植えて観察した結果、特に Ni で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 Ni 濃度を ICP-AES 法と ICP-MS 法で測定した。予想に反して両者の結果は感度についてはほぼ同等であった。

2. a. トランスジェニックマウスについて すでに上流 1Kb についてのクローン化は終了しているため、現在 1st intron の一部である PCR product を TA ベクターに挿入するところである。このベクターを構築後、BAC との相同組み換えを起こし、transgenic 用の BAC construct を構築する。

3. b. フィッシュの作製 前回赤色の蛍光である 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。そこで上流にサブレッサーの存在を想定して、promoter 領域をさらに削り 300bp でコンストラクトを試みた結果、全く蛍光を発しなかった。さらに上流 300bp から 2nd intron まで含むレポーター・フィッシュの作製も試みているが、生存率が悪かった。

D. 考察

1. 周辺組織中のニッケル濃度を ICP-AES 法と ICP-MS 法で測定した。両者の結果は感度についてはほぼ同等であった。Ni イオンの測定において、希釈を増して測定することが困難であるため、さらに MS における測定感度を上げないと実用イオンの測定は困難であると考えられる。

2. HDC promoter-reporter 動物の作製 現在 HDC reporter mouse に関しては動物の作製の中途である。fish については現在のところ plasmid を使った reporter fish の作製をこころみている。

E. 結論

1. 今後は、実用金属について生体への溶出量について検討を進める。

2. Mouse, fish 共にプロモーター1kb 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、マウスに関しては BAC によるリポーター動物の作製を開始し、フィッシュに関してはプラスミッド法を工夫している。

F. 今後の方針

1. 有用金属に関する測定を行なう。(ニチノール (形状記憶合金) やパラジウム (歯科材料)) など

2. a. マウスを作製する。promoter と 1st intron に挟まれるように GFP 遺伝子を挿入後、GFP 遺伝子直後に neomycin 耐性遺伝子を挿入したプラスミッドを用意する。その後、HDC 遺伝子の BAC クローンに電気穿孔法でプラスミッドを遺伝子導入し、相同組み換えをしたクローンを選択して、アラビノースで neomycin 耐性遺伝子を除いてから、大量培養して、BAC の精製をする。精製された BAC クローンを C57B6 mouse の受精卵に inject する。

b. HDC のレポーター・フィッシュを作製する。

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

研究協力者 笹月 健彦 国立国際医療センター 名誉総長
中山 勝文 東北大学加齢医学研究所 加齢生体防御学研究分野 助教
川野 光子 東北大学加齢医学研究所 加齢生体防御学研究分野 非常勤講師
田中 和沙 産業技術総合研究所 糖鎖遺伝子機能解析研究室

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。本学会議では、金属アレルギーの発症により変化する TCR レパトアを絞り込んだので報告する。

B. 方法

- 3) 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後、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。
- 4) 上記 1) により金属アレルギー特異的な T 細胞の濃縮を行ったヌードマウスより耳介・顎下リンパ節・脾臓を採取した。相模原病院鈴木隆二先生にお願いして、このサンプルから金属アレルギー発症により変化する TCR レパトアを解析していただいた。

C. 結果

移入を繰り返したマウスの耳介への 1 mM PdCl₂ challenge により、耳介・顎下リンパ節において TCR V α 11.1 が、また耳介において TCR V β 8.1 が特異的に発現増強することが遺伝子レベルで観察された。

D. 考察

TCR V β 8 について、タンパクレベルの解析では 8.1, 8.2 を標的としており、リンパ節における population の減少が見られ、これは遺伝子レベルでの解析結果と、同様の結論が得られた。しかしながら、耳介において population の増加が確認されているのは 8.1 が特異的である。したがって、TCR V α 11.1 および V β 8.1 がエフェクター細胞として機能している可能性が考えられた。

E. 結論

パラジウムによる金属アレルギー誘導により、TCR V α 11.1 および V β 8.1 を発現する T 細胞が、発症部位に特異的に増加することが判明した。

F. 今後の方針

①金属に特異的に反応する T 細胞レパトアのみを持つ遺伝子導入マウスの作製に向けて T 細胞のクローニングを行う。②金属アレルギーを発症している耳介より T 細胞を採取し、骨髄由来樹状細胞の移入による抗原提示（西屋先生からの研究情報）を in vitro で再現するモデル系を構築する。③病理標本として金属アレルギーを明確に確認できるような発症誘導条件を検討する。

金属アレルギーモデルマウスにおける網羅的 T 細胞レセプター解析

分担研究者：鈴木隆二

独立行政法人国立病院機構 相模原病院

臨床研究センター診断・治療学研究室 室長

研究協力者：熊谷賢一

鶴見大学歯学部口腔外科学第 1 講座 大学院

小林浩

鶴見大学歯学部口腔外科学第 1 講座 大学院

研究要旨

金属アレルギーは金属分子がペプチドの構造を変化させて MHC クラス II 分子に結合させることによって、T 細胞応答を引き起こす「T 細胞依存性 IV 型アレルギー反応」と考えられているが、その詳細な機構は不明のままである。

本研究では、当研究班で開発された金属アレルギー発症モデルマウスを用いて金属アレルギー発症に関与している T 細胞の動態を検証する事を目的とした。

その手法として T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子を同一条件化で増幅し、生体内の発現頻度をそのまま反映させて網羅的に TCR レパトア解析を行える独創的な Adaptor-Ligation-PCR 法を用い、解析を行った結果、我々は金属アレルギー発症に伴って局所に特異的な TCR subfamily を持つ T 細胞の増加を認めた。

今後はこれらの特異的な TCR subfamily のクローナリティーを CDR3 size spectratyping およびシーケンス解析を行うことで明らかにしていく予定である。

A. 研究目的

金属アレルギー発症に関わる T 細胞の動態を網羅的 T 細胞レセプター解析より明らかにすること。

B. 方法

T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子を同一条件下で増幅し、生体内の発現頻度をそのまま反映させて網羅的に TCR レパトア解析を行える独創的な Adaptor-Ligation-PCR 法を用いた。

C. 結果

金属アレルギー発症に伴いモデルマウスの耳介部局所に $V\alpha 11-1$ および $V\beta 8-1$ の subfamily を持つ T 細胞の増加が認められた。

D. 考察

金属アレルギー発症には特異的な TCR subfamily を持つ T 細胞の関与が示唆された。

E. 結論

炎症部 T 細胞には特異的な TCR subfamily を持った T 細胞が浸潤している事から金属アレルギーには特異的なエフェクター T 細胞の関与が強く示唆された。

F. 今後の方針

金属アレルギー発症に伴って認められた $V\alpha 11-1$ および $V\beta 8-1$ の subfamily におけるクローナリティーを CDR3 size spectratyping およびシーケンス解析で明らかにしていく予定である。

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蹠膿疱症など多彩である。金属アレルギーのスクリーニング方法として、パッチテストは比較的簡便であるが、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ッセイ系を確立することが今後の重要な課題である。

我々は、一昨年度、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) アッセイによる検出が可能であること、また、昨年度は制御性 T 細胞を除去することにより、LTT アッセイ系の感度が高まることを示した。ところが、制御性 T 細胞を除去する方法は労力と費用がかかるため、より簡便に LTT アッセイの感度を高める方法を確立することを本研究の目的とする。

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。これらの細胞に制御性 T 細胞が産生する免疫抑制系のサイトカインの代表である IL-10 の中和抗体を添加するグループと同操作を行わないグループに分け、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。被験者としては、Ni に対する PT 陽性の患者と陰性の健康人を選択した。

C. 結果

健康人においては、Ni に対する LTT は IL-10 中和抗体添加の有無にかかわらず不変であった。また、Ni アレルギーの患者においても、Ni に対する LTT の上昇は IL-10 中和抗体の添加によっても認められなかった。

D. 考察

健康人では IL-10 中和抗体を添加しても陽性とならなかったことより、擬陽性とはなる訳ではないことが示された。ところが、Ni アレルギーの患者の末梢血においても細胞増殖が IL-10 の中和抗体により上昇は認められなかった。すでに LTT で陽性の方にはそれ以上の効果が得られないのかも知れない。

E. 結論

金属に対する LTT アッセイにおいて、IL-10 中和抗体を添加することにより、感度の上昇が認められなかった。

F. 今後の方針

PT 陽性でありながら LTT が陰性の患者において同様の実験を試みたり、あるいは、CTLA-4 や PD-1 などの他の免疫抑制に関与する分子を中和抗体などにより阻害することも検討事項として挙げられる。

金属パッチテストおよびヒト末梢血単球を用いた金属アレルギー診断方法確立

分担研究者 松永 佳世子 藤田保健衛生大学 医学部 皮膚科学 教授
協力研究者 矢上 晶子 藤田保健衛生大学 医学部 皮膚科学 現客員講師→講師 (2009年7月～)
中川 真実子 藤田保健衛生大学 医学部 皮膚科 助教
加藤 義直 藤田保健衛生大学医学部皮膚科研究生

A. 研究目的

インプラント挿入後に皮膚障害が発症した場合、挿入しているインプラントを抜去すべきか否かは臨床の現場では重要な問題である。主要な接触皮膚炎のアレルゲンであるニッケル、クロム、コバルトなどは、インプラントにも汎用されている。接触アレルギーは、ほぼ終生記憶されるために、パッチテストを行うと、現在生じている皮膚症状の原因に関係のない金属も陽性を示すことがあり、これだけではその関連性を明らかにすることが不十分である。また、われわれの研究では、金属パッチテストも、貼布試料、貼布部位、貼布時期などにより、陽性所見にばらつきがあることが判明している。接触アレルギーに関連した *in vitro* の検査には、リンパ球幼若化試験があるが、金属による本検査法は非特異的に亢進することが知られ、まだ確実な方法とはいえ、本研究班でさらなる改善方法が検討されている。

われわれは、これまで、ヒト末梢血中単球をイオン化したニッケルと培養し、CD54ならびにCD86発現量を測定し、金属アレルギーの症状が惹起されている状態では、CD54が有意に高くなることを示した。本研究では、金属アレルギーの診断をより正確に行うために金属パッチテスト方法の再検討と、ヒト末梢血単球を用いた *in vitro* 試験方法が実用化可能か金属の種類と症例数を増やし検討する。

B. 方法

1. 金属パッチテスト方法の検討：コバルト、ニッケル、クロム、金、水銀、チタンを中心に、金属アレルギーが疑われる患者にパッチテストを行い、貼布部位、貼布試料の濃度・基剤、判定時期、貼布時の患者背景について、感度、特異度を上昇させる条件を検討する。

2. 金属パッチテスト前ならびに48時間後において、金属パッチテスト陽性患者と陰性患者の末梢血中の単球を用いて、金属アレルゲンとの培養によるCD86およびCD54の発現量を比較し、ヒトの血液を用いた新しいアレルギー試験法としての実用性を検討する。

C. 結果

D. 考察

E. 結論

F. 今後の方針

金属アレルギー患者における金属反応性 T 細胞の解析

分担研究者 橋爪秀夫 浜松医科大学 皮膚科 准教授

研究協力者 瀬尾尚宏 浜松医科大学 皮膚科 助教
伊藤泰介 浜松医科大学 皮膚科 講師

発表要旨：

A. 研究目的

金属アレルギーの予防や治療を考える上で、金属における免疫応答の詳細を解明することは不可欠である。我々は、これまで金アレルギーの患者末梢血から金反応性 T 細胞を樹立し、その機能的解析を行った。その結果、金反応性 T 細胞は、金が蛋白と共有結合したことによって抗原となる、いわゆるハプテン化抗原を認識するばかりでなく、MHC の拘束性が曖昧で、conventional な抗原認識とは異なった反応が存在することを見出した。これは、金属アレルギーの機序には、まだ詳細が明らかでない T 細胞反応が関連することを意味し、これを明らかにする事は、金属アレルギー反応を理解する上で重要である。ヒトの金属アレルギーにおいて、金属反応性 T 細胞の特性を明らかにし、金属に対する詳細な反応機序を解明することを目的とする。

B. 方法

金属アレルギー患者の末梢血また可能であればパッチテストによる誘発皮疹から、金属反応性 T 細胞を樹立する。末梢血に関しては、イオン化金属を至適量添加刺激培養してから、limiting dilution 法を用いて、金属反応性 T 細胞クローンまたはラインを樹立する。一方、誘発皮疹浸潤細胞の解析については、我々が考案した方法によって、浸潤 T 細胞を相当量増幅させた後、金属に対する反応性を解析する。また、末梢血からの樹立と同様の方法を用いて、皮膚由来金属反応性 T 細胞クローンまたはラインを樹立する。その両者の発現分子の比較検討、発現 TCR の免疫学的または分子生物学的解析、金属反応性に関する特徴について解析する。

C. 結果

D. 考察

E. 結論

F. 今後の方針

我々の考案した方法を用いて皮膚浸潤細胞由来の金属反応性 T 細胞と、末梢血由来の金属反応性 T 細胞との発現分子および機能を比較することが可能であれば、金属アレルギーにおける皮疹形成に必須の因子が明らかになると考えられる。加えて TCR 解析によって、金属分子関連抗原との認識様式が明らかになれば、金属アレルギーの予知や予防に関する新たな情報となりうる。

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

分担研究者 戸倉 新樹 産業医科大学医学部皮膚科学 教授
研究協力者 尾藤 利憲 産業医科大学病院 皮膚科 講師
杉田 和成 産業医科大学医学部皮膚科学 助教
梶島 利江子 産業医科大学病院 皮膚科 専修医

A. 研究目的

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、5) 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、6) 汗アレルギーと金属アレルギーの相関関係を調査すること、にある。

B. 方法

上記の目的を具現化するための以下の研究項目を設定した。

- 1) AD 重症度およびかゆみ程度に関する項目
- 2) 外因性と内因性の分別項目
- 3) 金属アレルギー検査項目
- 4) Th1, Th2, Th17 項目
- 5) 汗アレルギー検査項目

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±19.0 vs 27.1 ± 20.6 と内因性で重症度が軽い傾向があった。

2. 内因性 AD の角層状態とかゆみとの関連

角質水分量 (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。また水分蒸散量 (TEWL) は、正常人コントロールに比べ、外因性 AD では有意に高く、内因性 AD では変わらなかった。

3. 内因性 AD における Th1/Th2/Th17 細胞割合

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。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。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。

4. 内因性 AD と金属アレルギーとの関連

内因性 AD 患者 6 例中 3 症例で陽性所見を得た。この結果からすれば、内因性 AD の少なくとも一部は金属アレルギーが存在することを示唆している。

5. かゆみ関連物質との関連

血中サブスタンス P の量について、内因性 AD と外因性 AD で解析した。合計 10 名の AD 患者すべてにおいて、治療による SCORAD の低下に伴い、上昇していたサブスタンス P の量は低下した。この低下に外因性、内因性の差は認めなかった。

6. 汗アレルギー

汗による症状の増悪を自覚する AD 患者 10 名で自己汗の皮内テストを行った。8 名が陽性反応を示した。8 名中 6 名で Ni, Cr, Co に対する DLST を行い 2 名が陽性を示した。陽性患者はいずれも内因性 AD 患者であった。8 名で減感作療法を行い全例で症状の改善をみた。

D. 考察

外因性 AD と内因性 AD の分別として、IgE の他に、角層機能 (skin surface hydration と TEWL) が有用な分別方法になることが明らかとなった。金属パッチテストを行った 6 例の内因性 AD のうち、3 例が何らかの金属にパッチテスト陽性を示した。しかし LST は金属によって向き不向きがある。とくに溶解の問題は大きい。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よう。汗アレルギーの患者が金属アレルギーを高率に合併する可能性も得た。元来、汗には高濃度の金属が含まれていることが言われており、それを裏づけている。現在、汗アレルギーの患者に減感作療法を実施しており、これが金属アレルギーの克服に繋がることを画策している。

E. 結論

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。また、AD 患者の一部は汗アレルギーという形で金属アレルギーを表出している可能性が考えられた。

F. 今後の方針

今後は汗アレルギーの原因成分の追求を行いたいと考えている。まずはその中でも金属に焦点をあてたい。汗中の金属成分の測定、AD 個人間での比較。金属負荷後の用量の変動などの調査を検討している。まだ症例は少ないが、今回特に内因性 AD 患者で汗アレルギーを有する患者は金属アレルギーも合併している可能性が示唆されている。金属の体外への排出経路として汗が考えられ、AD 患者の皮疹の形成機序を解き明かすヒントになる可能性がある。

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21年度
第2回 班会議
抄録集

日時：平成21年10月29日（木）

13：00より

場所：東北大学加齢医学研究所1F 小会議室（内線8480）

連絡先： 022-717-8579（小笠原、中山、川野）