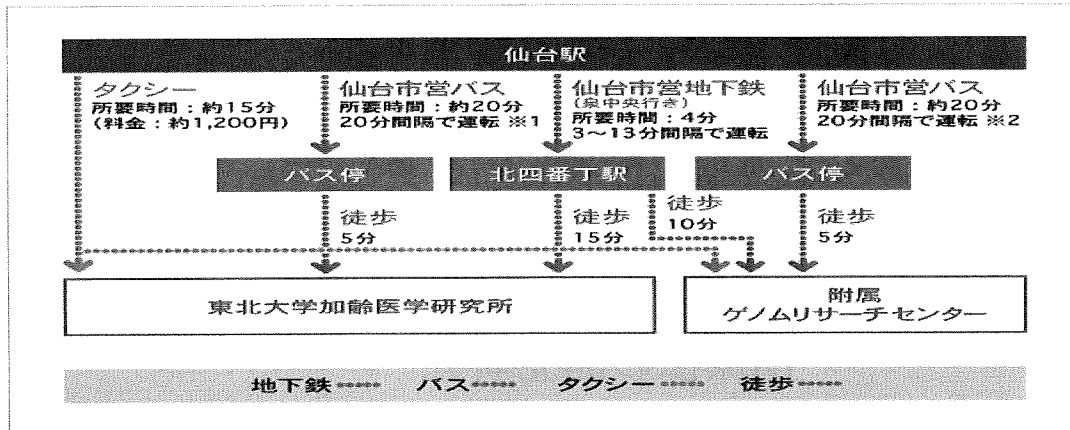


アクセス

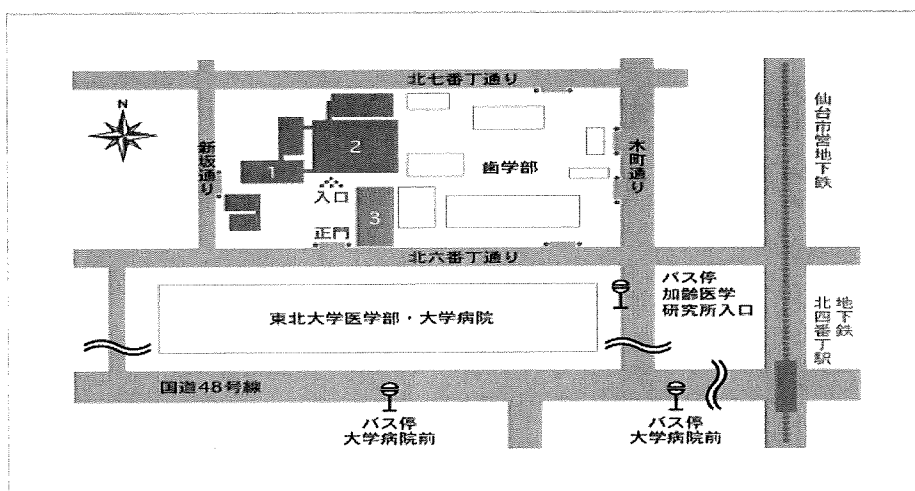


※1 仙台駅バスのりば案内(東北大学加齢医学研究所)

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
	{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		待ち時間 10分-30分
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.

「**骨髓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の病態解析**」

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免疫学的解析**」

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」

本田 哲也 (代理・分担研究者 梶島 健治) 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」

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外因性・内因性の2分別と金属アレルギーの関与」

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 *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以前の班会議で報告した。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金属アレルギーの発症における自然免疫の役割を解明することが目的である。今回は、金属塩+LPS 処理 DC の移入により活性化される T 細胞の局在と、DC の局所移入による感作成立について検討した。

B. 方法

B6 マウスの骨髄細胞を GM-CSF (10 ng/ml) で 7 日間処理し、骨髄由来 DC を得た。この細胞を PdCl₂ (0.2 mM) + LPS (20 ng/ml) で 24 時間処理した。対照の DC には PBS を処理した。これらの細胞を洗浄後、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。10 日後に脾臓及び顎下リンパ節を採取し、脾臓からは Pan T cell isolation kit (ミルテニー社) を用いて T 細胞を精製した。5x10⁵ 個の精製した T 細胞又はリンパ節細胞を非感作 B6 マウスに尾静脈注射により移入し、24 時間後に 1 mM PdCl₂ 溶液 15 µl をマウスの耳介に皮内注射して、以後その腫脹を 24 時間おきに 3 日間測定した。また、DC の耳介への移入による感作実験では、2x10⁵ 個の DC を右耳の耳介に皮内注射し、その 10 日後に PdCl₂ 溶液をマウスの両耳の耳介に皮内注射して、以後その腫脹を 24 時間おきに 3 日間測定した。

C. 結果

DC の耳介への移入による感作実験において、DC を移入した右耳の腫脹は、PBS 処理 DC 移入群と比較して Pd+LPS 処理 DC 移入群で優位な差が認められた。一方、DC を移入しなかった左耳の腫脹に関しては、両者の間に優位な差は認められなかった。DC 移入感作マウスの脾臓から精製した T 細胞及び顎下リンパ節細胞の非感作マウスへの移入実験において、リンパ節細胞を移入したマウスでは、PBS 処理 DC 移入群と比較して Pd+LPS 処理 DC 移入群で優位な腫脹の差が認められた。一方、精製した脾臓 T 細胞を移入したマウスでは、優位な差は認められなかった。

D. 考察

遠藤らの報告によると、金属塩と LPS の混合液の腹腔内投与で感作したマウスの脾臓細胞を移入することにより非感作マウスにアレルギーが発症するが、Pd+LPS 処理 DC の移入による感作方法では、脾臓の T 細胞というよりはむしろ顎下リンパ節の T 細胞が金属アレルギーの発症に関与することが示唆された。また、局所 DC 移入による感作では、全身的な感作は成立しないことが示唆された。

E. 結論

金属塩と LPS の混合液の腹腔内投与による感作法と金属塩+LPS 処理 DC の尾静脈からの移入による感作法では、感作される T 細胞の局在が異なることが示唆された。また、DC の局所移入では、局所的に感作が成立することが示唆された。

F. 今後の方針

Pd+LPS 処理 DC の移入による T 細胞の活性化機構を明らかにする。

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. 金属アレルギーの際に溶出した金属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ため、この遺伝子のレポーター動物を作製する。

B. 方法

1. マウス背部皮下に金属ワイアーを埋め込み、周囲組織中に溶出した金属イオン濃度を正確に定量するため、周囲組織はセラミック製の解剖器具を用いて採取し、硝酸中で 80℃に加熱した後、過酸化水素を加えて完全に溶解させた。

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. a. 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ア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。さらに現在 Ni 以外に Ni-Ti wire, Pd wire については進行中であり、Wire 表面の解析も行なっている。

1. b. NiCl₂ で感作したマウスに Ni ワイアー を implantation し 48 h 後に観察したところ、Ni 溶出については感作を行ったマウスと無感作のマウスでは明確な差が見られなかったものの、発赤はやや増強した。さらに今後早期の Ni 溶出について解析する予定である。また、金属ワイアーの周辺で炎症反応が誘発されることにより金属の溶出が高まることが、in vivo および in vitro で明らかになった。

2. a. トランスジェニックマウスについてすでに上流 1Kb についてのクローニングは終了しているため、1st intron の一部である PCR product を TA ベクターに挿入した。その後、この TA ベクター切り出して pBS-HDC1099 の同サイトに挿入した。さらに、GFP 遺伝子を挿入して、Neo 耐性遺伝子を挿入する予定である。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 HDC promoter に m-Cherry を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が特異性に乏しかった。そこで 2nd intron 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。

金属ワイアーを用いた本モデルは、臨床的に問題となる医用金属に対する金属アレルギーモデルとして有効であると考えられる。また、医用金属装着時の感染、あるいは菌周病等が金属溶出を増大させる可能性が示唆されているが、炎症時の金属溶出の予測、溶出の検出、分子機序解明と予防法の確立のための有用な実験系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。現在、3' 側の UTR を入れたベクターを構築して transgenic fish を作製中である。

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. 今後工学研究科技術部に高感度の ICP-MS が導入されるため、実際の臨床の場において生体内に溶出した金属イオンの測定が可能かどうか検討する。

2. a. レポーターマウスの作製をすすめる。

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の病態解析

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

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。前回、金属アレルギーの発症により変化する T 細胞集団を報告した。今回エフェクター細胞としてアレルギー発症部位に浸潤している T 細胞を検出するべく、蛍光免疫染色を行った。また、IFN- γ KO マウスを用いてパラジウム (Pd) アレルギーの発症について検討した。

B. 方法

5) 蛍光免疫染色

金属アレルギーを誘導後 24 時間のマウスの耳介を採取、未固定のまま freeze block を作製し、クライオスタットにより 10 μ m にて薄切、-80°C に保存した。染色時に冷アセトンにて固定後、blocking を行い、蛍光標識抗体にて染色、DAPI にて counter staining 後、観察を行った。

6) IFN- γ KO マウスを用いた Pd アレルギーの誘導

IFN- γ KO マウス (6 wks) に PdCl₂/LPS を感作し、7 日後に耳介に PdCl₂ を challenge してアレルギーの誘導を行った。ポジティブコントロールとして C57BL/6 マウスに同様に感作・challenge を行った。アレルギー誘導後、24 時間ごとに 96 時間まで耳介の腫脹測定を行うと共に、24 時間目の耳介・脾臓・顎下リンパ節を採取し、FACS により解析した。

C. 結果

3) Pd アレルギーを発症したマウスの耳介切片において、T 細胞の明らかな集積が認められた。これは、フローサイトメトリーの結果と同様であった。また、Pd アレルギーを誘導した際、フローサイトメトリーにて V α 、V β の TCR は検出できたものの定量化までは至らなかった。

4) IFN- γ KO マウスに Pd で感作・誘導を行ったが、耳介の腫脹は認められなかった。

D. 考察

3) アレルギーを起こしている耳介の蛍光免疫染色により CD4+T 細胞、CD8+T 細胞の集積が確認されたことから、Pd アレルギーにおいて T 細胞が重要な役割を担っていると考えられる。

4) IFN- γ KO マウスでは Pd アレルギーが起こらないことから、最終的な耳介の腫脹には IFN- γ が関わっていることが考えられる。

E. 結論

3) Pd アレルギーでは CD4+T 細胞、CD8+T 細胞とも重要である。

4) Pd アレルギーにおいて、アレルギー誘導部位における炎症には、IFN- γ が関与している。

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を作製する。②金属アレルギーを発症している耳介において、*in situ* hybridization により V alpha 11.1 を検出し、effector 細胞として機能していることを確認する。③C57BL/6 マウスを用いてパラジウムアレルギーを発症させ、RAG KO マウスへの移入を行い、BALB/c マウスと同様の TCR レパトアが反応しているかどうかを検討する。

金属アレルギーモデルマウスにおける免疫学的解析 —網羅的 TCR 解析および Th1/Th2 バランス—

分担研究者：鈴木隆二 独) 国立病院機構相模原病院・臨床研究センター・室長

研究協力者：熊谷賢一・小林浩・江口貴紀

独) 国立病院機構相模原病院・臨床研究センター・研究員

鶴見大学歯学部口腔外科学第一講座・大学院生

研究要旨：本研究では、金属アレルギーが発症した状態での獲得免疫機構、すなわち病変部に浸潤する T 細胞の動態に着目し、「T 細胞の活性化を端緒とした免疫応答が金属アレルギーの発症に関与している」という仮説のもとに、金属アレルギー発症モデルマウスを用いて各臓器に浸潤する T 細胞の動態ならびに定量 PCR 法を用いた遺伝子発現の解析を検証した。主任研究者らが開発したマウスモデルから得られたサンプルから網羅的に TCR レパトア解析を行った結果、罹患部および付属リンパ節に TCR レパトアの Skew が確認された。TCR α 鎖においては特定の V α に限定された使用と高い clonality が確認された。罹患部の耳においては Th1 に偏った免疫応答が惹起されて、さらに Fas に発現亢進が観察された。

A.研究目的：主任研究者が開発した金属アレルギーモデルを用いて、本疾患の発症に関わる T 細胞免疫応答の動態を網羅的に TCR 解析を行うと共に、各種サイトカインについても定量的 PCR 法により明らかにする。

B.材料と方法：①金属アレルギーモデルマウス小笠原主任研究者が開発した本疾患に関わる effector の濃縮を目的にヌードマウスに繰り返し移植する事により得られたサンプルを使用した。②TCR レパトア解析は、我々が開発した定量的かつ網羅的 TCR レパトア解析法を用い、さらに CDR3 size spectratyping 法とシーケンス解析により抗原特性をクローンレベルで解析した。③CD3,CD4,CD8 および Th1 と Th2 サイトカインの発現については定量的 PCR により検討を行った。

C.結果：①TCR V α 鎖については複数匹で特定の V α が炎症局所に誘導されていた。しかも CDR3 の解析から同一クローンが選択的に浸潤している結果が得られた。現在、例数を増やして確認中である。V β 鎖に関しては個々のマウスで金属特異的な family の高発現が観察されたが、共通したレパトアの使用は観察されていない。②T 細胞が存在しないヌードマウスに養子移入を繰り返すことで、アレルギー炎症局所の耳介部に CD3・CD4・CD8 陽性の各 subset の T 細胞が発現してきており、effector T 細胞の誘導が確認された。移入に伴って移入により炎症局所の耳介部では、IL-4・IFN- γ ともに発現量が増加し Th1 へのシフトが認められることから、Th1 側の遅延型過敏反応が耳介部で起こっていることが明らかになった。移入後の耳介部で TNF α および Fas の発現が増加しており、炎症局所でのアポトーシスが誘導されていた。

D.考察：金属は自己タンパクとともにハプテンを形成し、T 細胞上の TCR はハプテンと MHC が結合した複合体を認識している。T 細胞の金属への直接の認識には特定の TCR V α が関与していると考えられる。IL-4 および IFN- γ の高発現、Fas 分子を介したアポトーシスが T 細胞によって誘導されていることから CD8 および Th1CD4 陽性 T 細胞による細胞障害性遅延型過敏反応が起こっているが明らかになった。これまで困難であった金属アレルギーの発症機序に関わる免疫応答の解明および診断治療体系の開発に大きく貢献する可能性が示唆された。

E.今後の方針：TCRV β の詳細な解析に注力し、金属アレルギーの特異性を詳細解明する。

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
本田 哲也 京都大学・医学研究科 皮膚科 助教

A. 研究目的

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、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、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、あるいは健常人の末梢血から 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、TGF- β や CLTA-4 の中和抗体や阻害薬の添加を、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常人を選択した。

C. 結果

健常人においては、Ni に対する LTT は IL-10 や TGF- β の中和抗体添加により細胞増殖が亢進したが、Ni アレルギーの患者においては、その効果が認められなかった。

D. 考察

健常人では IL-10 や TGF- β 中和抗体の添加により細胞増殖の亢進が認められるものの Ni アレルギーの患者ではその効果が認められなかったことから、IL-10 や TGF- β 中和抗体により感度が上昇するわけではなく、むしろ擬陽性を高める可能性を示唆した。金属アレルギーでは健常人よりも金属に対する制御性 T 細胞が役割を遂行することができないために臨床症状を表している可能性が示唆された。

E. 結論

金属に対する LTT アッセイにおいて、IL-10、TGF- β や CLTA-4 の中和抗体を添加することによっても、感度の上昇が認められなかった。

F. 今後の方針

血中と皮膚における反応性の違いは皮膚に存在する自己タンパクの必要性や血中と皮膚の樹状細胞の機能の差などを示唆する。そこで、接触皮膚炎の形成に関わる樹状細胞サブセットの同定や、LTT アッセイ以外のアッセイ法の確立が必要となる。

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 講師
中川 真実子 藤田保健衛生大学 医学部 皮膚科学 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

金属パッチテスト (PT) 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。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まだ確実な方法とはいえない。

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 PT 方法の検討：金属アレルギーが疑われる患者に PT 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。
2. 金属 PT 前ならびに 48 時間後において、金属 PT 陽性患者と陰性患者の末梢血中の単球を用いて、金属アレルギーとの培養による 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

1. 金属 PT 試料によって、陽性率は異なった。陽性一致率は Ni が 83%、Hg 67%、Au は 40%であった。Trolab の試料 Au は陽性率が高い金属結果であった。陽性率に部位差は明らかではなかった。
2. 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 発現量を測定する研究は症例数の追加が少なかった。

D. 考察

1. Au の PT 陽性率が試薬メーカーにより異なるが、濃度の測定は表記と一致していた。金属試料の分散の問題が陽性反応に影響している可能性がある。背部での密着度の問題、免疫反応の部位差も否定できない。
2. 症例数がまだ不十分である。

E. 結論

1. 金属の PT の陽性反応の再現性、確実性を担保するためには、さらに十分な検討が必要である。1 箇所だけの貼布では金属アレルギーを見落とす可能性がある。
2. 金属 PT 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、金属アレルギーとの培養による 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は実用性の可能性はあるが、まだデータが不足している。

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

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結果、金属アレルギーの機序には、まだ詳細が明らかでない T 細胞反応が存在することが想定される。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から、単核細胞を調整し、金属添加刺激による T 細胞の発現分子および T 細胞受容体発現(TCR)の偏りをフローサイトメトリー解析する。また、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し、その発現分子および機能を調べ、金属反応性 T 細胞における特性を明らかにする。

C. 結果

1)金(Au)製剤による蕁麻疹患者から末梢血から Au 特異的 T 細胞クローン/ラインを得た。APC による抗原のプロセッシング依存性の有無を調べるために、代表的な CD4 陽性クローンである F11E5-V β 1 と F11E5-V β 22 を固定した APC または非固定した APC の存在下で Au 刺激に対する反応を調べたところ、前者は固定後に増殖は抑制されたが、後者は抑制されなかった。

2)ニッケル(Ni)による接触皮膚炎患者から末梢血を採取して、Ni 添加培養におけるリンパ球のフェノタイプおよび発現する T 細胞受容体(TCR)V β 鎖の偏りをフローサイトメトリー解析した。パッチテスト後に採取した新鮮末梢血中のリンパ球は、CD4 陽性細胞が 75%、CD8 陽性細胞は 25%であったが、Ni 存在下で 14 日間培養すると、すべて CD4 陽性細胞となった。両者の TCRV β のレパートアを調べると、培養後には V β 1, 13.1, 13.6, 14, 17, 21.3 を発現する細胞の割合が増加しており、特に V β 13.6 陽性細胞は 35%にも達していた。また、Ni 刺激培養後の CD4 陽性細胞は、Perforin の弱発現と granulysin の強発現を認めた。Ni 刺激培養後の細胞から Ni 特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンの D1(V β 13.2 陽性), E11(V β 1 陽性)および G6(V β 13.6 陽性)の 3 個を樹立し、このうち E11 および G6 のケモカイン受容体の発現を調べたところ、皮膚親和性分子の発現を認めず、両者とも CCR9 を発現していた。

D. 考察

金属アレルギーの機序の解明においては、その病因細胞の特性を明らかにする必要がある。一般的には CD8 陽性細胞と CD4 陽性細胞の両者が関与しているという報告が多いが、近年、金属特異的制御性 T 細胞の存在が確認され、少なくとも CD4 陽性細胞の一部は、炎症を抑制する制御性 T 細胞であることが示されている。したがって、それぞれの分画における細胞の機能と、金属に対する反応様式の解明が、金属アレルギーを制御する上で重要な課題となる。我々は、これまで Au アレルギーをモデルとして、金属を抗原として T 細胞が認識する方法として、CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞ともに、ハプテンとして認識する他にも、特異な様式が存在する可能性が高いことを示してきた。これは MHC に非拘束性であり、従来の抗原ペプチドのように MHC groove 内に存在するとは考えられない。今回、我々は MHC 拘束性の CD4 陽性クローンの中に、固定した APC を用いても増殖反応するものがあることが判明した。これは、金が抗原として認識される方法として、内在するペプチドと結合して APC 上に提示される経路と、金イオンがそのまま MHC または MHC 内のペプチドに結合して反応する経路が存在することになる。この反応様式は、我々が蕁麻疹患者から樹立したフェノバルビタール特異的 T 細胞の抗原認識反応と極めて類似しており、低分子物質を抗原として認識する際のひとつの経路として重要であると考えられる。

また、Ni アレルギーの末梢血中には Ni 刺激により granulysin を強く発現する CD4 陽性細胞が 30%程度存在することが判明した。granulysin は主に CD8 陽性細胞や NK 細胞に発現する細胞傷害性物質であり、結核や寄生虫感染、重症蕁麻疹の際に機能的分子として注目されている。金属アレルギー発症に、この分子の発現が特徴的であるとすれば、この分子の検出は客観的な金属アレルギーのスクリーニングへと発展する可能性がある。

Ni アレルギー患者から樹立した 2 個の Ni 特異的 T 細胞クローンはケモカイン受容体や CLA の発現から、病原細胞であると考えられなかったが、両者ともに CCR9 を発現していた。この意義は現在のところ不明で

あるが、我々は日常の食生活で 200 μ g/日の Ni を経口摂取することから(Ricciardi L et al, Allergy 2001), 吸収されやすい小腸指向性の制御性 T 細胞の頻度が、本患者では高いのかもしれない。

E. 結論

- 1) APC のプロセッシングを要さない機序による Au 抗原認識方法が存在する。
- 2) Ni アレルギー患者には Ni 刺激によって granulysin を発現する CD4 陽性 T 細胞が存在する。
- 3) Ni アレルギー患者には皮膚親和性分子を発現しない CCR9 陽性の Ni 特異的 CD4 陽性の亜分画も存在する。

F. 今後の方針

ヒトの金属アレルギーにおける病因細胞の特性を調べるため、末梢血からリンパ球を得て解析してきたが、この方法論では、皮膚指向性のない金属特異的 T 細胞の混入を避けられず、その詳細に迫ることが難しい。我々は最近、少量の皮膚検体から浸潤リンパ球を効率よく増幅する方法を開発した(submitted)。この方法を用いれば、今回と同様の方法論で、皮疹形成に直接関わる細胞を解析することが可能である。

一方、最近 Ni などの金属に反応する T 細胞は、健常人においても存在することが明らかになっている。微量金属の多くは、Ni と同様に食事からも摂取されている。金属アレルギー患者も毎日の金属の経口摂取量は他の健常人と変わらないから、腸管から吸収される金属に対する制御は、アレルギー患者においても同様に行われていると考えられる。したがって、アレルギー患者における皮膚炎の発症は、皮膚における免疫反応制御の破綻から生じている可能性がある。皮膚内に存在する抑制性免疫にかかわる樹状細胞や制御性 T 細胞の機能に関する解析が必要である。

金属刺激による患者リンパ球の granulysin 発現は、金属アレルギーのスクリーニングとなりえるのか、症例を蓄積して検討したい。

アトピー皮膚炎における外因性・内因性の2分別と金属アレルギーの関与

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
梶島 利江子 産業医科大学病院 皮膚科 専修医
森 智子 産業医科大学医学部皮膚科学 助教
杉田 和成 産業医科大学医学部皮膚科学 助教

研究要旨

アトピー性皮膚炎(AD)は、通常の外因性のものだけではなく、内因性のものが存在する。内因性ADは、血中IgEが正常域であり、皮膚バリアが破綻しIgEが高値の外因性ADとは異なった機序で発症していると考えられている。内因性ADにおける金属アレルギーの関与は、種々の傍証から推測されているが、明らかにされてこなかった。まず我々は内因性ADの皮膚バリア機能を、角質水分量、水分蒸散量、およびelectric current perception thresholdにおいて、外因性ADと比較検討した。その結果、外因性ADではバリアが破綻しているが、内因性ADではバリア機能が正常であることが判明した。さらに外因性ADではフィラグリンの遺伝子変異をもつ患者がいるものの、内因性ADには調べ得た限りでは存在しなかった。次に、内因性AD患者6名に種々の金属のパッチテストを実施したところ、6名中3名に1つ以上の金属の陽性所見を得た。さらにこれら金属のリンパ球幼弱化試験を患者末梢血リンパ球を用いて行ったところ、ニッケルに対する反応が陽性を示した。内因性ADでは外因性ADと同様に、末梢血IL-4陽性Th細胞、IL-17陽性Th細胞が増加しており、両者間に有意差はなかったものの、内因性ADではさらにIFN- γ 陽性T細胞が外因性ADと比べ有意に増加していた。このことは内因性ADではTh1細胞も増加していることを示し、何かの物質、例えば金属に接触過敏を有していることが想定された。AD患者には自己汗アレルギーをもつものがあるが、自己汗にアレルギー反応を示した9名のAD患者において金属に対するリンパ球幼弱化試験では2名、金属パッチテストで1名が陽性反応を示した。さらに陽性反応を示した患者で汗に含まれる金属濃度を測定し得た1名では、高濃度のNiを含有していることが判明した。金属アレルギーを有する患者は自己汗、しかも汗が含有する金属によりADの皮疹を悪化させている可能性が示唆された。

1. 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(loss of function)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つて、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、恐らく蛋白抗原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の特徴を表1に示す。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。これはpseudo-atopic dermatitis^{7,8)}と呼ばれた病像・病態が、金属アレルギー特にCrによるアレルギーであつたことと関連を示す。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可能性は残される。

表 1. 内因性 AD 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) Dennie line がある
--

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⁹⁾、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¹⁰⁾。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、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、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、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、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。

また、AD 患者の約半数が自己汗にアレルギー反応を示すこと、自己汗希釈液を用いた減感作療法で皮疹改善効果があることが判明している¹¹⁾。一方、汗成分が金属を含有していること、経口摂取した金属が汗に漏出することなどが報告されており¹²⁾、手掌や頸部、腋窩、膝窩など多汗部位における皮疹の形成に汗もしくは金属の関与が予想される。上述の機序により AD の皮疹の増悪にも金属アレルギーの関与が考えられ、金属に皮膚が曝露する経路としては自己汗を通してである可能性が考えられる。

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 Th1 細胞、Th2 細胞、及び 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) 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。

2. 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。

- a. AD 重症度およびかゆみ程度に関する項目
 - AD 重症度: scoring of atopic dermatitis (SCORAD)、好酸球数、LDH、TARC/CCL17
 - かゆみ程度: visual analog scale (VAS)、electric current perception threshold (CPT; Neurometer による測定)、血漿中 substance P
- b. 外因性と内因性の分別項目
 - IgE、transepidermal water loss (TEWL)、skin surface hydration (capacitance)
- c. 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
- d. 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
- e. 汗アレルギー検査項目

患者の自己汗を用いた皮内テスト

具体的には、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った。

a. 皮膚症状、かゆみ

ADの重症度は severity scoring system for atopic dermatitis (SCORAD)で評価した。かゆみの強さは visual analogue scale (VAS)で測定した。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した。

b. 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) を測定した。IgE RISTとRASTは外因性と内因性のADを分ける指標とした。好酸球数、LDH、TARCは検査値上の重症度の指標とした。

c. 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。スタンダードの濃度でパッチテスターを用いて行った。

d. 皮膚生理学的検査

角層のバリア機能を transepidermal water loss (TEWL)、skin surface hydration を用いて行った。

e. 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、以下の測定を行った。

i) 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した。Foxp3は細胞内染色を用いた。特に、CXCR3+CD4+細胞:Th1、CCR4+CD4+細胞:Th2、CD4+CD25+Foxp3+細胞:regulatory T(Treg) 細胞、について検討した。

ii) 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った。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した。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した。

iii) 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 μ Ci/well) を添加した。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した。

iv) 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)の血中濃度を測定した。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(NEP)を不活化した方法を取り入れて行った。

f. 汗アレルギー

i) 自己汗を両腕から採取し、22 μ m フィルターを通して精製し、滅菌生理食塩水にて100倍希釈し、0.02mlを皮内注射し、長径10mm以上の紅斑を生じた場合を陽性とした。

ii) 汗の中に含まれる金属の測定

三菱化学アナリテック(岡山)に依頼し、汗に含まれる金属をng/gの単位で測定した。

3. 結果

a. 内因性ADの角層状態とかゆみとの関連

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。

この我々の検討した集団において、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(図1)¹⁹⁾。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(図1)。従って外因性 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の相関を皮疹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(図2)。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が正の相関する、すなわち水分量が少ないほどかゆみを感じ易くなることを示した。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(図3)。以上より、内因性 AD は正常人と同じ角層状態を保っていることが示唆された。

さらにフィラグリン遺伝子変異を調べたところ、外因性 AD は 6 名中 2 名変異があったが、内因性 AD では 4 名中 0 名で変異は認められなかった。これはフィラグリンという角層バリア機能を構成する蛋白からも、内因性 AD は異常がないことを示した。

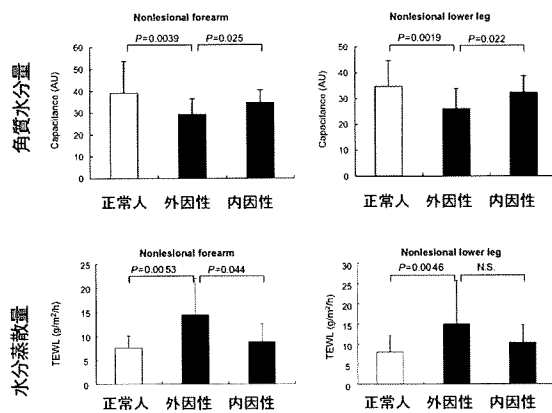


図1. 外因性 AD は皮膚バリア機能が低下

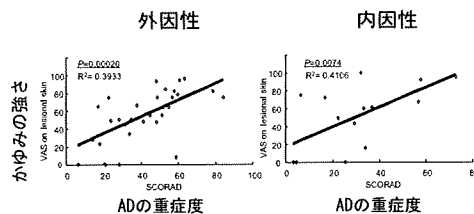


図2. 外因性も内因性もADの重症度に応じてかゆい

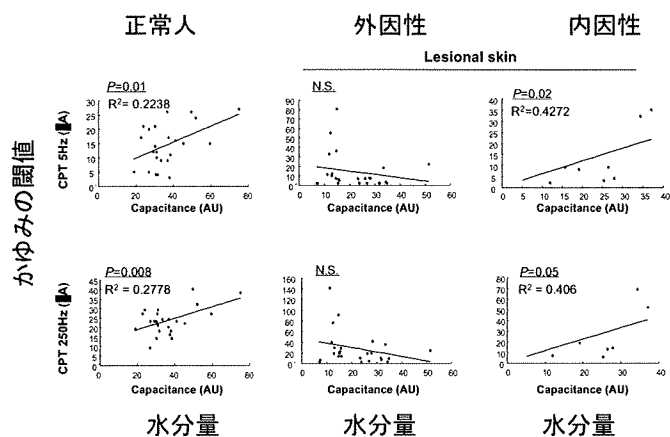


図3. 内因性ADは正常人と同じ角層状態を保持

c. 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¹⁰⁾。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。

内因性 AD は外因性 AD に比べ、末梢血 Th2 細胞 (IL-4 産生細胞) は有意差がなく、内因性 AD も Th2 に変調していることを裏付けた (表2)。また Th17 細胞割合も同等であった。一方、Th1 細胞 (IFN- γ 産生細胞) 割合は内因性 AD で有意に高く、内因性 AD は蛋白抗原以外の抗原、例えば金属に反応していることが示唆された。

表2. 外因性、内因性 AD における末梢血リンパ球割合 (%)

	IFN- γ +	IL-4+	IL-17+
外因性AD (n=28)	8.56 \pm 6.21	0.38 \pm 0.22	0.66 \pm 0.30
内因性AD (n=21)	12.47 \pm 4.82	0.32 \pm 0.13	0.76 \pm 0.25
健常人	9.20 \pm 1.50	0.25 \pm 0.07	0.42 \pm 0.07
外因性vs内因性	P=0.0367	P=0.276	P=0.212

d. 内因性 AD と金属アレルギーとの関連

内因性 AD 患者 13 例について金属パッチテストを実施した (表3)。8 名が何らかの金属に陽性であり、5 名がいずれも陰性であった。陽性率は 61.5% と高頻度であった。Co 陽性が 5 名と多く、しかもすべて女性であった。内因性 AD は女性に多いことと一致し、金属アレルギー、とくに Co の重要性が示唆された。その他では、Cr、Ni、Pa が各 2 名おり、男女は 1 名ずつであった。

表3. 内因性 AD におけるパッチテストの結果

金属パッチテスト		
陽性	8名	Co 5 (M0, F5) Cr 2 (M1, F1) Ni 2 (M1, F1) Pa 2 (M1, F1) Zn 1 (F1) Mn 1 (F1)
陰性	5名	

金属パッチテスト陽性者にリンパ球幼弱試験 (LST) を行った。予備実験として金属アレルギーが判明している患者に対し、LST を行った。その結果、従来観察されているように、Ni では陽性反応がしやすいもの (図4)、Co は陽性反応がでにくいことが判明した (図4、5)。

金属アレルギー (ベルトのバックルによる接触皮膚炎)
パッチテスト：
コバルト、ニッケル、プラチナ、マンガン、銅に陽性

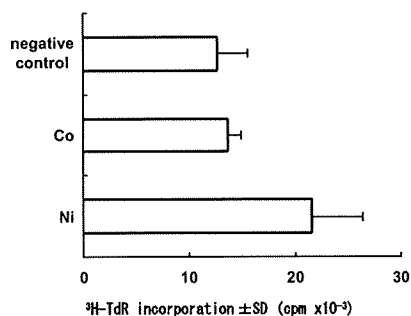


図4. LST. Ni は反応出易いが、Co は出にくい

金属アレルギー
パッチテスト：コバルト、ニッケルに陽性

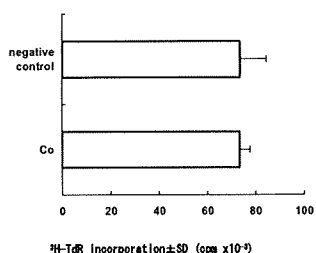


図5. LST. Co は反応が出にくい

内因性 AD の Cr パッチテスト陽性者に対して Cr の LST を行ったが陰性であり (図6)、Pa 陽性者にも LST を行っ

たがやはり陰性であった(図7)。従って、LST は Ni の陽性のみ得られ、他はパッチテスト陽性であっても LST 陽性所見は得られていない。一般に Ni 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。しかし、1 症例において Ni のみならず、Cr と Co で強い LST 陽性反応が得られており、確認を急いでいる。この症例は、自己汗の皮内反応によって陽性所見を示しており、いわゆる汗アレルギーを伴った患者である。汗には多量の金属が含まれると言われており、今後の解析を続けていきたい。

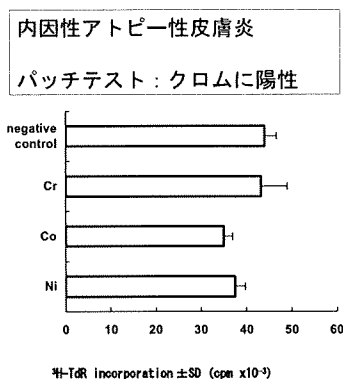


図6. LST. Cr は反応が出にくい

内因性アトピー性皮膚炎、光線過敏症
パッチテスト：パラジウムに陽性

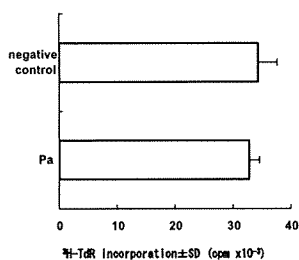


図7. Pd も反応が出にくい

e. 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。

f. 汗アレルギーと金属

外因性 AD 患者 20 名、内因性 AD 患者 5 名で自己汗の皮内テストを行った。外因性 11/20 (55%)、内因性 4/5 (80%) が陽性反応を示した。8 名で金属に対する LST もしくは金属パッチテストを行い 3 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。汗皮内テスト陽性者 12 名に対して減感作療法を行い、現在 10 名で症状改善をみている。

汗中の金属(Ni, Cr, Co)の定量を行った。外因性 AD 6 名、内因性 AD 2 名、健常人 4 名の汗を測定した。Cr と Co は各群、個人間で有意差はみられなかったが、Ni に関しては Ni の LST 陽性を示した内因性 AD 患者 1 名が 722ng/g であり(もう 1 名は正常)、外因性 AD の平均 112±76、健常人平均 136±114 と比較してとびぬけて高値を示した(図 8)。

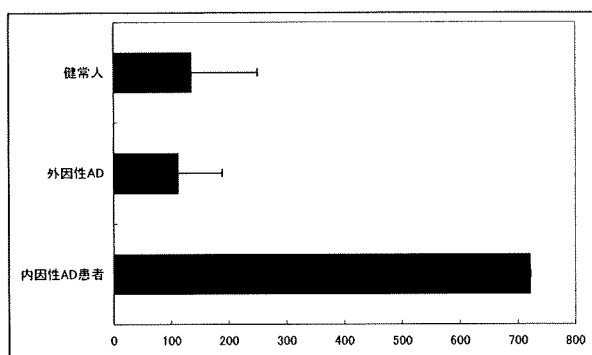


図8. 汗に含まれる Ni(ng/g)の分析結果

4. 考察

第1に、外因性ADと内因性ADを判別する方法が確立された。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他の原因」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とTEWL)が有用な分別方法になることが明らかとなった。また外因性ADの一部はフィラグリン遺伝子変異を有することが確認され、内因性ADは変異をもたないことも明らかになった。

第2に、内因性ADの原因としての金属アレルギーの存在が示唆された。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。内因性ADが女性に多く、パッチテストでもっとも陽性率が高かったCo陽性者5名がすべて女性であったことは興味深い。LSTは金属によって向き不向きがあり、とくに溶解の問題は大きい。本研究実施中に、汗アレルギーの患者が金属アレルギーにもなりやすいとの示唆も得た。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も期待している。

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た⁸⁾。外因性、内因性ADにおいて末梢血Th17細胞割合は有意差がなく、Th2細胞割合も変わらなかった。しかし、Th1細胞割合は内因性ADで高く、蛋白抗原以外のもの、例えば金属が抗原になっている可能性を支持した。

5. 結論

内因性ADの原因・病態は金属アレルギーが一重要因子である。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- γ 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- γ 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。内因性ADでは外因性ADで重要なTh2細胞/Th17細胞とともに、Th1細胞が重要であることが示唆された。

AD患者はかなりの割合で汗アレルギーを有していることが判明しているが、今後は原因成分の中でも金属が重要と考えられる。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。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た。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。AD患者における金属アレルギー、汗アレルギーの検討は、増悪因子の除去のみならず、減感作療法をはじめとする新たな治療展開の可能性を秘めている。

文献

- 17) 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.
- 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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).
 - 21) 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.
 - 22) 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.
 - 23) Shanon J: Pseudo-atopic dermatitis. Contact dermatitis due to chrome sensitivity simulating atopic dermatitis. *Dermatologica* 1965;131(3):176-90.
 - 24) De Cock PA, Hanon J: Pseudo-atopic dermatitis. An example of pseudo-nomenclature. *Dermatologica*. 1966;133(3):236-7.
 - 25) 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.
 - 26) 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.
 - 27) 尾藤利憲、福永淳、大橋明子、堀川達弥、市橋正光、錦織千佳子：自己の汗希釈液を用いたアトピー性皮膚炎患者に対する減感作療法、*日皮アレルギー*、11: 122-127, 2003
 - 28) Julander A, Hindsén M, Skare L, Lidén C. Cobalt-containing alloys and their ability to release cobalt and cause dermatitis. *Contact Dermatitis*. 2009 ;60:165-70.
 - 29) 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.
 - 30) Mori T, Ishida K, Mukumoto S, Yamada Y, Imokawa G, Kabashima K, Kobayashi M, Bito T, Nakamura M, Ogasawara K, Tokura Y. Comparison of skin barrier function and sensory nerve electric current perception threshold between IgE-high extrinsic and IgE-normal intrinsic types of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* (in press).