

200934005B

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・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19－21年度 総合総括研究報告書

主任研究者 小笠原 康悦

平成22(2010)年 3月

目 次

I. 総合総括研究報告	
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-----	3
東北大学 加齢医学研究所	
国立国際医療センター研究所	小笠原 康悦
II. 総合分担研究報告	
1. 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-----	25
東北大学 加齢医学研究所	
国立国際医療センター研究所	小笠原 康悦
2. 金属アレルギー発症モデルマウスにおける網羅的 T 細胞レセプター解析-----	33
国立病院機構相模原病院 臨床研究センター	鈴木 隆二
3. 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-----	40
北海道大学大学院医学研究科	西屋 禎
4. 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-----	44
東北大学大学院工学研究科	大津 浩
5. 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-----	49
藤田保健衛生大学医学部皮膚科学	松永佳世子
6. 金属アレルギー患者における金属反応性T細胞の解析-----	54
浜松医科大学医学部皮膚科	橋爪秀夫
7. 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に関する研究----	57
産業医科大学医学部皮膚科	戸倉新樹
8. 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-----	61
京都大学大学院医学研究科	椛島健治
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	65
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	89

I. 総合総括研究報告

総合総括研究報告書

研究課題：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

主任研究者：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 地域保健医療研究部 特任研究員

研究要旨

金属アレルギー等のアレルギー性皮膚炎は増加の一途であり、難治性の合併症を引き起こすため、大きな問題となっている。本研究はこれまで不明であった金属アレルギー発症の分子機構を明らかにし、アレルギーの診断、予防、治療に役立つ理論的基盤の確立を目指すことを目的とし、動物モデルを用いた基盤的研究、疾患患者サンプルを用いた臨床研究、工学的視点からの新規診断法の開発という観点から多面的に研究を進めている。当研究班が独自に開発した金属アレルギー動物モデルは、Nature 誌の News に掲載され国際的にも高く評価されている。本年度は、動物モデルによる基盤的研究から、金属暴露により TCR レパトアが変化することが明らかとなり、またその TCR レパトアの特定に成功した。また、IFN- γ , NKG2D, プロテアソームは金属アレルギーの治療標的になり得ることも判明した。さらに、*in vitro* で樹状細胞を金属感作し、マウスに移入することで金属アレルギーを誘導することが可能となった。臨床的観点からは、金属に対するヒト LTT アッセイにおいて、制御性 T 細胞を除去することにより、感度を高めることができた。また、内因性アトピー性皮膚炎患者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得、金属アレルギーとのかかわりが疑われた。工学的観点からの研究では、溶出金属イオンの測定法には、蛍光色素解析、および ICP-AES 法が有効であることが判明した。

研究分担者

戸倉新樹 産業医科大学 医学部 皮膚科教授
松永佳世子 藤田保健衛生大学 医学部 皮膚科学教授
鈴木隆二 国立病院機構相模原病院・臨床研究センター 診断・治療研究室 室長
椛島健治 京都大学大学院医学研究科 皮膚科准教授

橋爪秀夫 浜松医科大学 医学部 皮膚科准教授
大津浩 東北大学大学院工学研究科 応用量子工学教授
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

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 東北大学加齢研・生体防御・助教 川
野光子 東北大学加齢研・生体防御・非常勤講師
平澤典保 東北大学・薬・生活習慣病 教授 成
島尚之 東北大学・工・医用材料工学 教授
熊谷賢一 国立病院機構相模原病院・研究員
小林 浩 国立病院機構相模原病院・研究員
江口貴紀 国立病院機構相模原病院・研究員
本田哲也 京都大学・医学研究科 皮膚科助教
尾藤利憲 産業医科大学 医学部 講師

A. 研究目的

平成16年度厚生労働省の実態調査によると家庭用品等に係る皮膚障害では装飾品等の「身の回り品」が原因であることが最も多く、その皮膚障害の約半数が金属アレルギーを含むアレルギー性皮膚炎であることが報告されている。金属アレルギーはピアス等装飾品をつける人口の増加および金属を用いた医療技術の発展に伴い増加しているが、適切な動物モデルがない等の問題により研究が進んでおらず、金属アレルギー発症の分子機構は未だ分かっていない。掌蹠膿疱症などの金属アレルギー合併症は総じて難治であり、患者のQOLを著しく妨げている。金属アレルギー診断法としてパッチテストが有効であるものの、その施行および判定には患者の負担が大きく、より効果的な診断法も望まれている。

従って本研究は金属アレルギー発症の分子機構を明らかにし、アレルギーの診断、予防、治療に役立つ理論的基盤の確立を目指すことを目的としている。本目的を達成するため、

- 1) 金属アレルギー発症の分子機構の解明(動物モデルからのアプローチ)
 - 2) 金属アレルギーにおける細菌成分のアジュバント効果(自然免疫からのアプローチ)
 - 3) 新規診断法と治療法の開発へ向けた理論的基盤の確立(疾患からのアプローチ)
- を Specific Aim として、多面的な解析を行っている。

B. 方法

1) 金属アレルギー発症の分子機構の解明

①NiCl₂ 溶液と LPS (*E. coli*) 溶液の 1:1 混合液を BALB/c マウスに腹腔内注射し、10 日後、金属塩溶液 (LPS 添加または非添加) を耳介に皮内注して、以後その腫脹を測定した

杉田和成 産業医科大学 医学部 助教
森 智子 産業医科大学 医学部 助教
椛島利江子 産業医科大学 医学部 専門医
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
矢上晶子 藤田保健衛生大学 医学部 講師
中川真実子 藤田保健衛生大学 医学部 助教
加藤義直 藤田保健衛生大学 医学部 研究生

(金属アレルギーマウスモデルの作成)。

金属アレルギーにかかわるエフェクター細胞を絞り込むため、金属 (Pd) アレルギーマウスモデルを用いて所属リンパ節リンパ球をヌードマウスに養子移入した。養子移入と金属暴露を繰り返して、エフェクター細胞を濃縮した。濃縮された細胞集団について定量的かつ網羅的な方法を用いて RNA レベルでの TCR レパトア解析を行った。さらに CDR3 size spectratyping 法とシークエンス解析により、抗原特性をクローンレベルで解析した。さらに、CD3・CD4・CD8 および Th1・Th2 サイトカインの発現について定量的 PCR により検討した。

免疫組織染色を行い、金属アレルギー発症部位の組織解析を行った。また、IFN の関与を IFN- γ KO マウスを用いて追究した。リンパ球の挙動をフローサイトメトリーにより解析した。

②金属と結合するペプチドを同定するため、Ni と LPS で感作したマウス脾細胞から抗原提示細胞を単離し、界面活性剤で処理し、可溶性画分を調整した。MHC Class II 分子と収容溝のペプチドを溶出し、限外濾過法、逆相 HPLC カラムにて分析した。さらに、精製ペプチドの活性を評価するためのアッセイ系を確立するため、BALB/c マウスを Ni+LPS で腹腔内感作後、ニッケルイオンで尾根部筋肉内に challenge した。5 日後、所属リンパ節と脾臓からリンパ球を調整し、リンパ球をニッケルイオン± IL-2 存在下で 3 日間培養し、リンパ球の増殖を検討した。

③金 (Au) アレルギー患者の T 細胞受容体

(TCR) 発現の偏りをフローサイトメトリーにより解析した。また、金属反応性 T 細胞クローンを樹立し、金属反応性 T 細胞における特性を調べた。

2) 金属アレルギーにおける細菌成分のアジュバント効果

①各種 TLR 系ならびに NOD 系リガンド(マイコプラズマ型合成リポペプチド、poly I:C、合成リポド A、一本鎖 RNA、CpG DNA、FK156、ムラミルジペプチド)による口腔上皮系細胞株 HSC-2 の各種 NK 活性化リガンド (NKG2D リガンド) 発現増強を、リアルタイム PCR 法、フローサイトメトリーおよび免疫蛍光染色法で検討した。

各種 TLR 系ならびに NOD 系リガンド(マイコプラズマ型合成リポペプチド、FK156、ムラミルジペプチド)などを用いて金属アレルギーにおける感作相 (priming, sensitization) と惹起相 (challenge, elicitation) のそれぞれの段階での細菌成分の重要性についてマウスモデルを用いて検討した。口腔内細菌である *P. intermedia*, *P. gingivalis* の LPS 画分を用いて惹起相における細菌成分の重要性についてマウスモデルを用いて検討した。

②各種 TLR の反応性の違いを検討するため、TLR4 遺伝子座を欠損した C57BL/10ScN マウスの骨髄由来樹状細胞に TLR キメラ (TLR4 の細胞外部分と他の TLR の細胞膜及び細胞質部分を結合したもの) を発現させた遺伝子導入細胞を樹立した。この細胞を LPS で刺激した後、フローサイトメーターを用いて補助刺激分子及び MHC class II 分子の発現レベルを解析した。また、樹状細胞を金属イオン (Ni^{2+} または Pd^{2+}) と LPS で刺激し、同様の実験を行った。

③金属アレルギーの感作相 (priming, sensitization) を *in vitro* で行うことができるかを調べるため、骨髄由来樹状細胞(DC) を調整し *in vitro* で金属塩と LPS で刺激後、

マウスに移入した。その後金属塩を、感作 DC を移入したマウスに接種しアレルギーが誘導できるか検討した。さらに、この細胞を非感作 C57BL/6 マウスに移入し PdCl_2 溶液を耳介に接種し腫脹を測定した。

3) 新規診断法と治療法の開発へ向けた理論的基盤の確立

①パッチテスト(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、掌蹠膿疱症などの臨床症状別に分類し、各患者の末梢血から PBMC を分離した。金属の細胞増殖刺激能を検討するため、PT 陽性の金属 (NiSO_4 , NiCl_2 , MnCl_2 , CrCl_3 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ など) と混合培養し、 $^3\text{[H]thymidine}$ の取り込みにて評価した (lymphocyte transformation test; LTT)。

LTT 法の感度を高めるため、パッチテスト(PT)で陽性を確認した金属アレルギー患者の PBMC から制御性 T 細胞 (Treg) を除去後、PT 陽性の金属 (NiSO_4 , NiCl_2 , MnCl_2 , CrCl_3 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ など) と混合培養し、 $^3\text{[H]thymidine}$ の取り込みにて評価した。さらに、制御性 T 細胞 (Treg) が産生するサイトカイン (IL-10、TGF- β 、CTLA-4) の中和抗体や阻害剤を添加して、金属イオンによるリンパ球幼弱化試験 (LTT アッセイ) に改善を加えた。

②外因性および内因性アトピー性皮膚炎患者において、金属アレルギーの関与をパッチテストを用いて検討した。また、Th17 細胞の関与についても追究した。内因性のアトピー性皮膚炎 (AD) と金属アレルギーとのかかわりを、AD 重症度とかゆみとの関係、外因性 AD と内因性 AD との分別、金属アレルギー検査項目、細胞内サイトカインおよび培養上清サイトカイン測定による Th1・Th2・Th17 のバランスについて調べた。

③金属パッチテストの方法を再検討するため、貼付部位、貼付試料の濃度・基材、判定時期、貼付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した。

④マウスモデルを用いた養子移入の結果から、CD8⁺T 細胞が有力なエフェクター細胞の候補と考えられることから、Class I への抗原提示に重要なプロテアソームを標的とし、プロテアソームインヒビターを用いて金属アレルギーの発症を抑制できるか検討した。また、養子移入を繰り返した CD8⁺T 細胞において NKG2D が発現することから、抗 NKG2D 抗体により金属アレルギーの発症を抑制できるかも検討した。

⑤溶出金属イオンの測定法を開発するため、マウスの背部皮下に種々の金属を埋め込み炎症反応を惹起させた。周辺組織中の金属濃度を Newport Green を用いた蛍光法と ICP-AES 法で測定した。

(倫理面への配慮)

患者サンプルを用いた研究においては、「臨床研究に関する倫理指針(平成 15 年厚生労働省告示第 255 号)」、およびその「改正指針(平成 16 年厚生労働省告示第 459 号)」に従い、被験者には十分な研究内容の説明を口頭と文書の両方伝え、承諾を確認している。さらに、個人情報保護法に基づき保存される検体試料や研究データの匿名化は、患者に対し独自の ID を付与し、病院での患者 ID、氏名、住所、電話番号を削除する連結可能匿名化にて行っている。これらの実施に際し、施設内の倫理委員会において本研究計画の承認を得ている。実験動物の使用においては、各研究機関の実験動物委員会の審査及び承認を受け、各機関の倫理基準を厳守している。また、遺伝子組み換え実験については、各研究機関のバイオ・セーフティー委員会の承認を受けて実施している。

C. 研究結果

1) 金属アレルギー発症の分子機構の解明

①Ni 1 mM と LPS 1 μg/ml の等量混合液で priming (感作)したマウスにおいて、Ni, Pd, Cr, Co, Cu, Ag はいずれも、数 μM の

elicitation 濃度で炎症を誘導し、Pd, Cr, Ag, Cu は本来の抗原である Ni よりも強い炎症を誘導した。Cu はそれ自体が他の金属には見られない炎症反応を誘導したが、この炎症が起こらない低濃度で Ni と交差反応を示した。Elicitation phase での最少有効 Ni 濃度は、-LPS で 1×10^{-6} M, +LPS で 1×10^{-12} M であった。マウスモデルにおいて、金属アレルギーの発症に伴って NKG2D リガンドである RAE-1 の発現が誘導された。また、面白いことに、NKG2D リガンド強制発現マウスを用いて、金属アレルギーを誘導したところ、耳介の腫脹の程度が低かった。金属の種類に関しては、Pd は Ni よりも耳介の腫脹が強く、強い炎症がおこっていることが示唆された。金属暴露、養子移入を繰り返すことにより、CD8/CD4 比が変化し、TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD8⁺細胞が濃縮されることが判明した。また、CD8⁺細胞は NKG2D を発現するようになった。さらに、養子移入前の BALB/c マウスリンパ球は、V β 8 CD8⁺細胞細胞が TCR $\alpha\beta$ ⁺細胞の中で優位に存在していたが、金属暴露、養子移入を繰り返すことにより、所属リンパ節内の V β 8 CD8⁺細胞はほとんど存在しなくなり、TCR レパトアが変化することが判明した。TCR レパトアおよび CDR3 領域の解析において、同一クローンの金属特異的 V α 鎖が炎症局所に選択的に集積していた。V β 鎖に関して、個々のマウスで金属特異的な family の高発現が観察された。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 effector T 細胞の集積が確認された。炎症局所では、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た。

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

②金属と結合するペプチドに関して、逆相 HPLC カラムの分析により、精製した試料中に約 10 のピークを得た。この中に金属と結

合するペプチドが存在する可能性が高い。さらに、この精製ペプチドの活性を評価するためのアッセイ系を確立することに成功した。金属と結合するペプチドに関して、逆相 HPLC カラムの分析により、精製した試料中に約 10 のピークを得た。この中に金属と結合するペプチドが存在する可能性が高い。

③患者末梢血より Au 特異的 T 細胞クローン、Ni 特異的 T 細胞クローンを得た。PT 後の末梢リンパ球では CD4T 細胞が 75%、CD8T 細胞は 25%であったが、Ni 存在下で培養すると、全て CD4T 細胞となった。TCR V β のレパトアは、V β 13.6 陽性細胞が 35%にも達した。

2) 金属アレルギーにおける細菌成分のアジュバント効果

①ヒト口腔上皮細胞において、各種 TLR 系ならびに NOD 系リガンド刺激による NKG2D リガンド (ULBP-2, ULBP-3 および MICA/B) の発現増強が認められた。

微生物関連物質はいずれも感作相と惹起相の両ステップで Ni-allergy を促進した。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。歯周病関連細菌の *P. intermedia* ならびに *P. gingivalis* の菌体成分では TLR2 リガンドのリポペプチドが金属アレルギー発症に重要である。

②マウス樹状細胞の CD80、CD86、及び MHC class II 分子の発現レベルは、TLR4 及び TLR4/TLR5 キメラを発現した遺伝子導入細胞において著しく増大した。一方、TLR4/TLR1、TLR4/TLR2、または TLR4/TLR6 キメラを発現した遺伝子導入細胞では発現レベルの増大は観察されなかった。これらの結果から、TLR4 と TLR5 のリガンドが金属イオン-タンパク複合体の T 細胞への提示を効果的に誘導しうることを示唆された。また、金属イオンの効果について検討した結果、細胞毒性を示さない 0.25 mM の濃

度において、金属イオン単独処理により補助刺激分子及び MHC class II 分子の発現レベルは影響を受けず、また金属イオンは LPS によるこれらの分子の発現増強作用にも影響を与えなかった。

③ in vitro での樹状細胞の金属の感作に成功した。実際、PdCl₂ + LPS 処理 DC 移入群は、未処理 DC 移入群と比較して PdCl₂ による challenge で優位な腫脹の増大を示した。PdCl₂ 処理 DC 移入群は、未処理 DC 移入群と比較して 48 時間以降の腫脹が増大する傾向を示した。

BMDC の耳介への移入による感作実験において、BMDC を移入することで感作が成立した。BMDC 移入感作マウスから精製したリンパ球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、優位な腫脹の差が認められた。

3) 新規診断法と治療法の開発へ向けた理論的基盤の確立

①接触皮膚炎 (PT 陽性; Ni, 2 例あるいは Ni と Cr, 1 例)、肉芽腫性口唇炎 (PT 陽性; Ni, Cu, Mn, 1 例)、歯科金属アレルギー (PT 陽性; Cu, 1 例)、金属プレート挿入後の蕁麻疹 (PT 陽性; Fe, Mn, Cr, Ni, 1 例) の 6 症例において各金属と混合培養した Ni, Fe による LTT は著明な陽性を示したが、その他の金属では明らかな陽性とは言えなかった。

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、Stimulation Index は CD25 陽性制御性 T 細胞を除去することにより上昇した。

健康人においては、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。

②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。外因性 AD ではフィラグリンの遺伝子変異を持つ患者がいるものの、内因性

AD では検出されなかった。次に、内因性アトピー性皮膚炎患者 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。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 と比べ優位に増加していた。

③金属パッチテスト試料による陽性一致率は Ni が 83%、Hg が 67%、Au は 40%であった。Trolab 社の試料 Au は陽性率が高かった。また、貼付部位による差は認められなかった。

④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を抑制できた。

⑤マウスの背部皮下に種々の金属ワイヤーを埋め込み観察した結果、Ni で血漿成分の漏出や組織の壊死などが起きた。周辺組織中の Ni 濃度を ICP-AES 法と ICP-MS 法で測定したところ、両者の結果は感度についてはほぼ同等であった。Newport Green を用いた蛍光法と ICP-AES 法を用いたところ、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。また、金属ワイヤー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。

D. 考察

1) 金属アレルギー発症の分子機構の解明

①マウス金属アレルギーモデルを樹立することに成功した。このモデルを用いて、金属暴露、養子移入の繰り返しによりエフェクター細胞が濃縮できることが判明した。エフェクター細胞の 1 つとして TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD8⁺細胞が考えられる。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が判明し、治療標的の候補となった。金属ア

レルギーにより 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 細胞の特徴を明らかにし、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。

TCR レパトアの特定の結果から、金属は自己タンパクとともにハプテンを形成し、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 TCR の特異的 V α 鎖が関与していると考えられた。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 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ことが明らかとなった。これらの結果は、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と考えられる。

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、T 細胞が重要な役割を担っている。IFN- γ KO マウスでは Pd アレルギーが起こらないことから、IFN- γ の関与が示唆された。

Elicitation での最少 Ni 濃度が +LPS で 1×10^{-12} M の低濃度になることは、感染や細菌成分が極めて重要な金属アレルギー促進因子になることを示唆する。今後、TLRs や NODs の ligands などについても、詳細に検討する。

マウス金属アレルギーの発症に伴って NKG2D リガンド (RAE-1) の発現が誘導されること、ヒト口腔上皮細胞においても、NKG2D リガンドが発現増強することから、NKG2D が発症にかかわっている可能性が考えられた。

②本研究により自己抗原ペプチドを精製できることが判明した。今後、精製の精度とスケールを上げ、LC/MS/MS 分析により、金属アレルギー発症に関与する自己抗原ペプチドを同定する。

③Au アレルギーの場合、金属を T 細胞が認

識する方法として、ハプテンとして認識する他にも、MHCに非拘束性の反応も存在する。また、Niアレルギー患者の末梢血中にはNi刺激によりgranulysinを強く発現するCD4T細胞が30%程度存在することが判明した。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、バイオマーカーとして金属アレルギーのスクリーニングへと展開できる。

2) 金属アレルギーにおける細菌成分のアジュバント効果

①様々な菌体成分が金属アレルギー惹起反応を増強した。LPS存在下での金属アレルギーの交差反応はかなり広く、かつ、極めて低濃度で起こるといふ知見は、これがヒト金属アレルギーにおいても事実であるとすれば、金属アレルギーの診断や治療を考える上で極めて重要である。パッチテストの見直しも考慮に値する。

②本年度の研究成果から、TLR4とTLR5のリガンドが金属イオンタンパク複合体のT細胞への提示を効果的に誘導しうることが示唆された。また、金属イオンの効果について、*in vitro*で細胞毒性を示さない0.25 mMの濃度では、補助刺激分子及びMHC class II分子の発現レベルは影響を受けないことから、金属イオン自体は、抗原提示に関与する分子の発現レベルの調節には関与しないことが示唆された。

③*in vitro*で金属イオンを処理したDCを移入することにより感作を成立させることが可能であり、今後この実験系を用いて、効果的LTTアッセイの開発、および提示されるペプチドの同定などを試みる。
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BMDC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。

3) 新規診断法と治療法の開発へ向けた理論的基盤の確立

①パッチテスト陽性の金属に対して、LTTアッセイは、末梢血から制御性T細胞を除去することにより、測定感度が増強することが判明した。一方、健常人では制御性T細胞を除去しても擬陽性とはならず、末梢血から制御性T細胞を除去することは効果的である。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。

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出来ないために臨床症状を表している可能性が示唆された。

②内因性ADではTh1細胞も増加していることを示し、金属などに接触過敏を有していることが想定された。ADはTh2病といわれているが、それだけでは病態を説明できない。皮膚炎形成にはTh1サイトカイン、特にIFN- γ の存在なくしては成立するのが困難と考えられる。病原性T細胞はIFN- γ のソースであり、かつTh2細胞の特徴を持つことが必要である。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。

③Auのパッチテスト陽性率が試薬メーカーにより異なるが、濃度の測定結果は表記と一致していた。金属試料分散の問題が陽性反応に影響している可能性が考えられる。

④マウスモデルにおいて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ことが判明した。また、MHC Class I への抗原提示にはプロテアソームが重要であり、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ことが判明した。

⑤溶出金属イオンの測定法として 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。また ICP-AES 法も有力な測定法であり、今後、測定に必要な最小量を検討し、実用化に向けて追究する。

金属ワイヤ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り、かつ、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。

E. 評価

1) 達成度について

当研究班は、金属アレルギーの診断、予防、治療に役立つ理論的基盤の確立を目指すことを目的として研究を進めてきた。これまでの成果として、

①金属アレルギー動物モデルの樹立に成功した。②金属アレルギー動物モデルおよび患者サンプルの研究から、特異的 T 細胞レパトアが反応していることが判明し、金属がハプテンとして機能している可能性が高いことが明らかとなった。

③口腔内や皮膚の常在菌の菌体成分が、TLR を介して金属アレルギーの発症、増悪に関与していることが判明した。

④パッチテストの代替法として LTT 法が有用であることが明らかとなった。

このように、金属アレルギーの診断、予防、治療に役立つ理論的基盤の確立となる成果が得られたことから、多くの臨床材料を要する研究で困難もあったが、当初の目的は充分達

成できたと考える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

世界的に見て、金属アレルギーの研究は進んでおらず、金属による T 細胞の反応に関する情報は、まだ多くの蓄積がない。また、本邦の金属アレルギー罹患率は 15%~20% とかなり高く、潜在的な金属接触皮膚炎患者数は多いと推測される。日常生活に関連した金属製品によって本症が発症する場合、患者の QOL を低下させるのみならず、社会生活にも障害を与えている。

このような状況の下で、当研究班の研究成果は特筆すべきものがある。

①当研究班が開発した金属アレルギーマウスモデルは、*Nature* 誌の **News** にとりあげられ、国際的に高い評価を得ており、学術的にハイレベルの成果があがっている。

②動物モデルの解析により、金属アレルギーを引き起こす主たる細胞集団が CD8+T 細胞であること、また、金属特異的に反応する T 細胞レパトアを特定することに成功し、このレパトアを調べることで新たな診断法の開発に道を開き、学術的、社会的意義は大きい。

③細菌成分である TLR リガンドは強いアジュバント効果を示し、低濃度の金属塩においてもアレルギーを誘導することが判明し、学術的に意義深い。

④本研究は、金属塩+LPS 処理 BMDC の移入により金属アレルギーの感作が成立することを世界で初めて示した点において国際的にも学術的意義は大きく、さらにこの発見が金属アレルギー診断法の開発にも寄与することから社会的意義も大きい。

⑤金属アレルギーの診断には従来パッチテストが不可欠であったが、MLTT 法は、患者の QOL を下げることがなく、さらに、感作のリスクを負わせないという大きな長所を有しており、社会的意義が大きい。

⑥AD の 2 分別法は国際的にも受け入れられつつあり、それに沿った形での研究が望まれている。本研究では内因性 AD が金属アレルギー

ギーと関係を有することを示した点において学術的にも、また AD 患者の関心事である抗原についての社会的意義が大きい。

⑦ 金属イオン溶出の測定法を検討し、Newport Green を用いた蛍光法と ICP-AES 法が有用であることが判明した。今後、簡易的に金属イオンを測定できる方法を開発する。これは、診断や予後の判定に応用できる可能性を秘めており、社会的意義は大きい。以上、本研究の学術的・国際的・社会的意義は、卓越している。

3) 今後の展望について

これまでの研究の成果を基盤に、臨床応用を見据えた開発研究を行う。革新的診断、予防、治療法の開発に向けて、以下のように多面的に研究を遂行する。

① モデル動物からのアプローチ

当研究班が確立した T 細胞レパトア網羅的解析法を進展させ、マーモセットを用いて金属アレルギーモデルを構築し、T 細胞レパトアの網羅的解析を行う。特定した T 細胞受容体を用いた新規金属アレルギーモデル動物を樹立し、金属の交差反応について検討する。また、金属結合ペプチドをランダムペプチドライブラリー法、質量分析法を用いて決定する。*in vitro* 金属感作法を用いて、各種ケミカルインヒビターによりプロテアソームやリソソームの関与を検討し、金属イオンとペプチドの抗原提示される機構を追究する。

② 疾患からのアプローチ

ヒト型動物モデルを用い、金属塩を耳介に接種することにより腫脹を測定することで、パッチテストに替わる非侵襲的革新的診断法としての可能性を追究する。患者リンパ球を用いた金属イオンによる増殖反応の感度を高め、診断法としての可能性を検証する。加えて内因性アトピー性皮膚炎と金属アレルギーとの関連を追究する。国内屈指のパッチテスト研究フィールドを生かし、疫学的側面からも問題点を明確にする。さらに患者リンパ球の T 細胞レパトア解析を行い新規診断法とし

ての可能性を追究し、より有効かつ簡便な金属アレルギーの診断方法が確立されることが期待される。

③ 材料からのアプローチ

各種アジュバントによる炎症細胞の集積による金属溶出量の変化を検討する。ヒト歯科補綴物周囲浸出液や唾液など生体サンプルを用いて診断や治療効果および予後の判定に役立つ、簡便かつ鋭敏な溶出金属の測定法を開発する。

研究終了時には、金属アレルギーにかかわる T 細胞集団が特定され、発症の分子機構が判明し、治療標的が明らかとなる。T 細胞レパトア検査法やヒト型動物を用いた金属アレルギー革新的診断法が開発できる。また、溶出金属濃度測定法が確立され、診断、治療に応用できる。将来的には、霊長類、ヒト型動物モデルを用いて、新規治療法の開発を目指す。さらに、アレルギーが発症しにくい医療材料の開発に道を開くと考えられる。

4) 研究内容の効率性について

実験技術・試薬等に関して研究代表者・分担者間で積極的に情報交換することにより効率的に研究を遂行できた。また、班会議は年 2 回実施することにしたため、研究の目的および方向性を班員同士が明確に共有できた。本研究は、倫理委員会の承認と患者の同意のもとで、パッチテストと MLTT 検査の比較検証を有効に進めてきたため、効率的に進んだと考えられる。

さらに、多面的に解析するため、班を 4 つのグループに分け、効率的に研究をすすめた。各グループは、有機的に補助し合い、高い効率性で研究が遂行された。

F. 結論

19 年度

① 本研究班が開発した金属アレルギーマウスモデルは、*Nature* 誌の *News* にとりあげられ、国際的に高い評価を得た (*Infection may*

trigger metal allergies. *Nature*, published online news 070430-6, 2007).

②金属アレルギーの発症に伴って通常組織では発現の見られないNKG2Dリガンドが誘導された。複数の金属暴露によって炎症が増悪することから、メモリー型の免疫細胞の関与が示唆された。

③金属アレルギー発症に関わる自己抗原ペプチドを同定する方法の基盤を確立した。

④TLR4とTLR5が樹状細胞の活性化を誘導するが、金属イオンは直接的にはその活性化に関与しない。

⑤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LTTアッセイによる検出が可能であることが明らかとなった。

20年度

①金属暴露、養子移入を繰り返すことにより、CD8/CD4比が変化し、TCR $\alpha\beta$ +CD8+細胞が濃縮されることが判明した。金属アレルギーの発症においてTCR $\alpha\beta$ +CD8+細胞にNKG2Dの発現が誘導されること、TCRレパトアが変化することが明らかとなった。抗NKG2D抗体の投与、およびプロテアソームインヒビター投与でも金属アレルギーの発症を有意に抑制できることが判明した。すなわち、NKG2Dやプロテアソームは金属アレルギーの治療標的になり得る。

②金属アレルギー発症に関与する精製ペプチドの活性を評価するアッセイ系を確立することに成功した。

③溶出金属イオンの測定法には、Newport Greenを用いた蛍光色素解析、およびICP-AES法が有効である。

④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、極めて低い濃度で種々の金属イオンもアレルギー反応を誘導することが判明した。歯周病関連細菌の*P. intermedia*ならびに*P. gingivalis*の菌体成分ではTLR2リガンドのリポペプチドが金属アレルギー発症に重要である。

⑤In vitroで金属イオンとTLRリガンドを同時処理した骨髄由来DCを移入することにより、金属アレルギーの感作が成立することが判明した。

⑥金属に対するヒトサンプルLTTアッセイにおいて、制御性T細胞を除去することにより、感度を高めることができた。

⑦内因性アトピー性皮膚炎患者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。

21年度

①Pdアレルギーでは、CD4 T細胞、CD8 T細胞とも重要であり、アレルギー炎症には、IFN- γ が関与している。また、Pdアレルギーにおいて、TCRの特異的Va鎖が金属の認識に関与している。さらに、金属アレルギーは、CD8およびTh1細胞による細胞傷害性遅延型過敏反応が起こっている。

②APCによる抗原ペプチド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。Niアレルギー患者にはNi刺激によってgranulysinを発現するCD4 T細胞が存在する。

③内因性ADの原因・病態は金属アレルギーが重要因子である。

④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BMDC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。また、BMDCの局所移入では、局所的に感作が成立する。

⑤金属のパッチテスト陽性反応の再現性・確実性を確保するためには、さらに検討が必要であり、一箇所だけの貼付では金属アレルギーを見落とす可能性がある。

⑥生体への金属溶出量測定の実用化のためには、さらなる高感度化が必要である。

G. 研究発表

1) 海外

口頭発表	36件
原著論文による発表	146件

それ以外（レビュー等）の発表 8件

そのうち主なもの

論文発表

原著論文

1. 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)
2. 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).
3. Kawano M, Han J, Kchouk ME and Isoda H: Hair growth regulation by the extract of aromatic plant *Erica multiflora*. *J. Nat. Med.* 63: 335-339 (2009)
4. Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, Yagita H, and Okumura K. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and the cross-presentation. *Blood*, 2009, 113, 3821-3830
5. Talorete TPN, Limam A, Kawano M, Ben Rejed Jenhani A, Ghrabi A, Isoda H. (2008) Stress response of mammalian cells incubated with landfill leachate. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 27: 1084-1092
6. Kawano M, Matsuyama K, Miyamae Y, Shinmoto H, Kchouk ME, Morio T, Shigemori H, Isoda H. (2007) Antimelanogenesis effect of Tunisian herb *Thymelaea hirsuta* extract on B16 murine melanoma cells. *Exp. Dermatol.* 16: 977-984
7. Limam A, Talorete TPN, Ali MB, Kawano M, Ben Rejed Jenhani A, Abe Y, Ghrabi A, Isoda H. (2007) Assesment of estrogenic activity in Tunisian water and wastewater by the E-Screen assay. *Enviro.l Sci.* 14: 43-52
8. Vilarinho S, Ogasawara K, Nishimura S, Lanier LL, Baron JL. (2007) Blockade of NKG2D on NKT cells prevents hepatitis and the acute immune response to hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(46):18187-92.
9. Ishizaki K, Yamada A, Yoh K, Nakano T, Shimohata H, Maeda A, Fujioka Y, Morito N, Kawachi Y, Shibuya K, Otsuka F, Shibuya A, Takahashi S. (2007) Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. *J Immunol.* 178(1):605-12.
10. Kumagai K, Hamada Y, A. Holmlund, Gotoh A, Nakaoka K, Arai Go, Yamane S, Suzuki R. The levels of vascular endothelial growth factor in the synovial fluid correlated with the severity of arthroscopically observed synovitis and clinical outcome after temporomandibular joint irrigation in patients with chronic closed lock. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*2009 (in press)
11. Kitaura K, Kanayama K, Fujii Y, Shiobara N, Tanaka K, Kurane I, Suzuki S, Itoh T, Suzuki R. T cell receptor repertoire in BALB/c mice varies according to tissue type, sex, age, and hydrocortisone treatment. *Exp Anim.* 2009 Apr;58(2):159-68.
12. Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, Toyosaki-Maeda T,

- Ishizaki J, Matsuo Y, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R. The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction. *Immunology*. 2009 Sep;128(1Suppl):e315-24.
13. Gotoh A, Hamada Y, Shiobara N, Kumagai K, Seto K, Horikawa T, Suzuki R. Polyclonal expansion of T cells bearing restricted T cell receptor repertoires in lesions of oral lichen planus without hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol*.154(2):192-201 2008
 14. Hamada Y, Holmlund AB, Kondoh T, Nakaoka K, Sekiya H, Shiobara N, Gotoh A, Kumagai K, Suzuki R, Seto K. Severity of arthroscopically observed pathology and levels of inflammatory cytokines in the synovial fluid before and after visually guided temporomandibular joint irrigation correlated with the clinical outcome in patients with chronic closed lock. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*.106 (3): 343-349, 2008.
 15. Tanaka K, Horikawa T, Suzuki S, Kitaura K, Watanabe J, Gotoh A, Shiobara N, Itoh T, Yamane S, Suzuki R, Fukui N, Ochi T. Inhibition of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 reduces the severity of collagen-induced arthritis. *J Rheumatol*. 2008 ;35(12):2316-24.
 16. Ishida S, Yamane S, Ochi T, Nakano S, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Suzuki R. LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor. *J Rheumatol*. 2008 ;35(6):960-8.
 17. Yamane N, Tanaka Y, Ohyabu N, Yamane S, Maekawa K, Ishizaki J, Suzuki R, Itoh T, Takemoto H. Characterization of novel non-peptide thrombopoietin mimetics, their species specificity and the activation mechanism of the thrombopoietin receptor. *Eur J Pharmacol*. 2008 31;586(1-3):44-51.
 18. Fujii Y, Kitaura K, Nakamichi K, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I. Accumulation of T-cells with selected T-cell receptors in the brains of Japanese encephalitis virus-infected mice. *Jpn J Infect Dis*. 2008 ;61(1):40-8.
 19. Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Masuda R, Tanaka K, Shiobara N, Yamane N, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R. Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients *Journal of Inflammation* 2008 Apr 27;5:5
 20. Gotoh A, Hamada Y, Shiobara N, Kumagai K, Seto K, Horikawa T, Suzuki R. Polyclonal expansion of T cells bearing restricted T cell receptor repertoires in lesions of oral lichen planus without hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol*.154(2):192-201 2008
 21. kita A, Mitomi H, Mori T, Juji T, Katsuragawa Y, Yamamoto S, Sawabe M, Yamane S, Suzuki R, Sandell LJ, Ochi T. Regional differences in chondrocyte metabolism in osteoarthritis: a detailed analysis by laser capture microdissection. *Arthritis Rheum*. 2008 ;58(1):154-63.
 22. Shiobara N, Suzuki Y, Aoki H, Gotoh A, Fujii Y, Hamada Y, Suzuki S, Fukui N, Kurane I, Itoh T, Suzuki R. Bacterial superantigens and T cell receptor beta-chain-bearing T cells in the immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*. 2007 ;150(1):13-21.

23. Matsutani T, Ohmori T, Ogata M, Soga H, Kasahara S, Yoshioka T, Suzuki R, Itoh T. Comparison of CDR3 length among thymocyte subpopulations: impacts of MHC and BV segment on the CDR3 shortening. *Mol Immunol.* 2007 Mar;44(9):2378-87.
24. Nishiya T, Kajita, E, Horinouchi T, Nishimoto A, Miwa S : Distinct roles of TIR and non-TIR regions in the subcellular localization and signaling properties of MyD88. *FEBS Lett.* 581, 3223-3229, 2007.
25. 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).
26. Onoue A, Kabashima K, Kobayashi M, Mori T, Tokura Y : Induction of eosinophil- and Th2-attracting epidermal chemokines and cutaneous late-phase reaction in tape-stripped skin. *Exp Dermatol* 18 : 1036-1043, 2009.
27. Nishio D, Nakashima D, Mori T, Kabashima K, Tokura Y : Induction of eosinophil-infiltrating drug eruption in mice. *J Dermatol Sci* 55 : 34-39, 2009.
28. Sugita K, Kabashima K, Yoshiki R, Ikenouchi-Sugita A, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N, Tokura Y : Inducible Nitric Oxide Synthase Downmodulates Contact Hypersensitivity by Suppressing Dendritic Cell Migration and Survival. *J Invest Dermatol*, (in press).
29. Yoshiki R, Kabashima K, Sugita K, Atarashi K, Shimauchi T, Tokura Y : IL-10-Producing Langerhans cells and regulatory T cells are responsible for depressed contact hypersensitivity in grafted skin. *J Invest Dermatol* 129 : 705-713, 2009.
30. 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)
31. Honda T, Matsuoka T, Ueta M, Kabashima K, Miyachi Y, Narumiya S. Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2009.124(4):809-18
32. Yoshiki R, Kabashima K, Sugita K, Atarashi K, Shimauchi T, Tokura Y. IL-10-Producing Langerhans Cells and Regulatory T Cells Are Responsible for Depressed Contact Hypersensitivity in Grafted Skin. *J Invest Dermatol* 2008. 129(3):705-13.
33. Nakashima D, Kabashima K, Sakabe J, Sugita K, Kobayashi T, Yoshiki R, et al. Impaired initiation of contact hypersensitivity by FTY720. *J Invest Dermatol* 2008; 128:2833-41.
34. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008; 128:2625-30.
35. Sugita K, Koga C, Kabashima K, Tokura Y. Occupational contact dermatitis due to polyvinylamine. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22:1130.
36. Hino R, Orimo H, Kabashima K, Atarashi K, Nakanishi M, Kuma H, et al. Evaluation of photoallergic potential of chemicals using THP-1 cells. *J Dermatol Sci* 2008;

- 52:140-3.
37. Hino R, Nishio D, Kabashima K, Tokura Y. Percutaneous penetration via hand eczema is the major accelerating factor for systemic absorption of toluene and xylene during car spray painting. *Contact Dermatitis* 2008; 58:76-9.
 38. Kabashima K, Tokura Y. The potential of selected prostanoid receptors as targets in a new therapeutic strategy for allergy and immune diseases. *Curr Drug Saf* 2007; 2:186-92.
 39. Seike M, Furuya K, Ohmura M, Watanabe K, Ohtsu H. Histamine H4 receptor antagonist ameliorates chronic allergic contact dermatitis induced by repeated challenge. *Allergy* in press
 40. Hirasawa N, Goi Y, Tanaka R, Ishihara K, Ohtsu H, Ohuchi K. Involvement of prostaglandins and histamine in nickel wire-induced acute inflammation in mice. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* in press
 41. Carlos D, Fremond C, Samarina A, Vasseur V, Maillet I, Ramos SG, Erard F, Quesniaux V, Ohtsu H, Silva CL, Faccioli LH, Ryffel B. Histamine Plays an Essential Regulatory Role in Lung Inflammation and Protective Immunity in the Acute Phase of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Infect Immun* in press
 42. Analet C, Parmentier R, Ouk K, Guidon G, Buda C, Sastre JP, Akaoka H, Sergeeva OA, Yanagisawa M, Ohtsu H, Franco P, Haas HL, Lin JS. Orexin/Hypocretin and Histamine: Distinct Roles in the Control of Wakefulness Demonstrated Using Knockout Mouse Models. *J Neurosci* 29, 14423-14438, 2009
 43. Rajasekaran N, Solomon S, Watanabe T, Ohtsu H, Gajda M, Braeuer R, Illges H. Histidine decarboxylase but not histamine receptor 1 or 2 deficiency protects from K/BxN serum-induced Arthritis. *Int Immunol* 21, 1263-8, 2009
 44. Carter M, Adamantidis A, Ohtsu H, Deisseroth K, de Lecea L. Sleep homeostasis modulates Hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. *J Neurosci* 29, 10939-49, 2009
 45. Ishihara K, Goi Y, Hong JJ, Seyama T, Ohtsu H, Wada H, Ohuchi K, Hirasawa N. Effects of nickel on eosinophil survival. *Int Arch Allergy Immunol* 149, 57-60, 2009
 46. Beghdadi W, Porcherie A, S Schneider B, Dubayle D, Peronet R, Huerre M, Watanabe T, Ohtsu H, Louis J, Mécheri S. Role of histamine and histamine receptors in the pathogenesis of Malaria. *Med Sci (Paris)* 25, 377-381, 2009
 47. Musio S, Pedotti P, Mantegazza R, Ohtsu H, Boon L, Steinman L, Galli SJ, Pedotti R. Anaphylaxis to a self-peptide in the absence of mast cells or histamine. *Lab Invest* 89, 398-405, 2009
 48. Andou A, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kamada N, Kobayashi T, Hashimoto M, Okutsu T, Shimbo K, Takeda T, Matsumoto H, Sato A, Ohtsu H, Suzuki M, Hibi T. Dietary histidine ameliorates murine colitis by inhibition of pro-inflammatory cytokine production from macrophages. *Gastroenterol* 136, 567-574, 2009
 49. Brabant C, Alleva L, Grisar T, Quertemont E, Lakaye B, Ohtsu H, Lin J-S, Jatlow P, Picciotto M, Tirelli E. The H₃ inverse agonist thioperamide potentiates cocaine-induced locomotion: role of the histaminergic system and potential pharmacokinetic effects *Psychopharmacology* 202, 673-687, 2009

50. Shiohara M, Shigemura T, Suzuki T, Tanaka M, Morii E, Ohtsu H, Shibahara S, Koike K. MITF-CM, a newly identified isoform of microphthalmia-associated transcription factor, is expressed in cultured mast cells. *Int J Lab Hematol* 31, 215-226, 2009
51. Leite-de-Moraes MC, Diem S, Michel ML, Ohtsu H, Thurmond RL, Schneider E, Dy M. Histamine receptor H4 Activation Positively Regulates *in vivo* IL-4 and IFN- γ Production by invariant natural killer T cells. *J Immunol* 182, 1233-1236, 2009
52. Yamauchi K, Piao HM, Nakadate T, Shikanai T, Nakamura Y, Ito H, Mouri T, Kobayashi H, Maesawa C, Sawai T, Ohtsu H, Inoue H. Enhanced Goblet Cell Hyperplasia in HDC Knockout Mice with Allergic Airway Inflammation. *Allergology International* 58, 125-134, 2009

総説論文、著書

1. 著書 : Robin L. Thurmond(編者), **Histamine in inflammation** (タイトル), Landes Bioscience (出版社) Austen Texas, A chapter "Histamine synthesis and lessons learned from histidine decarboxylase deficient mice." written by Hiroshi Ohtsu in press in November (ページはまだ不詳) (2010) Feb 1 出版
2. 著者 : Anthony L. DeFranco, Richard M. Locksley, Miranda Robertson
題名 : Immunity -The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease Chapter 8, Specialized Lymphocytes in Early Responses and Homeostasis
出版社 : Oxford University Press
(翻訳 : 小笠原康悦, 監訳 : 笹月健彦)
年月 : in press

学会発表
国外学会

1. Ogasawara K, Ishizaki K, Urano N, Fjiwara N, Sasazuki T. Genomic analysis of RAE-1 genes. HFSP annual meeting, Berlin, Germany, 2008.
2. Kumagai K, Hamada Y, Kobayashi H, Gotoh A, Yamada H, Kawaguchi K, Horie A, Suzuki R. T Cell Receptor Analysis of Lymph Node Metastasis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma AAOMS 91st Annual Meeting and Scientific Session in conjunction with the Canadian Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, Toronto, CANADA October 15-17 2009
3. Kamei K, Hamada Y, Horie A, Goto A, Kumagai K, Kondoh T, Seto K. Arthroscopic findings and inflammatory cytokine levels in the synovial fluid of the superior joint compartment in patients with condyle fracture. AAOMS 89th Annual Meeting and Scientific Session in conjunction with JSOMS and KAOMS, Honolulu, USA October 8-14 2007
4. Nishimoto A, Lu L, Hayashi M, Nishiya T, Horinouchi T, Miwa S : Regulation of cell surface endothelin type A receptor level by a novel receptor-interacting protein, JAB1 : The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009), Kyoto, 2009
5. Tokura Y : Th17 cells in skin diseases. Annual Meeting of Taiwanese Dermatological Association, Kaohsiung, 2009.
6. Tokura Y : Expanding roles for Th17 cells in immunological skin disorders. The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatology, Sapporo, 2009.
7. Yoshiki R, Kabashima K, Sugita K, Nakamura M, Tokura Y: Local UVB-induced immunosuppression is mediated by IL-10-p

- roducing and OX40L-positive mature Langerhans cells. The 39th European Society for Dermatological Research Annual Meeting, Budapest, 2009.
8. What's new in immunology of metal allergy K Kabashima (17th International Contact Dermatitis Symposium 2009)
 9. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. C Koga, K Kabashima, N Shiraishi, M Kobayashi, and Y Tokura (IID 2008)
 10. Langerhans cells and prostaglandins: contribution to the etiology and pathogenesis of atopic dermatitis and related disorders (symposium) Kabashima K. 5th Georg Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis, Kyoto, April 2008
 11. Tanaka R, Goi Y, Ishihara K, Ueda K, Narushima T, Ohtsu H, Ohuchi K, Hirasawa N. Release of nickel from the implanted wire in vivo and enhancement by lipopolysaccharide. The 9th World Congress of Inflammation (Tokyo, 2009, July 6-10)

2) 国内

口頭発表	92 件
原著論文による発表	34 件
それ以外 (レビュー等) の発表	18 件

そのうち主なもの

論文発表

1. 著者：小笠原康悦
 題名：発症にかかわる免疫異常
 掲載誌：新時代の糖尿病学(1) 年月：
 in press
2. 著者：小笠原康悦
 題名：自然免疫と適応免疫を繋ぐ NK 細胞群
 掲載誌：The Frontiers in Medical Sciences
 「免疫応答と免疫病態の統合的分子理解に向けて」年月：2007

3. 著者：小笠原康悦
 題名：NK 細胞の制御シグナルと疾患
 掲載誌：実験医学 Vol 25 頁：
 1282-1285 年月：2007
4. 著者：Lewis L. Lanier (翻訳：小笠原康悦)
 題名：NK 活性化レセプター複合体
 掲載誌：実験医学 Vol 25 頁：
 1287-1292 年月：2007
5. 著者：石崎和沙、小笠原康悦
 題名：NK 細胞活性化レセプター
 NKG2D の生体内における機能
 掲載誌：実験医学 Vol 25 頁：1321
 -1325 年月：2007
6. 戸倉新樹：職業性皮膚炎の臨床と原因抗原. アレルギー・免疫 16:
 1714-1719, 2009.
7. 戸倉新樹：紫外線 B による免疫抑制と樹状細胞. 臨床免疫・アレルギー 52:
 508-513, 2009.
8. 瀬尾尚宏, 橋爪秀夫：金属アレルギーにおける T 細胞の反応 臨床免疫・アレルギー科 52(2):246-251,2009

学会発表

1. Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Ogasawara K. CD8 α^+ CDs use Tim-3 for phagocytosis of dying cells and cross-presentation. The 39th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Osaka, Dec. 2009.
2. Kawano M, Takeda K, Nakayama M, Kumagai K, Kobayashi H, Suzuki R, Ogasawara K. Increased specific T cells in the inflammation are of the metal allergy. The 39th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Osaka, Dec. 2009
3. 浦野奈央子、川野光子、田中和沙、岩崎之克、中村雅典、小笠原康悦「金属アレルギーモデルマウスにおける耳介真皮への T 細胞の浸潤」第 50 回歯科基礎医学

- 会、東京、2008年9月
4. Kawano M, Urano N, Tanaka-Ishizaki K, Ogasawara K. Pathological analysis using molecular cell biological methods of mouse model for metal allergy. The 38th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Kyoto, Dec. 2008.
 5. Tanaka-Ishizaki K, Kawano M, Urano N, Ogasawara K. RAE-1 is expressed on tumor associated macrophages. The 38th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Kyoto, Dec. 2008
 6. Ogasawara K 「NK細胞による骨髄移植拒絶の分子機構」(特別講演)第1回血液免疫研究会 東京、2007年11月
 7. Ogasawara K 「NK細胞の認識機構と骨髄移植」(特別講演)第60回山梨血液研究会 甲府、2007年10月
 8. Ogasawara K "NKG2D in Autoimmune diabetes" The first Diabetes Leading-edge Conference. Shizuoka, Aug 4-5, 2007
 9. Tanaka K, Urano N, Ogasawara K. Spl regulates NKG2D ligand RAE-1 epsilon transcription. 37th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Tokyo, 2007.
 10. Wada H, Ogasawara K, Seino K, Kawamoto H. Notch signaling promotes IFN- γ production in NK cell maturation. 37th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Tokyo, 2007.
 11. 川野光子、武田加奈、中山勝文、熊谷賢二、小林浩、鈴木隆二、小笠原康悦 金属アレルギー炎症部位における特異的 T細胞の増加 第39回日本免疫学会総会・学術集会(大阪) 2009.12.2-4
 12. 藤井克樹、北浦一孝、鈴木さつき、松谷隆治、高崎智彦、伊藤恒敏、倉根一郎、鈴木隆二 コモンマーモセット T細胞受容体 α 鎖および β 鎖配列の網羅的解析 第39回日本免疫学会総会・学術集会(大阪) 2009.12.2-4
 13. 熊谷賢一、濱田良樹、後藤哲人、川口浩司、堀江彰久、山田浩之、金井郁代、池谷進、石田璃久磨、瀬戸皖一、鈴木隆二 口腔癌リンパ節転移における網羅的 T細胞レセプター解析 第53日本口腔外科学会総会(徳島) 2008.10.20-21
 14. 後藤哲人、濱田良樹、熊谷賢一、小早川元博、亀井和利、齋藤知之、瀬戸皖一、鈴木隆二 口腔扁平苔癬における特異的な TCR レパトアを有する T細胞のポリクローナル様増殖 第53日本口腔外科学会総会(徳島) 2008.10.20-21
 15. 亀井和利、濱田良樹、堀江彰久、後藤哲人、熊谷賢一、近藤壽郎、瀬戸皖一. 関節突起骨折患者の上関節腔鏡視所見と滑液中の炎症性サイトカイン量 第52回日本口腔外科学会総会(名古屋) 2007.9.29-30
 16. 濱田良樹、近藤壽郎、齋藤知之、中岡一敏、堀江彰久、熊谷賢一、後藤哲人、瀬戸皖一. 慢性顎関節クローズドロックに対する顎関節有視下洗浄療法の予後に関連する関節鏡視所見ならびに炎症性サイトカインの検索 第20回日本顎関節学会総会・学術大会(仙台) 2007.7.14-15
 17. 熊谷賢一、濱田良樹、後藤哲人、齋藤知之、中岡一敏、堀江彰久、瀬戸皖一. 慢性顎関節クローズドロックに対する顎関節洗浄療法の治療成績と滑液中における血管内皮細胞増殖因子(VEGF)含有量の変化との関連性 第20回日本顎関節学会総会・学術大会(仙台) 2007.7.14-15
 18. NISHIYA, Tadashi: Distinct roles of TIR and non-TIR regions in the subcellular localization and signaling properties of MyD88, 第37回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2007年11月20~22日
 19. 戸倉新樹: 皮膚科からみたアトピー性皮膚炎の病態と治療管理. 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会 2009.6.5. 岐阜市
 20. 戸倉新樹: Th17細胞と皮膚疾患. 第73