とが示唆された。TLR4 シグナリングの活性化により、CD80、CD86、MHC class □分子の発現が効果的に増強されることと合わせて、BMDC を金属塩と LPS で処理することにより in vitro で金属イオンの情報を持つ MHC－ペプチド複合体を細胞表面に発現する活性型 BMDC が得られることが示唆された。また、$PdCl_2$+LPS 処理 BMDC を移入したマウスの顎下リンパ節細胞を移入すると金属アレルギーが誘導されたことから、$PdCl_2$+LPS 処理 BMDC は移入後顎下リンパ節へ移動し、そこで T 細胞に金属イオンの情報を抗原提示することが示唆された。

E　評価

１）達成度について

金属アレルギーの発症における自然免疫と抗原提示細胞の役割を明らかにした点において当初の目的を達成したと言える。

２）研究結果の学術的・国際的・社会的意義について

　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。

３）今後の展望について

金属塩＋LPS 処理 BMDC とそれにより活性化される T 細胞の体内動態を明らかにすることにより、掌蹠膿疱症のような金属暴露部位から遠く離れた部位にアレルギー症状が起こる病態の原因究明が期待できる。

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と言える。

F　結論

金属アレルギー発症には、TLR シグナリングを介した抗原提示細胞の活性化が必須であり、金属塩を処理した活性化抗原提示細胞を移入することにより、マウスに金属アレルギーを誘導できる。

G　研究発表

１）国内

口頭発表…３２件

原著論文による発表…０件

それ以外（レビュー等）の発表…０件

そのうち主なもの

論文発表

学会発表

<u>NISHIYA, Tadashi</u>：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。

２）海外

口頭発表…２件

原著論文による発表…６件

それ以外（レビュー等）の発表…１件

そのうち主なもの

論文発表

<u>Nishiya T</u>, 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.

学会発表

Nishimoto A, Lu L, Hayashi M, <u>Nishiya T</u>, 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

８　知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

１　特許取得…なし

２　実用新案登録…なし

<u>３　その他…なし</u>

厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
総合分担研究報告書

分担課題：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

分担研究者：大津　浩　東北大学大学院工学研究科　応用量子医工学分野　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分野　教授
　　　　　　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

研究要旨

1) 金属アレルギー発症の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。そこで、ICP-MS 法を用いて生体中に溶出したイオン化金属の量について検討した。マウスを用いた金属埋植モデルにおいて、炎症所見が明らかになる前に、Pd, Ag, Au などの貴金属も溶出していることが判明した。2) また、アレルギー発症の際にヒスタミンが産生されるため、ヒスタミンの産生細胞をモニターするためにその合成酵素の BAC(bacterial artificial chromosome)を使ったレポーター動物を作製している。3) マクロファージ細胞株を Ni プレートの上で培養すると、細胞の存在部位に一致して、プレート表面に金属の溶出像が見られ、組織中における金属の溶出には細胞成分が必須であることが判明した。今後、1)臨床的に良く使われる金属そのものでイオン化について測定し、2)BAC を用いたレポーターマウスやレポーターフィッシュの作製を行なう。3) 細胞が金属イオン溶出を促す機序についてさらに薬理学的に明らかにする。

A. 研究目的

１．金属アレルギーは汗、唾液などの体液によってイオン化した金属が体内に取り込まれることによって開始すると考えられている。取り込まれた金属は体内のたんぱく質と結合し、これによって生体が感作され、再び同じ金属が体内に入ってタンパク質と結合すると皮膚や粘膜を破壊することが金属アレルギーのメカニズムと考えられている。従って、溶出した金属を定量的に測定できるシステムがあると診断や重症度、治療効果、予後の判定などに大いに役立つため、工学的な機器開発を進めていこうと考えている。

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 (遠藤論文)。この遺伝子の発現制御を模倣すべく蛍光蛋白遺伝子を発現するようにトランスジェニック動物を作製し、その動物に金属アレルギーを引き起こし、蛍光発光を観察することにより、ヒスタミンの産生細胞が金属アレルギー病態において、どの段階でどの場所に存在するかについて研究する。

B. 方法

1)金属ワイアーのマウスへの植え込み実験
マウスの背部皮下に直径 0.8mm 長さ 5mm の種々の金属性のワイアーを植え込み、その後経時的にマウスを処理し、金属周辺における組織変化の観察や溶出金属イオンの測定を行なう。この際、血漿成分の漏出や組織の壊死などがおきるので、エバンスブルーによる血漿成分漏出反応の程度や、組織に対する毒性の程度を同時に観察する。本年度は Ni や Pd の植え込みを中心に観察する。また、炎症反

応の金属溶出に対する作用を明らかにするために、ワイアーの近傍にLPS(Lipopolysaccharide)を注射しその後に溶出する金属を測定した。

2)皮膚組織の溶解

溶出金属の測定のために、皮膚組織の溶解が必要である。金属を持ち込まないために、セラミック製のはさみやピンセットを用いて、皮膚を摘出後 10 倍量の濃硝酸中で加温し、H2O2 を加えてさらに過熱し皮膚組織を完全に溶解後、超純水で希釈してサンプルとした。

3)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ため急速に発展普及している。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としてとらえる方法であり感度は数 ng/g 程度である。本年度は ICP-AES 法と ICP-MS 法の特異性や感度を比較検討する。

4) レポーター動物の作製

HDC promoter 1.0kb+pZsGreen1.1 を構築し、トランスジェニックマウスを作製した。ヒスタミン産生細胞特異的な発現が得られなかったため、現在 BAC を利用したトランスジェニックマウスの作製に移行している。この目的のために BAC との相同組換えを起こすように、蛍光色素遺伝子の入った HDC 遺伝子のプラスミッドも構築中である。またトランスジェニックフィッシュも作製する予定である。

C. 研究結果

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 ICP-AES 法と ICP-MS 法を用いて比較した結果ほぼ同等の感度であった。

これまでマウス皮膚組織中に溶出する金属を測定するために金属性のはさみを用いていたが、組織を切断するだけではさみに含まれている金属が測定結果に影響することが判明したため、セラミック製の解剖器具を用いることにより解決した。マウスの正常皮膚組織では、Pd, Al, Co, Cr, Cu, V, Zr は検出されなかった。他方、Na, K, Ca, P, Mg, Zn, Fe, Mn が検出されたほか、Ti, Ni は微量ながら検出された。Pd, Co, Cr や Ni については正常皮膚での含量が低いため埋め込んだ金属からの溶出は測定可能であることが確認された。

2) 炎症反応と金属の溶出量

種々の金属ワイアーをマウス背部皮下に埋め込み、その周囲に LPS を注射することにより感染類似の炎症を誘発した時と誘発しないときで、周囲組織に溶け出す金属イオン濃度に影響がないかどうかについて解析した。Ni,Pd,および SUS316L(Stainless)ワイアーを植え込み、溶出量を検討したところ、Ni および SUS316L からの Ni イオンの溶出は LPS 刺激により増大した(図)。また、Pd の溶出量は少量であったが、LPS 刺激をすると検出される例があった。これらの実験結果から、生体内での金属イオンの溶出は炎症反応で促進されることや、本モデルを用いることによって種々の合金についても溶出金属を測定できることが判明した。

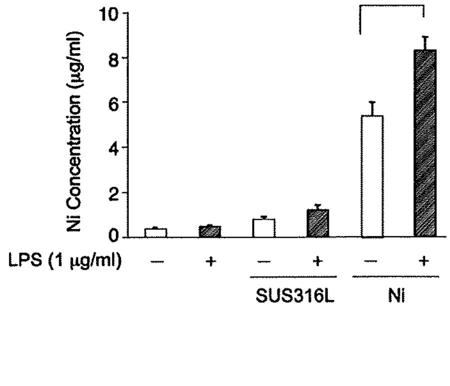


図　SUS316L ワイアーからの金属イオン溶出

3)　レポーター動物の作製について

トランスジェニックマウス

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、非特異的な部位における発光も見られるため、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．現在 BAC を用いた遺伝子導入について実験を開始した。

トランスジェニックフィッシュ

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がフィッシュは躯間部の筋組織も発光し特異性に乏しかった。現在は、コンストラクト内に 1st Intron や 5'UTR も加えることによって、生体に近い反応を起こしうるトランスジェニックフィッシュも作製中である。

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、生体内のしばしば用いられるステンレス鋼である 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。

さらに今回、金属医用材料からのイオンの溶出は生体内環境の変化（炎症の誘発）により増大することがあきらかになった。これは、金属医用材料の安全性を評価するために重要な知見であると考えられる。

今後、生体にしばしば用いられる金属を対象に、感度のより高い測定法を見つけ、どのような金属がイオン化しにくいかについて検討を進めていきたいと考えている。

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。

今後、マウスでは BAC を用いたレポーターマウスの作成を、フィッシュにおいては 1st Intron や 5'UTR を含んだプラスミッドを用いたレポーターフィッシュの作製を目指す。

E. 結論

金属の溶出は炎症環境下では促進されることが明らかになった。本実験系は金属アレルギーにおける安全な評価系であり、金属医用材料に関しても重要な生体内評価系となると考えられる。

HDC promoter によるレポーター動物の作製は非特異的な発光を示していたため、方法を変えて再度作製を開始している。

F. 研究危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1)原著論文

1. Seike M, Furuya K, Ohmura M, Watanabe K, <u>Ohtsu H</u>. Histamine H4 receptor antagonist ameliorates chronic allergic contact dermatitis induced by repeated challenge. **Allergy** in press

2. 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

3. 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

4. Anaclet 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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

9. 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

10. 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

11. Brabant C, Alleva L, Grisar T, Quertemont E, Lakaye B, Ohtsu H, Lin J-S, Jatlow P, Picciotto M, Tirelli E. The H_3 inverse agonist thioperamide potentiates cocaine-induced locomotion: role of the histaminergic system and potential pharmacokinetic effects **Psychopharmacology** 202, 673-687, 2009

12. 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

13. 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

14. 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

2)書籍

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.学会発表

1. 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. 田中里奈、五井嘉明、石原研治、上田恭介、成島尚之、大津浩、大内和雄、平澤典保。生体内における金属からのニッケル溶出の簡易測定法の確立と溶出機序の解析
日本薬学会第 129 年会（京都、2009 年 3 月 26-28 日）

H.知的財産権の出願・登録状況

該当無し

厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
総合分担研究報告書

分担課題：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

研究要旨

金属パッチテスト（PT）は、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。そこで、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した。その結果、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。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。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 発現量を測定した結果、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。つぎに、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した。しかし、その結果を追試確認する症例数の追加が少なかった。以上より、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り、今回の *in vitro* 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と結論した。

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

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は実用性の可能性はあるが、まだデータが不足している。

F. 研究危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1)原著論文

1. Yagami A, Kawai N, Kosai N, Inoue T, Suzuki K, Matsunaga K. Occupational allergic contact dermatitis due to dimethyl sulfate following sensitization from a severe acute irritant reaction to the reagent. Contact Dermatitis 2009;60:183-4.
2. Saito T, Hokimoto S, Oshima S, Noda K, Kojyo Y, Matsunaga K. Metal allergic reaction in chronic refractory in-stent restenosis. Cardiovasc Revasc Med 2009; 10:17-22.
3. Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, et al. HLA-B locus in Japanese patients with anti-epileptics and allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. Pharmacogenomics 2008;9:1617-22.
4. 田中紅，中川真実子，山北高志，松永佳世子：脱毛をきたした染毛剤による接触皮膚炎．皮膚病診療 2009;31:1303-4.
5. 安部正通，矢上晶子，中川真実子，佐野晶代，松永佳世子：HLA解析を行ったStevens-Johnson syndromeの2例．皮膚の科学 2009;8:158-63.
6. 古田加奈子，美浦麻衣子，牧浦宗彦，鈴木加余子，松永佳世子：トリルゴム手袋による接触皮膚炎の1.J Environ Dermatol Cutan Allergol 2009:3:449-58.
7. 中川真実子，矢上晶子，清水善徳，鷲見康子，鈴木加余子，松永佳世子：インプラント中の金属アレルギーによる皮膚障害が疑われた10症例の検討．J Environ Dermatol Cutan Allergol 2009:3:32-41.
8. 山北高志，清水　善徳，内藤健晴，松永佳世子：掌蹠膿疱症に対する扁桃摘出術の有効性．口咽科　2009；22：1：49-54.
9. 高山かおる，横関博雄，松永佳世子，片山一朗，相場節也，伊藤正俊，池澤善郎，足立厚子，戸倉新樹，夏秋優，古川福実，矢上晶子，幸野健，乾重樹，池澤優子，相原道子，日本皮膚科学会接触皮膚炎診療ガイドライン委員会．接触皮膚炎診療ガイドライン.日皮会誌 2009;119:1757-1793.
10.

2)総説論文

6. 松永佳世子: 扁平苔癬. 2009;8:1262-70.
7. 鶴田京子, 松永佳世子: 湿疹・皮膚炎・じんま疹　接触皮膚炎. 小児科診療 2009;72:1979-1985.
8. 松永佳世子： 接触皮膚炎. 皮膚臨床 2009:51:1323-31.
9. 松永佳世子, 矢上晶子：接触皮膚炎の臨床症状と検査.アレルギー・免疫 2009;16: 1698-1704.
10. 矢上晶子, 松永佳世子：日常品による接触皮膚炎. アレルギー・免疫　2009；16：43-48.
11. 松永佳世子：接触皮膚炎. Medicina 2010; 47:272-275.
12. 松永佳世子：アレルギー診療のスキルアップ　パッチテストの実際. Medicina 2010； 47:287-290.

2. 学会発表

国外学会

1. Kayoko Matsunga：International Workshop on Skin Safety Evaluation of Cosmetics and Chemicals: From Genetics, Alternatives and Human Testing Japanese collaboration on human patch testing. The 17th International Contact Dermatitis Symposium and the 11th Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium　Kyoto , 2009.
2. Hajime Kojima, Masafumi Iijima, Kayoko Matsunaga, Hitoshi Sasa, Hiroshi Itagaki, Yuko Okamoto, Nohiro Nishiyama, Hiroshi Onodera, Iku Mita, Jun Washida, Koichi Masuyama, Mitsuteru Masuda, Yasuo Ohno. International Workshop on Skin Safety Evaluation of Cosmetics and Chemicals: From Genetics, Alternatives and Human Testing Utilization of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug. The 17th International Contact Dermatitis Symposium and the 11th Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium Kyoto , 2009.
3. Mamiko Nakagawa, Yohinao Kato, Takaaki Yamada, Seiji Hasegawa, Kayoko Matsunaga. In vitro skin sensitization test using CD54 of human peripheral monocyte is useful to identify elicitation state of nickel allergy. The 17th International Contact Dermatitis Symposium and the 11th Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium Kyoto , 2009.

国内学会

1. 中川真実子, 山田貴亮, 長谷川靖司, 松永佳世子: ヒト末梢血中単球による感作性試験の検討.第

H.知的財産権の出願・登録状況

該当無し

貼布部位の違いによる部位別のパッチテストの結果
Hg (n=9)

番号	右上 72時間後	右上 1週間後	左上 72時間後	左上 1週間後	右下 72時間後	右下 1週間後	左下 72時間後	左下 1週間後
1			−	−	+	+		
2	+?	+	−	−				
3	+	+	−	−				
4	+	−	+	+				
5			+	+			+	−
6			+	+			+	+
7	−	−	+	+				
8			−	+			−	−
9			−	−			+	+

❖上背部と下背部に分けて貼布されていた症例数5例
そのうち上背部に反応が あった症例　3例/5例
そのうち下背部に反応が あった症例　3例/5例
❖左右に分けて貼布されていた症例数5例
そのうち右に反応があった 症例　3例/5例
そのうち左に反応のあった 症例　2例/5例

同物質のアレルゲン発売元の違いによるパッチテストの結果とNi錯体のパッチテスト結果　Ni (n=19)

番号	硫酸ニッケル(2.5%pet)(TROLAB)		硫酸ニッケル(2.5%pet)(Brial)		Ni錯体	
	72時間後	1週間後	72時間後	1週間後	72時間後	1週間後
1	+	+	+	+	−	−
2	+	+	−	−	−	+
3	+	+	−	−	+	+
4	−	−	+	+	−	−
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+
8	++	+	+	+	++	+
9	+	+	−	−	−	−
10	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+?
12	+	+	+	+	−	−
13	+	+	+	+	−	−
14	+	+	−	−	−	−
15	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	−	−
17	+	+?	+	+	−	−
18	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+

TROLABとBrial、錯体のアレルゲンに陽性
TROLABかBrialの一つのみのアレルゲンに陽性
TROLABとBrialのみに陽性(錯体陰性)
TROLABと錯体に陽性

- ❖ TROLABとBrial両方に陽性：14例/19例(73.3%)
- ❖ 3種のアレルゲンに陽性：9例/19例中(47.3%)
- ❖ TROLABもしくはBrial一つのみに陽性：3例/19例(15.1%)
- ❖ TROLABとBrialにのみ陽性(錯体陰性)：5例/19例(26.3%)
- ❖ TROLABと錯体のみ陽性(Brial陰性)：2例/19例(10.5%)

同物質の濃度の違いによるパッチテストの結果　Au (n=8)

番号	金チオ硫酸ナトリウム(0.25%pet)(TROLAB)		金チオ硫酸ナトリウム(0.5%pet)(Brial)		金チオ硫酸ナトリウム(0.25%pet)(Brial)	
	72時間後	1週間後	72時間後	1週間後	72時間後	1週間後
1	−	+	−	−	−	−
2	−	+	−	−	−	−
3	+	+	+	+	−	+
4	+	+	+	+	−	−
5	+	+	−	−	−	−
6	+	+	−	−	−	−
7	+	+	+	+	−	−
8	+	+	−	−	−	−

3つのアレルゲンが陽性
1つのアレルゲンが陽性
2つのアレルゲンが陽性

- ❖ 3種のアレルゲンに陽性：1例/8例中(45.5%)
- ❖ 2種のアレルゲンのみに陽性：5例/8例(62.5%)
- ❖ 0.5%pet濃度のアレルゲンに陽性：3例/8例(37.5%)

同物質のアレルゲン発売元と化合物の違いによるパッチテストの結果　Co (n=7)

番号	塩化コバルト(1.0%pet)(TROLAB)		硫化コバルト(1.0%pet)(Brial)		塩化コバルト(1.0%pet)(Brial)	
	72時間後	1週間後	72時間後	1週間後	72時間後	1週間後
1	+	+	++	++	−	−
2	+	+	+	+?	+?	+?
3	+	+	+	+	+?	+?
4	+	+	−	−	−	−
5	+	+	+	+	−	−
6	+	+	+	−	+	+
7	−	−	−	+	−	−

2つのアレルゲンに陽性
一つのアレルゲンに陽性

- ❖ 塩化コバルト(TROLAB)と硫化コバルト(Brial)に陽性：3例/7例(42.8%)
- ❖ 塩化コバルト(TROLAB)と塩化コバルト(Brial)に陽性：1例/7例(14.2%)

まとめ1

Ni

Brial, TROLAB共に硫酸ニッケルを使用し,2.5%petと濃度・基剤も同じであり, 陽性反応一致率は73.3%と高い値を示した。しかし15.1%の患者が一つのアレルゲンしか陽性反応を示さなかった。

Co

TROLABの塩化コバルト1%petとBrialの硫化コバルト1%petの陽性反応一致率は42.8%であったが, TROLAB社の塩化コバルト1%petとBRIAL社の塩化コバルト1%petの陽性反応一致率は14.2%であった。

Cr

Crは重クロム酸カリウム0.5%aq（鳥居薬品）,0.5%pet,(TROLAB) 硫化クロム0.5%pet(Brial), 硫化クロム酸カリウム2%aq(Brial), 塩化クロム1%pet(Brial)の4種類の化合物を貼布したが, 各化合物が同時に陽性になる症例は認めなかった。

異なる化合物と基剤の違いによるパッチテストの結果　Cr (n=8)

番号	重クロム酸カリウム(0.5%aq)(鳥居薬品)		重クロム酸カリウム(0.5%pet)(TROLAB)		硫化クロム(0.5%pet)(Brial)		硫化クロム酸カリウム(2%aq)(Brial)		塩化クロム(1%pet)(Brial)	
	72時間後	1週間後	72時間後	1週間後	72時間後	1週間後	72時間後	1週間後	72時間後	1週間後
1	−	−	+?	+	−	−	−	−	−	−
2	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
3	+	+	−	−	+?	−	−	−	−	−
4	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
5	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
6	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−
7	+	+	−	−	+?	−	−	−	−	−
8	+	+?	+	+	−	−	−	−	−	−

1つのアレルゲンのみ陽性

❖ 2つ以上のアレルゲンに陽性反応を呈した症例は認めなかった

まとめ2

Hg

Hgは鳥居薬品の塩化第二水銀0.05%aqを2ヵ所に貼布したが部位による陽性率の差はなかった。

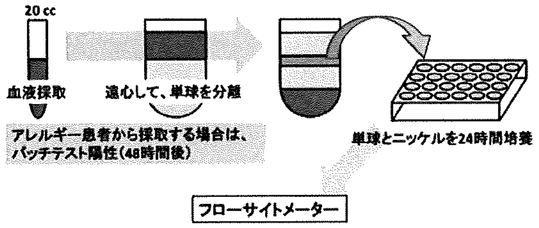
Pd

Pdは塩化パラジウム1%aq(鳥居薬品), 塩化パラジウム1%pet(TROLAB, Brial)と濃度は同じで異なる基剤, 異なる発売元のアレルゲンを貼布したが、陽性反応の数には大きな違いはなかった。しかしながら、その陽性一致率は15.3%と低い結果であった。

Au

金チオ硫酸ナトリウムの希釈濃度が異なるアレルゲンを貼布したところ, TROLABの金チオ硫酸ナトリウム0.25%petが金アレルギー患者全例で陽性反応を認めた。

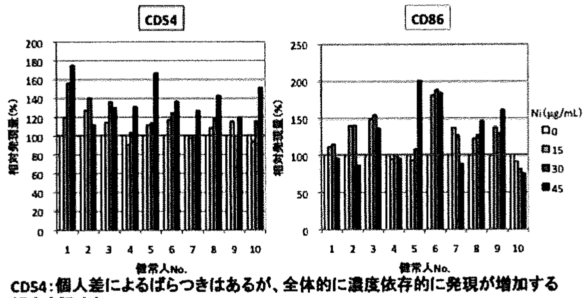
実験方法及び解析方法(ヒト末梢血単球)



細胞表面のIsotype control(ネガティブコントロール;NC)、CD54及びCD86の発現を解析

感作性物質を添加した細胞:CD54 or CD86の測定値 ― NCの測定値 / コントロールの細胞: CD54 or CD86の測定値 ― NCの測定値 ×100
= 感作性物質によって変化したCD54 or CD86の相対発現量(%)

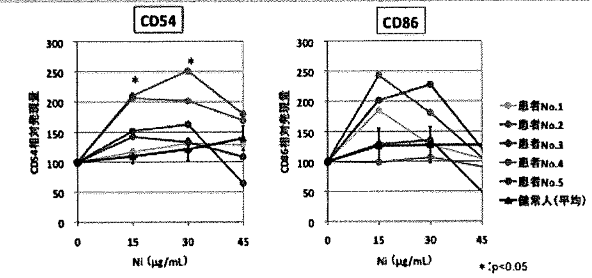
健常人におけるCD54及びCD86の発現(Ni)



CD54:個人差によるばらつきはあるが、全体的に濃度依存的に発現が増加する傾向を認めた。

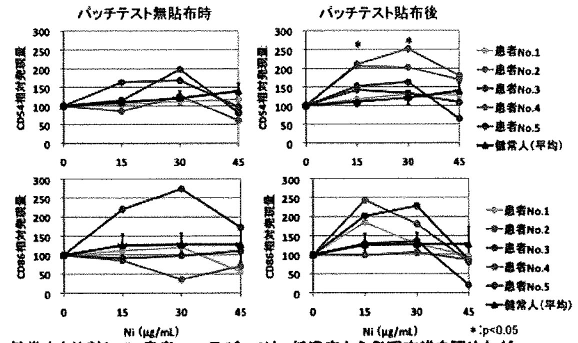
CD86:CD54と比較して、個人差によるばらつきが大きかったものの、全体的に発現の増加を認めた。ただし、発現増加を認めないものもあった(健常人No. 4、10)

Niアレルギー患者におけるCD54及びCD86の発現



Niアレルギー患者の中央値は152,162%であり、有意な差を認めた。($p<0.05$)
CD86に関しては有意な差は認めなかった。

Niアレルギー患者におけるパッチ無貼布時とパッチ貼布時の比較



健常人と比較して、患者No.3及び5では、低濃度から発現亢進を認めたが、No.1及び4では、変化がなかった。

まとめ

@ 健常人の末梢血単球において、Niを暴露させると、CD54又はCD86の発現が亢進した。

@ Niアレルギー患者のNi添加ヒト末梢血単球は、パッチテスト貼布時には健常人に比較してCD54の相対発現量は高かった($p<0.05$)。

@ しかしパッチテストを非施行時には両者の間に差はなかった。

考　察

インプラントが挿入されて皮膚症状を生じている状態は体内に金属イオンがあり、パッチテスト貼布時と同じ状態がおこっていると考えられる。

インプラント中の金属によって、アレルギー症状を惹起している状況を、患者自身の末梢血単球を用いる試験方法により、リアルタイムで直接臨床症状と関連性のある金属のアレルギーを評価できる可能性があると考えた。

厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

総合分担研究報告書

分担課題：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：　伊藤泰介　浜松医科大学皮膚科　講師
　　　　　　　瀬尾尚宏　浜松医科大学皮膚科　助教

研究要旨

金属アレルギーは，T 細胞を介する免疫反応である。金属のような低分子は，自己蛋白との結合により新たに生じたハプテン抗原として認識されると考えられているが，金アレルギー患者による我々の過去の検討から，ハプテン抗原認識以外の金属抗原認識機構の存在が推測される。金属による T 細胞反応の詳細を解析するために，我々はニッケルアレルギー患者から金属特異的 T 細胞を検討した。患者の末梢血をニッケルを添加して培養すると，反応する T 細胞の T 細胞受容体 Vβ 鎖は偏りがみられ， Vβ13.6 陽性細胞はその 35%を占めた。また，そのフェノタイプはすべてが CD4 陽性で，細胞傷害性分子であるパーフォリンの弱い発現およびグラニュライシンの強い発現を認めた。この細胞から限界希釈法によって 3 つのニッケル特異的 T 細胞クローンを樹立した。調べ得た限り，これらの細胞は皮膚親和性分子である cutaneous leukocyte antigen やケモカイン受容体の CCR4, CCR10 などを発現せず，小腸親和性分子である CCR9 を発現していた。我々の検討から，ニッケル反応性 CD4 陽性細胞がパーフォリンやグラニュライシンを発現することから，本細胞がエフェクター細胞として表皮細胞を障害する可能性がある。金属アレルギーの簡便な診断法の確立は，本症において重要な課題であるが，金属刺激によるパーフォリンまたはグラニュライシンの発現を調べることによって，新規の診断手段となる可能性がある。

A 研究目的

金属アレルギーの予防や治療を推進するためには，金属における免疫応答の詳細を明らかにする必要がある。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てきた。その結果、金反応性 T 細胞は、金が蛋白と共有結合した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。我々の発見は，金属アレルギーの機序の一部には、通常の抗原に対する T 細胞反応以外の特殊な反応様式が存在することを意味している。本研究では，ヒトの金属アレルギーにおいて，既知の金属ハプテン抗原認識反応に加え，この特殊な金属に対する T 細胞反応にも注目して解析し，金属反応性 T 細胞の特性を明らかにした上で，その機序を解明することを目的とする。

B 研究方法

金属アレルギー患者の末梢血や皮疹部から，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、限界希釈法を用いて、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 T 細胞受容体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。

(倫理面への配慮)

本研究は，浜松医科大学医の倫理委員会で倫理的側面から検討され，平成 21 年 7 月 31 日に承認を受けた(第 21-27 号)。この研究計画に基づき，被験者に対して倫理的に配慮して施行した。

C 研究結果

1)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 Vβ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%程度であった。50μM の Ni 存在下で 14 日間培養すると、ほぼすべての細胞は CD4 陽性細胞となった。両者の T 細胞受容体 Vβ鎖を調べると、培養後には Vβ1, 13.1, 13.6, 14, 17, 21.3 を発現する細胞の割合が増加した。特に Vβ13.6 陽性細胞は 35%にも達しており，偏りがあることが判明した。Ni 刺激培養後の CD4 陽性細胞は、細胞障害性分子であるパーフォリンの弱い発現とグラニュライシンの強い発現を認めた。

2)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（Vβ13.2 陽性），E11(Vβ1 陽性)および G6(Vβ13.6 陽性)の 3 個を樹立した。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、皮膚親和性と関連するケモカイン受容体の CCR4, CCR10 などの発現を認めなかったが、両者とも小腸親和性のケモカイン受容体である CCR9 の発現を認めた。

D 考察

最近，Ni 特異的制御性 T 細胞の存在が健常者において確認され，この細胞の機能不全が Ni アレルギー発症の一因であることが判明した。しかしながら，どの細胞が Ni アレルギーにおいて重要なエフェクター細胞であるかという問いに対しては、CD8 陽性細胞、CD4 陽性細胞またはその両者であると種々の報告があり、未だ結論をみていない。我々の検討では，Ni 添加後 14 日間の培養で、殆どの CD8 陽性細胞が消失し，すべて CD4 陽性細胞だけが残った。この際用いた検体は，Ni による皮膚炎の極期に採取したものであり，すでに高度に活性化していた CD8 陽性細胞が再刺激によってアポトーシスに陥ってしまった可能性は拭い得ず，CD8 陽性細胞がエフェクター細胞ではないという根拠にはならない。しかしながら，残っていた CD4 陽性細胞の約半数は、細胞障害活性を示すグラニュライシンを発現しており，結核菌などに出現する細胞傷害性 CD4 陽性細胞と同様なフェノタイプを示すことが判明した。したがって， Ni アレルギー患者においては、少なくとも Ni 刺激によって細胞障害活性を有する CD4 陽性細胞が誘導されうる新しい知見を得，そして本細胞が皮膚炎のエフェクター細胞である可能性を見出した。しかしながら、患者から樹立し得た 3 個の Ni 特異的 T 細胞クローンは，皮膚親和性分子の発現はみられず，直接皮膚炎をおこす病因細胞クローンを得ることはできなかった。一方，これらの細胞は，小腸親和性分子である CCR9 を発現していたが，その意義については不明である。

E 結論

Ni アレルギー患者には Ni 刺激によってグラニュライシンを発現する細胞傷害活性を有した CD4 陽性 T 細胞が存在し，この細胞が病因細胞である可能性がある。

<u>F. 研究危険情報</u>

<u>なし</u>

<u>G.研究発表</u>

1.論文発表

1)原著論文

1. Ito T, Ito N, <u>Hashizume H</u>, Takigawa M. Roxithromycin inhibits chemokine-induced chemotaxis of Th1 and Th2 cells but regulatory T cells. J Dermatol Sci 2009; 54: 185-91.

2. Ito T, <u>Hashizume H</u>, Takigawa M. Contact immunotherapy-induced Renbok phenomenon in a patient with alopecia areata and psoriasis vulgaris. Eur J Dermatol 2009.

3. Ito T, Fukamizu H, Ito N, Seo N, Yagi H, Takigawa M, <u>Hashizume H</u>. Roxithromycin antagonizes catagen induction in murine and human hair follicles: implication of topical roxithromycin as hair restoration reagent. Arch Dermatol Res 2009; 301: 347-55.

4. Ito T, Aoshima M, Ito N, Uchiyama I, Sakamoto K, Kawamura T, Yagi H, Hashizume H, Takigawa M. Combination therapy with oral PUVA and corticosteroid for recalcitrant alopecia areata. Arch Dermatol Res 2009; 301: 373-80.

5. Hashizume H, Aoshima M, Ito T, Seo N, Takigawa M, Yagi H. Emergence of circulating monomyeloid precursors predicts reactivation of human herpesvirus-6 in drug-induced hypersensitivity syndrome. Br J Dermatol 2009; 161: 486-8.

総説論文、書籍

1. 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

研究発表

国際学会

1. Fujiyama T, Hashizume H, Takigawa M: Stress management alleviates atopic pruritus. 5th International Workshop for the Study of Itch 25th Oct.

国内学会

1. 橋爪秀夫 紫外線と免疫　第 108 回日本皮膚科学会総会 4 月 25 日
2. 橋爪秀夫 腫瘍ペプチドを用いた経皮的免疫療法　第 25 回日本悪性腫瘍学会　5 月 22 日
3. 橋爪秀夫 重症薬疹の治療　第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会　6 月 5 日
4. 橋爪秀夫 乾癬患者の QOL とネオーラル治療 第 60 回日本皮膚科学会中部支部総会　10 月 10 日
5. 橋爪秀夫 金属による T 細胞反応　日本皮膚アレルギー学会・接触皮膚炎学会　11 月 6 日
6. 橋爪秀夫 An encounter of mono-myeloid precursors with CD4+ cells in skin initiates herpes virus reactivation in drug-induced hypersensitivity syndrome. 第 34 回日本研究皮膚科学会　12 月 5 日

H　知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

特許取得　なし。

実用新案登録　なし。

その他　なし。

厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)
総合分担研究報告書

分担課題: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

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
：椛島　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 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、外因性19名、内因性17名に種々の金属のパッチテストを実施したところ、内因性AD患者に陽性率が高く、とくに17名中9名にコバルトの陽性所見を得た。内因性ADでは外因性ADと同様に、末梢血IL-4あるいはIL-5陽性Th細胞、さらには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、何らかの非蛋白抗原、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いるが、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。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。

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。外因性ADは外来蛋白アレルゲンが原因とされ、IgEが高値であり、内因性ADはIgEが正常である。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、アレルゲン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的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、金属が原因の一重要因子と目されている。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。

B. 研究方法

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。

1) 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。

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。

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。スタンダードの濃度でパッチテスターを用いて行った。

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 を用いて行った。

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、i) リンパ球サブセット、ii) Th1、Th2、Th17 細胞割合、iii) 金属に対するリンパ球幼弱化反応を行った。

C. 研究結果

1) 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、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。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。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。

2) 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。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。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。

3) 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。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。金属パッチテスト陽性者にリンパ球幼弱化試験(LST)を行った。予備実験として金属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 では陽性反応がでやすいものの、Co は陽性反応がでにくいことが判明した。

D. 考察

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 あるいは自家感作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。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。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。

E. 評価

1) 達成度について

多くの臨床材料を要する研究であったが、当初の達成が得られた。

2) 研究成果の学術的·国際的·社会的意義について

AD 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。

3) 今後の展望について

なお継続中の事項が多々有り今後のさらなる研究を要する。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。

4) 研究内容の効率性について

産業医科大学皮膚科学教室内に 3 種類のグループを構成して行い、かつ各グループが有機的に補助し合うことで効率性を高めた。

F. 結論

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、金属アレルギーが関わっていることが示された。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、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ある。

G.研究発表

1) 国内

口頭発表　5 件

原著論文による発表　5 件

それ以外（レビュー等）の発表　5 件

そのうち主なもの

論文発表

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.

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.

学会発表

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

戸倉新樹：Th17 細胞と皮膚疾患．第 73 回日本皮膚科学会東部支部総会 2007. 9. 26. 甲府市

2) 海外

口頭発表　10 件

原著論文による発表　20 件

それ以外（レビュー等）の発表　2 件

そのうち主なもの

論文発表

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).

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.

Nishio D, Nakashima D, Mori T, Kabashima K, Tokura Y : Induction of eosinophil-infiltrating drug eruption in mice. J Dermtol Sci 55 : 34-39, 2009.

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).

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.

学会発表

Tokura Y : Th17 cells in skin diseases. Annual Meeting of Taiwanese Dermatological Association, Kaohsiung, 2009.

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.

Yoshiki R, Kabashima K, Sugita K, Nakamura M, Tokura Y: Local UVB-induced immunosuppression is mediated by IL-10-produing and OX40L-positive mature Langerhans cells. The 39th European Society for Dermatological Research Annual Meeting, Budapest, 2009.

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

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：　椛島　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($NiSO_4$, $NiCl_2$, $MnCl_2$, $CrCl_3$, $K_2Cr_2O_7$ などを 1, 10, 100 μM の濃度にて)と混合培養（$1x10^5$ 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)。また、制御性 T 細胞を CD25-beads や IL-10 等の中和抗体により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（0.5-5μM）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。

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。

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、等のより簡便な系を開発する必要があると考える。

E. 評価

1)達成度について

パッチテストの代替法を確立し、さらに、感度を向上させることにも成功した。従って目的は十分達成されたと考える。

2)研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

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。

3)今後の展望について

パッチテストに代わる安全な診断検査の基盤ができたが、感度の点でパッチテストに劣ることが問題点として残る。今後、特異性の検討と健常コントロール例を増やして検討すること、制御性T細胞の機能を効率的に制御する内在性のタンパクを供給しより皮膚と近い状態でのin vitro環境を提供するなどにより、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。

4)研究内容の効率性について

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。

F. 結論

アレルギーの診断法としてパッチテストは
アレルギー性接触皮膚炎の臨床症状を呈する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は、LTTアッセイによるNi, Feに対する特異的T細胞の増殖反応が検出可能であることが示された。

G.研究発表

1)国内

口頭発表	31件
原著論文による発表	29件
それ以外の発表	7件

そのうち主なもの

学会発表

椛島健治
「皮膚アレルギーの新しい知見と臨床応用の可能性について 第38回 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学術大会　大阪、2008年11月

椛島健治
「IL-17とTh2型免疫応答」シンポジウム
第38回 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学術大会　大阪、2008年11月

椛島健治
「接触皮膚炎と樹状細胞」
第３４６回　日本皮膚科学会　福岡地方会　北九州　2008年9月

2)海外

口頭発表	16件
原著論文による発表	79件
それ以外の発表	3件

そのうち主なもの

論文発表

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)

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