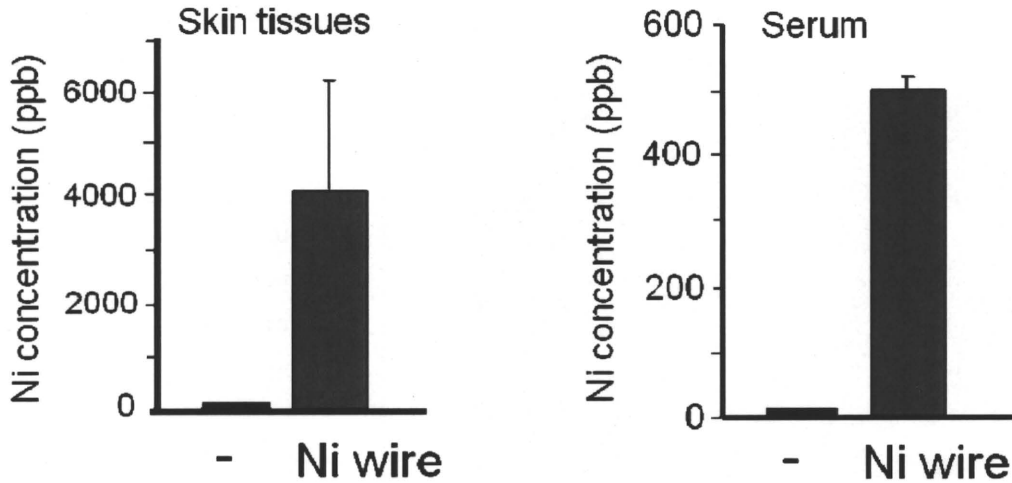


図 1

Three days after the implantation of a Ni wire

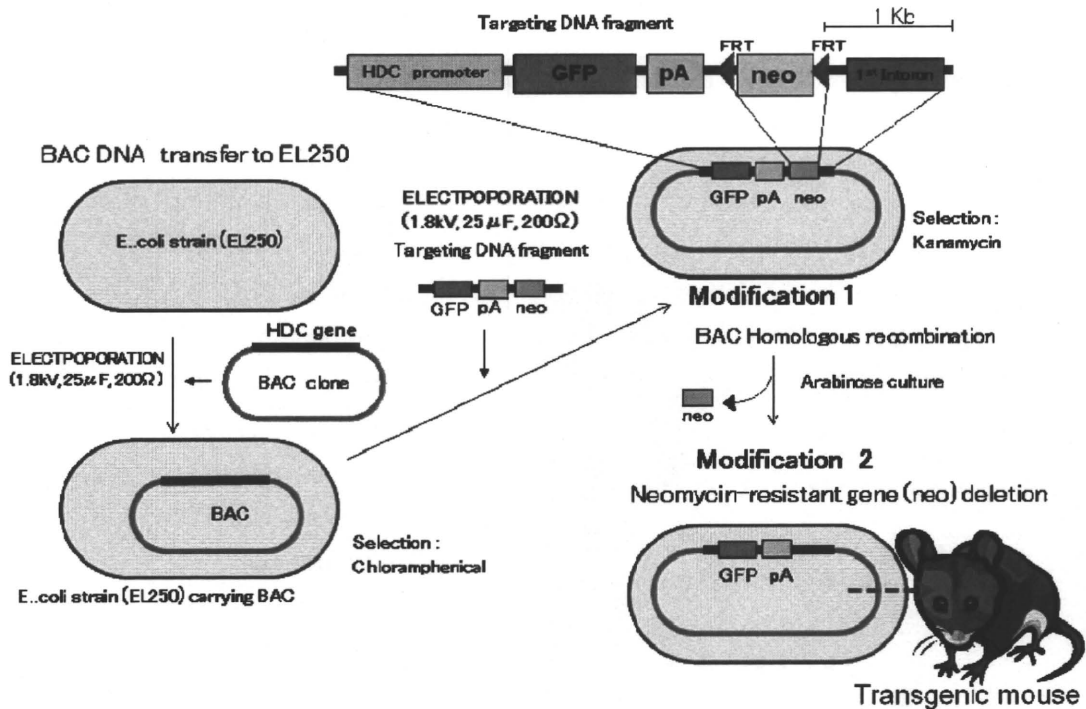


ニッケルワイアーをマウス背部皮下に植え込み3日後の皮膚、血清中のニッケルイオン濃度

図 2

BAC DNA modification

BAC Homologous recombination and Neomycin-resistant gene (neo) deletion

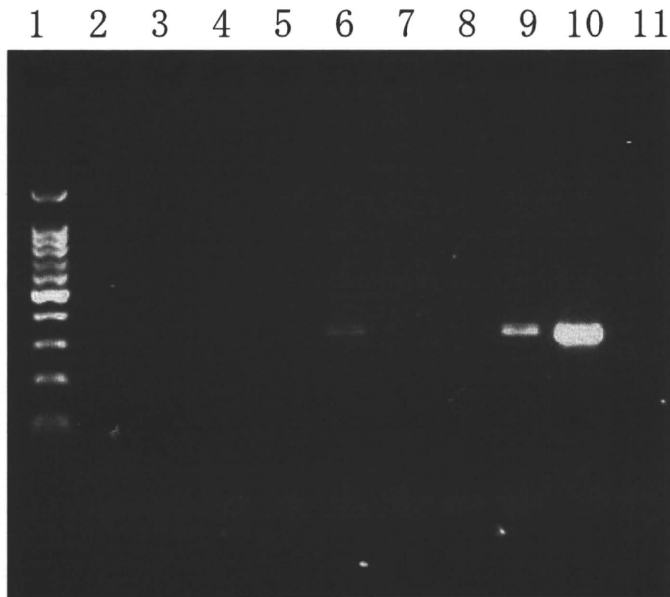


BAC を用いた HDC 転写レポーターマウスの作製過程

図3 transgenic mouse における GFP gene の確認(6, 9 が陽性)

Primer GFP- S (AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACC)

Primer GFP- A S (TGCCGTCGTCCTTGAAGAAGATG)

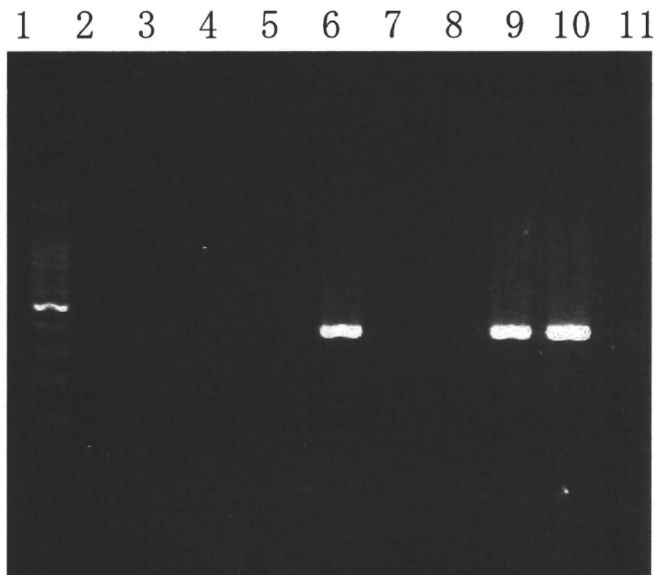


- 1. 100bp DNA Ladder
 - 2. mouse No. 565
 - 3. mouse No. 566
 - 4. mouse No. 567
 - 5. mouse No. 568
 - 6. mouse No. 569
 - 7. mouse No. 570
 - 8. mouse No. 571
 - 9. mouse No. 572
 - 10. transgene
 - 11. negative control
- 2% agarose gel

図4 transgenic mouse における Chloramphenicol resistant gene の確認(6,9 が陽性)

Primer CAT2 (CAGTCAGTTGCTCAATGTACC)

Primer CAT3 (ACTGGTGAA ACTCACCCA)



- 1. 100bp DNA Ladder
 - 2. mouse No. 565
 - 3. mouse No. 566
 - 4. mouse No. 567
 - 5. mouse No. 568
 - 6. mouse No. 569
 - 7. mouse No. 570
 - 8. mouse No. 571
 - 9. mouse No. 572
 - 10. transgene
 - 11. negative control
- 2% agarose gel

分担課題：金属の溶出評価と金属アレルギーへの進展機構の解析

分担研究者：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

研究要旨

金属アレルギー発症の最初のステップとして、金属イオン化の溶出がある。筆者らは、マウスを用いた金属線埋入モデルにおいて溶出した金属の濃度を定量的に測定できるシステムを構築した。本研究では本モデルを活用し、ニッケル線あるいはステンレス SUS316L からのニッケル溶出が、感染等による炎症反応、あるいはニッケルに対するアレルギーによって増大するかどうか解析した。ニッケル線あるいは SUS316L 線をマウス背部皮下に埋入するとともに、lipopolysaccharide 1 μ g をその周辺に注射すると、いずれの場合もニッケル溶出が増大した。また、ニッケル線で感作したマウスに SUS316L を埋入した場合においてもニッケルの溶出が増大した。これらの結果は、医用材料からのニッケル溶出は、炎症反応やアレルギーによって増大することが想定され、安全性を評価する上で重要な知見である。また、医用材料からのニッケルの溶出抑制が新しい金属アレルギー防止薬になる可能性も示唆された。一方、アトピー性皮膚炎患者の汗中にニッケルが高い値を示す患者がおり、生体試料中のニッケルを測定することの意義が示された。

A. 研究目的

近年、医工学の進歩により、人工骨やステントなど金属を含む医用材料により構築された人造物が体内に埋植されることが増えてきている。これらに用いられる医用材料としてはニッケル含量が低く、また表面が酸化皮膜で覆われることによりニッケルイオンの溶出も少ない物が用いられている。しかし、まれに、金属アレルギーの患者に重篤なアレルギー症状を誘発することがある。また、これらの医療機器を体内に埋入する場合に感染が生じる場合がある。そのような場合では金属溶出が増加する可能性が考えられているが、その定量的な解析はなされていない。筆者らは金属アレルギー誘発の第一段階は金属の溶出にあると考え、種々金属材料からのニッケルなど金属イオンの溶出を *in vivo* で、定量的に解析する系を確立し、医療材料からの金属溶出を評価するとともに、金属溶出の制御機構を解析した。すなわち、私たちは、マウスの背部皮下に直径 0.8-1 mm のニッケル線あるいは合金線(長さ 5mm) を埋入するモデルを作成し、ニッケルの溶出と誘発される炎症・

アレルギーの定量的解析を可能にした。本年度は、本モデルを応用し、実際に医療に用いられている医用材料からのニッケル溶出が炎症反応の誘発により増大されるか、またニッケルで感作された場合において、ニッケルの溶出が増大するかについて解析した。

B. 方法

1) 金属線の埋入と炎症反応の惹起

C57BL/6 マウス (雄性、6 wks)の背部皮下にニッケル線 (直径 0.8 mm、長さ 5 mm)、あるいはステンレス(stainless SUS316L)線 (直径 1 mm、長さ 5 mm) を埋入し、直ちにその近傍に LPS (lipopolysaccharide; 1 μ g/ 20 μ l saline)を注射した。72 時間後、周囲組織を採取した。

2) ニッケル線による感作と stainless 線の埋入

マウスの後肢付根付近の皮下にニッケル線を埋入して感作した。10 日後、背部皮下に stainlessSUS316L 線を埋入し、その 72 時間後に stainless 周囲組織を採取した。またこのとき脾臓を摘出し、重量を測定した。

3) ニッケルの測定

採取した組織を一定量の水中でホモジナイズし、抽出されたニッケルイオン濃度を Newportgreen を用いて蛍光法により定量した。本方法は ICP-AES で測定した値と高い相関を示すことを確認している。また、採取した皮膚組織を硝酸-過酸化水素法で溶解し、ニッケル濃度を ICP-MS 法を用いて精密に測定した。

4) ニッケル受容体発現細胞の解析

得られた脾臓細胞を $1\ \mu\text{M}$ のニッケル溶液中で 5 分間インキュベートして、ニッケルを結合させたのり、Newport green $1\ \mu\text{M}$ 中で 5 分間インキュベートしたのち、FACSscan でニッケル結合量を解析した。

5) アトピー患者の汗中のニッケル濃度の測定

アトピー患者から得られた汗 0.5 ml を硝酸で 5 ml とし、汗に含まれるニッケル、コバルト、クロムを ICP-MS で測定した。

C. 研究結果

1) LPS 炎症反応によるニッケル溶出の増大

ニッケル線埋入直後にその近傍に LPS ($1\ \mu\text{g}$) を注射し、その後経時的に組織へのニッケル溶出を定量した (図 1)。ニッケル線を埋入すると、経時的なニッケルイオンの溶出が生じ、組織中のニッケル濃度が増大する。さらに、感染による炎症反応を模倣する LPS を注入することにより、埋入したニッケル線の周囲で急性炎症を誘発すると、組織中のニッケル濃度はさらに高くなり、炎症反応を誘発するとニッケルイオンの溶出が増大することが明らかになった (図 1)。

2) LPS 炎症反応による stainless SUS316L からのニッケル溶出増大

1. と同様に SUS316L 線を埋入直後に、その近傍に LPS ($1\ \mu\text{g}$) を注射し、LPS 炎症によるニッケルイオンの溶出の増大が起きるかどうかが解析した (図 1)。ニッケル線に比べて SUS316L 線を埋入しても、ニッケルイオンの溶出は極めてわずかであったが、LPS 炎症を誘発することにより、ニッケルイオンの溶出が増大した (図 2)。

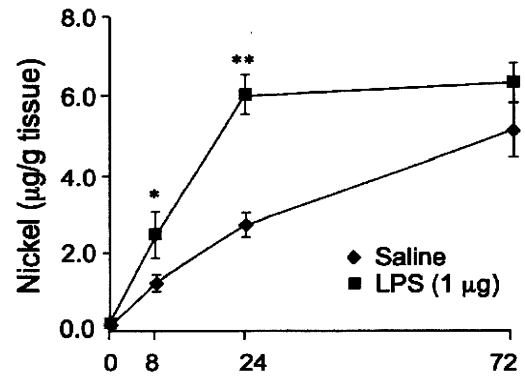


図 1. LPS によるニッケル線からのニッケル溶出増大の経時変化

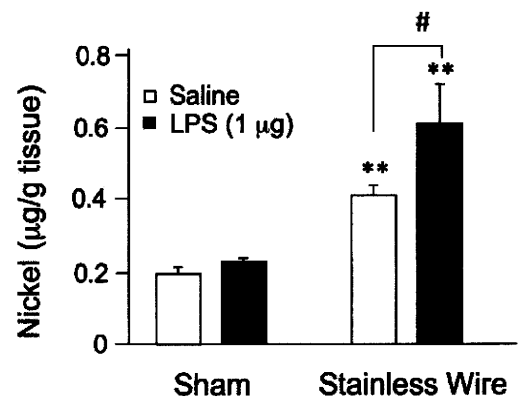


図 2. SUS316L からのニッケル溶出の LPS 炎症による増大

3) ニッケル感作による SUS316L からのニッケル溶出量の増大

ニッケル線を後肢付け根付近の皮下に埋入し、その 10 日目には脾臓の重量が増大し、免疫系が活性化していることが推定された。そこでニッケル線を埋入後 10 日目に SUS316L 線を背部皮下に埋入し、3 日後にニッケルイオンの溶出を評価した。その結果、ニッケル線を埋入して 10 日目では、感作に用いたニッケル線から溶出したニッケルイオンが組織中のニッケル濃度を増加させていること、さらにニッケル線で感作したマウスに SUS316L 線を埋入すると、ニッケルイオンの溶出が増加することが明らかになった (図 3)。

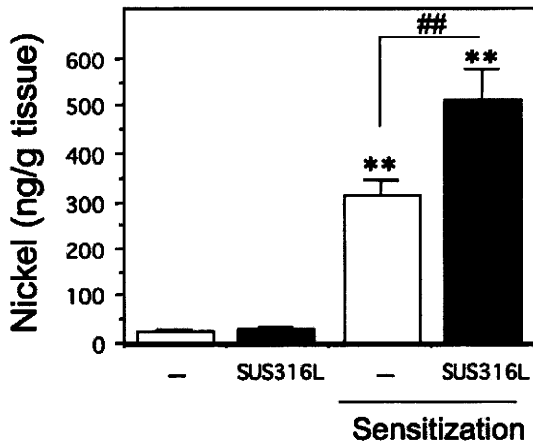


図3. ニッケル線を用いて感作したことによる SUS316L からのニッケル溶出の増大

4) ニッケル感作による脾臓中のニッケル応答細胞の増加

ニッケル線を埋入後 10 日目の脾臓細胞中のニッケル結合細胞を Newport Green を用いた FACSscan 法で解析したところ、感作により明らかな増加が認められた。今後、ニッケルイオンに応答して産生されるサイトカインについて検討する予定である。

5) アトピー性皮膚炎患者の汗中のニッケル量の測定

アトピー性皮膚炎患者には外来性の抗原に対して誘発される症例と内因性の原因物質による症例があることが明らかにされている。産業医大の戸倉先生、神戸大学尾藤先生との共同研究により、アトピー性皮膚炎患者の汗中のニッケル、クロム、コバルト濃度を ICP-MS で測定した。その結果、内因性アトピー性皮膚炎患者と考えられる場合に、汗中のニッケル濃度が高い患者がみられ、金属アレルギーである可能性が示唆された。現在さらに多くの患者について解析を進めている。

E. 結論

ニッケル線はもとより、従来「安全」と言われる金属性医用材料にもニッケルが溶出され、感染等の炎症反応によりさらに増大することが明らかになった。また、ニッケルで感作された場合においてニッケルの溶出が増大

することから、金属アレルギーの患者では、溶出した金属イオンに対して高反応性を示すだけでなく、金属イオンの溶出そのものも増大していることが示唆された。

筆者らはすでに、in vitro においてもマクロファージが LPS で刺激されるとニッケルの溶出を促進し、その機序として V-ATPase、 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger 等のプロトン輸送系が関与していることを示唆するデータを得ている（文献 1）。これらのことから、金属アレルギーを薬物により根治することは難しいものの、金属の溶出を薬物により抑制することは可能であると考えられる。

また、医用材料からのニッケル溶出は特に感作した状態、あるいは炎症反応が生じている状態ではさらに溶出が増大するという知見は、今後新規な医用材料を開発していく上で極めて重要な発見である。

一方、アトピー性皮膚炎患者の汗中のニッケル濃度が高値を示す場合があるなど、金属アレルギーが生じているかどうか、またその危険性があるかどうか、生体試料中の溶出したニッケル等金属イオンの測定は臨床的にも重要であると考えられる。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

- Enhancement of nickel elution by lipopolysaccharide-induced inflammation. Tanaka, R., Goi, Y., Ishihara, K., Ueda, K., Narushima, T., Ohtsu, H., Hiratsuka, M., Hirasawa, N. *J. Derm. Sci.* (in press)
- Assessment of the release of nickel from biomaterials in vivo and in vitro: enhancement by lipopolysaccharide. Tanaka, R., Goi, Y., Ishihara, K., Ueda, K., Narushima, T., Ohtsu, H., Ohuchi, K., Hiratsuka, M., Hirasawa, N. *Inflam. Regene.* (in press)
- Induction of thymic stromal lymphopoietin

by chemical compounds in vivo and exacerbation of allergy. Sato, N., Ishihara, K., Hiratsuka, M., Hirasawa, N. *Inflam. Regene.* (in press)

4. Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutations. Ishihara, K., Okuyama, S., Kumano, S., Iida, K., Hamana, H., Murakoshi, M., Kobayashi, T., Usami, S., Ikeda, K., Haga, Y., Tsumoto, K., Nakamura, H., Hirasawa, N., Wada, H. *Hearing Research* 270: 110-118 (2010)
5. Kinetic of 6-thioxanthine metabolism by allelic variants of xanthine oxidase. Kudo, M., Sasaki, T., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Drug Metabo. Pharmacokinet.* 25: 361-366 (2010)
6. Functional characterization of genetic polymorphisms identified in the promoter region of the xanthine oxidase gene. Kudo, M., Sasaki, S., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Drug Metabo. Pharmacokinet.* 25: 599-604 (2010)
7. Functional characterization of 26 CYP2B6 allelic variants (CYP2B6.2-CYP2B6.28, except CYP2B6.22). Watanabe, T., Sakuyama, K., Sasaki, T., Ishii, Y., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Pharmacogenet. Genom.* 20: 459-462 (2010)
8. Involvement of prostaglandins and histamine in Nickel wire-induced acute inflammation in mice. Hirasawa, N., Goi Y., Tanaka, R., Ishihara, K., Ohtsu, H., Ohuchi, K. *J. Biomedical Materials Research Part* 93A: 1306-1311 (2010)

2) 総説

増悪化アレルギー性皮膚炎症におけるヒスタミンの役割. 平澤典保、大内和雄、YAKUGAKU ZASSHI 131: 179-184 (2011)

2.学会発表

1) 国際学会

1. An exacerbated allergic dermatitis model in mice and participation of histamine. Hirasawa, N. 2010 International Symposium on New Drug

Development (Cheondju, Korea, Nov. 17, 2010)

2) 招待講演、シンポジウム

1. 平澤典保

マスト細胞とTSLP

シンポジウム「秋の夜長とマストセル」

第14回日本ヒスタミン学会 (2010年10月24-25日、川崎)

2. 平澤典保

ステロイド薬の基礎

シンポジウム「アレルギー疾患の薬物治療に役立つ基礎薬理学」

第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2010年5月9-10日、京都)

3. 平澤典保

増悪化アレルギー性皮膚炎症におけるヒスタミンの役割

シンポジウム「アレルギー疾患におけるヒスタミン研究の新展開」第130年会日本薬学会 (2010年3月28-30日、岡山)

3) 一般講演

6. 田巻佑一郎、新井富生、椛村春彦、佐々木崇光、平澤典保、平塚真弘

薬物代謝酵素遺伝子多型と肺がんリスクとの関連 第49回日本薬学会東北支部大会 (2010年10月24日、郡山)

2. 青島有佑、上田恭介、大津浩、成島尚之、小笠原康悦、平澤典保

金属系材料のマウス皮下における腐食挙動 日本金属学会 第147回大会 (2010年秋期) (2010年9月25~27日、札幌)

3. 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

特願 2010-146262 TSLP を恒常的に高発現する細胞、および前期細胞を利用した TSLP 調節剤のスクリーニング方

分担課題：金属パッチテストを用いた金属アレルギー診断方法確立とその教育

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
研究協力者 矢上 晶子 藤田保健衛生大学 医学部 皮膚科学 講師
伊佐見真実子 藤田保健衛生大学 医学部 皮膚科学 助教
安部 正通 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 皮膚科学 研究生
柘植 郁哉 藤田保健衛生大学 医学部 小児科学 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

金属アレルギー診断において、パッチテスト (PT) より確実で安全な方法は他にない。しかし、これを精度よく施行し治療と生活指導に役立てるには検討すべきことが多い。平成 22 年度の研究の目的を以下のように設定した。

1. 金属アレルギー診断のための金属の PT の精度をあげる診断方法を検討する。
2. 金属 PT の方法を用いた金属アレルギー診断方法を皮膚科医に教育する方策を検討する。
3. 金属アレルギーが関与する疾患のうち、齒

科医師と皮膚科医が連携すべき歯科金属アレルギーの診断方法を確立するための方策を検討する。

B. 方法

1. 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. 皮膚科医師に金属アレルギー診断方法を教育するワークショップ (WS) を行い、その教育効果を評価する。
3. 歯科医師と皮膚科医師の合同WSを開催し、

連携に必要な知識、資料、技術をリストし、これを教育するWSを行い、その教育効果を評価する。

C. 結果とD. 考察

1. 金属PTの陽性反応は1週間後も持続し72時間より遅く発現する場合もみられた。金属の試料によって、陽性率には差があり、一致率はNiが最も高く84%、Co 36%、Cr、Pd、Auではさらに低い結果であった。Auの陽性率は試料のなかの金属塩の結晶の小さいものが高かった。2. 金属アレルギーの機序を講義し、金属の用途、皮膚や粘膜との接触とイオン化、PT試料と入手方法、PTユニットの選択と理由、PTの試料の添付量、貼布方法、判定方法をWS形式で教育した。教育の評価は当日のプレテストとポストテストで評価し良好な結果を得た。

3. 歯科医師と皮膚科医師合同のWSを開催し、紹介状のテンプレートを作成した。お互いに必要としている知識を整理した。PTの試料の不足、知識の不足、イオン溶出検査機器の不足などが問題点としてあげられた。WSによってお互いを知り、信頼を深め、問題点を共有することは重要と考えた。

E. 結論

1. 金属PTの判定は1週間後がミニマムである。金属PTの陽性率が試料のなかの結晶の大きさによって異なることが示唆されたので、ワセリン基剤の試料のすべてを検討する必要がある。試料がどの程度経皮吸収されるのか、ヒト角層とPTユニットに残存した金属を定量する。金属PT試料の適正について、市販診断薬の再検討を行う予定である。

2. 皮膚科医師の教育WS・セミナーを全国規模で行う。

3. 歯科医師と皮膚科医師の連携WSをさらに拡大する。

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, Kojoyo 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

1. 松永佳世子: 扁平苔癬. 2009;8:1262-70.
2. 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.
3. 松永佳世子: 接触皮膚炎. 皮膚臨床 2009;51:1323-31.
4. 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.
5. 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.
6. 松永佳世子: 接触皮膚炎. Medicina 2010; 47:272-275.
7. 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 Matsunaga: 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

103. 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

分担課題：ヒト金属アレルギーの成立に関わる T 細胞規定因子の探索

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： 秦 まき 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。我々はニッケル(Ni)アレルギー患者から金属特異的 T 細胞クローンまたはラインを樹立し、その特性を解析することによって、金属アレルギー発症の T 細胞側の要因を分析した。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 V β 鎖は偏りがみられ、V β 13.6 陽性細胞が約 4 割に達するほどの増殖をみせることを以前報告したが、限界希釈法によって得られた 8 つのニッケル特異的 T 細胞クローンまたはラインのうち V β 13 を使用するものは 6 個であった。また、これらの細胞のうちの 6 つのクローンが発現するケモカイン受容体を解析したところ、CCR4、CCR7、CCR9、CXCR4、CXCR6 が発現していた。CCR9 は腸親和性のケモカイン受容体であり、ヒトにおいて Ni は食事から 300 μ g/日程度摂取され、常に腸管上皮は Ni に暴露されることから、これらの細胞は腸管において Ni に対する何らかの免疫応答が惹起されていると考えられる。また、これらの細胞の中の 3 個に関してサイトカイン産生を cytokine beads assay 法によって調べたところ、これらは Th0 型および Th2 型サイトカインを産生することが判明した。

我々の結果は、Ni 反応性 T 細胞がおそらくハプロタイプに関与せずに特定の T 細胞受容体 V β 鎖を高頻度が発現させていることから、過去に報告した金反応性 T 細胞と同様に、ハプテン抗原認識以外の金属抗原認識機構の存在を強く推測させる。また、ケモカイン受容体発現解析から、Ni 反応性 T 細胞の共通した臓器親和性が想像される。

A 研究目的

金属に対する免疫応答を規定する因子の解明は、金属アレルギーの本質に迫るテーマである。我々は、金アレルギーおよびニッケルアレルギーの患者末梢血から金属反応性 T 細胞を樹立してきた。この細胞の詳細に検討することによって、金属反応性の T 細胞の条件を調べることは、免疫応答を規定する条件を探索する上で有用な戦略と考えられる。これまでの結果から、金またはニッケルなどの金属反応性 T 細胞は使用する T 細胞受容体に偏りがあること、また表皮親和性を示すケモカインレセプターを発現すること、さらに、腸親和性を示す CCR9 の発現も比較的高頻度に見られることが判明している。さらに、本研究を進め、ニッケルなどの金属アレルギー患者からより多くの金属反応性 T 細胞を解析することによってこれまでの結果を検証し、金属アレルギー成立における金属反応性 T 細胞および金属特異的制御性 T 細胞との関連を明らかにし、金属に対する免疫応答性を規定する因子を明らかにすることを目的と

する。

B 研究方法

金属アレルギー患者の末梢血から、単核細胞を調整し、感作金属添加培養後、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から、金属反応性 T 細胞における特性を明らかにする。

(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 2 名から末梢血を採取して、Ni 刺激培養後の限界希釈法によって Ni 特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンまたはラインを

樹立した。これらの細胞のクローナリティを調べるために、T細胞受容体Vβ鎖をこれに対する抗体を用いてフローサイトメーター解析した(表1)。

表1. T細胞受容体Vβ鎖の発現

Patient	T細胞	CD4	CD8
TY	D11	13.2	-
	E11	1	-
	G6	13.6	-
KW	E3	2/3	-
	E4	13.6	-
	E6	2/13.1	1
	F1	13.1	-
	F7	13.1	-

2人の患者から得られた8個のクローン/ラインのうち、殆どがCD4陽性であり、そのうちVβ13を持つものは6個であった。また、CD8陽性細胞はE6のラインに含まれ、Vβ1を発現していた。

2) 樹立したのうち6つのクローン(D11, E11, G6, E4, F1, F7)についてケモカイン受容体の発現を解析した(図1)。

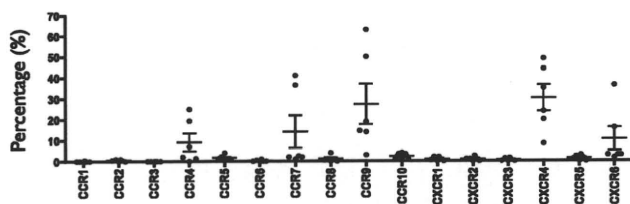


図1. ケモカイン受容体の発現。

これらの細胞は発現の程度の差はあるが、ほぼ同様のケモカイン受容体の発現プロファイルを示していた。すなわち、CCR4、CCR7、CCR9、CXCR4、CXCR6の発現がみられた。

3) これらの細胞の種々のサイトカイン産生量をCytokine Beads Assay法によって調べた(図2)。E4、F1、F7の3つのクローンについて抗CD3抗体による刺激後、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF-α、IFN-γ、IL-17の産生量を調べたところ、E4およびF7ではIL-4とTNF-αおよびIFN-γの産生がみられTh0型のサイトカイン産生パターンを示すのに対し、F1ではIL-4の産生能が高く、TNF-αおよびIFN-γの産生はあまりみられず、Th2型のパターンであった。

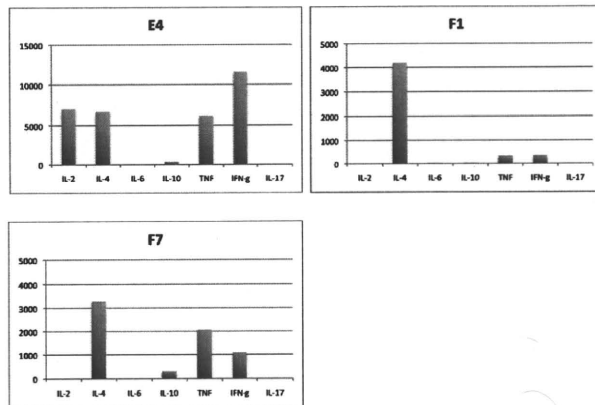


図2. Ni反応性T細胞クローンのサイトカイン産生プロファイル。数字はサイトカイン濃度(pg/ml)。

D 考察

前年度の研究結果に加え、新しいNiアレルギー患者からNi反応性T細胞を樹立し、その特性の一部を明らかにし得た。すなわち、本方法で樹立しえたT細胞はCD4陽性細胞が多く、しかもT細胞受容体Vβ13を発現するものが多数であった。またVβ1やVβ2を発現する細胞も複数みられた。この結果は同様な方法で解析したWarfel (J Invest Dermatol 1997)やSilvennoinen-Kassinen (Sand J Immunol 1998)らの結果とほぼ一致する。複数における同一のT細胞受容体Vβ鎖の高頻度の使用から、Niの抗原認識においては、少なくともHLAハプロタイプに依存しないものが存在し、しかもVβ13に親和性をもつと考えられる。これはこれまでNiアレルギーの抗原認識として報告されているNiのMHC内のヒスチジンに結合することによって生じるハプテン抗原認識とは全く異なる様式で、我々がすでに金反応性T細胞でも見出しているMHCに厳格に拘束されない(promiscuousな)金属抗原の認識と同様のものであり(Hashizume et al, J Immunol 2008)、金属抗原認識における特殊性を暗示する。また、ケモカイン受容体において共通性がみられ、中でもCCR9の発現は比較的高頻度にみられ、特徴的な所見と考えられる。Niは食物から吸収されることから、常に消化管を場とする免疫反応の存在を意味しているのかもしれない。サイトカイン産生に関してはまだデータの蓄積が充分ではないが、Th0型/Th2型サイトカイン産生がみられることも、従来の報告と一致していた。

より詳細な検討によって、さらにNi反応性T細胞の特徴が明らかになれば、Ni反応におけるT細胞側の規定因子が解明されると期待される。

E 結論

Ni 反応性 T 細胞の多くは CD4 陽性、Vβ 13 陽性で、CCR4 および CCR9、CXCR4 を発現している。

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. 藤山俊晴, 渡邊佑子, 橋爪秀夫. 【薬疹・2010】臨床例 皮膚浸潤 CD4 陽性細胞中に HHV-6 抗原を証明しえた drug-induced hypersensitivity syndrome(DIHS). 皮膚病診療 32 巻 8 号:891-94, 2010.
2. 川村哲也, 山本真由美, 藤山俊晴, 伊藤泰介, 橋爪秀夫, 深水秀一. 術後 15 年後に発症した悪性黒色腫. 臨床皮膚科 64 巻 12 号 951-955, 2010.
3. 金林純子, 梶田和美, 橋爪秀夫. スポロトリコーシスの 1 例 Visual Dermatology 10 巻 1 号: 74-75, 2011.
4. Hashizume H, Hansen A, Poulsen LK, Thomsen AR, Takigawa M, Thestrup-Pedersen K. In vitro propagation and dynamics of T cells from skin biopsies by methods using interleukins-2 and -4 or anti-CD3/CD28 antibody-coated microbeads. *Acta Derm Venereol* 90:468-73, 2010.
5. Ito T, Hashizume H, Takigawa M. Contact immunotherapy-induced Renbok phenomenon in a patient with alopecia areata and psoriasis vulgaris. *Eur J Dermatol* 20:126-7, 2010.
6. Suda T, Kono M, Nakamura Y, Enomoto N, Kaida Y, Fujisawa T, Imokawa S, Yasuda K, Hashizume H, Yokomura K, Toyoshima M, Koshimizu N, Suganuma H, Shirai T, Hashimoto D, Inui N, Colby TV, Chida K. Distinct prognosis of idiopathic nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) fulfilling criteria for undifferentiated connective tissue disease (UCTD). *Respir Med* 104:1527-1534, 2010.

2) 総説論文

1. 古川福実, 伊豆邦夫, 橋爪秀夫. 【小児の発疹の診かた】川崎病にみられる発疹. 小児内科 42 巻 1 号:93-98, 2010. 橋爪秀夫.
2. 橋爪秀夫. 【薬剤アレルギーの診断と治療の進歩】重症薬疹の治療. 臨床免疫・アレルギー科 53 巻 3 号:292-300, 2010.
3. 橋爪秀夫. 薬疹はどうして起こるか 薬疹発症メカニズムの不思議. *Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology* 4 巻 2 号:67-75, 2010.
4. 橋爪秀夫. *derm@tology* モルトリンフォーマ. 皮膚アレルギーフロンティア 8 巻 2 号:128, 2010.

3)書籍

4. 橋爪秀夫. 皮膚悪性リンパ腫. 山口徹, 福井次矢, 北原光夫(編) 今日の治療指針 2011 医学書院 東京, 2011 年
5. 橋爪秀夫. 湿疹(アトピー性皮膚炎・接触皮膚炎). 泉 孝英(編) ガイドライン外来診療 2010 日経メディカル開発 東京, 2010 年
6. 橋爪秀夫. 貨幣状湿疹, 自家感作性皮膚炎. 瀧川 雅浩, 渡辺 晋一(編) 皮膚疾患最新の治療 2011-2012 南江堂 東京, 2011 年

2.学会発表

国内発表

1. 橋爪秀夫: 薬疹の検査指針とその読み方 第 109 回日本皮膚科学会総会, 大阪, 平成 22 年 4 月 17 日
2. 橋爪秀夫, 小豆澤宏明: 薬疹に関する情報収集および提供を目的とした網羅的な情報データベースの構築 第 40 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 広島, 平成 22 年 12 月 10 日.
3. 伊藤泰介, 金林純子, 秦まき, 橋爪秀夫: 膿疱性乾癬患者に対するインフリキシマブ投与において生じた infusion reaction の 1 例 第 25 回日本乾癬学会学術大会 宇部, 平成 22 年 9 月 4 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。

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 浜松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 助教

: 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) のメカニズムは複雑であるが、通常の皮膚バリア異常に基づく外因性 AD だけではなく、内因性のもも存在する。内因性 AD は、血中 IgE が正常域であり、皮膚バリアが正常で外因性 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。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、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を明らかにしている。今回、外因性 AD では 44.4% にフィラグリンの遺伝子変異がみられるが、内因性 AD では 9.1% であり (正常人 3.7%)、有意に低頻度であった。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。しかし内因性 AD では IFN- γ 陽性 T 細胞が外因性 AD と比べ有意に増加し、血中 TARC/CCL17 が逆に低値であった。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は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っ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. 内因性アトピー性皮膚炎の特徴

- 1) 基本的特徴
IgEが正常域か軽度高値である。
環境食物アレルギーに対する特異的IgEがない。
アレルギー性鼻炎喘息の合併がなく、家族歴もない。
- 2) 頻度
ADの約20%を占める。女性に多い(70~80%)。
- 3) 臨床的特徴
Dennie-Morgan foldが出ない。
尋常性魚鱗癬を合併せず、手掌のhyperlinearityもない。
発症年齢が遅い。
症状が比較的軽い。しかし従来の治療に反応が悪い。
- 4) 皮膚バリア
皮膚バリア機能が正常である。
フィラグリン遺伝子変異がない。
- 5) 免疫学的特徴
IL-4, IL-5, IL-13が外因性ほど高くない。
IFN- γ 産生細胞割合が高い。
- 6) 病因論的特徴
金属アレルギーが多い。

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。

B. 方法

上記の目的を具現化するための以下の研究項目を設定した。

1. AD重症度およびかゆみ程度に関する項目
AD重症度: scoring of atopic dermatitis (SCORAD)、好酸球数、LDH
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
2. 外因性と内因性の分別項目
IgE、transepidermal water loss (TEWL)、

skin surface hydration (capacitance)

3. 金属アレルギー検査項目

金属パッチテスト, 金属に対するリンパ球幼弱化反応

4. Th1, Th2, Th17 項目

細胞内サイトカイン FACS, 培養上清サイトカイン測定

5. 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。

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、以下の測定を行った。

i) 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。

ii) 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 ($1 \cdot \text{Ci}/\text{well}$) 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。

iii) 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。

6. 汗アレルギー

i) 自己汗を両腕から採取し、22 μm 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。

C. 研究結果

1. 患者背景

外因性AD46名と内因性AD26名を比較し

た。症例背景を表2に示す。

表2. 症例背景

	外因性 AD	内因性 AD	Fisher's exact test
患者数	46 (19 men and 27 women)	26 (6 men and 18 women)	
年齢 (years, mean ± SD)	30.5 ± 13.2	31.9 ± 11.6	N.S.
IgE (kU/L, mean ± SD)	8,056 ± 10,373 (550-53,000)	124.9 ± 107.8 (8-367)	P=0.0002
LDH (U/L, mean ± SD)	259.9 ± 71.9	212.6 ± 70.39	P=0.0187
好酸球数 (% mean ± SD)	8.8 ± 6.0	6.1 ± 5.4	N.S.
VAS (mean ± SD)	54.2 ± 27.0	61.9 ± 20.9	N.S.
SCORAD (mean ± SD)	36.4 ± 16.1	30.2 ± 10.4	N.S.
TEWL (g/m ² /h, mean ± SD)	14.3 ± 7.57*	8.73 ± 3.74	P=0.044
Skin surface hydration (AU, mean ± SD)	29.2 ± 7.26*	34.7 ± 5.78	P=0.025

The normal ranges or values are as follows: LDH, 119-220 U/L; TEWL, 0.59 ± 1.78 g/m²/h; skin surface hydration (capacitance), 30.2 ± 14.4 AU. *Statistically significant, compared to normal subjects.

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¹⁴⁾。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。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。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。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 44.4% 変異があったが、内因性 AD では 9.1% 変異があった (正常人 3.7%)。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いことがすでに判明している¹⁰⁾。

内因性 AD は外因性 AD に比べ、末梢血 Th2 細胞 (IL-4 あるいは IL-5 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 (図1)。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。

血中 TARC/CCL17 値は外因性が内因性の約 3 倍であり、SCORAD が外因性の方がやや高いことを考慮しても高値であった。

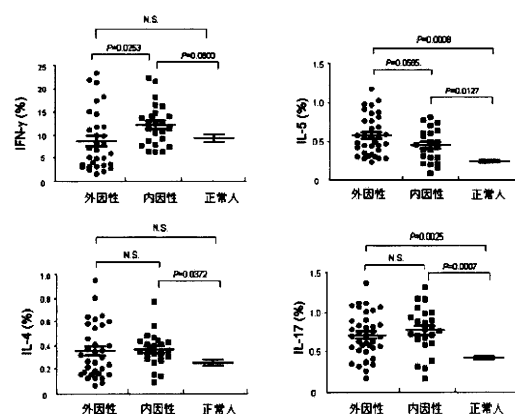


図1. 末梢血サイトカイン産生T細胞割合

3. 内因性 AD と金属アレルギーとの関連

外因性 19 名、内因性 17 例について金属パッチテストを実施した (表4)。内因性 17 名中 9 名が Co に対して陽性反応を示し、外因性に比べ有意に多かった。しかも女性が 6 名であった。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 の陽性率が高かった。

表4. 金属パッチテスト結果

	外因性	内因性	Fischer's exact test
Co	2/19 (10.5%, M0, F2)	9/17 (52.9%, M3, F6)	P=0.0103
Ni	4/19 (21.1%, M0, F4)	5/17 (29.4%, M2, F3)	N.S.
Cr	2/19 (10.5%, M0, F2)	4/17 (23.5%, M1, F3)	N.S.
Zn	1/19 (5.3%, M1, F0)	1/17 (5.9%, M0, F1)	N.S.
Mg	1/19 (5.3%, M0, F1)	2/17 (11.8%, M0, F2)	N.S.
Pd	1/19 (5.3%, M0, F1)	1/17 (5.9%, M0, F1)	N.S.

Other metals, including aluminum, stannous, ferric, platinum, indium, iridium, silver, potassium, gold, cupric, and mercuric, yielded negative results in all patients examined.

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。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、Pa 陽性者にも LST を行ったがやはり陰性であった。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 陽性反応が得られた。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。

4. 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。患者すべてにおいて、治療による SCORAD と VAS 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。外因性、内因性との間に血中サブスタンス P の量の差は認めなかった。

5. 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。

D. 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ニ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。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、内因性ADとTh1細胞の関わりである。外因性、内因性ADにおいて末梢血Th2細胞、Th17細胞割合は両者とも高い割合をします。しかしTh1細胞は内因性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(図2)。

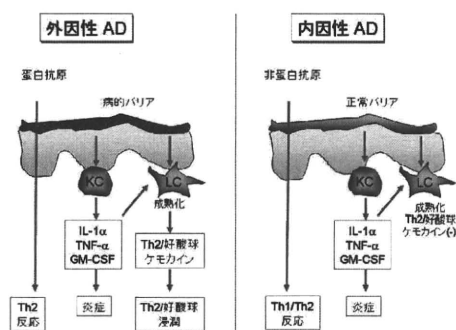


図2. 外因性と内因性アトピー性皮膚炎のメカニズム

E. 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。

内因性ADは皮膚バリア機能が正常であり、バリア異常に基づく蛋白アレルギーが発症に絡む外因性ADとは異なる。蛋白抗原はTh2を誘導しやすいことを考えると、内因性ADの抗原は蛋白抗原以外のものであって、

Th1も誘導しやすい抗原かもしれない。その意味において金属アレルギーが多いことと符号する。内因性ADは女性に多く、コバルトアレルギーは女性に多い。Pseudo-atopic dermatitisが金属によって発症していた⁷⁾という観察は、現在も非常に重要な知見と思われる。

衛生環境仮説では、兄のすぐ上に兄がいること、兄がデイケアセンターに早くからあずけられることが、ADの発症を抑制すると考えられている。これは細菌成分などに曝された場合免疫状態はTh1に傾き、それによってTh2病の発症が妨げられるという説である。ドイツでの研究で早くからデイケアセンターに入所させた児には内因性ADが多いという。これは見方を変えれば、外因性ADがTh2優位のため、その発症が抑制され、比較的內因性AD割合が多くなると解釈することもできる。

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。

参考文献

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

- enhancement of ceramide synthesis and cutaneous permeability barrier functions induced by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in human epidermis. *J Invest Dermatol* 2005; 124:786-792.
- 3) Palmer CN, Irvine CN, Terron-Kwiatkowski, et al: Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006; 38: 441-6.
 - 4) Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, et al: Specific Filaggrin Mutations Cause Ichthyosis Vulgaris and Are Significantly Associated with Atopic Dermatitis in Japan. *J Invest Dermatol* (in press).
 - 5) Thestrup-Pedersen K: Atopic eczema. What has caused the epidemic in industrial countries and can early intervention modify the natural history of atopic eczema? Treatment strategies and compliance for the adult patient with atopic eczema. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 2005; 215: 36-40.
 - 6) Giordano-Labadie F, Rancé F, Pellegrin F, Bazex J, Dutau G, Schwarze HP: Frequency of contact allergy in children with atopic dermatitis: results of a prospective study of 137 cases. *Contact Dermatitis* 1999; 40: 192-195.
 - 7) Shanon J: Pseudo-atopic dermatitis. Contact dermatitis due to chrome sensitivity simulating atopic dermatitis. *Dermatologica* 1965; 131: 1761-90.
 - 8) De Cock PA, Shanon J: Pseudo-atopic dermatitis. An example of pseudo-nomenclature. *Dermatologica*. 1966;133:236-237.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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
 - 12) 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.
 - 13) Mori T, Kabashima K, Yoshiki R, Sugita K, Shiraishi N, Onoue A, Kuroda E, Kobayashi M, Yamashita U, Tokura Y. Cutaneous hypersensitivities to haptens are controlled by IFN- γ -upregulated keratinocyte Th1 chemokines and IFN- γ -downregulated Langerhans cell Th2 chemokines. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1719-27.
 - 14) 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* 2010, 162: 83-90.
 - 15) Tokura Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2010; 58: 1-7.

- 16) 戸倉新樹, 栴島利江子 : 内因性アトピーと外因性アトピー. アレルギーの臨床 2010; 401: 404-409.

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. Nakamura M, Tokura Y : Expression of Snail1 in the fibrotic dermis of postmenopausal frontal fibrosing alopecia : possible involvement of an epithelial-mesenchymal transition and a review of the Japanese patients. Br J Dermatol 162 : 1152-1154, 2010.
2. Nakamura M, Tokura Y : Expression of SNAI1 and TWIST1 in the eccrine glands of systemic sclerosis patients : possible involvement of epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis. Br J Dermatol (in press) .
3. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, Okazaki T, Tokura Y : Tumor cell expression of programmed cell death 1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. Cancer 116 : 1757-66, 2010.
4. Hino R, Kabashima R, Kawakami C, Sugita K, Nakamura M, Tokura Y. Peripheral blood T cell fluctuation in psoriatic patients treated with combination therapy of calcipotriol and betamethasone butyrate propionate ointment. J Eur Acad Dermatol Venereol 2010. (Epub ahead of print).
5. 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 162 : 83-90, 2010.

6. Yoshiki R, Kabashima K, Sakabe J-I, Sugita K, Bito T, Nakamura M, Malissen B, Tokura Y : The mandatory role of IL-10-producing and OX40L-expressing mature Langerhans cells in local UVB-induced immunosuppression. J Immunol 184 : 5670-5677, 2010.
7. Sugita K, Kabashima K, Sakabe J, Yoshiki R, Tanizaki H, Tokura Y : FTY720 regulates bone marrow egress of eosinophils and modulates late-phase skin reaction in mice. Am J Pathol 177 : 1881-1887, 2010.
8. Sugita K, Tohyama M, Watanabe H, Otsuka A, Nakajima S, Iijima M, Hashimoto K, Tokura Y, Miyachi Y, Kabashima K : Fluctuation of blood and skin plasmacytoid dendritic cells in drug-induced hypersensitivity syndrome. J Allergy Clin Immunol 126 : 408-410, 2010.
9. 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 130 : 464-471, 2010.
10. Sawada Y, Nakamura M, Bito T, Fukamachi S, Kabashima R, Sugita K, Hino R, Tokura Y : Cholinergic urticaria studies on the muscarinic cholinergic receptor M3 in anhidrotic and hypohidrotic skin. J Invest Dermatol 130 : 2683-2686, 2010.
11. Fukamachi S, Mori T, Sakabe J, Shiraishi N, Kuroda E, Kobayashi M, Bito T,