

金属アレルギーの新しい診断技術開発に向けた工学的アプローチとHDC レポーター動物の作製

分担研究者：大津 浩（東北大学大学院工学研究科・応用量子医工学 教授）

研究協力者：成島 尚之（東北大学大学院工学研究科・医用材料工学分野 教授）

A. 研究目的

1. 金属アレルギーの際に金属の腐食とともに溶出した金属濃度を定量的に測定できるシステムがあると診断や重症度、治療効果、予後の判定などに大いに役立つ。工学的な機器開発の現状と問題点について検討する。
2. ヒスチジン脱炭酸酵素は、生体内における唯一のヒスタミン合成酵素であり、金属による炎症反応においてその遺伝子発現が誘導されることが示されているため、この遺伝子のレポーター動物を作製する。

B. 方法

1. マウス背部皮下に実用金属であるステンレス(SUS 316L)やニチノール(NiTi の合金)、銀パラジウム、コバルト・クロム・モリブデン合金の金属ワイヤーを埋め込み、3日後に周囲組織中に溶出した金属イオン濃度を定量する。周囲組織はセラミック製の解剖器具を用いて採取し、硝酸中で80℃に加温した後、過酸化水素を加えて完全に溶解させ、新型のICP-MSを用いて金属イオンの測定をする。それとともに、金属の表面の変化についてSEMを用いて観察する。

2. レポーター動物の作製：

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

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

C. 結果

1a. Ni および NiTi の結果：組織の病理学的な変化に先だって、微量の金属イオンの溶出が観察できた。NiTi wire でも Ni 金属の溶出が確認された。

1b. ステンレス SUS 316L の結果：SUS316L 植え込んだ後、金属表面をSEMで解析すると、マクロファージが金属表面に存在し、それに一致し金属表面の腐食が見られた。更に、周りの組織中の金属イオンについて解析すると、Ni, Mo は有意に上昇していることが判明した。

1c. Pd および Pd-Ag(銀パラジウム)の溶出結果：Pd wire については皮下組織に炎症がなく、金属の表面も変化が起きていない状態であるのに関わらず、既にPdの溶出を検出できた。またPd-Ag合金からも、その組成に含まれる金属全て(Pd, Ag, Au, Cu)が溶出していた。

2a. トランスジェニックマウスについて：現在、ターゲッティングベクターを切りだし精製後、HDC-BACを組み込んだ大腸菌への相同組換えを試みている。

2b. トランスジェニックフィッシュについて fish に関しても、プラスミッドによる transgenic fish を観察した結果、組織特異的な発現は再現できなかった。

D. 考察

1. 周辺組織中のニッケル濃度をICP-MS法で測定した。新しいICP-MSでは感度が上がり、Niばかりではなく、Pd, Ag, Au, Cuなどの金属も測定が可能となり、アレルギー反応が明らかになる前に金属を検知する可能性が出てきている。今後、臨床サンプルなどから金属を感知して、アレルギー反応が顕在化する前に未然に疾患を認知できる可能性を実験的に明らかにしていきたい。

2. HDC promoter-reporter 動物の作製

a. 現在HDC reporter mouse に関しては動物の作製の途中である。組み換え用のベクターのconstructは終了し、現在そのベクターを使ってBAC相同組換えを始めたところである。今後、組み換え体を単離し、アラビノースでFRTに挟まれたNeo耐性遺伝子を抜いて、受精卵に注射してトランスジェニックマウスをえる。

b. fish については現在のところ plasmid を使った reporter fish の作製をこころみていたが、BAC を使ったレポーター・フィッシュの作製を始めた。

E. 結論

1. 今後は、実用金属について生体への溶出量について検討を進める。

2. mouse, fish 共にBACによるレポーター動物の作製の途上である。

F. 今後の方針

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

2. a. レポーターマウスの作製をすすめる。

b. HDCのレポーター・フィッシュをBACを用いて作製する。

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

A. 研究目的

金属アレルギーの第一段階は金属の溶出にある。私たちは、マウスの背部皮下にニッケル線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。また、マウスマクロファージ細胞株 RAW264 を用いた培養系においてニッケル板からのニッケルイオンの溶出は細胞の存在により増大することを明らかにしてきた。これらの結果から、金属表面からの金属イオンの溶出には、炎症性細胞の活性化が必要であることが示唆されてきた。

そこで今回は、活性化された炎症性細胞がニッケル溶出を増大させる機序について解析した。

B. 方法

1) マウスニッケル線インプラントモデルとニッケル溶出の測定

マウス (6 wks)の背部皮下に 直径 0.8 mm, 長さ 5 mm のニッケル線をインプラントし、直ちに LPS (lipopolysaccharide; 1 μ g/ 200 μ l saline)をインプラント部位に皮下注射した。一定時間後、マウスを脱血死させた後、周囲組織を採取し、蒸留水でニッケルを溶出して、ニッケル濃度を Newport Green を用いて測定した。

2) RAW264 細胞を用いた in vitro ニッケル溶出測定系

RAW264 細胞(1×10^5 cells/ml) をニッケル板 (5 mm \times 5mm)を入れた 96 well-cluster dish に播種した。LPS (1 μ g/ml)を加え、一定時間培養した後、培養上清中のニッケル濃度を測定した。また、LPS で刺激する 10 分前に各種阻害薬を加えて、ニッケル溶出に対する効果を検討した。

C. 結果

- 1) ニッケル線をマウス背部皮下にインプラントすると、8 時間後から周囲組織へのニッケルの溶出が認められた。この溶出は同時に LPS を注射することにより増大した。
- 2) ニッケル板からのニッケル溶出は RAW264 細胞の播種により増加し、さらに LPS 刺激により著しく増大した。この LPS によるニッケル溶出は V-ATPase 阻害薬 bafilomycin A1, NHE 阻害薬 amiloride, リソソーム阻害薬 chloroquine で抑制された。

D. 考察

LPS により炎症を誘発、あるいはマクロファージを活性化するとニッケルの溶出が増大することが、in vivo および in vitro で明らかになった。この溶出にはプロントンの輸送・排出が大きく関与していることが示唆された。

E. 結論

金属周囲で炎症反応が生じ、炎症細胞が活性化することが、ニッケルの溶出を促進し、金属による接触炎、アレルギーの誘発を増大させることが示唆された。

F. 今後の方針

In vivo において溶出したニッケルの認識機構、ヒスタミン産生などの炎症誘発機構について引き続き解析する。また、ヒトにおいても汗や唾液中の金属濃度の高感度測定系の確立と、金属アレルギーの診断への応用を検討する。

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 *in vitro* 検査の有用性検討

分担研究者	松永 佳世子	藤田保健衛生大学	医学部	皮膚科学	教授
協力研究者	矢上 晶子	藤田保健衛生大学	医学部	皮膚科学	講師
	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

A. 研究目的

1. ヒトにおける金属アレルギーの診断には、*in vitro* の検査方法がまだ確立されていない。したがって、現時点では、パッチテスト(PT)が最も信頼性の高い重要な検査方法である。しかし、われわれの研究により、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、PTの貼布方法、試料の濃度と基剤、貼布ユニット、判定時間など、さらに十分な検討が必要であることが明らかとなった。藤田保健衛生大学病院での年間約50例の金属PT患者に加えて、すでに構築している歯科医と皮膚科医のネットワークと、松永が理事長を勤める日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会の協力も要請して、疫学的観点から、金属PTの再標準化を視野にいれ金属アレルギーにおけるPT法の現状と問題点について調査、検討する。H22年度は、ニッケル、パラジウム、クロム、水銀、金の陽性頻度の高いアレルゲンについて検討を行う。H23、24年度は、陽性頻度の低いアレルゲンについても、検討を加える。

2. *In vitro* 検査法として、carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)を用いたリンパ球刺激試験(LTT)を実施し、*in vitro*でのアレルゲン同定法の確立を目指し研究を開始する。

3. 本研究班の共同研究者とともにマウスモデルで得られた知見がヒトにおいて応用可能か検討を開始する。

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結果と、臨床症状や経過との関連性を詳しく調査し、十分な説明後に同意を得た症例から、CFSEを用いたLTTを実施し、*in vitro*でのアレルゲン同定法の確立を目指し研究を開始する。

具体的な方法：事前に同意が得られた対象者から採血(約15ml)を行う。CFSEを用いたLTT試験：アレルゲン特異的なT細胞の増殖・サイトカイン産生の同定：末梢血単核球をCFSE標識後アレルゲン存在下に7日間培養する。FACS Caliburを用いアレルゲン特異的な増殖反応をCFSE蛍光強度の減弱で、また、cytokineの産生は細胞質内サイトカインの染色で同定する。

3. 本研究班の分担研究者に金属アレルギーの症例のPT陽性部位の皮膚生検サンプルと末梢血を提供し、検討をいただく。

4. 以上の研究は、すべて藤田保健衛生大学 疫学・臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行う。

C. 結果

D. 考察

E. 結論

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 瀬尾尚宏 浜松医科大学 皮膚科 助教
秦 まき 浜松医科大学 皮膚科 講師

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、これまで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を第一の目的とする。健常人においては、金属特異的制御性 T 細胞の存在が確認されている。この細胞の反応の条件を調べることを第二の目的とする。すなわち、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。

B. 方法

金属アレルギー患者の末梢血または金属による誘発皮疹から、単核細胞を調整し、金属添加刺激による T 細胞の発現分子および T 細胞受容体発現(TCR)を解析する。また、イオン化金属を至適量添加刺激培養してから、limiting dilution 法を用いて、金属反応性 T 細胞クローンまたはラインを樹立し、その発現分子および機能を調べ、金属反応性 T 細胞における特性、特に T 細胞受容体の分子生物学的解析、およびサイトカイン産生、MHC の拘束性を明らかにする。また、同時に金属特異的制御性 T 細胞の樹立を、健常人から行い、その作用を明らかにした上で、金属アレルギー患者の同細胞を同様の方法で解析する。

C. 結果

1)金(Au)製剤による薬疹患者から末梢血から Au 特異的 T 細胞クローン/ラインを得た。APC による抗原認識の MHC 拘束性を調べると、従来のハプテン抗原認識と異なっていた。また、代表的な CD4 陽性クローンである F11E5-Vβ1 と F11E5-Vβ22 を固定した APC または非固定した APC の存在下で Au 刺激に対する反応を調べたところ、プロセッシング非依存性反応の存在が示された。

2)ニッケル(Ni)による接触皮膚炎患者から末梢血を採取して、Ni 添加培養におけるリンパ球のフェノタイプおよび発現する T 細胞受容体(TCR)Vβ鎖の偏りを調べると、Vβ 13.6 陽性細胞は 35%にも達する偏りを示した。また、Ni 刺激培養後の CD4 陽性細胞は、Perforin の弱発現と granulysin の強発現を認めた。Ni 刺激培養後の細胞から Ni 特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンの D1(Vβ 13.2 陽性), E11(Vβ 1 陽性)および G6(Vβ 13.6 陽性)の 3 個を樹立した。

D. 考察

金属を抗原として T 細胞が認識する方法として、CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞ともに、ハプテンとして認識する他にも、特異な様式の存在が示唆される。また、プロセッシング依存性と非依存性の反応が混在することが確認された。Ni アレルギーの末梢血中には Ni 刺激により granulysin を強く発現する CD4 陽性細胞が 30%程度存在することが判明した。

E. 結論

1) APC のプロセッシングを要さない機序による Au 抗原認識方法が存在する。

2) Ni アレルギー患者には Ni 刺激によって granulysin を発現する CD4 陽性 T 細胞が存在する。

F. 今後の方針

1) 複数の金属アレルギー患者末梢血から、金属反応性 T 細胞クローンを樹立し、同様に解析することによって、金属反応性 T 細胞の活性化における必要条件を明らかにする。

2) 健常人の末梢血から、金属特異的制御性 T 細胞クローンを樹立し、本細胞の機能にかかわる条件を明らかにする。

3) 我々が開発した皮膚検体から浸潤リンパ球を効率よく増幅する方法 (Acta Dermato-venereologica, in press)を用いて、金属による接触皮膚炎またはパッチテスト陽性病変から、直接エフェクター T 細胞を解析する。また、この方法を用いると、皮膚内の制御性 T 細胞も高率よく取り出すことができる。これらの細胞の関連を詳細に調べる。

アトピー性皮膚炎と金属アレルギー

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 椛島 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
濱 佳代 産業医科大学医学部皮膚科学 専門修練医

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎 (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の皮疹改善効果が報告されている。一方、汗成分が金属を含有している報告もあり、AD の皮疹の増悪に金属アレルギーの関与が示唆される。金属に皮膚が曝露する経路に自己汗が関与している可能性を考え、AD と金属アレルギー、汗アレルギーの関係を調べる。また、IgE が正常である内因性 AD と IgE が高値である外因性 AD との比較を検討することとする。

B. 方法

- ・自己汗の皮内テスト：自己汗を両腕から採取し、0.45 μm フィルターを通してろ過後、滅菌生理食塩水にて100倍希釈した。0.02 ml を皮内注射し、長径10 mm以上の紅斑を生じた場合を陽性とした。
- ・汗の分析：患者の自己汗に含まれるニッケル、クロム、コバルトの量について、三菱化学アナリテック（岡山）に依頼し誘導結合プラズマ発光分析法(ICP)にて測定した。

C. 結果

- ・汗アレルギー：AD患者16名（内因性5名、外因性11名）で自己汗の皮内テストを行い、12名（内因性4名、外因性8名）が陽性反応であった。自己汗に陽性を示した10名中8名で金属貼付試験を行い、4名が陽性であった。陽性患者はいずれも内因性AD患者であった。
- ・自己汗に含まれる金属量の測定：内因性AD患者3名、外因性AD患者6名、健常人4名から抽出した汗に含まれる金属の定量を行った。それぞれの汗中のニッケル量は、 403.7 ± 323.1 ng/g、 102.0 ± 88.3 ng/g、 92.5 ± 63.5 ng/g（平均値 \pm 標準偏差）であり、内因性ADで最も高値であった。クロム、コバルトでは特に有意差は認めなかった。

D. 考察

内因性AD患者において、金属アレルギーが皮疹の形成に密接に関わっている可能性が考えられた。

E. 結論

AD患者は汗アレルギーを伴いやすい。内因性AD患者においては、汗アレルギー陽性のうち80%が金属貼付試験で陽性であり、汗中のニッケルが高値であった。一方外因性ADでは、金属アレルギーの合併は見られず、汗中の金属も高値でなかった。

F. 今後の方針

金属アレルギーの経皮接触の回避および経消化管吸収の制限、減感作療法をはじめとする新たな治療展開の可能性を考えていきたい。

金属アレルギー成立における皮膚樹状細胞の役割の解明

分担研究者 梶島 健治 京都大学・医学研究科 皮膚科 准教授
研究協力者 加藤 真弓 京都大学・皮膚科 助教
大塚 篤司 京都大学・皮膚科 助教

A. 研究目的

金属アレルギーは皮膚免疫反応の代表的疾患であり、接触皮膚炎の一つの表現型である。この接触皮膚炎発症には、皮膚樹状細胞が重要な役割を果たす。皮膚にはランゲルハンス細胞、ランゲリン陽性真皮樹状細胞、ランゲリン陰性真皮樹状細胞の少なくとも三種類のサブセットが存在することがマウスにおいて示された。そこで、金属アレルギーの成立や寛容における樹状細胞サブセットの役割を検証することを本研究の目的とする。

B. 方法

皮膚樹状細胞サブセットを特異的に除去させるマウスモデルを確立し、このマウスにおいて、ハプテンを用いた接触過敏反応を誘導させ、接触皮膚炎形成における各樹状細胞サブセットの役割を検証する。

C. 結果

①ランゲルハンス細胞のみ、②ランゲリン陽性真皮樹状細胞のみ、③ランゲルハンス細胞と真皮樹状細胞の両方を欠失させるマウスにおいて、ハプテンを低容量と通常量塗布したところ、通常量塗布した場合には、接触皮膚炎反応は、①から③のいずれの場合においても野生型マウスと同様の耳介腫脹反応を呈した。ところが、低容量のハプテン塗布の場合には、③の場合において、接触皮膚炎反応が減弱した。また、感作後の所属リンパ節の DNBS 再刺激において、細胞増殖、Th1 サイトカインである IFN- γ の産生も減弱した。

D. 考察

ハプテンがある程度以上曝露されれば、ランゲルハンス細胞やランゲリン陽性真皮樹状細胞がなくてもランゲリン陰性真皮樹状細胞が補完し接触皮膚炎反応は成立する。しかしながら、抗原曝露が低容量であれば、ランゲルハンス細胞とランゲリン陽性真皮樹状細胞がともに欠失すると、接触皮膚炎反応は減弱する。ところが、ランゲルハンス細胞とランゲリン陽性真皮樹状細胞は互いに補完し合い、一方がなくても接触皮膚炎反応は十分成立することが示唆された。

E. 結論

金属アレルギーを代表とする接触皮膚炎反応における、皮膚樹状細胞サブセットの役割が、明らかとなった。

F. 今後の方針

感作相における接触皮膚炎形成における各樹状細胞サブセットの役割は明らかとなったので、今後は、惹起相における皮膚樹状細胞サブセットの役割の検証を試みたい。

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

金属アレルギーの革新的診断・予防・
治療法の開発研究

平成22年度
第2回 班会議
抄録集

日時：平成22年10月27日（水）

場所：東北大学東京分室 会議室 A

連絡先（班会議前日まで）： 022-717-8579

（小笠原、中山、川野）

プログラム

開会、本研究事業の概要 研究代表者 小笠原康悦 13:30-13:40

東北大学加齢医学研究所・生体防御学

前年度までの研究成果および本年度の研究計画の発表

セッション1.

「DC 移入型金属アレルギーマウスモデルを用いた金属アレルギー発症機構の解析」

西屋 禎 (分担研究者) 13:45-14:05

北海道大学大学院医学研究科・細胞薬理学

「マウス金属アレルギーモデルを用いた金属アレルギーの病態解析」

川野 光子 (代理・研究代表者 小笠原康悦) 14:10-14:30

東北大学加齢医学研究所・生体防御学

「金属アレルギー反応に関わる特異的T細胞の存在と意義」

鈴木 隆二 (分担研究者) 14:35-14:55

国立病院機構相模原病院・臨床研究センター

本研究事業の連絡事項 (協力研究者は退出)

小笠原康悦 (研究代表者) 15:00-15:15

東北大学加齢医学研究所・生体防御学

Break 15:15-15:30

セッション2.

「HDC レポーター動物の作製」

大津 浩 (分担研究者) 15:30-15:50

東北大学大学院工学研究科・応用量子医工学

「金属の溶出評価と金属アレルギーへの進展機構の解析」

平澤 典保 (分担研究者) 15:55-16:15

東北大学大学院薬学研究科・生活習慣病治療薬学分野

Break 16:15-16:30

セッション3.

「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」

松永 佳世子 (分担研究者) 16:30-16:50

藤田保健衛生大学・医学部・皮膚科

「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」

橋爪 秀夫 (分担研究者) 16:55-17:15

浜松医科大学・医学部・皮膚科

「アトピー性皮膚炎と金属アレルギー」

戸倉 新樹 (分担研究者) 17:20-17:40

産業医科大学・皮膚科

Break 17:40-17:55

「金属アレルギー成立における皮膚樹状細胞の役割の解明」

椛島 健治 (分担研究者) 17:55-18:15

京都大学・医学研究科・皮膚科

総合討論

18:15-18:30

発表は時間厳守でお願いいたします。目安として、発表時間15分、質疑応答5分、計20分と考えております（演題の間に5分の余裕はありますが、時間厳守でお願いいたします）。スライドはパワーポイントファイルで作成し発表してください。

DC 移入型金属アレルギーマウスモデルを用いた金属アレルギー発症機構の解析

分担研究者 西屋 禎 北海道大学大学院医学研究科 細胞薬理学分野 講師

A. 研究目的

金属アレルギーは T 細胞性の遅延型過敏反応であることが示唆されているが、有用な動物実験モデルが存在しなかったことから、その発症のメカニズムは不明な点が多い。特に、金属の抗原提示や交差反応のメカニズムはほとんど解明されていない。最近我々は、金属塩と LPS で処理した骨髄由来樹状細胞 (DC) をマウスに移入することにより、金属アレルギーを感作する動物実験モデル (DC 移入型金属アレルギーマウスモデル) を確立した。本研究は、このマウスモデルとプロテアソーム阻害剤 (MG-132) を用いて、金属アレルギーの発症における樹状細胞の抗原提示の重要性を検討した。また、樹状細胞に処理した金属と異なる金属でマウスを challenge することにより、金属アレルギーの交差反応における樹状細胞の役割を検討した。

B. 方法

C57BL/6 マウス (7~8 週齢♀) の骨髄細胞を GM-CSF (10 ng/ml) で 7 日間処理し、骨髄由来 DC を得た。この細胞を PdCl₂ (0.2 mM) + LPS (20 ng/ml) または NiCl₂ (0.1 mM) + LPS で 24 時間処理した (対照の DC には PBS を処理した)。なお、MG-132 (0.1 および 0.5 μM) は、金属+LPS 処理と同時にを行った。これらの DC を良く洗浄したのち、C57BL/6 マウス (7~8 週齢♀) に尾静脈注射により移入した (5x10⁵ 個/マウス)。10 日後に 1 mM PdCl₂ 溶液 15 μl または 1 mM NiCl₂ 溶液 15 μl をマウスの耳介に皮内注射し、以後耳の腫脹を 24 時間おきに測定した。

C. 結果

① Pd+LPS 処理 DC の移入による金属アレルギー発症におけるプロテアソームの関与について : Pd+LPS 処理 DC を移入したマウスでは優位な耳の腫脹が観察された。一方、Pd+LPS と同時に MG-132 で処理された DC を移入したマウスでは、耳の腫脹は減弱した。

② Pd と Ni の交差反応について : Pd+LPS 処理 DC を移入したマウスを Ni で challenge した場合、弱いながらも耳の腫脹が観察された。一方、Ni+LPS 処理 DC を移入したマウスを Pd で challenge した場合、耳の腫脹は観察されなかった。

D. 考察

樹状細胞内でのプロテアソームを介した蛋白質分解により金属アレルギーを引き起こす抗原ペプチドが産生されることが示唆された。また、Pd と Ni の交差反応に関して、Pd+LPS 処理 DC の移入では、Ni と反応する T 細胞が生成されるが、Ni+LPS 処理 DC の移入では、Pd と反応する T 細胞は生成されないことが示唆された。

E. 結論

① DC 移入による金属アレルギーの発症には、DC 内での蛋白質分解が必要である。

② Pd と Ni の交差反応に関して、Pd+LPS 処理 DC の移入では Pd と Ni の交差反応が起こるが、Ni+LPS 処理 DC の移入では Pd と Ni の交差反応は起きない。

F. 今後の方針

プロテアソーム阻害剤は、LPS のシグナリングの一部を阻害することが知られているため、これにより CD80/CD86 や MHC 分子の upregulation が抑制されている可能性も考えられることから、今後条件を変えてより詳細な解析を行う。また、DC 移入モデルと腹腔内投与モデルにおける交差反応の違いを比較検討し、交差反応における DC の役割を追究する。

マウス金属アレルギーモデルを用いた金属アレルギーの病態解析

分担研究者	小笠原 康悦	東北大学加齢医学研究所・生体防御学分野 教授
研究協力者	川野 光子	東北大学加齢医学研究所・生体防御学分野 博士研究員
	笹月 健彦	国立国際医療センター 名誉総長
	中山 勝文	東北大学加齢医学研究所・生体防御学分野 助教
	青島 有佑	東北大学大学院工学研究科・医用材料工学分野

A. 研究目的

金属アレルギーは、遅延型過敏反応とされ T 細胞主体のアレルギー反応とされている。我々は、金属アレルギーマウスモデルを用いて、金属アレルギーの病態、発症における分子の変化を時系列的に解析し、新規診断、予防、治療法の開発を目指すことを目的としている。①これまでに金属アレルギー発症マウス (BALB/c) の所属リンパ節細胞をヌードマウスへ養子移入を繰り返すと CD8 T 細胞が濃縮されたことから、今回遺伝子改変マウス等を用いてエフェクター相における CD8 T 細胞およびエフェクター分子の病理的役割について解析した。②Pd ワイヤの埋入により感作を成立させ、よりヒトの臨床像に近いモデルを構築できるかどうか検討した。

B. 方法

- C57BL/6 マウスにパラジウム (Pd) を用いて感作 (10 mM PdCl₂ / 10 µg/ml LPS, 250 µl/head, i.p.)・惹起 (1 mM PdCl₂, 20 µl/ear x 2/head) を行い、その病理像を解析した。次に C57BL/6 マウスに抗マウス CD4 抗体 (GK1.5) あるいは抗マウス CD8 抗体 (53-6.7) を投与することにより各々の T 細胞サブセットを除去し Pd アレルギーを誘導した。さらに MHC class I および CD8 T 細胞を機能的に欠損している β2m 欠損マウス、パーフォリン欠損マウスおよび IFN-γ欠損マウスについても Pd アレルギーを誘導し、これら分子の病理的役割について検討した。
- Pd ワイヤ埋入による Pd アレルギー誘導条件の検討
C57BL/6 マウスの背部皮下に Pd ワイヤ (φ1 mm x 5 mm) を LPS (1 µg/head) +/-にて埋入し、10-20 日後にマウス耳介に Pd 溶液の皮内注射によりアレルギーを誘導できるか否か検討した。

C. 結果

- Pd アレルギーを誘導した C57BL/6 マウスの耳介腫脹局所において CD8 および CD4 の両 T 細胞サブセットの浸潤が認められた。抗 CD4 抗体あるいは抗 CD8 抗体を各々投与した両群で耳介の腫脹が軽減された。β2m 欠損マウスおよび IFN-γ欠損マウスで耳介の腫脹が認められなかった。
- Pd ワイヤを 20 日間埋入した場合でも、Pd 溶液投与による耳介の腫脹は観察されなかった。

D. 考察

- 病理解析および T 細胞サブセット除去実験結果から、Pd アレルギー発症には CD4 および CD8 の両 T 細胞サブセットが関与すると考えられた。また β2m 欠損マウスおよび IFN-γ欠損マウスにおいて耳介の腫脹は観察されなかったことより、炎症最終相においては CD8 細胞由来の IFN-γが重要であることが示唆された。
- Pd ワイヤを 20 日間埋入した場合でも、耳介に金属アレルギーを誘導できなかったことから、再検討が必要である。

E. 結論

- C57BL/6 マウスを用いた Pd アレルギーの炎症最終相においては CD8 細胞の IFN-γが重要である。
- Pd ワイヤを背部皮下に埋入して金属アレルギーを誘導するには、更なる条件検討が必要である。

F. 今後の方針

- (ア) Pd アレルギーマウスの所属リンパ節細胞を繰り返し移入したヌードマウスの耳介切片を用いて、相模原病院での TCR レパトア解析結果を指標にすると同時に Pd に反応する effector T 細胞を *in situ hybridization* により検出する。

- (イ) 抗原ペプチドを決定するべく、Pd アレルギー誘導マウスまたは Pd + LPS 処理 BMDC からペプチドを採取・精製・濃縮し、得られたペプチドフラクションを WT マウスに感作させることで、Pd アレルギーを誘導できるか否かを検討する。誘導が出来た場合には、そのペプチドフラクションを nano LC/MS/MS にかけ、アミノ酸配列を決定する。
- (ウ) C57BL/6 マウスを用いて Pd アレルギーを発症させ、RAG KO マウスへの繰り返し移入を行い、マウス strain の違いにより Pd に反応する TCR レパトアが異なるかどうかを検討する。
- (エ) 引き続き、金属ワイヤーを埋入することで感作を成立させ、金属溶液を耳介に投与することで金属アレルギーを誘導することが出来るかどうか検討する (Ni、Co、Cr なども検討する)。
- (オ) ヘアレスマウスに金属アレルギーを誘導し、背部皮膚に金属溶液を塗布することで発症するモデルを構築する (ヒトの臨床像に近いモデルの構築)。

金属アレルギー反応に関わる特異的T細胞の存在と意義

分担研究者：鈴木隆二

研究協力者：熊谷賢一

：小林浩

江口貴紀

重松宏明

独) 国立病院機構相模原病院・臨床研究センター・室長

独) 国立病院機構相模原病院・臨床研究センター・研究員

鶴見大学歯学部口腔外科第一講座・助教

独) 国立病院機構相模原病院・臨床研究センター・研究員

鶴見大学歯学部口腔外科第一講座・大学院

研究要旨

金属アレルギーの病因と病態形成に如何なる生体反応が関与しているか未だに不明な点が多い。本研究は金属(Pd,Ni,Co)に対する病的生体反応の病態解明を目的として、我々の保有する TCR レパトア解析法を用いて本反応の特異性の有無を検討する。

A 研究目的

前回、我々は報告されている金属アレルギーモデルマウスをより安定した系に一部改変したマウスを用いて、T細胞を中心とした免疫応答の解析を行った結果、T細胞の特異的 Family が関与している可能性を報告した。今回はn数を増大させ、より統計学的に裏打ちされたデータを得る事を目的とした。

B 方法

Balb/c マウス (6 週齢、♀) に金属・LPS 混合溶液を鼠径部への皮内注射する事で感作し、金属溶液単体を皮内注射し誘導するといった基本手技と感作・誘導の回数は前回のままに固定し、Control 群,24h 群,72h 群,1W 群の計 4 群(各 n=10)の条件で、そのマウスの足蹠の腫脹を計測し、さらに足蹠および膝下リンパ節における T細胞マーカーおよびサイトカインプロファイルの経時的変化を、定量的 PCR 法にて解析し、また膝下リンパ節および足蹠においては TCR レパトア解析によりその細胞動態を調査した。

C.結果

感作後に足蹠の腫脹は 24 時間をピークとし 72 時間まで継続し、1W 後でも優位な腫脹が観察された。定量的 PCR 解析にて足蹠および膝下リンパ節ともに著しい T細胞マーカー(CD3,CD4,CD8)と各種サイトカインの上昇を有意差(P<0.05)を伴って認めた。また、TCR レパトアにおいては特異的 family(V α 18-1)の Skew を確認した(有意差あり)。

D.考察：

金属アレルギーはタンパク抗原によるアレルギー反応とは異なり、その詳細な機序は明らかになっていない点が多い。我々は金属アレルギーの臨床的特徴である「長時間の抗原暴露の必要性(T細胞誘導)」とその病態発症における「個体差」の二点を、十分な反復暴露と n 数の確保に努めることで考慮した。その結果、この二点を穴埋めすることに成功しており、いくつか報告されているヒトに概想可能な金属アレルギー病態モデル動物の中でも、発症機序をより近似させた実験モデルである本実験結果から得られた情報は有用性が高いと考えられる。

E.今後の方針：

V α の解析が終了し、V β についても同様に特異的 family の有無について解析を行う。またこれら TCR レパトア解析によって認められた各 family において CDR3 size spectratyping 法とシークエンス解析により抗原特異性をクローンレベルで解析する。さらに、今回の感作・誘導条件を基に各種金属における T細胞動態と特異性を詳細に検証する予定である。

HDC レポーターマウスの作製

分担研究者：大津 浩（東北大学大学院工学研究科・応用量子医工学 教授）
研究協力者：佐藤 陸（東北大学大学院工学研究科・応用量子医工学 技術補佐員）

A. 研究目的

ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 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発現が誘導されることが示されている。この遺伝子のレポーター動物を作製し金属アレルギー関連の研究に貢献する。

B. 方法

① プラスミドの構築：

HDC 遺伝子を含む BAC clone を入手し、このクローンを鋳型にして HDC 遺伝子の第 637 塩基から第 1777 塩基までの 1141bp を PCR で増幅する。この増幅した領域（第一イントロン部位）を pGEM-T vector に導入する。さらに pGEM-T vector の multiple cloning site に存在する ApaI および SalI を利用し導入した第一イントロン部位を切り出す。次に HDC 遺伝子のプロモーター部位（1099bp）が挿入された pBS-HDC1099 プラスミドを Apa I と Sal I で消化し、pGEM-T vector から切り出した第一イントロン部位が HDC プロモーターの下流に位置するように構築する。

次に HDC 遺伝子のプロモーターと第一イントロンの間に GFP 遺伝子と Neomycin 耐性遺伝子 (Neo) を挿入するため、7.0 GFP プラスミド、pBS-FRT-Neo-FRT プラスミド、pBS プラスミドを用意する。まず 7.0 GFP プラスミドを XbaI と XhoI で消化し GFP 遺伝子を切り出す。切り出した GFP 遺伝子は新たに用意した pBS プラスミドの multiple cloning site (XhoI と XbaI で消化) に挿入する。一方、pBS-FRT-Neo-FRT プラスミドを EcoRV と KpnI (切断部位を T4 DNA polymerase で処理) で消化し FRT-Neo-FRT 部位を切り出す。切り出した FRT-Neo-FRT 部位を pBS の multiple cloning site の XbaI (klenow filled) 部位に挿入して GFP 遺伝子の下流に位置するようにする。

最後に GFP 遺伝子と FRT-Neo-FRT を繋がった状態で切り出し (XhoI と NotI で消化)、pBS-HDC1099 の HDC プロモーターと第一イントロンの間に (SalI と HincII で消化後) 挿入しプラスミドの構築は完了する。構築後、Not I で消化して上流側からプロモーター部位、GFP 遺伝子、Neomycin 耐性遺伝子、第一イントロン部位の順番で繋がったターゲティングベクターを得る。

② 相同組み換え：

相同組み換えには大腸菌株 EL250 を使用するので、あらかじめエレクトロポレーションで HDC-BAC を EL250 に導入しておく。HDC-BAC が導入された EL250 は 42℃ のウォーターバスに 15 分インキュベートすることで Recombinase が活性化する。ターゲティングベクターの導入はエレクトロポレーションで行い、相同組み換えが起こっていることを PCR 法等で確認する。

③ Neomycin 耐性遺伝子を抜く：

相同組み換えの確認が済んだ大腸菌 EL250 に最終濃度が 0.1% になるようにアラビノースを加え、LB Medium で 1.5 時間培養する。PCR 法などで Neomycin 耐性遺伝子が抜けたことを確認する。

④ トランスジェニックマウスの作成：

Neomycin 耐性遺伝子を抜いた HDC-BAC をマウス受精卵にインジェクションし、HDC レポーターマウスを作成する。

C. 結果

プラスミドの構築及びターゲティングベクターの切りだし精製は完了し、HDC-BAC を組み込んだ大腸菌への相同組換えを行っている。

現在、組み換えが正確に起きているかを確認している。

D. 考察

HDC reporter mouse に関しては作製の途中である。HDC-BAC の相同組換の確認作業が済み次第、FRT に挟まれた Neo 耐性遺伝子をアラビノースで抜き、GFP 遺伝子が入った HDC-BAC をマウス受精卵に注射しトランスジェニックマウスの作製を進めようと考えている。

E. 結論

現在、BAC によるリポーター動物の作製途中である。

F. 今後の方針

レポーターマウスの作製をさらにすすめる。

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

A. 研究目的

金属アレルギーの第一段階は金属の溶出にある。私たちは、マウスの背部皮下にニッケル線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。今回は、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) ステープレからのニッケル溶出

マウス (6 wks)の背部皮膚に 皮膚縫合用ステープルを打ち込み、直ちに LPS (lipopolysaccharide; 1 μ g/ 20 μ l saline)を貫通部位に滴下した。72 時間後、周囲組織を採取し、硝酸-過酸化水素法で組織を溶解し、ニッケル濃度を ICP-MS 法を用いて測定した。

2) ニッケル線による感作と stainless からのニッケル溶出

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 stainless 線 (直径 1 mm、長さ 5 mm) を埋入し、その 72 時間後に stainless 周囲組織を採取、同様にニッケル濃度を定量した。またこのとき脾臓を摘出し、重量を測定するとともに、FACScan でニッケル結合細胞について解析した。

C. 結果

11)ステープルをマウス背部に打ち込み、72 時間後のニッケルの溶出を解析したところ、わずかではあるが、ニッケルの溶出が認められ、その量は LPS 刺激によりさらに増大した。

12)ニッケル線を皮下に埋入すると 72 時間後には強い炎症が生じた。このとき血清中のニッケル濃度も増大し、全身的に分布することが確認された。ニッケル線埋入後 10 日目に stainless 線を埋入し、その 3 日後にニッケルの溶出を測定したところ、ニッケル線で感作した群で高値を示した。また、ニッケル線埋植により脾臓重量が増加し、ニッケル結合細胞を Newport Green を用いた FACScan 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。

D. 考察

LPS により炎症を誘発すると、医用材料からのニッケルの溶出も増大することが確認された。また、感染等の炎症反応だけでなく、金属アレルギーの場合でも溶出が促進される可能性が示唆された。

E. 結論

金属アレルギーの患者では、医用材料からのニッケル溶出が増強されている可能性が考えられ、注意が必要である。

F. 今後の方針

感作マウスの脾臓細胞で増大する細胞を同定する。また、感作マウスに stainless 線を埋入した場合の stainless 線周囲の浸潤細胞を解析し、ニッケル溶出促進の機序を検討する。

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
協力研究者	矢上 晶子	藤田保健衛生大学	医学部	皮膚科学	講師
	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

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) より確実に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、歯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. 結論と今後の予定

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。

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 瀬尾尚宏 浜松医科大学 皮膚科 助教
秦 まき 浜松医科大学 皮膚科 講師

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、これまで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を第一の目的とする。健康人においては、金属特異的制御性 T 細胞の存在が確認されている。この細胞の反応の条件を調べることを第二の目的とする。すなわち、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。

B. 方法

金属アレルギー患者の末梢血から、単核細胞を調整し、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。

C. 結果

- 1) 昨年度とは別のニッケル(Ni)アレルギー患者から、上記の方法により 8 つの T 細胞ラインまたはクローンを樹立し、現在その特性を解析中である。
- 2) 8 つのクローン・ラインのうち、表面抗原について解析を終えた 3 つの特性は以下の表のごとくである。

Clone/Line	Vb	CD4/8	S.I.	CLA	CCR (% expression)										CXCR (%)			
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4
E6	1/2/13.1	4/8	2.25	-	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4
F1	13.1	4	7.57	-	0	0	0	22	0	0	46	8	15	0	0	3	0	58
F7	13.1	4	2.00	-	0	0	1	27	1	0	24	0	22	0	0	0	0	21

D. 考察

今回樹立した 8 つの Ni 特異的 T 細胞のうち、詳細な解析を行った 3 つの T 細胞受容体は、同じ Vb13.1 を共有していた。ケモカインレセプター発現でも、CCR4, CCR7, CCR9 および CXCR4 が陽性を示す点が共通していた。昨年度の別な患者から得られた Ni 特異的 T 細胞も、Vb13 を発現しており、また CCR9 陽性であったことから、これらの特徴は Ni 特異的 T 細胞に共通した特徴であることが推測される。

E. 結論

複数の患者の末梢血単核細胞より樹立した Ni 特異的 T 細胞は、発現する T 細胞受容体およびケモカインレセプターに共通した特徴を有する可能性がある。

F. 今後の方針

- 1) 解析の終わっていない T 細胞株における特性を解析する。
- 2) CCR9 の発現の意味について検討する。特に樹立した細胞が消化管における抑制免疫に関与しているかもしれない。
- 3) 可能であれば、我々が開発した皮膚検体から浸潤リンパ球を効率よく増幅する方法 (Acta Dermato-venereologica, in press) を用いて、金属による接触皮膚炎またはパッチテスト陽性病変から T 細胞を採取し、Ni 特異的 T 細胞クローンまたはラインを樹立し、末梢血から得られたものとを比較する。
- 4) 健康人から Ni 反応性 T 細胞を樹立し、アレルギー患者との比較を試みる。

アトピー性皮膚炎と金属アレルギー

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 梶島 利江子 産業医科大学病院 皮膚科 助教
尾藤 利憲 神戸大学大学院 皮膚科学 講師
森 智子 産業医科大学医学部皮膚科学 助教

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)は外因性(extrinsic)と内因性(intrinsic)に分けることができる。外因性は血中IgEが高く、喘息や鼻炎を合併しやすい通常型であり、内因性はIgEが正常域で特異的IgE感作を示さない型である。この両者は、皮膚バリア障害の有無、免疫変調の方向性、金属アレルギーの有無において異なる。これらについて検討を加え、とくにメカニズムが不明である内因性ADと金属アレルギーの関連について明らかにしたい。

B. 方法

1. 皮膚バリアの計測とフィラグリン遺伝子(*FLG*)の変異:皮膚バリアは経皮水分蒸散量(TEWL)と角質水分量にて評価した。*FLG*については日本人特有の8つの変異について検討した。
2. 免疫変調:患者及び正常人の末梢血単核球を細胞内染色し、IFN-g、IL-4、IL-5、IL-17陽性細胞の割合をフローサイトメトリで検討した。
3. 金属アレルギー:17種の金属をパッチテストし、陽性率を検討した。加えて金属が多量に含まれる汗について、金属濃度を計測した。

C. 結果

外因性ADではTEWLが高く角質水分量が低くバリアが破綻しているが、内因性ADではこれらバリア機能の指標が正常であった。さらにバリア異常の重要な因子である*FLG*変異が、外因性AD 44.4%、内因性AD 9.1%と高率に($P=0.0246$)外因性ADに認められた。内因性ADでは外因性ADと同様に、末梢血IL-4、IL-5、IL-17陽性Th細胞が増加していたが、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。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Coにおいて有意に陽性率が高かった(内因性52.9%、外因性10.5%)。自己汗の皮内テスト陽性者では、金属アレルギーを示す内因性ADが多かった。

D. 考察

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、事実Coパッチテストが高率に陽性であった。

E. 結論

内因性ADの接触原として金属が示唆された。

F. 今後の方針

内因性ADに対し、金属アレルギーの経皮接触の回避および経消化管吸収の制限、減感作療法をはじめとする新たな治療展開の可能性を考えたい。

金属アレルギー成立における皮膚樹状細胞の役割の解明

分担研究者 梶島 健治 京都大学・医学研究科 皮膚科 准教授
研究協力者 加藤 真弓 京都大学・皮膚科 助教
大塚 篤司 京都大学・皮膚科 助教

A. 研究目的

金属アレルギーは皮膚免疫反応の代表的疾患であり、接触皮膚炎の一つの表現型である。この接触皮膚炎発症には、皮膚樹状細胞が重要な役割を果たす。一方、皮膚肥満細胞は接触皮膚炎発症において樹状細胞との相互作用が示唆されているがその詳細なメカニズムは明らかとされていない。そこで、金属アレルギーの成立や寛容における樹状細胞および肥満細胞の役割、相互作用を検証することを本研究の目的とする。

B. 方法

皮膚肥満細胞を特異的に除去させるマウスモデルを確立し、このマウスにおいて、ハプテンを用いた接触過敏反応を誘導させ、接触皮膚炎形成における肥満細胞の役割および樹状細胞に与える影響を検証する。

C. 結果

肥満細胞欠損マウスにおいてハプテンを用いた接触皮膚炎を誘導したところ耳介腫脹は有意に減弱していることが明らかとなった。更に、接触皮膚炎感作相のみ肥満細胞を除去したモデルにおいて耳介腫脹は減弱し、このモデルに骨髄由来肥満細胞を再供給することで減弱が相殺された。肥満細胞除去時においては、皮膚ランゲルハンス細胞および真皮樹状細胞の遊走能、成熟度は有意に減弱していた。In vitro の実験では、骨髄より誘導した樹状細胞および肥満細胞を共培養することで、樹状細胞の成熟度は増強され、この相互作用には ICAM1-LFA1 を介した細胞接着および肥満細胞が産生する膜型 TNF α が必要であった。

D. 考察

皮膚肥満細胞は皮膚の樹状細胞の遊走・成熟を促進することにより、接触皮膚炎の成立に深く関与していることが示唆された。更に接触皮膚炎感作時には真皮内で肥満細胞と樹状細胞が接触を介した相互作用が重要であることが明らかとなった。

E. 結論

金属アレルギーを代表とする接触皮膚炎反応の成立において、肥満細胞による樹状細胞の遊走・成熟促進が重要な役割を果たす。また、今回は、感作源としてハプテンを用いたが、金属アレルギーの成立においても同様の機序が作用していることが示唆される。

F. 今後の方針

接触皮膚炎感作相における皮膚樹状細胞および肥満細胞の役割、相互作用は明らかとなったので、今後は、惹起相における肥満細胞の役割、樹状細胞との相互作用の検証を試みたい。