

## 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 宮地 良樹 京都大学・医学研究科・皮膚科 教授  
研究協力者 梶島 健治 京都大学・皮膚科 准教授  
大塚 篤司 京都大学・皮膚科 特別研究員

### 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。接触皮膚炎は、樹状細胞やT細胞が重要な役割を果たすことは疑いないが、肥満細胞の役割についても古くから注目されている。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

皮膚肥満細胞をジフテリアトキシン依存的に除去させるマウスモデル(Mas TRCK Tg マウス)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を検証する。また先天的に肥満細胞が欠損している W/W<sup>v</sup> マウスとの違いを検討する。

### C. 結果

Mas TRECK Tg マウスにジフテリアトキシン処理後、肥満細胞のみ除去された状態で接触皮膚炎を確認したところ野生型に比べ接触皮膚炎反応が減弱していることが明らかとなった。また W/W<sup>v</sup> マウスではハプテンの種類や濃度によって接触皮膚炎反応が減弱する結果が得られる一方、Mas TRECK Tg マウスでは異なる2つのハプテンにおいても接触皮膚炎反応が減弱することが明らかとなった。さらに oxazolone の濃度を低濃度もしくは高濃度と変えて感作を行ったところ W/W<sup>v</sup> マウスは高濃度のみ接触皮膚炎反応が減弱したのに対し、Mas TRECK Tg マウスではどちらの濃度においても接触皮膚炎反応が減弱することが明らかとなった。いずれのモデルにおいても、肥満細胞が接触皮膚炎に関与しているということを明らかにした。

### D. 考察

肥満細胞が先天的に欠損した場合と後天的に除去された場合では異なる免疫反応が誘導される可能性が示唆された。

### E. 結論

肥満細胞は接触皮膚炎反応の感作相に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、先天的に肥満細胞が除去されることで免疫系のホメオスタシスが働いている可能性が示唆された。

### F. 今後の方針

今回は感作源としてハプテンを用いたが、金属抗原の場合においても同様の現象が見られるか確認する。

## 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
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

### 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 23 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システムを作り実践する。
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システムを改善普及させる。
4. 一般の国民に対する金属アレルギーの啓発教育用 Q & A を作成する。

### B. 方法

1. 金属 P T 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 P T 試料の適正について、市販診断薬の再検討を行う。
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。

### C. 結果と D. 考察

### E. 結論と今後の予定

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23年度  
第2回 班会議  
抄録集

日時：平成23年11月7日（月）

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

### 研究成果および研究計画の発表

#### 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  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・薬効解析学分野

「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

「ヒト金属アレルギーと金属アレルギーモデルマウスの相同性」  
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) 15:00-15:20  
東北大学加齢医学研究所・生体防御学

Break 15:20-15:40

#### セッション2.

「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 レポーターマウスの作製」  
大津 浩 (分担研究者) 15:40-16:00  
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) 16:05-16:25  
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 : 25 – 16 : 45

---

セッション3.

「金属アレルギーを示す皮膚疾患とその病態」

戸倉 新樹 (分担研究者) 16 : 45 – 17 : 05  
浜松医科大学・医学部・皮膚科

「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」

宮地 良樹 (分担研究者) 17 : 10 – 17 : 30  
京都大学・医学研究科・皮膚科

Break 17 : 30 – 17 : 50

---

「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) 17 : 50 – 18 : 10  
藤田保健衛生大学・医学部・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 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・薬効解析学分野 准教授

### 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ものの、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依然として不明である。特に、金属の抗原提示や交差反応の分子機構はほとんど明らかにされていない。最近我々は、金属塩と lipopolysaccharide (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ことができる動物実験モデル (DC 移入型金属アレルギーマウスモデル) を確立した。本研究では、このマウスモデルを用いて、金属の抗原提示及び交差反応における樹状細胞の役割について検討を行った。

### B. 方法

マウス (C57BL/6 及び  $\beta 2$  ミクログロブリン ( $\beta 2m$ )  $-/-$ ) 由来の骨髄細胞を 10 ng/ml GM-CSF で 9 日間処理し、DC を得た。この DC を金属塩 (0.2 mM 塩化パラジウム ( $PdCl_2$ ) 及び 0.1 mM 塩化ニッケル ( $NiCl_2$ )) と 20 ng/ml LPS で 24 時間処理した。対照の DC には PBS を処理した。これらの DC を PBS とメディウムで良く洗浄したのち、C57BL/6 マウスに尾静脈注射により移入した ( $5 \times 10^5$  個/マウス)。10 日後に金属塩溶液 (1 mM  $PdCl_2$ 、1 mM 又は 5 mM  $NiCl_2$ 、及び 1 mM 塩化コバルト ( $CoCl_2$ )) 15  $\mu$ l をマウスの耳介に皮内注射し、24 時間後に耳の腫脹を測定した。また、DC 表面上の MHC class I、MHC class II、CD11c、CD80 及び CD86 の発現を、フローサイトメーターを用いて解析した。

### C. 結果

1. Pd+LPS 処理 DC を移入したマウスは  $PdCl_2$  のみならず  $NiCl_2$  及び  $CoCl_2$  でも炎症が惹起された。その際、 $CoCl_2$  は、 $PdCl_2$  や  $NiCl_2$  よりも激しい炎症を誘導した。
2. Pd+LPS の場合とは異なり、Ni+LPS で処理した  $\beta 2m$   $-/-$  由来 DC を移入されたマウスでは、Ni challenge による金属アレルギー反応が、コントロールの B6 由来 DC を移入されたマウスと同程度に誘導された。

### D. 考察

Pd は Ni や Co と交差反応を起こすことが知られているが、活性化 DC を介した感作は、これらの金属イオン間の交差反応を誘導することが示唆された。また、Ni+LPS で処理した  $\beta 2m$   $-/-$  DC を移入したマウスにおいて Ni アレルギーが誘導されたことから、Ni アレルギーの発症には MHC class I を介さない経路が関与することが示唆された。

### E. 結論

Pd の情報を持つ DC に感作された場合、Pd のみならず Ni や Co にも反応してしまう可能性が示唆された。Ni アレルギーの感作には MHC class I を介する抗原提示能は必要ない。

### F. 今後の方針

4. Pd, Ni, Co, Ag, Cr など複数の金属イオン間の交差反応における DC の役割を、DC 移入型金属アレルギーマウスモデルを用いて検討する。
- 上記金属が誘導する金属アレルギー反応及び交差反応における DC の抗原提示の重要性、特に MHC class I 及び MHC class II の役割について、 $\beta 2m$   $-/-$  マウスや I-Ab  $-/-$  マウス由来 DC を用いて検討する。

## 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
	中村 恭平	東北大学大学院医学系研究科・血液免疫病学分野 大学院生
	青島 有佑	東北大学大学院工学研究科・医用材料工学分野 大学院生

### A. 研究目的

金属アレルギーは、遅延型過敏反応とされ T 細胞主体のアレルギー反応とされている。我々は、金属アレルギーマウスモデルを用いて、金属アレルギーの病態、発症における分子の変化を時系列的に解析し、新規診断、予防、治療法の開発を目指すことを目的としている。前回までに CD8<sup>+</sup> T 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生がパラジウム (Pd) アレルギーの誘導に関与することが示唆されたことから、CD8<sup>+</sup> T 細胞の活性化により発現誘導される共刺激分子およびそのリガンドの関与について検討した。また、NK 細胞が樹状細胞から MHC class II を獲得するという現象を捉えたことから、MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞が遅延型アレルギー反応の誘導においてどのような作用を及ぼすかについて検討した。

### B. 方法

- 1) Pd アレルギー誘導マウスの所属リンパ節細胞の養子移入を繰り返したヌードマウスの耳介に Pd 溶液を投与 (0.5 mM PdCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ l/ear \* 2/head) 後、15 時間目に顎下リンパ節を採取し、フローサイトメトリーにより IFN- $\gamma$  産生細胞を解析した。
- 2) BALB/c マウスの耳介に金属溶液を投与 (10 mM PdCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ l/ear \* 2/head) 後、3 時間目に耳介組織を採取し、totalRNA を抽出、cDNA を合成後、real-time PCR により、共刺激分子リガンドの発現を評価した。
- 3) 共刺激分子リガンドのトランスジェニックマウスまたは C57BL/6 マウス (コントロール) にパラジウム (Pd) を用いて感作 (10 mM PdCl<sub>2</sub> / 10  $\mu$ g/ml LPS, 250  $\mu$ l/head, i.p.)・惹起 (0.5 mM PdCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ l/ear \* 2/head) により金属アレルギーを誘導し、耳介の腫脹を測定した。
- 4) C57BL/6 マウス脾臓から NK 細胞および樹状細胞を採取し、NK 細胞を IL-2 存在下 (1000 units/ml) で培養後、96 well plate にて樹状細胞と共培養した (それぞれ 5 x 10<sup>5</sup> cells/well)。その後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。
- 5) OT-II マウスから CD4<sup>+</sup> T 細胞を採取・調整後、10 ng/ml OVA<sub>323-339</sub> 存在下で 3 日間培養した骨髄樹状細胞 (OVA-loaded BMDC) と共に C57BL/6 マウス足蹠に皮下注射により移殖し、遅延型アレルギー反応を誘導した。その際、MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞または MHC class II<sup>-</sup> NK 細胞を同時に移植し、コントロール (OVA-unloaded BMDC) 移殖群と足蹠の腫脹を比較した (CD4<sup>+</sup> T 細胞 : BMDC : NK 細胞 = 6 x 10<sup>6</sup> : 2 x 10<sup>7</sup> : 1 x 10<sup>7</sup>)。

### C. 結果

- 1) CD8<sup>+</sup> T 細胞において共刺激分子の発現が誘導され、CD8<sup>+</sup> T 細胞のほとんどの細胞から IFN- $\gamma$  産生を検出した。
- 2) 耳介組織への金属投与により、共刺激分子リガンドの発現が有意に上昇した。
- 3) 共刺激分子リガンド Tg マウスにおいて、耳介の腫脹が有意に抑制された。
- 4) 5 分間の共培養により、MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞が出現した。
- 5) OT-II マウスから得た CD4<sup>+</sup> T 細胞を OVA-loaded BMDC と共移殖した場合、足蹠の腫脹が観察された。これに対し MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞を共移殖した場合、足蹠の腫脹は有意に減少した。MHC class II<sup>-</sup> NK 細胞を共移殖した場合には、腫脹の減少が抑えられた。

### D. 考察

- 1) 共刺激分子を介したシグナルにより T 細胞から IFN- $\gamma$  が誘導されることが、Pd アレルギー誘導において重要であることが考えられる。
- 2) 金属投与により共刺激分子リガンドの発現が上昇したことから、金属アレルギーにおいて金属投与部位において発現誘導された共刺激分子リガンドからの CD8<sup>+</sup>T 細胞上の共刺激分子へのシグナル伝達が重要であることが示唆された。
- 3) 共刺激分子リガンド Tg マウスにおいて Pd アレルギーの誘導が抑制されたことから、共刺激分子が Pd アレルギーの誘導において重要な役割を持つことが示唆された。
- 4) NK 細胞と樹状細胞の共培養により MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞が出現したことから、NK 細胞が樹状細胞から MHC class II 分子を獲得していると考えられる。
- 5) MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞を共移植した場合に、足蹠の腫脹が抑えられたこと、MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞の共移植ではその抑制が解除されたことから、NK 細胞が MHC class II 分子を獲得することが遅延型アレルギー反応における抗原提示を抑制する可能性が示唆された。このことから、金属アレルギーの抗原提示においても、MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞が関与する可能性が考えられる。

#### **E. 結論**

- Pd アレルギーにおいて、金属投与部位において発現誘導される共刺激分子リガンドからの CD8<sup>+</sup> T 細胞上の共刺激分子へのシグナル伝達を介した IFN- $\gamma$  産生が重要である。
- 遅延型アレルギー反応において、NK 細胞が MHC class II 分子を獲得することが抗原提示を抑制する可能性がある。

#### **F. 今後の方針**

- ① Pd アレルギー誘導に関わる T 細胞について、T 細胞ハイブリドーマを作成・クローニングし、*in vitro* における反応系を構築する。
- ② 金属アレルギー誘導系において、MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞が抑制的に働くか否かを検討する。
- ③ Pd + LPS 処理 BMDC から Pd に反応性を有するペプチドを採取・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 にかけて、アミノ酸配列を決定する。



## ヒト金属アレルギーと金属アレルギーモデルマウスの相同性

分担研究者：

鈴木隆二

独) 国立病院機構相模原病院・臨床研究センター・室長

研究協力者：

熊谷賢一

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

小林浩・江口貴紀・重松宏昭

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

### A 研究目的

ヒトの金属アレルギーはIV型アレルギー反応として報告されているが、その詳細な分子機構は未だ不明な点が多く、解明が求められている。

前回、既存のモデル系マウスをより安定した系に一部改変し、ヒト金属アレルギーで報告されているような特異的 T 細胞の浸潤が確認される事を報告してきた。今回は、ヒトの金属アレルギーとの相同性を明らかにするために、時間経過に伴う病理組織学的検討を中心に評価を行い、併せて、浸潤した T 細胞の特異性に関して TCR レパトア解析を指標に詳細に検討した。

我々は金属アレルギーにおける T 細胞と病態形成の因果関係を明らかにすることで新規診断および治療に寄与する事を目的としている。

### B 方法

改変モデルマウス足蹠部のサイトカインプロファイル (T cell markers, Th1,2-type cytokines, chemokines and chemokine receptors, Apoptosis factors) 及び組織学的変化(HE,CD3,CD4,CD8)を定量的 PCR 法・免疫組織化学的染色法にて時系列的に調査した。同時に TCR レパトア解析を行った。

### C.結果

誘導注射(10 mM PdCl<sub>2</sub> 25ml i.d.)後 1 週間のマウス足蹠部では CD3,CD4,CD8 を始めとする T cell マーカーおよびケモカインマーカーの有意な上昇が認められた。また、Th1/Th2 cytokine balance においては Th1-type cytokines の優位性を認め、アポトーシス因子においては Perforin,GranzymeA,B に差異は認められないものの Fas においては有意差を伴って上昇を認めた。病理組織的所見においても誘導注射後 1 週間のマウス足蹠部は T 細胞の明らかな上皮内・上皮浸潤と上皮組織構造の破壊を認めた。細胞浸潤は経時的に認められ、CD4 陽性細胞が主をなしていた。また、Vα18.1 および Vβ8.2 の skew が確認され、クローナルな増殖が示唆された。

### D.考察

我々の作製した改変モデルマウスは

- ・ヒト金属アレルギー患者で報告されている様な特異的 T 細胞の浸潤
- ・サイトカインプロファイルより Th1 type CD4 依存性の過敏反応を起こしている可能性の示唆
- ・病変部への T 細胞浸潤像と上皮組織破壊像の出現

といった特徴を有しており、ヒトの金属アレルギーで報告されている状態に近似していると考えられる。

### E.結論

我々の作製した改変モデルマウスはよりヒトの金属アレルギーに近似したモデルである可能性がある。

### F.今後の方針

- ・TCR repertoire 解析系による異種金属(NiCl<sub>2</sub> etc)における T 細胞動態差異の調査および交差性の確認。
- ・炎症部局所に浸潤している特異的 T 細胞のクローニングの検討。

## 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 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  
佐藤 睦 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

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、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。この遺伝子のレポーター動物を BAC を利用して作製し金属アレルギー関連の研究に貢献する。

### B. 方法

#### 1. ヒトのサンプルの金属濃度測定：

添加実験：ヒト・サンプルは貴重であり、実験全体の精度および感度を理想的な状態にしてから測定することが重要である。そのために市販の牛乳（デイリーヤマサキ 3.6 牛乳）を購入し、ニッケルおよびパラジウムの添加実験をおこなう事とする。そのために、ニッケル標準液（100 ppb）あるいはパラジウム標準液（1000 ppm）を添加し、最終濃度を 0 ppb、1 ppb、10 ppb、100 ppb、1000 ppb (=1 ppm) にする。サンプルの分析は工学研究科技術部合同計測分析班に現在依頼中であり、今週中に ICP/MS にて測定結果が出る予定である。その後、同じサンプルを成島研の ICP/MS と、ICP/AES で測定し、それぞれの方法の精度、感度を比較する。

実際のサンプル：加古川医療センター皮膚科足立厚子先生に検体を送ってもらい冷凍保存中である。サンプル 2 例を ICP/MS にて測定予定。

1 例：母乳採取し（20 ml）、今後東北大に送付され冷凍保存した。

1 例：掌蹠膿疱症の中年女性 ニッケルパラジウム強陽性 1 カ月制限後の汗を再度採取し、冷凍保存。

#### 2. レポーターマウスの作製：

Neomycin 耐性遺伝子を抜いた HDC-BAC (HDC 遺伝子上流 120 Kb および下流 146 Kb を含む) を BDF1 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

1. 添加試験の計画および添加までは進んでおり今週中に技術部での実験結果が出る。
2. マウスの数を増やすところまで進んでいる。

系統 1：

HDC-BAC-Tg (F0) ♀BDF1 × wild ♂C57B6 → 10 匹 (F1) TG mice (20 w)

系統 2：

HDC-BAC-Tg (F0) ♂BDF1 × wild ♀C57B6 → 12 匹 (F1) TG mice (10-12 w)

マウスは多くできてきており、パラフィン包埋予定。東北大学医学系研究科共同実験室（共通機器室）の実験動物病理プラットフォームで組織標本の作製を依頼予定。GFP 蛍光を確認する。

その後、TMN (tuberomammillary nucleus) 細胞を FACS-array profiling などを行うつもりである。

そして Tg mice をそののちに増やす。

### D. 考察

HDC reporter mouse に関しては作製の途中である。すでに 2 系統出来ているが、今後あと 1 系統用意する。

### E. 結論

金属アレルギー患者サンプルを集めて、実際に食物から入った金属を検知可能かどうか調べる。

また 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

実際の臨床サンプルでの測定をして、病勢と測定金属濃度との間の関係について考察する。

HDC レポーターマウスの作製をさらにすすめ、今後の金属アレルギーの実験に供する。

## 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金属線を埋入するモデルを作成し、金属イオン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、医用金属材料を長期間マウスに埋入したときの金属溶出、さらにはアトピー性皮膚炎患者の汗中の金属イオン濃度を測定して、生体サンプル中の金属測定の意義を明確にするとともに、NHE 阻害薬と抗炎症薬の金属溶出に対する作用を比較して薬物による金属溶出阻害の方法論の確立することを目的とした。

### B. 方法

#### 1) 医用金属材料からの金属溶出

雄性 C57BL/6 マウス (6 wks) の背部皮膚に Co-Cr-Mo-Ni 線を埋入し、2 週間後、金属線周囲組織中のニッケル、コバルト、クロム、モリブデンの濃度を ICP-MS 法を用いて測定した。

#### 2) アトピー性皮膚炎患者の汗中の金属イオン濃度の測定

尾藤博士により採取された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 により測定した。

#### 3) ニッケル線からのニッケル溶出に対する抗炎症薬の効果

雄性 C57BL/6 マウス (6 wks) に、dexamethasone (3 mg/kg)、NHE 阻害薬である amiloride (30 mg/kg)、dimethylamiloride (10 mg/kg)、ethylisopropylamiloride (10 mg/kg) を経口投与し、その 1 時間後に背部皮膚にニッケル線を埋入した。8 時間後にニッケル周囲組織を採取し、ニッケル濃度を測定した。

### C. 結果

1) CCM 線を埋入し、2 週間後では金属線周囲組織に弱いながら炎症が生じた。特にコバルトの溶出が顕著であった。

2) アトピー性皮膚炎患者の汗中にはニッケル、コバルト、クロムの濃度に明らかな相違があり、特に IgE レベルが低い患者において金属濃度が高い傾向が見られた。

3) Amiloride ならびにより NHE に選択的な dimethylamiloride および ethylisopropylamiloride はニッケルの溶出に対し抑制傾向を示した。

### D. 考察

組織中並びに汗中の金属イオンの測定は、金属の安全性の評価、金属アレルギーの診断に有用である事が示唆された。また、amiloride だけでなく、より NHE に選択的な 2 つの薬物においてもニッケル溶出が減少した事から、抗炎症作用に基づく作用ではなく、金属溶出を直接的に抑制しているものである事が示唆された。

### E. 結論

金属アレルギーの予防、診断、そして治療薬の開発に金属の高感度測定が有用である事が明らかになった。

### F. 今後の方針

炎症細胞による金属溶出の分子機序を明らかにし、その標的を確定する。また臨床診断への金属イオンの測定の意義を明らかにするため、さらに測定例を増加する。

## 金属アレルギーを示す皮膚疾患とその病態

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	鬼頭 由紀子	浜松医科大学医学部皮膚科	助教
	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

### 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アレルギー性の通常型であり、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。しかし、従来の内因性 AD は非アレルギーであるとの考えは誤りであり、Th1 も誘導する何らかの抗原が増悪因子になっていると考えられる。またその他の皮膚疾患においても金属がアレルギー機序で関わっていることがあり、患者情報の集積と病態について検討を加えたい。

### B. 方法

#### 1. 皮膚バリア機構に関わるフィラグリンのプロフィラグリンからのプロセッシング過程

外界からの金属に対する皮膚反応は皮膚バリアの破綻に影響されないという仮説を我々はもっている。皮膚バリアの重要な因子としてフィラグリンがあり、プロフィラグリンからプロテアーゼの働きで作られる。このプロフィラグリンのプロセッシングに関わる酵素の同定を試みた。マウス表皮細胞からプロテアーゼを抽出し、フィラグリンモノマーを繋ぐリンカーを切断する活性を検討した。

#### 2. 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

1. プロフィラグリンのプロセッシング酵素としてカリクレイン 5 (KLK5) を同定した。現在までに SASPase、matriptase なども候補に挙がっており、どのようにトリマー、ダイマー、モノマーを形成していくかが今後の問題となる。

2. 浜松医大で新たに、金属パッチテストを内因性 AD と他の皮膚疾患 7 例で実施した。内因性 AD 患者に陽性者がおり、産業医大での結果を裏付けた。汗中の金属濃度の測定も神戸大尾藤講師の協力で行なった。

### D. 考察、結論

フィラグリンが正常な内因性 AD では金属アレルギーが高頻度である。

### E. 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。また他の皮膚疾患での金属アレルギー症例の集積を継続する。

## 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 宮地 良樹 京都大学・医学研究科・皮膚科 教授  
研究協力者 梶島 健治 京都大学・皮膚科 准教授  
大塚 篤司 京都大学・皮膚科 特別研究員

### 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。接触皮膚炎は、樹状細胞やT細胞が重要な役割を果たすことは疑いないが、好塩基球の役割については全く解っていない。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好塩基球の役割、相互作用を検証することを本研究の目的とする。

### B. 方法

好塩基球をジフテリアトキシン依存的に除去させるマウスモデル(Bas TRECK Tg マウス)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好塩基球の役割を検証する。またアトピー性皮膚炎モデルの一つである反復塗布モデルを用いて検討する。

### C. 結果

Bas TRECK Tg マウスにジフテリアトキシン処理後、好塩基球のみ除去された状態で接触皮膚炎を確認したところ野生型と同程度の接触皮膚炎反応が起こることが明らかとなった。一方、反復塗布を行った Bas TRECK Tg マウスでは野生型に比べ接触皮膚炎反応が減弱することが明らかとなった。また、反復塗布モデルではリンパ節中の好塩基球に MHC class2 の発現および共刺激分子の発現が見られ、一部 IL-4 陽性細胞も確認できた。

### D. 考察

好塩基球がハプテン反復塗布モデルで重要な働きをしていることが明らかとなった。

### E. 結論

好塩基球は接触皮膚炎反応には関与せず、アトピー性皮膚炎モデルでは重要な役割を果たすことが明らかとなった。更には好塩基球が反復塗布モデルにおいて Th2 反応誘導に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

### F. 今後の方針

今回は感作源としてハプテンを用いたが、金属抗原の場合においても同様の現象が見られるか確認する。また樹状細胞との相互作用について検証する。

## 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
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

### 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。

今年度は金属の PT の診断方法を確立し、教育・普及することを目的とした。

### B. 方法

1. 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会会員に 2010 年 4 月から 2011 年 3 月までの 1 年間の金属アレルギーの実態を全国規模で調査する。
2. 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会と共催で年 3 回の金属アレルギー診断のための教育 WS・セミナーを全国規模で行う。
3. 歯科医師と皮膚科医師が連携すべき歯科金属アレルギーの診断方法を分かりやすく記載したパンフレットを作成する。
4. 金属アレルギーの啓発教育用 Q&A を作成する。

### C. 結果と D. 考察

1. 2010 年 4 月から 1 年間に全国 77 施設から 923 例のパッチテスト・プリックテストによりアレルギー性接触皮膚炎と診断した症例が報告された。女性 787 例、男性 136 例であった。そのうち原因が装身具であったものは 4.3%、その他の金属であったものが 3.3%であった。
2. 2010 年 4 月から 1 年間に全国 75 施設から 1879 例のジャパニーズスタンダード貼布例の報告があり、男性 425 例、女性 1454 例であった。その陽性率のトップは硫酸ニッケルで 14.2%、第 3 位が重クロム硫酸カリウムで 8.3%、第 4 位が塩化コバルト 7.6%、第 6 位が塩化第二水銀で 5.7%、第 12 位が金チオ硫酸ナトリウムで 3.0%であった。水銀を含む殺菌剤であるチメロサルは第 11 位で 3.4%であった。これらの陽性率の年次推移を検討すると 1993 年から 2009 年までは徐々に減少していたが、2010 年度は多くの金属が再び増加の傾向を示した。
3. Visual Dermatology 誌に「最新・歯科と連携して治す皮膚疾患」の特集を組み、分かりやすい解説書を作成することができた。その中で PT の理論と実際、歯科金属アレルギーの対応、歯科金属からのイオン溶出と測定、金属アレルギーに配慮した歯科用補綴の選択とその問題点、金属アレルギーの免疫学 Up-to-date などを解説できた。
4. 皮膚科医・歯科医連携 WS、皮膚科医への皮膚アレルギーセミナーを企画した。

### E. 結論と今後の予定

金属は 2010 年の全国調査で、最も重要なアレルゲン 24 種のうち上位を占めた。PT で確定診断したアレルギー性接触皮膚炎の原因製品のうち、7.6%が金属によるものであった。金属 PT に必要な参考資料を作成できたので、今後、これを使って、全国で教育・普及のための WS およびセミナーを行う予定である。また、PT の精度向上の研究は、継続して行っていく。

## IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年	報告書に掲載
1	<u>Nakayama M</u> , Takeda K, <u>Kawano M</u> , Takai T, Ishii N, <u>Ogasawara K</u>	Natural Killer (NK)-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4+ T cells.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	108 (45)	18360-18365	2011	*
2	Yamada H, Hamada Y, Fujihara H, Fukami K, Mishima K, Nakaoka K, <u>Kumagai K</u> , Imamura E	Solitary fibrous tumor of the buccal space resected in combination with coronoidectomy.	Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod		(in press)	2011	
3	Kitaura K, Fujii Y, Hayasaka D, Matsutani T, Shirai K, Nagata N, Lim CK, Suzuki S, Takasaki T, <u>Suzuki R</u> , Kurane I	High Clonality of Virus-Specific T Lymphocytes Defined by TCR Usage in the Brains of Mice Infected with West Nile Virus.	J Immunol	187	3919-30	2011	*
4	Fujii Y, Hayasaka D, Kitaura K, Takasaki T, <u>Suzuki R</u> , Kurane I	T-Cell Clones Expressing Different T-Cell Receptors Accumulate in the Brains of Dying and Surviving Mice After Peripheral Infection with Far Eastern Strain of Tick-Borne Encephalitis Virus.	Viral Immunol	24	291-302	2011	*
5	<u>Kumagai K</u> , Horikawa T, Gotoh A, Yamane S, Yamada H, Kobayashi H, Hamada Y, <u>Suzuki R</u>	Up-regulation of EGF receptor in keratinocytes and its ligands in infiltrating lymphocytes in the lesions of oral lichen planus.	Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod	110	748-54	2010	*



6	<u>Kumagai K</u> , Hamada Y, Gotoh A, Kobayashi H, Kawaguchi K, Horie A, Yamada H, <u>Suzuki R</u>	Evidence for the changes of antitumor immune response during lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma.	Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod	110	341-50	2010	*
7	Matsumoto K, <u>Nishiya T</u> , Maekawa S, Horinouchi T, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S	The ECS(PSB) E3 ubiquitin ligase is the master regulator of the lifetime of inducible nitric-oxide synthase.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	409 (1)	46-51	2011	*
8	Numajiri N, Takasawa K, <u>Nishiya T</u> , Tanaka H, Ohno K, Hayakawa W, Asada M, Matsuda H, Azumi K, Kamata H, Nakamura T, Hara H, Minami M, Lipton S, Uehara T	On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of PTEN.	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	108 (25)	10349 -10354	2011	*
9	Horinouchi T, Terada K, Higa T, Aoyagi H, <u>Nishiya T</u> , Suzuki H, Miwa S : Function and regulation of endothelin type A receptor-operated transient receptor potential canonical channels.	Function and regulation of endothelin type A receptor-operated transient receptor potential canonical channels.	J. Pharmacol. Sci.	117 (4)	295-306	2011	*
10	Horinouchi T, Higa T, Aoyagi H, <u>Nishiya T</u> , Terada K, Miwa S	Adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A signaling pathway inhibits endothelin type A receptor-operated Ca <sup>2+</sup> entry mediated via TRPC6 channels.	J. Pharmacol. Exp. Ther.	340 (1)	143-151	2012	*
11	Asano H, Horinouchi T,	Nicotine- and Tar-Free	J.		(in press)	2011	*

	Mai Y, Sawada O, Fujii S, <u>Nishiya T</u> , Minami M, Katayama T, Iwanaga T, Terada K, Miwa S	Cigarette Smoke induces cell damage through reactive oxygen species newly generated by PKC-dependent activation of NADPH oxidase.	Pharmacol. Sci.				
12	Tanaka R, Goi Y, Ishihara K, Ueda K, Narushima T, <u>Ohtsu H</u> , Ohuchi K, Hiratsuka M, <u>Hirasawa N</u>	Assessment of the release of nickel from biomaterials in vivo and in vitro: enhancement by lipopolysaccharide.	Inflam Regene	31	302-306	2011	
13	Fan YY, Hu WW, Dai HB, Zhang JX, Zhang LY, He P, Shen Y, <u>Ohtsu H</u> , Wei EQ, Chen Z	Activation of the central histaminergic system is involved in hypoxia-induced stroke tolerance in adult mice.	J Cereb Blood Flow Metab	31	305-314	2011	
14	Wang KY, Tanimoto A, Guo X, Yamada S, Shimajiri S, Murata Y, Ding Y, Tsutsui M, Kato S, Watanabe T, <u>Ohtsu H</u> , Hirano K, Kohno K, and Sasaguri Y	Histamine deficiency decreases atherosclerosis and inflammatory response in ApoE-KO mice independently on serum cholesterol level.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	31	800-807	2011	*
15	Tanaka R, Goi Y, Ishihara K, Ueda K, Narushima T, <u>Ohtsu H</u> , Hiratsuka M, <u>Hirasawa N</u>	Enhancement of nickel elution by lipopolysaccharide-induced inflammation.	J Dermatol Sci	62	50-57	2011	
16	Krusong K, Ercan-Sencicek AG, Xu M, <u>Ohtsu H</u> , Anderson GM, State MW, Pittenger C	High levels of histidine decarboxylase in the striatum of mice and rats.	Neurosci Lett	495	110-114	2011	
17	Nijima-Yaoita F, Tsuchiya M, <u>Ohtsu H</u> , Yanai K, Sugawara	Roles of Histamine in Exercise-Induced Fatigue: Favouring Endurance and	Biol Pharm Bull	35	91-97	2012	*

	S,Endo Y, and Tadano T	Protecting Against Exhaustion.					
18	Chepkova A, Yanovsky E, Parmentier R, <u>Ohtsu H</u> , Haas HL, Lin JS, Sergeeva OA	Histamine Receptor Expression, Hippocampal Plasticity and Ammonia in Histidine Decarboxylase Knockout Mice.	Cell Mol Neurobiol	32	17-25	2012	*
19	He G, Hu J, Li T, Ma X, Meng J, Jia M, Lu J, <u>Ohtsu H</u> , Chen Z, Luo X	Arrhythmogenic effect of sympathetic histamine in mouse hearts subjected to acute ischemia.	Mol Med	18	1-9	2012	*
20	<u>Ohtsu H</u>	Pathophysiologic Role of Histamine; Evidence Clarified by Histidine Decarboxylase Gene Knockout Mice. (review)	Int Arch Allergy Immunol		(in press)	2012	
21	Mizuno N, Suzuki T, <u>Hirasawa N</u> , Nakahata N	Hetero-oligomerization between adenosine A1 and thromboxane A2 receptors affects cellular signal transduction on stimulation with high and low concentrations of agonists for both receptors	Eur. J. Pharmacol.	677	5-14	2012	
22	Satou N, Ishihara K, Hiratsuka M, Tanaka H, Endo Y, Saito S, Iwatate Y, Leonard WJ, <u>Hirasawa N</u>	Induction of thymic stromal lymphopoietin production by xylene and exacerbation of picryl chloride-induced allergic inflammation in mice	Int. Arch. Allergy Immunol.	157	194-201	2012	
23	Tanaka R, Goi Y, Ishihara K, Ueda K, Narushima T, Ohtsu H, Ohuchi K, Hiratsuka M, <u>Hirasawa N</u>	Assessment of the release of nickel from biomaterials in vivo and in vitro: enhancement by lipopolysaccharide	Inflam. Regene	31	302-306	2011	
24	Tanaka R, Goi Y, Ishihara K, Ueda K,	Enhancement of nickel elution by	J. Derm. Sci	62	50-57	2011	*

	Narushima T, Ohtsu H, Hiratsuka M, <u>Hirasawa N</u>	lipopolysaccharide-induced inflammation					
25	Hong J, Aoyama S, <u>Hirasawa N</u> , Zee O, Ishihara K, Hashida C, Kimura M, Seyama T, Ohuchi K	Suppression of intracellular calcium levels and inhibition of degranulation in RBL-2H3 mast cells by the sesquiterpene lactone parthenolide	Planta Medica	77	252-256	2011	
26	Sato N, Ishihara K, Hiratsuka M, <u>Hirasawa N</u>	Induction of thymic stromal lymphopoietin by chemical compounds in vivo and exacerbation of allergy	Inflam. Regene	31	184-188	2011	
27	Tamaki Y, Honda M, Muroi Y, Arai T, Sugimura H, Matsubara Y, Kanno S, Ishikawa M, <u>Hirasawa N</u> , Hiratsuka M	Novel Single Nucleotide Polymorphism of the CYP2A13 gene in Japanese individuals.	Drug Metabolism & Pharmacokinetics	26	544-547	2011	
28	Tamaki Y, Arai T, Sugimura H, Sasaki T, Honda M, Muroi Y, Matsubara Y, Kanno S, Ishikawa M, <u>Hirasawa N</u> , Hiratsuka M	Association between Cancer Risk and Drug Metabolizing Enzyme Gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) Polymorphisms in Japanese Cases of Lung Cancer.	Drug Metabolism & Pharmacokinetics	26	516-522	2011	
29	Honda M, Muroi Y, Tamaki Y, Saigusa D, Suzuki N, Tomioka Y, Matsubara Y, Oda A, <u>Hirasawa N</u> , Hiratsuka M	Functional characterization of CYP2B6 allelic variants in demethylation of anti-malarial artemether.	Drug Metab. Dispos.	39	1860-1865	2011	
30	Akaza N, Akamatsu H, Kishi M, Mizutani H, Nakata S, <u>Matsunaga</u>	Normal human epidermal keratinocytes react differently than HaCaT	J Dermatol	38 (5)	499-502	2011	