

1) Ni アレルギーモデルマウス作製

Ni アレルギーマウスモデル確立のための条件検討を行ったところ、感作2回、誘導3回の条件では足底部の腫脹が他の条件と比較した中で最大であった(図1-A)。また、CD3の発現量を解析したところ感作2回、誘導3回の条件では、対照群と比べて誘導後3日目から有意に上昇し7日目で最大となった(図1-B, C)。他の条件では対照群と比較して有意な変化は無かった。

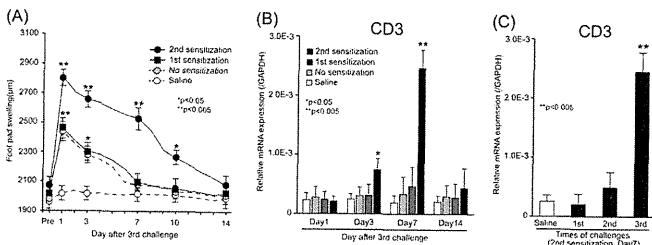


図1: 感作誘導の条件検討 (A) 足底腫脹 (B) CD3の誘導回数における時系列変化 (C) 感作回数におけるCD3の変化

2) 病理組織学的解析・免疫組織化学的解析

CD3の発現量が最大であった感作2回、誘導3回後7日目の足底部をHE染色による病理組織学的解析ならびに、CD3、CD4、CD8免疫染色による免疫組織化学的解析したところ、細胞浸潤を広範囲に認め(図2-C, D)、CD3のシグナルはヒト金属アレルギーと同じく上皮基底層周囲に認めた(図2-F, G)。興味深いことに上皮基底層周囲のT細胞はCD4、CD8共にnegativeであった(図2-H, I, J)。

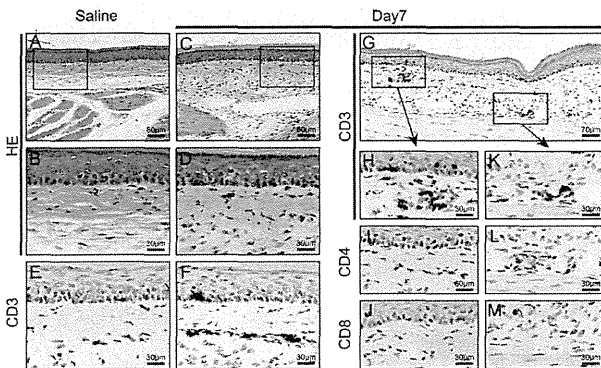


図2: HE染色、免疫染色 (CD3, CD4, CD8) 対照群 (A, B, E)、実験群 (C, D, F-M)

3) TCR repertoire 解析

Niによって集積してきたT細胞を明らかにするためにTCR repertoire解析を行った。TCR repertoire解析の結果より Va14-1及び、Vb8-2の発現頻度が対照群と比較して有意に上昇していた(図3)。

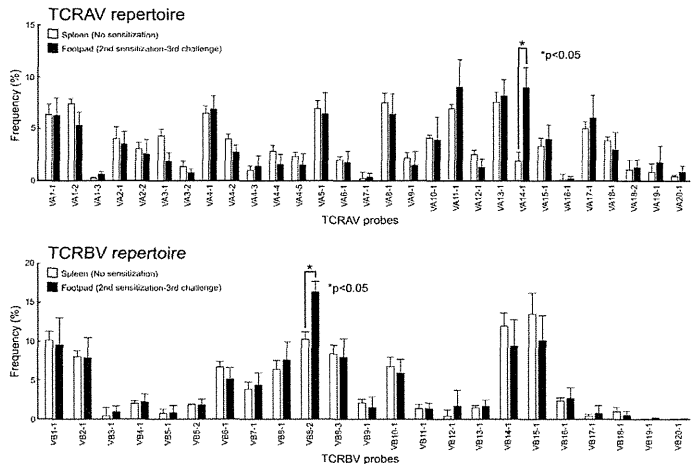


図3: TCR repertoire 解析 (上) TCR a, (下) TCR b

4) Complementarity determining region 3 (CDR3) 領域におけるシーケンス解析

TCR repertoire解析の結果より Va14-1及び、Vb8-2の発現頻度が対照群と比較して有意に高いことから、この2つのファミリーのCDR3領域の解析を行った。Va14-1においては全ての個体で高頻度に invariant なアミノ酸配列である Va14Ja18が検出された(表1-A)。Vb8-2では全ての個体で全く同じアミノ酸配列は検出できなかったが、Jb2.7が高頻度に検出された(表1-B)。この結果はNKT細胞が誘導されたことを示唆する結果であった。

Footpad	Clonal frequency	V	N	J	J gene
#1	14/14	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
#2	12/13	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
	1/13	CVG	LL	NSGGSNYKLTFG	AJ53
#3	13/14	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
	1/14	SVV	W	ASSFSKLVFG	AJ50
#4	16/16	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
#5	9/11	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
	1/11	CVV	G	ATGGNNKLTFG	AJ56
	1/11	CVV	GA	DSGYNKLTFG	AJ11
#6	15/15	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
#7	12/15	CVV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18 ^{a)}
	1/15	CVV	V	DRGSALGRLHFG	AJ18
	1/15	CAV	G	DRGSALGRLHFG	AJ18
	1/15	CV	V	VNTGNYKYVFG	AJ40

^{a)}Identical sequences were detected in different individual mice.

表1-A: Va14-1 CDR3 領域シーケンス

Sample	Number of clone	TCRBJ gene usage in TCRBV8-2 (%)													
		1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.7	
Footpad	#1	12	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0	8.3	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	75.0
	#2	15	0.0	0.0	13.3	13.3	0.0	13.3	0.0	0.0	0.0	0.0	13.3	0.0	46.7
	#3	14	21.4	0.0	14.3	0.0	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	14.3	0.0	42.9
	#4	12	8.3	0.0	41.7	0.0	0.0	8.3	0.0	8.3	0.0	0.0	8.3	0.0	25.0
	#5	14	14.3	0.0	35.7	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.1	0.0	35.7
	#6	11	9.1	9.1	9.1	0.0	0.0	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	63.6
	#7	16	18.8	0.0	12.5	0.0	6.3	6.3	0.0	6.3	0.0	6.3	0.0	0.0	43.8
	mean	10.3	1.3	18.1	4.1	0.9	7.5	0.0	3.3	0.0	0.9	6.2	0.0	47.5	
	SD	8.5	3.4	15.0	5.5	2.4	4.0	0.0	4.1	0.0	2.4	6.3	0.0	16.8	
Spleen	#1	12	8.3	0.0	50.0	8.3	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	16.7	0.0	8.3
	#2	14	14.3	7.1	14.3	7.1	0.0	21.4	14.3	0.0	7.1	7.1	0.0	7.1	0.0
	#3	16	0.0	12.5	6.3	0.0	12.5	6.3	6.3	12.5	6.3	12.5	6.3	6.3	12.5
	#4	11	9.1	0.0	9.1	9.1	0.0	18.2	0.0	9.1	18.2	9.1	9.1	9.1	0.0
	#5	12	0.0	16.7	8.3	16.7	8.3	0.0	16.7	8.3	8.3	0.0	8.3	0.0	8.3
	#6	14	14.3	0.0	14.3	7.1	7.1	7.1	0.0	7.1	0.0	14.3	14.3	0.0	0.0
	#7	15	13.3	6.7	0.0	0.0	13.3	0.0	6.7	13.3	13.3	6.7	6.7	13.3	6.7
	mean	8.5	6.1	14.6	6.9	5.9	8.8	6.3	7.2	7.6	7.1	8.8	5.1	5.1	
	SD	6.3	6.7	16.4	5.7	5.9	8.3	7.0	5.4	6.6	5.6	5.5	5.3	5.1	

ie TCRBJ 2.7 gene usage of footpad was significantly increased than those of spleen (unpaired t-test p<0.05).

表 1-B:Vb8-2 における Jb 領域発現頻度

5) NKT 細胞関連分子・各種サイトカインの解析

NKT 細胞の動態を明らかにするために、NKT 細胞関連分子及び各種サイトカインを測定した。NKT 細胞関連分子 (Va14Ja18、NKG2D、CD161c)、Th1 サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-2) 及び、細胞障害性因子 (FasL、perforin、granzymeA、granzymeB) は誘導後 3 日目で対照群と比較して有意に上昇し 7 日目で最大となった (図 4-A, B, D)。一方 Th2 サイトカインは対照群と比較して有意な変化は無かった (図 4-C)。以上より NKT 細胞は誘導後期に局所に集積し、Th1 偏性で細胞障害を誘導していることが示唆された。

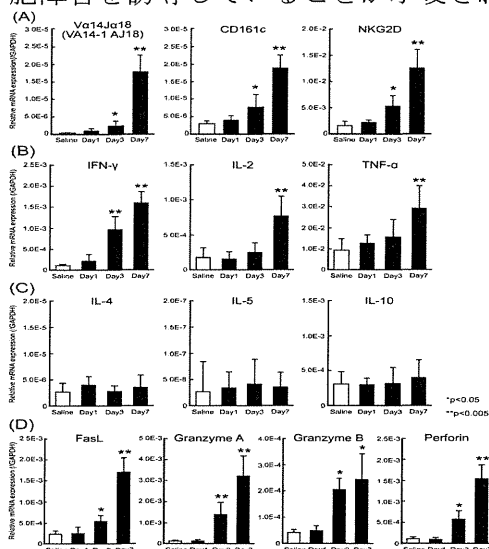


図 4: NKT 細胞関連分子 (A), Th1 サイトカイン (B), Th2 サイトカイン (C), 細胞障害性因子 (D)

D. 考察

マウスに感作、誘導を繰り返し行うことによって Pd と同様に足底部に T 細胞誘導を認める Ni アレルギーマウスモデルを確立した。IV型アレルギー反応は、様々な抗原や環境アレルゲンに繰り返し曝露されることによって惹起される疾患である。Ni アレルギーマウスモデルの確立には一般的なアレルギー惹起の過程と同じように抗原である Ni を繰り返し感作、誘導することが必要であると考えられた。

Ni によって集積した T 細胞は TCR レパトア解析の結果から NKT 細胞であることが示唆された。近年、ヒトのアレルギー性接触性皮膚炎において NKT 細胞の関与が報告されており (Gober MD, et al: J Invest Dermatol. 2008 Jun;128(6):1460-9.)、また、無症状の皮膚に活性化した NKT 細胞を注射すると症状を誘発することから、NKT 細胞は病態惹起に深く関わっていると考えられている (Brian J. Nickoloff et al: Arch Dermatol. 1999;135(5):546-552.)。本研究における Ni アレルギーマウスモデルにおいても NKT 細胞が局所炎症巣に誘導され、Th1/Th2 バランスは Th1 偏性で、細胞障害性因子の発現量が NKT 細胞の発現頻度と比例して増加していることから、NKT 細胞が組織傷害を誘発し病態を惹起している可能性が考えられた。

E. 結論

Ni アレルギーでは NKT 細胞が局所炎症巣に誘導され、病態を惹起している可能性が示唆された。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

- Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai

- K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R. A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. *J Immunol Methods*. 2012 Oct 31; 384 (1-2): 81-91
2. Kurane I, Matsutani T, Suzuki R, Takasaki T, Kalayanarooj S, Green S, Rothman AL, Ennis FA. T-cell responses to dengue virus in humans. *Trop Med Health*. 2011 Dec; 39(4 Suppl): 45-51
 3. Wake M, Hamada Y, Kumagai K, Tanaka N, Ikeda Y, Nakatani Y, Suzuki R, Fukui N. Up-regulation of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor-A in the synovial fluid of temporomandibular joints affected by synovial chondromatosis. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Apr 2. [Epub ahead of print]
 4. Yamada H, Hamada Y, Fujihara H, Fukami K, Mishima K, Nakaoka K, Kumagai K, Imamura E. Solitary fibrous tumor of the buccal space resected in combination with coronoidectomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Jul; 114(1): e9-14
 5. Kazutoshi Nakaoka, Hiroyuki Yamada, Toshikatsu Horiuchi, Tomoyuki Saito, Go Arai, Kenichi Kumagai, Ko Ito, Yoshiki Hamada. A case of simple bone cyst in the mandible with remarkable tooth resorption. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 2012, in press
 6. Minoru Ito, Kenichi Kumagai, Nobuoki Sakai, Yutaka Fukushima, Yoshiki Hamada. Penetrating transoral cranial injury by a chopstick through the jugular foramen: report of a case. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 24, 2, 101-105, 2012
- ## 2. 学会発表
- ### 国内学会
1. 熊谷賢一, 藤井恵介, 北浦一孝, 江口貴紀, 重松宏昭, 岸 悠太, 山田浩之, 川口浩司, 鈴木隆二, 濱田良樹「口腔癌の頸部リンパ節転移における腫瘍免疫応答の解明」第 25 回日本口腔診断学会・第 22 回日本口腔内科学会 合同学術大会 2012.9.21-22
 2. 江口貴紀, 小林浩, 熊谷賢一, 重松宏昭, 後藤哲人, 濱田良樹, 鈴木隆二「新規金属アレルギーモデルマウスの作製と T 細胞発現解析」第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2012.5.17-18 広島国際会議場(若手優秀ポスター賞受賞)
 3. 小林浩, 江口貴紀, 熊谷賢一, 重松宏昭, 後藤哲人, 濱田良樹, 鈴木隆二「新規金属アレルギーモデルマウスにおける網羅的 T 細胞レセプター解析」第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2012.5.17-18 広島国際会議場(若手優秀ポスター賞受賞)
- ### 海外学会
1. Hiroyuki Yamada, Kazutoshi Nakaoka, Toshikatsu Horiuchi, Kenichi Kumagai, Tomoko Ikawa, Yuko Shigeta, Mitsuyoshi Iino, Takumi Ogawa, Yoshiki Hamada

2. CAD-ASSISTED MANDIBULAR RECONSTRUCTION USING CUSTOM-MADE TITANIUM MESH TRAY AND PARTICULATE CANCELLOUS BONE AND MARROW HARVESTED FROM BILATERAL POSTERIOR ILIA
XXI Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Dubrovnik, Croatia, 11-15 September 2012
3. Kenichi Kumagai, Hiroshi Kobayashi, Akito Gotoh, Takanori Eguchi, Hiroyuki Yamada, Ryuji Suzuki, Yoshiki Hamada. Synchronous modulation of epidermal growth factor receptor family genes in oral premalignant lesions. 20th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. Santiago, Chile, November 1-4, 2011
4. Yoshiki Hamada, Masahiro Wake, Kenichi Kumagai, Kazutoshi Nakaoka, Hiroyuki Yamada, Nakatani Yasunori, Ryuji Suzuki, Naoshi Fukui. Up regulation of IL-6 and VEGF-A in the synovial fluid of temporomandibular joint affected by synovial chondromatosis. 20th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. Santiago, Chile, November 1-4, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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・応用量子医工学分野 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・応用量子医工学分野 技術補佐員

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。金属の腐食とともに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。現在、実際のヒト・サンプルを測定できるようになった。臨床サンプルである汗、血液、尿、唾液などで金属イオンを測定している。実際の測定前に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回収率、感度などの改善のために、前処理の工夫や測定機器の選択を進めた。2) 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た。トランスジェニック用の構築は終えて、2系統のマウスを維持している。実際のマクロファージや肥満細胞で GFP を発現するかどうか FACS を用いた解析を進めた。BAC を用いたレポーターマウスの金属皮下埋入モデルを作製した。さらにヒスタミン産生細胞の病理学的な解析を進めている。

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経皮的に体内に取り込まれたり、食事性に吸収されたりすることによって感作が開始する。金属は体内のたんぱく質と結合後、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発症機構と考えられている。従って、溶出した金属を鋭敏に定量的に測定できるシステムがあると早期診断や重症度、治療効果、予後の判定などに大いに役立つ。このため工学的に生体内金属測定していこうと考えている。

2. ヒスタミンは金属アレルギーの症状を悪化させる生体内物質であることが明らかにされている。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。この遺伝子の転写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マウスを作製し、そのマウス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明らかにする。

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 (100ppb) あるいはパラジウム標準液 (1000ppm) を添加し、最終濃度を 0ppb、1ppb、10ppb、100ppb、1000ppb(=1ppm)にする。冷凍にしていた牛乳資料 1ml に硝酸 6ml を添加、マイクロウェーブにて 140℃ 5min→170℃ 5min→200℃ 10min→220℃ 15min 処理する。これによって、牛乳は分解され超純水を加えて 25ml とする。サンプルの分析は工学研究科技術部合同計測分析班に依頼し、ICP/MS にて測定する。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 (20ml)、今後東北大に送付され冷凍保存した。

2) 溶出金属イオン測定法

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS 法) (誘導結合質量分光法)

放電を利用する溶液試料の質量分析法。高感度で多くの元素を同時定量ができるため現在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きわめて高感度(数 pg/g)であり、今回の植え込み実験に使用した。

3) レポーター動物の作製

以前プラスミッドを用いたトランスジェニックマウスを作製していたが、組織特異的な発現を再現できないため現在 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 BAC 遺伝子も構築完了し、マウスの受精卵に注入し、個体を発生させ PCR による遺伝子解析を行ない、2 系統のマウスを維持している。マウスは、腹腔内に大腸菌を植え込む実験をして肥満細胞やマクロ

ファージに蛍光発光が見られることを FACS を使って確認している。

C. 研究結果

1. 添加実験

ニッケル、パラジウムともに添加量を増やすにしたがって感知する金属濃度も増加した。100ppb 以上では測定結果に満足できる程度であったものの、それ以下ではサンプルごとのばらつきも多く、実際の検体の測定には適さない。そこで、前処理に硝酸に加えて過酸化水素水を加えることによりさらに分解を進めたことにより、測定の精度が増した。また、金属イオンを真空部に送るインターフェイスに Ni, Pd を用いない材料を使用し測定中の持ち込みをなくすことで、さらに精度を増すこととなった。

さらにニッケル、パラジウムの添加検体を 3 本ずつ用意して技術部にて ICP/MS による測定を依頼した(表 1 および表 2)。

図 1 は上記の改善点を加えた実験で、ばらつきの点ではまだ問題があるが、添加したニッケルおよびパラジウムの量を反映した実験結果が出てきており、母乳の測定が可能であった。

2. レポーター動物

トランスジェニックマウス

現在 BAC を用いたレポーター遺伝子の構築を終え受精卵に注入し、現在 2 系統のマウスを維持している。それぞれの系統のマウスの腹腔細胞を FACS にかけて、c-kit あるいは Mac-1 と GFP で解析した結果 (図 3)、c-kit positive な細胞の中に、GFP が強い細胞があり、肥満細胞とかがえられた。また、Mac-1 陽性細胞の中にも GFP positive な細胞があり、macrophage のうち HDC が positive な細胞であると考えられた。腹腔内に LPS を注入して同様に腹腔細胞を採取して FACS による解析を行ったが、GFP が陽性になった細胞はわずかに増加する程度であった。

私たちは、以前ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝

子ノックアウトマウス（以下 HDC-KO mouse）を用いて、大腸菌を用いた腹腔炎モデルマウスを作製した。その結果、このノックアウトマウスは、大腸菌の排除速度を上げることから、ヒスタミンは感染においても重要な働きをすることを示唆していると考えた。今回のトランスジェニックマウスを用いて、同様に腹腔内に大腸菌を注入した後で、腹腔内の細胞を採取し、その蛍光発光を観察すると（図2）、蛍光発光が強まることを観察している。従って、大腸菌は腹腔内において腹腔細胞から新たにヒスタミンの合成酵素遺伝子の転写を高めることが推察された。

D. 考察

1. 添加実験

検量線を見ると 1ppb level から測定可能であるに、実際の検体では 100ppb level にならないと精度をもって測定できていない。この原因について考察すると、1) 検体の場合は 25 倍に希釈されている、2) 検体には前処理（硝酸添加、マイクロウェーブ処理）が施されている、3) 前処理が施されていても夾雑物によって正確な測定が出来ていない、などが考えられる。今回、前処理の条件を変化させ、インターフェイスの材質を変えることによってある程度の感度を獲得できることが出来た。現在、感度が上がったところで、実際のサンプルでの測定を行なっている。

2. HDC promoter-reporter 動物の作製

BAC を用いた新しいレポーターマウス作製し、2系統のトランスジェニックマウスを

維持している。FACS により腹腔内細胞の解析では、GFP を強く発現している細胞が見られた。さらに腹腔中に大腸菌を注入して、GFP の誘導が確認された。このマウスを用いた金属植え込み実験によって、ヒスタミン産生細胞が出現することまで確かめているが、今後どのような種類の細胞であるかについて考察を深める。

E. 結論

金属の溶出は局所の炎症が起きうる種類の金属ばかりではなく、従来「安全」と言われる金属にも溶出反応が起きていることが判明した。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。生体反応が起きるより早期に溶出金属を測定できることは、今後の金属アレルギーの臨床にとって大いに役立つ。現在臨床検体を使った測定をおこない、サンプル数を増やしている段階まで来ている。

レポーターマウスの作製は終了した。動物に金属アレルギーを発症させればどの時期にヒスタミン産生細胞が活性化しているのかが判明し、抗ヒスタミン剤の投与方法について工夫できるようになる。

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. Hu WW, Fang Q, Xu ZH, Yan HJ, He P, Zhong K, Fan YY, Yang Y, Zhang XN, Zhang CY, Ohtsu H, Xu TL, Chen Z. Chronic H1-Antihistamine Treatment Increases Seizure Susceptibility After Withdrawal by Impairing Glutamine Synthetase. *CNS Neurosci Ther* 18: 683-90. 2012
2. Matsushita, Ayuko; Seike, Masahiro; Okawa,

Haruka; Kadowaki, Yayoi; Ohtsu, Hiroshi. Advantages of histamine H4 receptor antagonist usage with H1 receptor antagonist in murine allergic contact dermatitis. *Exp Dermatol* 21: 714-5, 2012

3. Aisa Chepkova, Evgenij Yanovsky, Regis Parmentier, Hiroshi Ohtsu, Helmut L. Haas, Jian-Sheng Lin and Olga A. Sergeeva Histamine Receptor Expression, Hippocampal Plasticity and Ammonia in Histidine Decarboxylase Knockout Mice. *Cell Mol Neurobiol* 32:17-25, 2012

4. He G, Hu J, Li T, Ma X, Meng J, Jia M, Lu J, Ohtsu H, Chen Z, Luo X. The arrhythmogenic effect of sympathetic histamine in mouse hearts subjected to acute ischemia. *Mol Med* 18: 1-9. 2012
5. Fukie Nijima-Yaoita, Masahiro Tsuchiya, Hiroshi Ohtsu, Kazuhiko Yanai, Shunji Sugawara, Yasuo Endo, and Takeshi Tadano. Roles of Histamine in Exercise-Induced Fatigue: Favouring Endurance and Protecting Against Exhaustion. *Biol Pharm Bull* 35: 91-97. 2012

2) 総説論文

1. Hiroshi Ohtsu. Pathophysiologic Role of Histamine; Evidence Clarified by Histidine Decarboxylase Gene Knockout Mice. *Int Arch Allergy Immunol* (minireview) 158 (suppl 1): 2-6, 2012

3) 書籍

1. W. Bäumer, T. Werfel, R. Seifert, M. Kietzmann, D. Neumann, R. Khanferyan, H. Ohtsu, E. Masini, S.E. Dahlén, B. Dahlén, A. Sydbom, R. Gutzmer. *Histamine H₄ receptor: a novel drug target for immunoregulation and inflammation* Chapter 5. Histamine in atopic disorders (in press)

2. 学会発表

1) 国際学会

1. Ohtsu H, Sato A, Moriguchi T, Takai J, Yamamoto M. HDC-GFP transgenic mouse

(oral presentation) European Histamine Symposium Belfast (Northern Ireland) May 2-5 2012

2. Ramsey LCB, Crowley M, Hughes Z, Ohtsu H, Araujo ID, State M, Mayes L, Pittenger C. Behavioral and neurochemical analysis of HDC-KO mice, a model of a genetic form of Tourette Syndrome (oral presentation), International Behavioral Neuroscience Society, June 5-10, Hawaii 2012

2) 国内学会

1. 佐藤睦、大津浩「大腸菌人工染色体(BAC)を用いたヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)レポーターマウスの作製」日本薬理学会(京都) 2012年3月14-16日

3) 招待講演、シンポジウム

招待講演

1. European Histamine Research Society: COST action: Nov. 18, 2012 Malaga, Spain **Plenary Lecture** The biological activity of histamine clarified using histidine-decarboxylase gene -manipulated mice. -----The power of interaction with Japanese colleagues

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 今回のNi, Pdの牛乳への添加実験

(前処理に硝酸を加え、インターフェイスにNi, Pd以外の素材を使用)

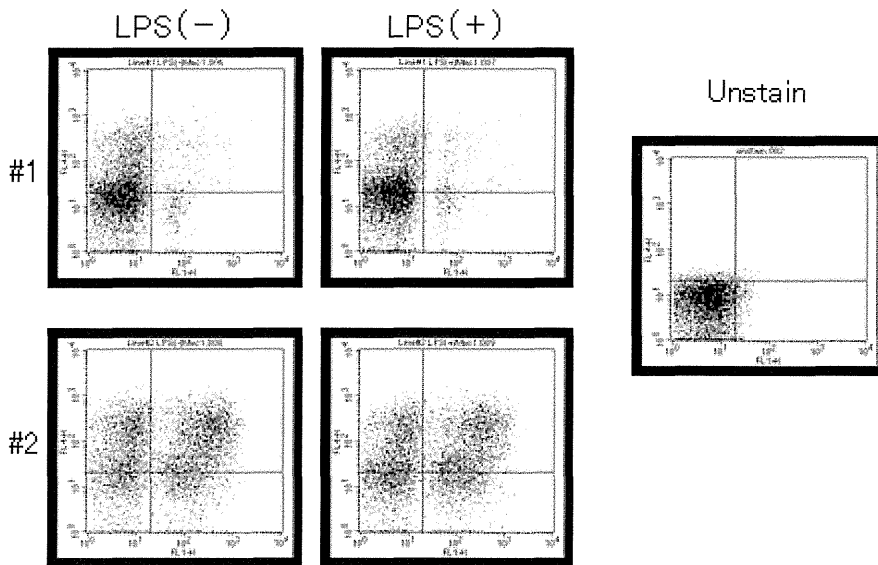
添加金属最終濃度(μg/L)	Ni	Pd
0	55.2	20.6
0	32.8	15.8
0	73.2	16.8
1	38.0	18.2
1	53.2	16.8
1	46.2	17.4
10	65.0	27.8
10	60.0	27.8
10	68.6	27.0
100	161.4	132.4
100	122.6	92.6
100	159.2	137.8
1000	1037.8	1094.2
1000	1030.6	1047.2
1000	1044.8	965.8

表2 前回の牛乳へのNi, Pdの添加実験

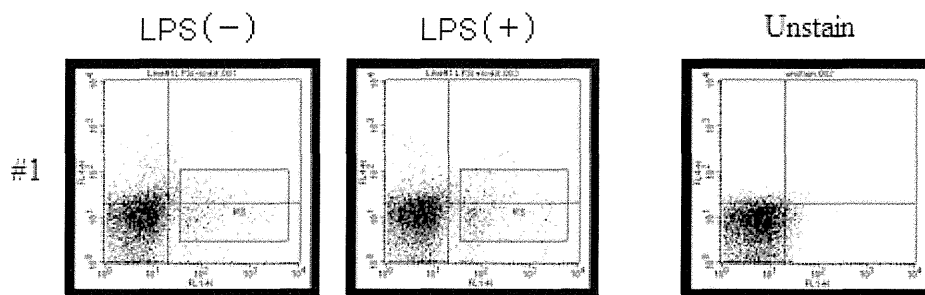
添加金属最終濃度(μg/L)	Ni	Pd
0	81.50	11.50
0	87.75	11.25
0	133.25	12.25
1	42.25	12.75
1	61.00	12.75
1	31.75	10.25
10	41.50	21.50
10	34.00	19.00
10	53.50	9.50
100	168.25	112.50
100	147.25	122.75
100	139.75	90.50
1000	986.25	1098.50
1000	1031.00	987.25
1000	951.25	1004.00

図1. 腹腔細胞の LPS 刺激前後における GFP の発現

Mac-1



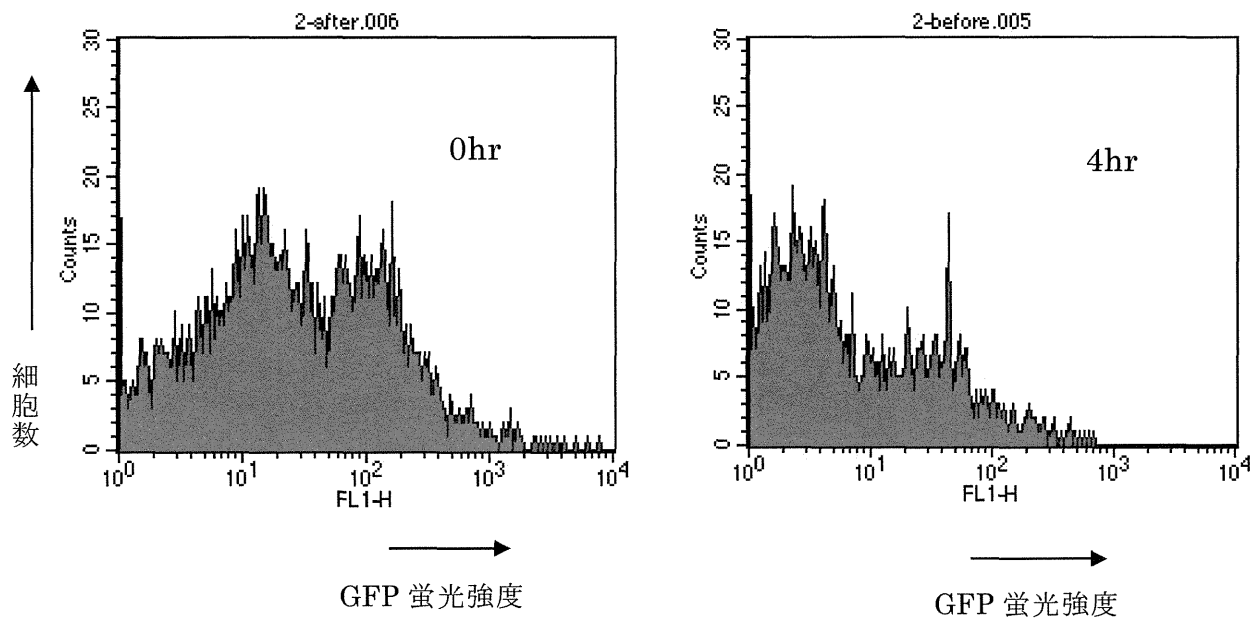
c-kit Line #1



Gate Statistics			
File: Line#1.FCS	Log Data Used: Linear Y-axis		
Sample ID:	Panel ID:		
Tube: Unstain	Panel Description: Unstain		
Acquisition Date: 14-Feb-12	Gate: G4		
gated Events: 5080	Total Events: 9790		
X Parameter: FL1-H[Log]	Y Parameter: FL1-A[Log]		
Gate	Events	% Gated	% Total
G1	5080	51.80	51.80
G2	5080	51.80	51.80
G3	328	4.52	2.91
G4	5080	51.80	51.80
G5	228	4.52	2.91
G6	228	4.52	2.91

Gate Statistics			
File: Line#1.FCS	Log Data Used: Linear Y-axis		
Sample ID:	Panel ID:		
Tube: Unstain	Panel Description: Unstain		
Acquisition Date: 14-Feb-12	Gate: G4		
gated Events: 5080	Total Events: 9790		
X Parameter: FL1-H[Log]	Y Parameter: FL1-A[Log]		
Gate	Events	% Gated	% Total
G1	5080	51.80	51.80
G2	5080	51.80	51.80
G3	347	5.94	3.32
G4	5080	51.80	51.80
G5	347	5.94	3.32
G6	347	5.94	3.32

図 2. E.coli 腹膜炎モデルにおける腹腔細胞の蛍光発光



HDC-GFP BAC マウスの腹腔内の細胞を Tyrode バッファーを用いて Lavage する。さらにそのマウスの腹腔内に E.coli を 1×10^8 CFU 注入し、4 時間後に再度 Tyrode バッファーを用いて Lavage し FACS にて解析した。

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)
分担研究報告書

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、金属イオンの溶出・組織浸透がある。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、 Na^+/H^+ exchanger (NHE) 阻害薬 amiloride がこれを抑制することを明らかにした。本年度は、lipopolysaccharide (LPS) により NHE が活性化されること、amiloride は lysosome の酸性化は抑制しないことを明らかにし、金属との接触面での NHE の活性化が金属溶出に重要であることを示した。また、 NiCl_2 はマクロファージ細胞株における LPS 刺激によるサイトカイン産生のうち、特に IL-6 の産生を選択的に抑制することを見いだし、溶出した Ni イオンは特定の細胞内シグナル伝達因子に作用することを示唆した。一方、臨床サンプルである汗、唾液中の金属濃度の測定を引き続き行い、アトピー性皮膚炎患者における金属アレルギーの診断と金属除去食の効果判定に有効であることを示した。

A. 研究目的

歯科金属、人工骨やステントなど金属を含む医用材料により溶出した金属イオン、あるいは食物として摂取した金属イオンがアレルギー様症状を誘発することがある。多くの場合、その原因が本当に金属であるかどうかや、金属除去の効果の判定は難しく、また金属であった場合にその溶出を抑制する薬物は開発されていない。筆者らは生体試料中の金属濃度を精密に測定する系を確立し、NHE 阻害薬である amiloride が金属の溶出を *in vitro* だけでなく、*in vivo* においても抑制することを明らかにしてきた。本年度は、amiloride の作用機構、溶出した Ni イオンの作用を解析した。さらに、臨床サンプルにおける金属イオンの測定を継続し、その診断等における有用性を示した。

B. 方法

1) アクリジンオレンジによる酸性顆粒の染色と amiloride の効果

RAW264 細胞(2.5×10^5 cells/ml) 0.8 ml を 4-well glass slide に播種し、一晚培養した。

Amiloride (100 μ M)あるいは V-ATPase 阻害薬 bafilomycin A1 (100 nM) 存在下で 10 分間処理した後、LPS (1 μ g/ml)で 2 時間刺激した。Acridine orange (10 μ g/ml)で染色し、蛍光顕微鏡(励起波長 488 nm, 蛍光波長 (560- nm, 505-530nm) で観察した。

2) NHE 活性の測定

RAW264 細胞(1.5×10^5 cells/ml) 2 ml を 6-well cluster dish に播種し、一晚培養した。pH indicator である BCECF を用い、 Na^+ 依存的な細胞内 pH の回復速度として、NHE 活性を測定した。

3) Ni イオンの皮膚浸透の測定

ICR マウスの右耳介に 10% NiCl_2 を含む水溶性クリーム 50 μ g 塗布し、30 分後、あるいは 60 分後に採血し、血清中のニッケル濃度を ICP-MS 法を用いて測定した。

4) Ni イオンのサイトカイン産生に対する効果

RAW264 細胞(1.5×10^5 cells/ml) 0.5 ml を 24-well cluster dish に播種し一晚培養した。Lipopolysaccharide (1 μ g/ml)ならびに NiCl_2 (300 μ M)で刺激し、24 時間後培養液上清を

回収した。培養上清中のサイトカインを ELISA によって測定した。

5) アトピー患者の汗中のニッケル濃度の測定

金属アレルギーが疑われるアトピー用皮膚炎患者から汗を採取し、その後通常食から金属除去食への変更を指示し、約 1 ヶ月後再び汗を採取した。得られた汗 0.5 ml を硝酸で 5 ml とし、汗に含まれる金属イオンを ICP-MS で測定した。なお試料は加古川医療センター皮膚科 安達厚子博士より供与された。

C. 研究結果

1) NHE と Ni 溶出

ニッケル線埋入モデルにおいて amiloride は Ni の溶出を抑制し、マウスマクロファージ様細胞株 RAW 264 を用いた *in vitro* の Ni 溶出系においては、LPS 刺激により Ni 溶出が増大し、amiloride がこれを抑制することを明らかにしている。そこで、amiloride の作用機構を明らかにする一環として、LPS による NHE の活性化と amiloride の lysosome の酸性化に対する効果について解析した。酸性顆粒である lysosome を acrydine orange で染色し、LPS の作用並びに amiloride の効果を解析した。その結果、RAW264 細胞において NHE 活性を測定したところ、LPS により NHE 活性が一時的に増加することが明らかになった (図 1)。また LPS は lysosome の放出や酸性化を誘導せず、amiloride も明確な作用を示さなかった (図 2)。

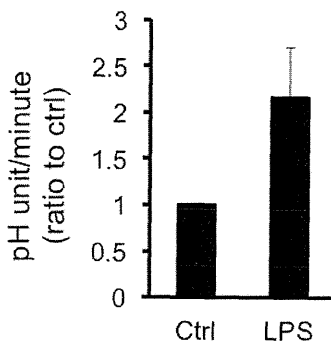


図 1 LPS による NHE の活性化
LPS は NHE の活性を増加させた。

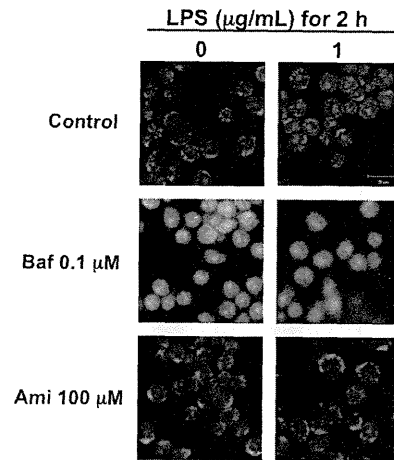


図 2 Amiloride および LPS の酸性顆粒の放出に対する効果

LPS も amiloride の酸性顆粒には影響を与えなかったが、V-ATPase 阻害薬 BafilomycinA1 は強く lysosome の酸性化を抑制した。

2) Ni のサイトカイン産生に対する作用

RAW264 細胞を LPS で刺激すると種々のサイトカイン機能タンパク質の発現が増大される。NiCl₂ を LPS とともに添加して、RAW264 細胞を共刺激した場合には、予想外のことに、IL-6 の産生のみが選択的に抑制された (図 3)。

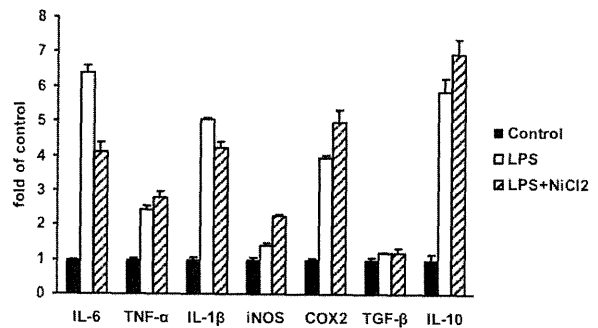


図 3 LPS による機能分子の発現に対する NiCl₂ の作用

RAW264 細胞において LPS 刺激は種々のサイトカイン、機能タンパク質の発現を誘導したが、NiCl₂ はこのうち IL-6 の酸性だけを抑制した。

3) Ni の組織浸透

汗中に Ni が存在することを明らかにしてきたが、体表面の Ni イオンが体内に浸透して

いくつかどうかマウスで確認した。NiCl₂を10%含むクリームをマウス耳介に塗布し、血液中のNi濃度を測定することでNiイオンの組織浸透を評価した。その結果、図2に示すように、体表面のNiイオンは急速に浸透することが明らかになった(図3)。

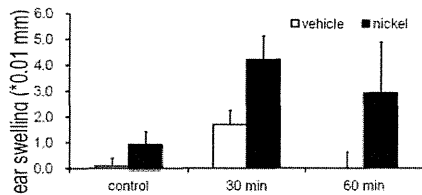


図3 NiCl₂の塗布による組織浸透

NiCl₂をマウス耳介に塗布すると、30分以内に血清中のNi濃度が上昇した。

4) 汗ならびに唾液中の金属イオン濃度の測定

金属アレルギーに基づくアトピー性皮膚炎は汗中のNiが関与している可能性示してきた。そこで引き続き、汗中のニッケル濃度を測定した。本患者は金属アレルギーと診断され、金属除去食療法が有効であった例であるが、治療前後で汗中の金属濃度、特にCr, Co, Niが顕著に低下しており、皮疹の状態の改善と一致した。

表1 汗中の金属イオン濃度

	汗中金属濃度 (ng/ml)	
	2月21日	3月23日
Al	3043	1373
Cr	9	0
Co	10	3
Ni	1241	140
Pd	9	10
Ag	1.7	0.6
In	0	0.1
Sn	71	24
Ir	0.1	0
Pt	0	0
Au	7	13

* 2/21 測定後金属除去食に変更

E. 結論

Ni金属からのNiの溶出が、RAW264細胞をLPSで刺激したときに増加することを明らかにしてきたが、その機序としてLPS刺激によりNHEの活性化が生じていることが確認された(図1)。またamilorideはlysosomeの放出、酸性化には影響を与えないこと(図2)から、炎症性細胞が金属に接触し、その微小環境でNHEが活性化されて酸性化が生じて、金属溶出が増大するのではないかと考えられた。

さらにマウス耳介にニッケルを含むクリームを塗布することにより、体外(例えば汗中の)Niイオンが体内にどの程度浸透するかを解析した。その結果、体外に塗布したNiイオンは急速に体内に浸透することが確認された(図3)。さらに溶出したNiイオンは、マクロファージによるサイトカインやiNOSなどの炎症性タンパク質の発現に対して、IL-6選択的に抑制することが明らかになり(図4)、Niイオンは細胞内である特定のシグナル分子に作用することが示唆された。

以上の結果から、体内では何らかの刺激により炎症性細胞が活性化されるとNHEが活性化され、金属との接触面において金属溶出が生じ、溶出したNiイオンが炎症反応を修飾することが示唆された。

一方、体外に塗布したNiイオンは急速に浸透する(図4)。実際、アトピー性皮膚炎患者の汗中のニッケルなどの金属濃度が高値を示し、金属アレルギーに基づく皮疹を示すことがある。今回そのような患者の食事を金属除去食に変更したところ、症状の改善が見られたが、その場合の汗中の金属イオンを測定した結果、特に金属アレルギーの原因金属であるCr, Co, Niの濃度の低下(表1)が確認され、金属除去食の摂取により汗中の金属濃度が低下することが明らかになった。このように汗中の金属イオン濃度の測定は診断等に有効であることが示された。

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. The antagonism of histamine H1 and H4 receptors ameliorates chronic allergic dermatitis via anti-pruritic and anti-inflammatory effects in Nc/Nga mice. Ohsawa, Y., Hirasawa, N. *Allergy* 67: 1014-1022 (2012)
2. Induction of thymic stromal lymphopoietin production by xylene and exacerbation of picryl chloride-induced allergic inflammation in mice. Satou, N., Ishihara, K., Hiratsuka, M., Tanaka, H., Endo, Y., Saito, S., Iwatate, Y., Leonard, W.J., Hirasawa, N. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 157: 194-201 (2012)
3. Hetero-oligomerization between adenosine A1 and thromboxane A2 receptors affects cellular signal transduction on stimulation with high and low concentrations of agonists for both receptor. Mizuno, M., Suzuki, T., Hirasawa, N., Nakahata, N. *Eur. J. Pharmacol.* 677, 5-14 (2012)

2) 総説

1. ステロイドの基礎. 平澤典保 ENTONI 139: 1-6 (2012)
2. ステロイド薬の基礎 ?適切な使用のために 平澤典保 小児科 53: 203-210 (2012)

2. 学会発表

1) 一般講演

1. 平塚真弘、田巻佑一朗、新井富生、相村春彦、平澤典保 薬物代謝酵素群の遺伝子多型と肺がんとの関連性 第33回日本臨床薬理学会学術総会 (2012年11月29日-12月1日、沖縄)
2. 岸本祐、高野貴幸、浅川三喜、沖田喜幸、平澤典保 ニッケル線誘発炎症におけるヒスタミンの役割とヒスチジン脱炭酸酵素の誘導 第16回日本ヒスタミン学会 (2012年10月19-20日、岡山)
3. 佐藤大樹、平澤典保 前脂肪細胞におけるHDAC阻害薬の炎症応答増強作用とその機序に関する研究 第51回日本薬学会東北支部大会 (2012年10月7日、青森)
4. 高野貴幸、青島有佑、田中里奈、浅川三喜、上田恭介、大津浩、成島尚之、平澤典保 マウスにおける金属からのニッケルイオン溶出とNHEの関与 第51回日本薬学会東北支部大会 (2012年10月7日、青森)
5. 新沼優衣、高橋理充、斎藤雄大、塚田智晴、伊藤雅、平澤典保、平塚真弘 31種のCYP2C9遺伝子多型バリエーション酵素におけるワルファリン7-水酸化活性の変化 第51回日本薬学会東北支部大会 (2012年10月7日、青森)
6. 山下紗緒里、佐藤望未、平澤典保 マウス表皮ケラチノサイトにおける吉草酸のTSLP産生誘導作用の解析 第51回日本薬学会東北支部大会 (2012年10月7日、青森)
7. 山田廉、林寛人、Siddhartha S. Das、佐藤大樹、平澤典保 GLP-1産生に対する小胞体ストレスの影響 第51回日本薬学会東北支部大会 (2012年10月7日、青森)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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：鈴木 加余子 藤田保健衛生大学医学部皮膚科学 客員准教授
刈谷総合病院皮膚科 部長
矢上 晶子 藤田保健衛生大学医学部皮膚科学 准教授
鶴田 京子 藤田保健衛生大学医学部皮膚科学 准教授
藤田保健衛生大学坂分種報徳会病院皮膚科
伊佐見真実子 藤田保健衛生大学医学部皮膚科学 助教
藤田保健衛生大学坂分種報徳会病院皮膚科
佐野 晶代 藤田保健衛生大学医学部皮膚科学 助教
田中 紅 藤田保健衛生大学医学部皮膚科学 助教

研究要旨

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現在の時点では他にない。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 24 年度は、金属の PT の診断方法を確立し、医療者に教育・普及すること、そして金青くアレルギーの Q&A 集を作成し広く国民に情報を提供することを目的とした。また、チタンのアレルギー試薬の国際的研究への協力を開始した。

平成 23 年 4 月から 1 年間にジャパニーズスタンダードアレルゲン (JSA) 2008 貼布例は全国 81 施設 2227 例であった。その結果を集計したところ、JSA2008 に含まれる金属アレルゲンの陽性率は、硫酸ニッケルが 15.3%と最も高値であり、続いて塩化コバルト 8.8%、重クロム酸ナトリウムで 7.0%、塩化第二水銀で 6.1%、金チオ硫酸ナトリウムで 4.5%であった。日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会と共催で、金属アレルギー診断を含めた皮膚アレルギーテストの教育 WS・セミナーを開催し、教育実績をあげることができた。また、チタン合金のインプラント挿入前後で、現行のチタン PT 試料により、チタンアレルギーの検出を試みたが、未だいずれの試料においてもアレルギー反応を検出していない。

A. 研究目的

平成 24 年度は、金属のパッチテスト (PT) 診断方法を確立し、医療者に教育・普及することと、金属アレルギーの Q&A 集を作成し、広く国民に情報を提供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

員を対象に、平成 23 年 4 月から平成 24 年 3 月までの 1 年間の金属アレルギーの実態調査結果を集計した。

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った。
3. チタンのアレルギー試薬の国際的な研究

に協力した。

4. 一般国民向けの金属アレルギーの啓発教育用 Q&A 集の作成を開始した。

C. 結果および D. 考察

1. ジャパニーズスタンダードアレルゲン (JSA) 2008 の平成 23 年度陽性率を集計した。その結果、全国 81 施設、2227 例において、JSA2008 に含まれる金属アレルゲンの陽性率は、硫酸ニッケル 15.3%、塩化コバルト 8.8%、重クロム酸ナトリウム 7.0%、塩化第二水銀 6.1%、金チオ硫酸ナトリウム 4.5%であった。
2. 平成 24 年度は金属アレルギー診断のための教育 WS・セミナーを平成 25 年 2 月に小倉、3 月に千葉で開催した。
3. チタンについては藤田保健衛生大学では金属 PT を施行する際に titanium-IV -oxide0.1%pet、チタン粉末 20%pet、チタン錯体 0.157%aq を貼布し、平成 24 年 4 月から T.R.U.E. Test のチタン PT の試作品 3 濃度を貼布しているが、いずれのチタン試料においても未だにアレルギー反応を認めていない。
4. 一般国民向けの金属 Q&A については、質問事項を設定し、現在回答を作成中である。Q1. 金属アレルギーとは何ですか？ Q2. どのような金属が原因ですか？ Q3. 装飾品はどのようなものが原因ですか？ Q4. 金属アレルギーの症状はどのようなものですか？ Q5. 金属アレルギーの診断方法は？ Q6 何科を受診すれば良いですか？ Q7. 金属アレルギーは年代や性別で違いがありますか？ Q8. どうして金属アレルギーになるのですか？ Q9. 金属アレルギー症状はどれくらい続くのですか？ Q10. 金属アレルギーは完治しますか？

E. 結論と今後の予定

1. 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。

2. PTの精度向上の研究は継続して行っていく必要がある。

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. Akaza N, Akamatsu H, Takeoka S, Mizutani H, Nakata S, Matsunaga K. Increased hydrophobicity in *Malassezia* species correlates with increased proinflammatory cytokine expression in human keratinocytes. *Med Mycol.* 50 (8): 802-810, 2012
2. Inoue Y, Hasegawa S, Yamada T, Date Y, Mizutani H, Nakata S, Matsunaga K, Akamatsu H. Bimodal effect of retinoic acid on melanocyte differentiation identified by time-dependent analysis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25(3): 299-311, 2012
3. Suzuki K, Yagami A, Matsunaga K. Allergic contact dermatitis caused by a skin-lightening agent, 5,5'-dipropylbiphenyl-2,2'-diol. *Contact Dermatitis.* 66(1): 51-52, 2012

2) 総説論文

1. 鶴田 京子, 松永 佳世子 金属アレルギーと掌蹠膿疱症 *Visual Dermatology* 11巻10号 1052-1054, 2012
2. 鈴木 加余子, 矢上 晶子, 松永 佳世子 新しい検査法と診断法 ジャパニーズスタンダードアレルゲンの陽性率 *臨床皮膚科* 66巻5号 64-69, 2012
3. 矢上 晶子, 松永 佳世子 これだけは知っておきたい接触皮膚炎の基礎知識 *パッチ*

テストの基本手技と解釈 *医学のあゆみ*
240巻4号 321-326, 2012

国内学会

2.学会発表
国外学会

H.知的財産権の出願・登録状況
該当無し

分担課題：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 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 皮膚科学 助教
：山口 隼人 浜松医科大学 皮膚科診療従事者
：坂部 純一 浜松医科大学 特任助教
：久保 利江子 産業医科大学 皮膚科 助教
：尾藤 利憲 神戸大学 皮膚科学 講師

研究要旨

アトピー性皮膚炎 (AD) には、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 AD 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。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。外因性 51 名、内因性 29 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 患者でニッケルとコバルトの陽性率が有意に外因性 AD より高い知見を得た。内因性 AD では汗中 Ni 濃度が有意に外因性 AD より高かった。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。両者間での根本的な差違が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、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、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。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。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。これは pseudo-atopic dermatitis 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。

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。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、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、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、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、汗中の金属濃度を測定することにある。

B. 方法

1. 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。

2. 汗の中に含まれる金属の測定

東北大平澤先生(分担研究者)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

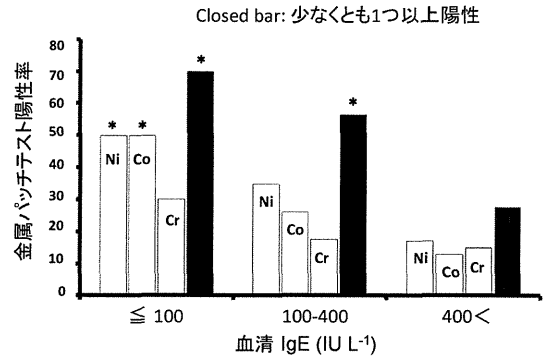
1. 内因性 AD と金属アレルギーとの関連

外因性 51 名、内因性 29 例について金属パッチテストを実施した。Ni と Co の陽性率は、外因性に比べ有意に高かった(表 1)。Ni、Co、Cr のうちで少なくとも一つ以上反応する率は、内因性 AD では外因性 AD の 2 倍以上であった(表 1)。とくに IgE 100 以下の内因性 AD では Ni、Co の陽性率が高かった(図 1)。

表1. 内因性、外因性アトピー性皮膚炎患者での金属パッチテスト陽性率

	内因性	外因性	Fisher's exact test
ニッケル	12/29 (41.4%)	9/51 (17.7%)	$P = 0.033$
コバルト	12/29 (41.4%)	6/51 (11.8%)	$P = 0.004$
クロム	7/29 (24.1%)	7/51 (13.7%)	$P = 0.359$
少なくとも一つ以上	19/29 (65.5%)	14/51 (27.5%)	$P = 0.002$

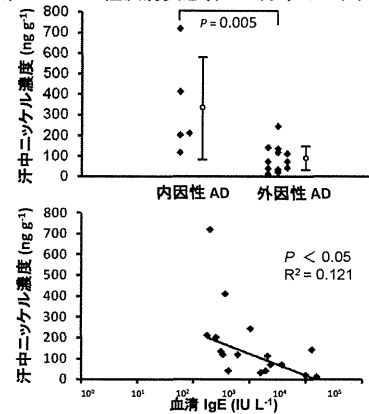
図1. IgE 値の層別金属パッチテスト陽性率



2. 汗中の金属濃度

汗中の Ni の定量を行った。内因性 AD 患者の汗中 Ni 濃度は外因性 AD 患者のそれより有意に高濃度であった(図 2)。

図2. アトピー性皮膚炎患者での汗中のニッケル濃度



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 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。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。

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