

る。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- $\gamma$  の存在なくしては成立するのが困難である。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という観察は、現在も非常に重要な知見と思われる。

我々の研究結果は、内因性 AD の少なくとも一部は金属アレルギーをもち、汗中の金属によって皮膚炎を惹起していることを示唆した。

## 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. Shimauchi T, Yagi H, Sasada K, Kito Y, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y: Characterization of malignant T-cell line established from a rare case of CD8<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> Sézary syndrome. *Br J Dermatol* (in press).
2. Shimauchi T, Sasada K, Kito Y, Mori T, Hata M, Fujiyama T, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y: CD8<sup>+</sup> Sezary syndrome with IL-22 production modulated by bacterial sepsis. *Br J Dermatol* (in press).
3. Fukamizu H, Fujiwara M, Kim T, Matsushita Y, Tokura Y: Development of a Three-Microneedle Device for Hypodermic Drug Delivery and Clinical Application. *Plastic Reconstr Surg* 130 : 451-455, 2012.
4. Sawada Y, Shimauchi T, Hama K, Yoshioka

H, Ohmori S, Yamada S, Tajiri M, Kubo-Kabashima R, Yoshioka M, Sugita K, Yoshiki R, Hino R, Kobayashi M, Izu K, Nakamura M, Tokura Y: Combination of skin-directed therapy and oral etoposide for smoldering adult T-cell leukemia/lymphoma with skin involvement. *Leuk Lymphoma* (in press).

5. Sawada Y, Nakamura M, Kabashima-Kubo R, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y: Defective epidermal innate immunity and resultant superficial dermatophytosis in adult T cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 18: 3772-3779, 2012.
6. Kabashima-Kubo R, Nakamura M, Sakabe JI, Sugita K, Hino R, Mori T, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Ogasawara K, Nomura Y, Nomura T, Akiyama M, Shimizu H, Tokura Y: A group of atopic dermatitis without IgE elevation or barrier impairment shows a high Th1 frequency: Possible immunological state of the intrinsic type. *J Dermatol Sci*. 67 : 37-43, 2012.
7. Ohmori S, Hino R, Kobayashi M, Nakamura M, Tokura Y: Inflammatory cytokine expression in the skin lesions of tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Rheumatology* (Oxford) 51: 196-199, 2012.
8. Ito T, Hashizume H, Shimauchi T, Funakoshi A, Ito N, Fukamizu H, Takigawa M, Tokura Y: CXCL10 produced from hair follicles induces infiltrates of Th1 and Tc1 cells in the acute phase of alopecia areata followed by sustained accumulation of Tc1 cells in the chronic phase. *J Dermatol Sci* (in press).
9. Kasuya A, Fujiyama T, Shirahama S, Hashizume H, Tokura Y: Decreased expression of homeostatic chemokine receptors in intravascular large B-cell lymphoma. *Eur J Dermatol* 22: 272-3, 2012.

10. Sugita K, Kabashima K, Tokura Y: Characterization of Peripheral Natural Killer Cells and their Reduction in Drug-induced Hyper-sensitivity Syndrome. *Acta Derm Venereol* 92: 83-84, 2012.
  11. Sugita K, Kabashima K, Sawada Y, Haruyama S, Yoshioka M, Mori T, Ogasawara K, Tokura Y: Blocking of CTLA-4 on lymphocytes improves the sensitivity of lymphocyte transformation test in a patient with nickel allergy. *Eur J Dermatol* 22: 268-269, 2012.
  12. Ohmori S, Hino R, Kobayashi M, Nakamura M, Tokura Y: Inflammatory cytokine expression in the skin lesions of tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Rheumatology* (Oxford) 51: 196-199, 2012.
  13. Ohmori S, Hino R, Nakamura M, Tokura Y: Heparin serves as a natural stimulant of the inflammasome and exacerbates the symptoms of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Dermatol Sci* 66: 82-4, 2012.
  14. Kasuya A, Moriki M, Tatsuno K, Hirakawa S, Tokura Y: Clearance Efficacy of Autoantibodies in Double Filtration Plasmapheresis for Pemphigus Foliaceus. *Acta Derm Venereol* (in press).
  15. Shimauchi T, Yagi H, Sasada K, Kito Y, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y: Characterization of malignant T-cell line established from a rare case of CD8+ CD56+ Sézary syndrome. *Br J Dermatol* (in press).
- 2) 総説論文・著書
    1. McGill N-K, Vyas J, Shimauchi T, Tokura Y, Piguet V: HTLV-1 Associated Infective Dermatitis: Updates on the Pathogenesis. *Exp Dermatol* 21: 815-821, 2012.
    2. Sugaya M, Hamada T, Kawai K, Yonekura K, Ohtsuka M, Shimauchi T, Tokura Y, Nozaki K, Izutsu K, Suzuki R, Setoyama M, Nagatani T, Koga H, Tani M, Iwatsuki K. Guidelines for the management of cutaneous lymphomas (2011): A consensus statement by the Japanese Skin Cancer Society - Lymphoma Study Group. *J Dermatol* (in press).
    3. Bito T, Sawada Y, Tokura Y: Pathogenesis of cholinergic urticaria in relation to sweating. *Allergol Int* (in press).
- 2.学会発表
    1. Tokura Y: Mechanism of Photo-Allergic Contact Dermatitis from Ketoprofen. 11th Congress of The European Society of Contact Dermatitis (ESCD 2012).2012.6.13. Malmo,Sweden
    2. Tokura Y: Innate immunity of the epidermis toward bacterial and fungal infection : lessons from Th17-dysregulated conditions. The 10th Symposium of the Cutaneous Biology Research Institute, Yonsei University College of Medicine. 2012.9.8. Seoul, Korea
- 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規診断法と治療法の開発に向けた理論的基盤の開発に関する研究

分担研究者： 宮地 良樹 京都大学医学研究科 教授  
研究協力者 梶島 健治 京都大学医学研究科 准教授  
野村 尚史 京都大学医学研究科 講師

## 研究要旨

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。この接触皮膚炎反応の制御に、制御性 T 細胞がどの様に関わっているか、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制御性 T 細胞の役割、相互作用を検証することを目的として研究を行った。今回我々は、接触皮膚炎の炎症の収束に制御性 T 細胞が重要であることを明らかとし、また皮膚に集積する制御性 T 細胞が Helios 陽性であることを明らかにした。このような機序は金属アレルギーの成立過程においても同様であることが期待される。これまで注目されていなかった制御性 T 細胞の機能を調整することで、金属アレルギー発症の予防や治療応用を図り、金属アレルギーに苦しむ患者の苦痛の軽減に寄与したい。

## 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。この接触皮膚炎反応の制御に、制御性 T 細胞がどの様に関わっているか、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制御性 T 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

制御性 T 細胞を生体内で除去可能な hCD2-Foxp3 マウスを用いた。また、Helios 遺伝子のプロモーター下に YFP を組み込んだレポーターマウスを作製した。これらのマウスを用いて接触過敏反応を誘導し、皮膚に浸潤してくる細胞を継時的に測定することで、接触皮膚炎形成における制御性 T 細胞の役割を検証した。

## C. 研究結果

hCD2-Foxp3 マウスは Campath1 抗体を投与

することで、生体内で制御性 T 細胞を除去することが可能なマウスである。このマウスに接触過敏反応を誘導し、惹起前日に Campath1 抗体を投与して制御性 T 細胞を除去したところ、コントロールの IgG 抗体を投与したマウスと比較して有意に耳介の腫脹が遷延することが明らかとなった(図 1)。更に、接触皮膚炎惹起相において、惹起部の耳介皮膚を継時的に採取し、皮膚に浸潤している T 細胞のサブセットを検討した(図 2)。炎症の無い状態では、皮膚内には T 細胞はほとんど存在していない。一方で炎症惹起後には、2 日目をピークとして CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞のいずれもが多数浸潤していることが FACS で確認された。細胞数は CD8 陽性 > CD4 陽性 T 細胞であった。制御性 T 細胞は胸腺で分化する natural Treg と、末梢組織で誘導される induced Treg とに大別することができる。Helios タンパクは natural Treg のマーカーの一つとなることが近年示唆されている。そこで、Helios のプロモーター下に YFP を組み込んだ Helios-YFP レポーターマウスを作製した。本マウスを用いることで、natural Treg の生体内動態をモニターすることが可能となる。本マ

ウスを用いた解析により接触過敏反応惹起相で皮膚に浸潤してくる制御性 T 細胞は YFP 陽性であること、すなわち natural Treg が主体であることが明らかとなった (図 4)。

#### D. 考察

接触皮膚炎惹起相における炎症の収束には制御性 T 細胞が関与している。このときに皮膚にあらわれる制御性 T 細胞は、皮膚内で誘導された induced Treg ではなく、もともと胸腺で制御性 T 細胞として分化した natural Treg が主体であると考えられる。

#### E. 結論

金属アレルギーを代表とする接触皮膚炎反応を終息させる相において、制御性 T 細胞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. 研究危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hara-Chikuma M, Chikuma S, Sugiyama Y, Kabashima K, Verkman AS, Inoue S, Miyachi Y. Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3 -mediated hydrogen peroxide uptake. *J Exp Med.*; 209 (10) : 1743-52, 2012
2. Belsito D, Bickers D, Bruze M, Calow P, Dagli ML, Dekant W, Fryer AD, Greim H, Miyachi Y, Saurat JH, Sipes IG, Api AM. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclopentanones and cyclopentenones when used as fragrance ingredients. *Food Chem Toxicol.* 2012 50 Suppl 3: S517-56.
3. Nakajima S, Igyártó BZ, Honda T, Egawa G, Otsuka A, Hara-Chikuma M, Watanabe N, Ziegler SF, Tomura M, Inaba K, Miyachi Y,

Kaplan DH, Kabashima K. Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 129 (4), 1048-55, 2012

4. Nakahigashi K, Doi H, Otsuka A, Hirabayashi T, Murakami M, Urade Y, Tanizaki H, Egawa G, Miyachi Y, Kabashima K. PGD(2) induces eotaxin-3 via PPAR $\gamma$  from sebocytes: A possible pathogenesis of eosinophilic pustular folliculitis. *J Allergy Clin Immunol.* 129(2):536-43, 2012

##### 学会発表

1. Nakajima S, Miyachi Y, Kabashima K. Role of IL17A for induction of Th2 in murine model of atopic dermatitis. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012. 12.7-9. Okinawa, Japan
2. Egawa G, Miyachi Y, Kabashima K. Intercellular gap of the keratinocytes is a migratory pathway for Langerhans cells. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012. 12.7-9. Okinawa, Japan
3. Hanakawa S, Miyachi Y, Kabashima K. Possible role of Treg in the development of atopic dermatitis-like Th2-dominant cutaneous inflammation. Role of IL17A for induction of Th2 in murine model of atopic dermatitis. 日本免疫学会学術集会. 2012. 12.5-7. Kobe, Japan
4. Sugita K, Miyachi Y, Kabashima K. Regulatory T cells suppress basophils-induced IgE-mediated chronic allergic inflammation. 2012 Annual Meeting of the European Society of Dermatological Research. 2012. 9.19-22. Venice, Italy

5. Natsuaki Y, Miyachi Y, Kabashima K.  
Dermal dendritic cells initiate the  
elicitation phase of contact hypersensitivity  
via immunological synapse formation. 2012  
Annual Meeting of the European Society of  
Dermatological Research. 2012. 9.19-22.  
Venice, Italy

H.知的財産権の出願・登録状況

該当無し

図 1

Campath1 抗体の投与により、制御性 T 細胞が除去される (A)。この状態で接触過敏反応を惹起すると耳介の腫脹が遷延する。

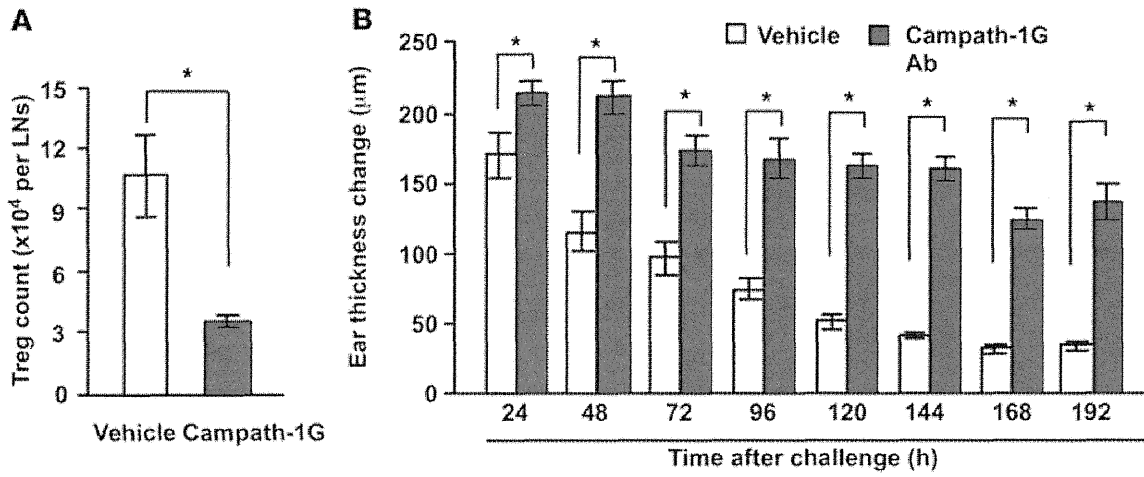


図 2

惹起相における皮内への浸潤 T 細胞を FACS を用いて検証した。CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞共に day 2 をピークとして皮内へ浸潤する。

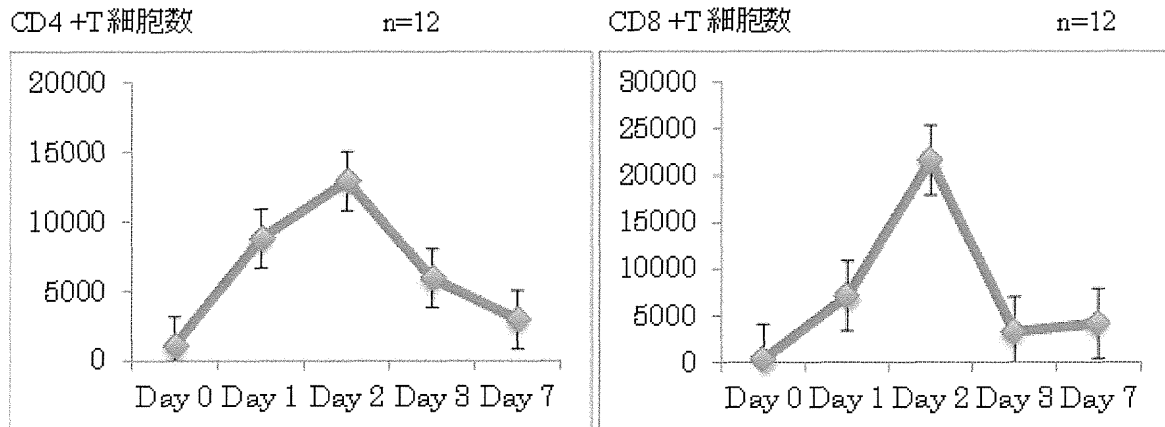
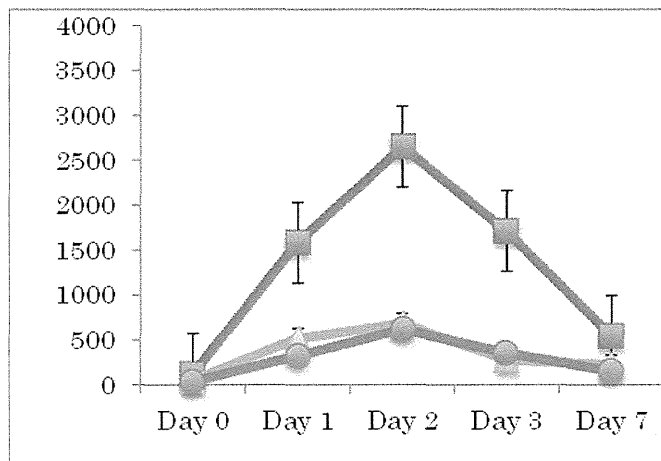


図 3

接触過敏反応惹起相における制御性 T 細胞の皮内浸潤。Helios 陽性の natural Treg が主流を占める。

■Helios+foxp3+ ▲Helios-foxp3+ ●Helios+foxp3- (CD4 gated) n=12



### III. 班会議プログラム



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24年度  
第1回 班会議  
抄録集

日時：平成24年5月14日（月）

場所：東北大学東京分室 会議室A

## 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.

##### 「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) 13:45-14:05  
東北大学加齢医学研究所・生体防御学

##### 「金属による誘導条件の検討」

鈴木 隆二 (分担研究者) 14:10-14:30  
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) 14:35-14:55  
東北大学加齢医学研究所・生体防御学

Break 14:55-15:15

#### 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) 15:15-15:35  
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) 15:40-16:00  
東北大学大学院薬学研究科・生活習慣病治療薬学分野

Break 16:00-16:20

#### 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)

16:20-16:40

---

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)

16:45-17:05

---

京都大学・医学研究科・皮膚科

Break

17:05-17:25

---

「**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)

17:25-17:45

---

藤田保健衛生大学・医学部・皮膚科

総合討論

17:45-18:15

---

発表は時間厳守をお願いいたします。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、時間厳守をお願いいたします)。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。

## 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	助教
	笹月 健彦	国立国際医療センター	名誉総長
	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
	中山 勝文	東北大学加齢医学研究所・生体防御学分野	助教
	渡邊 真通	東北大学加齢医学研究所・生体防御学分野	博士研究員
	園淵 和明	東北大学大学院医学系研究科・整形外科学分野	大学院生
	樋口 繁仁	東北大学加齢医学研究所 生体防御学分野	非常勤講師
	佐藤 直毅	東北大学加齢医学研究所 生体防御学分野	非常勤講師
	鈴木 忍	東北大学加齢医学研究所 生体防御学分野	非常勤講師

### 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。マウスを用いて耳介組織に金属アレルギーを誘導したところ、耳介組織への金属投与により、NKG2D リガンドの発現に有意な上昇を捉えるとともに、その所属リンパ節においては NKG2D<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を検出した。本研究では、①実際に炎症局所に浸潤している T 細胞の定量化、②金属に反応性を有する T 細胞を *in vitro* で再刺激・評価するための条件検討を行った。

### B. 方法

- 4) BALB/c マウスまたはパラジウム (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パラジウムアレルギーを誘導し、惹起後 24 時間目の耳介組織を用いて切片作成後、抗 CD3 抗体による免疫組織化学染色を行い、Image Cytometry により耳介への T 細胞の浸潤を定量解析した。
- 5) Pd+LPS 投与により腹腔浸出性マクロファージ (Pd/LPS-PEC) を回収、接着した細胞のみを抗原提示細胞として用いた。相模原病院で構築した Pd アレルギー改変誘導モデルの系を用いて、C57BL/6 マウスの足蹠部に Pd アレルギーを誘導し、その所属リンパ節である膝窩リンパ節の細胞 (Pd-PLN) をエフェクター細胞として用いた。PLN : PEC = 2 : 1 にて共培養し、0.2 mM PdCl<sub>2</sub> にて 24h 処理後、培養上清を回収し、ELISA にて IL-2 産生を定量・評価した。

### C. 結果

- 4) WT への Pd アレルギー誘導の系および所属リンパ節細胞の移入繰り返しの系の両方で、マウス耳介組織における CD3<sup>+</sup> T 細胞の割合がコントロール群に比べて有意に高かった。
- 5) Pd/LPS-PEC と PLN を共培養することで、Pd 再刺激により培養上清中に IL-2 の産生が認められ、Pd-PLN で有意に反応性が高かった。

### D. 考察

- 4) WT への Pd アレルギー誘導および所属リンパ節細胞移入繰り返しの両方で、炎症部位へ浸潤する T 細胞の定量解析が可能である。
- 5) Pd 投与により回収した PEC を抗原提示細胞として用いることで、*in vivo* で T 細胞が獲得した金属に対する反応性を *in vitro* で再現することができた。

### E. 結論

- 1). 組織へ浸潤する T 細胞の定量解析はこれまで困難であったが、病理切片の免疫組織化学染色により可能となった。

- 2). 金属の投与により得られた抗原提示細胞と金属アレルギー誘導後の所属リンパ節細胞を共培養することで、*in vivo* における金属反応性を *in vitro* で評価することが可能となった。

#### 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* 反応系を用いて反応性の高いクローンを選択する。
- ② Pd アレルギーの誘導個体の皮膚組織または血清から Pd 結合性のペプチドを精製・濃縮し、nano LC/MS/MS にかけて、アミノ酸配列を決定する。

## 金属による誘導条件の検討

分担研究者：

鈴木 隆二 独) 国立相模原病院機構相模原病院・臨床研究センター 室長

研究協力者：

○江口 貴紀・重松 宏昭 独) 国立相模原病院機構相模原病院・臨床研究センター・研究員  
鶴見大学歯学部顎顔面外科学講座・大学院

小林 浩 厚生連 長野松代総合病院

熊谷 賢一 独) 国立相模原病院機構相模原病院・臨床研究センター 研究員  
鶴見大学歯学部顎顔面外科学講座・助教

### A.研究目的

金属アレルギーは様々な金属によって惹起される疾患である。特に代表的な金属としてニッケル(Ni)、コバルト(Co)、クロム(Cr)が金属アレルギー3大金属としてあげられる。前回、パラジウム(Pd)を用いて、ヒト金属アレルギーで報告されているような病態を確認できるマウスモデルを報告した。今回我々は、前回報告したマウスモデルを応用し、金属アレルギー三大金属である Ni,Co,Cr と、Pdを用いて腫脹の経時的変化と T 細胞浸潤との関係を明らかにすることを目的とした。

### B.方法

- ・金属：Ni,Co,Cr および Pd
- ・感作：左右の鼠径部に金属+LPS の混合溶液を 125 $\mu$ l ずつ皮内注射
- ・誘導：左右の足蹠部に金属溶液を 25 $\mu$ l ずつ皮内注射

以上の条件で感作を7日間隔で2度行い、誘導を14日間隔で3度行った。誘導後は足蹠部を経時的に腫脹を測定した。また、各誘導後1週間でのT細胞マーカー(CD3)をQRT-PCRにて測定した。

### C.結果

Pd や Cr は腫脹が強く、誘導を繰り返すことで壊死を生じる固体を認めた。Ni は誘導回数を増やすと、腫脹消退まで時間を要する結果となった。Co は誘導回数を増やしても腫脹の変化は認めなかった。また、Ni や Pd のように誘導を繰り返し行うことによって腫脹が増大する金属は、誘導回数に相関して CD3 も増加した。

### D.考察

感作、誘導条件が同じでも、金属によって反応が異なることが明らかとなった。

### E.結論

各々の金属で解析する際は、感作、特に誘導条件を再検討する必要性が示唆された。

### F.今後の方針

感作、誘導条件を検討し、金属アレルギー3大金属である Ni,Co,Cr の解析を進めていく。

## 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度、治療効果、予後の判定などに大いに役立つ。工学的な測定機器による測定を実施し、実際の臨床に役立たせる。
2. ヒスタミン脱炭酸酵素は、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：**人乳中のニッケル濃度測定のため、予備実験として市販の牛乳（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。ニッケル標準液（100ppb）あるいはパラジウム標準液（1000ppm）を牛乳に添加し、最終濃度を 0ppb、1ppb、10ppb、100ppb、1000ppb(=1ppm)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および工学研究科成島研の ICP/MS にて測定結果を出す。またサンプルは成島研の ICP/AES でも測定し、それぞれの方法の精度、感度を比較検討する。

**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。

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 120Kb および下流 146Kb 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した。マウスは現在 2 系統を維持している。腹腔内細胞を FACS にて GFP の発現を観察する。また、脳、眼球、肝臓などの切片を作製し、HE 染色、GFP の免疫染色などをおこない、HDC の遺伝子発現を模倣するのかどうかにつき検討を行なう。GFP の免疫染色は一次抗体には抗 GFP ラビット IgG 抗体、二次抗体に Peroxidase labeled anti-rabbit goat IgG を用い、その後 DAB staining を行なう。

### C. 結果

1. 牛乳に金属の添加を行ない、技術部で前処理、測定を行なったものの、ICP/MS の結果は個々のデータのバラつきが多く、今後前処理の工夫が必要である。HPLC や GC による分離を行うつもりである。
2. マウス腹腔細胞を FACS にて解析した。その結果、腹腔からの細胞採取によって、GFP 蛍光を確認した。マクロファージのマーカー Mac-1 や肥満細胞のマーカー c-kit と、GFP にて展開したが全般的に GFP を高発現した Line#2 と、やや強く発現している Line#1 に展開された。その後、組織の観察をマウス脳、マウス眼球に行う。視床下部の TMN 細胞を中心に染まり、眼球では Ganglion cell layer が染色された。

### D. 考察

1. ICP/MS における測定は前処理の工夫がいる。ICP/AES は希釈せずに測定可能なため、高感度で測定できる可能性もあり、次回に MS, AES の比較実験を行なう。
2. HDC reporter mouse に関しては、出来るだけ内在性遺伝子の発現を忠実に再現するラインを見出す。その後、以前に HDC-KO mice で腹腔内大腸菌の排除が野生型マウスで遅いことが判明しているため、野生型ではヒスタミンが産生されることが予想される。この実験系を用いて、ヒスタミンの産生源を明らかにする。そののち、金属ワイヤーの植え込み実験に供与する予定。

### 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 によるレポーター動物の作製を完了することとする。

### 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。本モデルを活用して、薬物により金属溶出を阻害することも可能であることを示すことができた。今回、このような薬物の1つ  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE) 阻害薬の作用について検討した。また生体試料中の金属測定を臨床での金属アレルギーの診断に応用することを目指し、基礎検討を行った。すなわち、口中に扁平苔癬が生じる1つの原因として歯科金属の溶出があることが知られているが、金属イオンの関与を明確にするために、唾液中の溶出金属を測定する方法を検討した。

### B. 方法

#### 1) ニッケル線からのニッケル溶出の経時変化

雄性 C57BL/6 マウス (6 wks) の背部皮膚に Ni 線を埋入し、経時的に金属線周囲組織ならびに血清中のニッケル濃度を ICP-MS 法を用いて測定した。

#### 2) 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。

#### 3) 溶出したニッケルイオンの作用

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞を用いて塩化ニッケルのサイトカイン産生に対する効果を検討した。

#### 4) 健常人の唾液中の金属イオン濃度の測定

健常人より採取した唾液中の Ag, Al, Au, Co, Cr, Hg, In, Ir, Ni, Pd, Pt, Sn 濃度を ICP-MS により測定した。

### C. 結果

1) Ni 線を埋入したときのニッケル溶出は24時間まで特に顕著であり、血清中のニッケル濃度は24時間をピークに増大した。

2) NHE 阻害薬はニッケルの溶出に対し抑制傾向を示した。

3) マウスのマクロファージ細胞において塩化ニッケルは IL-6 選択的産生抑制作用を示した。

4) 唾液中には Ag, Al, Au, Hg, Ni, Pd が検出された。Cr, Co, Sn, Ir は6人いずれからも検出しなかった

### D. 考察

生体内における金属の溶出は埋入後24時間以内が強く、その後低下していくことが示唆された。また、このニッケルの溶出は、NHE 阻害薬によって抑制されたことから、NHE による  $\text{H}^+$  放出が金属溶出に寄与していることが示唆された。また溶出したニッケルイオンも炎症細胞の機能に影響することが示唆された。唾液中の金属イオンを同時に測定することが可能であったが、さらに唾液の採取方法、金属アレルギー患者での測定が必要である。

### E. 結論

金属アレルギーの診断、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示唆された。

### 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し、健常人での正常範囲と、金属アレルギーを誘発する濃度を明確にする。



## 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 8 例と他の皮膚疾患 14 例で実施した。内因性 AD 患者 8 例中 4 例陽性であった。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好塩基球の役割、および樹状細胞との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 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。また比較としてタンパク抗原を用いた皮膚 Th2 反応モデルでの検討を行う。

### 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。しかしながらタンパク抗原を用いた皮膚 Th2 反応モデルでは好塩基球存在下、非存在下で差は見られなかった。

### 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。しかしながらタンパク抗原の場合では好塩基球は免疫応答に関与していない事が示唆された。

### 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	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文種報徳會病院 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文種報徳會病院 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

### 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 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する。

### B. 方法

1. 日本皮膚アレルギー・接触性皮膚炎学会会員に平成 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を全国規模で調査する。
2. 日本皮膚アレルギー・接触性皮膚炎学会と共催で年 3 回の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・セミナーを全国規模で行う。
3. チタンのアレルギー試薬の国際的な研究に協力する。
4. 金属アレルギーの啓発教育用 Q & A を作成する。

### C結果 現時点までの進捗状況・E今後の予定

1. 平成 23 年度のアレルギー性接触皮膚炎症例およびジャパニーズスタンダードシリーズの陽性率の調査を日本皮膚アレルギー・接触性皮膚炎学会会員に依頼した。現在、結果を集計中。
2. 平成 23 年度は日本皮膚アレルギー・接触性皮膚炎学会と共催で沖縄と仙台の年 2 回の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・セミナーを全国規模で行った。平成 24 年度は千葉、和歌山、北海道などを予定している。
3. T. R. U. E. TEST®の新しい試薬として potassium titanium oxide oxalate が検討されている。チタン合金のインプラントを挿入する前および一定期間後、あるいは不具合のある症例にこれまで酸化チタンやチタンの錯体などによるパッチテストを行っている。しかし、チタンアレルギーの症例はまだ経験していない。平成 24 年 6 月 13 日から 16 日まで開催される the 11<sup>th</sup> Congress of the European Society of Contact Dermatitis に参加し、世界の最新情報を入手する。複数例経験している研究者の情報を確認する予定である。
4. 金属アレルギーの啓発教育用 Q & A を作成する。医師および歯科医師のネットワークをすでに作っており、このネットワークおよび日本皮膚アレルギー・接触性皮膚炎学会のパッチテスト 2012 試薬共同研究委員会の協力を得て、広く一般の人の啓発になる Q & A を作成する予定。

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24年度  
第2回 班会議  
抄録集

日時：平成24年11月12日（月）

場所：東北大学東京分室 会議室A