

201229004B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

(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22－24年度 総合総括研究報告書

主任研究者 小笠原 康悦

平成25(2012)年 3月

# 目 次

## I. 総合総括研究報告

- 金属アレルギーの克服へ向けた効果的診断・予防・治療法の開発研究-----3  
東北大学 加齢医学研究所

小笠原 康悦

## II. 総合分担研究報告

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特異的T細胞解析-----17  
東北大学 加齢医学研究所 小笠原 康悦
2. 金属アレルギー発症モデルマウスにおける網羅的T細胞レセプター解析-----24  
国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 鈴木 隆二
3. 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  
-----32  
東北大学大学院工学研究科 大津 浩
4. 金属の溶出評価と金属アレルギーへの進展機構の解析-----40  
東北大学大学院薬学研究科 平澤 典保
5. アトピー皮膚炎と金属アレルギー-----49  
浜松医科大学皮膚科学 戸倉 新樹
6. 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-----57  
京都大学大学院医学研究科 宮地 良樹
7. 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-----65  
藤田保健衛生大学医学部皮膚科学 松永 佳世子

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----71

## IV. 研究成果の刊行物・別刷-----115

# I. 総合総括研究報告

総合総括研究報告書

研究課題：金属アレルギーの克服へ向けた効果的診断・予防・治療法の開発研究

主任研究者：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

研究要旨

金属アレルギー等のアレルギー性皮膚炎は増加の一途にあり、難治性の合併症を引き起こすため、大きな問題となっている。本研究はこれまで不明であった金属アレルギー発症の分子機構を明らかにし、アレルギー診断・予防・治療に役立つ理論的基盤の確立を目指すことを目的とし、動物モデルを用いた基盤研究、疾患患者サンプルを用いた臨床研究、工学的視点からの新規診断法の開発という観点から多面的に研究を進めている。当研究班が独自に開発した金属アレルギー動物モデルは、Nature 誌の News に掲載され国際的にも高く評価されている。本年度は動物モデルによる基盤的研究から、金属暴露により TCR レパトアが変化することが明らかとなり、またその TCR レパトアの特定に成功した。また、IFN- $\gamma$ , NKG2D, プロテアソームは金属アレルギーの治療標的になり得ることも判明した。さらに、in vitro で樹状細胞を金属感作し、マウスに移入することで金属アレルギーを誘導することが可能となった。臨床的観点からは、金属に対するヒト LTT アッセイにおいて、制御性 T 細胞を除去することにより、感度を高めることができた。また、内因性アトピー性皮膚炎患者において重クロム酸カリウムと硫酸クロムに陽性反応を得、金属アレルギーとのかかわりが疑われた。工学的観点からの研究では、溶出金属イオンの測定法には、蛍光色素解析および ICP-AES 法が有効であることが判明した。

研究分担者

宮地良樹 京都大学医学研究科 教授  
鈴木隆二 国立病院機構相模原病院・臨床  
研究センター 診断・治療研究室 室長  
戸倉新樹 浜松医科大学医学部皮膚科 教  
授  
松永佳世子 藤田保健衛生大学医学部皮膚

科学 教授  
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  
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

研究協力者

笹月健彦 国立国際医療センター 名誉総  
長  
川野光子 東北大・加齢研生体防御 助教  
中山勝文 東北大・加齢研生体防御 助教  
青島有佑 東北大・工・医用材料工学 大  
学院生  
園淵和明 東北大・医・整形外科 大学院  
生  
中村生 東北大・医・生体防御 大学院生  
渡辺真通 東北大・加齢研生体防御 研究  
員  
成島尚之 東北大・工・医用材料工学 教

授  
西屋禎 岡山大・医歯薬学・薬効解析学 准  
教授  
田村裕 千葉大・医・生命情報科学 准教  
授  
菅波晃子 千葉大・医・生命情報科学 特  
任研究員  
樋口繁仁 東北大・加齢研生体防御 非常  
勤講師  
佐藤直毅 東北大・加齢研生体防御 非常  
勤講師  
熊谷賢一 国立病院機構相模原病院 研究

員

小林浩 国立病院機構相模原病院 研究員  
江口貴紀 国立病院機構相模原病院 研究員  
重松宏昭 国立病院機構相模原病院 研究員  
鬼頭由紀子 浜松医大皮膚科学 助教  
山口隼人 浜松医大皮膚科 診療従事者

坂部純一 浜松医大 特別大学院生  
久保利江子 産業医大皮膚科 助教  
尾藤利憲 神戸大皮膚科学 講師  
梶島健治 京都大医学研究科 准教授  
野村尚史 京都大医学研究科 講師  
加藤真弓 京都大医学研究科 助教  
大塚篤司 京都大医学研究科 助教

## A. 研究目的

金属アレルギーは、T 細胞依存性の疾患と考えられているものの、適切な動物モデルがなかったため、発症の分子機構など不明な点が多い。また、合併症が難治なため、患者の QOL を著しく妨げている。加えて、診断はパッチテストが有効ではあるものの検査による感作リスクは避けられず、金属アレルギーの革新的診断法や治療法の開発が強く望まれている。このように本課題は我が国の政策医療において取り組むべき重要課題である。本研究は金属アレルギー発症の分子機構を多面的解析から追究し、理論基盤に立脚したアレルギーの革新的診断、予防、治療法を開発することを目的とする。我々の研究班は、これまで観察が困難であった金属アレルギー動物モデルを作製することに成功し、国際的に高い評価を得ている (*Nature* 2007)。本研究目的を達成するため、

1. 金属アレルギー病因論の追究 (モデル動物からのアプローチ)
  2. 新規診断法と治療法の開発へ向けた理論的基盤の確立 (疾患からのアプローチ)
  3. 金属の溶出量の測定と新材料開発の基盤研究 (材料からのアプローチ)
- を Specific Aim として設定している。

## B. 研究方法

### 1. 金属アレルギー病因論の追究

- i) 改変モデルマウス足蹠部の TCR レパトア解析およびサイトカインプロファイル (T cell markers, Th1, 2-type cytokines など)、組織学的変化を定量的 PCR 法・免疫組織化学的染色法にて時系列的に調査した。
- ii) 遅延型アレルギー反応を誘導するため、OT-II マウス CD4<sup>+</sup> T 細胞と、OVA<sub>323-339</sub> を load した骨髄樹状細胞 (OVA-loaded BMDC) を共にマウス足蹠に皮下注射した。その際、MHC class

II<sup>+</sup> NK 細胞または NK 細胞も同時に移入し、コントロール群と足蹠の腫脹を比較した。

iii) 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 Pd 溶液を投与後、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。

iv) マウスの骨髄細胞を GM-CSF で処理し、骨髄由来樹上細胞 (DC) を得た。この細胞を PdCl<sub>2</sub>+ LPS または NiCl<sub>2</sub>+ LPS で 24 時間処理した。これらの DC を良く洗浄したのち、C57BL/6 マウスに尾静脈注射により移入し、10 日後に PdCl<sub>2</sub> 溶液、NiCl<sub>2</sub> 溶液、CoCl<sub>2</sub> 溶液をマウスの耳介に皮内注射し、耳の腫脹を測定した。

v) 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) 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した。

### 2. 新規診断法と治療法の開発へ向けた理論的基盤の確立 (疾患からのアプローチ)

- i) 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した。
- ii) 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のための教育 WS・セミナーを全国規模で行った。
- iii) 一般国民向けの金属アレルギーの啓発教育用 Q&A を作成する。
- iv) 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証明するため、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に関わる酵素の同定を試みた。
- v) 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。

### 3. 金属の溶出量の測定と新材料開発の基盤研究 (材料からのアプローチ)

i) 医用金属材料からの金属溶出を検討するため、マウスの背部皮膚に Co-Cr-Mo-Ni 線を埋入し、金属線周囲組織中のニッケル(Ni)、コバルト(Co)、クロム(Cr)、モリブデン(Mo)の濃度を ICP-MS 法を用いて測定した。

ii) アトピー性皮膚炎患者の汗中の金属、(Ni、Co、Cr) のイオン濃度を ICP-MS 法で測定した。

iii) Ni 線からの Ni 溶出に対する抗炎症薬の効果を検証するため、マウスに、dexamethasone、NHE 阻害薬を経口投与し、その後に背部皮膚に Ni 線を埋入した。8 時間後にニッケル周囲組織を採取し、Ni 濃度を測定した。

#### (倫理面への配慮)

実験動物の使用および遺伝子組み換え実験においては、機関の委員会の審査及び承認を受け倫理基準を厳守している。さらに「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」「研究開発に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」について遵守する。

臨床試験計画については、研究班内で十分な検討を行い、さらに各研究実施機関での倫理審査委員会において試験実施の妥当性について科学的、倫理的審査を受け承認されたことを確認した後、症例登録を行っている。試験実施にあつては被験者の人権に配慮し、文書を用いて適切な説明を行った上で同意を得る。必要であれば試験計画の改訂を行い、施設の倫理審査委員会の再審査を受けることとした。倫理的に試験を実施するために、各研究実施機関において臨床試験審査委員会、安全性評価委員会、監査委員会等の監視下で適切な臨床試験の運営を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 金属アレルギー病因論の追究 (モデル動物からのアプローチ)

i) 誘導注射後 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-type cytokines の優位性を認め、アポトーシス因子においては Fas の上昇を認めた。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 陽性細胞が主であった。また、T 細胞レパトアの skew が確認され、クローナルな増殖が示唆された。

ii) 遅延型アレルギー反応を抑制するドレス細胞 (MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞) を発見した (Nakayama et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011)。

iii) 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 細胞ほぼすべてから IFN- $\gamma$  産生を検出した。共刺激分子の発現抑制マウスにおいて、金属アレルギーの発症が有意に抑制された。

iv) Pd+LPS 処理 DC を移入したマウスは PdCl<sub>2</sub> のみならず NiCl<sub>2</sub> 及び CoCl<sub>2</sub> でも炎症が惹起された。その際、CoCl<sub>2</sub> は、PdCl<sub>2</sub> や NiCl<sub>2</sub> よりも激しい炎症を誘導した。

v) 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。

#### 2. 新規診断法と治療法の開発へ向けた理論的基盤の確立 (疾患からのアプローチ)

i) 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。また、同期間に全国 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。

- ii) 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。
- iii) 一般国民向けの金属アレルギーQ&A については、質問事項を設定し、回答作成を行った。
- iv) プロフィラグリンのプロセシング酵素としてカリクレイン5 (KLK5)を同定した。
- v) 浜松医大でも内因性 AD 患者に金属パッチテスト陽性者がおり、産業医大での結果を裏付けた。

### 3. 金属の溶出量の測定と新材料開発の基盤研究 (材料からのアプローチ)

- i) CCM 線を埋入し、2週間後金属線周囲組織に弱いながら炎症が生じた。特に Co の溶出が顕著であった。
- ii) アトピー性皮膚炎患者の汗中には Ni、Co、Cr 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。
- iii) Amiloride ならびにより NHE に選択的な dimethylamiloride および ethylisopropyl-amiloride はニッケルの溶出に対し抑制傾向を示した。

## D. 考察

### 1. 金属アレルギー病因論の追究 (モデル動物からのアプローチ)

- i) 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。
- ii) ドレス細胞 (MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞) は、遅延型アレルギー反応において足蹠の腫脹を抑制したことから、金属アレルギーにおいても、

MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞が関与する可能性が考えられた。

- iii) Pd アレルギーにおいて T 細胞の共刺激分子を介して IFN- $\gamma$  が誘導されると示唆された。共刺激分子の発現抑制マウスにおいて、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と示唆された。
- iv) 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。
- v) 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であると考えられたため、今後、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。

### 2. 新規診断法と治療法の開発へ向けた理論的基盤の確立 (疾患からのアプローチ)

- i) 歯科医師と皮膚科医師の連携WS をさらに拡大する。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 P T 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などを解説した。
- ii) プロフィラグリンのプロセシング酵素に関してさらにトリマー、ダイマー、モノマーを形成していくかを追究する。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。また金属アレルギー症例の集積を継続する。

### 3. 金属の溶出量の測定と新材料開発の基盤研究 (材料からのアプローチ)

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 Ni 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. 評価

### 1) 達成度について

本研究目的である「金属アレルギー発症の分子機構を多面的解析から追究し、理論基盤に立脚したアレルギーの革新的診断、予防、治療法を開発すること」について、基礎研究の結果を踏まえ、金属アレルギーの革新的診断法や治療法の開発に向けて総括的かつ客観的に追究してきた。皮膚科学・歯科・工学・薬学分野の知見・意見を基に各分野の技術を駆使し、基礎研究分野と臨床分野の両局面から統括的に研究を遂行することで、本研究課題開始当初の目的を達成しているものと考えられる。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究班による接触皮膚炎の実態調査結果により、減少傾向にあった金属による接触皮膚炎罹患者数が再度増加傾向にあることが明らかとなった。掌蹠膿疱症など重篤な疾患を併発することが報告されている金属アレルギーについて、原因から発症機序・予防・治療までを追究する本研究による成果は、日本国内のみならず、国際的に重要な意義を持つと考えられる。

金属アレルギーの研究は歴史的に患者の末梢血単核球を用いて行われてきたが、我々の開発した「単一の金属アレルギー感作を行い、かつ、ヒトの金属アレルギー症状を再現出来る動物モデル」を用いることで、これまで困難であった「発症段階の経時的な解析」が可能となり、これまでの患者サンプルを用いた解析と組み合わせることで、発症の原因追究に貢献できるものと期待できる。

金属アレルギーの診断は主にパッチテストにより行われているが、実際の臨床現場における判定基準は様々であり、確定的な診断を行うためには、まず臨床医の教育が求められる。本研究班主催のワークショップにより、全国の皮膚科医師と歯科医師の連携を高めるとともに、受診機関によるバラツキのない確定診断への第一歩を踏み出せたものと考えられる。また、金属アレルギーQ&A作成により、一般国民に向けた啓発教育の促進への貢献が期待される。

以上により、本研究成果による学術的・国際

的・社会的意義は極めて高いものであると考えられる。

### 3) 今後の展望について

本研究班により、臨床と基礎研究分野を融合し統括的な研究の遂行が可能となった。特に、単一の金属により感作された動物モデルを構築し、尚且つその症状がヒトの金属アレルギーに極めて近似していることは、今後の研究の発展に重要な事柄と言える。しかしながら、我々が構築したモデルは現段階ではマウスモデルであり、ヒトの臨床状況とは異なる。すなわち、ヒトと同様に遺伝的背景に多型を持つ霊長類を用いて介入実験を行うことで、よりヒトの臨床状態を再現可能となり、遺伝的多型による罹患率や症状の違いなどについて、さらに情報の構築が可能となる。実際に霊長類の中でもハンドリングが比較的容易なマーモセットを用いて、リンパ球による試験法の構築および金属アレルギーモデルの構築の準備を行っている。また次世代シーケンサーの投入により、ヒトの遺伝的多型と実験動物としての霊長類の遺伝的多型をリンクさせることで、どのような金属に対し感受性を持つのか、発症した場合の症状の状況について、予想可能なデータベースを構築し、予防医療への貢献が期待される。

また、皮膚科医と歯科医の連携を高めるワークショップを持続的かつ定期的に開催し、患者側からみて一定の条件で確定診断が行われる診療機関の拡大に貢献していく。同時に一般の国民に向けた啓発教育の一環として、金属アレルギーQ&Aの配布により、予防・診断・治療の効率化を目指す。

工学分野からの研究成果として、実際の金属アレルギー患者サンプルにおける含有金属の定量解析法を構築したことは特筆に値する。今後は、より安定的かつ簡便で、少量の患者サンプルから、より多くの金属種について定量可能な解析法を構築することで、患者個人がどのような金属に暴露され、感作が成立しているのかを予測可能なオーダーメイド医療への貢献を視野に入れ、更なる解析法の開発を行っていく。

### 4) 研究内容の効率性について

本研究班は、皮膚科学・歯学・工学・薬学の



研究者により構成されており、多面的な研究遂行を目指している。個々の研究については、最初に設定した Specific Aim

1. 金属アレルギー病因論の追究（モデル動物からのアプローチ）
2. 新規診断法と治療法の開発へ向けた理論的基盤の確立（疾患からのアプローチ）
3. 金属の溶出量の測定と新材料開発の基盤研究（材料からのアプローチ）

に基づいて遂行し、統括的に進めるべき局面においては柔軟に協力していくことで、3年間という限られた研究期間の中で、より効率的に研究を遂行することに努めた。また、研究期間を通して、社会への情報還元・研究成果の発信を念頭に置いて研究を遂行することで、基礎研究と臨床分野とのバランスのとれた研究を遂行できたものと考えられる。

## F. 結論

- i) 金属アレルギーをマウスに誘導すると炎症局所および所属リンパ節にT細胞の集積とレパトアのSkewが観察された。今回の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ている可能性が高い。
- ii) ドレス細胞（MHC class II<sup>+</sup> NK細胞）は、遅延型アレルギー反応において足蹠の腫脹を抑制した。
- iii) PdアレルギーにおいてT細胞の共刺激分子を介してIFN- $\gamma$ が誘導されると示唆された。
- iv) 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にも反応する可能性が示唆された。
- v) 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であることが判明した。
- vi) 金属アレルギーの予防、診断、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。
- vii) 金属は2010年の全国調査で、最も重要なアレルギー24種のうち上位を占めた。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。金属アレルギーの診断を改善するためには歯科と皮膚科医師の連携WSをさらに拡大する必要

がある。

viii) 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。

## G. 研究発表

- 1) 海外  
口頭発表 46  
原著論文による発表 107  
それ以外（レビュー等）の発表 11

そのうち主なもの

論文発表

原著論文

1. Nakayama M, Kurokawa K, Nakamura K, Lee BL, Sekimizu K, Kubagawa H, Hiramatsu K, Yagita H, Okumura K, Takai T, Underhill DM, Aderem A, Ogasawara K. Inhibitory receptor paired Ig-like receptor B is exploited by *Staphylococcus aureus* for virulence. *J.Immuno.* 189 (12): 5903-5911 (2012).
2. Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, and Ogasawara K. Natural Killer (NK)-dendritic cell interactions generate MHC Class II-dressed NK cells that regulate CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 18360-18365 (2011).
3. Kojima Y, Nakayama M, Nishina T, Nakano H, Koyanagi M, Takeda K, Okumura K, Yagita H. Importin b1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells. *J. Biol. Chem.* 286: 43383-43393 (2011).
4. Takeda K, Nakayama M, Sakaki M, Hayakawa Y, Imawari M, Ogasawara K, Okumura K, Smyth MJ. IFN- $\gamma$  production by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. *J. Leukoc. Biol.* 90: 777-785 (2011).
5. 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.
6. 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.
  7. 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.]
  8. 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.
  9. Nakaoka K, Yamada H, Horiuchi T, Saito T, Arai G, Kumagai K, Ito K, Hamada Y. 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.
  10. Ito M, Kumagai K, Sakai N, Fukushima Y, Hamada Y. 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
  11. Kitaura K, Fujii Y, Hayasaka D, Matsutani T, Shirai K, Nagata N, Lim CK, Suzuki S, Takasaki T, Suzuki R, 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*. 2011; 187 (8): 3919-30.
  12. Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R. Immune-related gene expression profile in laboratory common marmosets assessed by an accurate quantitative real-time PCR using selected reference genes. *PLoS One*. 2013; 8 (2): e56296.
  13. Kobayashi H, Kumagai K, Gotoh A, Eguchi T, Yamada H, Hamada Y, Suzuki S, Suzuki R. Upregulation of epidermal growth factor receptor 4 in oral leukoplakia. *Int J Oral Sci* 2013, in press.
  14. Sugita K, Kabashima K, Sakabe J-I, Yoshiki R, Tanizaki H, Tokura Y: FTY720 regulates bone marrow egress of eosinophils and modulates late phase skin reaction in mice. *Am J Pathol* 177:1881-1887, 2010.
  15. Sawada Y, Nakamura M, Bito T, Fukamachi S, Kabashima R, Sugita K, Hino R, Tokura Y: Cholinergic urticaria: Studies on the muscarinic cholinergic receptor M3 in the anhidrotic and hypohidrotic skin. *J Invest Dermatol* 130: 2683-2686, 2010.
  16. Yoshiki R, Kabashima K, Sakabe J-I, Sugita K, Bito T, Nakamura M, Malissen B, Tokura Y: The mandatory role of IL-10-producing and OX40L-expressing mature Langerhans cells in local UVB-induced immunosuppression. *J Immunol* 84: 5670-5677, 2010.
  17. Kabashima K, Sakabe J-I, Yoshiki R, Tabata Y, Kohno K, Tokura Y: Involvement of Wnt signaling in dermal fibroblasts. *Am J Pathol* 176: 721-732, 2010.
  18. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, Okazaki T Tokura Y: Tumor cell expression of programmed cell death 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 116: 1757-1766, 2010.
  19. Mori T, Ishida K, Mukumoto S, Yamada Y, Imokawa G, Kabashima K, Kobayashi M, Bito T, Nakamura M, Ogasawara K, Tokura Y: Comparison of skin barrier function and sensory nerve electric current perception threshold between IgE-high extrinsic and IgE-normal intrinsic types of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 162: 83-90, 2010.
  20. Sugita K, Kabashima K, Yoshiki R,

- Ikenouchi-Sugita A, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N, Tokura Y: Inducible Nitric Oxide Synthase Downmodulates Contact Hypersensitivity by Suppressing Dendritic Cell Migration and Survival. *J Invest Dermatol* 130: 464-471, 2010.
21. Sawada Y, Hino R, Hama K, Ohmori S, Fueki H, Yamada S, Fukamachi S, Tajiri M, Kumo R, Yoshioka M, Nakashima D, Sugita K, Yoshiki R, Shimauchi T, Mori T, Izu K, Kobayashi M, Nakamura M, Tokura Y: The type of skin eruptions is an independent prognostic indicator for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 117: 3961-3967, 2011.
  22. Fukamachi S, Mori T, Sakabe J-I, Shiraishi N, Kuroda E, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y: Topical cholecystokinin depresses itch-associated scratching behavior in mice. *J Invest Dermatol* 131: 956-961, 2011.
  23. Fukamachi S, Bito T, Shiraishi N, Kobayashi M, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y: Modulation of semaphorin 3A expression by calcium concentration and histamine in human keratinocytes and fibroblasts. *J Dermatol Sci* 62: 118-123, 2011.
  24. Bito T, Sumita N, Ashida M, Budiyo A, Ueda M, Ichihashi M, Tokura Y, Nishigori C: Inhibition of epidermal growth factor receptor and PI3K/Akt signaling suppresses cell proliferation and survival through regulation of Stat3 activation in human cutaneous squamous cell carcinoma. *J Skin Cancer* 2011:874571, 2011.
  25. Kobayashi M, Nakagawa T, Fukamachi K, Nakamura M, Tokura Y. Efficacy of combined topical treatment of acne vulgaris with adapalene and nadifloxacin: A randomized study. *J Dermatol*. 38: 1163-1166, 2011.
  26. 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).
  27. Shimauchi T, Sasada K, Kito Y, Mori T, Hata M, Fujiyama T, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y: CD8<sup>+</sup> Sézary syndrome with IL-22 production modulated by bacterial sepsis. *Br J Dermatol* (in press).
  28. 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.
  29. 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).
  30. 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.
  31. 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.
  32. 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.
  33. 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).
34. 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.
  35. 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.
  36. 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.
  37. 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.
  38. 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.
  39. 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).
  40. 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).
  41. 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*. 2012 Aug 27.
  42. 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.
  43. 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*. 2012 Feb 29.
  44. 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*. 2012 Feb;129(2):536-43
  45. Otsuka A, Honda T, Doi H, Miyachi Y, Kabashima K. An H1-histamine receptor antagonist decreases serum interleukin-31 levels in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2011 Feb;164(2):455-6.
  46. Honda T, Otsuka A, Tanizaki H, Minegaki Y, Nagao K, Waldmann H, Tomura M, Hori S, Miyachi Y, Kabashima K. Enhanced murine contact hypersensitivity by depletion of endogenous regulatory T cells in the sensitization phase. *J Dermatol Sci*. 2011 Feb;61(2):144-7.
  47. Egawa G, Honda T, Tanizaki H, Doi H, Miyachi Y, Kabashima K. In vivo imaging of T-cell motility in the elicitation phase of contact hypersensitivity using two-photon microscopy. *J Invest Dermatol*. 2011 Apr;131(4):977-9.
  48. 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

49. 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
50. 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

総説論文、著書

1. Tokura Y: Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 58: 1-7, 2010.
2. Tokura Y: Hypersensitivity to mosquito bites and EBV. WCD Special Book. 22nd World Congress of Dermatology. 2011, pp423-428.
3. Nakamura M, Tokura Y: Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *J Dermatol Sci* 61: 7-13, 2011.
4. Nakamura M, Tokura Y: Pathogenesis of alopecia areata: why does alopecia areata develop in a round pattern? *Exp Dermatol* (in press).
5. McGill N-K, Vyas J, Shimauchi T, Tokura Y, Piguat V: HTLV-1 Associated Infective Dermatitis: Updates on the Pathogenesis. *Exp Dermatol* 21: 815-821, 2012.
6. 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).
7. Bito T, Sawada Y, Tokura Y: Pathogenesis of cholinergic urticaria in relation to sweating. *Allergol Int* (in press).
8. Fujiyama T, Tokura Y: Clinical and histopathological differential diagnosis of eosinophilic pustular folliculitis. *J Dermatol* (in press).

学会発表  
国外学会

1. Nakayama M, Aderem A, Kawano M, Okumura K, Takai T, Ogasawara K. *Staphylococcus aureus* binds to paired Ig-like receptor-B to suppress the innate immune response. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug., 2010.
2. Kawano M, Nakayama M, Ogasawara K. Specific T cells increased by metal allergy. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug., 2010.
3. Yamada H, Nakaoka K, Horiuchi T, Kumagai K, Ikawa T, Shigeta Y, Iino M, Ogawa T, Hamada Y. 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.
4. Kumagai K, Kobayashi H, Gotoh A, Eguchi T, Yamada H, Suzuki R, Hamada Y. 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.
5. Hamada Y, Wake M, Kumagai K, Nakaoka K, Yamada H, Nakatani Y, Suzuki R, Fukui N. 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.
6. Tokura Y: Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. 35<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology. 2010.12.4. Wakayama.
7. Tokura Y: Psoriasis and Th17-mediated skin diseases. Shanghai Immunodermatology

- Forum. Shanghai, China, 2010.5.20.
8. Tokura Y: Photoimmunology: sensitization and suppression. Australasian Society for Dermatology Research 2011 Annual Scientific Meeting. 2011.5.19. Perth, Australia.
  9. Tokura Y: Atopic dermatitis and skin barrier in the extrinsic and intrinsic types. The 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the Taiwanese Dermatological Association. 2011.11.26. Taipei, Taiwan.
  10. Tokura Y: The type of skin eruptions is an independent prognostic indicator for adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). 5<sup>th</sup> International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphomas. 2011.1.15. Berlin, Germany.
  11. Tokura Y: Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. Ancillary Meeting on Atopic Dermatitis. 22<sup>nd</sup> World Congress of Dermatology 2011. 2011.5.24. Seoul, Korea.
  12. Tokura Y: Recent concept on the role of cutaneous dendritic cells in UVB-induced immunosuppression. Aging and Photoaging: Asian Forum for Investigative Dermatology. 22<sup>nd</sup> World Congress of Dermatology 2011. Korean Society for Investigative Dermatology (KSID) Ancillary Meeting. 2011.5.24. Seoul, Korea.
  13. Tokura Y: Immunosuppression and Complications in the Disordered Axis of TNF- $\alpha$  and Th17 Cells. 22<sup>nd</sup> World Congress of Dermatology. 2011.5.25. Seoul, Korea.
  14. Tokura Y: Adult T-cell leukemia / lymphoma and HTLV-1. Cutaneous Lymphomas of Viral Origin. 22<sup>nd</sup> World Congress of Dermatology. 2011.5.27. Seoul, Korea.
  15. Tokura Y: Adult T-cell leukemia/lymphoma: Treg neoplasm with affinity to the skin. International Immunodermatology Symposium (Post-ESDR 2011). 2011.9.12. Heidelberg, Germany.
  16. Tokura Y: Skin barrier impairment is heterogeneous in atopic dermatitis. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2011.12.10. Kyoto, Japan.
  17. Tokura Y: Mechanism of Photo-Allergic Contact Dermatitis from Ketoprofen. 11<sup>th</sup> Congress of The European Society of Contact Dermatitis (ESCD 2012).2012.6.13. Malmo, Sweden.
  18. Tokura Y: Innate immunity of the epidermis toward bacterial and fungal infection : lessons from Th17-dysregulated conditions. The 10<sup>th</sup> Symposium of the Cutaneous Biology Research Institute, Yonsei University College of Medicine. 2012.9.8. Seoul, Korea
  19. Tokura Y: Adultt-cell leukaemia / Lymphoma: Impaired innate immunity of the skin. CUTANEOUS LYMPHOMAS(2nd World Congress of Cutaneous Lymphomas, 6<sup>th</sup> International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphoma) 2013.2.7. Berlin, Germany.
  20. 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
  21. 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
  22. Otsuka A, Miyachi Y, Kabashima K. The role of basophils in skin Th2 response using a newly generated basophil-specific conditional depletion model. The 98<sup>th</sup> AAI Annual. San Francisco, May 2011
  23. Kabashima K. Role of T cell subsets in the development of atopic dermatitis. LIAI Immunology Symposium, Tokyo, Dec. 2010
  24. Kabashima K. Helper T cell subsets in atopic eczema. New Trends in Allergy VII and 6<sup>th</sup> Georg Rajka Symposium. In Munich, Germany, July 2010
  25. Kabashima K. Recent advances in the mechanism of contact dermatitis. The 28<sup>th</sup>

Annual meeting of the Korean Society for Contact Dermatitis and Skin. Seoul, Korea, June 2010

## 2) 国内

口頭発表	49
原著論文による発表	0
それ以外（レビュー等）による発表	184

### そのうち主なもの 論文発表

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ギーの陽性率 *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
4. 川野光子, 小笠原康悦: 金属アレルギーの免疫学 Up-to-date. *Visual Dermatology* 10(11): 1208-1212, 2011.
5. 矢上晶子, 松永佳世子: パッチテストの基本手技と解釈 *医学のあゆみ* Vol.240 No.4: 321-326, 2011.
6. 矢上晶子, 松永佳世子: 既成パッチテストテープはどこまで使えるか. *What's new in 皮膚科* 2012-2013: 46-47, 2011.
7. 伊豆邦夫, 森 智子, 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎に対するタクロリムス軟膏の使用経験—全身への外用療法による皮疹とQOLの改善—. *Progress in Medicine* 31: 1573-1577, 2011.
8. 戸倉新樹: アレルギー・マーチ~皮膚科医からの意見~. *日小皮会誌* 30: 221, 2011.
9. 藤山俊晴, 渡邊佑子, 橋爪秀夫. 【薬疹-2010】臨床例 皮膚浸潤CD4陽性細胞中にHHV-6抗原を証明しえた drug-induced hypersensitivity syndrome(DIHS). *皮膚病診療* 32巻8号:891-94, 2010.
10. 川村哲也, 山本真由美, 藤山俊晴, 伊藤泰介, 橋爪秀夫, 深水秀一. 術後15年後に発症した悪性黒色腫. *臨床皮膚科* 64巻12号 951-955, 2010.
11. 金林純子, 梗田和美, 橋爪秀夫. スポロトリコーシスの1例 *Visual Dermatology* 10巻1号: 74-75, 2011.
12. 古川福実, 伊豆邦夫, 橋爪秀夫. 【小児の発疹の診かた】川崎病にみられる発疹. *小児内科* 42巻1号:93-98, 2010. 橋爪秀夫.
13. 橋爪秀夫. 【薬剤アレルギーの診断と治療の進歩】重症薬疹の治療. *臨床免疫・アレルギー科* 53巻3号:292-300, 2010.
14. 橋爪秀夫. 薬疹はどうして起こるか 薬疹発症メカニズムの不思議. *Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology* 4巻2号:67-75, 2010.
15. 橋爪秀夫. *dermatology* モルトリンフォーマ. *皮膚アレルギーフロンティア* 8巻2号:128, 2010.
16. 増悪化アレルギー性皮膚炎症におけるヒスタミンの役割. 平澤典保, 大内和雄, *YAKUGAKU ZASSHI* 131: 179-184 (2011)
17. 橋爪秀夫. 皮膚悪性リンパ腫. 山口徹, 福井次矢, 北原光夫(編) 今日の治療指針 2011 医学書院 東京, 2011年
18. 橋爪秀夫. 湿疹(アトピー性皮膚炎・接触皮膚炎). 泉 孝英(編) ガイドライン外来診療 2010 日経メディカル開発 東京, 2010年
19. 橋爪秀夫. 貨幣状湿疹, 自家感作性皮膚炎. 瀧川雅浩, 渡辺晋一(編) 皮膚疾患最新の治療 2011-2012 南江堂 東京, 2011年

### 学会発表

1. Ogasawara K. Immune-regulation in metal allergy. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, Dec., 2012
2. Nakayama M, Takeda K, Nakamura K, Ogasawara K. Trogocytosis-mediated generation of regulatory MHCII-dressed NK cells. The 41st Annual Meeting of Japanese

- Society for Immunology, Kobe, Dec., 2012.
3. Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Sonofuchi K, Nakamura S, Watanabe M, Ogasawara K. Analysis of T cells on development of metal allergy. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, Dec., 2012
  4. Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. NK-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4+ T cells. The 40th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Makuohari, Nov. 2011.
  5. Kawano M, Kumagai K, Kobayashi H, Nakayama M, Suzuki R, Ogasawara K. Investigation of metal allergy using mouse model. The 40th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Makuohari, Nov. 2011.
  6. 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
  7. 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)
  8. 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)
  9. 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
  10. 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
  11. 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し



## II. 総合分担研究報告

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)  
総合分担研究報告書

分担課題：マウス金属アレルギーモデルを用いた金属アレルギー特異的T細胞解析

分担研究者 小笠原 康悦 東北大学加齢医学研究所 加齢生体防御学研究分野 教授

研究協力者

笹月健彦	国立国際医療センター	名誉総長	佐藤直毅	東北大加齢研	生体防御	非常勤
川野光子	東北大加齢研	生体防御 助教	講師			
中山勝文	東北大加齢研	生体防御 助教	鈴木忍	東北大加齢研	生体防御	非常勤
青島有佑	東北大 工学	医用材料 院生	講師			
園淵和明	東北大 医学	整形外科 院生	高橋哲	東北大 歯学	顎顔面口腔外科	
中村生	東北大 医学	生体防御 院生	教授			
渡辺真通	東北大加齢研	生体防御 研究員	橋元亘	東北大 歯学	顎顔面口腔外科	
成島尚之	東北大 工学	医用材料 教授	助教			
上田恭介	東北大 工学	医用材料 助教	小野瑞穂	東北大加齢研	生体防御	
西屋禎	岡山大 医歯薬	薬効解析 准教授	土橋明	東北大加齢研	生体防御	
田村裕	千葉大 医学	生命情報 准教授	高橋亜希子	東北大加齢研	生体防御	
菅波晃子	千葉大 医学	生命情報 特任研究員	橋本卓	東北大加齢研	生体防御	
樋口繁仁	東北大加齢研	生体防御 非常勤	遠藤実里	東北大加齢研	生体防御	
講師			石塚まりこ	東北大加齢研	生体防御	
			近藤威	東北大加齢研	生体防御	
			佐藤隆	ノバルサイエンス株式会社		

研究要旨

金属アレルギーはT細胞依存性のIV型（遅延型）アレルギー反応であると考えられているが、その分子機構は不明のままである。我々は、当研究班で開発した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。これまでの結果からT細胞が金属アレルギーの発症に関与することが示唆された。金属アレルギーの誘導におけるエフェクターT細胞サブセットおよびエフェクター分子を同定するとともに、T細胞が応答するために必要不可欠である共刺激分子の同定を行った。金属アレルギー発症マウスの所属リンパ節細胞を繰り返し移入することで、*in vivo*においてエフェクター細胞の濃縮を試み、V $\alpha$ レパトアについての情報が得られた。この情報を下に、TCR  $\alpha$  chain およびMHC class I および class II のアミノ酸配列情報からスーパーコンピューターを用いた三次元立体構築を行い、エネルギー的に安定な状態を比較した。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。また、実際に医療現場等で用いられる生体材料金属について、これまでに開発された合金の長所を生かしつつ、炎症誘導を抑えるような素材開発を見据えた基礎実験を開始し、金属ワイヤーを埋入した組織における炎症・線溶系に関与する分子の発現評価を行った。

## A. 研究目的

金属アレルギーは、我々に身近なアレルギー疾患であり、ピアスなどの装飾品や医療現場で用いられる金属から溶出した金属イオンが原因となり発症すると考えられている。金属アレルギーの原因金属としてニッケル (Ni)、コバルト (Co)、クロム (Cr) が知られており、近年では歯科医療で用いられるパラジウム (Pd) もその一つとされる。例えば、口腔内ではこれらの金属がイオン化し、口腔最近、唾液、血液などのタンパクと結合して抗原性を持つのではないかと考えられている。すなわち、金属アレルギーはイオン化した金属に最近成分などがアジュバントとして働き、アレルギーの発症および増悪に関与している可能性が考えられる。しかしながらその発症の分子機構は不明である。

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。これまでの我々の研究により、金属アレルギーに T 細胞が関与することが明らかとなったことから、惹起部位に浸潤する T 細胞の定量解析や、金属アレルギーの発症に関与するエフェクター細胞やエフェクター分子の同定を行った。また、T 細胞が抗原に特異的に応答するためには、共刺激分子を介した刺激が必要不可欠であるが、金属アレルギーにおいて機能する共刺激分子についてはこれまで不明であったことから、その同定および金属アレルギー誘導の分子機構を追究した。金属アレルギーを誘導した際、炎症組織および所属リンパ節における T 細胞受容体 (TCR) レパトア解析を行い、MHC 分子との相互作用について三次元立体構築を行い、エネルギー的に安定な状態の検討を行った。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。実際に医療現場等で用いられる生体材料金属について、これまでに開発された合金の長所を生かしつつ、炎症誘導を抑えるような素材

開発を見据えた基礎実験を開始し、金属ワイヤーを埋入した組織における炎症・線溶系に関与する分子の発現評価を行った。

## B. 方法

- 1) 金属アレルギーマウスモデル  
C57BL/6 マウスまたは BALB/c マウスに、10 mM PdCl<sub>2</sub> / 10 μg/ml LPS を 250 μl 腹腔内投与して Pd 感作を行い、10 日後に 0.5 mM PdCl<sub>2</sub> を耳介に皮内投与して金属アレルギーを誘導した。
- 2) アレルギー特異的な T 細胞の濃縮  
上記の方法により金属アレルギーを耳介に誘導した BALB/c マウスの顎下リンパ節を採取し、single cell に調整後、BALB/c nu-nu マウスへ静脈内投与により養子移入した。そのマウスの耳介に 4 回惹起を行った後、同様に顎下リンパ節細胞を調整し、同様に BALB/c nu-nu マウスに養子移入した。これを繰り返すことで金属アレルギー特異的な T 細胞の濃縮を行った。
- 3) 炎症局所における T 細胞の定量解析  
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。
- 4) エフェクター T 細胞およびエフェクター分子の同定  
上記 2 によりエフェクター T 細胞が濃縮状態にある BALB/c nu-nu 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た後、Pd アレルギーを誘導し、惹起後 24 時間ごとに耳介の腫脹を計測し、Pd アレルギーの誘導が起こったか否か検討した。各種遺伝子欠損マウス (β2m, I-Ab, IFN-γ and perforin) および C57BL/6 マウス (コントロール) に上記 1 と同様に Pd アレルギーを誘導し、Pd アレルギーの誘導が起こったか否か検討した。

また、C57BL/6 マウスに上記と同様に金属アレルギーを誘導し、15 時間後に顎下リンパ節を採取し、フローサイトメトリーによりサイトカイン産生について解析した。

マウスの耳介に金属溶液を投与（10 mM PdCl<sub>2</sub>, 20 μl/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、NKG2D リガンドの発現を評価した。

5) TCR・MHC 分子間の安定状態解析  
相模原病院鈴木隆二室長による TCR レパトア解析結果から、最有力候補である Vα11-1 および MHC class I (H-2D<sup>d</sup>, H-2L<sup>d</sup>) または II (I-Eα, I-Aα) のアミノ酸配列をもとにスーパーコンピューターを用いて三次元立体構築を試み、エネルギー的安定状態を *in silico* 解析により比較した。

6) MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞の解析  
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。また、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植し、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）移植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>）。

7) 金属ワイヤー埋入による炎症・線溶系関連分子の発現解析  
C57BL/6 マウスの背部皮下に各種金属ワイヤー（Ni, CCM, ultra low Ni-CCM, ultra low-Ni CCM+Zr）を埋入し、3 日目に組織を採取、total RNA を抽出後、cDNA を合成し、炎症・線溶系関連分子および GAPDH の発現を real time PCR を用いて評価した。

## C. 結果

- 1) 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。
- 2) 抗 CD8 抗体投与群、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。抗 CD4 抗体投与群、I-Ab 欠損マウスおよび perforin 欠損マウスではコントロール群と比べ耳介腫脹に影響は認められなかった。また、金属アレルギー惹起後 15 時間目の所属リンパ節において IFN-γの産生が認められ、産生細胞は CD8<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup> T 細胞であった。金属投与部位には NKG2D リガンドの発現誘導が認められた。
- 3) レパトア解析により炎症局所およびその所属リンパ節において skew が認められた TCR α chain は MHC class II と interaction する際に、エネルギー状態がより安定になることが計算上示唆された。
- 4) NK 細胞と樹状細胞を 5 分間共培養することにより、MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞が出現した（図 2）。OT-II マウスから得た CD4<sup>+</sup> T 細胞を OVA-loaded BMDC と共移植した場合、足蹠の腫脹が観察された。これに対し MHC class II<sup>+</sup> NK 細胞を共移植した場合、足蹠の腫脹は有意に減少した。MHC class II<sup>-</sup> NK 細胞を共移植した場合には、腫脹の減少が抑えられた（図 2）。
- 5) Ni ワイヤーを埋入した群では、炎症・線溶系関連分子の発現が有意に増加した。ultra low Ni-CCM および CCM ワイヤーを埋入した場合には、炎症・線溶系関連分子の発現はそれほど増加しなかったが、ultra low Ni-CCM における発現量は、CCM に比べて有意差をもって低発現であった。

## D. 考察

- 1) 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。
- 2) T 細胞サブセット除去実験結果から、Pd