

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には、第一に金属からの金属イオンの溶出、組織浸透が生じるが、これまでこれらの減少についてはほとんど解析されていなかった。筆者らは、ICP-MSを用いて生体試料中の金属イオン濃度を精度よく測定する方法を確立し、さらにマウスを用いた金属線埋入モデルおよび金属塗布モデル、ならびに細胞を用いた *in vitro* での金属溶出モデルを開発して、金属の溶出、組織浸透を定量的に測定することを可能にした。本研究により、金属溶出には炎症性細胞が寄与し、炎症刺激が加わるによりさらに増大すること、またその分子機序として Na^+/H^+ exchanger (NHE) が関与し、その阻害薬 amiloride が *in vivo* および、*in vitro* のいずれにおいても金属溶出を抑制することを明らかにした。また臨床サンプルとして、汗、及び唾液中の金属イオン濃度を測定し、本測定が金属アレルギーの診断、原因金属の同定、治療の評価等に有用であることを示した。

A. 研究目的

近年、装飾品だけでなく、食物摂取による金属アレルギーや、人工骨やステントなど金属を含む医用材料により構築された人造物が体内に埋植されることによる金属炎症・アレルギーの発症が増えてきている。このような金属アレルギー・炎症が発症する最初のステップとして、装飾品や医用材料からの金属イオンの溶出があるが、これまで、生体内での金属の溶出を精密に測定した例はほとんどなく、また金属の溶出を抑制する薬物は開発されていない。一方、金属アレルギー患者でみられる全身あるいは局所で生じるアレルギー様症状の原因が本当に金属であるかどうかの判定や、金属除去した場合のその効果の判定は多くの場合難しかった。

筆者らはこれらの問題点を解決するために、生体試料中の金属濃度を精密に測定する系を確立し、金属イオンの溶出機構について、*in vivo* 並びに *in vitro* で解析する実験系を確立した。また、臨床サンプルにおける金属イオンを測定し、臨床診断等における有用性を検討した。

B. 方法

1) 金属線の埋入と炎症反応の惹起

C57BL/6 マウス (雄性、6 wks)の背部皮下にニッケル線 (直径 0.8 mm、長さ 5 mm)、あるいはステンレス(stainless SUS316L)線 (直径 1 mm、長さ 5 mm) を埋入し、直ちにその近傍に LPS (lipopolysaccharide; 1 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ saline) を注射した。その後、経時的に周囲組織を採取した。

2) ニッケルの測定

採取した組織を一定量的水中でホモジナイズし、抽出されたニッケルイオン濃度を NewportGreen を用いて蛍光法により定量した。本方法は ICP-AES で測定した値と高い相関を示すことを確認している。また、採取した皮膚組織を硝酸-過酸化水素法で溶解し、ニッケル濃度を ICP-MS 法を用いて精密に測定した。

3) 薬物投与

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。

4) RAW264 細胞を用いた in vitro ニッケル溶出測定系

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

5) 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。

6) 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 を使い、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。

7) Ni イオンの皮膚浸透の測定

ICR マウスの右耳介に 10% NiCl₂ 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。

8) Ni イオンの炎症性タンパク質産生に対する効果

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 NiCl₂ (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。

9) アレルギー患者の汗及び唾液中の金属濃度の測定

神戸大学皮膚科 尾藤利憲博士より汗試料を、東北大学皮膚科 相場節也博士より唾液試料を得た。また、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。なお本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。

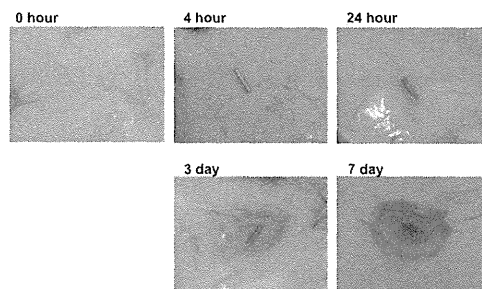
得られた汗及び唾液は 0.5 ml を硝酸で 5 ml とし、汗、唾液中の金属 (Ag, Al, Au, Co, Cr, Hg, In, Ir, Ni, Pd, Pt, Sn) の濃度を ICP-MS により測定した。

C. 研究結果

1) マウス Ni 線埋入モデルにおける炎症反応

C57BL6 マウスに Ni 線を埋入すると強い炎症反応が生じる (図 1)。この炎症はアルミ線、鉄線では認められず、Ni が溶出し、その Ni イオンが炎症反応を誘発したものと考えられる。

図 1 マウス Ni 線埋入モデルにおける炎症反応



2) LPS 炎症反応による Ni 溶出増大

Ni 線埋入直後にその近傍に LPS (1 μ g) を注射し、その後経時的に組織へのニッケル溶出を定量した。Ni 線を埋入すると、経時的な Ni イオンの溶出が生じ、組織中のニッケル濃度が増大した。さらに、LPS を注入すると、組織中のニッケル濃度はさらに高くなり、炎症反応を誘発すると Ni イオンの溶出が増大することが明らかになった (図 2)。

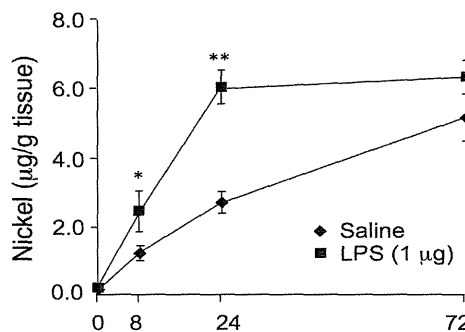


図 2. LPS によるニッケル線からの Ni 溶出増大の経時変化

3) LPS 炎症反応による stainless SUS316L からのニッケル溶出増大

同様に SUS316L 線を埋入直後に、その近傍に LPS (1 μg) を注射し、LPS 炎症による Ni イオンの溶出の増大が起きるかどうか解析した。Ni 線に比べて SUS316L 線を埋入しても、Ni イオンの溶出は極めてわずかであったが、LPS 炎症を誘発することにより、Ni イオンの溶出が増大した (図 3)。

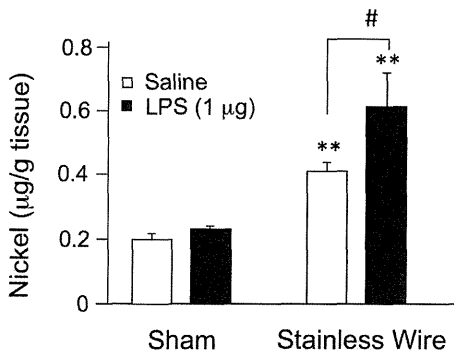


図 3. SUS316L からの Ni 溶出の LPS 炎症による増大

4) 薬物による Ni 溶出抑制

マウス Ni 線埋入モデルにおいて、各種薬物が Ni の溶出を抑制するかどうか解析した。NHE 阻害薬 amiloride, dimethylamiloride, ethylisopropylamiloride は抑制作用を示した。

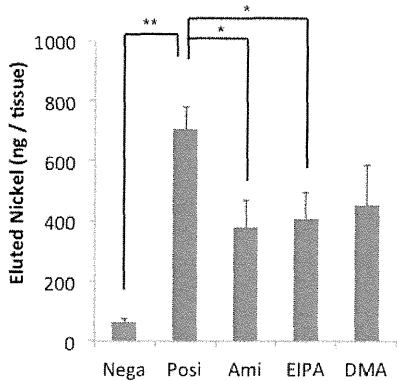


図 4 NHE 阻害薬による Ni 溶出の抑制

5) NHE と Ni 溶出

マウスマクロファージ様細胞株 RAW 264 を用いた in vitro の Ni 溶出系を確立した。本系においては、LPS 刺激により Ni 溶出が増大し (図 5)、NHE 阻害薬 amiloride (Ami)、

V-ATPase bafilomycin A1 (Baf), lysosome 中和剤 chloroquine (CQ) がこれを抑制すること (図 6) を明らかにした。

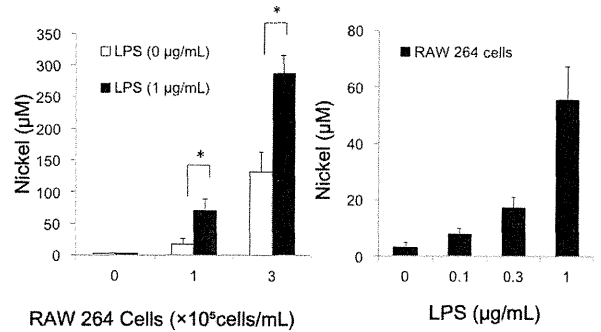


図 5 RAW264 細胞による Ni 溶出と LPS による増強

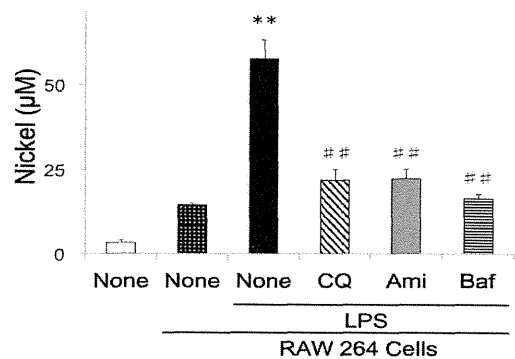


図 6 各種薬物による Ni 溶出の抑制

6) LPS による NHE の活性化

LPS による Ni の溶出の増大は LPS により NHE が活性化されるためであるかどうか明らかにするために、NHE 活性を測定した。その結果、LPS 刺激により NHE が活性化されることが明らかになった。

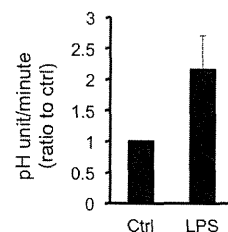


図 7 LPS による NHE の活性化

また NHE が酸性顆粒の形成あるいは放出に影響するかどうか明らかにするために、酸性顆粒を acrydine orange によって染色したところ、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8)

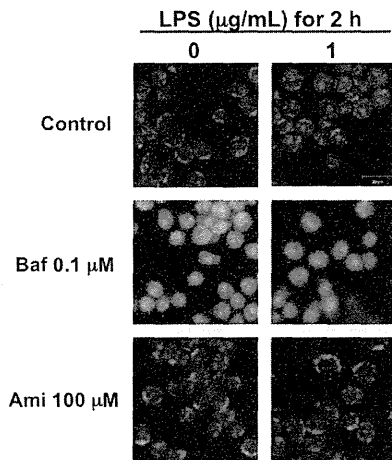


図8 Amiloride および LPS の酸性顆粒に対する効果

7) 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や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、予想外なことに、IL-6 の産生のみが選択的に抑制された(図9)。

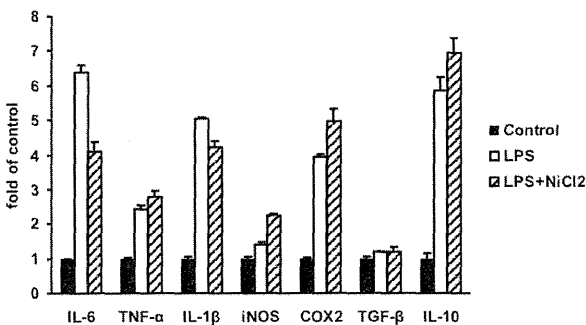


図9 LPS による機能分子の発現に対する NiCl₂ の作用

8) 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 10 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10)。

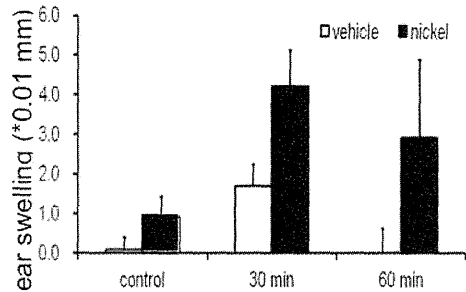


図10 NiCl₂ の塗布による組織浸透

9) 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金属イオン濃度を測定し、血中 IgE レベルと比較した。その結果、内因性アトピー性皮膚炎患者と考えられる場合に、汗中のニッケル濃度が高い患者がみられ、血中 IgE レベルとは相関しなかった(図11)。

また、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患者において、治療の前後の汗中の金属イオン濃度を測定したところ、特に Cr, Co, Ni の濃度が除去食により顕著に低下し(表1)、皮疹の改善とも一致した。

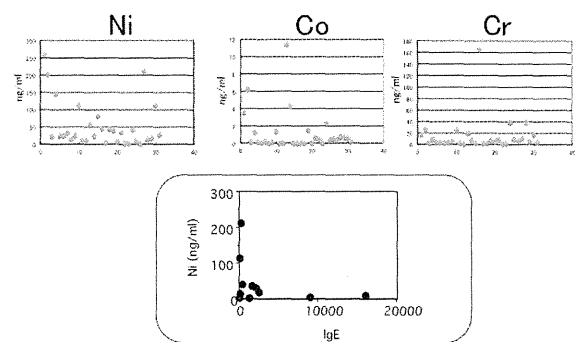


図11 汗中ニッケル濃度と血中 IgE レベル

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

マウスにおいて金属からの金属イオンの溶出を評価できる実験系を確立し、金属の溶出には炎症性細胞が関与しており、炎症刺激を加えることで金属の溶出がさらに増大すること明らかになり、しかもこれは医用材料として広く用いられている SUS316L においても当てはまることが確認された。したがって、医療機器を体内に設置する際に、感染等の炎症が生じることを抑制することが金属溶出を抑制するために重要であると考えられる。さらに、この金属の溶出には NHE が関与していること、NHE 阻害薬は *in vivo* において金属溶出を抑制することを明らかにした。また、*in vitro* においてマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞が金属溶出を促進させ、LPS 刺激によりさらに増大させるという *in vivo* の現象を再現することができた。この系により LPS は NHE の活性化を誘導すること、また NHE 阻害薬は酸性顆粒の挙動には影響を与えず、金属との接触面でのプロトン放出を抑制していることが推察された。

炎症反応が金属溶出を促進することから、溶出した金属イオンがさらに炎症細胞を活性

化する可能性を検討した。その結果、Ni イオン自身には炎症誘発作用はほとんどなく、LPS 刺激によるサイトカイン産生、機能分子の誘導に対しては、IL-6 のみ選択的に抑制することが明らかになり、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。

さらにマウス耳介に Ni を含むクリームを塗布すると、Ni イオンは急速に体内に浸透することが確認された。臨床的には汗中に金属イオンが湿疹等のアレルギー反応の誘発に関与していると考えられるが、今回明らかになった金属イオンの組織移行性は、この仮説を支持するものである。実際、アトピー性皮膚炎患者の汗ではニッケルなどの金属濃度が高値を示す場合があり、皮疹との関連性が示唆されている。特に内因性アトピー性皮膚炎は、IgE の産生が低く、外来蛋白以外に抗原があることが予想されていた。その候補の1つとして金属イオンが示唆されていたが、本研究で汗中の金属イオン濃度と臨床像との関連性が明らかになった。すなわち、汗中の金属濃度を測定したところ、特に IgE レベルが低いアトピー性皮膚炎患者で汗中の金属イオン濃度が高いという結果が得られた。また、あるアレルギー性皮膚炎患者において、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ことから食事由来の金属が原因であろうと診断された。この場合の汗中の金属イオンを測定した結果、金属除去食に変更したことにより汗中の金属イオン濃度、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、金属除去食の摂取と症状の緩和の関連性が、汗中の金属濃度測定により明らかになった。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。

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酸性化が生じて、金属溶出が誘導され、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。これまで金属アレルギーの診断はパッチテストで感作金属を同定するにとどまっていたが、局所の金属イオン濃度を測定することにより、実際にアレルギー局所に存在する金属を定量すれば、原因金属の確定、治療のメーカーになることが示唆された。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

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 receptors. Mizuno, N., Suzuki, T., Hirasawa, N., Nakahata, N. *Eur. J. Pharmacol.* 677: 5-14 (2012)
4. 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 (2011)
5. Enhancement of nickel elution by lipopolysaccharide-induced inflammation. Tanaka, R., Goi, Y., Ishihara, K., Ueda, K., Narushima, T., Ohtsu, H., Hiratsuka, M., Hirasawa, N. *J. Derm. Sci.* 62: 50-57 (2011)
6. Assessment of the release of nickel from biomaterials in vivo and in vitro: enhancement by lipopolysaccharide. Tanaka, R., Goi, Y., Ishihara, K., Ueda, K., Narushima, T., Ohtsu, H., Ohuchi, K., Hiratsuka, M., Hirasawa, N. *Inflam. Regene.* 31: 302-306 (2011)
7. Induction of thymic stromal lymphopoietin by chemical compounds in vivo and exacerbation of allergy. Sato, N., Ishihara, K., Hiratsuka, M., Hirasawa, N. *Inflam. Regene.* 31: 184-188 (2011)
8. Suppression of intracellular calcium levels and inhibition of degranulation in RBL-2H3 mast cells by the sesquiterpene lactone parthenolide. Hong, J., Aoyama, S., Hirasawa, N., Zee, O., Ishihara, K., Hashida, C., Kimura, M., Seyama, T., Ohuchi, K. *Planta Medica* 77: 252-256 (2011)
9. Novel Single Nucleotide Polymorphism of the CYP2A13 gene in Japanese individuals. Tamaki, Y., Honda, M., Muroi, Y., Arai, T., Sugimura, H., Matsubara, Y., Kanno, S., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Drug Metabolism & Pharmacokinetics* 26: 544-547 (2011)
10. Association between Cancer Risk and Drug Metabolizing Enzyme Gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) Polymorphisms in Japanese Cases of Lung Cancer. Tamaki, Y., Arai, T., Sugimura, H., Sasaki, T., Honda, M., Muroi, Y., Matsubara, Y., Kanno, S., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Drug Metabolism & Pharmacokinetics* 26: 516-522 (2011)
11. Functional characterization of CYP2B6 allelic variants in demethylation of anti-malarial artemether. Honda, M., Muroi, Y., Tamaki, Y., Saigusa, D., Suzuki, N., Tomioka, Y., Matsubara, Y., Oda, A., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Drug Metab. Dispos.* 39: 1860-1865 (2011)
12. Salicylate restores transport function and

- anion exchanger activity of missense pendrin mutations. Ishihara, K., Okuyama, S., Kumano, S., Iida, K., Hamana, H., Murakoshi, M., Kobayashi, T., Usami, S., Ikeda, K., Haga, Y., Tsumoto, K., Nakamura, H., Hirasawa, N., Wada, H. *Hearing Research* 270: 110-118 (2010)
13. Kinetic of 6-thioxanthine metabolism by allelic variants of xanthine oxidase. Kudo, M., Sasaki, T., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Drug Metabo. Pharmacokinet.* 25: 361-366 (2010)
 14. Functional characterization of genetic polymorphisms identified in the promoter region of the xanthine oxidase gene. Kudo, M., Sasaki, S., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Drug Metabo. Pharmacokinet.* 25: 599-604 (2010)
 15. Functional characterization of 26 CYP2B6 allelic variants (CYP2B6.2-CYP2B6.28, except CYP2B6.22). Watanabe, T., Sakuyama, K., Sasaki, T., Ishii, Y., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Pharmacogenet. Genom.* 20: 459-462 (2010)
 16. Involvement of prostaglandins and histamine in Nickel wire-induced acute inflammation in mice. Hirasawa, N., Goh Y., Tanaka, R., Ishihara, K., Ohtsu, H., Ohuchi, K. *J. Biomedical Materials Research Part* 93A: 1306-1311 (2010)
- 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)
 3. ステロイドの作用機序と耐性化メカニズム 平澤典保 *アレルギーの臨床 (The Allergy in Practice)* 31: 1137-1141(2011)
 4. キシレン、トリメチルベンゼンによる表皮からのTSLP産生誘導 平澤典保 *臨床と免疫・アレルギー科* 56: 478-484 (2011)
 5. 抗炎症薬 平澤典保, Hong JangJa, 木邑道夫, 大内和雄 *JOHNS* 27: 1782-1786 (2011)
 6. 薬学新時代の大学院教育 平澤典保, 奥直人 *薬学雑誌* 131: 931 (2011)
 7. 6年制の大学院教育：東北大学の場合 富岡佳久, 平澤典保, 永沼章 *薬学雑誌* 131: 932-938 (2011)
 8. TSLP 平澤典保, Hong JangJa, 木邑道夫, 大内和雄 *炎症と免疫* 19: 437-440 (2011)
 9. ステロイド薬の基礎 平澤典保, アレルギー 60: 193-198 (2011)
 10. 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, *薬学雑誌* 131: 179-184 (2011)
- 2.学会発表
- 1) 国際学会
1. An exacerbated allergic dermatitis model in mice and participation of histamine. Hirasawa, N. 2010 International Symposium on New Drug Development (Cheondju, Korea, Nov. 17, 2010)
- 2) 招待講演、シンポジウム
1. 平澤典保 特別講演「化学物質によTSLP産生とアレルギー増悪化」平成23年度日本薬学会東北支部講演会第33回東北薬学セミナー (2011年12月3日 仙台)
 2. 平澤典保 金属アレルギーの新たなアプローチ 第15回日本ヒスタミン学会シンポジウム「炎症・アレルギーを巡る最近のトピックス」 (2011年10月21-22日)
 3. 平澤典保 マスト細胞とTSLP シンポジウム「秋の夜長とマストセル」 第14回日本ヒスタミン学会 (2010年10月24-25日、川崎)
 4. 平澤典保 ステロイド薬の基礎 シンポジウム「アレルギー疾患の薬物治療に役立つ基礎薬理学」 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2010年5月9-10日、京都)
 5. 平澤典保 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 シンポジウム「アレルギー疾患におけるヒスタミン研究の新展開」第130年会日本薬学会 (2010年3月28-30日、岡山)

3) 一般講演

1. 平塚真弘、田巻佑一朗、新井富生、梶村春彦、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)
8. 平塚真弘、本田雅志、三枝大輔、鈴木直人、富岡佳久、平澤典保 抗マラリア薬アーテメター代謝におけるCYP2B6遺伝子多型バリエーションの機能解析 第32回日本臨床薬理学会年会 (2011年12月、浜松)
9. 瀬川良佑、平澤典保 空気嚢型炎症モデルにおけるTSLP産生制御機構の解析 第50回記念日本薬学会東北支部大会 (2011年10月30日、仙台)
10. 佐藤大樹、平澤典保 前脂肪細胞株OP9におけるTLR4刺激によるIL-6産生: HDAC阻害薬の効果 第50回記念日本薬学会東北支部大会 (2011年10月30日、仙台)
11. 平塚真弘、田巻佑一朗、新井富生、梶村春彦、平澤典保 肺がん発症リスクと薬物代謝酵素遺伝子多型との関連 第21回日本医療薬学会年会 (2011年10月、神戸)
12. 大澤雄亮、平澤典保 マウスアトピー性皮膚炎モデルにおけるヒスタミンH1およびH4受容体拮抗薬の併用による治療効果 第15回日本ヒスタミン学会 (2011年10月21,22日、盛岡)
13. Masahiro Hiratsuka, Yuka Muroi, Kanako Sakuyama, Yui Niinuma, Takahiro Saito, Masamitsu Takahashi and Noriyasu Hirasawa Oxidative metabolism of n-desmethyltamoxifen to endoxifen by 50 Cyp2D6 allelic variants 日本薬物動態学会第26回年会 (2011年11月、広島)
14. 高橋亜希、平塚真弘、本田雅志、田巻佑一朗、室井祐佳、新沼優衣、眞野成康、平澤典保 東北大学病院における腎機能低下患者の割合と腎排泄型薬剤の使用状況調査 第5回日本腎と薬剤研究会学術大会 (2011年9月、北九州)
15. 田巻佑一郎、新井富生、梶村春彦、佐々木崇光、平澤典保、平塚真弘 薬物代謝酵素遺伝子多型と肺がんリスクとの関連 第49回日本薬学会東北支部大会 (2010年10月24日、郡山)
16. 青島有佑、上田恭介、大津浩、成島尚之、小笠原康悦、平澤典保 金属系材料のマウス皮下における腐食挙動 日本金属学会第147回大会 (2010年秋季) (2010年9月25~27日、札幌)

17. 田中里奈、五井嘉明、石原研治、上田恭介、成島尚之、大津浩、大内和雄、平澤典保 生体内における金属からのニッケル溶出の簡易測定法の確立と溶出機序の解析日本薬学会第 129 年会（京都、2009 年 3 月 26-28 日）

H.知的財産権の出願・登録状況

特願 2010-146262 TSLP を恒常的に高発現する細胞、および前期細胞を利用した TSLP 調節剤のスクリーニング方法

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 浜松医科大学特別大学院生
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) のメカニズムは複雑であるが、通常の皮膚バリア異常に基づく外因性 AD だけではなく、内因性のものも存在する。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。事実、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%)、有意に低頻度であった。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が、明らかにされてこなかった。内因性 AD では IFN- γ 陽性 T 細胞が外因性 AD と比べ有意に増加し、血中 TARC/CCL17 が逆に低値であった。このことは内因性 AD では Th1 細胞も増加していることを示し、何らかの非蛋白抗原、例えば金属に接触過敏を有していることが想定された。外因性 AD、内因性 AD 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 患者に陽性率が高く、とくにニッケルとコバルトの有意な陽性率を得た。AD 患者には自己汗アレルギーをもつものがあるが、自己汗にアレルギー反応を示した 9 名の AD 患者において金属に対するリンパ球幼弱化試験では 2 名、金属パッチテストで 1 名が陽性反応を示した。内因性 AD では汗中ニッケル濃度が外因性 AD に比し、有意に高値であった。内因性 AD で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) は均一の集団ではなく、大きくは外因性 (extrinsic) AD と内因性 (intrinsic) AD に分けられる。外因性 AD は外来蛋白アレルギーが原因とされ、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、アレルギーが起り、IgE は高値となる。一方、IgE 値が正常を示す AD の成因は、特異的 IgE の出現がないことから、恐らく蛋白抗原の経

表皮の透過性の亢進によるものではなく、その他の機序によるものと考えられて、外因性に対して内因性 AD と呼ばれてきた。内因性 AD の特徴を表 1 に示す。

内因性 AD の病態は不明であるが、Th1 の活性化がみられるタイプの AD であり、蛋白光源以外の抗原が皮膚炎を惹起していると考えられる。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、抗原としての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、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。

表1. 内因性アトピー性皮膚炎の特徴

1. 基本
IgEが正常か軽度高値。環境アレルゲン特異的IgEなし。
鼻炎、喘息の合併少ない。家族歴少ない。
2. 頻度
アトピー性皮膚炎の約20%。女性に多い(70-80%)
3. 臨床像
Dennie-Morgan foldが多い。
尋常性魚鱗癬合併なし。Palmar hyperlinealityなし。
4. 皮膚バリア
バリア機能正常。フィラグリン遺伝子変異低頻度。
5. 免疫
IL-4, IL-13が外因性ほど高くない。TARC値が正常。
IFN- γ 産生細胞が多い。
6. 病因論
金属アレルギーが多い。

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 (Ag)、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. 金属に対するリンパ球幼弱化反応

金属パッチテスト陽性患者に対して、PBMC (2×10^5 /well) を 96 穴プレートで金属を希釈系列添加で 3 日間培養し、培養の最後 12 時間に 3H-チミジン ($1 \mu\text{Ci}/\text{well}$) を添加した。細胞をハーベスト後、液体シンチレーションカウンターにて 3H-チミジンの取り込みを測定した。

3. 汗アレルギー

自己汗を両腕から採取し、22 μm フィルターを通して精製し、滅菌生理食塩水にて 100 倍希釈し、0.02 ml を皮内注射し、長径 10 mm 以上の紅斑を生じた場合を陽性とした。

4. 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。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2. 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1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

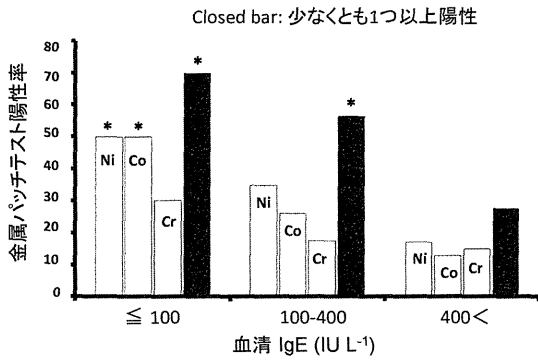
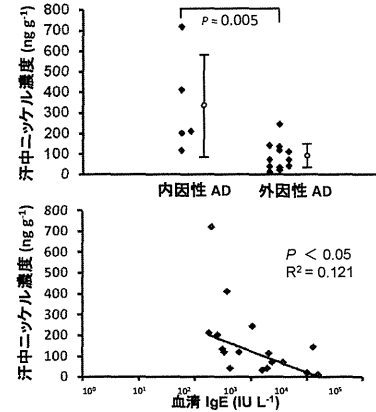


図2. アトピー性皮膚炎患者での汗中のニッケル濃度



金属パッチテスト陽性者にリンパ球幼弱化試験 (LST) を行った。予備実験として金属アレルギーが判明している患者に対し、LST を行った。その結果、従来観察されているように、Ni では陽性反応がしやすいものの、Co は陽性反応がでにくいことが判明した。内因性 AD の Cr パッチテスト陽性者に対して Cr の LST を行ったが陰性であり、Pa 陽性者にも LST を行ったがやはり陰性であった。従って、LST は Ni の陽性のみ得られ、他はパッチテスト陽性であっても LST 陽性所見は得られていない。また CTLA-4 を抗体点かによりブロックすると反応が得られ易いことも見出すことができた (Sugita K et al: Eur J Dermatol, in press)。一般に Ni は in vitro の増殖反応に適した金属であるが、その他の金属は培養系の工夫であろう。

2. 汗アレルギーと金属、汗中の Ni 濃度

外因性 AD 患者 20 名、内因性 AD 患者 5 名で自己汗の皮内テストを行った。外因性 11/20 (55%)、内因性 4/5 (80%) が陽性反応を示した。8 名で金属に対する LST もしくは金属パッチテストを行い 3 名が陽性を示した。陽性患者はいずれも内因性 AD 患者であった。汗皮内テスト陽性者 12 名に対して減感作療法を行い、現在 10 名で症状改善をみている。

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)。

3. 金属アレルギー症例の蓄積

産業医大 (20 例)、藤田保健衛生大 (4 例)、京都大 (7 例)、浜松医大 (5 例) の計 36 例における疾患別症例数は以下であった (表 3)。

表3. 金属アレルギーの疾患別症例数

疾患	男	女
アトピー性皮膚炎	2	1
術前(整形外科/歯科/循環器)	3	9
掌蹠膿疱症		5
接触皮膚炎	1	8
扁平苔癬		1
クインケ浮腫		1
慢性口唇炎		2
その他	2	1

※術前の方は、多くが金属アレルギーを自覚
※その他には、人工股関節術後に全身型金属アレルギーを発症した方1名含む

パッチテストの陽性者数は以下であった(表 4)。

表4. パッチテストの陽性者数

	男	女
塩化アルミニウム		2
テトラクロロ金塩酸		1
塩化第二スズ	1	3
塩化第二鉄	1	2
ヘキサクロロ白金酸(浜松、京大では塩化白金酸)	1	5
塩化パラジウム		7
三塩化インジウム		
四塩化イリジウム		4
塩化亜鉛	3	11
塩化マンガン	2	6
臭化銀		2
コントロール		
硫酸クロム		4
塩化コバルト	2	7
塩化第二水銀		4
硫酸ニッケル	2	15
重クロム酸カリウム	2	3
硫酸銅		1
金チオ硫酸ナトリウム		2
プラチナ	2	1

最近の浜松医大での症例とパッチテストの結果は以下であった(表5)。

表5. 最近の浜松医大での金属アレルギー症例とパッチテスト

症例	年齢/性	診断	パッチテスト
1	28/女	接触皮膚炎(指輪)	Co+, Pt++ (2)
2	51/女	扁平苔癬	Pt, Mn, Ag, Zn, Co, Sn (2,7)
3	37/女	接触皮膚炎(アクセサリー)	Ni++, Pd+, Pt+ (2,7)
4	58/女	肉芽腫性口唇炎	Mn+, Pd+ (2,7)
5	43/女	手湿疹(金属加工業)	Ir+, Pt+ (2)
6	22/女	内因性AD	Ni++, Co++ (2,7)
7	16/女	内因性AD	Ni+ (2, 7)
8	17/女	接触皮膚炎(ピアス)	9種? (1.5)

()内は判定日(日)

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なども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。内因性ADが女性に多く、パッチテストでもっとも陽性率が高かったCo陽性者5名がすべて女性であったことは興味深い。LSTは金属によって向き不向きがあり、とくに溶解の問題は大きい。本研究実施中に、汗アレルギーの患者が金属アレルギーにもなりやすいとの示唆も得た。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なども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病といわれる。しかしそれだけでは病態を説明できない。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- γ の存在なくしては成立するのが困難だからである。

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、Co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。

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。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。内因性AD患者で汗アレルギーを有する患者は金属アレルギーも合併している可能性が示唆された。金属の体外への排出経路として汗が考えられ、AD患者の皮疹の形成機序を解き明かすヒントになる可能性がある。AD患者における金属アレルギー、汗アレルギーの検討は、増悪因子の除去のみならず、減感作療法をはじめとする新たな治療展開の可能性を秘めている。

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. 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.
2. 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.
3. 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.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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).
 14. Shimauchi T, Sasada K, Kito Y, Mori T, Hata M, Fujiyama T, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y: CD8⁺ Sezary syndrome with

- IL-22 production modulated by bacterial sepsis. *Br J Dermatol* (in press).
15. 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.
 16. 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).
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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).
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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).
 27. 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. 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, Piguet 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)
1. Tokura Y: Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. 35th Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology. 2010.12.4. Wakayama.
2. Tokura Y: Psoriasis and Th17-mediated skin diseases. Shanghai Immunodermatology Forum. Shanghai, China, 2010.5.20.
3. Tokura Y: Photoimmunology: sensitization and suppression. Australasian Society for Dermatology Research 2011 Annual Scientific Meeting. 2011.5.19. Perth, Australia.
4. Tokura Y: Atopic dermatitis and skin barrier in the extrinsic and intrinsic types. The 37th Annual Meeting of the Taiwanese Dermatological Association. 2011.11.26. Taipei, Taiwan.
5. Tokura Y: The type of skin eruptions is an independent prognostic indicator for adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). 5th International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphomas. 2011.1.15. Berlin, Germany.
6. Tokura Y: Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. Ancillary Meeting on Atopic Dermatitis. 22nd World Congress of Dermatology 2011. 2011.5.24. Seoul, Korea.
7. Tokura Y: Recent concept on the role of cutaneous dendritic cells in UVB-induced immunosuppression. Aging and Photoaging: Asian Forum for Investigative Dermatology. 22nd World Congress of Dermatology 2011. Korean Society for Investigative Dermatology (KSID) Ancillary Meeting. 2011.5.24. Seoul, Korea.
8. Tokura Y: Immunosuppression and Complications in the Disordered Axis of TNF- α and Th17 Cells. 22nd World Congress of Dermatology. 2011.5.25. Seoul, Korea.
9. Tokura Y: Adult T-cell leukemia / lymphoma and HTLV-1. Cutaneous Lymphomas of Viral Origin. 22nd World

2.学会発表 国外学会

- Congress of Dermatology. 2011.5.27. Seoul, Korea.
10. 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.
 11. Tokura Y: Skin barrier impairment is heterogeneous in atopic dermatitis. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2011.12.10. Kyoto, Japan.
 12. Tokura Y: Mechanism of Photo-Allergic Contact Dermatitis from Ketoprofen. 11th Congress of The European Society of Contact Dermatitis (ESCD 2012).2012.6.13. Malmö, Sweden.
 13. 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
 14. Tokura Y: Adultt-cell leukaemia / Lymphoma: Impaired innate immunity of the skin. CUTANEOUS LYMPHOMAS(2nd World Congress of Cutaneous Lymphomas, 6th International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphoma) 2013.2.7. Berlin, Germany.

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
	加藤 真弓	京都大学医学研究科	助教
	大塚 篤司	京都大学医学研究科	助教

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、様々な種類の免疫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。そこで我々は肥満細胞、好塩基球、制御性 T 細胞に着目し、金属アレルギーの成立や寛容における役割、相互作用を検証することを目的として研究を行った。その中で我々は、①肥満細胞が樹状細胞の機能を亢進させること、②抗原曝露が繰り返される場合には好塩基球が重要な役割を果たす事、③炎症の収束に制御性 T 細胞が重要であること、④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。様々な種類の免疫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。そこで我々は肥満細胞、好塩基球、制御性 T 細胞に着目し、金属アレルギーの成立や寛容における役割、相互作用を検証することを目的として研究を行った。

B. 方法

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

応およびハプテン反復塗布モデルにて好塩基球の役割を検証する。

3) 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 細胞の役割を検証する。

C. 結果

1) 肥満細胞欠損マウスにおいてハプテンを用いた接触皮膚炎を誘導したところ耳介腫脹は有意に減弱していることが明らかとなった(図 1)。更に、接触皮膚炎感作相のみ肥満細胞を除去したモデルにおいて耳介腫脹は減弱し、このモデルに骨髄由来肥満細胞を再供給することで減弱が相殺された(図 2)。肥満細

胞除去時においては、皮膚ランゲルハンス細胞および真皮樹状細胞の遊走能、成熟度は有意に減弱していた（図3）。In vitroの実験では、骨髄より誘導した樹状細胞および肥満細胞を共培養することで、樹状細胞の成熟度は増強され、この相互作用にはICAM1-LFA1を介した細胞接着および肥満細胞が産生する膜型TNF α が必要であった。

2) 好塩基球欠損マウスにおいてハプテンを用いた接触皮膚炎を誘導したところ耳介腫脹は変化がないことが明らかとなった（図4）。一方、ハプテン反復塗布モデルでは好塩基球欠損マウスにおいて急性期の炎症反応が有意に減弱している事が明らかとなった（図5）。しかしながら、オボアルブミン（OVA）誘発皮膚炎モデルでは皮膚炎に野生型マウスと好塩基球マウスの差が見られなかった（図6）。

3) 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7）。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8）。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9）。

E. 評価

1) 達成度について

金属アレルギーの診断・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、我々は特に、接触過敏反応モデルからの病態解明を目指してきた。その中で、肥満細胞、好塩基球、制御性T細胞の新たな役割を見出した。金属アレルギーの診断・予防・治療に役立つ理論的基盤となる成果が得られたことから、当初の目的は十分達成できたと考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

金属アレルギーの発生メカニズムをあきらかにすることは、新たな治療アプローチを開発するうえでも極めて重要である。今回のわれわれの研究は、発症機序、繰り返し暴露時の感作メカニズム、症状寛解のメカニズムの一端を明らかにしたもので、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となるものと期待される。

3) 今後の展望について

金属アレルギーの病態へのアプローチとして、まずハプテンを用いた同じIV型アレルギーである接触過敏反応を対象として研究をおこない、肥満細胞、好塩基球、制御性T細胞の新たな役割を明らかにした。今後はわれわれが明らかにしたメカニズムが、金属を抗原としたモデルでも同様に働いているのかを検討していく。

4) 研究内容の効率性について

実験技術・試薬等に関して研究代表者・分担研究者間で積極的に情報を交換することにより効率的に研究を遂行するできた。

F. 結論

1) 金属アレルギーを代表とする接触皮膚炎反応の成立において、肥満細胞による樹状細胞の遊走・成熟促進が重要な役割を果たす。

2) 接触皮膚炎反応の成立において、好塩基球は病態形成に関与していないものの度重なる曝露を受けた場合では好塩基球が重要な役

割を果たす事が明らかとなった。

3) 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。

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上記のような機序が作用していることが示唆される。

G. 研究発表

口頭発表 9件
原著論文による発表 29件
そのうち主なもの

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*. 2012 Aug 27.
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*. 2012 Feb 29.
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 γ from sebocytes: A possible pathogenesis of eosinophilic pustular folliculitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012

Feb; 129 (2): 536-43

5. 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.
6. 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.
7. 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.

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