

免疫学的解析に基づく 新たな医療材料開発へのアプローチ

川野光子¹⁾ 武田裕利²⁾ 中村 生²⁾ 小笠原康悦³⁾

1. はじめに

金属は強度と延性を兼ね備え、加工性に優れていることからインプラントをはじめ多くの医療用デバイス、装飾品やコインなど、様々な分野で利用されている。バイオマテリアルとして現在使用されている合金としては、ステンレス鋼・Ti合金・Co-Cr合金などが多く、優れた材料として認識されている。しかしその一方で、炎症や人工関節の緩み、金属アレルギーの発症等が報告されている。実際、金属摩耗粉による偽腫瘍の発生や溶出金属イオンの体内動態、金属イオンの細胞への蓄積や周辺組織への影響など、解明されていない問題は多く、金属アレルギーの発症機序は不明である。これらの問題を克服するためには、発症機序の解明が急務であるとともに病態解明に基づく治療法の開発およびより安全性の高い金属材料開発が求められている。

現行の安全性試験は主にウサギやモルモットなどの齧歯類を用いた検討であり、医療用生体金属材料はこの安全基準を達成しているものの、ヒトにおいては金属炎症やアレルギーが引き起こされる場合がある。すなわち、現行の安全基準では見逃されてしまう有害性があることを意味し、齧歯類を用いた安全基準では捉えきれない反応が、ヒトにおいて存在すると考えられる。臨床で用いられる生体用金属材料は十年単位で長期間埋入されることが前提であり、長期埋入による影響等を実際に齧歯類において検討することは難しいこと、齧歯類とヒトで金属に対する感受性が異なる可能性について検討されていないこと等、近年の生命科学研究結果から様々な指摘が見出されている。したがって、より厳しい安全基準を基礎医学的・免疫学的視点から策定することが必要と考えられる。本稿では、金属アレルギーの免疫学的な解析結果と今後の展開について紹介したい。

2. 金属アレルギーの現状

松永らの金属アレルギー全国実態調査によると、皮膚炎に

より皮膚科に来院した患者にパッチテストを施行した場合の約3割が、金属に対し陽性反応を示すことが明らかになった。特にNi, Co, Crが3大原因金属であること等が判明した⁽¹⁾⁽²⁾。また近年では、Pdに対するアレルギーの発症が報告されている⁽³⁾。Pdは歯科金属で多用されており、またEUではNiの代わりにPdを用いた装飾品等が流通している⁽⁴⁾。金属アレルギーは身近な疾患であるものの、ステロイドによる治療が一定の効果を示すため、臨床的にも基礎的にも研究は進んでいない。

金属アレルギーは遅延型アレルギーに分類され、生体防御において重要な役割を担っているT細胞依存性の疾患の一つと考えられている。アレルギーは大きく4つに分類されている⁽⁵⁾。I型アレルギーには花粉症・アレルギー性鼻炎・アナフィラキシーショックなどがあり、免疫グロブリンE(IgE)を介した即時型アレルギーとされる。II型アレルギーは自己免疫性溶血性貧血・バセド病・重症筋無力症などが挙げられ、免疫グロブリンM(IgM)や免疫グロブリンG(IgG)により生じる組織傷害である。III型アレルギーは、可溶性抗原とそれに対する抗体による免疫複合体が局所に沈着し、Fc受容体γIII(FcγRIII)を介した肥満細胞の活性化により組織傷害が生じる反応であり、血清病・全身性エリテマトーデスにおける腎炎や皮膚炎がある。I～III型のアレルギーは抗体を介した反応であるのに対し、IV型アレルギーは抗原への感作によって生じる病原性T細胞による組織傷害であり、抗原接触後24時間以上経過してから生じる遅延型の炎症反応が特徴的である。金属アレルギーはこのIV型アレルギーであるものの、適切な動物モデルが存在せず時系列的解析ができなかったため、発症の詳しい分子メカニズムについては良く分かっていない。

3. 金属アレルギー研究の現状

これまで遅延型アレルギーに関して、2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)や2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB), 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)などの化学物質を用いた

* 東北大学 1)助教 2)大学院生 3)教授;加齢医学研究所(〒980-8575 仙台市青葉区星陵町4-1)
Approach for Development of Novel Biomaterials Based on Immunological Analysis; Mitsuko Kawano, Yuri Takeda, Sho Nakamura, Kouetsu Ogasawara (Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai)
Keywords: DTH (delayed-type hypersensitivity), TCR (T cell receptor) repertoire, pathogenic T cells, hapten, adjuvant
2013年11月25日受理[doi:10.2320/materia.53.153]

先行研究が数多く報告されている⁽⁶⁾⁻⁽⁸⁾。これら化学物質は、低分子化合物であり、ハプテン(それ自体は免疫原性を欠き、反応原性のみをもつ物質)として機能すると考えられている。そのため、ハプテンは生体内の高分子キャリアタンパク質と結合することにより、抗原として機能する。金属の場合も低分子化合物と同様にハプテンとして機能していると考えられている。しかしながら、金属イオンが結合する内在性タンパク質の同定が未だなされていないだけでなく、関与する免疫担当細胞も金属種毎に同定されていないことから、抗原提示の分子機構は不明な点が多い。

これまでの金属アレルギーの研究は主に、パッチテスト陽性のヒト患者血液からリンパ球を分離し、*in vitro*において金属溶液に反応するT細胞クローンを得ることにより進められてきた⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾。こうして得られたT細胞クローンの反応性を解析することは、患者のダイレクトな反応を捉えられる一方で、すでにアレルギーを発症してからの解析であって、アレルギー発症段階を時系列的に解析することはできない。また、ヒトの場合は様々な金属に暴露されており、単一の金属暴露による影響を解析することは不可能である。この問題を解決するためには、金属特異的にアレルギーを発症するモデル動物を開発し、金属アレルギー発症から終息までの時系列的な病態解析を行うことが重要である。金属に特異的に反応する細胞やアレルギー誘導にかかわる分子群を同定することが、発症機序解析への第一歩となる。我々は、金属アレルギーをマウスに効率的に誘導するモデル系を構築し解析を行い、新規予防・診断・治療法の開発を目指している。

4. 金属アレルギーモデルマウスの構築

これまでもマウスを用いた金属アレルギーの解析がなされ、作用機序について報告されてきた。マウス個体に金属溶液のみでアレルギーを誘導させることは難しく、金属溶液+アジュバント(抗原と混合して生体に投与することにより、投与した抗原に対する免疫応答を増強する物質)を用い誘導する方法が報告されている⁽¹¹⁾⁽¹²⁾。我々は金属アレルギーにおける病原性T細胞の同定とその詳細な解析を目指し、ヒトの病態に極めて近い金属アレルギーモデルマウスの構築を試みた。

我々は、歯科金属アレルギーという観点で、Pdに対するアレルギーに着目して研究を進めている。口腔内環境を考えた場合、金属と常在細菌が共存する環境にあることから、細菌成分をアジュバントとして金属と同時に免疫することでマウス個体に金属アレルギーを引き起こすことができるのではないかと考えた。実際にグラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖(lipopolysaccharide: LPS)とPdの混合液をマウス腹腔内に投与して感作を行った後、マウス耳介にPd溶液のみを皮内投与することで金属アレルギーを誘導することができた。

前述の通り、金属アレルギーは遅延型アレルギーであることから、T細胞依存性の疾患と考えられており、金属を認

識した病原性T細胞により炎症反応が惹起されると考えられている(図1)。我々のモデルにおいて、実際に金属アレルギーを引き起こす病原性T細胞が存在するのであれば、病原性T細胞を他個体に移入することにより金属アレルギーを引き起こすことができるはずである。そこで我々は、感作成立個体の所属リンパ節細胞(Pd-SLNC)をT細胞が存在しないヌードマウスに移入(養子移入)し、金属を耳介に投与すること(惹起)だけで金属アレルギーを誘導することができるかどうか検討した(図2)。対照群として無感作個体から得た所属リンパ節細胞(naïve-SLNC)を用いて同様の実験を行った。その結果、naïve-SLNCの移入ではアレルギー反応は起こらなかったが、Pd-SLNCを移入した群では金属アレルギー

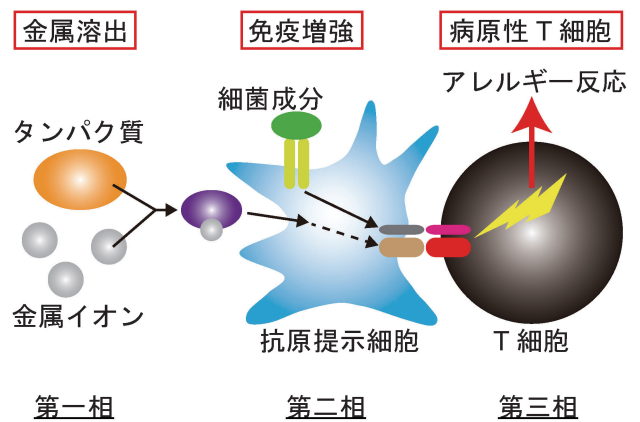


図1 金属アレルギー発症の模式図。

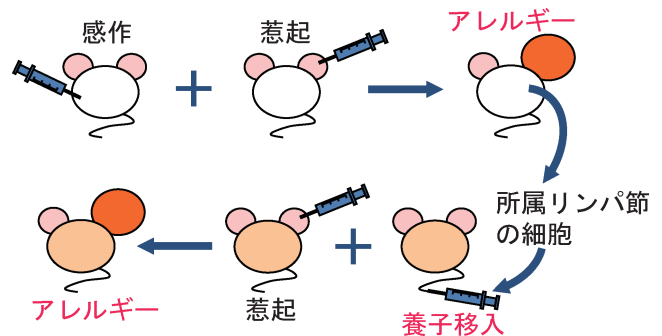


図2 パラジウムアレルギー誘導マウスモデルの樹立。

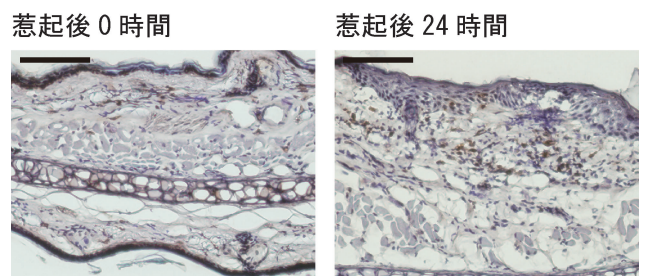


図3 パラジウムアレルギーによるT細胞の浸潤。茶色く染色された細胞がT細胞。染色像内のバーはそれぞれ100 μm。

一が引き起こされた。これらの結果は、金属を認識する病原性 T 細胞が存在することを示すものである。こうして、金属特異的なアレルギー反応を示すマウスモデルを樹立でき、時系列的な病態解析が可能となった⁽¹³⁾。

5. 金属アレルギーにおける T 細胞受容体の解析

このモデルを用いて、Pd による金属アレルギー発症の分子メカニズムを解析した。T 細胞が欠損しているヌードマウスに直接感作+惹起を行った場合には金属アレルギーの誘導は観察されなかったことから、ヒト金属アレルギー同様 T 細胞が重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、野生型のマウスに Pd アレルギーの誘導を行った際、惹起後24時間で T 細胞の有意な浸潤像を捉えた(図3)。さらに我々は、病原性 T 細胞を同定するために、上述の養子移入・惹起を数回繰り返し、*in vivo* で病原性 T 細胞の濃縮を試みた。興味深いことに、養子移入を繰り返すことで、T 細胞サブセットの存在比に変化が見られた。通常、リンパ節では CD4⁺ T 細胞が CD8⁺ T 細胞より多く存在する。しかし、養子移入を繰り返した金属アレルギーモデルマウスでは、所属リンパ節において CD8⁺ T 細胞の集積が認められ、Pd に特異的に反応する病原性 T 細胞が CD8⁺ T 細胞である可能性が示唆された。さらに、この病原性 T 細胞はどの T 細胞受容体(TCR)レパートリーを持っているのかについて検討を行った。生体防御系で主役となっている T 細胞は、多くの病原体を排除するために 1×10^{18} 通りもの多様性を持つことができる。ヒトの細胞が60兆個、遺伝子が25,000であるものの、T 細胞は DNA 再構成により理論上 1×10^{18} 通りの多様性を獲得する。この機構によりあらゆる抗原に対し特異的に応答することができる。我々は金属アレルギーモデルマウスを用いて網羅的に TCR レパートリーを解析することで、Pd および Ni に特異的に反応する TCR レパートリーをそれぞれ V α 18-1 および V α 14-1 であることを発見し、金属アレルギー特異的に応答する病原性 T 細胞の存在を証明した⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾。我々はさらに、Pd アレルギーにおける炎症応答を分子レベルで解析した。より長期間にわたるアレルギー性炎症反応を捉えるために、マウスの足跡に金属アレルギーを誘導し、遺伝子レベルで様々な分子の関与を解析した。免疫応答はサイトカインと呼ばれる細胞分泌性のタンパク質により正または負にコントロールされている。また、炎症応答に細胞傷害性の T 細胞が関与する場合には、細胞傷害活性を有する分子による細胞死の誘導が知られている。金属アレルギー誘導後のこれらの分子の発現レベルを解析した結果、免疫亢進を促すことで知られる Interferon- γ (IFN- γ)、T 細胞増殖時に放出される Interleukin-2(IL-2)、炎症性サイトカインの一つである Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、細胞死の誘導に関わる Fas の発現上昇を捉えた(表1)。一方、細胞傷害性 T 細胞の機能分子として Perforin や Granzyme 等の放出が知られているが、それらの発現に変化は見られなかった。金属アレルギーの誘導による炎症応答の詳細を分子

表1 Pd アレルギー誘導後の遺伝子発現変動解析。

機能分子	発現レベル
IFN- γ	+++
TNF- α	+++
IL-2	+++
IL-4	変化なし
IL-5	変化なし
Fas	+++
Perforin	変化なし
Granzyme A	変化なし
Granzyme B	変化なし

レベルで解析したことにより、これまで不可能と考えられていた金属アレルギーに対する治療標的の探索が可能となった。また、金属アレルギーによる炎症応答の開始から終息までを包括的に捉えることで、より生体の応答に近い治療法の開発が期待される。

6. 金属アレルギーモデルマウスおよびその解析結果の応用

これまで我々は、金属として Pd をピックアップし、マウスを用いたモデル系の構築を行ってきた。同様にして、金属アレルギーを誘導するとの報告がある他の金属(Ni, Co, Cr 等)を用いたモデルマウスの樹立を進めている。これにより、Pd と同様、様々な金属に対して特異的に応答性を有する病原性 T 細胞の同定が可能となる。TCR レパートリーの網羅的解析により理論上 1×10^{18} 通り存在する T 細胞の中から特異的に応答するレパートリーを各金属に対してそれぞれ同定することができた場合、パッチテストに替わる安全性の高い金属アレルギー診断法確立の可能性が高まる。一方、複数の金属に対して一つの TCR レパートリーの応答が見出された場合には、交差反応の有無について情報が得られることから、接触を制限すべき金属の予想が可能となる。また、T 細胞以外の細胞の関与を捉えた場合には、遺伝子欠損マウス等を用いることで、アレルギー反応の誘導にどの細胞が重要な働きを担っているか追究することができる。さらに、金属特異的病原性 T 細胞の応答について分子レベルで解析することが可能となり、どのような分子メカニズムをもって炎症反応が起こっているのかを金属種毎に決定することができる。

我々は、金属アレルギーの発症メカニズムの第二相・第三相を明らかにすることができた(図1)。したがって、今後は材料工学分野と協力して、生体内に埋入した際により安全性の高いバイオマテリアルの開発(金属溶出を極限まで抑える)を行っていくことが重要であると考えられる。まず、生体に埋入した際の各金属からの溶出を解析し、生体にとって害を及ぼす金属種および溶出量を決定することが重要である。さらに、害になる金属の生体内挙動(溶出量と生体内における閾値)を解析する。これらの解析結果を元に、害になる金属

を除いた合金の開発が材料工学的に可能であるか否か、あるいは害になる金属の溶出量をどこまで減らすことが可能であるかを検討していく。さらに、合金の開発だけではなく、合金の表面処理によって金属の溶出量を抑制できるかについても検討していく。以上により、免疫学的解析結果を利用して、これまで以上に安全性の高いバイオマテリアルの開発に取り組んでいきたい。

7. おわりに

現在、金属アレルギーに対してステロイドの投与が一定の効果を示すことから研究が進んでおらず、金属アレルギーに対する有効な根治療法はない。したがって、金属アレルギーについては、予防することが第一であるが、その予防法についても確立されておらず、金属に接触しない以外に方法はない。臨床においては、優れたバイオマテリアルとして金属材料が広く使用されている。臨床および免疫学分野と生体材料工学分野が一体となって共に、より安全性の高いバイオマテリアルを開発していくことが期待されている。第一に、生体内に埋入した際に炎症を起こさない金属材料の開発である。そのためには、金属溶出を極力抑えることが重要と考えられるが、現行の安全性試験ではその危険性を捉えることが難しい。したがって、我々生命科学分野が今後明らかにしていく情報を利用して、安全な生体金属材料の開発へ展開していきたいと考えている。

文献

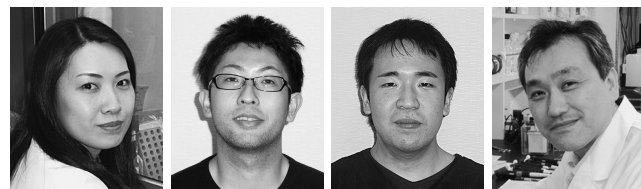
(1) 鈴木加余子, 矢上晶子, 松永佳世子: 臨床皮膚科, **66**(2012), 64-69.
 (2) 小笠原康悦 他: 厚生労働科学研究費補助金, 金属アレルギーの革新的診断・予防・治療法の開発研究, 平成22-24年度総合研究報告書。
 (3) U. Raap, M. Stiesch, H. Reh, A. Kapp and T. Werfel: Contact Dermatitis., **60**(2009), 339-343.
 (4) C. Tillman, M. Engfeldt, M. Hindsen and M. Bruze: Contact Dermatitis., **69**(2013), 288-295.

(5) P. G. H. Gell and R. R. A. Coombs, eds.: Clinical Aspects of Immunology, 1st ed. Oxford, England, Blackwell, (1963).
 (6) J. L. Garrigue, J. F. Nicolas, R. Fragninals, C. Benezra, H. Bour and D. Schmitt: Contact Dermatitis., **30**(1994), 231-237.
 (7) C. Lass, I. Merfort and S. F. Martin: Exp. Dermatol., **19**(2010), 1007-1013.
 (8) N. Inagaki, N. Shiraiishi, K. Igeta, T. Itoh, T. Chikumoto, M. Nagao, J. F. Kim and H. Nagai: Eur. J. Pharmacol., **546**(2006), 189-196.
 (9) T. Werfel, M. Hentschel, A. Kapp and H. Renz: J. Immunol., **158**(1997), 2500-2505.
 (10) H. Hashizume, N. Seo, T. Ito, M. Takigawa and H. Yagi: J. Immunol., **181**(2008), 8096-8102.
 (11) S. Artik, C. von Vultée, E. Gleichmann, T. Schwarz and P. Griem: J. Immunol., **163**(1999), 1143-1152.
 (12) M. Kinbara, N. Sato, T. Kuroishi, T. Takano-Yamamoto, S. Sugawara and Y. Endo: Br. J. Dermatol., **164**(2011), 356-362.
 (13) M. Kawano *et al.*: PLoS One., **9**(2014), e86810.
 (14) H. Kobayashi, K. Kumagai, T. Eguchi, H. Shigematsu, K. Kitaura, M. Kawano, T. Horikawa, S. Suzuki, T. Matsutani, K. Ogasawara, Y. Hamada and R. Suzuki: PLoS One., **8**(2013), e76385.
 (15) T. Eguchi, K. Kumagai, H. Kobayashi, H. Shigematsu, K. Kitaura, S. Suzuki, T. Horikawa, Y. Hamada, K. Ogasawara and R. Suzuki: Cellular Immunol., **284**(2013), 163-171.

★★

川野光子
 2005年3月 筑波大学大学院生命環境科学研究科博士課程修了
 博士(学術)
 2002年- 皮膚の恒常性維持におけるFGFの機能解析に従事(産業技術総合研究所)
 2008年- 金属アレルギーの病態解析に従事(国立国際医療センター研究所)
 2009年 東北大学加齢医学研究所
 2012年4月より現職
 専門分野: 分子細胞生物学, 免疫学
 ©皮膚疾患モデルの作製を通じた病態解析に従事。生体の最外層で生体防御を担う皮膚の免疫機能に焦点をあてた研究を展開していきたい。

★★



川野光子 武田裕利 中村 生 小笠原康悦