

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15721

研究課題名(和文) 金属ナノボールを用いた金属アレルギー用新規パッチテスト素材の開発

研究課題名(英文) Development of novel metal allergy patch test resource using metal nanoballs

研究代表者

宇尾 基弘 (UO, Motohiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20242042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：微小金属粒子(ナノボール)を金属アレルギーパッチテストの素材として用いるため、水溶液中での金属イオン放出特性と皮膚へのイオン浸透特性を調査した。ニッケル等のナノボールを弱酸性溶液に分散し、透析膜を介して外液に溶出イオンを供給する試験を行ったところ、十分な金属イオン溶出が得られることが判明した。加えて動物皮膚への浸透試験を同様の手法で行ない、放射光蛍光X線分析で金属の皮膚への金属イオンの連続的な浸透を認めた。浸透した金属イオンは既存のアレルギーパッチテスト試薬と比較して、低濃度で時間依存的に供給されていた。以上より金属ナノボールは新たなパッチテスト素材として期待できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, metal nanoballs were applied as the resource of metal allergy patch test and the metal ion release and permeation into skin were estimated. Ni and other metal nanoballs were dispersed in the mildly acidic solution and the enough ion release through the dialysis membrane was confirmed. Also, continuous ion permeation into skin with same method was estimated with the synchrotron radiation X-ray fluorescence. The permeation occurred in lower concentration with time dependently compared to conventional patch test. In conclusion, the metal nanoballs was suggested to be applicable as the resource of metal allergy patch test.

研究分野：歯科理工学

キーワード：金属アレルギー パッチテスト ナノ材料

1. 研究開始当初の背景

金属アレルギーの標準的対応としては、皮膚パッチテストにおいてアレルゲンとなる金属元素を特定し、当該元素を含む装身具や金属修復物を除去して経過観察となるが、多くの金属修復物は歯質に接着されているため、修復物の撤去は患者に身体的・経済的負担を与えるばかりか、撤去時の切削で対象金属が散乱しアレルギー反応を増悪させる懸念がある。その上、パッチテストの精度はさほど高くなく、原因金属を確実に特定するのは困難である。その原因は金属の水溶性塩 (NiSO₄ など) の高濃度溶液を滴下したパッチを貼付するため、皮膚に高濃度の金属イオン (およびカウンターイオン) 浸透が急激に起こることと、溶液の多くは pH が 3 以下の酸性であり、アレルギー反応以外の皮膚反応が惹起されるためと提唱されている。実際の金属アレルギーの発症は体液に徐々に溶出した金属イオンが皮膚や粘膜から吸収されて起こるため、現行のパッチテストは実際の機序と大きく異なるが、代替法がないのが現状である。

そこで比表面積の極めて大きな金属ナノ微粒子 (ナノボール) を弱酸性の緩衝液に懸濁して金属イオンの溶出を促進し、溶出イオンを皮膚に浸透させることで、現実の金属アレルギー発症に近い環境を実現することを考案した。但し、ナノ物質については組織・細胞内に浸透しやすいため、バルクとは異なる毒性 (ナノ毒性) を示す可能性が危惧されている。例えば、化粧品などに多用されるナノ TiO₂ では皮膚浸透性が高いことが知られている。ナノボール (ナノ微粒子) による意図しない毒性発現を避けるためには、ナノボールの皮膚への直接接触・浸透は避けなければならない。そこでナノボール懸濁液を半透膜を介して皮膚に接触させることで、溶出した金属イオンのみを半透膜を通して皮膚に浸透させるモデルを考案し、その有効性を調査した。

2. 研究の目的

現行のパッチテストは検査できる金属種に限られ、金属の急激かつ高濃度の皮膚浸透や酸性の溶液による皮膚影響から検査精度に限界がある。金属ナノボールは直径数十 nm の微小金属粒子で、大きな比表面積を持つため、通常の微粉末より大きな金属イオン溶出が期待できる。そこで実際の金属アレルギー発症を良好に模擬した新規パッチテスト素材をナノボールを用いて開発し、現行のパッチテストの欠点を克服した、新たな手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

液中プラズマ放電により作製された Ni およびステンレス鋼(SUS304)のナノボール (図

1) を蒸留水および各種 pH に調整したリン酸緩衝液(PBS)にナノボール濃度が最大で 1000 ppm となるよう懸濁した分散液を調整した。同分散液を透析膜 (透析チューブ) を介して、蒸留水、皮膚を模擬した寒天に接触させ、蒸留水 (寒天) 中への金属イオンの溶出量を Ni イオンにより色調 (蛍光) が変化する指示薬である Nitro-PAPS による比色定量法および ICP 発光分光分析(ICP-AES)により評価した。

動物皮膚への金属イオン浸透試験では金属ナノボール分散液を充填した透析膜をブタ皮膚 (凍結品) に接触させ、37 °C、湿度 100% で最大 24 時間まで保持した。その後、通法に従って凍結切片を作製し、約 20 μm 厚に薄切しカプトンフィルム上に貼付・乾燥して元素分布分析に供した。元素分布分析は高エネルギー加速器研究機構 放射光科学研究施設(KEK-PF)の BL-4A で、放射光蛍光 X 線分析(SR-XRF)により行った。SR-XRF ではポリキャピラリーにより約 30 μmφ に集光した X 線 (12.9 keV) を試料に照射し、試料を 100 μm で X-Y スキャンしつつ蛍光 X 線を SDD 検出器で計測することにより元素分布像を得た。

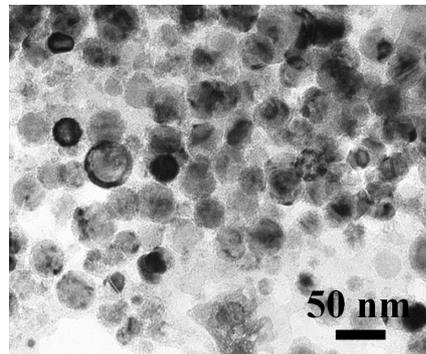


図 1 Ni ナノボールの透過電子顕微鏡像

4. 研究成果

In vitro での Ni およびステンレスナノボール分散液から透析膜 (チューブ) を介しての蒸留水中への金属イオン浸透試験では、Ni (ステンレスの場合は Fe も) イオンの浸透が明瞭に確認された。ナノボールの分散媒を蒸留水から pH = 5 ~ 6 程度の弱酸性にすることで、Ni イオンの溶出は 10 倍程度に増加し、十分な溶出とイオン浸透が得られることが推定された。ヒトの皮膚や一般に pH 6 弱の弱酸性とされており、この程度の pH は皮膚に接触しても刺激性の無いものと考えられた。

図 2 は Nitro-PAPS を添加した寒天に透析膜を介して Ni ナノボールを接触させた場合の寒天への Ni イオンの浸透状況を示す。上方のチューブにナノボール分散液が充填されており、下面の透析膜を介して寒天に接している。Nitro-PAPS は Ni イオンによりオレンジから紫色に変色するため、Ni イオン浸透域が変色により視認できる。接触直後(a)では寒天に変色域がないが、(b), (c), (d) (それぞれ約 1, 3, 6 時間後) と進行するに従って、Ni

イオン浸透に伴う変色域が拡大している。Nitro-PAPS は Ni イオンに反応して変色するが、金属状態の Ni ナノボールには反応しないため、Ni イオンが透析膜を介して徐放されることを確認した。

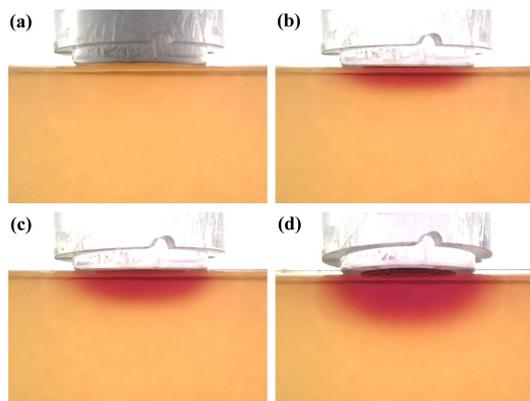


図2 透析膜を介したNi ナノボール分散液からのNitro-PAPS 含有寒天へのNi イオンの浸透

図3はNi ナノボールおよびステンレス鋼ナノボール分散液(約500ppm, pH=5.8)を封入した透析チューブを24時間貼付したブタ皮膚断面のSR-XRFによる元素分布像を示す。

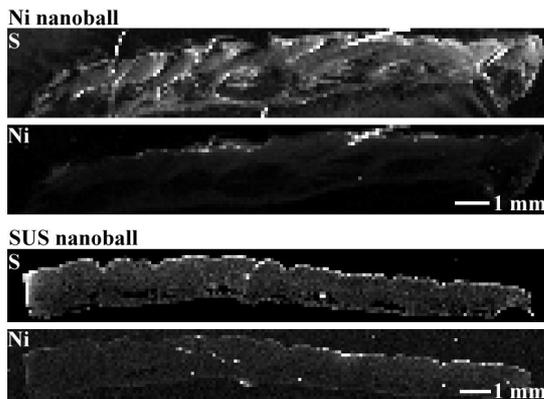


図3 Ni ナノボールおよびステンレス鋼ナノボール分散液を24時間接触させたブタ皮膚断面のSR-XRFによるSおよびNi分布像

画像上面が皮膚表層であり、S分布像により組織の外形が分かる。Ni ナノボールを接触させた皮膚では接触部位直下にNi分布像で明瞭なNiの局在が認められる。Ni浸透域は接触1時間後から認められ、24時間までほぼ連続的に浸透域の拡大および相対的な濃度向上が認められた。当該領域のH-E像では軽度な炎症反応を認めたが、高濃度Ni塩水溶液を用いる現行のパッチテストと比較すると、その程度は軽微であった。

ステンレスナノボールでも皮膚表層にわずかにNi浸透域が認められたが、その濃度はNiナノボールに比べると低かった。またCrについては明確な皮膚浸透は認められなかったが、これはCrイオンの低い溶解度に

起因すると考えられた。Feについては溶出していると考えられるが、生体内に比較的高濃度に含有されているため、外来(ナノボール由来)と識別が困難なため、元素分布による浸透の評価は不可能であった。しかしながらステンレスナノボールからNiの溶出がin vitroでの溶出試験および皮膚浸透で確認されたことから、実際のステンレス鋼と同様の成分金属イオンの溶出が得られることが予想された。

本研究の目的では実際の金属アレルギーを模擬してナノボールから金属イオンを溶出・皮膚浸透させることであるが、ナノボール自体を皮膚に接触させることは、いわゆる「ナノ毒性」への危惧の点から避ける必要がある。in vitro試験でNiイオンが溶出していること、皮膚浸透試験で実際に皮膚にNiが浸透することを確認しているが、皮膚内のNiが全てNiイオンであること、即ち金属ナノボールが浸透していないことを確認する必要がある。

そのためX線吸収分光法により、Ni K吸収端のX線吸収端近傍構造(XANES)スペクトルを測定し、標準物質(金属Niと硫酸ニッケル水溶液)のそれと比較したのが図4である。Niナノボールから皮膚に浸透したNiのXANESスペクトルは金属Niとは異なり、硫酸ニッケル水溶液(水溶液中のNiイオン)に近似していることから、透析膜を介してNiナノボール(ステンレスナノボールも同様)から溶出したNiイオンのみが皮膚に浸透した者と考えられた。

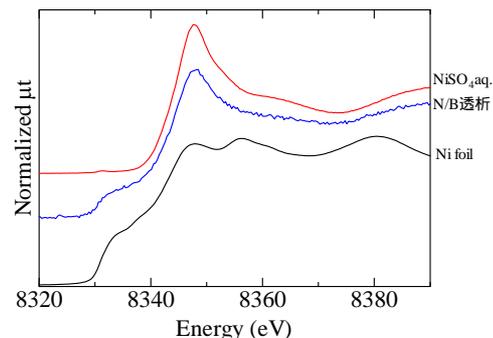


図4 Ni ナノボール懸濁液を接触させた皮膚組織中のNiのK端XANESスペクトルと標準物質との比較

以上より、金属ナノボール分散液を用いて、実際の金属アレルギー発症を模擬するための十分な成分金属イオンを皮膚に浸透させることが可能であり、新たな金属アレルギーパッチテストの素材として金属ナノボールを応用し得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Sugiyama T., Uo M., Mizoguchi T., Wada T., Omagari D., Komiyama K., Mori Y., Copper accumulation in the sequestrum of medication related osteonecrosis of the jaw, Bone Reports 3, 40-47, 2015, 査読有;
<https://doi.org/10.1016/j.bonr.2015.08.001>

[学会発表](計 7 件)

姜 東勲, 和田敬広, 宇尾基弘, 興地隆史, 合成ケイ酸カルシウムセメントの圧縮強度と操作性向上に関する研究, 第 70 回日本歯科理工学会学術講演会, 2017 年 10 月

清水畑誠, 猪越正直, 和田敬広, 高橋礼奈, 宇尾基弘, 水口俊介, イオン徐放性 S-PRG フィラー含有根面う蝕修復用セメントの機械的強度と微細構造解析, 第 70 回日本歯科理工学会学術講演会, 2017 年 10 月

Hongo T., Wada T., Uo M., Development of a quantitative method of residual substances in the autopolymerizing acrylic resin, International Dental Materials Congress 2016 (国際学会), 2016 年 11 月

Kang D., Wada T., Uo M., Okiji T., Evaluation of mechanical properties of an experimental synthetic tricalcium silicate cement., The 18th Joint Scientific Meeting of Korean Academy of Conservative Dentistry - Japanese Society of Conservative Dentistry (国際学会), 2016 年 11 月

和田敬広, 宇尾基弘, 微小部 XRF・XAFS の生物試料分析への応用と BL-15 への期待, PF 研究会(招待講演), 2015 年 10 月

Wada T., Murata N., Uehara H., Suzuki T., Niwa Y., Nitani H., Uo M., Asakura K., μ -XAFS Investigation of a Real μ -Gas Sensor to Reveal the Origin of Methane Selectivity Degradation, XAFS16 (国際会議), 2015 年 8 月

Sugiyama T., Uo M., Wada T., Omagari D., Komiyama K., Mori Y., Detection and chemical state analysis of trace metallic elements in oral mucosal lesions using SRXRF, PIXE, and XAFS, XAFS16 (国際会議), 2015 年 8 月

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇尾 基弘 (UO, Motohiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 20242042

(2)研究分担者

尾曲 大輔 (OMAGARI, Daisuke)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号: 10608699

和田 敬広 (WADA, Takahiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 10632317

本郷 敏雄 (HONGO, Toshio) (H28 まで)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 60142444