

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 5 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20592342

研究課題名（和文） PIXE 法の微量元素偏在分析による口腔扁平苔癬の病因解明のための基礎的研究

研究課題名（英文） Trace element analysis of the tissue from the oral lichen planus patients by the PIXE method

研究代表者

杉山 芳樹（SUGIYAMA YOSHIKI）

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：00162909

研究成果の概要（和文）：口腔扁平苔癬（OLP）の原因究明のため、粒子励起 X 線分光法で口腔扁平苔癬患者と健常者の口腔粘膜元素の比較を行った。その結果 17 種の必須元素と 11 種の汚染（非必須）元素を検出した。含有量を 30 歳以上の女性で比較すると、Si, Fe, Zn, Al, Sr が OLP 群で有意に高かった。OLP 群では健常群よりも元素含有量が高い傾向にあり、病因として Zn, F, Pd などの d-遷移元素の可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：We made a comparative study of trace elements in the oral mucosa of 31 patients with oral lichen planus (OLP) and of 100 healthy persons by the Particle Induced X-ray Emission (PIXE) method in order to clarify the causes of OLP. The results were as follows: Seventeen trace elements and 11 contaminating elements were detected. As for the females over 30 years old, the OLP group showed significantly higher values of Si, Fe, Zn, Al and Sr than the control group. The mean values of the other essential and contaminating elements did not differ significantly between the groups, although there was a trend toward higher values in the OLP group. We found by the PIXE method that Zn, Fe and Pd, which are d-transitional elements, showed higher values in the oral mucosa of the OLP patients than in those of the healthy persons.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2009 年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 2010 年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：歯学・臨床・分析化学・加速器・人間生活環境

## 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平苔癬は原因不明の炎症性病変である。その病因については、従来から基底膜下のTリンパ球の集積が特徴的であることや歯科用合金に対する金属アレルギー患者に見られることなどから、細胞性免疫の異常または細胞性免疫そのものが関与していると考えられている。近年、発症については角化細胞、ランゲルハンス細胞と浸潤細胞の相互作用についてのあらたな知見が得られている。しかし、免疫反応に一番重要である抗原そのものが特定されていないことが、研究の進展の妨げとなっている。

一方、口腔扁平苔癬の治療は、原因が明確でないために、副腎皮質ホルモン含有軟膏やタクロリムス水和物軟膏の塗布などの対処療法に甘んじている。一般に金属アレルギーが疑われる疾患の場合、特定された金属を含む歯科用材料や装飾用材料などの除去を行う。しかし、大多数の症例の場合、除去後に症状の改善がみられて初めて、その材料を原因と診断している。仮に口腔扁平苔癬患者について、特定の金属が原因と特定できたら、原因金属材料の除去はより効率的に行える。さらにキレート剤の局所塗布など、根治的な新たな治療法の開発につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

口腔扁平苔癬の原因の一つに金属アレルギーがあげられる。金属元素が感作するためには、金属元素が皮膚や粘膜に接触し、そこから侵入して体内タンパク質と結合する過程が必須である。そして、生体はこの金属結合タンパクに対して反応する。したがって、口腔扁平苔癬患者の口腔粘膜には何らかの形で原因金属元素が存在する

と予想される。本研究は、口腔扁平苔癬患者の病変部口腔粘膜と健常者の口腔粘膜に含まれる金属元素を粒子励起 X 線分光法 (Particle Induced X-ray Emission : PIXE 法) にて分析し、比較検討することにより、これまで推測の域を出なかった同疾患の原因を直接的に証明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 対象

口腔扁平苔癬患者 31 名 (以下 OLP 群と略す) に対し、説明と同意を得て、病理検査とともに口腔粘膜の一部、唾液、血清の元素分析を行った。患者の内訳は、男性 8 名、女性 23 名で、年齢は男性が平均 60.9 歳 (48~73 歳) であり、女性が平均 58.3 歳 (31~79 歳) であった。一方、対照の健常者 100 名 (以下健常者群と略す) は男性 48 名、女性 52 名で、年齢は男性が平均年齢 32.5 歳 (12~77 歳)、女性が平均年齢 30.7 歳 (11~76 歳) であった。

### 2) 方法

研究方法は、患者またはボランティアから口腔粘膜組織を採取し、同時に同一者から唾液、血清を採取した。その後、口腔粘膜組織は硝酸灰化法で液状化し、唾液、血清にはそのままインジウムを内部標準として加え、PIXE 法で含有元素分析を行った。それぞれの試料について約 35 種の元素のデータ解析を行い、過去に蓄積した健常者 100 例のデータとの比較により、口腔扁平苔癬の原因金属の同定と摂取経路を検索した。

すなわち、

①口腔粘膜組織の採取を行う。同時に同一

者から唾液、血清を採取した。

②口腔粘膜組織は生理食塩水中で攪拌洗浄を2時間行った。

③口腔粘膜組織の一部は2%コラゲナーゼを37℃、2時間で上皮と固有層の分離を行い以下の操作は同様に行った。

④口腔粘膜組織の細胞を破壊しないように、40℃ホットプレート上で乾燥させた。

⑤乾燥させた口腔粘膜組織は5mgにセミマイクロ/マクロ分析天秤にて調整した。

⑥口腔粘膜組織は硝酸灰化法で処理した。すなわち、乾燥試料5mg、硝酸200 $\mu$ l、内部標準としてインジウム5 $\mu$ lを加え、電子レンジ200Wにて2分間加熱後、1分間自然冷却し、さらに2分間加熱後、20分自然冷却した。唾液、血清は1mlあたり50 $\mu$ lの内部標準インジウムを加えて試料とした。

⑦4 $\mu$ mのポリプロピレンフィルムに各試料を5 $\mu$ l滴下し、十分に乾燥後して、サイクロトロンターゲットとした。

⑧測定は2.9MeVプロトンを用い、励起された特性X線をシリコン・リチウム検出器で検出し、Multi-channel analyzerにてスペクトルに変換後、各元素の検出量を算出した。

#### 4. 研究成果

##### 1) OLP群、健常者群全例での比較

###### (1) 検出元素

表1のようにOLP群、健常者群の口腔粘膜から微量元素12種類、超微量元素5種類の計17種類の必須元素と11種類の汚染元素の計28種類が検出された。本来、生体には必要としない汚染元素ではAl, Ti, Sr, Pbが半数以上のOLP群で検出され、特にPbはOLP、健常者群全例で検出した。検出率についてみると、OLP群では健常者群よりも必須元素ではSi, Mn, Fe, Ni, Asが有意に低く、汚染元素ではAl, Gaが有意に低かった。必須元

素ではSi, Cu, Cr, Fe, Zn, Se, Br, Rbが、汚染元素ではAl, Ti, Pbは両群ともに65%以上の検出率であった。

###### (2) 口腔粘膜含有元素量

OLP群、健常者群の口腔粘膜含有元素量を表2に示す。必須元素ではNi, Se, Rbが有意に低い結果であった。

##### 2) OLP群、健常者群の30歳以上の女性における比較

口腔扁平苔癬の発症には性差があり、一般に中年以降の女性に多い。そこで本研究結果から30歳以上の女性を抽出してOLP群、健常群を比較した。

###### (1) 検出元素

その結果、必須元素では超微量元素であるPdがOLP群で全例検出され有意に高い検出率であった。汚染元素ではOLP群でAl, Ga, Hgが有意に低い検出率であった。

###### (2) 口腔粘膜含有元素量

30歳以上女性では必須元素のSi, Fe, ZnがOLP群で有意に高く、汚染元素ではAl, Srが有意に高い値を示した。有意差はなかったがSr, PdはOLP群で高い値を示し、特にPdは2倍以上の含有量であった。各元素ともにOLP群の方が、健常群よりも高値を示す傾向にあった(図1)。Zn, Fe, Pdなどのアレルギー活性が高いd-遷移元素がOLP群の口腔粘膜に多く含まれている傾向にあった。

##### 3) 口腔粘膜、唾液、血清の比較

OLP群、健常群の同一個体での口腔粘膜、唾液、血清の含有量の比較を行った。その結果、口腔粘膜の含有量と血清の含有量を比較すると、Crの77.9倍からSeの7.5倍であった。また、唾液の含有量と比較するとNiの595.0倍からRbの15.3倍であった。Brを除く、すべての元素で粘膜の元素含有量は唾液、

血清よりも高い値を示した。特に必須元素では Cu, Cr, Mn, Fe, Co, Zn, Se, Rb が、汚染元素では, Al, Ti, Sr, Ag, Pb は唾液、血清ともに粘膜組織の含有量が有意に高い値を示していた。唾液と血清を比較すると、必須元素である Cu, Fe, Se, Rb が、汚染元素である Pb が血清に有意に高い値を示していた。含有量をみると、Si 以外は血清の方が唾液よりも含嗽含有量が高かった。口腔粘膜は各元素を唾液を介して吸収しているよりも、血清を介して体外に排出している可能性も示唆された。この点は今後の検索の課題と思われる。

表1 OLP群・健常者群の口腔粘膜含有元素

| OLP群と健常者群の検出数と検出率(微量元素) |            |      |             |       |
|-------------------------|------------|------|-------------|-------|
| 検出元素                    | OLP群(n=31) | %    | 健常者群(n=100) | %     |
| Si                      | 24         | 77.4 | 94          | 94 *  |
| Cu                      | 31         | 100  | 100         | 100   |
| V                       | 2          | 6.5  | 12          | 12    |
| Cr                      | 26         | 83.9 | 84          | 84    |
| Mn                      | 22         | 71   | 93          | 93 ** |
| Fe                      | 27         | 87.1 | 97          | 97 *  |
| Co                      | 15         | 48.4 | 56          | 56    |
| Ni                      | 19         | 61.3 | 83          | 83 *  |
| Zn                      | 31         | 100  | 100         | 100   |
| Se                      | 26         | 83.9 | 80          | 80    |
| Mo                      | 7          | 22.6 | 23          | 23    |
| Sn                      | 4          | 13   | 21          | 21    |

\* P<0.05 \*\* P<0.01 \*\*\* P<0.001

| OLP群と健常者群の検出数と検出率(超微量元素) |            |      |             |      |
|--------------------------|------------|------|-------------|------|
| 検出元素                     | OLP群(n=31) | %    | 健常者群(n=100) | %    |
| Ge                       | 0          | 0    | 3           | 3    |
| As                       | 1          | 3.2  | 22          | 22 * |
| Br                       | 31         | 100  | 96          | 96   |
| Rb                       | 28         | 90.3 | 96          | 96   |
| Pd                       | 3          | 9.7  | 9           | 9    |

\* P<0.05 \*\* P<0.01 \*\*\* P<0.001

| OLP群と健常者群の検出数と検出率(汚染元素) |            |      |             |         |
|-------------------------|------------|------|-------------|---------|
| 検出元素                    | OLP群(n=31) | %    | 健常者群(n=100) | %       |
| Al                      | 20         | 64.5 | 100         | 100 *** |
| Ti                      | 28         | 90.3 | 86          | 86      |
| Ga                      | 0          | 0    | 21          | 21 **   |
| Sr                      | 17         | 54.8 | 46          | 46      |
| Zr                      | 8          | 25.8 | 13          | 13      |
| Nb                      | 2          | 6.5  | 13          | 13      |
| Ag                      | 8          | 25.8 | 17          | 17      |
| Sb                      | 1          | 3.2  | 9           | 9       |
| Au                      | 9          | 29   | 16          | 16      |
| Hg                      | 3          | 9.7  | 28          | 28      |
| Pb                      | 31         | 100  | 100         | 100     |

\* P<0.05 \*\* P<0.01 \*\*\* P<0.001

表2 OLP群・健常者群の口腔粘膜元素含有量

| OLP群と健常者群の検出元素の含有量の比較(微量元素) |                |    |                 |      |
|-----------------------------|----------------|----|-----------------|------|
| 検出元素                        | OLP群(n=31)     | n  | 健常者群(n=100)     | n    |
| Si                          | 135.08 ± 12.88 | 24 | 121.37 ± 131.93 | 94   |
| Cu                          | 19.97 ± 19.35  | 31 | 18.93 ± 26.34   | 100  |
| V                           | 2.8 ± 0.39     | 2  | 2.53 ± 1.09     | 12   |
| Cr                          | 4.49 ± 6.57    | 26 | 4.65 ± 6.85     | 84   |
| Mn                          | 2.83 ± 3.38    | 22 | 1.93 ± 1.37     | 93   |
| Fe                          | 121.72 ± 74.42 | 27 | 108.47 ± 78.24  | 97   |
| Co                          | 1.95 ± 2.32    | 15 | 1.83 ± 2.45     | 56   |
| Ni                          | 2.91 ± 3.63    | 19 | 7.86 ± 21.23    | 83 * |
| Zn                          | 71.13 ± 29.32  | 31 | 66.19 ± 30.41   | 100  |
| Se                          | 0.82 ± 0.27    | 26 | 1.16 ± 1.36     | 80 * |
| Mo                          | 2.16 ± 0.51    | 7  | 3.29 ± 5.9      | 23   |
| Sn                          | 12.57 ± 6.94   | 4  | 24.51 ± 30.11   | 21   |

\* P<0.05 \*\* P<0.01 \*\*\* P<0.001 (μg/g)

| OLP群と健常者群の検出元素の含有量の比較(超微量元素) |             |    |             |       |
|------------------------------|-------------|----|-------------|-------|
| 検出元素                         | OLP群(n=31)  | n  | 健常者群(n=100) | n     |
| Ge                           |             | 0  | 0.22 ± 0.07 | 3     |
| As                           | 1.49        | 1  | 0.65 ± 0.57 | 22    |
| Br                           | 3.35 ± 1.59 | 31 | 3.2 ± 1.48  | 96    |
| Rb                           | 3.27 ± 1.82 | 28 | 5.01 ± 3.49 | 96 ** |
| Pd                           | 5.04 ± 4.96 | 31 | 5.44 ± 7.59 | 9     |

\* P<0.05 \*\* P<0.01 \*\*\* P<0.001 (μg/g)

| OLP群と健常者群の検出元素の含有量の比較(汚染元素) |               |    |               |     |
|-----------------------------|---------------|----|---------------|-----|
| 検出元素                        | OLP群(n=31)    | n  | 健常者群(n=100)   | n   |
| Al                          | 81.59 ± 66.35 | 20 | 71.52 ± 64.19 | 100 |
| Ti                          | 7.56 ± 4.26   | 28 | 6.11 ± 6.87   | 86  |
| Ga                          |               | 0  | 0.68 ± 0.3    | 21  |
| Sr                          | 0.93 ± 0.34   | 17 | 0.91 ± 0.46   | 46  |
| Zr                          | 4.86 ± 7.43   | 8  | 0.76 ± 0.37   | 13  |
| Nb                          | 0.85 ± 0.08   | 2  | 0.9 ± 0.61    | 13  |
| Ag                          | 7.38 ± 4.39   | 8  | 7.82 ± 7.32   | 17  |
| Sb                          | 13.08         | 1  | 11.46 ± 7.77  | 9   |
| Au                          | 4.03 ± 2.43   | 9  | 3.79 ± 4.19   | 16  |
| Hg                          | 1.82 ± 1.44   | 3  | 1.83 ± 1.39   | 28  |
| Pb                          | 5.04 ± 4.96   | 31 | 5.58 ± 7.1    | 100 |

\* P<0.05 \*\* P<0.01 \*\*\* P<0.001 (μg/g)

表3 OLP群・健常者群の口腔粘膜元素含有量(30歳以上の女性)

| OLP群と健常者群の検出元素の含有量の比較(微量元素) |                 |    |               |       |
|-----------------------------|-----------------|----|---------------|-------|
| 検出元素                        | OLP群(n=23)      | n  | 健常者群(n=18)    | n     |
| Si                          | 144.09 ± 113.12 | 18 | 81.13 ± 60.87 | 15 *  |
| Cu                          | 21.84 ± 21.07   | 23 | 28.89 ± 43.35 | 18    |
| V                           | 2.8 ± 0.39      | 2  | 2.16 ± 1.1    | 3     |
| Cr                          | 4.9 ± 7.66      | 18 | 5.13 ± 7.23   | 15    |
| Mn                          | 3.1 ± 3.17      | 18 | 1.71 ± 1.18   | 15    |
| Fe                          | 131.77 ± 82.16  | 20 | 82.89 ± 47.66 | 18 *  |
| Co                          | 1.91 ± 2.46     | 12 | 1.5 ± 1.27    | 12    |
| Ni                          | 2.99 ± 3.76     | 14 | 1.43 ± 1.42   | 16    |
| Zn                          | 78.36 ± 29.3    | 23 | 53.44 ± 25.62 | 18 ** |
| Se                          | 0.79 ± 0.31     | 19 | 0.73 ± 0.3    | 15    |
| Mo                          | 2.12 ± 0.61     | 5  | 1.72 ± 1.3    | 3     |
| Sn                          | 13.9 ± 7.85     | 3  | 12.06 ± 3.56  | 3     |

\* P<0.05 \*\* P<0.01 \*\*\* P<0.001

| OLP群と健常者群の検出元素の含有量の比較(超微量元素) |             |    |             |    |
|------------------------------|-------------|----|-------------|----|
| 検出元素                         | OLP群(n=23)  | n  | 健常者群(n=18)  | n  |
| Ge                           |             | 0  | 0.17        | 1  |
| As                           | 1.49        | 1  | 0.13        | 1  |
| Br                           | 3.46 ± 1.75 | 23 | 2.92 ± 1.28 | 18 |
| Rb                           | 3.19 ± 1.82 | 21 | 3.67 ± 2.24 | 16 |
| Pd                           | 4.93 ± 5.36 | 23 | 2.2 ± 0.4   | 2  |

\* P<0.05 \*\* P<0.01 \*\*\* P<0.001

| OLP群と健常者群の検出元素の含有量の比較(汚染元素) |               |    |               |       |
|-----------------------------|---------------|----|---------------|-------|
| 検出元素                        | OLP群(n=23)    | n  | 健常者群(n=18)    | n     |
| Al                          | 88.08 ± 71.24 | 16 | 45.75 ± 15.98 | 18 *  |
| Ti                          | 7.04 ± 4.07   | 21 | 8.01 ± 13.59  | 15    |
| Ga                          |               | 0  | 0.82 ± 0.24   | 6     |
| Sr                          | 0.97 ± 0.34   | 13 | 0.65 ± 0.22   | 10 ** |
| Zr                          | 0.8 ± 0.14    | 4  | 0.61 ± 0.44   | 2     |
| Nb                          | 0.85 ± 0.08   | 2  | 0.86 ± 0.57   | 4     |
| Ag                          | 8.08 ± 5.36   | 5  | 6.99 ± 2.23   | 2     |
| Sb                          | 13.08         | 1  | 10.65 ± 4.8   | 3     |
| Au                          | 4.37 ± 2.67   | 7  | 2.71 ± 0.93   | 3     |
| Hg                          | 0.77 ±        | 1  | 1.37 ± 0.74   | 6     |
| Pb                          | 4.93 ± 5.36   | 23 | 3.3 ± 3.23    | 18    |

\* P<0.05 \*\* P<0.01 \*\*\* P<0.001

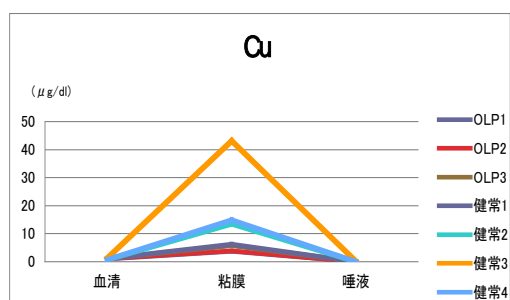


図1 血清・粘膜・唾液中のCu含有量

## 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 8件)

1) Kumagai, A., Matsuo, M., Hoshi, H., Sato, H., Takeda, Y. and Sugiyama, Y.: Oral

Lichenoid Drug Reaction with Autoantibodies in Peripheral Blood: Case Report, Oral Science International, 8:29-33. 2011. (レフリー有り)

2) Sera, K., Terasaki, K., Sasaki, T., Goto, S., Saitoh, Y. and Itoh, J.: Studies on Changes of Elemental Concentration in a Human Body by Means of Analyses of Long Hairs on the Basis of the Standard-Free Method., Int'l Journal of PIXE Vol. 19 -1, 2 17-27, 2009. (レフリー有り)

3) Sera, K., Itoh, J., Goto, S., Saitoh, Y., Fujimura, A., Nosaka, Y., Noda, Y., Nishizuka, S. and Wakabayashi, G.: Quantitative analysis of very small quantity of organs taken from patients and experimental animals; standard-free method for organ samples, Int'l Journal of PIXE, 18 -3, 4: 111-122, 2008 (レフリー有り)

[学会発表] (計 10件)

1) 原 康文、杉山 芳樹、星 秀樹、熊谷章

子、飯島 伸、松本直子:  $^{18}\text{F}$ -Choline PETによる口腔癌の診断、第 29 回日本口腔腫瘍学会、2011年1月27, 28日、鹿児島

2) 原 康文、古屋 出、熊谷章子、寺崎一典、星 秀樹、小豆島正典、杉山芳樹:  $^{18}\text{F}$ -Choline PET検査で脳腫瘍が発見された前立腺癌下顎骨転移の1例、第54回日本口腔外科学会総会、2009年10月9日、札幌。

3) Kumagai, A., Matsuo, S., Furuuchi, H., Hoshi, H. and Sugiyama, Y.: A patient with drug-induced oral lichen planus who had autoantibody in peripheral blood, The 19th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, May 25, 2009, Shanghai (China)

4) 松本直子、飯島 伸、熊谷章子、星 秀樹、小豆島正典、杉山芳樹: FDG-PETを用いたがん検診で発見された口腔良性腫瘍の2例。第53回日本口腔外科学会総会、2008年10月20日、徳島。

[その他]

ホームページ等:

<http://www-os2.iwate-med.ac.jp/research.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉山 芳樹 (SUGIYAMA YOSHIKI)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号: 162909

### (2) 研究分担者

世良 耕一郎 (SERA KOUICHIRO)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号: 230855