

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18627

研究課題名（和文）免疫寛容破綻を起点とした歯科金属アレルギー発症機序の可能性探索

研究課題名（英文）Elucidation of onset mechanism of Dental metal allergy originating from the failure of immune tolerance

研究代表者

江口 香里（Eguchi, Kaori）

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：10779614

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ニッケルに対する歯科金属アレルギー動物モデルを作成し、アレルゲンの侵入部位および機序を明らかにするため、腸管透過性および腸管免疫の変化について解析を行った。また歯周病併発歯科金属アレルギー動物モデルを作成し、歯周病と歯科金属アレルギーの関連について検証を行った。これらの結果、歯周病原細菌の影響によって、歯科金属アレルギー発症による皮膚症状が増悪することが確認され、歯周病と歯科金属アレルギー関連疾患との関連性が示唆された。歯科金属アレルギー発症機序の起点の同定にはさらなる検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、歯周病と歯科金属アレルギー関連疾患との関連性が示唆され、歯周治療によって歯科金属アレルギー関連疾患の症状を軽減できる可能性が示唆された。一方で、歯周病と歯科金属アレルギーの発症との関連についてはさらなる検証が必要である。金属補綴修復物と歯周病による免疫寛容の破綻が歯科金属アレルギー発症機序の起点になるか否かを明らかにし、金属の体内侵入経路とその機序を解明することは、治療標的を明らかにし、歯科金属アレルギー関連疾患の症状寛解に有効な歯科処置のエビデンス構築に貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：I established a nickel allergy animal model and tried to clarify the site and mechanism of allergen entry by analyzing changes in intestinal permeability and intestinal immunity to clarify the site and mechanism of allergen entry. I also established an animal model of dental metal allergy with periodontal disease and verified the relationship between periodontal disease and dental metal allergy. As a result, it confirmed that the skin symptoms caused by dental metal allergy are exacerbated by the influence of periodontal pathogenic bacteria that suggesting a relationship between periodontal disease and dental metal allergy-related diseases. Further verification is required to identify the origin of the pathogenesis of dental metal allergy.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯科金属アレルギー 免疫寛容破綻 モデルマウス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、保険診療に様々な非金属材料が導入されているが、現状において完全なメタルフリー治療の達成は難しく、歯科における金属材料の重要性は変わらない。歯科金属アレルギーは、口腔内の金属補綴修復物に含まれる金属を抗原としてアレルギー反応が感作・惹起され、その病態は、歯科金属アレルギー関連疾患と呼ばれる皮膚炎、掌蹠膿疱症、扁平苔癬、尋常性乾癬、湿疹などの局所性、全身性の皮膚粘膜疾患として発現し、患者の生活の質を著しく低下させる。歯科金属アレルギーは歯科治療が疾患原因の医原病であり、歯科が解決する責務を負う課題であるが、ハプテンである金属イオンが完全抗原になるまでの過程やその際に結合するタンパク質、体内侵入経路については不明な点が多い。金属アレルギーの機序解明のために、これまで様々な動物モデルが確立されているが、これらは金属イオンを経皮的に体内に直接注入してアレルギー反応を感作・惹起するモデルであることから、経口経路で口腔内金属が感作・惹起を起こす歯科金属アレルギーの発症機序を正確に模倣したモデルとは言い難い。金属イオンの経口投与による歯科金属アレルギー動物モデルの確立は今までに成功していないことから、歯科金属アレルギー発症機序に対する新しい発想が必要である。歯科金属アレルギー治療においては、口腔内の抗原被疑金属の除去が第一選択とされており、抗原の供給減少による惹起抑制が症状寛解の機序として想定されている。一方、申請者は、口腔内の抗原被疑金属を除去していない歯科金属アレルギー関連疾患患者において、歯周治療により皮膚粘膜症状が寛解した症例を認めており、他施設でも同様の報告がある。この理由として、歯周病による全身性の感染・炎症状態がアレルギー反応を助長し皮膚粘膜症状を増悪させており、歯周治療を行うことにより感染・炎症状態が抑制され症状寛解に至った、と考えられているが、その因果関係は不明であり、歯科金属アレルギー関連疾患と歯周病との関係を病態生理学的に証明した研究はない。近年、歯周病原細菌による腸内細菌叢の変化が腸のバリア機能を低下させ、腸管透過性を亢進し、炎症を誘発することや、腸内細菌叢の変化が腸管免疫機構を攪乱し食物アレルギーを発症させることが報告されている。これらの報告は、歯周病原細菌による腸内細菌叢の変化が腸管免疫系に影響を及ぼし、アレルギーの感作・惹起が起こりやすい体内環境を成立させている可能性を示唆している。

以上の背景から、歯科金属アレルギーの感作・惹起の成立には経口の金属イオンの供給に加えて、歯周病原細菌による腸内細菌叢の変化とそれに伴う腸管透過性の亢進や腸管免疫寛容の破壊が関与しているのではないかと、という仮説に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3点である。

歯科金属アレルギーと歯周病との関連解析

金属の体内侵入経路および侵入機序の解明による歯科金属アレルギー発症機序の起点探索

歯科金属アレルギー関連疾患の症状寛解に有効な治療の機序解明

## 3. 研究の方法

### (1) 歯周病併発経口歯科金属アレルギー動物モデルの確立

本研究では、歯周病原細菌経口投与と、金属イオンの経口投与による、歯周病を併発した経口歯科金属アレルギー動物モデルを確立する。歯周病の感染・炎症状態を評価するため、歯周病原細菌感染による歯槽骨吸収を小動物用マイクロX線CTによって観察し、血清中の炎症マーカー及びエンドトキシン濃度の計測を行う。また、歯周病原細菌による腸内細菌叢の変化を確認するため、小腸内容物、糞便を採取し、次世代シーケンサーによるマイクロバイーム解析を行う。金属アレルギーの抗原には、アレルゲン頻度が高いニッケルと、歯科で最も頻用される金属の一つであるパラジウムを用いる。一般的な金属アレルギー動物モデルでは、完全フロイントアジュバントやエンドトキシンと金属イオン水溶液との混合物を腹腔内投与して感作した後、耳介もしくは足底部に金属イオン溶液を注入して惹起する。本研究における歯周病併発経口歯科金属アレルギー動物モデルでは、感作時に歯周病原細菌および金属イオン溶液を経口投与する。惹起は通法に従い金属イオン溶液の注入とする。金属アレルギー発症部位の炎症を評価するため、腫脹量の計測及び病理組織学的解析を行う。アレルギー反応はSham処置群をネガティブコントロール、通法の金属アレルギー動物モデル群をポジティブコントロールとして用いて比較検討する。

### (2) 腸管透過性および腸管免疫の变化解析

小腸、大腸を採取し、組織学的解析、遺伝子発現解析およびタンパク質発現解析を行い、腸管透過性について解析する。また、分子量の異なる蛍光標識デキストランとD-キシロースを用いて、細胞間隙短経路及び経細胞路における物質の透過・吸収機能を評価する。さらに、腸管免疫の変化について評価するため、各種免疫細胞の組織学的解析及び遺伝子発現解析を行い、対照群と比較検証する。

### (3) 金属結合タンパク質の単離、抗原の形成および侵入部位と機序の探索

金属が完全抗原となる際に結合するタンパク質について解析するため、小腸、大腸を採取し、組織切片を作製する。EPMA 分析もしくは放射光蛍光 X 線分析により、組織における金属元素の集積について解析する。完全抗原の形成は金属集積部付近で行われると考えられることから、周辺の腸内容物や腸管組織からタンパク質を採取し、金属結合タンパク質の候補となるタンパク質を同定、単離する。得られたタンパク質と金属イオンによる複合体を作製し、その複合体が免疫原性を持つ完全抗原であるかを確認する。完全抗原であることを確認した後、腸管粘膜への取り込みや細胞間隙短経路の通過性について解析することにより、抗原の生体内での動向を追跡し、抗原の侵入機序を解明する。

### (4) 歯周治療と歯科金属アレルギー関連疾患症状寛解の関連解析

歯周治療による症状寛解の原因が、腸内細菌叢の回復によるとの仮説のもと、歯周病併発経口歯科金属アレルギーモデルマウスに対し、抗生物質並びに Sham 処置群から採取した腸内細菌の投与を行う。その後、再度金属イオンを経口投与し、金属アレルギー症状、腸管透過性、腸管免疫の確認を行う。

## 4. 研究成果

### 【金属イオンの経口投与による歯科金属アレルギー動物モデルの確立】

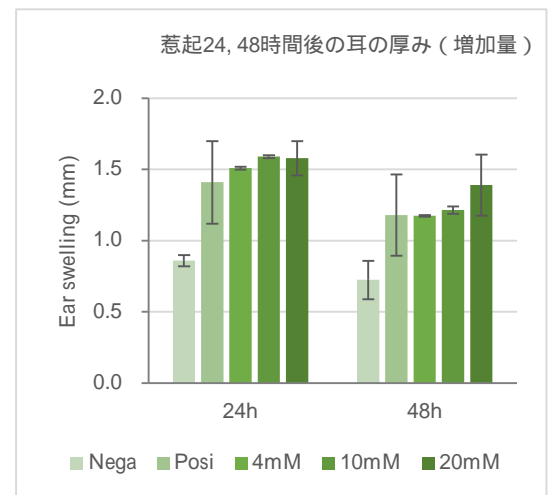
まず、歯周病原細菌の一つである *P. gingivalis* を経口投与することによって、歯周病動物モデルを作成できることを確認した。

次に、ニッケルおよびパラジウムに対する歯周病併発経口歯科金属アレルギー動物モデルを作成するため、金属イオンの経口投与による金属感作の最適条件（金属イオンの投与回数、投与濃度など）について検索を行った。

その結果、歯周病原細菌経口投与と金属イオンの経口投与を組み合わせることによって、一般的な金属アレルギー動物モデル（金属感作のために、完全フロイントアジュバントやエンドトキシンと金属イオン水溶液との混合物を腹腔内投与し感作させる動物モデル）と同等の惹起反応を起こす、金属アレルギー動物モデルを作成できることが確認された。



また、作成したモデル動物の皮膚の炎症症状について評価を行った。その結果、歯周病を併発させた場合、金属アレルギー単独の場合と比較して炎症症状は増悪し、皮膚の発赤および腫脹が増大することが確認された。



本研究成果から、歯周病と歯科金属アレルギー関連疾患との関連性が示唆され、歯周治療によって歯科金属アレルギー関連疾患の症状を軽減できる可能性が示唆された。

一方で、歯周病と歯科金属アレルギーの発症との関連について不明な点が多く、さらなる検証が必要であると考えられる。

また、アレルギーの侵入部位および機序を明らかにするため、腸管透過性および腸管免疫の変化に着目して解析を進めてきたが、機序の解明には至っていない。標的組織や解析方法を再検討し、解析を続ける予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takaoka Yurina, Akiba Yosuke, Nagasawa Masako, Ito Akiko, Masui Yukiko, Akiba Nami, Eguchi Kaori, Miyazawa Haruna, Tabeta Koichi, Uoshima Katsumi	4. 巻 -
2. 論文標題 The relationship between dental metal allergy, periodontitis, and palmo-plantar pustulosis: An observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2186/jpr.JPR_D_20_00307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学大学院医歯学総合研究科 生体歯科補綴学分野 ホームページ -研究- <a href="https://www.dent.niigata-u.ac.jp/prosth2/research.html">https://www.dent.niigata-u.ac.jp/prosth2/research.html</a>
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------