

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：33602
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659927
 研究課題名（和文） 金属アレルギーの原因物質アレルゲンの回転リングディスク電極法による解明
 研究課題名（英文） Identification of allergens for metal allergy by hydrodynamic voltammetry.
 研究代表者
 洞澤 功子（HORASAWA NORIKO）
 松本歯科大学・歯学部・講師
 研究者番号：20165567

研究成果の概要（和文）：金属アレルギーのアレルゲンは、金属イオンが生体内に入りタンパク質と結合したものである。しかしアレルゲンの同定は行われていない。そこで本研究は、アレルゲンとなるタンパク質と結合する金属イオンの組み合わせの解明を電気化学測定法にて行った。その結果ある種のアミノ酸と特異的に反応する純金属の組み合わせを解明した。さらにアミノ酸と反応する純金属の価数には共通点の在ることがわかった。

研究成果の概要（英文）：It is said that the allergen for metal allergy is produced by the protein in human body and the released metal ions. However the kinds of protein in human body are too much. An amino acid is the smallest structured unit of protein. Therefore as first step, the reaction was investigated between the amino acid and metal. The aim of this study was to identify potential allergens for metal allergy. The electrochemical interaction between pure metals and amino acid was examined by hydrodynamic voltammetry.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：歯科理工学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：金属アレルギー、回転リングディスク電極法、アレルゲン、対流ボルタンメトリー、タンパク質、アミノ酸、金属イオン、酸化-還元曲線

1. 研究開始当初の背景

(1) 金属アレルギーのアレルゲンは、金属イオンが生体内に入り体内のタンパク質と結合したものである。歯科用金属によるアレルギーは多発しているが、パッチテストによる原因金属の特定までで、生体内での原因因子となるアレルゲンの同定は未だ行われてはいない。

(2) 代表者は、浸漬試験や電気化学測定法を用いて歯科用金属の耐食性について研究

を行ってきた。その結果、口腔内でイオンになって溶出し易い金属に関する知見を持っている。また耐食性試験への回転リングディスク電極の応用も行い、その有用性についても検討している。そこで反応生成物や中間生成物に関する情報を電気化学パラメータとして得る事のできる回転リングディスク電極法を、アレルゲンの同定に応用しようと考えた。

2. 研究の目的

(1) 本申請の目的は、電気化学測定法の1つである回転リングディスク法を用いて、金属アレルギーのアレルゲンを同定する事である。

(2) アレルゲンとなる生体内タンパク質と結合する金属イオンの組み合わせ解明に、回転リングディスク電極を用いた電気化学測定法を応用し、その酸化還元反応から生体内の反応を解析しようとしているところが斬新である。

(3) アレルゲンとなる金属イオンの量的関係を明らかにすることによって、未だ明らかではない、生体に悪影響を与える溶出金属イオン量の閾値の解明できる点が斬新である。

3. 研究の方法

(1) 実験に用いた材料

① アミノ酸

タンパク質を構成するアミノ酸の内次の7種類：L-リシン(K)、L-システイン(C)、L-プロリン(P)、L-アルギニン(R)、グリシン(G)、L-セリン(S)、L-アラニン(A)

② 電解質溶液

アミノ酸を TBS (トリスバッファーサリン溶液、pH=7.4) に溶解して、それぞれのアミノ酸の 0.1 モル溶液を調整した。

③ 純金属および金属イオン

歯科用合金を構成する金属 14 種類: 銀(Ag)、銅(Cu)、パラジウム(Pd)、ニッケル(Ni)、コバルト(Co)、モリブデン(Mo)、スズ(Sn)、バナジウム(V)、クロム(Cr)、鉄(Fe)、チタン(Ti)、アルミニウム(Al)、亜鉛(Zn)、インジウム(In)

純金属棒はサイズ 3φ x 4 mm の円柱状で上面の測定面のみをエメリーペーパー #1200 で研磨して用いた。グラッシーカーボン はアルミナ研磨まで行って用いた。

金属イオンは原子吸光用標準試料溶液 (1,000ppm) を希釈して用いた。

(2) 測定方法

① 測定装置

バイポテンショガルバナスタット (モデル 2323、BAS 社製) と回転リングディスク電極装置 (RRDE-3A Ver. 1.2.、BAS 社製) を用いて測定した。

電解セルは三電極法として参照電極は銀塩化銀電極、対極に白金線を用いた。

② 電気化学測定

実験系 1. 回転ディスク電極 (純金属) を用いて、まず TBS のみの電解質溶液中で対流ボルタンメトリーを行い、続いて TBS にアミノ酸を添加した電解質溶液中で対流ボルタンメトリーを行い、両方の電解質溶液から得られたサイクリックボルタモグラム (CV) を比較して、アミノ酸と金属の反応を検討する。

回転リングディスク電極のディスクとリングの材質を代えて、2つの実験系を計画した。ディスク交換型リングディスク電極のリング部分はグラッシーカーボンとし、ディスク部分のみをそれぞれの実験系で交換し実験を行った。

実験系 2. ディスク電極 (純金属) 上で生成した化学種を、グラッシーカーボン製のリング電極上で検出するために、回転リングディスク電極を用いて対流ボルタンメトリーを行った (図 1)。

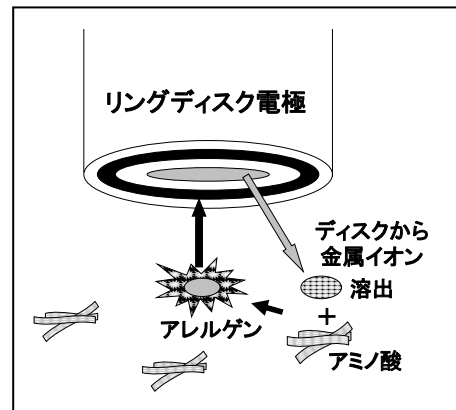


図 1

実験系 1. において反応の確認できたアミノ酸と金属の組み合わせについてのみ測定を行う。リング電極とディスク電極から得られた 2 つのサイクリックボルタモグラム (CV) を検討し、反応が確認された化学種の価数、反応物等に関する情報を得る。

実験系 3. アミノ酸含有の電解質溶液中に金属イオンを添加して、溶液中で生成された化学種をリング電極上で検出するために、対流ボルタンメトリー法とストリッピングボルタンメトリー法を組み合わせで行った (図 2)。

実験系 1. において反応が確認できたアミノ酸と金属の組み合わせについてのみ測定を行う。ディスク部分もグラッシーカーボンとして、TBS にアミノ酸を添加した電解質溶液に、金属イオン (原子吸光用標準

試料溶液)を添加して行う。得られたリング電極とディスク電極のサイクリックボルタモグラム(CV)を検討し、実験系2.の結果を確認し、反応量の算出を行った。

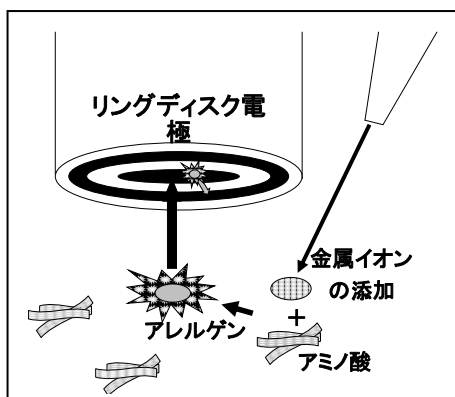


図2

実験系2および3で得られたボルタモグラムから、反応中間体、反応生成物、反応量を決定した。

2つの実験系における結果を比較することによって、得られた結果の正確さも確認できた。

いずれの実験系においても電解質溶液の容量、電解セルの保持温度、RRDEの回転速度、RRDEの電位走査範囲、走査速度、走査回数の測定条件は一定として行った。

電解質溶液もTBS、TBS+アミノ酸、TBS+タンパク質の3種類を実験系1.~3.に組み込んで測定を行った。

③ ターフェルプロット

ポテンショガルバナスタットに付属でPC制御用のソフトウェアによって、得られたサイクリックボルタモグラムをターフェルプロットに変換できる。それを用いてターフェル変換を行い、ゼロカレントポテンシャル(ZCP)、分極抵抗(R_p)および腐食電流(I_{corro})を算出した。

4. 研究成果

(1) 測定条件の決定

対流ボルタンメトリーに先立ち、本実験系における測定条件の検討を行い、すべての測定を以下の条件にて行った。

電解質溶液の容量; 80m l

電解セルの保持温度; 37°C

RRDEの回転速; 100rpm

RRDEの電位走査速度; 0.05V/sec

RRDEの走査回数; 3回

RRDEの走査範囲; 純金属の種類により多少異

なるが+0.8~-1.5V

(2) 電気化学測定結果

① サイクリックボルタモグラム(CV)の比較

TBSのみの電解質溶液中とTBSにアミノ酸を添加した電解質溶液中において、異なったサイクリックボルタモグラム(CV)を示した組み合わせを以下に示す。これらの組み合わせは、ある種のアミノ酸と特異的に反応する純金属が在ることを示している。測定を繰り返し、特異的反応を示すアミノ酸と純金属の組み合わせを解明した。

その組み合わせを以下に示す。

リシン(K): Cu, Co, Mo, V, Cr, Fe

システイン(C): Ag, Cu, Pd, Sn, Fe

プロリン(P): Pd, Sn, Fe

アルギニン(R): Cu, Pd, Co, Mo, Sn, V, Fe,

グリシン(G): Cu, Pd, Sn,

典型的なサイクリックボルタモグラムを図3~6に示す。

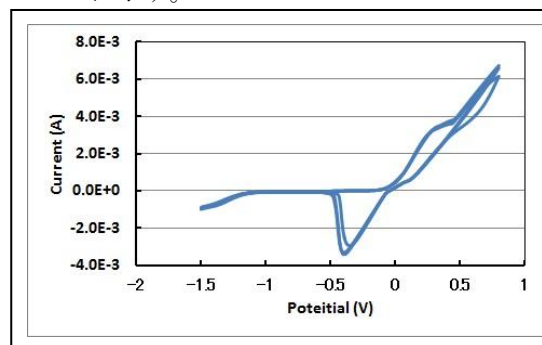


図3 TBS溶液中での銅のサイクリックボルタモグラム

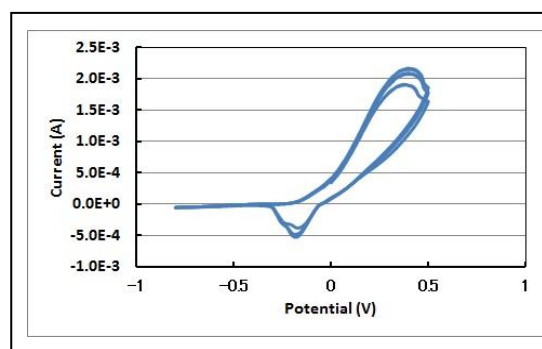


図4 TBSにリシンを添加した溶液中での銅のサイクリックボルタモグラム

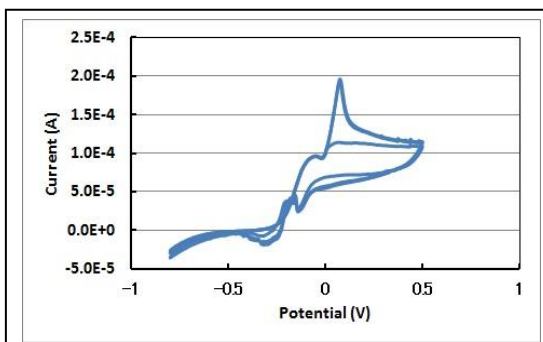


図5 TBS にシステインを添加した溶液中での銅のサイクリックボルタモグラム

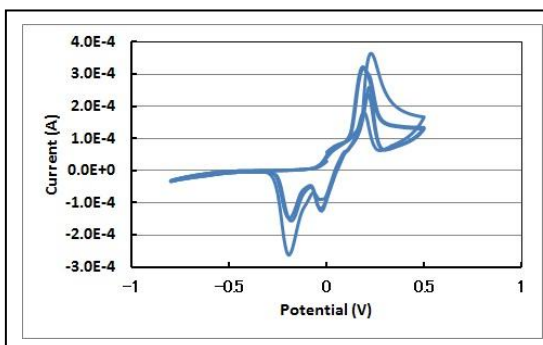


図6 TBS にシステインを添加した溶液中での銀のサイクリックボルタモグラム

② ターフェルプロット

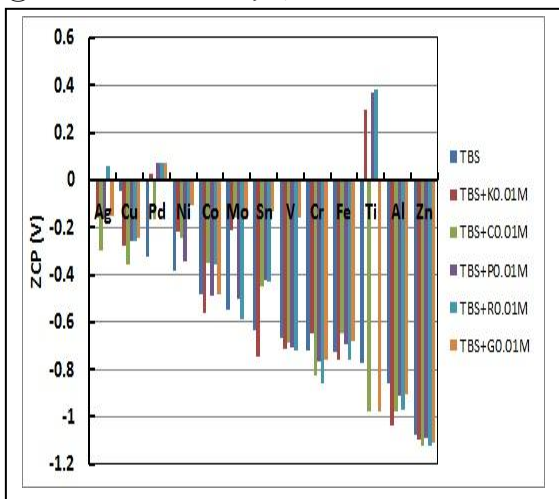


図7 ZPC の結果

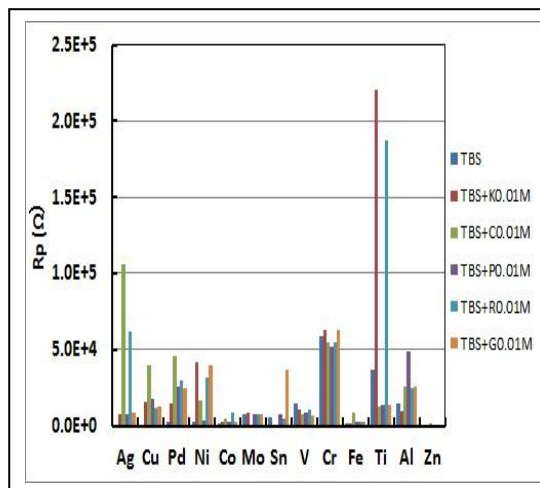


図8 分極抵抗の結果

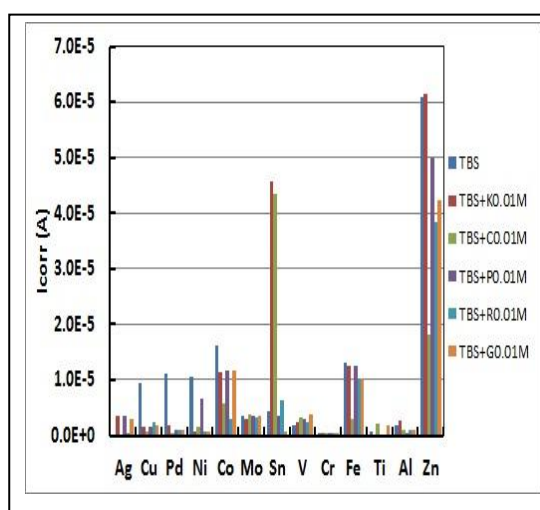


図9 腐食電流の結果

ターフェルプロットから算出した値を図5～7に示した。これらのグラフから反応があったと考えられるアミノ酸と金属の組み合わせが以下のように得られた。

リシン(K) : Ag, Cu, Pd, Ti, Sn,
 システイン(C) : Ag, Cu, Pd, Ni, Sn, Co, Fe,
 プロリン(P) : Ag, Cu, Pd, Al, Ni, Ti, Zn,
 アルギニン(R) : Ag, Cu, Pd, Ni, Co, Ti, グ
 リシン(G) : Ag, Cu, Pd, Ni, Sn.

サイクリックボルタモグラム(CV)から得られたアミノ酸と金属の組み合わせと比較して、重なる組み合わせは反応性があることは確実である。

③ リング電極のサイクリックボルタモグラム(CV)

それら組み合わせについてリング部分をグラッシーカーボンとした RRDE にて対流ボルタンメトリーを行い、リング電極で捕えた化学

種を検討した結果、アミノ酸と反応する純金属の価数は、2または4価で共通点の在ることがわかった。

(3) これまでの成果のまとめ

以上、本研究の結果から金属アレルギーのアレルゲン解析に RRDE を用いた対流ボルタンメトリーの応用は十分有用であると結論することができる。また今まで不明であった金属イオンの生体内での量的関係をサイクリックボルタモグラム(CV)から得ることができることもわかった。

(4) 今後の展望

現在行われている金属アレルギーの治療方法の一つは、パッチテストにより原因金属を探り、その金属を除去することである。しかしパッチテストの結果は、絶対的なものではなく、不確かさを持っている。またもう一つは皮膚科における対症療法である。金属アレルギーによる炎症にはステロイド剤、強い痒みには抗アレルギー剤を処方する。これら治療方法は、アレルゲンがどのような化学種であるかが未知であるための治療方法である。

本研究の成果として得られた特異的に結合するアミノ酸と金属の組み合わせの結果から、そのアミノ酸をより多く含有するタンパク質が金属と結合し、金属アレルギーのアレルゲンとなることが推測できる。そこで、アミノ酸をタンパク質に変えた実験に研究を進めることによって、アレルゲン解明ができる。

金属アレルギーの原因物質としてのアレルゲンの実態が明らかとなり、それが特定ができれば、より効果的な治療方法や治療薬の開発に繋がる。アレルギー症状への治療は、対症療法から根治治療へと移って行くことが期待できる。

また本研究の成果である特定の金属イオンと結合する生体内のタンパク質(アミノ酸)が特定できることは、金属アレルギーの個人差がある理由の解明にも繋がる。測定結果から、1種類の金属イオンが複数のタンパク質と結合するデータが得られることも考えられる。それは特定の金属と結合するアミノ酸を含有するタンパク質が複数存在することが予測されるためである。そして、それはアレルゲンの候補となる物質であり、個人差の原因であると考えられる。

(5) 今後の課題

タンパク質を構成するアミノ酸の種類は

さらに 14 種類あり、それらについても今回と同様の測定を行い、検討をする必要がある。しかし、それらアミノ酸は水溶液中で酸性あるいは塩基性領域で安定のため、金属を用いたボルタンメトリーには液性が大きな影響を及ぼしてしまうことが予想される。今後の課題としては、それら電解質溶液中での測定のための工夫をすることである。

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 洞澤 功子(代表者)、Miroslav Marek、Identification of allergens for metal allergy by hydrodynamic voltammetry. 国際歯科研究学会日本部会 (JADR)、2012 年 12 月 14 日～2012 年 12 月 15 日、新潟市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

洞澤 功子 (HORASAWA NORIKO)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：20165567

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

ミロスラヴ マレック (MIROSLAV MAREK)
ジョージア工科大学・材料工学・教授
研究者番号：なし