

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3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009 - 2011

課題番号：21659442

研究課題名（和文） マウスモデルを用いたレジニアレルギーに関する研究

研究課題名（英文） Studies on resin allergy using murine models

研究代表者

佐々木 啓一 (Sasaki Keiichi)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：30178644

研究成果の概要（和文）：研究当初，私達は resin monomer (RM) の methyl methacrylate (MMA) 歯科用標品を用いた実験で，マウスでのレジニアレルギーモデルに成功したと考えていた。しかし，その後の試薬グレードの MMA を用いた実検では，それを再現できず，“RM は他のアレルゲンによるアレルギーを促進するのではないか？”と考えるに至った。歯科関連の高頻度アレルギーとして金属アレルギーがある。そこで，私達は Ni アレルギーに対する RM のアジュバント効果を検討した。MMA と 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) はいずれも，炎症性であり，マウス Ni アレルギーを促進することを確認した。種々の細菌成分および窒素含有 bisphosphonates (炎症性骨吸収抑制薬) もマウス Ni-アレルギーの成立を促進した。これらの発見は，口腔細菌に加え，炎症性の化学物質も免疫学的アジュバントとして金属アレルギーを促進することを示唆する。

研究成果の概要（英文）：At the start of the project, we were thinking that we had succeed in establishing the murine model of resin allergy by experiments using a preparation of resin monomer methyl methacrylate (MMA) that is clinically used in dentistry. However, in later experiments using a reagent grade of MMA, we could not reproduce it, leading us to speculate that “LM might promote allergies to allergens other than LM”. Metal allergies are dentistry-associated allergies with a high incidence. Thus, we examined the adjuvant effect of RM on Ni-allergy. We found that both MMA and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) are inflammatory and promote Ni allergy in mice. Various microbial substances and nitrogen-containing bisphosphonates (NBPs, anti-bone-resorptive drugs) also promoted Ni allergy. These findings suggest that inflammatory chemicals, as well as oral bacteria, may promote metal allergies as an immunological adjuvant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	0	1,300,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	240,000	3,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：レジン，アレルギー，生体材料，免疫，炎症

1. 研究開始当初の背景

Methacrylates (MA) の重合体であるアクリルレジン¹は工業的応用のみならず、歯学や医学においても広く応用されている。MA に属するレジンモノマー (RM) には methyl MA (MMA), 2-hydroxyethyl MA (HEMA), 2-hydroxypropyl MA (HPMA), ethylene glycol di-MA (EGDMA など) などがある。補綴歯科臨床においては粉末状の MMA ポリマーにモノマーを混和して重合体を得る即時重合レジジンが、テンポラリークラウンの作製や義歯床の修理などに頻繁に応用されている。これらのレジジンの応用に伴い、RM が原因と思われる接触過敏症がしばしば報告されている。とくに歯科医療従事者では、皮膚疾患の 64% は RM に対するアレルギー反応であったとの報告もあり、また、患者での発症も報告されている。爪を化粧するアクリルネイルによるレジンアレルギーも報告されている。しかし、RM のアレルギーとしての強さは、良く知られているハプテンで多くの研究がなされている oxazolone, dinitrochlorobenzene, formaldehyde 等にくらべると極めて弱く、アレルギーを発症し易いモルモットにおいても、RM によるアレルギーの成立には、非現実的とも思われる激しい条件が必要であり。塗布した部位に激しい組織障害をもたらす。このように、RM は強い刺激性をもつが、アレルギーとしての強さは極めて弱く、RM によるアレルギー発症機序に関する研究は、日本のみならず、諸外国においても、足踏み状態である。事実、現時点での研究は、血中単核球の MA に対する apoptosis 感受性を、患者と正常人で比較するなどの、一般的な毒性を探る研究に留まっている。従って、RM (または MA) に対する感作成立の機序や促進因子など、重要な点はほとんど未解明である。これらの問題を解明し、また、有効な予防方法を探るには、再現性の良いマウスモデルを確立し、それを用いた研究が必須と思われる。

本研究の申請当時、私達は市販歯科材料の methyl methacrylate (MMA) を用いた実験により、レジニアレルギーをマウスに発症させることに成功したと考えていた (2008 年歯科基礎医学会発表)。しかし、その後の実験で、試薬 grade の MMA では、アレルギーを再現できなかった。理由として、市販歯科材料に含まれる“MMA 以外のなんらかの物質”が実際のアレルゲンである可能性が予想される。しかし、手がかりは得られず、試行錯誤の結果、“RM には他のアレルゲンによるア

レルギーを促進する効果 (アジュバント作用) もあるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

歯科が関連する頻度の高いアレルギーとして金属アレルギーがある。上記仮説を検証するため、私達は Ni アレルギーに対する RM の効果を検討することにした。

3. 研究の方法

従来の金属アレルギーの動物モデルは、過酷な条件 (激しい炎症を起こすアジュバントの使用と高濃度の Ni) を必要とし、現実を反映する適切なモデルとは言えなかった。私達は細菌の膜に含まれる lipopolysaccharide (LPS) をアジュバントとして使う新しいモデルを確立した (Sato et al., Clin Exp Allergy 2007; 37:743-751)。このモデルでは、温和な条件で低濃度の金属でアレルギーが再現性良く成立し、感染として口腔細菌は日常的な事象であり、上記モデルは現実的な発症条件に基づく reasonable なモデルと考えられる。アレルギーは感作 (sensitization) と発症 (elicitation) の 2 つのステップから成るが、本研究では以下の方法で実験を行った。

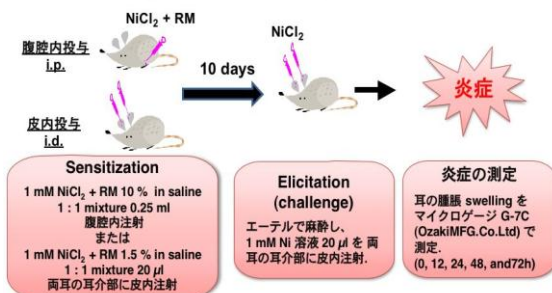
Sensitization のステップでは、低濃度の MMA または HEMA と 1 mM NiCl₂ の等量混合液をマウス腹腔注射 (i.p.) または耳介に皮内注射 (i.d.) した。この 10 日後、耳介に 1 mM NiCl₂ を i.d. することにより elicitation を行ない、耳介の腫脹を経時的に測定した (図)。

方法

マウス : BALB/c ♀ 6 ~ 10 w, n=6

レジンモノマー (RM) : methyl methacrylate (MMA) (>98%)
2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) (99%)
(生理食塩水に溶解)

金属塩溶液 : NiCl₂ (Sigma-Aldrich, 99.9999%) を生理食塩水に溶解。

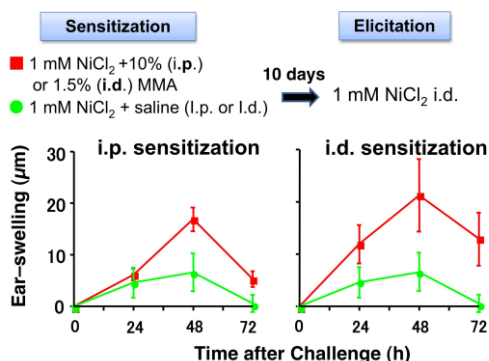


研究成果

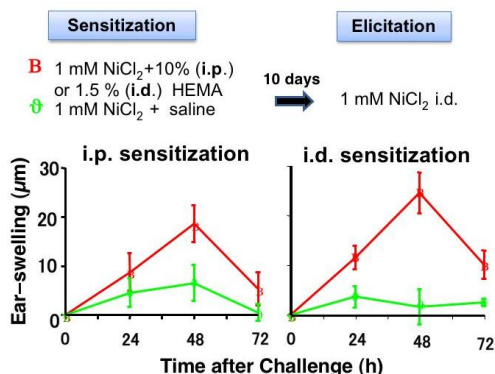
MMA と HEMA はいずれも、炎症性であり、マウス Ni アレルギーを促進することを確認した (MMA と HEMA についての結果を図に示した) (論文投稿準備中)。種々の細菌成分および炎症性骨吸収抑制薬窒素含有 bisphosphonates もマウス Ni-アレルギーの成

立を促進した (論文発表)。これらの発見は、口腔細菌に加え、炎症性の化学物質も免疫学的アジュバントとして金属アレルギーを促進する可能性を示唆し、歯科医も含め、レジンの取り扱いには留意すべき事項と思われる。ちなみに、bisphosphonates による顎骨壊死と露出が現在大きな問題になったおり、その背景としてアレルギー反応の関与も想定される。

MMA のアジュバント効果



HEMA のアジュバント効果



今後の研究

本研究は、当初、レジニアレルギーのマウスモデルを作製し、このモデルを用いてレジニアレルギーを研究することを目的にスタートした。しかし、前述の様に、この目的は達成できず、試行錯誤の結果、RM は他のアレルゲンによるアレルギーのアジュバントになるのでは？ と考えるに至り、上述の発見に至った。アレルギーは感作 (sensitization) と発症 (elicitation) の2つのステップから成るが、今回の研究で、RM は感作ステップで金属 (Ni) アレルギーの成立を促進することが分かった。本萌芽研究での上記の成果を踏まえて、研究の次のステップでは、以下を検討したい。

- (1) RM が LPS と同様に、sensitization step のみならず、elicitation ステップにおいてもアジュバントとして作用するかどうかの検討。もし、そうであれば、RM への接触

が、本当のアレルギーは例えば金属アレルギーであっても、あたかも RM がアレルゲンとしてアレルギーを発症させるかのように見えることになる。レジニアレルギーに対する考え方と対処の仕方が根本から変わることになる。

- (2) RM のアジュバント作用の機序の解明。上述の様に RM には強い炎症惹起作用があり、この作用が RM のアジュバント作用の背景になっていると予想される。Ni アレルギーに対して強いアジュバント効果をもつ LPS も炎症惹起作用があり、サイトカインやヒスタミン合成酵素など、種々の炎症性分子を誘導する作用がある。RM にも同様の作用が予想される。
- (3) 当初の目的であるレジニアレルギーのマウスモデル作製について、さらに条件を検討し、その作製に取り組む。現在、吸入による RM への暴露や繰り返し感作などを考えているが、成功には至っていない。忍耐強い検討が必要と感じている。
- (4) 前述の様に、本研究申請当時、私達は市販歯科材料 RM の MMA を用いた実験で、マウスにアレルギーが起ることを観察した。しかし、試薬 grade の MMA では、アレルギーを再現できなかった。理由として、市販歯科材料に含まれる“MMA 以外のなんらかの物質”が実際のアレルゲンである可能性がある。その可能性の有る物質は RM の重合を予防する為に添加されている安定剤が考えられ、hydroquinone はそのひとつである。市販材料では、hydroquinone またはその関連物質がハプテンとなり、RM がアジュバントになり、アレルギーを起こす可能性がある。マウスでこの可能性を検証する。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Nickel allergy-promoting effects of microbial or inflammatory substances at the sensitization step in mice. Harue Takahashi, Masayuki Kinbara, Naoki Sato, Keiichi Sasaki, Shunji Sugawara, Yasuo Endo. International Immunopharmacol 2011;11:1534-1540. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

1. マウスにおけるレジンモノマーのニッケル (Ni) アレルギー促進効果。坂東加南, 金原正敬, 高橋春江, 米田博行, 佐々木啓二, 山本照子, 菅原俊二, 遠藤康男. 歯科基礎医学会, 2011-9/30-10/2, 岐阜
2. マウスにおける minodronate の骨吸収抑制

作用と炎症・壊死作用:他の bisphosphonates との比較. 木山朋美, 坂東加南, 岡田 諭, 山口晃史, 金 始瑛, 長谷川正和, 佐々木 啓一, 山本照子, 菅原俊二, 遠藤康男. 歯科基礎医学会, 2011-9/30~10/2, 岐阜

- 3 マウスでの金属粉末による金属アレルギーの誘導. 米田博行, 高橋春江, 佐々木 啓一, 菅原俊二, 遠藤康男. 歯科基礎医学会 2009, 9, 11 新潟
4. 窒素含有 bisphosphonate の骨との結合におよぼす etidronate の効果に関する分子イメージング的検討. 山本未央, 横山政宣, 高橋春江, 遠藤康男, 佐々木 啓一. 歯科基礎医学会 2009, 9, 11 新潟

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 啓一 (SASAKI KEIICHI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号 : 30178644

(2)研究分担者

遠藤 康男 (ENDO YASUO)
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師
研究者番号 : 50005039