

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592860

研究課題名(和文) 歯科金属アレルギーの金属動態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the metal dynamics of dental metal allergy

研究代表者

樋口 繁仁 (Shigehito, Higuchi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：10291262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：金属アレルギーは、遅延型アレルギーに分類されている。金属アレルギーの発症には、金属イオンの溶出が必須である。金属イオンはタンパク質に結合すると考えられているものの、その分子機構はよくわかっていない。本研究は、金属アレルギーの原因となる金属イオンの動態を明らかにすることを目的とした。金属イオンの動態を明らかにするために、我々は、ニッケルイオンを可視化することを検討した。我々は、蛍光色素によりニッケルイオンの可視化が可能になり、細胞分析装置、例えば、蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーが利用できるようになった。我々は、ニッケルの細胞内の取り込みを定量的かつ視覚的に解析することができるようになった。

研究成果の概要(英文)：Metal allergy is categorized in the delayed allergy, because the symptoms are developed at least 24 hours after contact with the metal. Elution of metal ion is known to be essential for the development of metal allergy. Although the metal ion might be bound to protein, the molecular mechanism is unknown. Accordingly, the present study is to reveal the dynamics of metal ions that cause allergies of metal. To clarify the kinetics of metal ions, we examined to visualize the nickel ions. We were able to develop the visualization of nickel ion by fluorescent dye. This visualization was realized and cell analyzer such as a fluorescence microscope or flow cytometry will be available. We were able to analyze the nickel at the cellular level uptake quantitatively and visually.

研究分野：歯学

キーワード：アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

歯は自己修復能力が極めて低いため、人工修復材料により保存修復される。人工修復材料として用いられているのが、金属、レジン、セラミックなどである。その中で金属が頻用されており、患者のQOLを満足させてきた。しかし、ごく一部の患者においては金属アレルギーの誘発など問題を抱えている。さらに、ピアスやネックレスなどの装飾品をつける人も増えたことから、金属アレルギーは増加の一途にある(平成19年度の厚生労働省の報告による。)。これまでの研究で、金属アレルギーは金属イオンが生体内タンパクと結合することにより抗原となっておこるIV型アレルギーとして位置づけられているものの、その分子機構はいまだわかっていない。

金属アレルギーは症状が重篤なわけではなく、臨床的には、ステロイド投与により一定の症状の改善がみられるため、世界的に注目されていなかったという背景もあり基礎および臨床面でも研究がすすんでいるとは言えない。

## 2. 研究の目的

申請者は、これまで東北大学病院保存科において、金属アレルギー患者280名の診断および治療にあたってきた。一般的に金属アレルギーは、ニッケル、コバルト、クロムが、三大原因金属として知られている。歯科を受診する患者において特徴的なことは、歯科で広く使用されている、パラジウムにおける患者が多い傾向にあることである。パラジウムは、金銀パラジウム合金として、保険収載されており、日本においては保存治療や、補綴治療の際に一般的に広く用いられている金属である。貴金属に分類され、物性学的には安定であり、金の代替金属として用いられている。しかし、この安全な金属であるパラジウムであってもアレルギーを引き起こすことは、患

者を診察してみても判明した驚きの事実であった。

<患者における感作金属の種類および陽性率>

掌蹠膿疱症・金属感作陽性患者における感作金属および陽性率

金属	患者数	陽性率(%)
Ni	26	57.8
Pt	25	55.6
Pd	18	40.0
Cu	17	37.8
Cr	15	33.3
Zn	12	26.7
Hg	11	24.4
Co	9	20.0
Au	8	17.8
Sn	7	15.6
Mn	4	8.9
Fe	3	6.7
In	1	2.2
Ag	0	0

n=45 重複あり

金属アレルギーは発症するためには必ず金属イオンの溶出が前提になる。しかし、口腔内に使用される金属は、その用途により選択され、多種多様であり、また、その構成濃度についてもばらつきがあり、口腔内といった非常に複雑な環境下で、どの金属の組み合わせの時にどのような金属イオンが溶出しやすいのか、*in vitro* および *in vivo* における腐食機構、特に接触腐食については金属の生体内でのイオン化のメカニズムとして更なる解明が必要である。

したがって本研究は、**アレルギーの原因となる金属イオンの生体内の動態を明らかにすることを目的とした。**

この目的を達するために、

(1) 金属の生体内での溶出機構

(2) 金属イオンの細胞内の挙動  
について研究を展開した。

### 3. 研究の方法

(1) 金属の生体内での溶出機構、イオン化のメカニズム

*in vivo* における金属イオンの溶出を検討した。マウス背部皮下に金属ワイヤーを埋め込み(直径0.8mm,長さ5mm) 経時的にワイヤー周囲の組織を採取して、プラズマ発光法による金属イオン定量解析技術(ICP-AES法)による解析で、金属イオン溶出量を測定した。

(2) 金属イオンの細胞内の挙動

マウスマクロファージ細胞株 RAW cell を用いて、ニッケルイオンの培養細胞における挙動を検討した。RAW cell を RPMI1640+10%FCS 培養液にて細胞培養し、シャーレ底面に RAW cell を接着させた。その後、塩化ニッケル溶液を培養液に加え、24 時間後に、細胞を PBS にて洗浄、細胞外にある塩化ニッケル溶液、ニッケルイオンを洗い流した。シャーレに PBS を 1ml 加えさらにニッケル結合蛍光試薬を加えて細胞を染色した。1 時間後に、過剰な蛍光試薬を洗い流した。RAW cell は、シャーレに接着しているために、トリプシン-EDTA PBS を用いて細胞を遊離させたのち、トリプシンを失活させて細胞を回収した。遠心分離により、細胞を PBS にて洗浄後、この細胞をサンプルとして用いた。

この細胞をフローサイトメトリーおよび、ICP-AES 法による解析で、ニッケルイオンの細胞内の取り込みを測定した。

### 4. 研究成果

(1) 金属の生体内での溶出機構、イオン化のメカニズム

マウス背部皮下に金属ワイヤーを埋め込み(直径0.8mm,長さ5mm) 経時的にワイヤー周囲の組織を採取して、プラズマ発光法

による金属イオン定量解析技術(ICP-AES法)による解析で、*in vivo* 金属イオン溶出量を測定した。ニッケルワイヤーを埋め込み2日後、皮下の内視鏡画像を以下に示す。

<ニッケルワイヤーを埋め込み 2 日後の内視鏡写真データ>



内視鏡画像にみられるように、ニッケルは組織に対する影響が大きく、ワイヤーの2日間の挿入にもかかわらず、ニッケルワイヤー周囲には肉芽組織が観察された。ワイヤー周囲の組織を溶解して、ICP-AES 法により、ニッケルの溶出量を測定した。ICP-AES 法により、組織内へニッケルが溶出していることが観察された。ニッケルは、内視鏡画像でもわかるように、非常に炎症誘導性が高く、炎症およびアレルギーを誘導する一因となっていることが確認された。

(2) 金属イオンの細胞内の挙動

マウスマクロファージ細胞株 RAW cell に、塩化ニッケル溶液存在下で、24 時間培養することにより、ニッケルイオンを細胞内に取り込ませた。ニッケル結合蛍光試薬により、ニッケルを蛍光標識して、フローサイトメトリーで検出可能かについて、検討した。対照として、塩化ニッケル溶液を加えず培養した RAW cell においては、ニッケル結合蛍光試薬を加えたとしても、フローサイトメトリーで検出できず、非特異的結合は起こらないことが確認できた。

塩化ニッケル溶液存在下で、24 時間培養した RAW cell は、ニッケル結合蛍光試薬により染色され、フローサイトメトリーで検出できることが明らかになった。このフローサイトメトリーの結果が正しいことを検証するために、この細胞を、ICP-AES 法によりニッケルイオンの存在を測定した。その結果、塩化ニッケルを加えず培養した細胞群では、ICP-AES 法でもニッケルイオンは検出限界以下であり、検出できなかった。それに対して、塩化ニッケル溶液存在下で培養した細胞群では、ニッケルイオンが確実に検出でき、フローサイトメトリーの蛍光強度に比例して、細胞内ニッケルイオンが検出できた。このことは、ニッケルイオンの可視化に成功したことを意味する。

ニッケルイオンを可視化するためには、イオンと蛍光物質と結合させること、および細胞内にイオンより大型の分子量をもつ蛍光物質を取り込ませることに困難を極めた。しかし、蛍光物質のみならず、ICP-AES 法を用いて検証実験も並行して行ったことが、最終的には効率的に計画を実施することができた要因と考えられた。ニッケルイオンの可視化に成功したことによって、蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーといった細胞分析装置が利用可能となり、細胞レベルでのニッケルの取り込みを、定量的かつ視覚的に解析することが可能となった。

#### 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3件)

Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Nakamura K, Ono M, Nishiya T, Nakamura S, Takeda Y, Dobashi A, Takahashi A, Endo M, Ito A, Ueda K, Sato N, Higuchi S, Kondo T, Hashimoto S, Watanabe M, Watanabe M, Takahashi T, Sasaki K, Nakamura M, Sasazuki T, Narushima T, Suzuki R, Ogasawara K  
NKG2D+ IFN- $\gamma$ + CD8+ T cells are responsible for palladium allergy *PLoS*

*One* 2014 Feb 12;9(2):e86810

橋元 亘、中村恭平、遠藤実里、島田栄理遣、小笠原康悦、中山勝文、佐藤直毅、樋口繁仁。免疫抑制にはたらくドレス NK 細胞の発見。炎症と免疫 21:297-304(2013)

川野光子、遠藤実里、佐藤直毅、樋口繁仁、小笠原康悦「金属アレルギー研究：動物モデルによる免疫学的解析」実験医学 増刊. 31 (17) 2013.

[学会発表](計2件)

小笠原康悦、川野光子、佐藤直毅、樋口繁仁、鈴木隆二 「動物モデルを用いた金属アレルギーの研究」 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2013年11月29日 12月1日 金沢  
小笠原 康悦、川野光子、中村生、遠藤実里、武田裕利、樋口繁仁、鈴木隆二 「金属炎症・アレルギーの免疫学的解析」 日本バイオマテリアル学会東北地域講演会 2013年10月7日 仙台

[その他]

ホームページ等

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/imbio/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

樋口 繁仁 (HIGUCHI, SHIGEHITO)  
東北大学・大学院歯学研究所・非常勤講師  
研究者番号：10291262

##### (2)研究分担者

小笠原 康悦 (OGASAWARA, KOUETSU)  
東北大学・加齢医学研究所・教授  
研究者番号：30323603