

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2012～2015
 課題番号：24593002
 研究課題名(和文) マイクロPIXE法の組織微量元素偏在分析による口腔扁平苔癬病因解明のための研究

 研究課題名(英文) The study of identification of causative metals with PIXE method by directly analyzing trace elements in the oral lichen planus-affected mucous

 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

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、PIXE法により口腔扁平苔癬の原因金属を同定することである。対象は口腔扁平苔癬患者72例(pOLP群)で、このうち臨床的に口腔扁平苔癬様病変患者と診断したのは12例(OLL群)であった。対照は健康人口腔粘膜100例とした。

口腔粘膜含有元素の検出率をみると、非必須元素ではAuとYがpOLP群で有意に高かった。口腔粘膜の非必須元素はpOLP群では検出率は低い含有量は高い傾向であった。また唾液と血清中の元素含有量は、必須元素は唾液より血清が高く、非必須元素は唾液の方が高い傾向であった。OLL群については、非必須元素ではAuが検出率が高く、含有量はAlとTiが高かった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our research is to identify causative metals of oral lichen planus by PIXE method. Subjects were 72 patients with oral lichen planus (pOLP group), and 12 patients with oral lichenoid lesion (OLL group) chosen from pOLP group. The control is elemental data of 100 healthy persons (control group).

As to appearance ratio of elements in oral mucosa, levels of Au and Y were significantly higher in pOLP group than in control group. The contaminating elements in oral mucosa of pOLP group had a lower appearance ratio than the control but each of the contaminating elements was more abundant. Tendencies were seen for contaminating elements to be more abundant in saliva than in serum and for essential elements to be more abundant in serum than in saliva. In OLL group, as to appearance ratio of elements in oral mucosa, the levels of Au were significantly higher and as to the concentration of elements, Al and Ti were more abundant than in control group.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平苔癬 PIXE法 微量元素分析 金属アレルギー 口腔扁平苔癬様病変 OL P OLL

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平苔癬 (oral lichen planus: OLP) は難治性の口腔粘膜の慢性炎症性疾患で、T 細胞の帯状浸潤を特徴とする。その病因については、口腔粘膜基底膜直下の 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。

特に近年は OLP に臨床的にも組織学的にも類似し、上皮性異形成を伴う口腔扁平苔癬様病変 (oral lichenoid lesion: OLL) が注目されている。この OLL の原因として薬剤や歯科用金属アレルギーがあげられ、病変が悪性転化する可能性も示唆されている。

さらに OLP の免疫学的な側面として、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関する新たな知見が得られている。しかし、免疫反応にとって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、研究進展の大きな妨げとなっている。

一方、臨床的には、これまで同疾患の原因金属の検索は、主として皮膚パッチテストや患者リンパ球幼若化反応などにより行われてきたが、これらの検査法には感度や再現性に問題がある。そこで、口腔扁平苔癬患者粘膜から直接原因金属を検出することが試みられてきた。しかし、粘膜に存在する金属元素量はごく微量で、検出には高精度の分析装置が必要である。さらに、口腔粘膜の組織量そのものが少なく、分析法は限られる。

現在、物質に含まれる微量元素分析法には原子吸光分析法、誘導結合プラズマ質量分析法、蛍光 X 線分析法など種々の方法がある。このうち粒子励起 X 線分光法 (Particle Induced X-ray Emission Method: PIXE 法) は、少量の試料から同時に多種類の元素を高精度で検出、定量することができるのが特長であり、生体の微量元素、超微量元素分析に最も適した方法である。しかし、同法には粒子加速器が必要である。一般研究者が微量元素分析用に利用できる加速器は、わが国でも 5 台程度で、ごく限られている。幸い岩手医科大学は、日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンターに近接し、その利用が容易な環境にある。

この仁科記念サイクロトロンセンターの施設を利用して、われわれは 1995 年からそれまで国内外で存在しなかった、口腔粘膜の微量元素分析データの蓄積を行ってきた。これまでの分析の結果、口腔扁平

苔癬病変粘膜からは、亜鉛、銀、パラジウムなどの d-遷移元素が健常粘膜よりも高い含有量と検出率を示し、実際のアレルギー性接触皮膚炎の症例報告の原因金属と一致している。そこで、これらの結果に基づき、従来から行われている病変粘膜の PIXE 分析やマイクロ PIXE 法などを用いて、病変組織中の微量、超微量元素の局在分析を計画した。

2. 研究の目的

口腔粘膜の原因元素を解析して、その局在性を検索することで、口腔扁平苔癬や口腔扁平苔癬様病変の病因を究明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

岩手医科大学歯科医療センター口腔外科を受診し、通常の病理組織学的に診断が得られた OLP 患者のうち、研究主旨の説明と同意を得られた方を対象とした。患者の病変粘膜、血清、唾液を採取し、微量元素分析を行った。さらに、同患者の一部を対象として金属の皮膚パッチテスト、口腔金属修復物のメタルバイオプシーを施行した。また、対照はこれまでわれわれが PIXE 法で分析した健常者の口腔粘膜、血清、唾液 (健常者群) とした。

尚、本研究は岩手医科大学歯学部倫理委員会規定 (承認番号 01096) に従って行った。

(2) 病理学的診断および臨床診断

受診時の患者口腔粘膜病変の病理組織標本を口腔病理医 1 名と口腔外科医 2 名で、再度、病理組織学的に診断した。また、患者の臨床診断は、口腔外科医 3 名による視診を含めた診察により行った。

(3) 各組織の PIXE 分析法

① 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。

② 口腔粘膜組織の細胞を破壊しないように、40°C ホットプレート上で乾燥させた。

③ 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。

④ 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 μ l、内部標準としてインジウム 5 μ 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、血清は硝酸灰化法を行わず、そのまま 1ml あたり 50 μ l の内部標準インジウムを加えて試料とした。

⑤ 4.4 μ m のポリプロピレンフィルムに各試料を 5 μ l 滴下し、十分に乾燥して、サイクロトロンのターゲット (測定用試料)

とした。

⑥小型サイクロトロンから陽子ビームを発生させ、測定用試料に照射し、発生した特性 X 線解析から試料中の元素分析を行った。分析結果は PC を用いて統計処理を行った。

尚、試料作製の各種実験容器には容器自体からの金属流出を最小限にする必要がある。このため測定試料の作製には、通常のプラスチック容器は使用せずにテフロン容器を用いた。

4. 研究成果

(1) 病理診断による OLP 再診断症例

これまで対象としてきた OLP 症例を、再度、口腔病理医、口腔外科医で見直した結果、OLP と再診断した症例は男性 25 例、女性 47 例の合計 72 例であった。今回は、この OLP 再診断例を pOLP 群として分析対象とした。pOLP 群の年齢は 31 歳から 79 歳で、平均は 60.1 歳であった。

(2) 口腔粘膜から検出された元素

口腔粘膜から PIXE 法で検出された必須元素のうち、微量元素はケイ素(Si)、バナジウム(V)、クロム(Cr)、マンガン(Mn)、鉄(Fe)、コバルト(Co)、ニッケル(Ni)、銅(Cu)、亜鉛(Zn)、セレン(Se)、モリブデン(Mo)、スズ(Sn)、ゲルマニウム(Ge)、ヒ素(As)、臭素(Br)、ルビジウム(Rb)、パラジウム(Pd)の 17 種類であった。また、アルミニウム(Al)、チタン(Ti)、ガリウム(Ga)、ストロンチウム(Sr)、ジルコニウム(Zr)、ニオブ(Nb)、銀(Ag)、アンチモン(Sb)、金(Au)、水銀(Hg)、鉛(Pb)、イットリウム(Y)の 12 種類の非必須元素(汚染元素)が検出された。

(3) 健常者群口腔粘膜と pOLP 群口腔粘膜の元素分析比較(検出率)

①必須元素で有意差があったのは Si, Mn, Co, Sn, As であり、いずれも健常者群の方が検出率は高かった。

②非必須元素では Al, Ga, Sb, Au, Hg, Pb, Y の出現頻度に有意差があった。このうち、Au と Y が pOLP 群の方が有意に高い率で検出された(図 1)。

(4) 健常者群口腔粘膜と pOLP 群口腔粘膜の元素分析比較(含有量)

①必須元素で有意差があったのは Cu, Ni, Rb で、どの元素も健常者が有意に含有量が高かった。

②非必須元素では Al, Ti, Ga, Y が有意に高い含有量であった。必須元素と異なり、この 4 元素は pOLP 群の方が高かった。

以上の①、②の結果から、pOLP 群での元素検出率は健常者群に比べ低い、検出された元素の含有量は高い結果であり、これは非必須元素で顕著な傾向であった。

(5) 血清、口腔粘膜、唾液の元素含有量比較

検出元素で 50%以上の検出率でかつ健常者群と pOLP 群の含有量に有意差のあった Cu, Ni, Rb, Al, Ti について、同一患者で血清、

口腔粘膜、唾液を比較すると、いずれも口腔粘膜の含有量が血清、唾液の含有量よりも有意に高かった。血清と唾液を比べると必須元素では血清の方が、非必須元素では唾液の方が含有量が高かった(図 2)。したがって、口腔粘膜に含まれる元素は、必須元素は血清から、非必須元素は唾液から移行する可能性が示唆された。

さらに、マイクロ PIXE 法により、病変組織中の元素局在を研究を試みたが、操作分担時間の関係で、十分なデータが得られず、今後の継続研究課題とした。

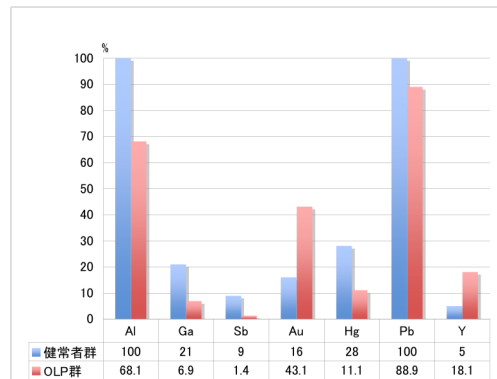


図 1 口腔粘膜微量元素検出率(非必須元素)

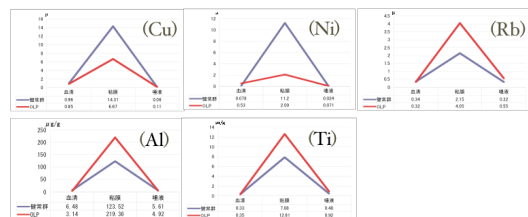


図 2 血清・口腔粘膜・唾液中の微量元素含有量

(6) 生体微量元素分析と臨床データとの比較

金属アレルギーが原因として強く示唆されている OLL 症例を pOLP 群から臨床データにより診断して OLL 群とした。症例の抽出は既往歴、口腔内所見、パッチテストなどを参考にした。尚、現状では OLL の診断は、病理学的に他疾患とは鑑別ができないため、このような臨床診断によった。抽出した症例 12 例の Eisen 分類による臨床視診型は網状・過角化型 3 例、萎縮・紅斑型 2 例、びらん・潰瘍型は 7 例であった。

① OLL 群の口腔粘膜元素分析(検出率)

必須元素では Mn が健常者群が OLL 群よりも高かった。非必須元素では Al, Pb がやはり健常者群が OLL 群よりも検出率が有意に高かった。しかし、非必須元素の Au は OLL 群で 12 例中 8 例が検出され、OLL 群の方が有意に高い検出率であった。

② OLL 群の口腔粘膜元素分析(含有量)

必須元素では Cr, Mn が、非必須元素では Al, Ti が OLL 群で健常者群よりも高い含有量を示していた。

③OLL 群のパッチテスト、メタルバイオプシーと口腔粘膜元素分析の結果

OLL 群 12 例中、金属パッチテストと走査型 X 線分析顕微鏡によるメタルバイオプシーを行ったのは 10 例であった。このうち、パッチテストで陽性であった症例は 10 例中 5 例であった。一般に金属アレルギーは、Co と Ni や Hg と Au のように交叉反応がみられる。これら交叉反応を加味すると、5 例中 3 例でパッチテストの結果と PIXE 分析の検出元素の結果が一致していた。したがって、PIXE 法による口腔粘膜の元素分析は直接的に OLL の原因元素を同定する可能性を示唆していた。しかし今回での研究では、症例数が少ないために、原因金属同定の精度を高めるためには、より症例を増加させる必要があり、この件も継続研究課題であると思われた。

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 1 件)

① S. Iijima, Y. Sugiyama, N. Matsumoto, A. Kumagai, S. Ishibashi and K. Sera, PIXE analysis of trace elements included in oral lichen planus-affected mucosa, International Journal of PIXE, 査読有、25、2016、86-92

[学会発表] (計 5 件)

①S. Iijima, N. Matsumoto, S. Ishibashi and Y. Sugiyama, PIXE Analysis of Trace Elements Included in Oral Lichen Planus-affected Mucosa, 22nd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Oct.27-30, 2015, Australia.

②杉山芳樹、口腔扁平苔癬患者の口腔粘膜元素分析について、第 69 回日本口腔科学会学術集会・ワークショップ 5、2015 年 5 月 15 日、大阪。

③飯島 伸、石橋 修、杉山芳樹、世良耕一郎、口腔扁平苔癬罹患粘膜に含まれる微量元素の PIXE 分析、第 30 回 PIXE シンポジウム、2014 年 10 月 23 日、盛岡。

④飯島 伸、石橋 修、大橋祐生、松本直子、星 秀樹、杉山芳樹、口腔扁平苔癬罹患粘膜に含まれる微量元素の PIXE 分析 (第 2 報)、第 24 回日本口腔内科学会・第 27 回日本口腔診断学会合同学術大会、2014 年 9 月 20 日、福岡。

⑤松尾伸一、星 秀樹、熊谷章子、松本直子、

野宮孝之、西平宗功、南館英明、杉山芳樹、大槌町における口腔粘膜疾患の疫学調査、第 57 回日本口腔外科学会総会、2012 年 10 月 19 日、横浜。

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：00162909

(2) 研究分担者

世良 耕一郎 (Sera, Kouitirou)
岩手医科大学、医学部、教授、
研究者番号：00230855

(3) 連携研究者

飯島 伸 (Iijima Shin)
岩手医科大学、歯学部、助教、
研究者番号：60376754