

## 原 著

## 口腔扁平苔癬罹患粘膜組織に含まれる微量元素の PIXE 分析

飯島 伸<sup>1)</sup>、石橋 修<sup>2)</sup>、原 康文<sup>1)</sup>、世良耕一郎<sup>3)</sup>、武田 泰典<sup>4)</sup>、杉山 芳樹<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 岩手医科大学歯学部口腔顎顔面再建学講座口腔外科学分野

(主任: 杉山 芳樹 教授)

<sup>2)</sup> 八戸赤十字病院 歯科口腔外科

(主任: 石橋 修 部長)

<sup>3)</sup> 岩手医科大学歯学部病理学講座病態解析学分野

(主任: 武田 泰典 教授)

<sup>4)</sup> 岩手医科大学サイクロトロンセンター

(主任: 世良耕一郎 教授)

(受付: 2017年2月14日)

(受理: 2017年5月1日)

## 要 旨

口腔扁平苔癬は口腔外科臨床で遭遇する機会が多い粘膜疾患である。疾患の治療には原因を除去することが重要である。しかし、口腔扁平苔癬は原因が明確でないため、治療が難渋することがある。われわれは、これまでに挙げられている口腔扁平苔癬の病因説のうち、関与が有力とされている金属アレルギーに注目した。アレルギーの発症には、生体が直接的に抗原としての金属を取り込む過程が必要である。そこで、口腔扁平苔癬に罹患した粘膜組織の含有元素を PIXE 法を用いて分析した。そしてこの結果を、これまでにわれわれが報告した健常者口腔粘膜組織の分析結果と比較検討を行い、口

---

PIXE analysis of trace elements included in oral lichen planus-affected mucosal tissue  
Shin Iijima<sup>1)</sup>, Shu Ishibashi<sup>2)</sup>, Yasufumi Hara<sup>1)</sup>, Koichiro Sera<sup>3)</sup>, Yasunori Takeda<sup>4)</sup>, Yoshiki Sugiyama<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Reconstructive Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Yoshiki Sugiyama)

<sup>2)</sup> Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hachinohe Red Cross Hospital

(Chief: Shu Ishibashi)

<sup>3)</sup> Division of Anatomical and cellular Pathology, Department of Pathology, School of Dentistry, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Yasunori Takeda)

<sup>4)</sup> Cyclotron Research Center, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Koichiro Sera)

<sup>1)</sup> 1-3-27, Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

<sup>2)</sup> 2 Nakaakedo, Tamonoki, Hachinohe, Aomori 039-1104, Japan

<sup>3)</sup> 1-3-27, Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

<sup>4)</sup> 348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

<sup>1)</sup> 岩手県盛岡市中央通一丁目 3-27 (〒 020-8505)

<sup>2)</sup> 青森県八戸市大字田面木字中明戸 2 (〒 039-1104)

<sup>3)</sup> 岩手県盛岡市中央通一丁目 3-27 (〒 020-8505)

<sup>4)</sup> 岩手県滝沢市留が森 384-58 (〒 020-0603)

*Dent. J. Iwate Med. Univ.* 42 : 33-44, 2017

腔扁平苔癬の原因金属を特定することを目的とした。

対象は口腔扁平苔癬に罹患した44名で男性16名、女性28名で平均年齢は62.9歳であった。対照は健常者口腔粘膜組織の100名で男性48名、女性52名で平均年齢は31.6歳であった。

その結果、病変部粘膜から検出された微量元素は、必須元素であるSi, Cu, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Se, Mo, Snの12種類で、超微量元素はGe, As, Br, Rb, Pdの5種類であった。また、汚染元素はAl, Ti, Ga, Sr, Zr, Nb, Ag, Sb, Au, Hg, Pb, Yの12種類が検出された。これは、健常者群の粘膜組織から検出されたものと同様であった。検出率、含有量の比較検討では、本来生体には存在しないはずの汚染元素が、OLP群の粘膜組織は健常者群の粘膜組織に比べて検出率は低い含有量では多い傾向を示した。

同一個体から採取した血清、粘膜組織、唾液から検出された元素の種類は三者とも同じであった。

汚染元素が粘膜組織に蓄積し、粘膜上皮の脱落とともに排泄されている可能性も考えられた。

## 緒 言

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、口腔粘膜のレース様白斑と組織学的に上皮直下の粘膜固有層相当部にTリンパ球の帯状浸潤を特徴とする<sup>1)</sup> (図1)。その原因については、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み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<sup>2)</sup>。

特に近年はOLPに臨床的にも組織的にも類似し、上皮異形性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ている<sup>3)</sup>。

さらに、OLPの免疫学的な側面として、発症

については遅延型アレルギーに類似した細胞性免疫反応が関与するという新たな知見が得られている<sup>4)</sup>。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。

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末梢血のリンパ球幼弱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<sup>4,5)</sup>。粘膜組織に存在する金属元素量はごく微量であり、検出には高精度の分析装置が必要である。さらに採取できる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の分析法には、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<sup>6)</sup>。このうち粒子励起X線分光法 (Particle Induced X-ray Emission: PIXE法) は、少量の試料から同時に多種類の元素を高精度に検出、定量する

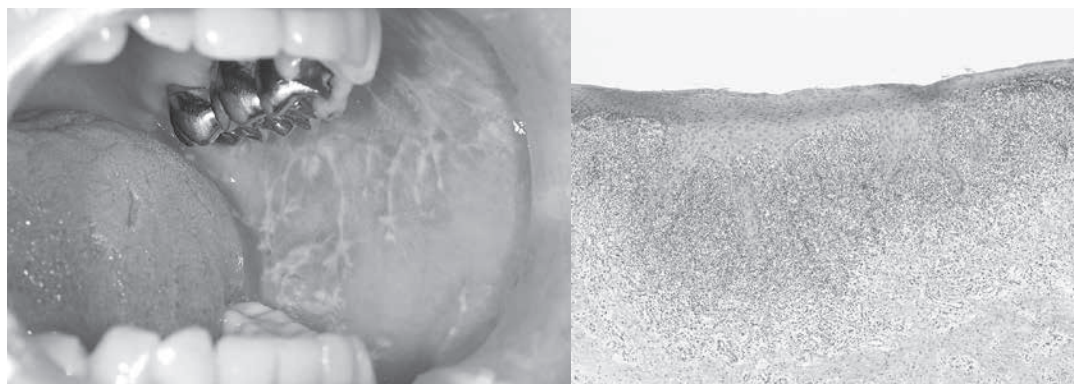


図1. 口腔扁平苔癬罹患粘膜の口腔内写真 (左)、病理組織写真 (右)

頬粘膜にレース様の白斑と発赤を呈する (左)。粘膜上皮直下に帯状のリンパ球浸潤を認める (右)。

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<sup>7,9)</sup>。これまでにわれわれは岩手医科大学がある盛岡市に近接する滝沢市の仁科記念サイクロトロンセンターの小型サイクロトロンを用い、PIXE法で健常者の口腔粘膜組織の微量元素分析データの蓄積を行ってきた<sup>10-12)</sup>。

そこで、本研究では、この健常者の口腔粘膜組織含有元素結果を対照として、口腔扁平苔癬に罹患した粘膜組織の含有元素をPIXE法で分析し、同疾患の原因金属の特定を試みた。さらに、口腔粘膜と同時に同一個体から採取しえた血清、唾液に含有する元素もPIXE法で分析し比較検討した。

## 対 象

平成21年1月から平成24年12月までの期間で岩手医科大学歯科医療センター口腔外科を受診し、臨床診断がOLPの患者60例に研究主旨の説明と同意を得て生検を行った。この60例のうち、病理組織学的にOLPと診断された44例を対象とした(OLP群)。対象の内訳は男性16名、女性28名で性比は4:7であった。(表1) 男性の年齢分布は49歳から88歳で平均年齢は64.8歳、女性の年齢分布は31歳から79歳で平均年齢が61.8歳であった。さらに同意を得ることのできた患者25名から血清と唾液の採取を行った。

比較対照は、これまでに当科で報告した健常口腔粘膜組織100例のデータで、これを健常者群とした。健常者群100例の内訳は男性48名、女性52名で性比は12:13であった。また、男性の年齢分布は12歳から77歳で平均年齢が31.6歳、女性の年齢分布は11歳から76歳で平均年齢が30.7歳であった<sup>10)</sup>。(表1)

表1. 対象および対照

性 別	健常者群(n=100)		OLP群(n=44)	
	男	女	男	女
症例数(名)	48	52	16	28
平均年齢(歳)	31.6	30.7	64.8	61.8
年齢分布(歳)	12 - 77	11 - 76	49 - 88	31 - 79

なお、本研究は岩手医科大学歯学部倫理委員会の承認(01096)の承認を受けて行った。

## 方 法

### 1. 採取方法

#### 1-1. 病変粘膜組織

局所麻酔下に採取したOLP罹患粘膜の生検時の組織の半分を病理組織学的検査に使い、残りの半分を元素分析に使用した。分析に使用する組織は5×5mm大で剪刀にて粘膜下組織を除去した。

#### 1-2. 血液

OLP群44例中、25名(男性10名、女性15名)から病変粘膜組織の採取と同時に血液の採取を行った。肘正中静脈から5mlを採血し、遠心分離器で3,000rpm、10分間で血清成分と血球成分に分離した。分離した血清の1mlを試料とした。

#### 1-3. 唾液

血液を採取した25名と同一の患者から唾液の採取を行った。採取方法は、水道水で含嗽後、数分間安静にした。その後口腔内に貯留する唾液を注射用シリンジで1ml採取し、測定試料とした。

### 2. 元素分析用試料調整法

#### 2-1. 試料洗浄

採取した粘膜組織は、付着している血液の除去を目的に、震盪器上で50mlコニカルチューブ(CORNING社製)を用いて20mlの生理食塩水中で1時間ごとに計2回生理食塩水を交換し、常温で洗浄を行った。(図2a)

#### 2-2. 試料乾燥

洗浄した試料は2mlセラムチューブ(CORNING社製)内に移し、40℃のホットプレート(Nissin社製HOT PLATE NHP245N)上で十分に乾燥した。(図2b)

#### 2-3. 試料調整

乾燥試料は、分析用電子天秤(Sartorius社製BP210S)を用いて重量が5mgとなるように調整した。(図2c)

2-4. 硝酸灰化法<sup>13)</sup>

金属イオン混入を防ぐために専用のテフロン容器（布施製作所製）を用い、5 mg の乾燥試料、硝酸（和光純薬工業株式会社製）200  $\mu$  l、内部標準元素として1,000ppm インジウム（In）標準液（和光純薬工業株式会社製）を5  $\mu$  l 加え、200W の電子レンジで2分間加熱した。その後、1分間自然冷却を行い、再度電子レンジで2分間加熱した。次にテフロン容器をそのままの状態ですら20～25分間自然冷却をした（硝酸灰化法）。クリーンベンチ内で厚さ4  $\mu$  m のポリプロピレンフィルム（東レ株式会社製）に、マイクロペットを用いて硝酸灰化にて液体となった試料の10  $\mu$  l を滴下した。これを十分に自然乾燥を行い測定用のターゲットとした。（図 2d,e）

2.5. 粒子励起X線分光法（PIXE法）<sup>8)</sup>

医療用小型サイクロトロン（SHIMADZ 社製 MCY-1750）から2.9MeV 陽子ビームをターゲットに照射し、発生した特性X線をSi（Li）detector（ORTEC 社 製 SLP-06165-p, SLP-04160-p）からなる two detector system にて検出後、マルチチャンネルアナライザによりスペ

クトルに変換し各元素を検出した。

## 2-6. 試料定性・定量

定性と定量は、パーソナルコンピュータによる Spectrum Analysis Program for PIXE（SAPIX）を用いて行った<sup>14)</sup>。ターゲットは1試料につき3枚作製し、測定値はその平均値とした。PIXE法は定量的測定法であるため、定量しえた元素を検出陽性とした（定性分析）。

3. 唾液・血清の分析<sup>15)</sup>

採取した唾液、血清は、口腔粘膜組織と同様に試料に直接内部標準元素として1,000ppm インジウム（In）標準液を25  $\mu$  l 加え、5分間攪拌後にクリーンベンチ内で厚さ4  $\mu$  m のポリプロピレンフィルムに10  $\mu$  l を滴下し、十分に自然乾燥を行った後、測定用のターゲットとした。

## 4. 統計処理

含有元素の検出率については $\chi^2$ 検定、含有量についてはt-test および Cochran-Cox を用いて統計学的検定を行った。有意水準は $P < 0.05$ とし、被験者から検出されなかった元素は検体数から除外した。

また、PIXE法により検出された元素を、和

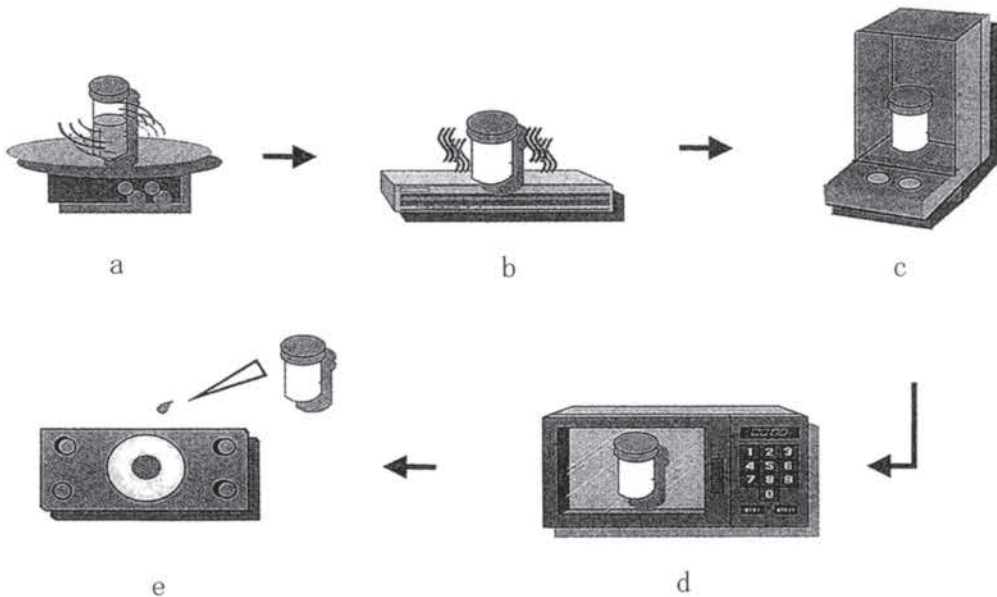


図2. 試料作製法（文献<sup>10)</sup>から改変）

a. 試料洗浄 b. 試料乾燥 c. 試料計量 d. 硝酸灰化 e. ターゲット作製

田<sup>16)</sup>の分類に従い、必須元素と非汚染元素に分類した。生体にとって有利に働き、ある機能に欠くべからざるものを必須元素、それ以外のものを汚染元素（非必須元素）とした。このうち必須元素を体重1kgあたり10g以上のものを多量元素、また、1.0～2.5gのものを少量元素、1～100mgのものを微量元素、1mg以下のものを超微量元素とした<sup>17)</sup>。

## 結 果

### 1. 病変粘膜組織の含有元素

#### 1-1. 病変粘膜組織含有元素の検出率（健常者群との比較）

OLP群、健常者群の口腔粘膜組織から必須元素として、微量元素はSi, Cu, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Se, Mo, Snの12種類が、超微量元素はGe, As, Br, Rb, Pdの5種類の元素が検出された。また、汚染元素はAl, Ti, Ga, Sr, Zr, Nb, Ag, Sb, Au, Hg, Pb, Yの12種類が検出された。各元素の検出率を健常者群とOLP群を

比較すると、必須元素ではSi, V, Mn, Co, SnがOLP群で健常者群よりも有意に低く、汚染元素ではAl, Hg, Pbが有意に低かった。また、OLP群が健常者群より有意に検出率が高かったのはCr, Au, Yであった。本来、生体には存在しない汚染元素が健常者群、OLP群の両群で検出された。（表2-a）

#### 1-2. 病変粘膜組織含有元素の含有量（健常者群との比較）

OLP群、健常者群の口腔粘膜組織の含有元素量の比較を表2-bに示す。含有量はCu, Ni, RbがOLP群の方が健常者群より有意に低かった。一方、Si, Mn, Br, Al, Ti, Ga, Sr, Ag, Yは、OLP群の方が健常者群よりも有意に高かった。含有量では、健常者群よりOLP群の方が高かった元素のうち、Si, Mn, Brを除く元素は汚染元素であった。また、Sb, Pbを除く汚染元素でOLP群が健常者群より高値を示した。本研究では、口腔粘膜組織含有元素についてみると、一般に汚染元素でOLP群の方が検出率は低いが、含有量は健常者群よりも多い傾向を示した。（表2-b）

表2-a. 病変粘膜組織含有元素の検出率（健常者群との比較）

検出元素	健常者群(n=100)	%	OLP群(n=44)	%
Si	94	94	23	52.3 ***
Cu	100	100	44	100
V	12	12	0	0 *
Cr	84	84	43	97.8 *
Mn	93	93	22	50 ***
Fe	97	97	44	100
Co	56	56	14	31.8 **
Ni	83	83	33	75
Zn	100	100	44	100
Se	80	80	36	81.8
Mo	23	23	13	29.5
Sn	21	21	0	0 **
Ge	3	3	1	2.3
As	22	22	4	9.1
Br	96	96	44	100
Rb	96	96	39	88.6
Pd	9	9	3	6.8

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

表2-b. 病変粘膜組織含有元素の含有量（健常者群との比較）

検出元素	健常者群(n=100)	n	OLP群(n=44)	n
Si	121.37 ± 131.93	94	171.60 ± 91.20	23 *
Cu	18.93 ± 26.34	100	6.31 ± 3.93	44 ***
V	2.53 ± 1.09	12	0	0
Cr	4.65 ± 6.85	84	7.01 ± 6.32	43
Mn	1.93 ± 1.37	93	2.60 ± 0.85	22 **
Fe	108.47 ± 78.24	97	116.72 ± 76.60	44
Co	1.83 ± 2.45	56	2.44 ± 1.34	14
Ni	7.86 ± 21.23	83	2.47 ± 2.38	33 *
Zn	66.19 ± 30.41	100	65.57 ± 27.40	44
Se	1.16 ± 1.36	80	1.10 ± 0.43	36
Mo	3.29 ± 5.90	23	4.57 ± 2.68	13
Sn	24.51 ± 30.11	21	0	0
Ge	0.22 ± 0.07	3	2.89	1
As	0.65 ± 0.57	22	1.10 ± 0.33	4
Br	3.20 ± 1.48	96	3.88 ± 1.49	44 *
Rb	5.01 ± 3.49	96	3.77 ± 2.13	39 *
Pd	5.44 ± 7.59	9	6.28 ± 1.29	3

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 (μg/g)

検出元素	健常者群(n=100)	%	OLP群(n=44)	%
Al	100	100	30	68.2 ***
Ti	86	86	36	81.8
Ga	21	21	7	15.9
Sr	46	46	18	40.9
Zr	13	13	2	4.5
Nb	13	13	3	6.8
Ag	17	17	10	22.7
Sb	9	9	0	0
Au	16	16	25	56.8 ***
Hg	28	28	6	13.6 *
Pb	100	100	37	84.1 ***
Y	5	5	12	27.3 ***

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

検出元素	健常者群(n=100)	n	OLP群(n=44)	n
Al	71.52 ± 64.19	100	195.08 ± 152.70	30 ***
Ti	6.11 ± 6.87	86	11.72 ± 7.24	36 ***
Ga	0.68 ± 0.30	21	0.97 ± 0.32	7 *
Sr	0.91 ± 0.46	46	1.58 ± 0.88	18 **
Zr	0.76 ± 0.37	13	7.74 ± 7.01	2
Nb	0.90 ± 0.61	13	2.07 ± 0.91	3
Ag	7.82 ± 7.32	17	18.53 ± 17.94	10 *
Sb	11.46 ± 7.77	9	0	0
Au	3.79 ± 4.19	16	4.25 ± 1.78	25
Hg	1.83 ± 1.39	28	2.64 ± 1.84	6
Pb	5.58 ± 7.10	100	5.47 ± 3.92	37
Y	0.57 ± 0.17	5	1.07 ± 0.35	12 **

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 (μg/g)



2. 血清、唾液の含有元素

2-1. 血清、唾液の含有元素の検出率の比較

同一個体から血清、粘膜組織、唾液を採取しえたのは OLP 群 25 名と健常者群 10 名であった。これら OLP 群と健常者群をあわせた 35 名で血清、唾液の含有元素について検出率を比較検討した結果を表 3-a に示す。

必須元素では Si, Mn, Co, Ni, Rb が、汚染元素では Al, Ti, Au が唾液から有意に高く検出された。必須元素の Fe, Se は血清の方が有意に高く検出された。

粘膜組織の検出率が 50% 以上と高値を示したのは、必須元素では Si, Cu, Cr, Fe, Ni, Zn, Se, Br, Rb であり、汚染元素では Al, Ti, Au, Pb であった。これらの元素についての血清と唾液の比較では、必須元素の検出率は特定の傾向を示さなかった。しかし、汚染元素はすべての元素で血清より唾液での検出率が高い傾向を示した。(表 3-a)

表 3-a. 血清、唾液の含有元素の検出率の比較

Table with 6 columns: 検出元素, 粘膜(n=35)計, %, 血清(n=35) %, 唾液(n=35) %, and a significance column. Rows include Si, Cu, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Se, Mo, Sn, Ge, As, Br, Rb, Pd.

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001; 血清と唾液の含有量の比較

† 粘膜組織の含有量は参考に記した。

血清、唾液の含有元素の検出率の比較(汚染元素)

Table with 6 columns: 検出元素, 粘膜(n=35)計, %, 血清(n=35) %, 唾液(n=35) %, and a significance column. Rows include Al, Ti, Ga, Sr, Zr, Nb, Ag, Sb, Au, Hg, Pb, Y.

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001; 血清と唾液の含有量の比較

† 粘膜組織の含有量は参考に記した。

2-2. 血清、唾液の含有元素の含有量の比較

同一個体から血清、唾液を採取しえた OLP 群 25 名と健常者群 10 名の計 35 名の含有元素について含有量を比較検討した結果を表 3-b に示す。

血清と唾液の比較では、必須元素では Cu, Fe, Se, Br が、汚染元素では Pb が有意に唾液より血清に多く含有されていた。必須元素の Mn が有意に血清より唾液に多く含有されていた。(表 3-b)

2-3. 血清の含有元素についての健常者群と OLP 群の比較

2-3-1. 血清に含有される各元素の検出率

血清に含有する各元素の検出率について健常者群と OLP 群の比較を表 4-a に示す。有意差があったのは汚染元素の Nb で、健常者群から多く検出された。しかし、他の元素の検出率に差はなく、一般に健常者群と OLP 群の血清の含有元素に検出率の差はみられなかった。(表 4-a)

2-3-2. 血清に含有される各元素の含有量

健常者群と OLP 群の血清の含有元素量の比較を表 4-b に示す。含有量については Fe, Zn が健常者群の方が OLP 群より有意に多く含有さ

表 3-b. 血清、唾液の含有元素の含有量の比較

Table with 6 columns: 検出元素, 粘膜(n=35)計, n, 血清(n=35) n, 唾液(n=35) n, and a significance column. Rows include Si, Cu, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Se, Mo, Sn, Ge, As, Br, Rb, Pd.

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001; 血清と唾液の含有量の比較(検定)

† 粘膜組織の含有量は参考に記した。

血清、唾液の含有元素の含有量の比較(汚染元素)

Table with 6 columns: 検出元素, 粘膜(n=35)計, n, 血清(n=35) n, 唾液(n=35) n, and a significance column. Rows include Al, Ti, Ga, Sr, Zr, Nb, Ag, Sb, Au, Hg, Pb, Y.

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001; 血清と唾液の含有量の比較(検定)

† 粘膜組織の含有量は参考に記した。

表 4-a. 健常者群と OLP 群の血清に含有される元素の検出率の比較

検出元素	健常者群(n=10)	%	OLP 群(n=25)	%
Si	4	40	3	12
Cu	10	100	24	96
Cr	2	20	10	40
Mn	3	30	3	12
Fe	10	100	25	100
Co	3	30	2	8
Ni	4	40	3	12
Zn	10	100	25	100
Se	10	100	23	92
Br	10	100	25	100
Rb	2	20	2	8

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

健常者群と OLP 群における血清からの検出元素と検出率の比較 (汚染元素)

検出元素	健常者群(n=10)	%	OLP 群(n=25)	%
Al	5	50	7	28
Ti	3	30	5	20
Ga	3	30	3	12
Sr	4	40	5	20
Nb	4	40	2	8
Ag	1	10	2	8
Au	0	0	3	12
Hg	2	20	1	4
Pb	5	50	14	56
Y	2	20	4	16

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

れていた。一方、Br、Pb は OLP 群の方が健常者群よりも有意に多く含有されていた。なお、Pb は 2 倍以上、OLP 群の方に多く含有されていた。(表 4-b)

表 4-b. 健常者群と OLP 群の血清に含有される元素の含有量の比較

検出元素	健常者群(n=10)	n	OLP 群(n=25)	n
Si	5.90 ± 3.01	4	4.24 ± 0.54	3
Cu	1.11 ± 0.40	10	0.90 ± 0.19	24
Cr	0.09 ± 0.09	2	0.11 ± 0.06	10
Mn	0.06 ± 0.02	3	0.06 ± 0.04	3
Fe	1.50 ± 0.64	10	0.86 ± 0.49	25
Co	0.12 ± 0.13	3	0.21 ± 0.12	2
Ni	0.78 ± 0.01	4	0.39 ± 0.48	3
Zn	0.97 ± 0.22	10	0.75 ± 0.22	25
Se	0.13 ± 0.04	10	0.11 ± 0.04	23
Br	4.60 ± 0.49	10	5.43 ± 1.00	25
Rb	0.34 ± 0.13	2	0.32 ± 0.03	2

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

(μg/g)

健常者群と OLP 群における血清の含有元素量の比較 (汚染元素)

検出元素	健常者群(n=10)	n	OLP 群(n=25)	n
Al	5.66 ± 2.77	5	3.17 ± 0.53	7
Ti	0.33 ± 0.12	3	0.32 ± 0.08	5
Ga	0.061 ± 0.01	3	0.70 ± 0.03	3
Sr	0.085 ± 0.04	4	0.23 ± 0.16	5
Nb	0.085 ± 0.03	4	0.15 ± 0.01	2
Ag	0.046	1	0.61 ± 0.24	2
Au	0	0	0.17 ± 0.07	3
Hg	0.17 ± 0.05	2	0.18	1
Pb	0.19 ± 0.14	5	0.42 ± 0.27	14
Y	0.073 ± 0.01	2	0.07 ± 0.01	4

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

(μg/g)

2-4. 唾液の含有元素の健常者群と OLP 群の比較

2-4-1. 唾液に含有する各元素の検出率

唾液に含有される元素の検出率の比較を表 5-a に示す。唾液に含有される元素の検出率で有意差を認めたのは Cr、Se、Hg で、健常者群の方が OLP 群より有意に高かった。しかし、他の元素の検出率に差はなかった。一般に健常者群と OLP 群の唾液の含有元素に検出率の差は

表 5-a. 健常者群と OLP 群の唾液に含有される元素の検出率の比較

検出元素	健常者群唾液(n=10)	%	OLP 群唾液(n=25)	%
Si	6	60	9	36
Cu	9	90	22	88
Cr	8	80	3	12
Mn	4	40	14	56
Fe	10	100	10	40
Co	5	50	20	80
Ni	5	50	5	20
Zn	10	100	25	100
Se	2	20	2	8
Br	10	100	25	100
Rb	9	90	23	92

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

健常者群と OLP 群における唾液からの検出元素と検出率の比較 (汚染元素)

検出元素	健常者群唾液(n=10)	%	OLP 群唾液(n=25)	%
Al	9	90	23	92
Ti	7	70	13	52
Ga	3	30	3	12
Sr	4	40	8	32
Nb	1	10	1	4
Ag	2	20	7	28
Au	4	40	10	40
Hg	4	40	1	4
Pb	5	50	19	76
Y	0	0	4	16

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

表 5-b. 健常者群と OLP 群の唾液に含有される元素の含有量の比較

検出元素	健常者群(n=10)	n	OLP 群(n=25)	n
Si	19.26 ± 29.36	6	5.96 ± 4.53	9
Cu	0.06 ± 0.042	9	0.1 ± 0.13	22
Cr	0.11 ± 0.18	8	0.28 ± 0.34	3
Mn	0.11 ± 0.076	4	0.098 ± 0.038	14
Fe	0.49 ± 0.51	10	0.1 ± 0.68	10
Co	0.063 ± 0.051	5	0.1 ± 0.11	20
Ni	0.024 ± 0.0076	5	0.083 ± 0.12	5
Zn	2.12 ± 4.35	10	9.5 ± 41.28	25
Se	0.024 ± 0.11	2	0.057 ± 0.051	2
Br	3.36 ± 1.82	10	3.92 ± 1.6	25
Rb	0.3 ± 0.16	9	0.49 ± 0.29	23

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

(μg/g)

健常者群と OLP 群における唾液の含有元素量の比較 (汚染元素)

検出元素	健常者群(n=10)	n	OLP 群(n=25)	n
Al	5.25 ± 2.24	9	4.83 ± 2.25	23
Ti	0.69 ± 0.69	7	0.99 ± 1.59	13
Ga	0.048 ± 0.04	3	0.025 ± 0.38	3
Sr	0.058 ± 0.04	4	0.08 ± 0.056	8
Nb	0.064	1	0.63	1
Ag	0.24 ± 0.086	2	0.4 ± 0.2	7
Au	0.85 ± 0.032	4	0.15 ± 0.11	10
Hg	0.13 ± 0.094	4	0.87	1
Pb	0.066 ± 0.021	5	0.14 ± 0.11	19
Y	0	0	0.054 ± 0.029	4

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

(μg/g)

みられなかった。(表 5-a)

#### 2.4.2. 唾液中に含有する各元素の含有量

健常者群と OLP 群の唾液の含有元素量の比較を表 5-b に示す。含有量では、Rb, Pb が健常者群より OLP 群の方が有意に高かった。血清と同様に Pb は OLP 群の方に 2 倍以上多く含有されていた。(表 5-b)

### 考 察

口腔扁平苔癬は口腔外科領域で診察する機会の比較的多い粘膜疾患である。頬粘膜に多く生じ、臨床的には白色の丘疹からなり、丘疹は播種状に存在し、あるいは癒合して斑状をなす。また、びらんや小水疱を伴うものもあり<sup>1)</sup>、一般に接触痛を伴う。病理組織学的には上皮層の有棘細胞層の肥厚、萎縮あるいは増生や表層の角化亢進を認め、上皮下のリンパ球の帯状浸潤を認める<sup>18)</sup>。この口腔扁平苔癬の原因には金属アレルギー、C 型肝炎ウイルス感染、内分泌異常、精神的ストレス、免疫異常などがあげられている。しかし、口腔扁平苔癬は原因が明確でないため、治療は副腎皮質ステロイド含有軟膏や免疫抑制剤タクロリムスの局所塗布による対症療法が一般的である<sup>2)</sup>。症状が軽減することはあっても治癒に至らないことも多い。

口腔扁平苔癬の原因の 1 つに免疫異常があげられている。金属が抗原となるためにはまず原因元素そのものが体内に取り込まれ、ハプテンとして生体内タンパク質と結合し抗原性を示すと考えられている<sup>5)</sup>。また最近では、体内に取り込まれた金属イオンが生体内で金属ナノ粒子を形成し、これが新たな金属イオンと感作することにより発症する可能性があると考えられている<sup>19)</sup>。

今回、金属分析に用いた PIXE 法は、少量の試料から同時に多数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須で、これが PIXE 法の欠点でもある。一般研究者が微量元素分析用に利用できる加速器はごく限られ、本邦では 18 施設程度である。幸い岩手医科大学は、そのうち

の一つである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の施設に近接し、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、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<sup>10-12)</sup>を行ってきた。そこで本研究ではこの健常者の微量元素分析データを対照に口腔扁平苔癬に罹患した粘膜組織に存在する金属元素を PIXE 法で検出し同疾患の原因を同定することを試みた。また、試料によっては元素番号が隣接する元素の検出の精度が落ちる場合もある<sup>8,9)</sup>が、今回の試料では突出するピークが存在せず、問題なく検出することができた。

生体はすべて元素から成り立っており、生命体は進化の過程で、宇宙や地球に存在するあらゆる元素を取り込み、利用してきた<sup>20)</sup>。それらの元素は、含有量により多量元素、微量元素、超微量元素、汚染元素に分類されている。これらのうち微量元素は酵素や補酵素として生体の構成要素に役立っており、身体の全重量の 0.02% を占めている。また、かつては汚染元素とされていた元素の中で、測定機器の発展により必須性が証明された元素を超微量元素と呼ぶようになった<sup>20)</sup>。生体では多種類の元素が様々な濃度で存在し、一定の元素バランスを保ち、正常な生命機能の維持を行っている。しかし、そのバランスが破綻すると特有の疾病が誘発されるとされている<sup>17)</sup>。

本研究では OLP 群の粘膜組織に含有されている元素について、健常者群の粘膜組織との比較を行い検討した。まず、OLP 群の粘膜組織からは、必須元素として Si, Cu, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Se, Mo, Sn の 12 種類の微量元素と、Ge, As, Br, Rb, Pd の 5 種類の超微量元素が検出された。また、汚染元素は Al, Ti, Ga, Sr, Zr, Nb, Ag, Sb, Au, Hg, Pb, Y の 12 種類が検出された。検出した元素の種類は、健常者群の粘膜組織から検出されたものと同様であった。しかし、それぞれの元素の検出率は一般に OLP 群の方が低い傾向を示した。口腔扁平苔癬の罹患



によって形成されたびらんや潰瘍により上皮とともに脱落した可能性が考えられた。さらに、微量元素の含有量を検討した結果、必須元素のSi, Mn, Br、汚染元素のAl, Ti, Ga, Sr, Ag, YがOLP群の方が健常者群より有意に高かった。

以上の元素のうち、健常者群で汚染元素でありながら検出率が100%であったAlに注目すると、OLP群でのAlの検出率は68.2%と有意に低かった。しかし、含有量はAlが健常者群で71.52  $\mu\text{g/g}$ であったのに対しOLP群では195.08  $\mu\text{g/g}$ と有意に高く、その値は2倍以上であった。同様にTiは検出率では健常者群とOLP群で差がみられなかったが、含有量では健常者群で6.11  $\mu\text{g/g}$ であったのに対しOLP群では11.72  $\mu\text{g/g}$ と有意に高く、約2倍であった。Alは食品にも含まれる元素であり粘膜への暴露の機会も多く、その摂取量は地形的、年代的あるいは食習慣によって異なるが、1日に約10-40mg程度と推察されている。その多くは食品自体、食品添加物、調理器具から由来し、残りは飲料水、埃などから体内に取り込まれる。特にベーキングパウダーなどの食品添加物の寄与が大きいとされている<sup>21-23)</sup>。そして、配位子交換速度が金属イオンの中でAlが最も小さく、タンパク質と結合が強いことから体内に蓄積しやすいと考えられる<sup>21)</sup>。しかし、OLP群の粘膜組織からの検出率が低かった。これについては、OLPがびらんや潰瘍形成時に粘膜上皮の欠損とともにすでにAlが欠落した可能性が考えられる。また、Tiは骨折などの修復のためのプレートや歯科用インプラントなどに使用され、接している骨膜へ流出し蓄積するとの報告がある<sup>24,25)</sup>。しかし、チタンプレートの埋入症例や歯科用インプラント埋入症例は今回の検索対象者にはなかったことから、多くの症例から検出されたのは着色料などの食品添加物や飲料水などの摂取による可能性が高いと思われる。

これまでのわれわれの研究から口腔粘膜組織に種々の元素が含有されていた。この口腔粘膜組織の含有元素の由来については、血流を介して口腔粘膜に蓄積したものと、唾液から口腔粘

膜に蓄積されたものが存在すると推察される。その口腔粘膜組織への到達する経路の検索するためにわれわれは、同一個体から血清、粘膜組織、唾液を採取し分析を行った。

微量元素の吸収は、①消化管による吸収、②呼吸器による吸収、③経皮からの吸収が知られているが、消化管からの吸収が最も重要とされる<sup>17)</sup>。しかし、消化管からの吸収機構についてはほとんど解明されていない。一方、舌下錠などの口腔粘膜から吸収するとされる薬剤には、ヒト口腔粘膜に輸送担体の関与する特殊輸送系が存在するとされている<sup>26)</sup>。これは、直接粘膜から吸収され、粘膜下の毛細血管内に移行する<sup>27)</sup>。微量元素もこのような経路をたどり、粘膜組織を通過し、その際に粘膜に蓄積する可能性があると思われる。実際、これまでに動物実験でNiやCrなどの金属が直接肉内に接触している場合、その金属の口腔粘膜の含有量が多くなるといった報告がある<sup>28)</sup>。

本研究結果では、同一個体から採取した血清、粘膜組織、唾液の比較ではBrを除くすべての元素が血清、唾液より粘膜組織に多く含有されていた。したがって、必須元素も汚染元素も粘膜組織に蓄積している可能性が考えられた。しかし、粘膜組織は乾燥した試料を使用し、血清、唾液は直接的に試料とすることからこれらを比較することは、困難と考えられ、今後検討が必要であると思われた。

さらに同一個体から採取した血清、粘膜組織、唾液に含有元素については、粘膜組織での検出率が50%以上と高く、測定値に信頼性がある必須元素のSi, Cu, Cr, Fe, Co, Ni, Zn, Se, Br, Rb、汚染元素のAl, Ti, Au, Pbについて検討した。その結果、血清と唾液の比較で、必須元素は一定の傾向を示さなかったが、すべての汚染元素は血清より唾液での検出率が高い傾向を示した。これは、唾液が体内の汚染元素を排出している可能性とびらんや潰瘍形成に伴い欠落した汚染元素を含む粘膜上皮が口腔内に停滞し唾液に含まれたことが考えられる。

汚染元素については健常者群、OLP群の両

群の粘膜組織、血清、唾液のすべてから検出されることが本研究で判明した。また、毛髪、爪などからも同じ種類の汚染元素が検出されている<sup>29)</sup>。このことから、体内には少なからず汚染元素が蓄積し、それを排出する機構があるものと考えられる。腸管においての汚染元素の排泄は、①各種の腺からの能動的ないし受動的な分泌、②消化管上皮の脱落による排泄、③胆汁中への排泄の3つがあるとされている<sup>16)</sup>。口腔粘膜も消化管にも同様の機構が存在する可能性が考えられる。今回のわれわれの研究結果では、一般に汚染元素は OLP 群の粘膜組織は健常者群の粘膜組織に比べて検出率は低い含有量は多い傾向を示していた。したがって、口腔粘膜組織に高濃度に蓄積された汚染元素は、OLP の病因になるとともに、体外への排泄にも関与している可能性も考えられた。

本研究結果から、OLP の発症と粘膜組織含有元素との関連は、特定の金属ではなく、それぞれの OLP 群の個体により原因金属が異なる可能性も考えられた。しかし、例数を増やすことにより、原因となる金属の特定が可能と思われる。今後は対象症例数を増やし、さらにパッチテスト陽性となった金属を詳細に分析することで OLP の原因金属の特定につながる可能性があると思われた。

## 結 論

1. 一般に汚染元素は OLP 群の粘膜組織は健常者群の粘膜組織に比べて検出率は低い含有量は多い傾向を示していた。したがって、口腔粘膜組織に高濃度に蓄積された汚染元素は、OLP の病因になるとともに、体外への排泄にも関与している可能性も考えられた。

2. 汚染元素については健常者群、OLP 群の両群の粘膜組織、血清、唾液のすべてから検出されることが本研究で判明した。この汚染元素が蓄積する経路や排泄する経路についての解明にまでは至らなかったが、OLP の病因には何らかの汚染元素の関連する可能性があると思われた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇意なる御指導と御高閲を賜りました山田浩之教授に深甚なる謝意を捧げます。併せて口腔外科学分野医局員各位に心より謝意を表します。本研究は(社)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(NMCC)共同利用に採用され、研究の一部は、NMCC の施設を利用し行った。本研究の遂行に際し、心よく御協力いただき御懇切なご助言を頂きました本学サイクロトロンセンター研究所職員各位に感謝いたします。

本研究の一部は、平成 28 年度文部科学省科学研究費(課題番号 24593002)によるものである。

## 利 益 相 反

本論文に関して開示すべき利益相反状態はない。

## 参 考 文 献

- 1) 石川悟朗：口腔病理学Ⅱ．永末書店，京都，215-219, 1986.
- 2) 白砂兼光，古郷幹彦：第3版 口腔外科学．医歯薬出版，東京，173-174, 2010.
- 3) Issa, Y., Duxbury, A. J., Macfarlane, T. V. and Brunton, P. A. : Oral lichenoid lesions related to dental restorative materials. *British Dental Journal*, 198 : 361-366, 2005.
- 4) 小宮山一雄，伊東大典，神部芳則，菅原由美子，中村誠司，藤林孝司，朔 敬，田中昭男，長谷川博雅，前田初彦：口腔扁平苔癬全国調査に基づいた病態解析および診断基準・治療指針の提案．*日口内誌*，21:49-57, 2015.
- 5) 野村修一，橋本明彦：歯科金属アレルギーの臨床．*新潟歯学会誌*，34 : 1-10, 2004.
- 6) 岡本研作：必須微量元素の測定値をめぐる諸問題．*日本臨床*，54 : 186-191, 1996 .
- 7) 岩田吉弘：粒子励起 X 線分光法．*日本臨床*，54 : 221-227, 1996.
- 8) Sera, K., Yanagisawa, T., Tsunoda, H., Futatsugawa, S., Hatakeyama, S., Suzuki, S. and Orihara, H. : The Takizawa PIXE facility combined with a baby cyclotron for positron nuclear medicine. *Int. J. PIXE*, 2:47-55, 1992.
- 9) Sera, K., Yanagisawa, T., Tsunoda, H., Futatsugawa, S., Hatakeyama, S., Saitoh, Y., Suzuki, S. and Orihara, H. : Bio-PIXE at the Takizawa facility. *Int. J. PIXE*, 2 : 325-330, 1992.
- 10) 石橋 修，杉山芳樹，中村ますみ，関山三郎：口腔粘膜の微量元素分析．*岩医大歯誌*，28 : 76-84,

- 2003.
- 11) 石橋 修：粒子励起 X 線分光法による口腔粘膜の元素分析. 日口粘膜誌, 4 : 91-100, 1998.
  - 12) 石橋 修：口腔粘膜疾患と歯科用重金属. RA-DIOISOTOPES 50 : 12-21, 2001.
  - 13) Futatsugawa, S., Hatakeyama, S., Saitou, Y. and Sera, K. : Present status of NMCC and sample preparation method for bio-samples. Int. J. PIXE, 3 : 319-328, 1993.
  - 14) Sera, K. and Futatsugawa, S. : Personal Computer Aided Data Handling and Analysis for PIXE. Nucl Instr and Meth in Phys Res B, 109/110 : 99-104, 1996.
  - 15) 伊東じゅん, ニツ川章二, 齊藤義弘：PIXE 分析のための液体・固体試料調整法の確認. NMCC 共同利用研究成果報文集, 11 : 187-193, 2003.
  - 16) 和田 攻：金属とヒト, 金属とヒト-エコトキシコロジーと臨床-. 9-19, 朝倉書店, 東京, 1992.
  - 17) 荒川泰昭：生体機能を維持する微量元素. 日本臨床, 74 : 1058-1065, 2016.
  - 18) 高木 實 監修：口腔病理アトラス. 文光堂, 東京, 147-148, 2002.
  - 19) Hirai, T., Yoshioka, Y., Izumi, N., Ichihasi, K., Handa, T., Nishijima, N., Uemura, E., Sagami, K., Takahashi, H., Yamaguchi, M., Nagano, K., Mukai, Y., Kamada, H., Tsunoda, S., Ishii, K., Higashisaka, K. and Tsutsumi, Y. : Metal nanoparticles in the presence of lipopolysaccharides trigger the onset of metal allergy in mice. Nature Nanotechnology, 11 : 808-816, 2016.
  - 20) 山田裕道、小川秀興：皮膚疾患と必須微量元素. 日本臨床, 54 : 99-105, 1996.
  - 21) 川原正博：アルミニウムと神経疾患. 日本臨床, 74 : 1176-1185, 2016.
  - 22) Iijima, S., Sugiyama, Y., Matsumoto, N., Kumagai, A., Ishibashi, S. and Sera, K. : PIXE analysis of trace elements included in oral lichen planus-affected mucosa. Int. J. PIXE, 25 : 85-92, 2015.
  - 23) Sugiyama, Y., Ishibashi, S., Sekiyama, S., Sera, K. and Futatsugawa, S. : Trace Elements of the Oral Mucosa of 22 patient with Oral Lichen Planus by the PIXE Method. Int. J. PIXE, 12 : 159-166, 2002.
  - 24) Uo, M., Asakura, K., Yokoyama, A., Tamura, K., Totsuka, Y., Akasaka, T. and Watari, F. : Analysis of Titanium Dental Implants Surrounding Soft Tissue using X-ray Absorption Fine Structure (XAFS) . Chemistry Letters, 34 : 776-777, 2005.
  - 25) Sugiyama, Y., Ishibashi, S., Sekiyama, S., Sera, K. and Futatsugawa, S. : Analysis of Elements in The Soft Tissue Covering Titanium Plates and Screws for Internal Bone Fixation by The PIXE Method. Int. J. PIXE, 9 : 305-313, 1999.
  - 26) 黒崎勇二, 木村聰城郎：薬物の口腔粘膜からの吸収. 医学のあゆみ, 145 : 468-470, 1988.
  - 27) 下山直人：粘膜からの吸収剤：坐剤、口腔粘膜、鼻粘膜からの吸収製剤. 麻酔, 64 : 1160-1165, 2015.
  - 28) Imamura, T., Kanno, Z., Imai, H., Sugiyama, T., Wada, T., Yoshida, M., Sakama, M., Ono, T., Honda, E. and Uo, M. : Infiltration of trace metal ions in the oral mucosa of a rat analyzed using SR-XRF, XAFS, and ICP-MS. Dent Mater J, 34 : 814-821, 2015.
  - 29) 山田知美, 高辻俊宏, 後藤祥子, 世良耕一郎, 中村 剛, 野瀬善明：PIXE 分析による毛髪ミネラル量とアトピー性皮膚炎発症との関連調査. NMCC 共同利用研究成果報文集, 19 : 76-86, 2012.

## PIXE analysis of trace elements included in oral lichen planus-affected mucosal tissue

Shin Iijima<sup>1)</sup>, Shu Ishibashi<sup>2)</sup>, Yasufumi Hara<sup>1)</sup>, Koichiro Sera<sup>3)</sup>, Yasunori Takeda<sup>4)</sup>,  
Yoshiki Sugiyama<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Reconstructive Oral and Maxillofacial Surgery,  
School of Dentistry, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Yoshiki Sugiyama)

<sup>2)</sup> Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hachinohe Red Cross Hospital

(Chief: Shu Ishibashi)

<sup>3)</sup> Division of Anatomical and cellular Pathology, Department of Pathology, School of Dentistry, Iwate Medical  
University

(Chief: Prof. Yasunori Takeda)

<sup>4)</sup> Cyclotron Research Center, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Koichiro Sera)

[Received : February 14, 2017 : Accepted : May 1, 2017]

**Abstract** : The purpose of our research is to identify causative metals by using Pertilce Induced X-ray Emission (PIXE) to directly analyze trace elements in the oral mucosal tissue affected by oral lichen planus (OLP) . The subjects were 44 patients with OLP, and the patients were 16 males and 28 females, with a mean age of 62.9. The control was an elemental analysis by PIXE of the oral mucosa of 100 healthy persons.

Seventeen essential elements—Si, Cu, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Se, Mo, Sn, Ge, As, Br, Rb, and Pd—were detected. Twelve contaminating elements were also detected—Al, Ti, Ga, Sr, Zr, Nb, Ag, Sb, Au, Hg, Pb, and Y. These findings were similar to those of mucosal tissue from healthy individuals. A comparison of detection rates and abundance showed that the mucosal tissue of the OLP group tended to have lower detection rates but a higher abundance of contaminating elements that should not exist in the body than the mucosal tissue of healthy individuals.

Additionally, the types of elements detected from serum, mucosal tissue, and saliva collected from the same individual were identical.

It is possible that contaminating elements accumulate in the mucosal tissue and are excreted along with the shedding of the mucosal epithelium.

**Key words** : oral lichen planus, pixe, trace element, oral mucosa