

表 題 微量元素元素が口腔扁平苔癬などの口腔粘膜疾患に及ぼす影響と  
診断基準の新規確立に関する研究

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 杉山 知子

担当指導教員氏名 森 良之 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系  
消化器疾患学  
歯科口腔外科学

2016 年 1 月 8 日申請の学位論文

# 目次

第一章 緒論 .....	1
1. はじめに .....	1
2. 微量元素分析法 .....	2
2-1 物質へ照射した X 線の作用 .....	2
2-2 X 線吸収微細構造解析 (X-ray absorption fine structure; XAFS) .....	2
2-3 蛍光 X 線分析法 (X-ray fluorescence analysis; XRF) .....	3
2-4 放射光蛍光 X 線分析法 (Synchrotron radiation excited X-ray fluorescence analysis; SR-XRF) .....	4
2-5 粒子線励起 X 線分析 (Particle induced X-ray emission; PIXE) .....	4
2-6 元素分布分析法 .....	5
3. 本研究の目的 .....	6
Figure .....	7
第二章 口腔粘膜疾患における金属元素分布に関する研究 .....	13
1. はじめに .....	13
2. 方法 .....	16
2-1 試料 .....	16
2-2 元素分布分析 .....	16
3. 結果 .....	16
4. 考察 .....	20
5. まとめ .....	25
6. 参考文献 .....	26
Table, Figure .....	31
第三章 口腔粘膜疾患における金属元素分布に関する研究 .....	50
1. はじめに .....	50
2. 方法 .....	50
2-1 ベースレジンモノマーの調整 .....	50

2-2 フィルム状濃度換算試料の作製と検量線の作製 .....	51
3. 結果と考察 .....	51
4. 応用例 —口腔粘膜疾患組織中から検出された合金成分の定量評価— ...	52
5. まとめ .....	53
6. 参考文献 .....	53
Table, Figure .....	54
 第四章 新規金属アレルギーパッチテストの開発に関する研究.....	58
1. はじめに.....	58
2. 方法 .....	59
2-1 Ni ナノボール懸濁液の調整および Ni イオン放出能に関する <i>in vitro</i> 研究.....	59
2-2 マウス皮膚への Ni イオン拡散分布に関する <i>in vivo</i> 研究 .....	59
2-3 元素分布分析および化学状態分析, Ni 濃度換算評価.....	60
3. 結果と考察 .....	60
3-1 Ni イオン放出能に関する <i>in vitro</i> 研究 .....	61
3-2 マウス皮膚への Ni イオン分布に関する <i>in vivo</i> 研究 .....	61
4. まとめ .....	63
5. Abbreviations .....	63
6. 参考文献 .....	63
Table, Figure .....	67
 第 5 章 結語.....	75
 第 6 章 謝辞 .....	77

# 第一章 緒論

## 1. はじめに

我々の世界は様々な金属で溢れている。衣類やアクセサリに使用される金属、整形外科（人工股関節）や脳外科（動脈瘤コイル）、心臓血管外科（血管ステント）、口腔外科（インプラント）などの医療現場で生体材料として使用される金属、抗がん剤の Pt 製剤や躁病治療薬の Li 製剤など治療薬として使用される金属、そして味蕾の新陳代謝に関与する Zn や血液を介して体内への酸素運搬に関与する Fe のように生体に元来含有されている金属。金属元素は我々の生活、ヒト生体の維持に大きく関わっている。しかし、金属が原因で発症するとされる疾患に我々はしばしば遭遇する。金属アレルギーやある種類の口腔粘膜疾患などである。金属が原因と疑われる病態組織中の元素分析や病態との関連を研究した報告は少なく、金属の体内での挙動を調べることは大きな意味を持つはずである。また、金属アレルギーの診断には金属アレルギーパッチテストが使用されている一方で、この検査法が有する低信頼性の問題はかねてより指摘されている。実際に信頼性が低くなる原因を皮膚貼付部での金属イオンの挙動の観点より調査した報告はない。

通常、診断目的に採取されたヒト試料は、パラフィン包埋されたブロック状のものであり、その量は決して多くはない。しかし、体内での金属動態を調べるためにはこのパラフィン包埋試料を使用せざるを得ない。従来の微量元素分析法というと、誘導結合プラズマ発光分析（Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry; ICP-AES）、ICP 質量分析（ICP- mass spectrometry; ICP-MS）がその代表であったが、これらの手法は溶媒に試料を溶かさなくてはならないため、元々低濃度であった微量元素がさらに希釈されてしまうという問題を抱える。

また金属が及ぼす病態形成との関係を検索するためには病理組織像と同じ視野で金属元素分布を得る必要があり、この点においても従来法は適していないと言える。そこで、試料非破壊かつ高感度の微量元素分析法の導入が必要であった。これを可能にするのが放射光蛍光 X 線分析 (SR-XRF)、粒子線励起 X 線分析 (PIXE)、X 線吸収微細構造解析 (XAFS) と呼ばれる手法である。

## 2. 微量元素分析法

### 2-1 物質へ照射した X 線的作用

X 線を物質に照射した場合にどのような作用を示すかをまとめたのが Figure 1-1 である。物質に照射された X 線の一部は、物質により吸収され、残りは透過する。吸収された X 線のさらに一部によって、原子の中の電子がはじき飛ばされると光電子が飛び出す（これを光電効果という）。光電子を失った原子はイオン化し不安定な状態（これを励起状態という）となるが、蛍光 X 線もしくはオーグメント電子を発生させることで安定化するのである。蛍光 X 線が発生する仕組みは後述することとし、本研究で使用する手法は蛍光 X 線および、X 線の「吸収」効果を利用した分析法である。

### 2-2 X 線吸収微細構造解析 (X-ray absorption fine structure; XAFS)

蛍光 X 線を発生させるためには、X 線が物質に吸収されなくてはならない。あるエネルギーの X 線が厚み  $t$  の物質を透過する場合、入射 X 線の強度： $I_0$ 、透過 X 線の強度： $I$  の関係から表される吸光度  $A$  は「 $A = \ln I_0/I = \mu t$ 」（ $\mu$ ：X 線吸収係数）となる。X 線の吸収が大きいほど吸光度は増加するということである。入射エネルギーに応じての吸光度変化を示したスペクトルの模式図を Figure 1-2 に示す。I の領域ではエネルギーの増加と共に吸光度は減少していくが、これは電

子構造における K 核の電子をはじき飛ばすためのエネルギーが足りていないことを意味する。続いて、II の領域では吸光度が急激に増加し、このエネルギー値を「吸収端」と呼ぶ。これは電子構造における K 殻の電子をはじき飛ばすことが可能なエネルギー値であることを意味する。つまり X 線を吸収したことで得られるエネルギーを電子をはじき飛ばす力に変換して使うのである。この電子がはじき飛ばされる現象こそが光電効果であり、その結果として発生するのが蛍光 X 線である。

この吸収端付近に見られる固有の構造から対象元素の化学状態や近傍構造を解析する分析手法が X 線吸収微細構造解析 (X-ray absorption fine structure; XAFS) である。XAFS はそのエネルギーの領域によって X 線吸収端近傍構造 (X-ray absorption near edge structure; XANES), X 線広域微細構造 (Extended X-ray absorption fine structure; EXAFS) に分類される (Figure 1-3)。XANES は吸収端付近の 50eV 程度の狭い領域に認められる構造で、元素の価数や、元素がどのような化学構造であるのかを知ることができる。EXAFS は XANES 領域よりも高エネルギー側で、吸収端 50eV から 1000eV 程度までの広域領域に認められる構造であり、元素の距離や数など原子レベルでの構造を知ることができる。今回、我々の研究では XANES を用いて、検出元素の化学状態解析を行った。

### 2-3 蛍光 X 線分析法 (X-ray fluorescence analysis; XRF)

X 線の吸収により獲得したエネルギーが原子殻内の電子をはじき飛ばすことで発生するのが蛍光 X 線であることは前節で述べた通りであるが、さらに詳しく述べたのが Figure 1-4 である。ある原子が X 線を吸収することで得たエネルギーを使って K 殻にある電子をはじき飛ばすと (このはじき飛ばされた電子を

光電子という), はじき飛ばされた領域は空孔となり原子としては不安定な状態となる。原子は安定化をはかるために, 外側の領域から電子を K 殻の空孔領域に落とす。電子構造内のエネルギーは外側の殻ほど大きくなる。つまり, L 殻軌道内の電子が, それより小さいエネルギーの K 殻軌道内へ落ちてくる際に発生する余分なエネルギーが X 線として放出される。これが蛍光 X 線である。K 殻や L 殻, M 殻のエネルギーの差は同一元素であるならば同一値であるため, 蛍光 X 線エネルギー値より, どの元素が存在しているのかを知ることが可能となる。

#### **2-4 放射光蛍光 X 線分析法 (Synchrotron radiation excited X-ray fluorescence analysis; SR-XRF)**

放射光とは, 光の速度に近い電子が磁場で曲げられる際に発生する極めて指向性 (輝度性) の高い光である (Figure 1-5)。XRF 法は, 励起源である白色 X 線が放つ散乱により試料内の微量元素の小さなピークがバックグラウンドに隠れて検出が困難となってしまう。そこで, この白色 X 線を分光し単色化することにより入射光の散乱の影響を除外し, 検出元素の小さなピークがバックグラウンドに隠れてしまうことを回避できるようになる。しかし, 入射光を分光することにより光強度は弱くなってしまう。そこで, 「放射光」という極めて強力な線源を使用することで, 分光後も高い光強度を維持することが可能となる。我々はこの SR-XRF 法により, 生体試料内の極めて微量な元素の検出測定を行ったのである。

#### **2-5 粒子線励起 X 線分析 (Particle induced X-ray emission; PIXE)**

粒子線励起 X 線分析法とは, 加速器で数 MeV に加速したプロトン等の荷電

粒子が試料に衝突した際に発生・放出される特性 X 線を分析する手法である。試料への照射線源が異なるが, X 線を照射して蛍光 X 線を発生させる XRF 法と同一の手法と考えてよい。マイクロビームを用いた 2 次元解析手法はマイクロ PIXE と呼ばれ, これは高感度かつ空間分解能に優れた手法であり, 様々な研究用途に近年使用されるようになっている。

## 2-6 元素分布分析法

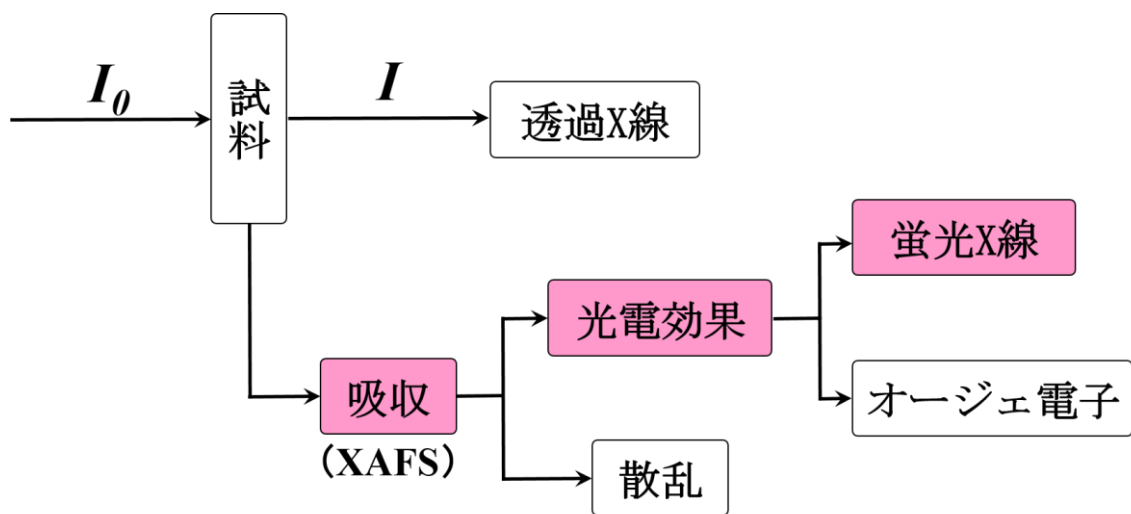
実際の元素分布分析法について Figure 1-6 に示す。X 線 (SR-XRF 法) や粒子線 (PIXE 法) を試料に照射すると, 試料内の各元素はそのエネルギーを吸収し, 各元素に特有のエネルギー値である蛍光 X 線や特性 X 線を発生する。この蛍光 X 線や特性 X 線のエネルギー値から観察部位にどの元素がどれだけ存在しているのかを把握することが可能となる。更に試料台を X-Y 方向へ 2 次元に駆動させることで各点における蛍光 X 線や特性 X 線を測定できる。そして, 各元素の試料内での濃淡つまり元素分布像が得られる。

SR-XRF はビームラインによって得意とするエネルギー領域に幅があり (元素種がビームラインにより制限される), また, 最小でも数  $\mu\text{m}$  までの集束しか許されないのに対し, マイクロ PIXE は多元素を同時に測定することが可能であり, かつビーム径を最小  $0.2 \mu\text{m}$  程度にまで集束できるため, 極めて微小領域の分析が可能となる。一方, SR-XRF は  $20\sim 30 \text{ mm}$  程度の領域に対しての測定が可能であり, かつ高輝度線源により極めて高感度な微量元素検出が可能であるのに対し, マイクロ PIXE の視野は最大でも  $2\times 2 \text{ mm}$  であり, SR-XRF に比べて感度は低い。SR-XRF や PIXE にはそれぞれの共通点/相違点, 長所/短所を有しているため, 試料の分析に際しては相補的に利用することが望まれる。



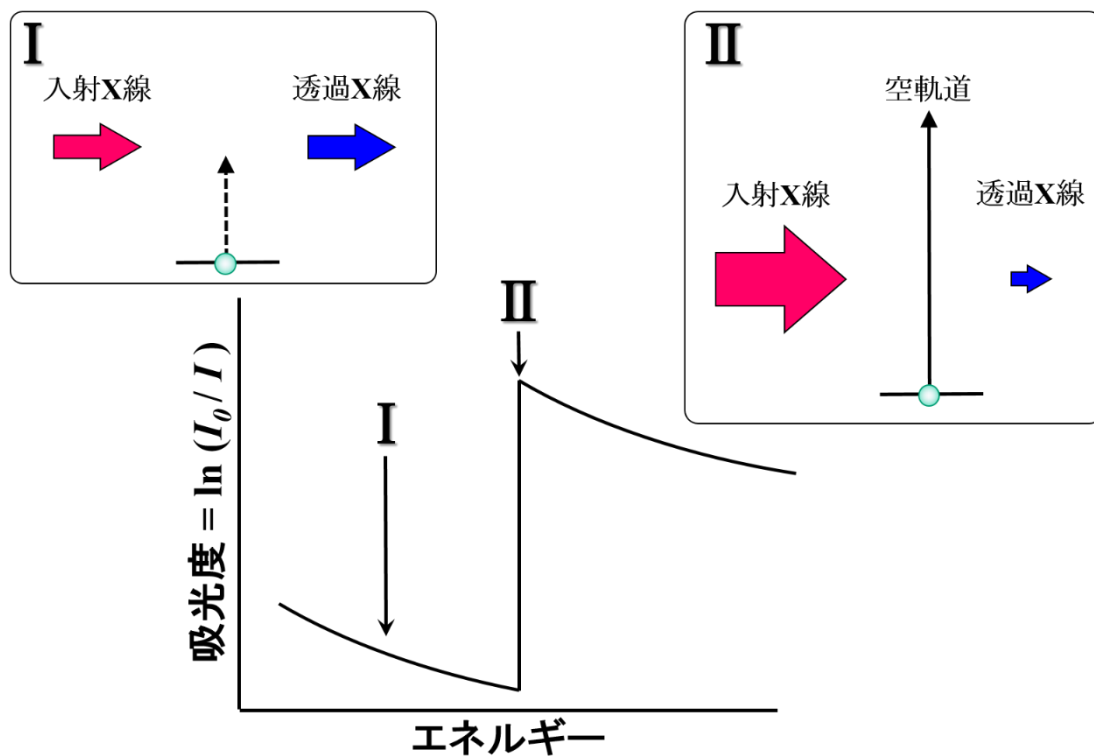
### 3. 本研究の目的

本研究の目的は SR-XRF や PIXE, XAFS という医学領域では稀な高感度分析手法を用いて, 組織診断用のパラフィン包埋試料に含まれる元素の検出や分布分析, 化学状態分析を行うことにより, 金属元素と口腔粘膜疾患の病態形成との因果関係を明らかにすることである. 同時に信頼性の高い金属アレルギーパッチテストの開発も併せて目的とする.



**Figure 1-1** 照射 X 線と物質との相互作用

強度  $I_0$  の X 線を試料に照射した場合，一部の X 線が試料に吸収されて強度  $I$  の X 線が試料を透過する．吸収された X 線が物質を構成する原子内の電子をはじき飛ばすと光電子が飛び出す（これを光電効果という）．光電子を失った原子は不安定な状態となるが，蛍光 X 線やオージェ電子を発生させることで安定化する．

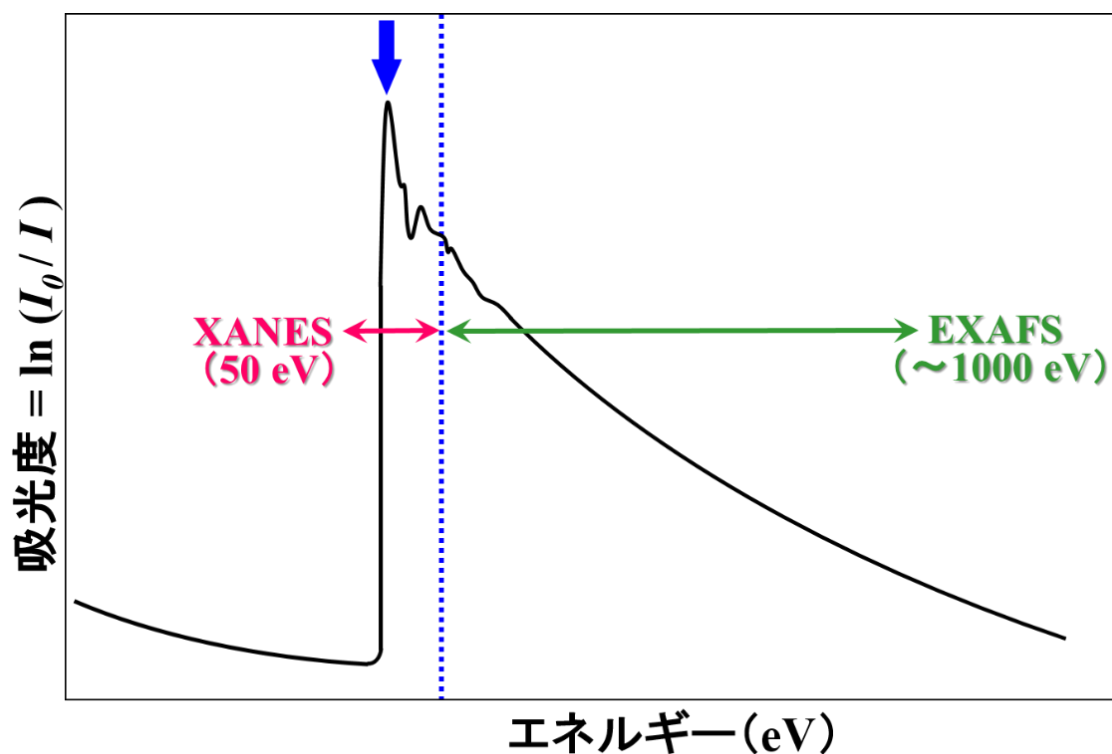


**Figure 1-2 X線吸収スペクトル (K吸収端付近)**

入射 X 線と透過 X 線の強度比のことを吸光度という。物質（物質を構成する原子）が X 線を吸収すると吸光度は増加する。

I の領域ではエネルギーが増加するにつれて吸光度は減少している。これは電子構造における K 核の電子をはじき飛ばすのに十分なエネルギーではないことを意味する。II の領域では吸光度が急激に増加し、このエネルギー値を吸収端と呼ぶ。これは電子構造における K 殻の電子をはじき飛ばすことが可能であるエネルギー値であることを意味する。つまり X 線を吸収したことで得られるエネルギーを電子をはじき飛ばす力として使う。

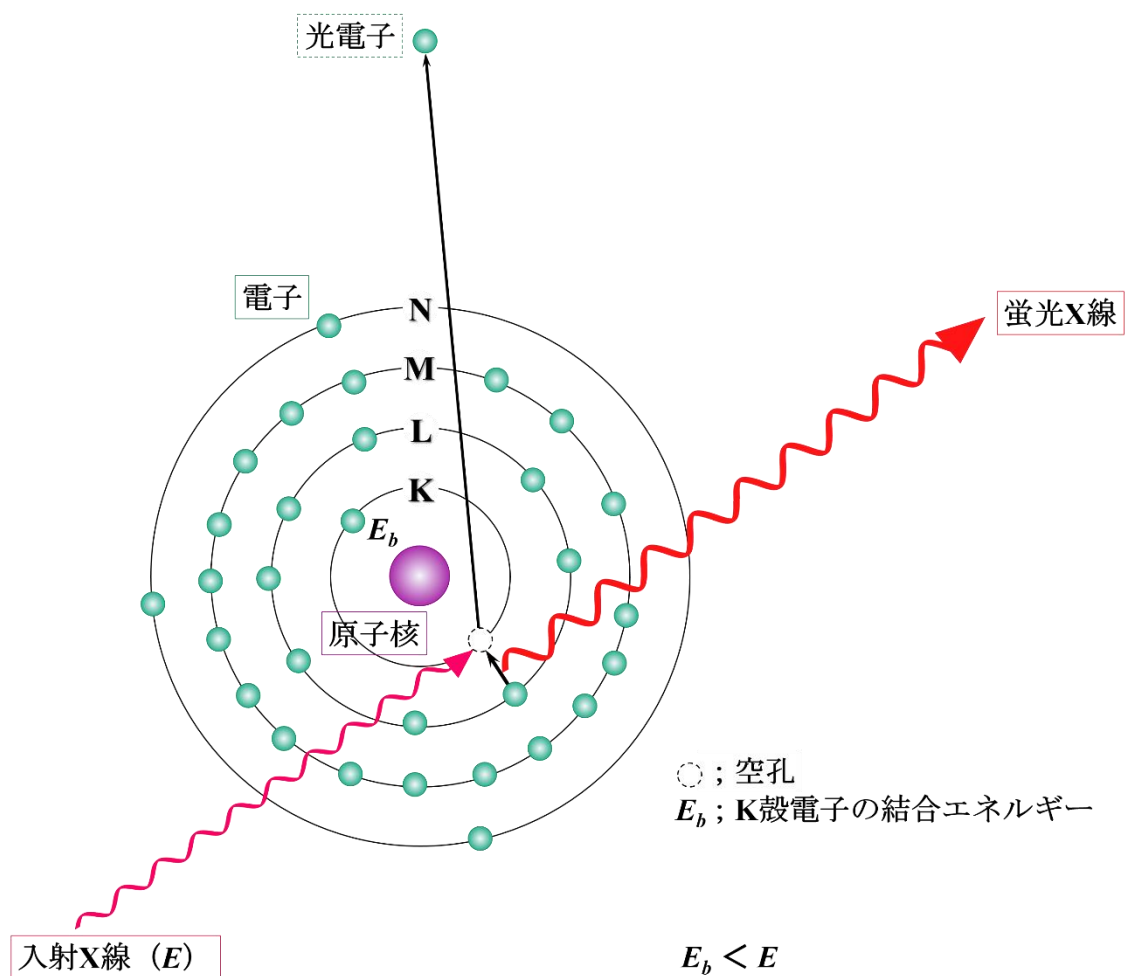
はじき出される電子が電子構造の K 殻にあれば K 吸収端、L 殻にあれば L 吸収端と呼ぶ。



**Figure 1-3 XAFS スペクトル (矢印は吸収端)**

X 線吸収スペクトルにおける K 吸収端付近を拡大したスペクトルで認める微細な波状のスペクトル構造が X 線吸収微細構造 (XAFS) であり，さらに 2 つの領域に分けてスペクトルを解析することができる．

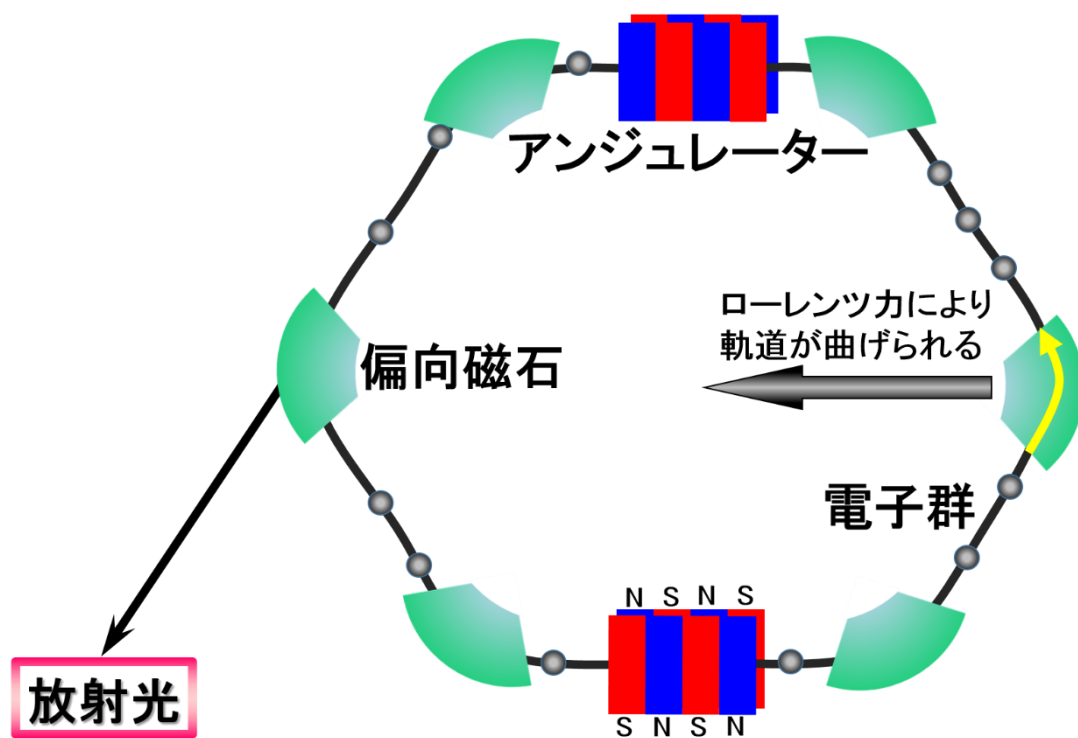
吸収端付近の 50 eV 程度の狭い領域に認める波状構造が XANES である．元素の価数や，元素がどのような化学構造であるのかを解析する．XANES 以後の 1000 eV 程度までの広域領域に認められる構造が EXAFS である．元素の距離や数など原子レベルでの構造を解析する．



**Figure 1-4 電子構造 (ボーアモデル)**

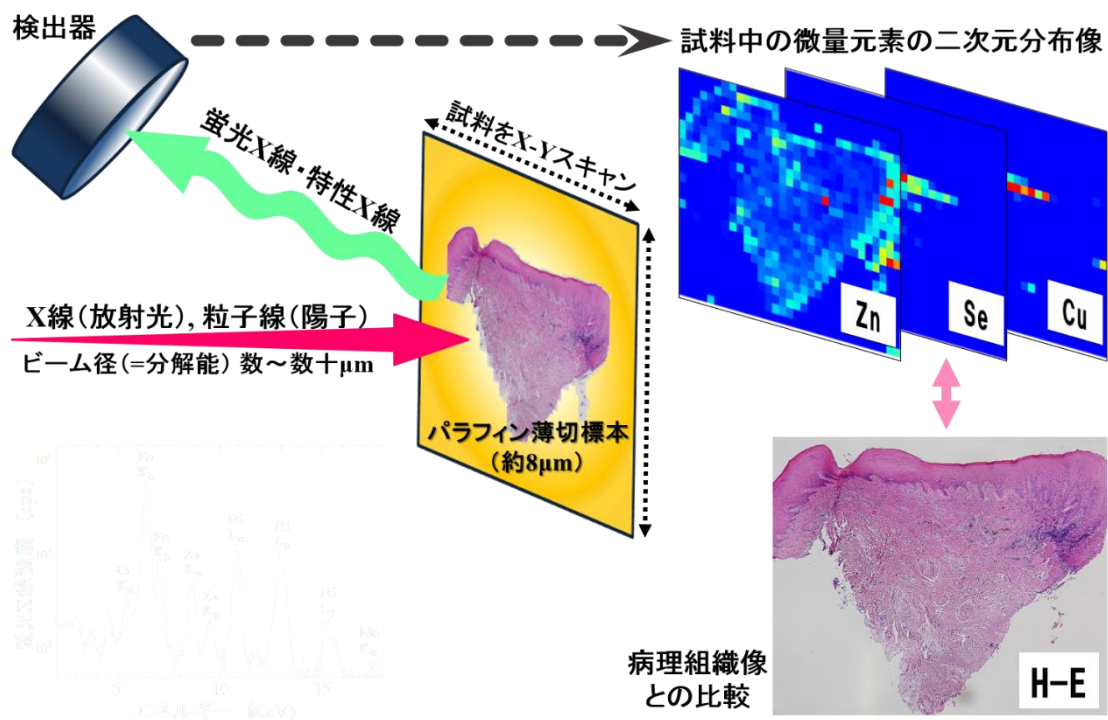
円形の軌道のことを電子殻と呼び、原子核に近い内側から順に K 殻, L 殻, M 殻・・・という。殻内に属する電子のエネルギーは外側の殻へ行くほど高く、同一の軌道内でのエネルギーは同じである。

K 殻軌道内における電子の結合エネルギー ( $E_b$ ) よりも入射 X 線エネルギー ( $E$ ) が大きい場合、玉突きのように電子ははじき飛ばされる。空孔領域に、より高位からの電子が（本例の場合は L 殻から）落ちてくることで、原子の不安定な状態が安定する。L 殻軌道内での電子エネルギーの方が K 殻軌道内の電子エネルギーよりも大きいため、移動の際には余分なエネルギーが放出されることになる。これが蛍光 X 線である。



**Figure 1-5** 放射光発生概念図

偏向磁石で磁場を作って電子の軌道を曲げて、リング内で電子を周回させた時に接線方向に発生する光が放射光である。



**Figure 1-6 SR-XRF, マイクロ PIXE による元素分布分析法**

X 線や粒子線を試料に照射すると、エネルギーを吸収した試料内の各元素は特有のエネルギー値である蛍光 X 線や特性 X 線を発生する。発生した蛍光 X 線や特性 X 線の強度から観察部位にどの元素がどれだけ存在しているのかを知る。試料台を 2 次元に駆動し各点で蛍光 X 線や特性 X 線を測定することから元素分布像を得る。

## 第二章 口腔粘膜疾患における金属元素分布に関する研究

### 1. はじめに

扁平苔癬 (Lichen planus ; LP)は 1869 年に Wilson によって初めて報告されたが、これは粘膜皮膚疾患であり、時に皮膚病変を伴わない口腔粘膜病変のみの例もある<sup>1)</sup>。口腔扁平苔癬 (Oral lichen planus ; OLP) は角化異常を伴う慢性炎症性病変で、頬粘膜、舌、そして歯肉が発症頻度の高い部位ではあるが、口腔内のあらゆる部位に出現する。Andreasen は OLP を病態別に、Reticular-type (網状型)、Papular-type (膨疹型)、Plaque-like-type (白斑型)、Erosive-type (びらん型)、Atrophic-type (萎縮型)、Bullous-type (水疱型)<sup>2)</sup>の 6 つに分類した。OLP の病理組織像は次の 3 つの特徴的な所見を呈する。すなわち、過角化に伴う上皮の肥厚、基底層直下の炎症性細胞帯状浸潤、基底層融解による鋸歯状化である<sup>3-5)</sup>。OLP の原因は未だ明らかになってはないが、金属アレルギーや C 型肝炎、内分泌障害、精神的ストレスなど、いくつかの要因が指摘されている。

これに対して、口腔扁平苔癬様疾患 (Oral lichenoid lesions ; OLL) は扁平苔癬と類似した病態で、臨床像および病理組織像が OLP のそれと酷似している。OLP と OLL の分類について Table 2-1 に示す。OLL は臨床タイプに応じて次の 3 つに型に分類されている : Oral lichenoid contact lesions (OLCL), Oral lichenoid drug reactions (OLDR), Oral lichenoid lesions in graft-versus-host disease (OLL-GVHD)<sup>6,7)</sup>。OLDR は薬剤性に発症する病態であり、OLL-GVHD は骨髄移植歴のある患者の口腔内にしばしば出現する病態であり、これらは患者の病歴によりある程度の確定診断が可能である。一方、OLCL は口腔内に装



着している金属修復物により引き起こされる接触性の粘膜炎とされているが、OLP と鑑別することは極めて困難である。そこで、臨床現場では、OLP は 3 つの特徴的な病理組織学的所見に加え、病変の近傍に金属修復部を認めず、かつ両側性に認める傾向にあるものとし、対して OLCL は OLP と同じく 3 つの特徴的な病理組織学的所見に加え、病変の近傍に金属修復物を認め、片側性に生じている傾向にあるものとして区別している。ところが、片側性に金属修復物を有するが病態は両側性に認められる、口腔内に金属修復物を有するが粘膜との直接的な接触は認めていないなど、OLP と OLCL のどちらに分類すれば良いのか、その基準は曖昧である。OLP、OLCL の発症率は人口の約 0.5～2.2%といわれており、臨床現場ではしばしば遭遇する疾患である<sup>7)</sup>。さらに、OLP および OLCL は癌化リスクを伴うとの報告もある<sup>4) 8-22)</sup>。OLCL の診断は病理組織学的な所見に加え、主に口腔内の金属修復物の有無によるところが大きい<sup>23-24)</sup>、もし OLCL であるとする確定診断を明らかにすることができれば原因修復物を除去できる根拠になり得る。OLP の病因は不明であるためステロイドを用いた治療法が主であるが、実際のところ、先に述べたように OLP と OLCL の鑑別は困難であり、しかも金属修復物を除去することは患者の口腔機能の悪化（咀嚼困難、発語困難、審美障害など）につながり、かつ本邦においては金属修復物除去の先に控えている治療法は陶材などのアレルギーになりにくい材料を用いた修復物治療となり、これは自費治療となるため患者に経済的負担を強いることになる。したがって、OLP と OLCL の正確な診断を試みることなく漫然とステロイド治療されているのが現状である。少なくとも OLCL に対しての正確な診断は、原因修復物の除去という根治的な治療法を提供できるようになるだけでなく、これによりステロイド使用に伴う副症状の出現を回避することができる。さらには癌化リスクの軽減にも繋がる。したがって、OLP と OLCL の鑑別診断は

極めて重要なことであり、臨床現場では強く望まれている。

OLCL である根拠を得るために、臨床現場では一般的にパッチテストを用いた金属アレルギー検査がなされる。しかし、パッチテストは偽陰性や偽陽性の出現、副症状の出現などを認め、決して信頼性の高い検査とは言えない。そこで、もし病変内への金属イオンの検出を何らかの方法により明らかにすることができれば歯科用修復物に由来する接触性粘膜炎の指標になり得るはずである。そして被疑修復物の除去を可能にする。しかし、歯科治療に際して使用される合金材料は通常、耐食性に優れたものが使用されているため、もし合金成分が溶出し、イオンが存在していたとしてもその濃度は検出するのが困難なほどの低いレベルであると考えられる。さらに、もし溶出元素を認めるとするならば、試料中のどの領域に元素が存在しているのかを病理像と比較して知る必要がある。そのためには非破壊的に行える何かしらの手法を適応しなくてはならない。

口腔粘膜組織中の溶出金属元素の検出はこれまでもなされており<sup>25-29)</sup>、X線を用いた分析手法は試料破壊の必要がなく有効であることが解っている。前章で述べたように、中でも放射光蛍光 X 線分析 (SR-XRF) 法は試料内の微量元素の分布情報を、XAFS 分析法は対象とする元素の化学状態についての情報をそれぞれ与えてくれる。さらにマイクロ PIXE 法は SR-XRF で測定可能な領域を超えてさらに微小な領域での元素分布情報を与えてくれる。これらの方法を使用することは、極めて微量な試料内に含有されているであろうさらに微量な金属元素の分布分析に最適と考えられる。

本研究の目的は、高感度かつ非破壊的な手法である SR-XRF, PIXE, そして XAFS という分析手法を用いて、OLCL および OLP 組織内の微量元素の拡散を明らかにし、両者の鑑別を可能にし、新たな治療法を確立することである。

## 2. 方法

### 2-1 試料

口腔粘膜組織は、自治医科大学医学部附属病院歯科口腔外科および共同研究先である日本大学歯学部附属病院病理学講座より提供された15例を使用した。いずれもパラフィン包埋された試料であり、内訳は臨床所見および病理組織学的所見よりOLPと診断されたものが6例、OLCLと診断されたものが6例であった。そしてコントロールとして舌、頬粘膜、歯肉に発症した扁平上皮癌の切除病変のうち正常部分の組織を使用した。本研究は自治医科大学附属病院（A12-27）、日本大学歯学部附属病院（2012-14）倫理委員会の承認を受けて実施した。なお、病理組織学的診断は熟練した口腔病理専門医によりなされているが、本研究におけるOLPとOLCLの判断は病変が金属修復物と接触環境にある、もしくは病変と金属修復物が極めて近傍にあるか否かという臨床所見に基づきなされた。それぞれ8 $\mu$ mの厚さに薄切し、カプトンフィルム®（Du Pont - Toray Co., Ltd, Tokyo, Japan）上に貼付乾燥し、これを分析に供した。

### 2-2 元素分布分析

元素分布分析は SR-XRF を用いて行い、さらに高解像度の元素分布分析はマイクロ PIXE を用いて行った。元素分析条件の詳細は Table 2-2 に記す。

## 3. 結果

SR-XRF およびマイクロ PIXE を用いて口腔粘膜試料 15 例に対しての金属元素分析を行った。Table 2-3 には臨床診断および元素分析で得られた検出元素を示す。濃縮領域での平均蛍光 X 線カウント数 (cps) はそれ以外の領域での平均蛍光 X 線カウント数 (cps) と比較した。OLCL と診断された試料#7, #8, #10,

#11, #12 の 5 つからは明らかに蛍光 X 線カウント数の高い金属元素の検出を認め、これらはいずれも歯科材料として一般的に使用される種類のものではあった。これに対し、OLP と診断された#1 から#6 の 6 例およびコントロール試料 #C1 から#C3 の 3 例では明らかな金属元素の検出は認めなかった。このことより、OLP と OLCL の違いには金属元素の有無が関連している可能性が示唆された。

Figure 2-1 に示すのは試料#7 の臨床像および病理組織像 (H-E 染色), SR-XRF による元素分布像である。本症例は金属冠直下に過角化を伴う白色の病変を認め、試料は同部位から採取された。また病理組織学的には特徴的な角化病変の所見を認めた。つまり、上皮角質層の肥厚の亢進、基底層直下の結合組織層での帯状の炎症性細胞浸潤、基底層の鋸歯状化現象である。以上より、本症例は OLCL と診断された。SR-XRF による元素分布像では、上皮で Zn, Cu そして Se が確認された。P は上皮層と上皮層直下の領域で認めたが、これは炎症性細胞浸潤と領域を同じくしており、P の集積はこれに由来するものと考えられた。Zn, Cu, Se の集積領域 (Figure 2-1 内のボックス領域) をさらにマイクロ PIXE を用いて微少部元素分布分析を行った。その結果、Ag, Zn, Cu, Se の集積が明らかであった (Figure 2-2)。Ag, Se が最も高濃度で濃縮していた領域 (矢印) での特性 X 線スペクトルを Figure 2-3a で示す。Ag の集積領域では Ag のピークに加えて Zn, In そして Ga のピークが確認された。市場で入手可能な銀合金である Casting Silver S (GC Corp., Tokyo, Japan) の組成は Ag ; 24, In ; 2.5, Zn ; 2, Ga ; 1 (wt%) であり、この銀合金は歯科材料として頻用されるものである。また、Ag, In そして Ga は生体に元々含有されているはずのない元素種であることより、病変内より検出されたこれらの元素は歯科材料に由来すると示唆された。Figure 2-3b で示す Ag の K 吸収端 XAFS スペクトルでは、Ag-foil のスペクトルとは異なっており、硫化銀 (Ag<sub>2</sub>S) のスペクトルと

酷似していた。また Figure 2-3c で示す Zn の K 吸収端 XAFS スペクトルでは、Zn-foil のスペクトルとは異なっており、Zn 水和物 ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ) のスペクトルと酷似していた。以上の結果より、Ag および Zn は歯科用合金から溶出した成分が粘膜組織に吸収され蓄積したと考えられた。つまり、溶液中での溶解性の極めて低い Ag は、化学的に安定した  $\text{Ag}_2\text{S}$  として存在していたと考えられた。対して、Zn の化学状態は Zn イオンと酷似していたが、Zn は溶液中での溶解性が高いため組織中でもイオン化の状態で存在していたものと考えられた。

Zn や Cu などのヒト生体に元々含有されている必須金属元素の場合、検出金属が歯科材料からの溶出物であると判断するのは困難である。しかし、XAFS を用いた化学状態分析が与える情報こそが、検出金属元素が何に由来するものであるのかを的確に示唆してくれる。

Figure 2-1 や Figure 2-2 で示すように、本症例では Ag, Zn そして Cu の局在領域を取り囲むように Se の集積が認められた。Se の特性 X 線スペクトル解析 (Figure 2-3a) では、Se のピークと共に Ag と Cu のピークもまた明らかであった。Ag 集積部での特性 X 線スペクトル解析では Se が検出されていなかったにも関わらずである。Se は歯科用合金もしくは歯科材料として使用されることはない元素だが、ヒト生体に元々含有されている必須元素である。したがって、ここで検出された Se はヒト生体に由来するものであると考えられた。

Figure 2-4 で示すのは、試料#12 の病理組織像および元素分布像である。これは頬粘膜から採取されたものである。病理組織学的には試料#7 と同じく角化病変に特徴的な所見を有していた。また元素分布像より Fe, Cr そして Ni の顕著な集積が認められた。これらの元素はステンレス鋼の主な構成成分である。

Figure 2-5 で示す Ni および Cr の K 吸収端 XAFS スペクトルより、いずれも金属状態のスペクトルとは異なっており、水和物状態 ( $\text{Ni}(\text{OH})_2$ ) および酸化物

状態 ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) のスペクトルと酷似していることが明らかであった。試料#7 と同様、試料#12 の Ni および Cr はステンレス鋼からの溶出物に由来し、水和物および酸化物の状態で集積したと考えられた。

Figure 2-6a で示すのは、試料#10 の蛍光 X 線スペクトルである。Ag, Pd, Au そして Cu のピークが明らかであった。これらの元素は Au-Ag-Pd-Cu 合金（金銀パラジウム合金）の構成成分であり、本邦での歯科治療にて現在もなお最も頻用されている合金である。Figure 2-6b では試料#11 における Bi と Zn のピークを明らかにしている。Bi は歯科材料の合金成分ではないが、酸化亜鉛ビスマスとして根管内治療の際に使用される歯科材料に含有されている。試料#8 は Ag, Ni, Cu そして Zn の集積を認めた。

以上のように、OLCL と診断された 6 例中 5 例において歯科用合金や歯科材料に由来する元素の検出、集積を認めた。なお各々の病理組織像と比較し Fe は血管、つまり血液に由来するものと考えられた。

Figure 2-7 で示すのは、試料#4 の臨床像および病理組織像、SR-XRF による元素分布像である。両側の頬粘膜に過角化病変を認めるが、金属修復物は口腔内に存在していなかった。病理組織学的には角化病変特有の 3 徴候を有していた。臨床所見、病理組織学的所見より本症例は OLP と診断された。元素分布像では、明らかな金属元素は検出されなかった。生体必須金属元素である Zn や Fe の検出は試料全域に及んでおり局在性を有しているとは言えなかった。蛍光 X 線カウント数においても、OLCL と診断された試料#7 では Zn: 2052 cps, Fe: 440 cps であったのに対し、試料#4 では Zn: 35 cps, Fe: 62 cps と明らかに低値であった。他の OLP 試料やコントロール試料においても特筆すべき金属元素の検出は認められなかった。

#### 4. 考察

OLCL と OLP はその臨床所見や病理組織学的所見が類似しているため鑑別が困難である。金属修復物の有無が両者を区別する通法となってはいるが、実際のところ、病変の出現部位と金属修復物の存在部位との非整合性はその鑑別を困難にもしている。しかし、過去の報告にもある通り、口腔内に存在している金属修復物からの溶出が OLCL の病態形成に関与しているのは間違いないと考えられた<sup>24)</sup>。したがって元素分布分析法を用いて、OLCL と OLP 組織内における金属成分の分布を視覚化する手法は両者の鑑別に有効であった。しかし、生体組織標本を微量元素分析に応用するには様々な制限がある。そもそも OLP と OLCL は腫瘍性病変ではないため、その治療法として病変の切除は適応にならない。悪性所見が認められないこと、そして角化病変に特有の病理組織学的所見を確認するために組織生検は行われる。つまり、採取される組織量は極めて少量である。そこで、試料非破壊かつ高感度な分析手法である SR-XRF、マイクロ PIXE の使用が有効であった。我々が使用する SR-XRF のビームラインにおけるエネルギーは、歯科用合金の主な構成元素である Ag, Pd, In, Sn などの重金属元素を励起するには限界があった。しかし、マイクロ PIXE はたいいていの元素に対しての元素分布像を獲得することが可能である。そこで、本研究では SR-XRF とマイクロ PIXE を相補的に使用することで口腔粘膜組織に対する詳細な元素分布分析を可能にした。これを病理組織像と比較することにより、外来由来の元素蓄積の影響を明らかにしたのである。

本研究では、OLCL と診断された試料 6 例中 5 例において歯科用金属材料の元素成分が検出された。一方、6 例の OLP および 3 例のコントロール試料では明らかな金属元素の分布を認めなかった。Ag, In, Au そして Pd のような生体の必須金属元素ではない種類の歯科用合金成分の検出は歯科材料に由来するも

のと示唆された一方で、Zn, Cu, Ni そして Cr のようなヒト生体中に含有される必須金属元素成分の検出に対しては、それが外来由来であるのか生体由来であるのかを区別する必要がある。Figure 2-4 で示すように、明らかな局在性を有した分布は外来由来であると予測できたが、それでも定量評価により正常値と比べてどの程度に高濃度で集積しているのかを明らかにすることが必要である。定量評価の新たな手法については第三章にて述べることにするが、OLCL 試料で検出された必須金属元素の濃度は正常粘膜の濃度に対して明らかに高値であったのに対し、OLP やコントロール試料中の必須金属元素の濃度は正常粘膜の過去の報告例と近似していた。

歯科治療に際しては時に金属修復物を口腔内で削合するため、切削片が粘膜へ埋入することもあり得る。また、試料作製時にミクロトーム刃からの混入物が試料へ埋入することもあり得る<sup>28)</sup>。金属切削片の埋入は局所的な炎症反応を引き起こし得るが OLCL を引き起こす根拠とは言えない。XAFS 分析は局在元素の化学状態についての詳細な情報を与えてくれるため、切削片の混入物は XAFS 分析により容易に被疑元素から除外することが可能となる。

実際に我々は口腔粘膜病変から検出した元素の由来についての検索を XAFS 分析法を効果的に使用して追加実験を行っている。口腔粘膜組織は、共同研究先である日本大学歯学部附属病院より提供された 2 例を使用した(試料名を#D1, #D2)。いずれもパラフィン包埋された試料であり、内訳は臨床診断および病理組織学的所見より#D1 は OLP, #D2 は OLCL と診断されたものであった。いずれも本研究と同様に 8 $\mu$ m 厚に薄切し、カプトンフィルム®上に貼付乾燥したものを分析に供した。試料の詳細は Table 2-4 に記す。Figure 2-8 に示すのは試料#D1 の病理組織像および SR-XRF による元素分布像である。上皮層よりさらに深部で Ni の集積を認めた。Ti および Fe も同領域に認めた。病理組織像と比



較すると、この領域はいわゆる炎症性細胞の帯状浸潤の領域とは異なる領域ではあるが、局所的に炎症所見を認めた。さらにマイクロ PIXE を用いて微少部元素分析を行った結果が Figure2-9a である。およそ 30~40 $\mu$ m の Ni および Fe の拡散像を認めた。図に示す点 (Spot 1) で測定した特性 X 線スペクトル (Figure 2-9b) では Ni や Fe のピークだけではなく Al, Si, K, Ca, Ti, Zn のピークを認めた。Figure 2-10 で示す Ni の K 吸収端 XAFS スペクトルでは、Ni(OH)<sub>2</sub> のスペクトルと酷似しており Ni-foil のスペクトルとは異なっていた。この結果より、Ni は水溶性イオンの状態で集積していたと考えられた。つまり Ni 含有歯科用合金からの溶出物が蓄積したものと考えるのが妥当であった。したがって、本症例は OLP と診断されていたが、以上の結果より OLCL と診断されるべき症例であったと言える。続いて、Figure 2-11 に示すのは試料#D2 の病理組織像および SR-XRF による元素分布像である。試料#D1 とは異なる元素の集積状態を認めた。Fe, Cr は粘膜上皮の縁に点状に集積しており (Spot 2-A), また Zn, Cu は基底層の内側に点状に集積していた (Spot 2-B)。さらに Spot 2-A を含む領域でのマイクロ PIXE による微少部元素分析を行った結果が Figure2-12a である。数ミクロンという極めて小さな点状での Fe, Cr の集積を認めた。この点での特性 X 線スペクトル (Figure2-12b) では Fe や Cr のピークは著明であるのに対し Ca や Zn のピークは弱かった。粘膜組織に認められて良いはずの P や S, K などのピークは認めなかった。Figure 2-13 で示す Fe および Cr の K 吸収端 XAFS スペクトルでは、いずれも Fe-foil, Cr-foil のスペクトルと酷似しており、金属状態で存在していることを示唆する所見であった。したがって Fe-Cr 合金に由来する外来物が埋入していることを疑った。本研究で薄切試料を調整する際に、我々はステンレススチール製のマイクローム用替刃 (Feather S35 type, Feather Safety Razor Co., Ltd, Tokyo, Japan) を使用する。これは 87%

の Fe と 12%の Cr から成る合金である． Spot 2-A の点は試料の縁にありここは軟性材料であるパラフィンと境する試料組織密度の高いところである．つまりパラフィン領域から試料側へ薄切を進める過程で替刃の一部が破折したことによる混入物に由来するものであると考えるのが妥当であった．さらに， Spot 2-B を含む領域でのマイクロ PIXE による微量部元素分析を行った結果が Figure 2-14a である．約 10 $\mu$ m 程度の小さな領域で Cu, Zn, Fe, Ni の集積を認めた．この点での特性 X 線スペクトル (Figure 14b) では，Cu, Zn の著明なピークと Fe, Ni の弱いピークを認めた．いずれの元素も生体に含有される必須元素ではあるが，前者の Cu および Zn の強度より生体に由来するものとは考えにくい． Figure 2-15 で示す Cu および Zn の K 吸収端 XAFS スペクトルでは，いずれも Cu-foil, Zn-foil のスペクトルと酷似しており，金属状態で存在していることを示唆する所見であった．つまり黄銅や洋銀 (Cu-Zn-Ni alloy) のような Cu と Zn を含有する合金に由来する外来物が埋入しているものと疑われた．実際に洋銀は数十年前まで歯科修復材料として使用されていたものであり，つまり口腔内で削合した際に出現した合金片が粘膜より埋入し沈着したと考えるのが妥当であった．そして，組織内で溶出している所見を呈していないことより，病態形成には関与していないと考えるのが妥当であった．したがって，本症例は OLCL と診断されていたが，以上の結果より OLP と診断されるべき症例であったと言える．

本研究では，OLCL 病変内で検出された元素はいずれも金属状態のものではなく水和物状態 (Ni, Zn) や硫化物状態 (Ag)，酸化物状態 (Cr) であることが明らかであった．Ag や Cr は溶解度が低いため，体液中で化学的に安定した状態で存在したと考えられた．以上のように，SR-XRF やマイクロ PIXE での元素分布分析と XAFS 分析を相補的に利用することで，病変内の含有金属元素の

有無を検出するだけでなく、その分布が何に由来するのも明らかにする有効な情報を得る事ができた。

一方で、検出した金属の化学状態は、実際の口腔内での状態と、試料作製行程を経た状態とでは変化するのではないかという疑問が生じる。我々はこの疑問に対しても検討している<sup>30)</sup>。マウス皮下組織に様々な歯科用合金を埋入し、合金周囲の組織を剥離した後、XAFSを用いて化学状態を分析した。この際、試料は凍結乾燥標本とし、ホルマリン固定やパラフィン包埋を行わないことで試料が受ける様々な外的影響を遮断した。結果はNiイオン、酸化クロム、そして硫化銀が同定され、いずれも本研究で検出した金属元素のXAFS解析の結果と同じであった。また、Hartら<sup>31)</sup>によりなされたCo-Cr人口関節から組織への合金成分の溶出元素分布を検索した研究においても、ホルマリン固定された試料と即時凍結乾燥された試料ではその化学状態は同じであることを示している。以上のことより、ホルマリン固定やパラフィン包埋の行程で受ける影響は元素分布や化学状態を変化させる問題はないといえる。しかしながら、イオン状態にある溶解度の高い元素の場合には、固定・包埋行程の間に微量元素成分が流出してしまう可能性を十分に考慮しなくてはならない。その場合は即時凍結標本が理想的であるといえる。

試料#7では、AgやCuの集積領域と同一領域にSeの検出を認めた (Figure 2-2, Figure 2-3)。Seは歯科用合金や歯科材料の成分ではないが、ヒト生体に含有される必須元素である。したがって検出したSeはヒト生体に由来するものと考えられる。過去には、口腔粘膜におけるSe, AgそしてHgの関連についての報告もある<sup>26)</sup>。Ag, Cu, HgはSやSeのようなカルコゲン属と強い親和性を有する。セレン化合物として知られるセレノプロテインのいくつかのタイプは、ヒト生体内に存在している。元素分布分析と病理組織像とを比較すると、Ag,

Cu および Se は炎症性細胞浸潤の領域というよりも後毛細血管細静脈叢の近くにあることが解る．この所見はセレノプロテインが体内循環から供給されたものであることを示唆し，Ag, Cu と生体由来の Se の反応が血管系を介して行われていることを示唆するものであった．

現在、様々な金属材料や金属デバイスが医学領域では用いられている．これらの材料の安全性は厳しい腐食耐食試験を経て決定される．しかし、本研究では歯科用合金に由来すると考えられる金属元素の蓄積を示すこととなった．OLCL と接触している金属修復物との相関が示唆された．少なくとも、現在は OLCL と OLP の区別は主に臨床所見からなされてはいるが、OLCL の診断を装着金属修復物の影響によるものと決定付ける根拠はなく、確立した治療法を提供することは困難である．したがって OLCL と OLP の発症機序は異なっているであろうにも関わらず、ステロイドを用いた対症療法が臨床現場での常となっている．本研究で示したように、OLCL 病変内で原因となる歯科材料物質を明らかにできれば、これを除去するという根治療法が可能となる．金属元素の分布分析および化学状態分析から得られる情報は OLCL の確定診断に際しての重要な Supporting information となるはずである．

本研究では、歯科材料からの拡散金属成分の検出に SR-XRF, マイクロ PIXE, XAFS 分析を用い、OLCL と OLP の鑑別診断の一助になることが期待された．

## 5. まとめ

OLCL と診断された 6 例中 5 例で歯科用材料からの金属成分が検出された．一方、OLP と診断された 6 例やコントロール試料 3 例では明らかな金属元素の検出は認められなかった．また XAFS 分析により OLCL 試料で検出された元素が金属状態にないことを明らかにできたことより、口腔内で割合した切削片が

粘膜に埋入したものではなく、金属修復物の溶出物が蓄積したものであることが明らかとなった。SR-XRF、マイクロ PIXE、XAFS 分析手法の相補的な使用は OLCL と OLP の鑑別診断に際して重要な情報を与えてくれた。これまでの金属接触性 OLL という概念から、metal-induced OLL という概念へ改めることが可能となり、これまでの OLCL に対する対症療法から脱却した根治療法を提供できるものと期待された。

## 6. 参考文献

1. Mollaoglu, N. Oral lichen planus: a review. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **38**: 370–377, 2000.
2. Andreasen, J. O. Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **25**: 31–42, 1968.
3. WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesion: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **46**: 518–539, 1978.
4. van der Meij EH, Schepman KP, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **96**: 164–171, 2003.
5. Shklar G. Lichen planus as an oral ulcerative disease. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **33**: 376–388, 1972.
6. Al-hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, Wray D, *et al.* Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **103**: S25.e1–e12,

2007.

7. Thornhill MH, Sankar V, Xu X, Barrett AW, High AS, Odell EW, Speight PM, Farthing PM. The role of histopathological characteristics in distinguishing amalgam-associated oral lichenoid reactions and oral lichen planus. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **35**: 233–240, 2006.
8. van der Meij EH, Mast H, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncology* **43**: 742–748, 2007.
9. Gonzalez-Moles MA, Scully C, Gil-Montoya JA. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. *Oral Diseases* **14**: 229–243, 2008.
10. Bombeccari GP, Guzzi G, Tettamanti M, Gianni AB, Baj A, Pallotti F, Spadari F. Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **112**: 328–334, 2011.
11. Mignogna MD, Muzio LL, Russo LL, Fedele S, Ruoppo E, Bucci E. Clinical guidelines in early detection of oral squamous cell carcinoma arising in oral lichen planus: a 5-year experience. *Oral Oncology* **37**: 262–267, 2001.
12. Chainani-Wu N, Silverman S Jr, Lozada-Nur F, Mayer P, Watson JJ. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *The Journal of the American Dental Association* **132**: 901–909, 2001.
13. Eisen D. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology* **46**: 207–214, 2002.
14. Gumru B. A retrospective study of 370 patients with oral lichen planus in Turkey.

*Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal* **18**: e427–e432, 2013.

15. Bardellini E, Amadori F, Flocchini P, Bonadeo S, Majorana A. Clinicopathological features and malignant transformation of oral lichen planus: a 12-years retrospective study. *Acta Odontologica Scandinavica* **71**: 834–840, 2013.
16. Kaplan I, Ventura-Sharabi Y, Gal G, Calderon S, Anavi Y. The dynamics of oral lichen planus: a retrospective clinicopathological study. *Head and Neck Pathology* **6**: 178–183, 2012.
17. Bermejo-Fenoll A, Sanchez-Siles M, Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F, Salazar-Sanchez N. A retrospective clinicopathological study of 550 patients with oral lichen planus in south-eastern Spain. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **39**: 491–496, 2010.
18. Torrente-Castells E, Figueiredo R, Berini-Aytes L, Gay-Escoda C. Clinical features of oral lichen planus: a retrospective study of 65 cases. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal* **15**: e685–e690, 2010.
19. Carbone M, Arduino PG, Carrozzo M, Gandolfo S, Argiolas MR, Bertolusso G, Conrotto D, Pentenero M, Broccoletti R. Course of oral lichen planus: a retrospective study of 808 northern Italian patients. *Oral Diseases* **15**: 235–243, 2009.
20. Fitzpatrick SG, Hirsch SA, Gordon SC. The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions. *The Journal of the American Dental Association* **145**: 45–56, 2014.
21. Laeijendecker R, van Joost T, Kuizinga MC, Tank B, Neumann HAM. Premalignant nature of oral lichen planus. *Acta Dermato-Venereologica* **85**: 516–520, 2005.
22. Xue JL, Fan MW, Wang SZ, Chen XM, Li Y, Wang L. A clinical study of 674 patients with oral lichen planus in China. *Journal of Oral Pathology and Medicine*

- 34**: 467–472, 2005.
23. Garhamme P, Schmalz G, Hiller KA, Reitinger T. Metal content of biopsies adjacent to dental cast alloys. *The journal Clinical Oral Investigations* **7**: 92–97, 2003.
  24. Schmalz G, Garhammer P. Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues. *Dental Materials* **18**: 396–406, 2002.
  25. Uo M, Asakura K, Kohgo T, Watari F. Selenium distribution in human soft tissue determined by using X-ray scanning analytical microscope and X-ray absorption fine structure analysis. *Chemistry Letters* **35**: 66–67, 2006.
  26. Uo M, Asakura K, Yokoyama A, Ishikawa M, Tamura K, Totsuka Y, Akasaka T, Watari F. X-ray absorption fine structure (XAFS) analysis of titanium-implanted soft tissue. *Dental Materials Journal* **26**: 268–273, 2007.
  27. Uo M, Asakura K, Tamura K, Totsuka Y, Abe S, Akasaka T, Watari F. XAFS analysis of Ti and Ni dissolution from pure Ti, Ni–Ti alloy, and SUS304 in soft tissues. *Chemistry Letters* **37**: 958–959, 2008.
  28. Sugiyama T, Uo M, Wada T, Omagari D, Komiyama K, Noguchi T, Jinbu Y, Kusama M. Estimation of trace metal elements in oral mucosa specimens by using SR-XRF, PIXE, and XAFS. *Biometals* **28**: 11–20, 2015.
  29. Lorella P, Alessandra G, Giulia S, Murielle S, Manuela S, Carla C, Maya K, Mauro M, Clara R. The interaction of asbestos and iron in lung tissue revealed by synchrotron-based scanning X-ray microscopy. *Scientific Reports* **3**: 1123, DOI:10.1038/srep01123, 2013.
  30. 宇尾基弘, 杉山知子, 和田敬広, 本郷敏雄, 高師則行. 各種歯科用合金からの溶出合金元素の分布および状態分析. 日本歯科理工学会誌 **34(1)**: 41-47, 2015.



31. Hart AJ, Quinn PD, Sampson B, Sandison A, Atkinson KD, Skinner JA, Powell JJ, Mosselmans JFW. The chemical form of metallic debris in tissues surrounding metal-on-metal hips with unexplained failure. *Acta Biomaterialia* **6**: 4439–4446, 2010.
32. Numako C, Nakai I. XAFS analysis of coprecipitation of zinc by sulfide ions in an acidic solution. *Spectrochimica Acta Part B* **54**: 133–141, 1995.
33. Sugiyama T, Uo M, Wada T, Omagari D, Komiyama K, Miyazaki S, Numako C, Noguchi T, Jinbu Y, Kusama M, Mori Y. Detection of trace metallic elements in oral lichenoid contact lesions using SR-XRF, PIXE, and XAFS. *Scientific Reports* **5**: 10672, DOI:10.1038/srep10672, 2015.

**Table 2-1 OLP と OLL の分類（文献 33 改）**

	OLP	OLL		
		OLCL	OLDR	OLL-GVHD
病理組織学的所見	<ul style="list-style-type: none"> <li>・角化亢進に伴う上皮層の肥厚</li> <li>・基底層直下の結合組織層での炎症性細胞の帯状浸潤</li> <li>・基底層融解に伴う鋸歯状化</li> </ul>			
臨床所見	6 タイプ：網状型，膨疹型，白斑型，びらん型，萎縮型，水疱型			
	両側	片側の傾向		
原因	突発性	金属	薬剤	骨髄移植
鑑別	両者の鑑別は明らかでない		病歴より鑑別可能	

**Table 2-2 測定条件に関する詳細**

SR-XRF	施設・条件	<p>BL-4A (Photon Factory, 高エネルギー加速器研究機構, Tsukuba, Japan)</p> <p>Electron-storage ring operated at 2.5 GeV and 450 mA</p> <p>Incident X-ray energy = 12.9 KeV</p> <p>Focal size = 100 <math>\mu\text{m}</math> (obtained using polycapillary optics)</p> <p>Measurement step = 5-50<math>\mu\text{m}</math></p> <p>BL 37XU (SPring-8, Hyogo, Japan)</p> <p>Incident X-ray energy = 30 KeV</p> <p>Focal size = 2 <math>\times</math> 4 <math>\mu\text{m}</math> (obtained using Kirkpatrick-Baez mirror optics)</p> <p>Measurement step = 5 <math>\mu\text{m}</math></p>
	処理ソフト	PyMca (ESRF, Ver. 4.7.3)
マイクロ PIXE	施設・条件	<p>PASTA (放射線医学総合研究所, Chiba, Japan)</p> <p>Micro-focused proton beam</p> <p>(3.0 MeV, 2-<math>\mu\text{m}</math> beam diameter, total irradiation = 200 nC)</p>
	処理ソフト	OMDAQ2007 (Oxford Microbeams Ltd., Version 1.3.71.669)
XAFS	施設・条件	BL-4A and NW-10A (Photon Factory, 高エネルギー加速器研究機構, Tsukuba, Japan)
	方法	The fluorescent XAFS method using a multi-element solid-state detector (Canberra, Connecticut, USA)
	標準試料	<p>Ag<sub>2</sub>S, Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Ni(OH)<sub>2</sub></p> <p>Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> solution was measured according to methods described by Numako et al. <sup>32)</sup></p>
	処理ソフト	REX2000 (Rigaku, Ver. 2.5)

**Table 2-3 検出元素の一覧（文献 33 改）**

No.	年齢	性別	領域	診断	Detected metallic elements										Suspected dental materials	
					intrinsic				non-intrinsic							
					Fe	Ni	Cu	Zn	Ti	Cr	Pd	Ag	Au	In		Bi
#C1	64	F	Tongue	—	-*	n.m.	-*	-*	n.m.	-*	n.m.	-*	n.m.	n.m.	n.m.	—
#C2	69	M	Bucca	—	-	-	-	-	+	-	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	—
#C3	74	F	Gum	—	-	-	-	+	+	-	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	—
#1	65	M	Bucca	OLP	-†	-†	-†	+†	-†	-†	-†	-†	-†	-†	-†	—
#2	47	F	Bucca	OLP	-	-	-	-	-	-	n.m.	-*	n.m.	n.m.	n.m.-	—
#3	58	F	Gum	OLP	-*	n.m.	-*	-*	n.m.	-*	n.m.	-*	n.m.	n.m.	n.m.	—
#4	53	F	Bucca	OLP	-*	n.m.	-*	-*	n.m.	-*	n.m.	-*	n.m.	n.m.	n.m.	—
#5	71	F	Bucca	OLP	-*	n.m.	-*	-*	n.m.	-*	n.m.	-*	n.m.	n.m.	n.m.	—
#6	51	F	Bucca	OLP	-	-	-	-	-	-	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	—
#7	42	M	Gum	OLCL	+	-	+	+	+	-	+†	+*,†	-	+†	-†	Ag-In-Zn 合金
#8	42	M	Soft Tissue	OLCL	-	+	++	+	+	+	-†	+*,†	-	-†	-†	銀合金
#9	60	F	Bucca	OLCL	-	-	-	+	-	-	-†	-†	-†	-†	-†	—
#10	68	F	Gum	OLCL	-	-	-	+	+	-	+	+	+	n.m.	n.m.	金銀パラジウム合金
#11	53	F	Bucca	OLCL	+	-	-	+	+	+	n.m.	-*	-	n.m.	+	根管治療用材料
#12	75	F	Bucca	OLCL	++	++	+	+	++	++	n.m.	-*	-	-	n.m.-	Stainless, Silver alloy

**Decision criteria of accumulation**

++ Significant : 元素集積領域での蛍光 X 線カウント数（特性 X 線カウント数）が，その周囲領域のカウント数平均の 10<sup>2</sup> 倍以上

+ Possibly :

Intrinsic elements : 周囲領域のカウント数平均の 10 倍

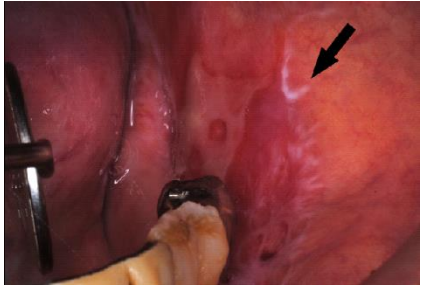
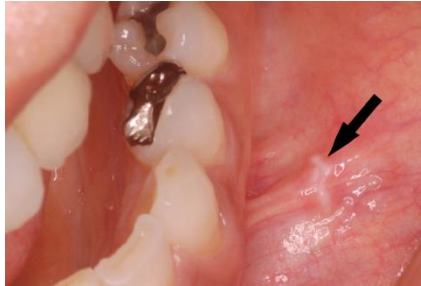
Non-intrinsic elements : 周囲領域のカウント数平均の 10 倍もしくは明らかな蛍光 X 線スペクトル（特性 X 線スペクトル）におけるピークを認める。

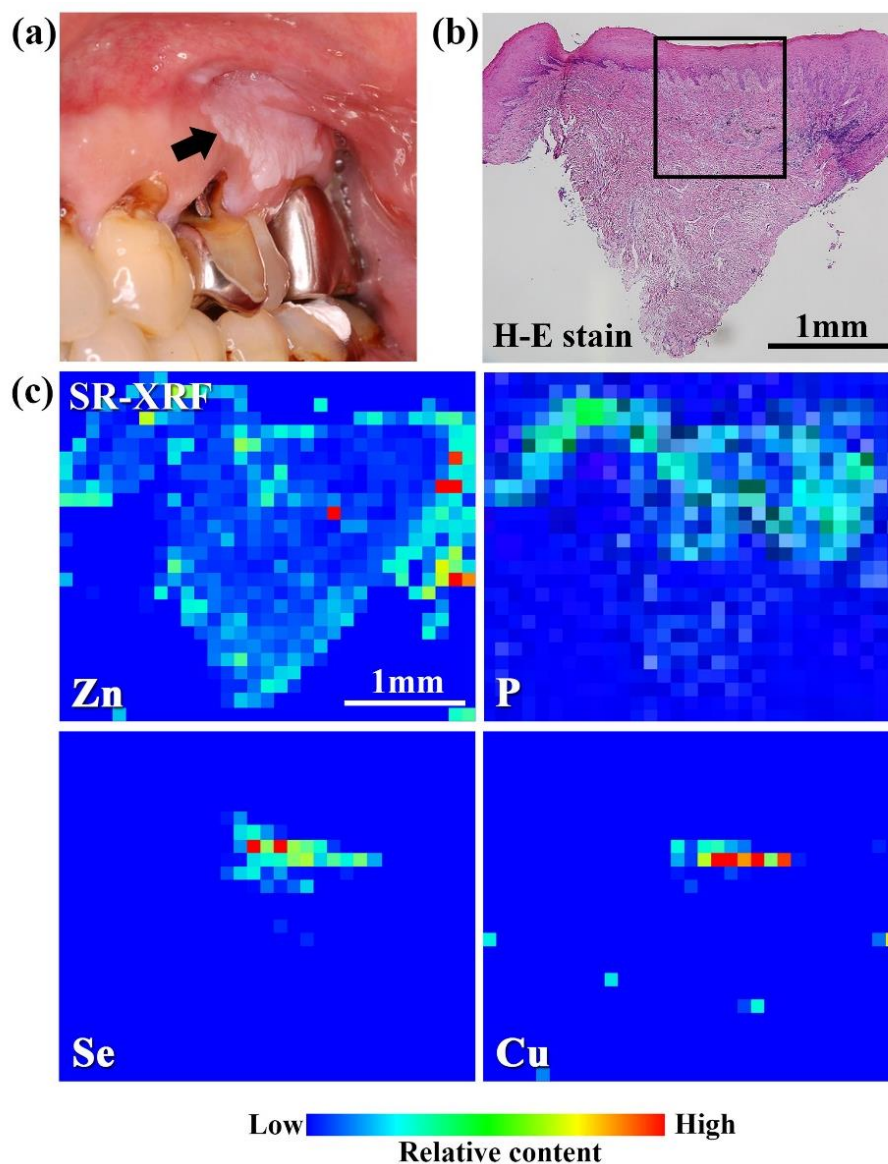
- negative

n.m. : not measured

Measurement method and facility ; unmarked: SR-XRF (KEK-PF), \*:SR-XRF (SPring-8), † :micro-PIXE

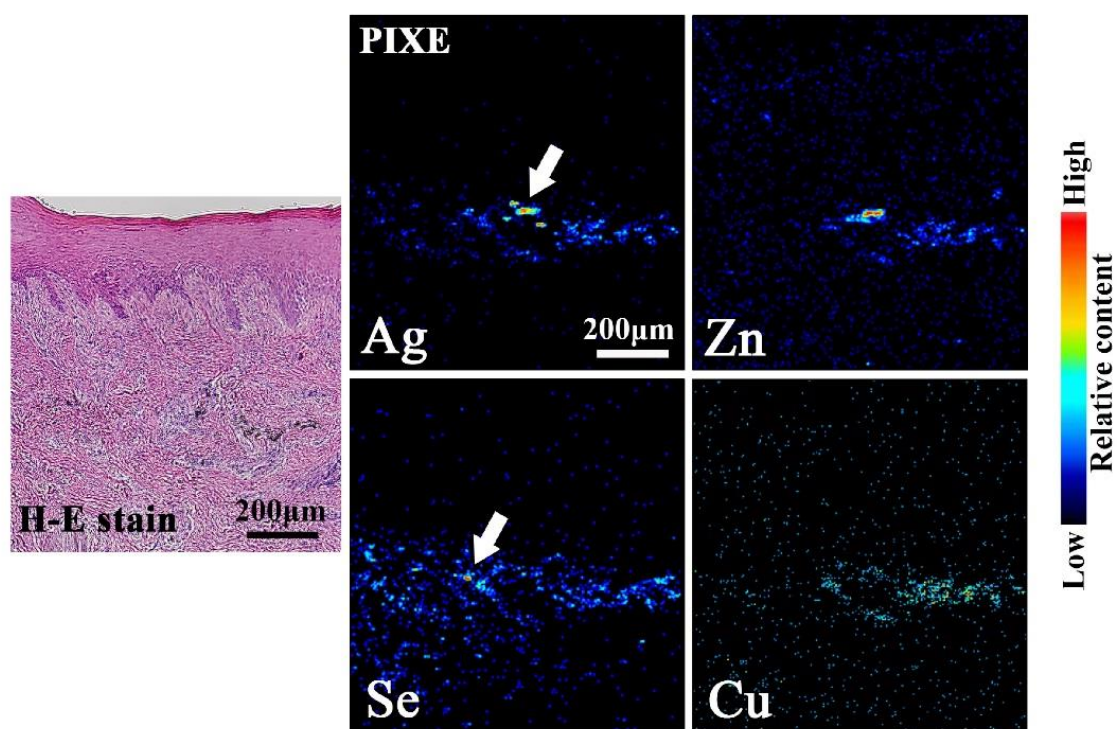
**Table 2-4 試料#D1 および#D2 の一覧**

No	年齢	性別	領域		診断	口腔内写真
#D1	57	M	頬粘膜	両側性	OLP	
#D2	40	F	頬粘膜	片側性	OLCL	



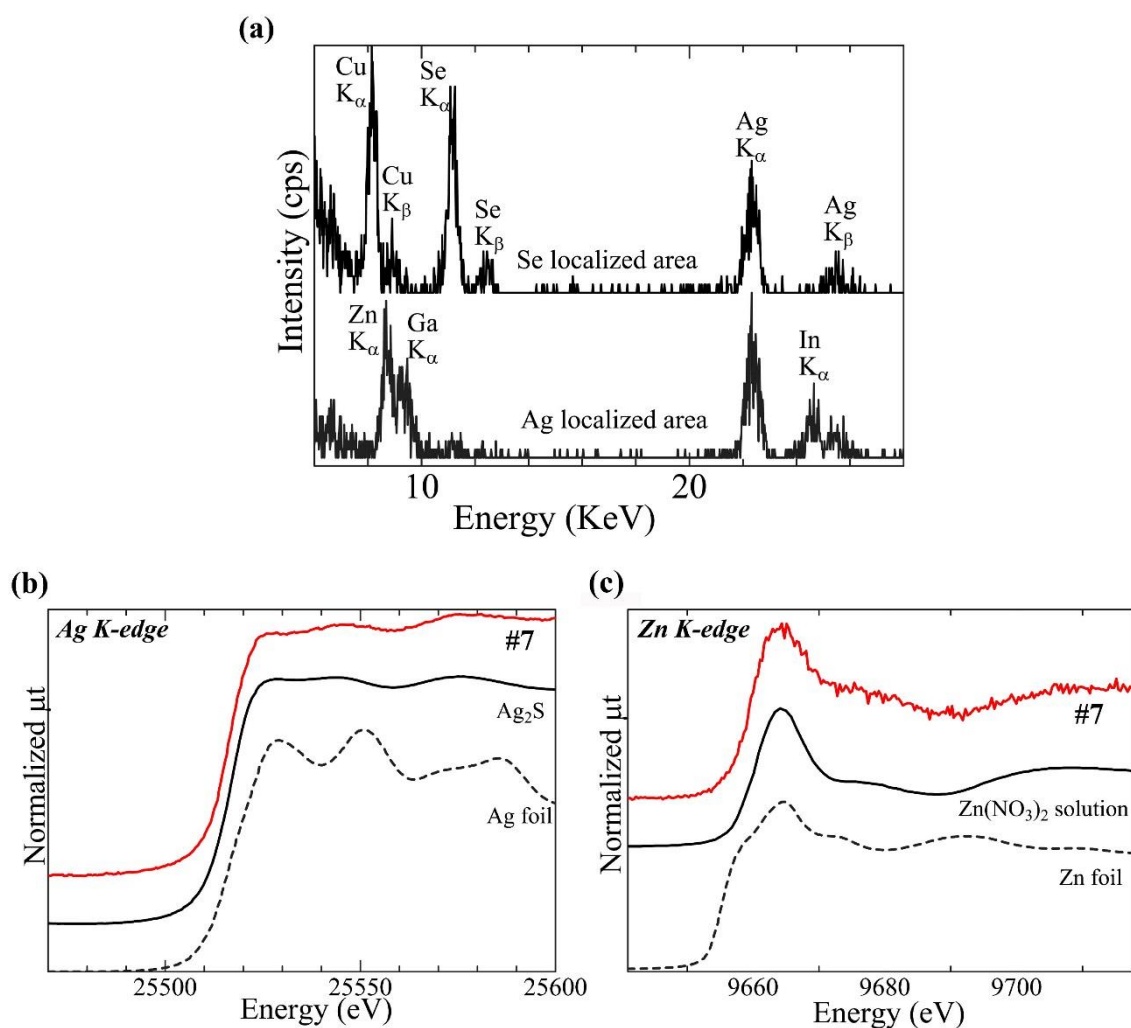
**Figure 2-1** 試料#7 の臨床写真 (a), 病理組織像 (H-E 染色) (b), SR-XRF による元素分布像 (c) (文献 33)

(a) 金属冠の直下に過角化病変を認めた (矢印). (b) 粘膜上皮の肥厚, 炎症性細胞の帯状浸潤, 基底層の鋸歯状化を認めた. これらの所見はいずれも OLP および OLCL の特徴的な所見である. (c) 上皮下の結合組織に Zn, Cu そして Se の局在を認めた. P と炎症性細胞の浸潤領域は一致していた.



**Figure 2-2** マイクロ PIXE による微少部元素分布像 (文献 33)

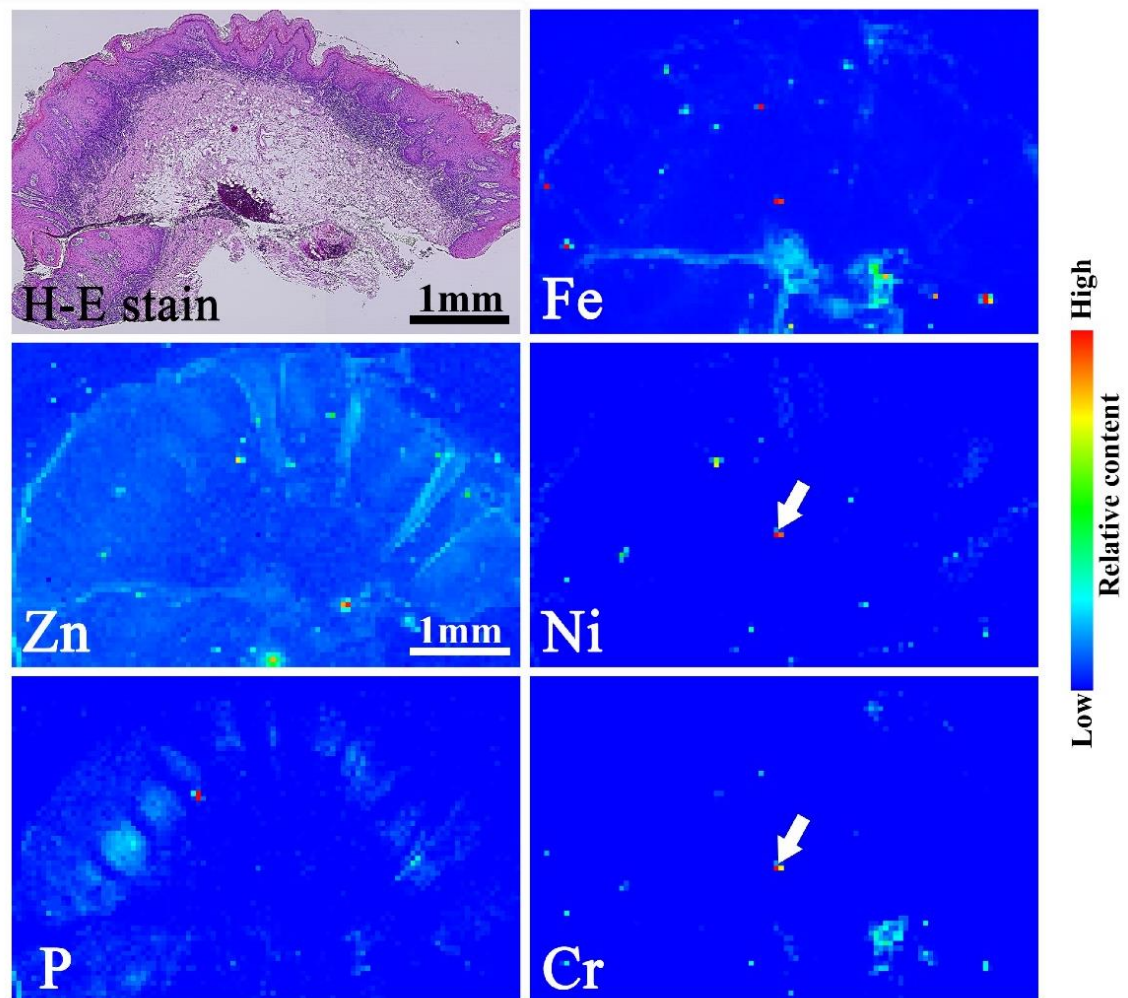
Ag の集積領域は上皮下の結合組織内で確認された. Zn, Cu そして Se もまた Ag の集積領域と同一領域に検出された.



**Figure 2-3** Se および Ag の特性 X 線スペクトル (a), Ag および Zn の K 吸収端 XAFS スペクトル (b, c) (文献 33)

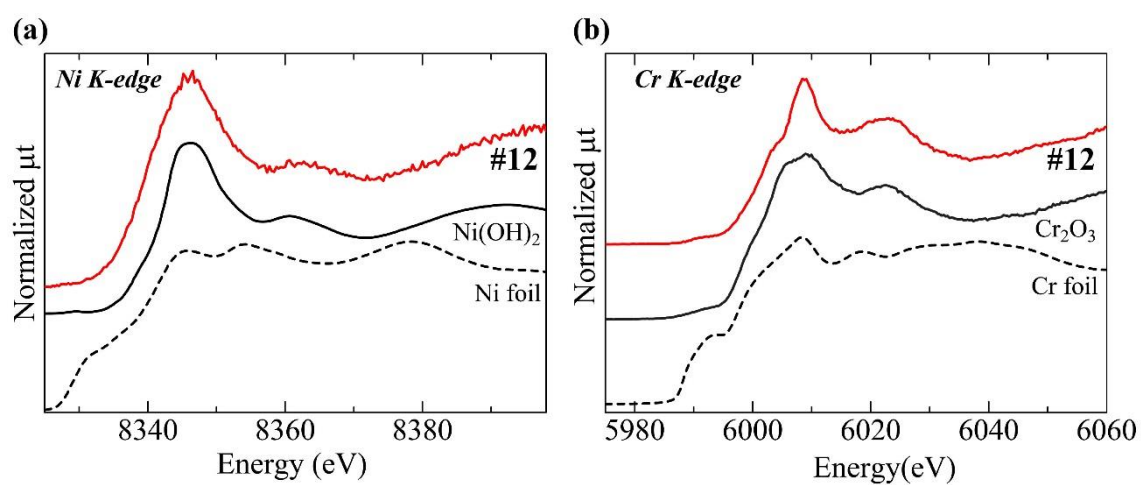
(a) Ag 局在領域では Ag のピークだけではなく, Zn, In そして Ga のピークも認めた. 一方, Se 局在領域では Ag, Cu のピークを認めた. (b) Ag の K 吸収端 XAFS スペクトルは, Ag-foil のスペクトルとは異なり, Ag<sub>2</sub>S のスペクトルと酷似していた. (c) Zn の K 吸収端 XAFS スペクトルは, Zn-foil のスペクトルとは異なり, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> のスペクトルと酷似していた. 以上のことより, Ag および Zn は金属削片物に由来するものではなく, 金属修復物の溶出に由来するものと考えられた.





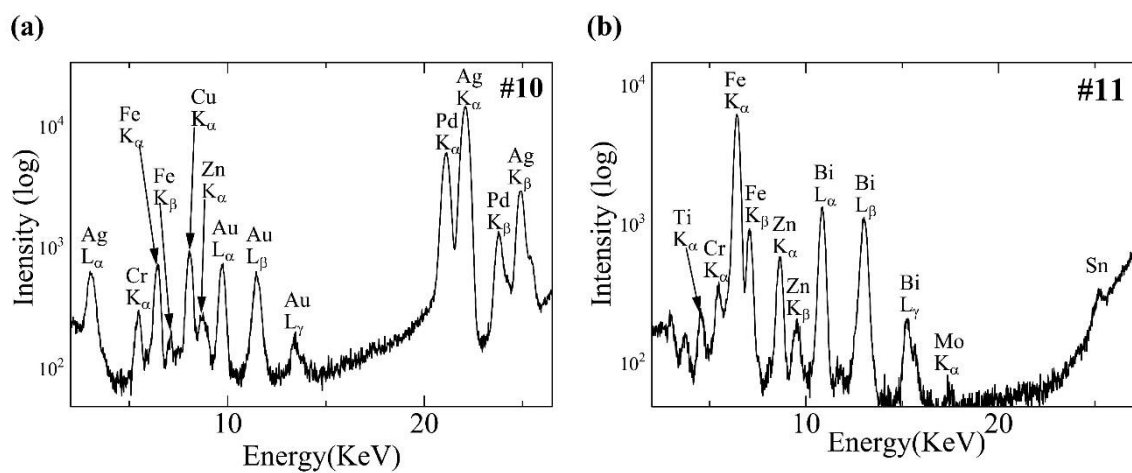
**Figure 2-4** 試料#12 の病理組織像（H-E 染色）および SR-XRF による元素分布像（文献 33）

Fe, Cr そして Ni の明らかな局在が認められた．P の局在は炎症性細胞の浸潤領域と一致していた．



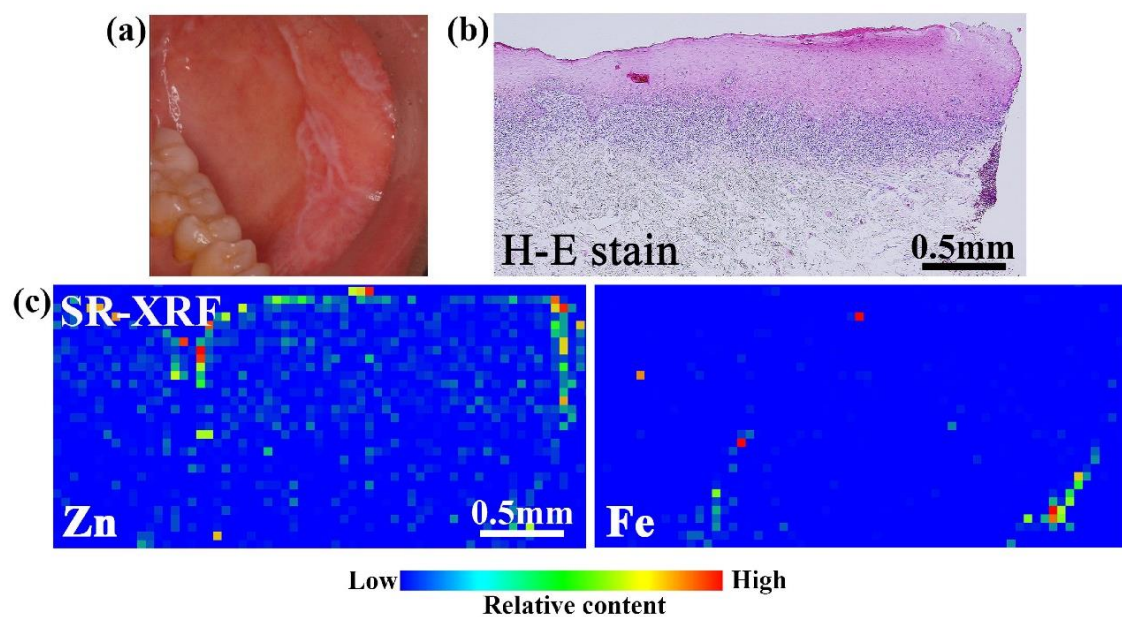
**Figure 2-5** Ni および Cr の K 吸収端 XAFS スペクトル (文献 33)

(a) Ni の K 吸収端 XAFS スペクトルは, Ni-foil のスペクトルとは異なり, Ni(OH)<sub>2</sub> のスペクトルと酷似していた. (b) Cr の K 吸収端 XAFS スペクトルは, Cr 金属のスペクトルとは異なり, Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> のスペクトルと酷似していた.



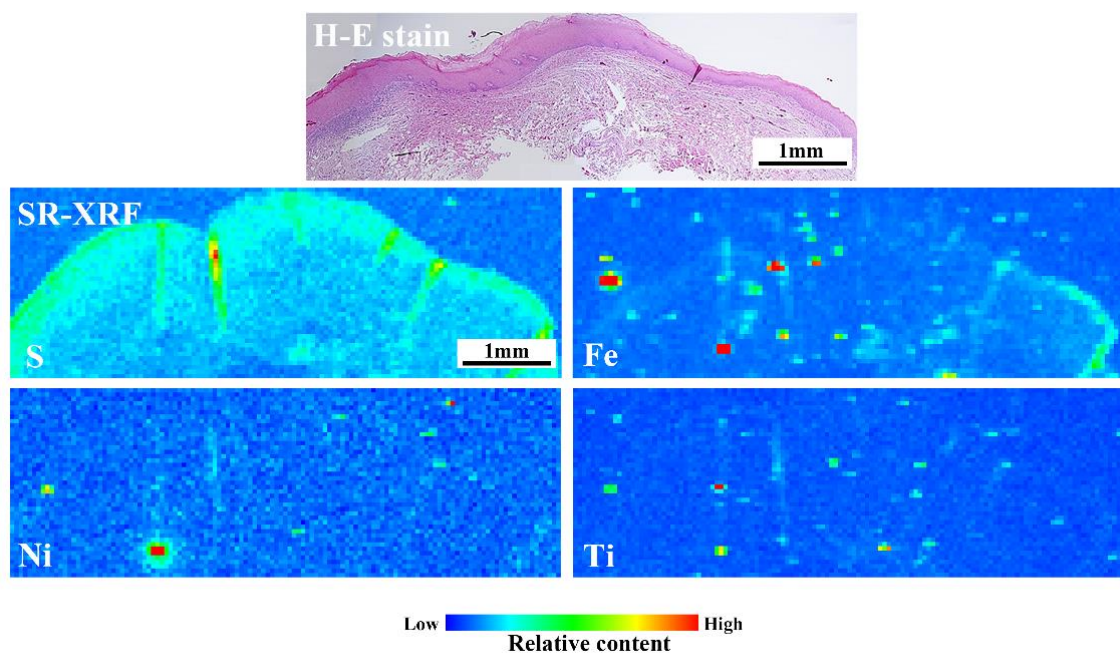
**Figure 2-6** 試料#10 および#11 の蛍光 X 線スペクトル (文献 33)

(a) Ag, Pd, Au そして Cu のピークが認められた．これらは金銀パラジウム合金として歯科用金属材料として最も多く使用される合金の成分である．(b) Bi のピークが確認された．Bi は根管治療用材料に含有されている成分である．



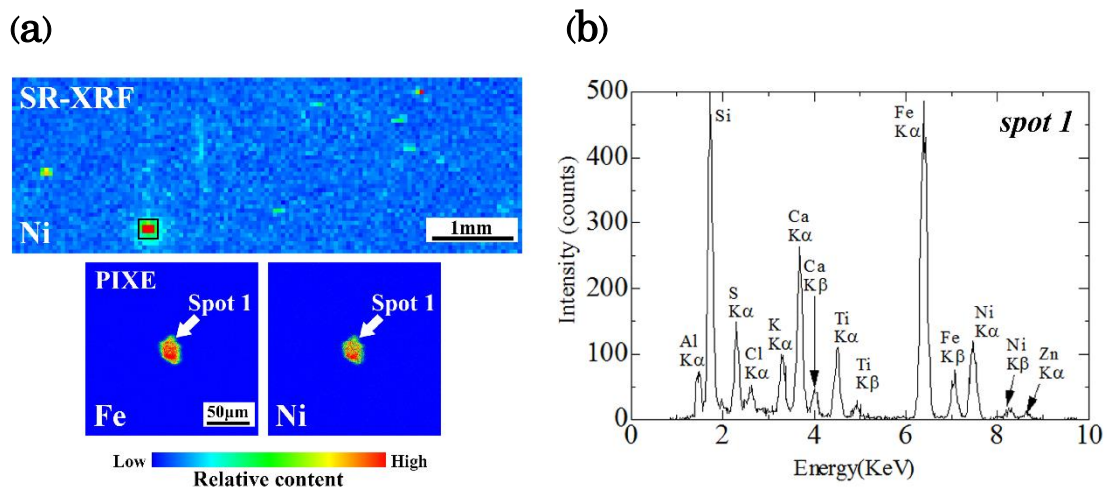
**Figure 2-7** 試料#4 の臨床写真 (a), 病理組織像 (H-E 染色) (b), SR-XRF による元素分布像 (c) (文献 33)

(a) 頬粘膜に過角化病変を認めたが、金属修復物は口腔内に装着されていなかった。(b) 粘膜上皮の肥厚、炎症性細胞の帯状浸潤、基底層の鋸歯状化を認めた。これらの所見は OLCL の病理組織学的所見 (Fig. 2-1b) と類似していた。(c) 明らかな金属元素の検出は認められなかった。Zn や Fe は試料全域に認められ局在性を有してはいなかった。



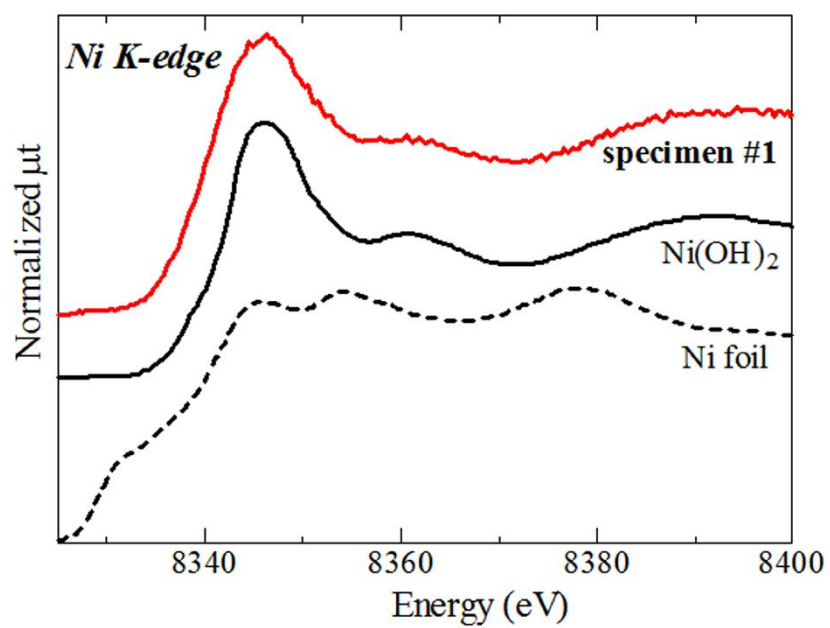
**Figure 2-8** 試料#D1 の病理組織像（H-E 染色）および SR-XRF による  
元素分布像（文献 28）

炎症性細胞の帯状浸潤領域よりもさらに深部で広域な Ni の集積を認めた。  
Fe や Ti の集積も同領域に認めた。



**Figure 2-9** マイクロ PIXE による微少部元素分布像 (a) および Spot 1 における特性 X 線スペクトル (b) (文献 28)

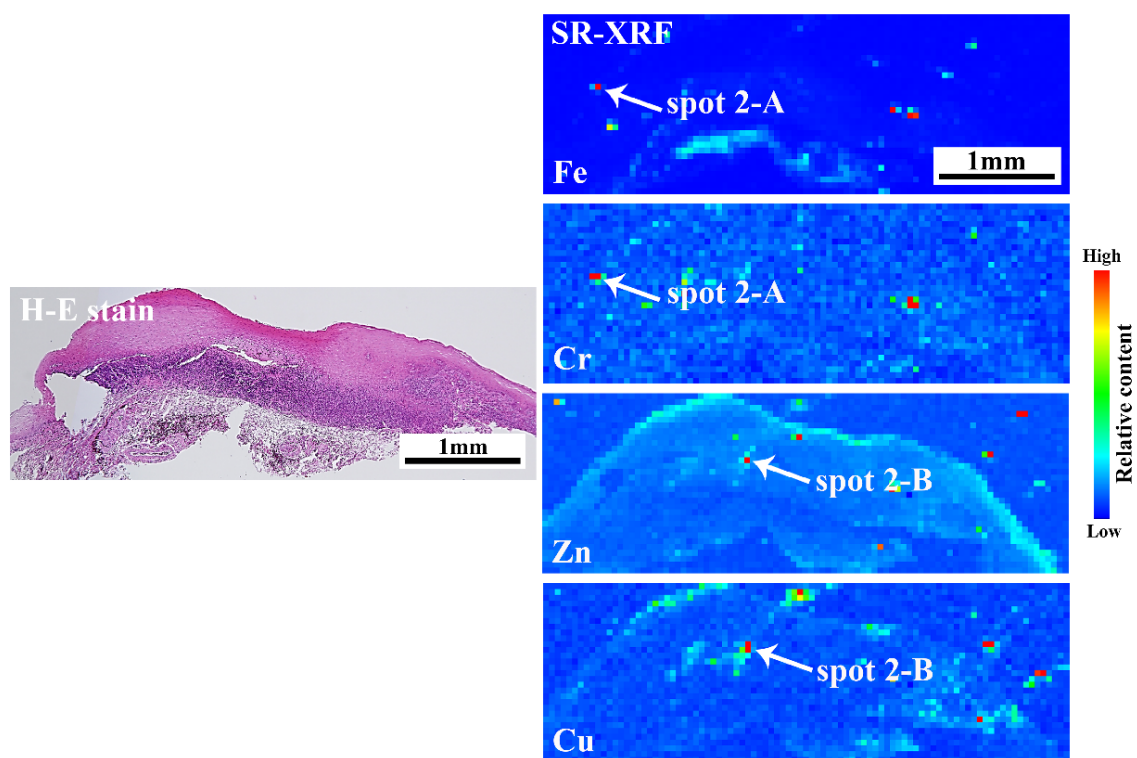
(a) 約 30~40μm という広い領域での Ni および Fe の拡散を認めた．いずれも中央ほ部ほど濃度が高かった．(b) Ni, Fe のピークに加え Al, Si, K, Ca, Ti, Zn のピークも認めた．



**Figure 2-10** Ni の K 吸収端 XAFS スペクトル (文献 28)

Ni の K 吸収端 XAFS スペクトルは、Ni-foil のスペクトルとは異なり、 $\text{Ni(OH)}_2$  のスペクトルと酷似していた。

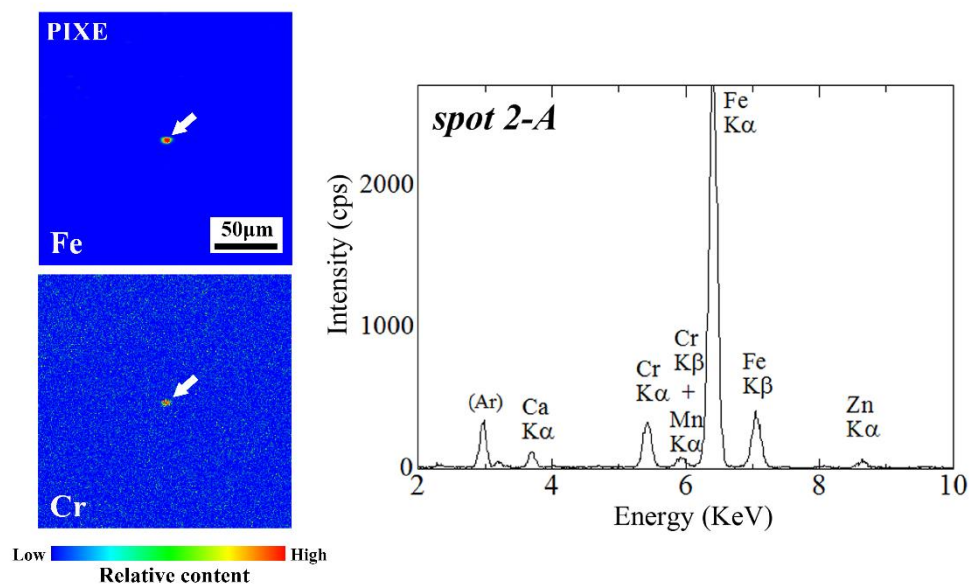




**Figure 2-11** 試料#D2 の病理組織像（H-E 染色）および SR-XRF による  
元素分布像（文献 28）

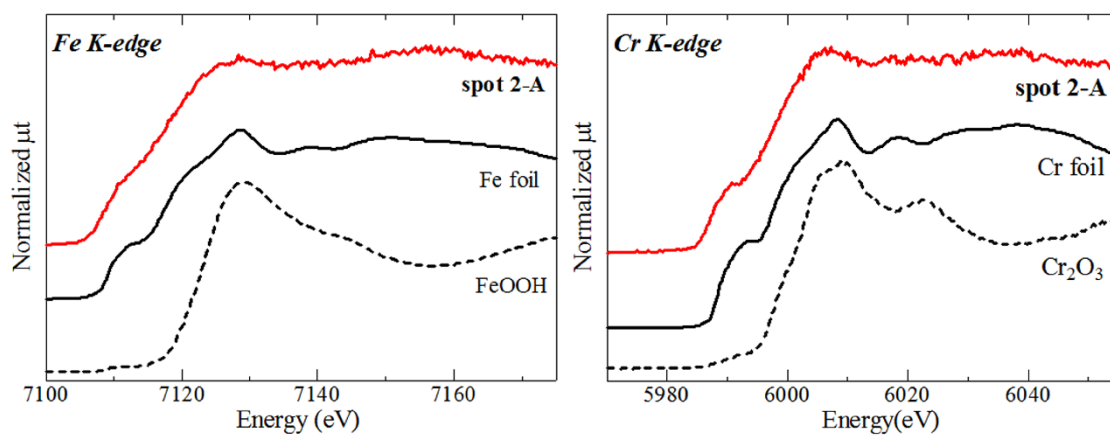
Fe, Cr, Zn, Cu の集積を認めたが、試料#D1 とは異なり、いずれも点状の集積であった。





**Figure 2-12** マイクロ PIXE による微量部元素分布像 (a) および Spot 2-A における特性 X 線スペクトル (b) (文献 28)

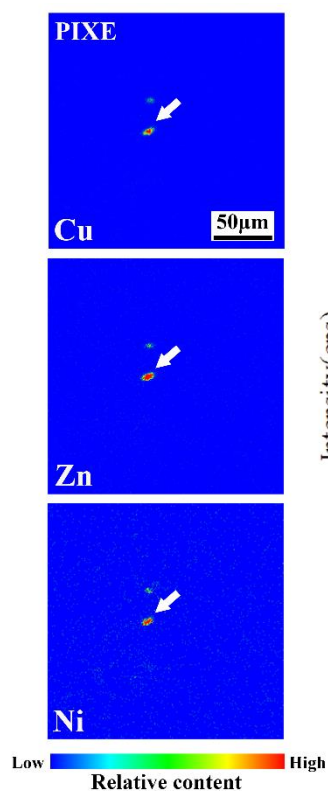
(a) 数ミクロンという極めて小さな点状で Fe と Cr の集積を認めた. (b) この spot (矢印) での特性 X 線スペクトルでは Fe や Cr 以外のピークは極めて弱く, S や P など生体に含有されるはずの元素のピークは認めなかった.



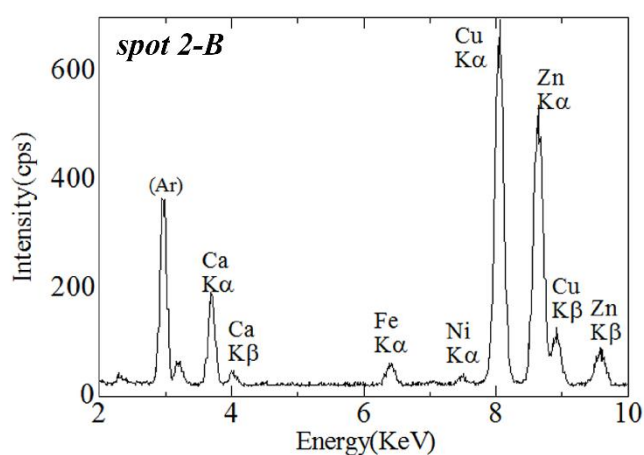
**Figure 2-13 Fe および Cr の K 吸収端 XAFS スペクトル (文献 28)**

Fe および Cr とともに、Fe-foil, Cr-foil のスペクトルと酷似しており、spot 2-A で検出された元素は金属状態で存在していることを示唆した。

(a)

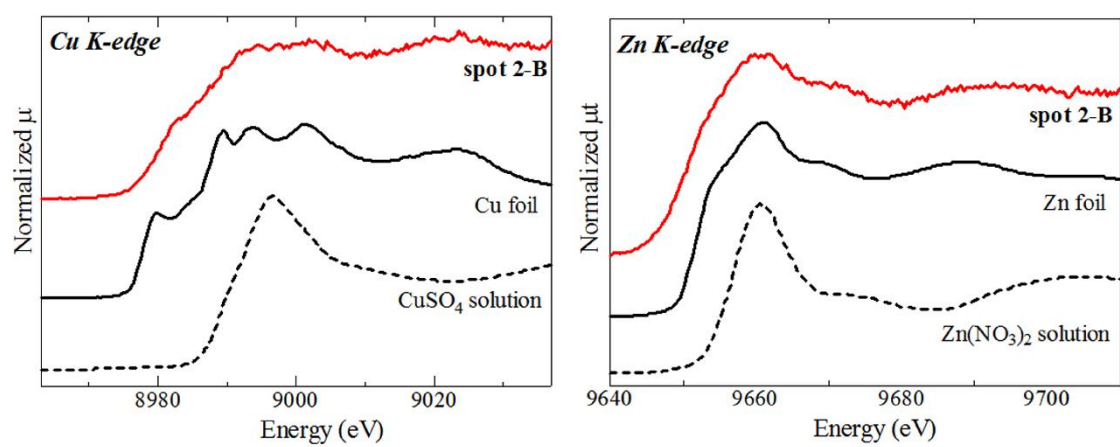


(b)



**Figure 2-14** マイクロ PIXE による微量部元素分布像 (a) および Spot 2-B における特性 X 線スペクトル (b) (文献 28)

(a) 約 10 ミクロン程度の小さな点状で Cu, Zn, Ni の集積を認めた. (b) この spot (矢印) での特性 X 線スペクトルでは Cu, Zn の著明なピークと Fe, Ni の弱いピークを認めた. 生体に含有される S や P などのピークは認めなかった.



**Figure 2-15 Cu および Zn の K 吸収端 XAFS スペクトル (文献 28)**

Cu および Zn とともに、Cu-foil, Zn-foil のスペクトルと酷似しており、spot 2-B で検出された元素は金属状態で存在していることを示唆した。

## 第三章 濃度換算試料の作製に関する研究

### 1. はじめに

病態と特定の元素との相関を知るためには、病理組織像と同じ視野で各元素の分布像を得る必要があり、SR-XRF 法は極めて有効な手法である。しかし、検出元素が正常値に比べて欠乏傾向にあるのか過剰傾向にあるのかを SR-XRF 分析で得られる蛍光 X 線強度 (count per second; cps) で判断するのは難しい。そこで、標準試料を用いた定量分析が必要である。これまでもエポキシ樹脂ブロック<sup>1)</sup>やメチルセルロースフィルム<sup>2)</sup>、溶液標準試料<sup>3)</sup>、噴霧フィルター型<sup>4)</sup>など様々な形状の標準試料が報告されているが、我々が使用する試料の多くはパラフィン包埋もしくは凍結試料から得られる薄切試料であり、同様の形状をした標準試料が必要である。しかも放射光での頻回の測定に耐えうる化学的安定性と耐久性が求められる。

そこで、本研究では歯科治療の際に歯質修復物として頻用される光重合型アクリル樹脂を用いて、フィルム状の濃度換算試料を作製した。

### 2. 方法

#### 2-1 ベースレジンモノマーの調整

歯質修復材料であるコンポジットレジンに使用される Bis-GMA(bisphenol A glycidyl-methacrylate, Shi-Nakamura Chemical Co., Ltd, Wakayama, Japan) と TEGDMA (triethyleneglycol dimethacrylate, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Tokyo, Japan) を重量比 1:2 で混合し、重合開始剤として過酸化ベンゾイル (TCI) 1.5 wt%, カンファークイノン (Sigma-Aldrich Co., LLC, Tokyo, Japan) 0.5 wt% を添加したものをベースモノマーとした。

## 2-2 フィルム状濃度換算試料の作製と検量線の作製

各金属元素成分は、Acetylacetonat として知られる有機金属化合物を使用した (Table 3-1). これらをベースモノマーで希釈し、濃度調整を行った. Cr, Fe, Ni, Zn は 0~500 ppm の間で濃度を調整し、Cu についてはベースモノマーへの溶解限界が 100 ppm であったため、40 ppm までの濃度で調整を行った. 各濃度に調整し完全に溶解されたモノマーをスライドガラス上に 100  $\mu$ l 滴下し、スライドガラスで圧接した. これを光重合用可視光照射器 (Demi Ultra, Kerr Corporation, Orange, CA, USA) で両面から光重合した. 重合条件は、波長 450~470 nm, 光度 1100 mW/cm<sup>2</sup>, 照射時間 片面 40 秒であった. その後、100°C に加熱して重合を完了させた. 硬化したフィルム状試料は注意深く剥離し、試料の厚みをマイクロメーター (Mitsutoyo Co., Ltd, Kanagawa, Japan) で 3 点計測し、その平均を各試料の厚みとした. その後、短冊状に切断し専用ホルダーに接着した (Figure 3-1). この試料の元素分布分析を SR-XRF を用いて行った. 元素分析条件の詳細は Table 3-2 に、元素分布像は Figure 3-2 に示す. 蛍光 X 線の強度平均値より検量線を作製した.

## 3. 結果と考察

フィルム状濃度換算試料より得られた検量線を Figure 3-3 に示す. Cr, Fe, Ni, Zn では 200 ppm 以下で相関係数 0.99 以上という直線性の高い検量線が得られた (Figure 3-3a). Cu では acetylacetonate のベースモノマーへの溶解度が低いことから検量線として得られる最高濃度は 40 ppm と制限されたが、相関係数 0.96 という比較的直線性の高い検量線が得られた (Figure 3-3b).

Bis-GMA/TEGDMA 混合モノマーは歯科用充填材のベースモノマーとして一

般的に使用されていることからわかる通り、生体に対しての安全性が高く、重合物は湿潤環境下でも十分な耐久性を有するため、繰り返しの使用・長期保存に十分耐えうる。かつ、小型で安価な青色光照射器で重合可能なため、短時間での作製も可能である。本研究では金属 acetylacetonate を金属源として用いたが、モノマーに可溶であれば化合物はこれらに限定されず、多様な元素、濃度の濃度換算試料に応用が可能であり、生物標本の定量評価における濃度換算試料として極めて有用であると考えられた。

#### 4. 応用例 一口腔粘膜疾患組織中から検出された合金成分の定量評価―

第二章で述べた OLP と OLCL さらにコントロール試料に対して濃度換算評価を応用した。Table 3-3 に OLP, OLCL そして Control 試料における検出元素 (Ni, Cu, Zn, Cr) が最も高い点での蛍光 X 線強度と、Figure 3-3 の検量線を用いた濃度換算値を示す。Control では正常粘膜組織における元素濃度の報告値と近似した値であり<sup>5)</sup>、今回作製した濃度換算試料の正当性が確認された。OLCL での各元素濃度換算値は Control に比べて極めて高い値であり（検量線の範囲を超えるほど）、これら 4 元素の異常蓄積が明らかとなった。OLP でも元素濃度換算値は Control に比べて高い傾向にはあるものの、OLCL の濃度換算値に比べると 1 ～2 桁低く、OLCL 病変内での検出されたこれらの元素は生体由来ではなく歯科用合金に由来するものと考えられた。

生体組織中より検出された金属元素の場合、Ag のように生体に含有されるはずのない金属種の場合は外来由来と断定できるが、生体必須元素種の場合、組織中濃度を換算し、正常値から逸脱していることを確認する必要がある。この濃度換算試料は生体中の微量金属元素分析において極めて有用なツールである。

## 5. まとめ

本フィルム状濃度換算試料は作製行程が簡便であり，かつ複数回使用可能な高い耐久性を有していた．また，本手法はモノマーに対して溶解性を有する様々な有機金属化合物へ応用することが可能であり，生物標本の定量分析における標準試料として極めて有用であると考えられた．

## 6. 参考文献

1. Roomans GM, Van Gaal HLM. Organometallic and organometalloid compounds as standards for microprobe analysis of epoxy resin embedded tissue. *Journal of microscopy* **109**: 235-240, 1977.
2. Billiet J, Dams R, Hoste J. Multielement thin film standards for XRF analysis. *X Ray Spectrometry* **9**: 206–211, 1980.
3. Geraki K, Farquharson MJ, Bradley DA. Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study. *Physics in Medicine and Biology* **47**: 2327–2339, 2002.
4. Vanhoof C, Chen H, Berghmans P, Corthouts V, De Brucker N, Tirez K. A risk assessment study of heavy metals in ambient air by WD-XRF spectrometry using aerosol-generated filter standards. *X-Ray Spectrometry* **32**: 129–138, 2003.
5. 石橋修，杉山芳樹，中村ますみ，関山三郎．口腔健全粘膜の微量元素分析．岩手医科大学歯学雑誌 28(2): 76-84, 2003.
6. Sugiyama T, Uo M, Wada T, Omagari D, Komiyama K, Miyazaki S, Numako C, Noguchi T, Jinbu Y, Kusama M, Mori Y. Detection of trace metallic elements in oral lichenoid contact lesions using SR-XRF, PIXE, and XAFS. *Scientific Reports* **5**: 10672, 2015.



**Table 3-1 濃度換算に使用した有機金属系化合物の一覧**

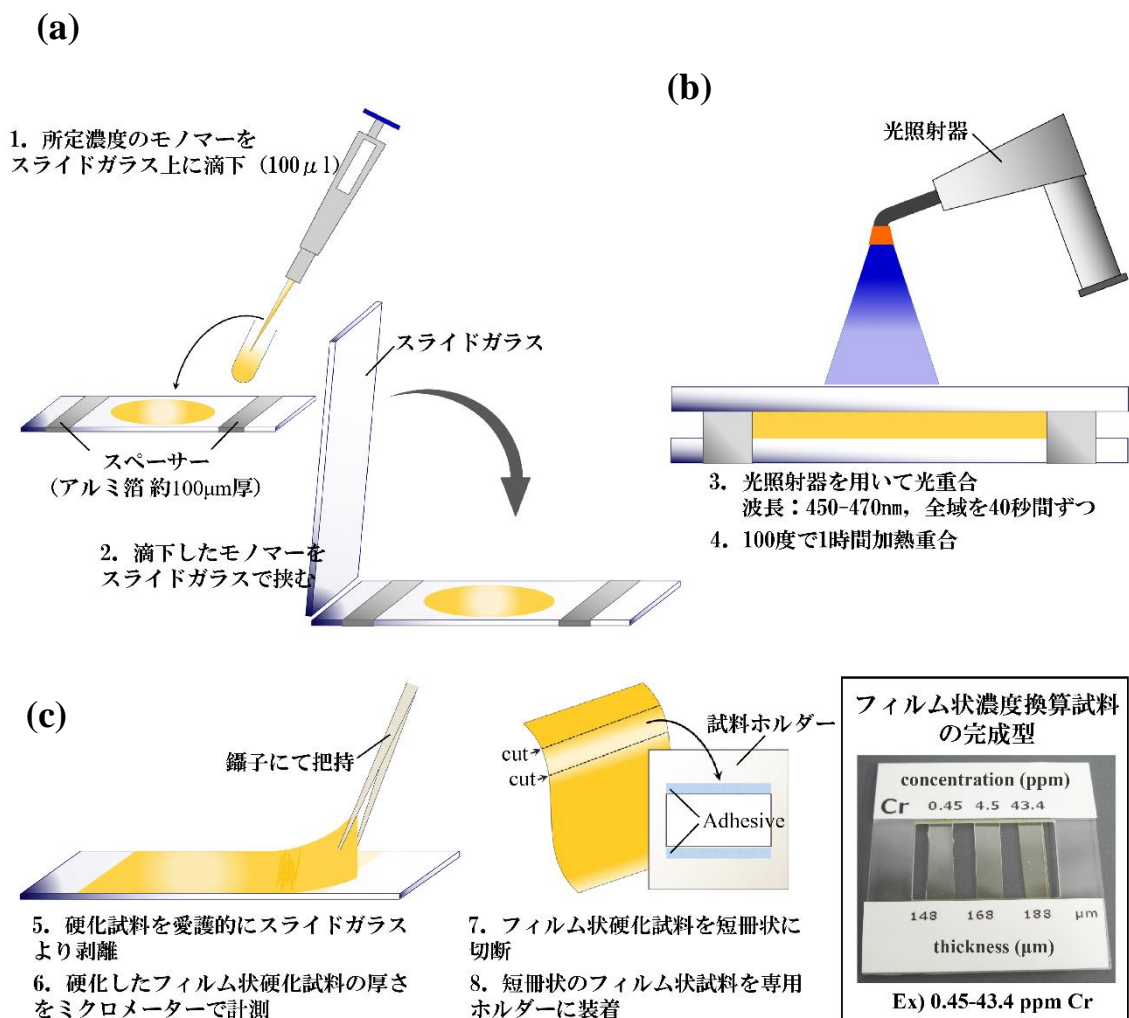
元素	化合物	会社
Cr	Tris(2,4-pentanedionato)chromium(III)	Dojindo, Kumamoto, Japna
Fe	Tris(2,4-pentanedionato)iron(III)	Dojindo
Ni	Tris(2,4-pentanedionato)nickel( II )hydrate	TCI
Cu	Tris(2,4-pentanedionato)copper( II )	Dojindo
Zn	Tris(2,4-pentanedionato)zinc( II )monohydrate	Dojindo

**Table 3-2 測定条件に関する詳細**

SR-XRF	施設・条件	BL-4A (Photon Factory, 高エネルギー加速器研究機構, Tsukuba, Japan) Electron-storage ring operated at 2.5 GeV and 450 mA Incident X-ray energy = 12.9 KeV Focal size = 20 $\mu$ m (obtained using polycapillary optics) Measurement step = 1 mm (1-sec steps)
	処理ソフト	PyMca (ESRF, Ver. 4.7.3)

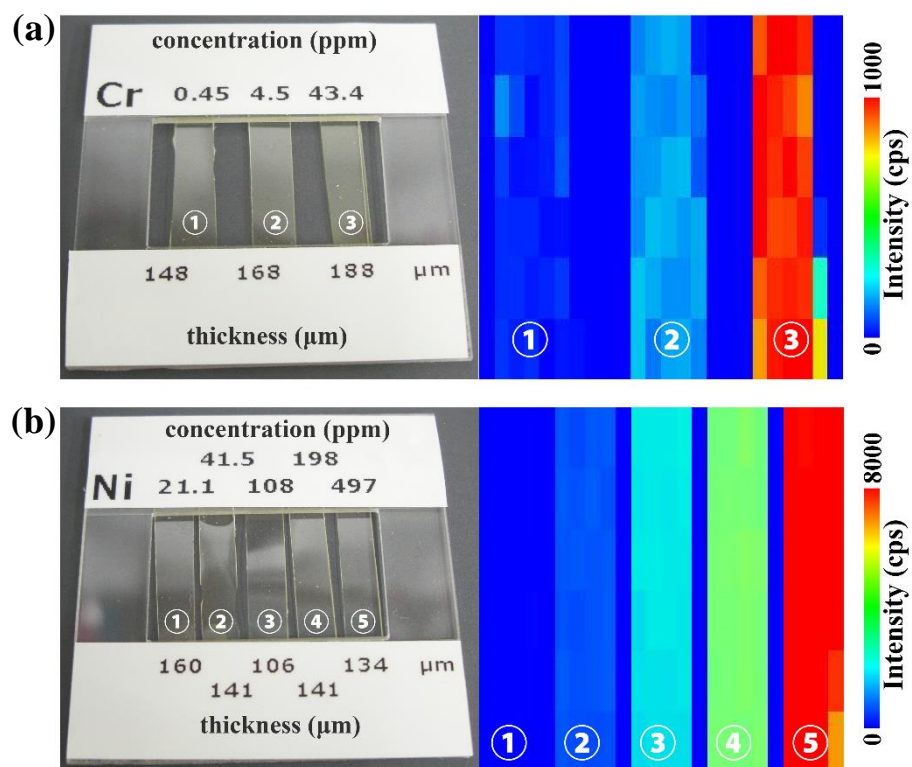
**Table 3-3 Ni, Cu, Zn および Cr の濃度換算値 (文献 6)**

No.	診断	Ni		Cu		Zn		Cr	
		counts (cps)	濃度換算値 (ppm)	counts (cps)	濃度換算値 (ppm)	counts (cps)	濃度換算値 (ppm)	counts (cps)	濃度換算値 (ppm)
#2	OLP	49	240.00	88	380.00	1253	>>1000	36	350
#12	OLCL	2082	>>1000	3160	>>1000	13783	>>1000	3922	>>1000
#C2	Control	35	34.00	72	37.00	636	420.00	26	50.00
正常値		7.86 $\pm$ 21.23		18.93 $\pm$ 26.34		66.19 $\pm$ 30.41		4.65 $\pm$ 6.85	



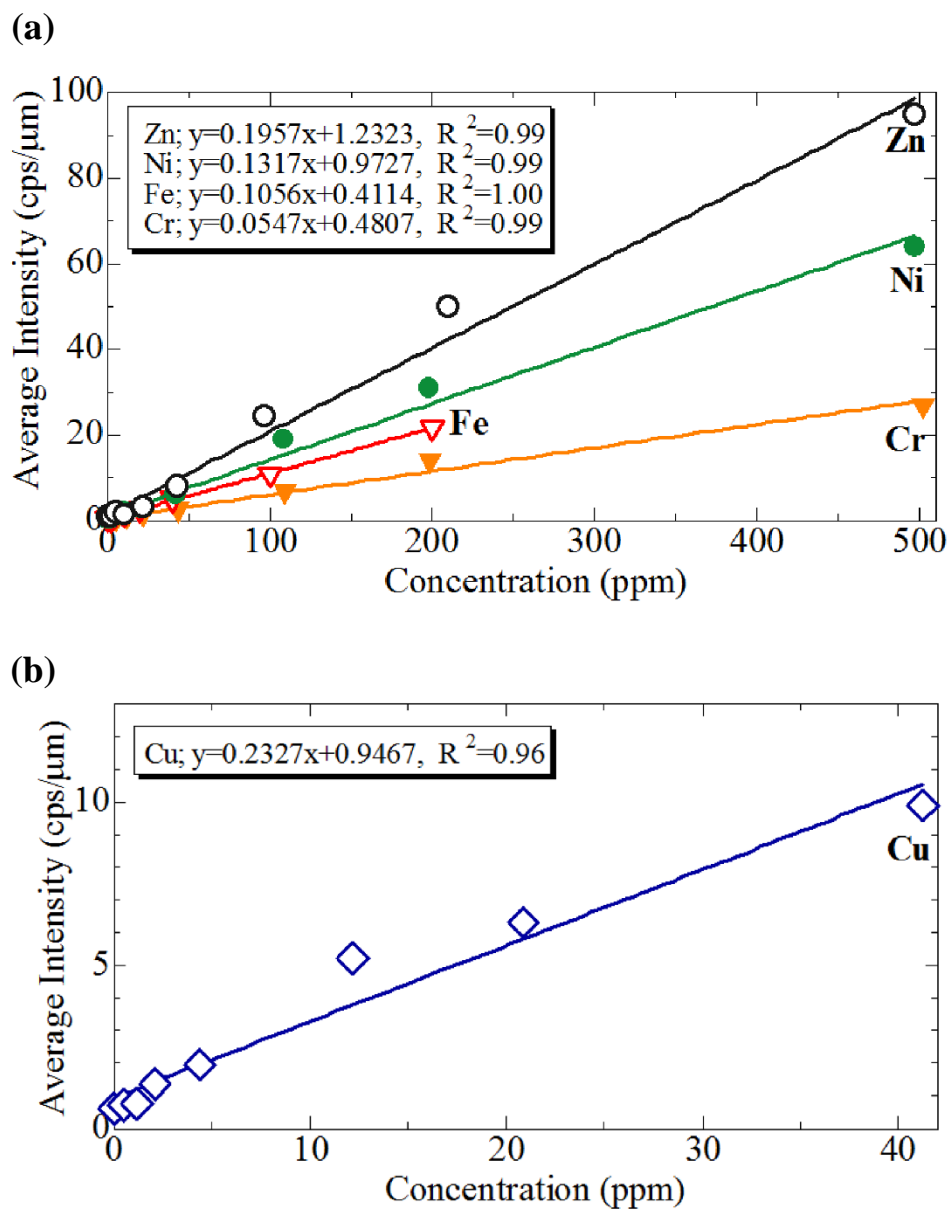
**Figure 3-1 SR-XRF 用フィルム状濃度換算試料作製の手順**

(a) フィルム状濃度換算試料の調整, (b) モノマーの重合, (c) 重合後試料の剥離・  
試料ホルダーへの固定



**Figure 3-2** SR-XRF 用フィルム状濃度換算試料と元素分布像

組織標本と同条件で BL-4A で元素分布測定を行った．(a) Cr の例，(b) Ni の例



**Figure 3-3** フィルム状濃度換算試料から得られた検量線

フィルム状濃度換算試料中の金属元素濃度と蛍光 X 線カウント数との関係

(a) Zn, Ni, Fe, Cr (b) Cu

## 第四章 新規金属アレルギーパッチテストの開発に関する研究

### 1. はじめに

金属アレルギーパッチテストは金属接触性皮膚炎の診断に際して臨床現場で広く用いられている検査法である。現在利用可能なパッチテストは様々な高濃度の金属塩水溶液で、これを染みこませたシートを皮膚へ貼付し、局所的にアレルギー反応を惹起させるものである (Figure 4-1a)。通常、パッチテストの試薬は酸性金属塩水溶液であるが<sup>1)</sup>、この試薬は高濃度であるため水疱形成などの皮膚刺激反応を引き起こすだけでなく、偽陰性や偽陽性<sup>2)</sup>を示すことがしばしばある<sup>3-5)</sup>。これに対し、実際の金属アレルギーは中性に近い環境下で金属材料からの持続的な金属イオン溶出により引き起こされるものであり、その濃度は低い。したがって、pH や金属イオン濃度、皮膚への浸透量などは実際の金属アレルギーが発症する環境と現在のパッチテストでは大きく異なっていると言える。

理想的なパッチテストは金属材料からの金属イオン溶出を再現したものではなくてはならない (Figure 4-1b)。そこで、過去にはパッチテストの金属溶出源として粗粒の金属粒子が使用されていたこともあるが<sup>6)</sup>、粗粒では比表面積が小さいため、金属イオンの溶出量が金属アレルギーを誘発するには不十分であった<sup>7,8)</sup>。

前述のようなパッチテストにおける問題を解決するため、我々は粒径 40～50 nm の Ni 微小粒子（以後、Ni ナノボール）を使用した (Figure 4-1c)。このナノボールは電極表面でのプラズマ放電による融解で得られる<sup>9)</sup>。40～50nm という微小粒径のため、Ni ナノボールがパッチテストの試薬として十分なイオン溶出

を示すことが期待された. 我々が提案する新規パッチテストシステムでは, Ni ナノボール懸濁液を透析用チューブに封入したものを使用した (以後, Ni ナノボールパック). Ni イオンはナノボールパックから透析膜を介してマウス皮膚へ浸透するので, Ni ナノボールと皮膚との直接的な接触を回避することが可能である. 我々は, *in vitro* で Ni イオン溶出量を, *in vivo* でマウス皮膚を用いた実験を行った. 皮膚中の Ni 分布分析は SR-XRF, マイクロ PIXE により, さらに Ni 浸透部での化学状態は XAFS にて評価した.

## 2. 方法

### 2-1 Ni ナノボール懸濁液の調整および Ni イオン放出能に関する *in vitro* 研究

Ni ナノボールは Toriyabe らの方法で作製した<sup>9)</sup>. 蒸留水と pH=5.8 の 0.1M リン酸緩衝液 (PBS) に Ni ナノボールを分散し, 500 ppm の Ni ナノボール懸濁液を調整した. Ni イオン放出の *in vitro* 評価では, 透析膜を介して Ni イオンの放出を評価できる装置を作製して行った (Figure 4-2a). 内筒には蒸留水および PBS (pH=5.8) で調整した 500 ppm の Ni ナノボール懸濁液 500  $\mu$ L を充填し, 蒸留水 2500  $\mu$ L を満たした外筒に 1 時間から 7 日間, 浸漬した. 外筒内の蒸留水への Ni イオン溶出量評価は比色定量試薬である Nitro-PAPS を使用した. この試薬は試料内の Ni と錯体を形成し, 吸光度 568 nm 付近で特異的な吸収を示す (Figure 4-3). そこで, 透析膜を介して Ni ナノボール懸濁液より放出された Ni イオンを含む外液 500  $\mu$ L を 20 ppm の Nitro-PAPS 溶液 2.0 mL と混合し, Yamashita らの方法<sup>10)</sup>に従って, 分光光度計 (UV-Vis) により Ni イオン濃度を評価した. Ni 標準試料 (0.2-10 ppm) は 1 mg/mL の  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  溶液を蒸留水に希釈して調整した.

### 2-2 マウス皮膚への Ni イオン拡散分布に関する *in vivo* 研究

実験には 45～75 週齢の C57BL6 系マウスを用いた。動物実験は NIH のガイドラインに基づき、共同研究先である日本大学動物実験委員会の承認の下に行われた。全身麻酔下にマウス背部皮膚を脱毛し、現行パッチテストおよび Ni ナノボールパック（約 20 mL の Ni ナノボールを注入した透析チューブの両端をクリップで封鎖したもの）をフィルムドレッシングで貼付固定した（Figure 4-4）。皮膚への貼付時間は 30 分から 24 時間とし、一定の貼付時間経過後にマウスを安楽死させ、現行パッチテストおよび Ni ナノボールパックを皮膚より愛護的に除去し、これらが接触していた皮膚面を切除して即時凍結保存した。その後、Kubota らの方法<sup>11)</sup>に従い、OCT コンパウンドに試料の下端を包埋し、分析対象領域となる試料上方部をクライオスタットを用いて 20  $\mu\text{m}$  厚に薄切した切片（Figure 4-5）をカプトンフィルム®上に貼付・乾燥し、各種分析に供した。皮膚組織内へ浸透、拡散した Ni イオンが OCT コンパウンドへ流出するのを防ぐため、薄切該当領域に OCT コンパウンドを接触させないように留意した。隣接切片は H-E 染色を施し病理組織学的に評価した。

*In vivo* 研究に使用した薬品、材料、装置に関する詳細は Table 4-1 に記す。

### 2-3 元素分布分析および化学状態分析、Ni 濃度換算評価

元素分布分析は SR-XRF を用いて行い、さらに高解像度の元素分布分析はマイクロ PIXE を用いて行った。Ni ナノボールやマウス皮膚へ拡散した Ni の化学状態は XAFS 分析により行った。測定条件の詳細は Table 4-2 に記す。さらにマウス皮膚内に浸透した Ni 濃度は、第三章で述べた定量評価用濃度換算試料から得られた検量線（Figure 3-3）を用いて評価した。

## 3. 結果と考察

### 3-1 Ni イオン放出能に関する *in vitro* 研究

*In vitro* における Ni 放出量の経時変化を Figure 4-2b に示す. Ni の持続的な放出が認められた. pH=5.8 の PBS 中へ分散された Ni ナノボール懸濁液からの Ni イオン放出量は, 蒸留水中へ分散された Ni ナノボール懸濁液からの Ni イオン放出量より高かった. これは, Ni 溶解度が酸性溶液中で増加するという過去の報告に一致していた<sup>12,13)</sup>. 現行の Ni パッチテスト試薬は pH=3.8 で, 通常約 5.0 程度であるヒト皮膚の pH より明らかに低いことより<sup>14)</sup>, pH=5.8 の Ni ナノボール懸濁液がヒト皮膚を刺激する可能性は極めて低いと考えられた. さらに, 今回開発したシステムでは Ni 溶出量を pH 濃度の調整により制御することも可能であった.

### 3-2 マウス皮膚への Ni イオン分布に関する *in vivo* 研究

Figure 4-6 は現行のパッチテストおよび Ni ナノボールパックを 24 時間貼付したマウス皮膚断面の病理組織像 (H-E) および元素分布像である. 現行のパッチテストでは局所に限局した Ni の高濃度領域を認めるのに対し, Ni ナノボールパックでは, 貼付部位からの皮膚への均一な Ni 浸透が明らかであった. さらに Box 領域に対して行ったマイクロ PIXE による高解像度元素分布分析では, 現行のパッチテストでは Ni 濃度が上皮で顕著に集積しているのに対し, Ni ナノボールパックでは上皮側から基底層を超えて内方の結合組織層まで連続的な Ni の浸透を認めた. また, P の分布より Ni ナノボールパックから溶出した Ni は皮膚の局所的炎症性反応を惹起している可能性が示唆された.

Figure 4-7 は Ni ナノボールパックを貼付したマウス皮膚への Ni 浸透量の時間変化を示す. Figure 4-7a は皮膚断面の Ni 分布像を, Figure 4-7b は試料全域 (Figure 4-7a) での Ni の蛍光 X 線強度の総計を示す. Ni ナノボールパックでは皮膚中の



Ni 量が 24 時間まで直線的かつ時間依存的に上昇した．これに対し，現行の Ni パッチテストの場合には，貼付 30 分で Ni 濃度が急激に上昇した．さらに 24 時間後では Ni ナノボールパック貼付後の浸透 Ni 総量のおよそ 3 倍もあった．

現行のパッチテストを 24 時間貼付した皮膚における蛍光 X 線強度の最高値は約 8000 cps であり，これを濃度換算すると約 3000 ppm という極めて高濃度の Ni 局在であることが解った．一方，Ni ナノボールパックを貼付した皮膚における蛍光 X 線強度の最高値は約 700 cps であり，これを濃度換算すると約 250 ppm 程度となった．現行パッチテストにおける過度な Ni 濃度は副症状を引き起こす可能性があり，パッチテストの信頼性を低下させる原因となり得る．これに対して，Ni ナノボールパックからの緩徐かつ持続的な Ni 浸透は，実際の金属アレルギー発症の環境と類似しており，Ni アレルギー反応を引き起こすのに最適な条件といえる．

Figure 4-7 (c, d) は Ni ナノボールおよび皮膚に浸透した Ni の K 吸収端 XAFS スペクトルを併せて示している．Ni ナノボールの XAFS スペクトルは金属状態の Ni (20%) と NiO (80%) の混合状態で良くフィットされた．これは Ni ナノボールの大部分が保存中に酸化されたことを示唆している．これに対し，皮膚に浸透した Ni のスペクトルは NiSO<sub>4</sub> のスペクトルに類似しており，Ni ナノボールの主成分である NiO のそれとは異なっていた．このことより，Ni ナノボールから溶出したのは Ni イオンであり，これは透析膜を介して確実に皮膚へ浸透していることが推測された．

実際の金属アレルギーの発症は，低濃度かつ持続的な金属溶出とその皮膚浸透がおこる環境下で認める．本研究では，弱酸性の条件下で Ni ナノボールパックから Ni イオンを徐放することが可能であることを示した．近年，ナノ材料が有する生体毒性が懸念されている<sup>20-13)</sup>．それゆえ本研究では Ni ナノボールの持

つ高い比表面積を用いてナノボールと皮膚の直接的な接触を回避しつつNi イオンを効率的に溶出させ、局所的な Ni アレルギーを惹起させることを意図した。

#### 4. まとめ

高い金属イオンやカウンターイオン濃度、および酸性 pH は現在利用可能な金属アレルギーパッチテストの信頼性を下げる要因となっている。本研究では、これらの欠点を克服した最先端のパッチテストとしての可能性を秘めた試験法を提唱した。現在のパッチテストのもう一つの欠点は、実施可能な金属種が限られている点である。本研究で用いた Ni ナノボールの作製法は、多くの純金属および合金に対して応用可能であり、他の金属アレルギー診断への応用が期待される。動物およびヒトの皮膚に対するアレルギーに関する更なる研究を行うことで、我々が開発した新規パッチテストシステムは金属アレルギーの診断精度を向上させることが期待される。

#### 5. Abbreviations

PBS: Phosphate buffer solution; Nitro-PAPS: 2-(5-Nitro-2-pyridylazo)-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl)-amino]phenol disodium salt dehydrate

#### 6. 参考文献

1. Endo K, Ohno H, Kawashima I, Yamane Y, Yanagi T. Reliability of patch testing for metal hypersensitivity: Stability of metal ions and solution pH. *Shika Zairyo, Kikai* **24**:82, 2005.
2. Mitchell J, Maibach HI. Managing the excited skin syndrome: patch testing hyperirritable skin. *Contact Dermatitis* **37**:193–199, 1997.

3. Mowad CM: Patch testing. pitfalls and performance. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **6**:340–344, 2006.
4. Diepgen TL, Coenraads PJ. Sensitivity, specificity and positive predictive value of patch testing: the more you test, the more you get? ESCD Working Party on Epidemiology. *Contact Dermatitis* **42**:315–317, 2000.
5. Fischer T, Rystedt I. False-positive, follicular and irritant patch test reactions to metal salts. *Contact Dermatitis* **12**:93–98, 1985.
6. Thyssen JP, Menné T, Schalock PC, Taylor JS, Maibach HI. Pragmatic approach to the clinical work-up of patients with putative allergic disease to metallic orthopaedic implants before and after surgery. *British Journal of Dermatology* **164**:473–478, 2011.
7. Midander K, Pan J, Wallinder IO, Heim K, Leygraf C. Nickel release from nickel particles in artificial sweat. *Contact Dermatitis* **56**:325–330, 2007.
8. Larese F, Gianpietro A, Venier M, Maina G, Renzi N. In vitro percutaneous absorption of metal compounds. *Toxicology Letters* **170**:49–56, 2007.
9. Toriyabe Y, Watanabe S, Yatsu S, Shibayama T, Mizuno T. Controlled formation of metallic nanoballs during plasma electrolysis. *Applied Physics Letters* **91**:041501, 2007.
10. Yamashita S, Abe A, Noma A. Sensitive, direct procedures for simultaneous determinations of iron and copper in serum, with use of 2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino)phenol (nitro-PAPS) as ligand. *Clinical Chemistry* **38**:1373-1375, 1992.
11. Kubo A, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki H, Nagao K, Ohashi Y, Amagai M. The stratum corneum comprises three layers with distinct metal-ion barrier properties.

*Scientific Reports* **3**:1731, 2013.

12. Palmer DA, Bénézech P, Xiao C, Wesolowski DJ, Anovitz LM. Solubility measurements of crystalline NiO in aqueous solution as a function of temperature and pH. *Journal of Solution Chemistry* **40**:680–702, 2011.
13. Plyasunova NV, Zhang Y, Muhammed M. Critical evaluation of thermodynamics of complex formation of metal ions in aqueous solutions. IV. Hydrolysis and hydroxo-complexes of Ni<sup>2+</sup> at 298.15 K. *Hydrometallurgy* **48**:43–63, 1998.
14. Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International Journal of Cosmetic Science* **28**:359–370, 2006.
15. Wahlberg JE. Nickel: the search for alternative, optimal and non-irritant patch test preparations: Assessment based on laser Doppler flowmetry. *Skin Research Technology* **2**: 136–141, 1996.
16. Wahlberg JE. Nickel chloride or nickel sulfate? Irritation from patch-test preparations as assessed by laser Doppler flowmetry. *Dermatologic Clinics* **8**: 41–44, 1990.
17. Tanojo H, Hostýnek JJ, Mountford HS, Maibach HI. *In vitro* permeation of nickel salts through human stratum corneum. *Acta Dermato-Venereologica* **212**: 19–23, 2001.
18. Hostýnek JJ, Dreher F, Pelosi A, Anigbogu A, Maibach HI. Human stratum corneum penetration by nickel; In vivo study of depth distribution after occlusive application of the metal as powder. *Acta Dermato-Venereologica* **212**, 5–10, 2001.
19. Hostýnek JJ, Dreher F, Nakada T, Schwindt D, Anigbogu A, Maibach, HI. Human stratum corneum adsorption of nickel salt; Investigation of depth profiles by tape

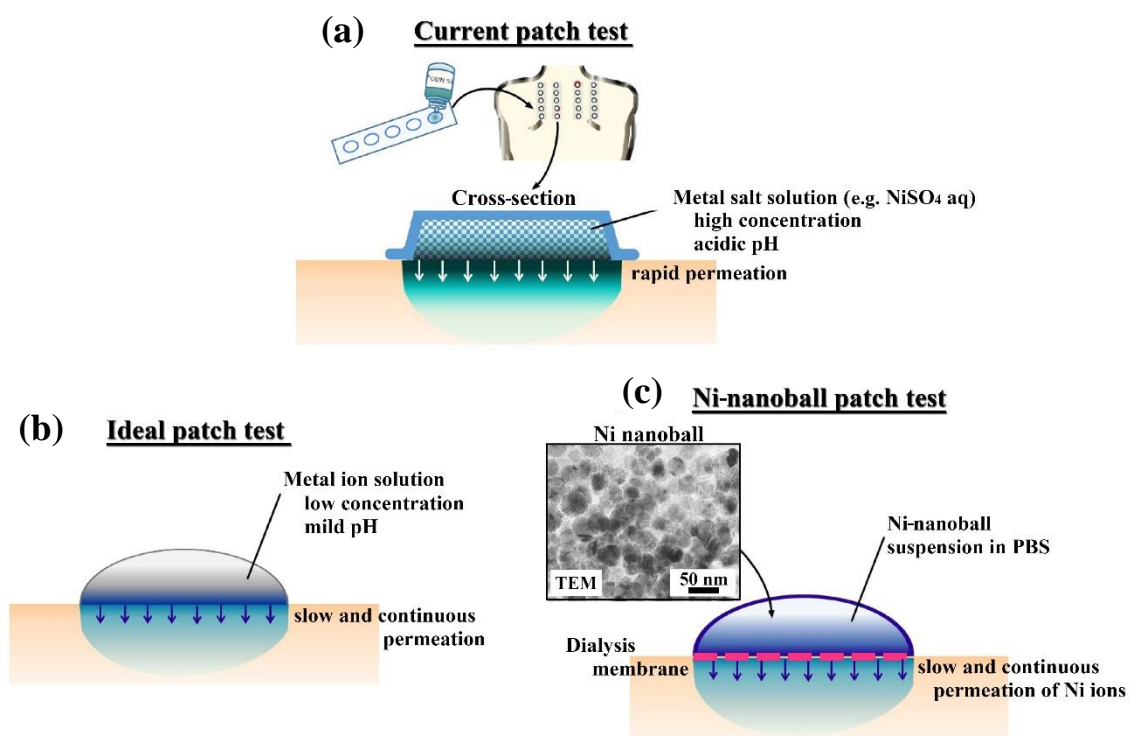
- stripping *in vivo*. *Acta Dermato-Venereologica* **212**, 11–18, 2001.
20. Auffan M, Rose J, Bottero JY, Lowry GV, Jolivet JP, Wiesner MR. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology* **4**:634–641, 2009.
  21. Kertész Z, Szikszai Z, Gontier E, Moretto P, Surléve-Bazeille JE, Kiss B, Juhász I, Hunyadi J, Kiss ÁZ. Nuclear microprobe study of TiO<sub>2</sub>-penetration in the epidermis of human skin xenografts. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **231**:280–285, 2005.
  22. Larese FF, Crosera M, Timeus E, Adami G, Bovenzi M, Ponti J, Maina G. Human skin penetration of cobalt nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology in Vitro* **27**:121–127, 2013.
  23. Larese FF, D’Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi N, Bovenzi M, Maina G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* **255**:33–37, 2009.
  24. Sugiyama T, Uo M, Wada T, Hongo T, Omagari D, Komiyama K, Sasaki H, Takahashi H, Kusama M, Mori Y. Novel metal allergy patch test using metal nanoballs. *Journal of Nanobiotechnology* **12**: 51, 2014.
  25. Sugiyama T, Uo M, Wada T, Hongo T, Omagari D, Komiyama K, Oikawa M, Kusama M, Mori Y. A method to visualize transdermal nickel permeation in mouse skin using a nickel allergy patch. *Bio-Medical Materials and Engineering* **26**: 1-8, 2015.

**Table 4-1 薬品, 材料, 装置に関する詳細**

薬品	比色定量試薬	Nitro-PAPS (Dojindo, Kumamoto, Japan)
	Ni 標準溶液	Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> solution (1000 ppm, AAS grade, Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan)
	市販のパッチテスト試薬	5% w/v NiSO <sub>4</sub> aq. (Torii Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan)
材料	透析膜 (in vitro)	Cellu-Sep Flat Sheet Membrane (average pore size: 15–50 Å; MWCO: 12,000–14,000; thickness: 25 µm; Membrane Filtration Products, Inc., Texas, USA)
	透析チューブ (in vivo)	Dialysis Membrane (average pore size: 25–50 Å; MWCO: 14,000; thickness: 20 µm; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
	Film dressing	Opsite™ Post-Op Visible (Smith & Nephew, London, UK)
	Kapton film	12.5 µm (Du Pont-Toray Co., Ltd, Tokyo, Japan)
	OCT compound	Optimum cutting temperature compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan)
装置	分光光度計	56171-K, 57052-K, and 63723 (Edmond Optics, Barrington, USA)
	マイクロトーム	Cryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)

**Table 4-2 測定条件に関する詳細**

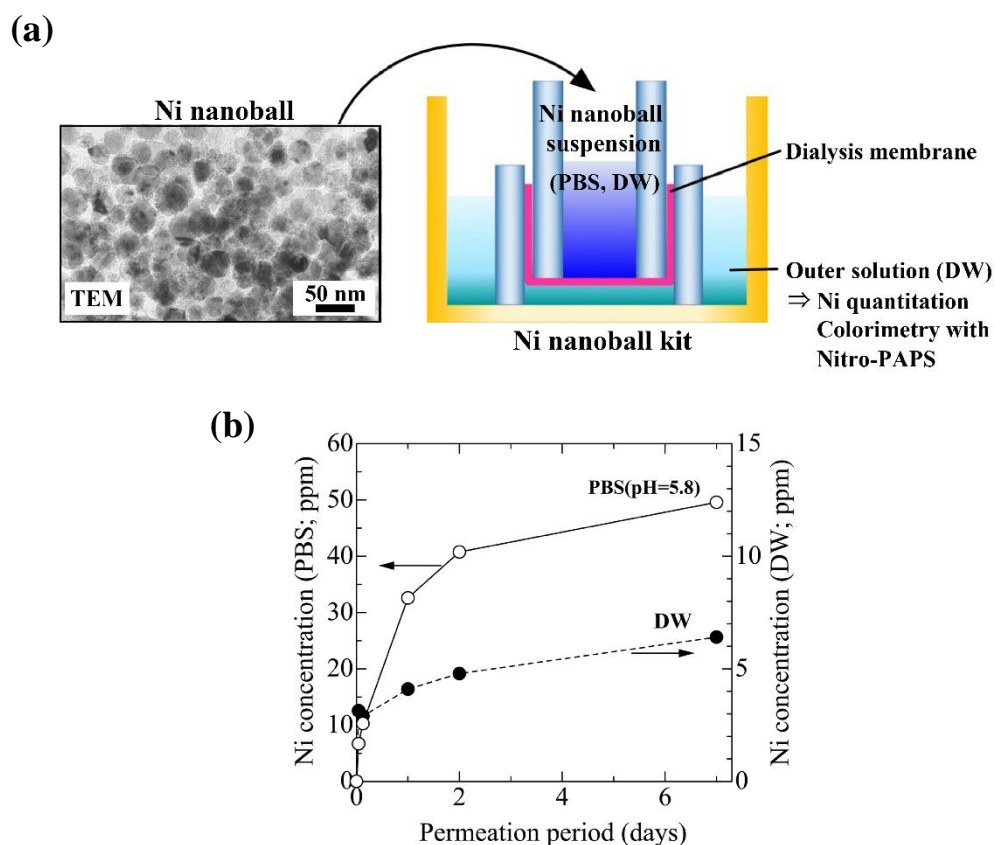
SR-XRF	施設・条件	BL-4A (Photon Factory, 高エネルギー加速器研究機構, Tsukuba, Japan) Electron-storage ring operated at 2.5 GeV and 450 mA Incident X-ray energy = 12.9 KeV Focal size = 20 $\mu\text{m}$ (obtained using polycapillary optics) Measurement step = 40 $\mu\text{m}$ (1-sec steps)
	処理ソフト	PyMca (ESRF, Ver. 4.7.3)
マイクロ PIXE	施設・条件	PASTA (放射線医学総合研究所, Chiba, Japan) Micro-focused proton beam (3.0 MeV, 2- $\mu\text{m}$ beam diameter, total irradiation = 200 nC)
	処理ソフト	OMDAQ2007 (Oxford Microbeams Ltd., Version 1.3.71.669)
XAFS	施設・条件	BL-4A and BL-9A (Photon Factory, 高エネルギー加速器研究機構, Tsukuba, Japan)
	方法	Ni nanoball, Ni foil, NiO (standard): Transmission method Skin specimen, NiSO <sub>4</sub> aq. (standard): Fluorescence method, a multi-element solid-state detector used (Canberra, Connecticut, USA)
	標準試料	Ni (foil), NiO (reagent grade), 5% w/v NiSO <sub>4</sub> aq. (commercial patch test solution)
	処理ソフト	REX2000 (Rigaku, Ver. 2.5)



**Figure 4-1** 様々なパッチテスト概念図（文献 24）

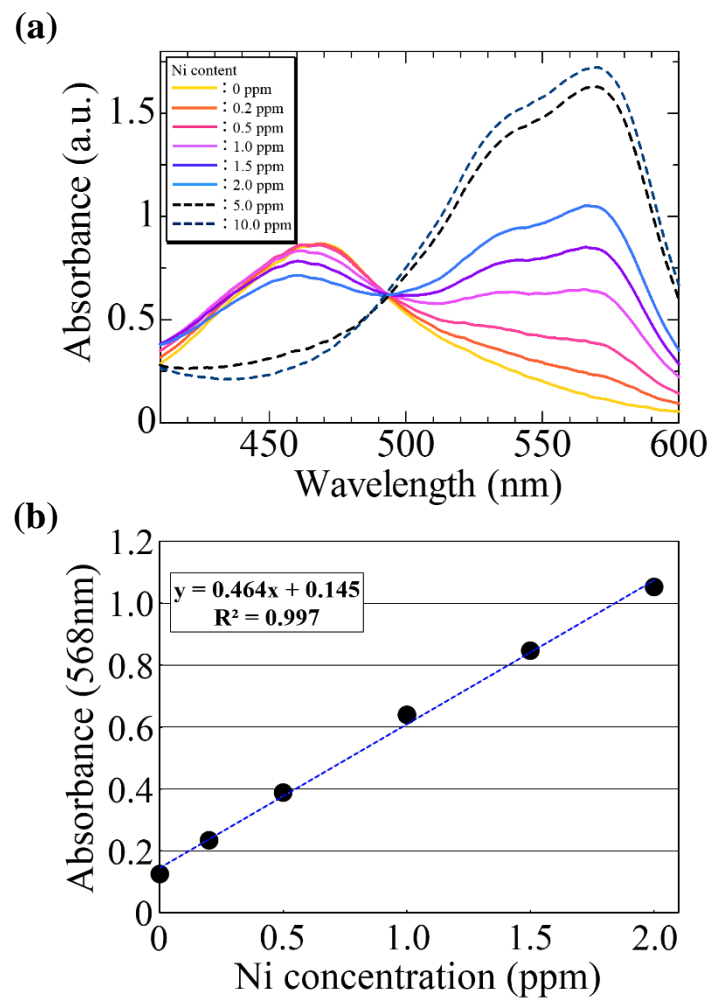
(a) 現行のパッチテストシェーマ, (b) 理想的なパッチテストシェーマ, (c) Ni ナノボールを用いた理想的なパッチテストのデザイン





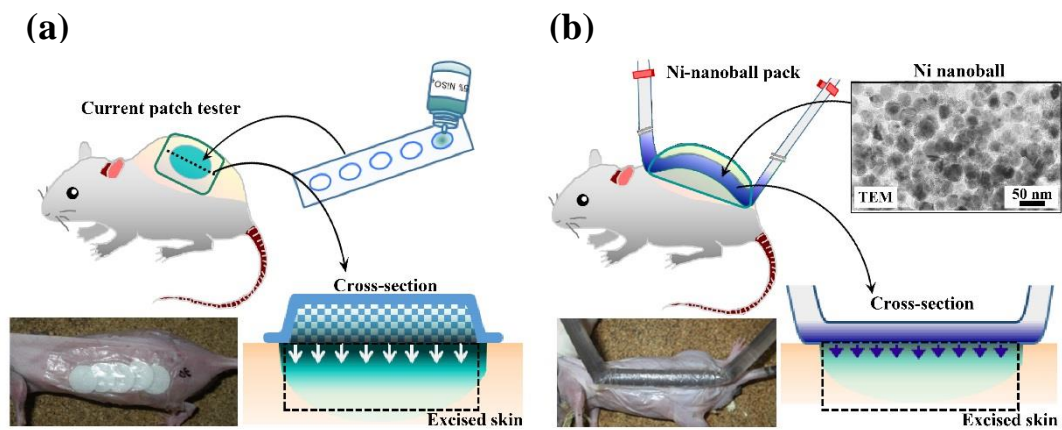
**Figure 4-2** 透析膜を介した Ni ナノボール懸濁液からの Ni 拡散実験における  
実験セットアップ (a) と Ni 拡散の経時的変化 (b) (文献 24)

(a) 内筒は蒸留水もしくは pH=5.8 の PBS 中に分散した 500 ppm の Ni ナノボール懸濁液 500  $\mu$ L, 外筒は蒸留水 2500  $\mu$ L を満たした. (b) pH=5.8 の PBS 中へ分散した Ni ナノボール懸濁液からの Ni イオン放出量の方が明らかに高かった.

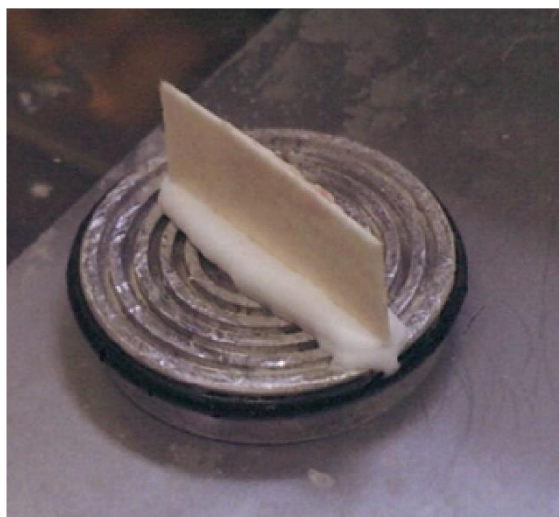


**Figure 4-3 Nitro-PAPS 溶液の光吸収スペクトルと検量線（文献 24）**

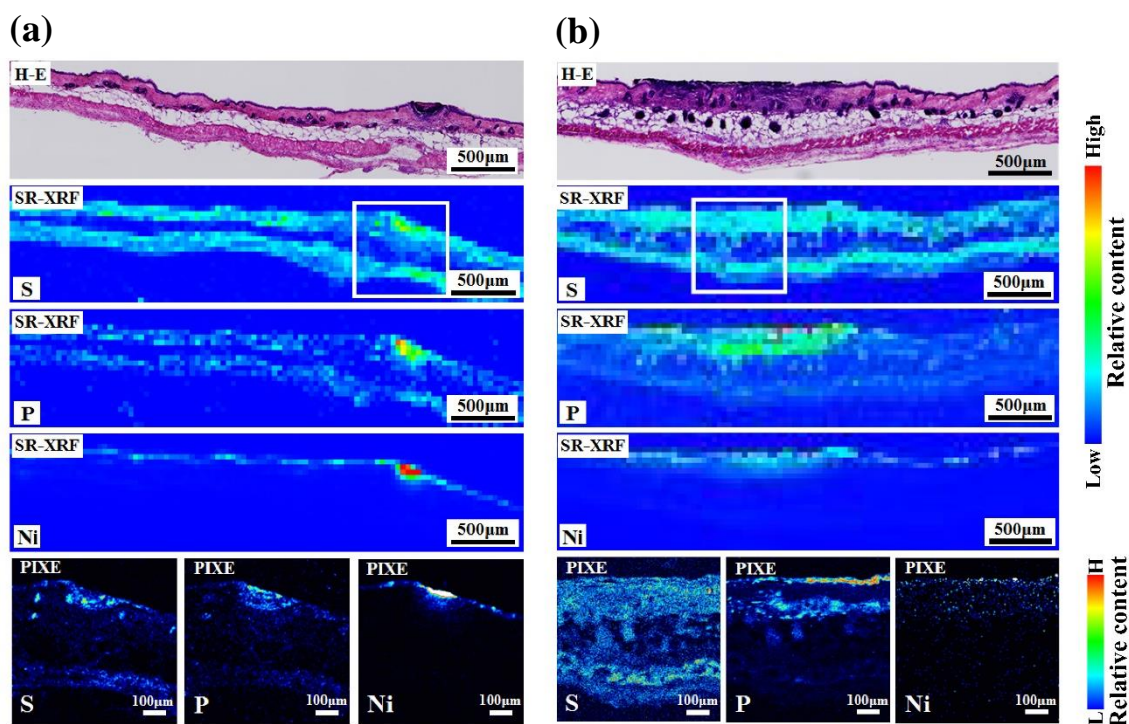
- (a) 様々な濃度の Ni イオン溶液を混和した Nitro-PAPS 溶液の光吸収スペクトル,  
 (b) 吸光度 568nm での Ni 検量線 Ni 濃度 0~2.0ppm では直線性の高い相関を得られた. Ni 定量評価はこの濃度内で測定できるよう試料を希釈して行った.



**Figure 4-4** 現行の Ni パッチテスト (a) および Ni ナノボールパック (b) からのマウス皮膚への Ni 拡散実験用セットアップ (文献 24 改)

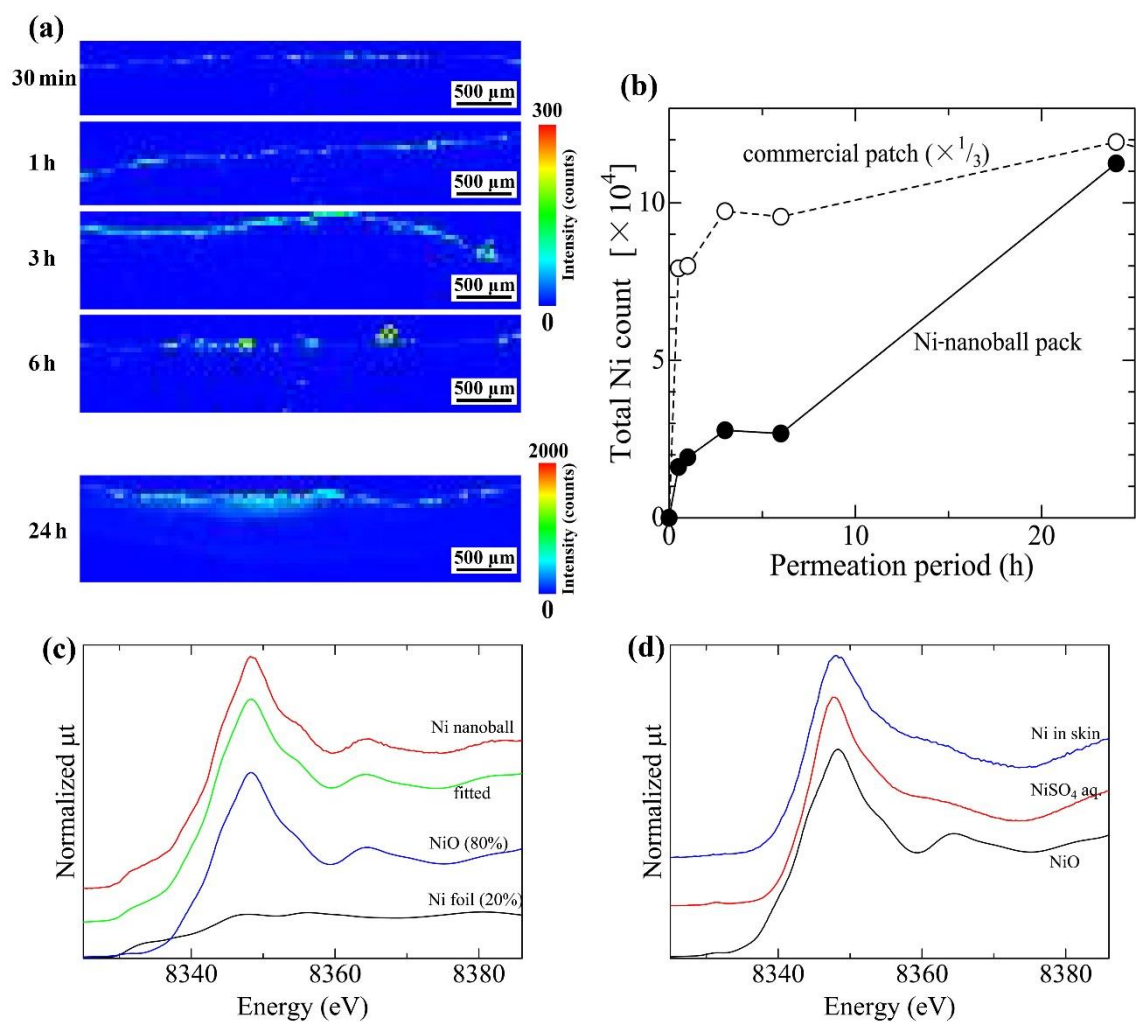


**Figure 4-5** OCT コンパウンドを使用した試料の薄切方法



**Figure 4-6** パッチテストを 24 時間貼付したマウス皮膚の断面における病理組織像および元素分布像 現行パッチテスト (a) および Ni ナノボールパック (b) (文献 24, 25 改)

(a) 現行のパッチテストでは局所に局限した Ni の高濃度領域を認めた. (b) Ni ナノボールパックでは, 貼付部位からの皮膚への均一な Ni 浸透が明らかであった. P の分布像より Ni ナノボールパックから溶出した Ni は皮膚の局所的炎症性反応を惹起している可能性が示唆された.



**Figure 4-7** 皮膚中の Ni 相対濃度の経時変化および Ni の化学状態 (文献 24)

(a) Ni ナノボールパックを 30 分～24 時間貼付したマウス皮膚断面における Ni 分布の経時変化 (b) Ni ナノボールパックおよび現行のパッチテストにおける Ni の蛍光 X 線強度総計の経時変化 (c) Ni ナノボールにおける Ni の K 吸収端 XAFS スペクトル (d) マウス皮膚の Ni 浸透部位での Ni の K 吸収端 XAFS スペクトル

## 第五章 結語

本研究では、SR-XRF や PIXE, XAFS という医学領域では未だ稀な高感度な分析手法を用いて、以下の知見を得た。

第二章においては、鑑別が困難とされている OLP と OLCL 試料を分析した。OLCL と診断された口腔粘膜試料より歯科用材料に由来する金属成分が検出され、一方、OLP やコントロールの口腔粘膜試料からは明らかな金属元素の検出は認められなかった。さらに OLCL 試料で検出された元素は金属状態ではなく、各検出元素が化学的に安定した水和物状態、硫化物状態、酸化物状態にあることが明らかとなった。つまり口腔内に装着されている金属修復物の溶出が蓄積したものであることを示唆する結果であった。OLP と OLCL は、両者の鑑別が困難であることを理由にステロイド軟膏を用いた対症療法が治療の主となっているが、本病態は癌化するとの報告もあり、臨床現場では診断基準と治療法の確立が強く望まれている。SR-XRF, マイクロ PIXE, XAFS 分析法の相補的な使用は、OLP と OLCL の鑑別診断に際して重要な情報となり、OLCL が金属溶出原因で発症していることを明らかにするものであった。近い将来、少なくとも金属溶出が原因であると同定できる OLCL に対しては、これまでの対症療法から脱却した根治療法を提供できるようになると期待された。

第三章では、SR-XRF 分析時に有用な濃度換算試料を作製した。この濃度換算試料は作製が簡便で、かつ高い耐久性を有しており、また様々な有機金属化合物へ応用することが可能であった。SR-XRF 法は高感度な優れた分析手法ではあるが、生物試料内から検出される蛍光 X 線強度 (cps) で生体への影響を評価する

ことは難しい．本研究で開発した濃度換算試料は生物標本における定量分析に極めて有効なツールであると考えられ，SR-XRF 法の医学応用の可能性が広がった．

第四章では，高い信頼性を有する新規金属パッチテストを開発した．金属アレルギーの診断には広く皮膚パッチテストが用いられるが，現行のパッチテストは信頼性が決して高い検査ではないことがかねてより問題になっている．本研究で開発したパッチテスト素材はナノボールという超微粒子を用いたシステムで，高効率にイオンを生成し，かつ低用量のイオンを連続的に皮膚に浸透させることが可能であった．これは実際の金属アレルギー発症と類似した環境下での検査が可能であることを示す結果であった．さらに，この新規パッチテストは現行では作製できない貴金属やチタンを含む殆どの金属や合金種で作製可能である．以上のことより，ナノボールを用いた新規パッチテストは，現行のアレルギーパッチテストの欠点を克服した理想的なパッチテストになり得ることが示唆された．

以上のように，SR-XRF，PIXE，XAFS という分析手法の導入により，これまで困難とされていた口腔粘膜疾患の新たな診断基準と治療法の確立が期待される結果を得た．また，最先端の金属アレルギーパッチテストの開発も可能であった．本手法は医学領域において有用なツールになり得ることが示唆され，未だ病態生理が明らかとなっていない他疾患の病態解明にも応用できることが期待された．



## 謝辞

本研究は、著者が自治医科大学大学院医学研究科博士課程在学中に、同大学歯科口腔外科学講座 森良之教授、草間幹夫名誉教授の指導のもとに行ったものです。研究を開始するにあたり環境を整備いただき、貴重なご助言・ご指導いただいたことに心より感謝申し上げます。

本研究は大学横断的に遂行したものであり、多くの皆様にご協力いただきました。

日本大学歯学部病理学講座 小宮山一雄教授・尾曲大輔助教には、試料提供、動物実験指導、病理組織学のご指導をいただきました。最初にご提供いただいた試料の分析は、自信を持って本研究を遂行していけることを確信する時間となりました。あの時の喜びは今も鮮明に思い出されます。先生方のご協力がなければ本研究の実施は困難であったはずです。深甚の謝意を表します。

東京医科歯科大学医歯学総合研究科先端材料評価学分野 宇尾基弘教授・和田敬広助教、放射線医学総合研究所 飯田厚夫教授、放射線医学総合研究所 及川将一氏、SPring-8 寺田靖子氏、千葉大学理学部 沼子千弥准教授・宮寄世里加氏には、放射光施設での実験を遂行するにあたり、多くのご助言、ご指導をいただきました。微量分析についての知識はゼロからの出発でしたが、SR-XRFやPIXEを用いた微量分析法の医学応用を提案できるほどに成長できたことは著者の励みとなっております。心より感謝申し上げます。

東京医科歯科大学医歯学総合研究科先端材料評価学分野 本郷敏雄准教授、北海道大学工学部 高橋平七郎先生、株式会社 中山組 佐々木仁氏には、Niナノボールのご提供、薬理学のご指導をいただきました。心より感謝申し上げます。



研究を進めるにあたり，ご支援，ご協力を頂きながら，ここにお名前を記すことが出来なかった多くの方々に感謝申し上げます。

最後に，本研究を行うにあたり，いつも温かい激励とご鞭撻をいただいた神部芳則教授，野口忠秀准教授はじめ，自治医科大学歯科口腔外科学講座医局員一同のご支援・ご協力に深謝致します。また，博士課程への進学を快諾し，どんな困難な状況下においても，いつも見守り，いつも味方でいてくれた父，母，兄に心より感謝します。

2016年1月8日

杉山 知子