

氏 名	すぎやまともこ 杉 山 知 子
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 506 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 22 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	微量金属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 審 査 委 員	(委員長) 教 授 大 槻 マミ太郎 (委 員) 教 授 香 山 不二雄 准教授 金 井 信 行

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

インプラントや人工股関節など生体材料に使用される金属や、抗がん剤などの治療薬、生体必須元素、装飾品など、我々の生活は金属で溢れている。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 Fe 欠乏性貧血はその代表と言えるが、口腔粘膜疾患の中にも金属が影響して発症するとされる疾患がある。口腔扁平苔癬（Oral Lichen Planus; OLP）や口腔扁平苔癬様疾患（Oral Lichenoid Lesion; OLL）である。

いずれも口腔外科領域では高頻度に出現する角化異常を伴う慢性炎症性病変で、前者は原因不明、後者はある程度原因が予測できるものとして区別されている。OLL の中でも、口腔内修復金属と接触性に発症している病態を Oral lichenoid contact lesion; OLCL と分類している。しかし、OLP と OLCL の臨床像や病理組織像は極めて酷似しており、両者を鑑別することは困難であるため、臨床現場ではステロイドを用いた対症療法が治療の主となっている。また一部の病態においては癌化するとの報告もあり、臨床現場では両者の鑑別診断と治療法の確立が強く望まれている。

両者を鑑別する目的に、臨床現場では皮膚パッチテストが実施されるが、この検査は高濃度の金属イオン検査薬を使用する方法であり、pH 変化やアニオンの影響を受けることにより偽陰性や偽陽性も多く、決して信頼性が高いとはいえない。

そこで SR-XRF や PIXE, XAFS という高感度な最新の微量元素分析手法を用いて、OLP や OLCL の組織中の元素分布分析、化学状態分析により、病態発症に関与している金属元素を検出し病態形成との因果関係を明らかにすることより、新たな診断基準と治療法を確立することを本研究の目的とする。併せて信頼性の高い金属アレルギーパッチテストの新規開発も目的とする。

### 2 研究方法

口腔粘膜疾患組織中の元素分布分析に関する研究では、臨床所見および病理組織学的所見より OLP と診断された 6 例および OLCL と診断された 6 例、コントロールとして扁平上皮癌切除試料の安全域組織 3 例のパラフィン包埋試料を使用した。ミクロトームで 8 $\mu$ m に薄切し、分析用の特殊フィルム上に貼付したものを分析に供した。試料中の微量元素分布分析は、放射光蛍光 X 線分析法（SR-XRF）、粒子線励起 X 線分析法（PIXE）を使用し、さらに検出元素の化学状態は X 線吸収微細構造分析法（XAFS）で評価した。これらの結果を病理組織学的所見と比較し、病態発症に

関与している微量元素と病態形成との関連について検討した。本研究は、自治医科大学附属病院および共同研究先である日本大学歯学部附属病院倫理委員会の承認を受けて実施した。また、SR-XRF法の医学応用は未だ稀である。生体中の金属元素は欠乏でも過剰でも病態形成の原因となり得るため、濃度推定による正常値との比較は重要である。しかし、本研究のような薄切試料内に含有されている元素の濃度を評価する術はない。そこで、歯科治療用の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新たに作製し、上述の口腔粘膜疾患組織の測定と同じ条件下でこれを測定し、得られた蛍光 X 線強度から検量線を作製した。これを使用して検出元素の濃度換算評価を行い、正常粘膜との比較から病態形成への影響を考察した。

新規アレルギーパッチテストの開発に関する研究では、粒径 40~50 nm という高い比表面積を持つ Ni ナノパーティクル（以後、Ni ナノボール）を用いた。比色定量試薬を含有した寒天を用いた *in vitro* 研究では、Ni ナノボールからのイオン溶出状態と溶出量を評価し、高効率に Ni イオンを生成する Ni ナノボール懸濁液の pH 濃度を検討した。また、マウス皮膚を用いた *in vivo* 研究では、Ni ナノボール懸濁液を封入した透析チューブを脱毛したマウス背部皮膚に一定時間貼付し、皮膚組織内でのニッケル動態とニッケルの化学状態を SR-XRF, PIXE, XAFS 分析法を用いて評価した。

SR-XRF および XAFS 測定は高エネルギー加速器研究機構（つくば）、SPring-8（兵庫県）で行い、PIXE 測定は放射線医学総合研究所（千葉県）で行った。

### 3 研究成果

口腔粘膜疾患組織中の元素分布分析に関する研究では、OLP, Control 群では、外来および生体由来の微量元素の局在は認めなかったのに対し、OLCL 群においては 6 例中 5 例において Ag や Pd, Ni など、歯科用合金の主要合金成分が検出され、これらの検出元素が金属状態ではなく、水和イオン (Ni, Zn) や硫化物 (Ag), 酸化物 (Cr) 状態として存在していることが XAFS 分析により明らかとなった。また、検出元素の濃度換算評価の結果、OLCL (試料#12) では検出元素である Ni や Cu, Zn, Cr が 1000ppm を超える濃度であったのに対し、OLP (試料#2) やコントロール (試料#C2) では、OLCL の濃度換算に比べて 1~2 桁低い値であった。

新規アレルギーパッチテストの開発に関する研究では、透析膜を介して Ni ナノボール懸濁液からの持続的な Ni の放出を認めた。さらに、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それより明らかに高かった。また、Ni ナノボールパッチテストを貼付したマウス皮膚組織内における Ni 元素分布分析では、貼付部位からの皮膚への均一な Ni の浸透が明らかであった。経時的変化においては、直線的かつ時間依存的に皮膚への Ni 量が上昇した。濃度換算評価では、現行のパッチテスト貼付面における Ni 濃度は 3000ppm と高濃度であったのに対し、Ni ナノボールパッチテスト貼付面における Ni 濃度は 250ppm 程度であった。

### 4 考察

口腔粘膜疾患組織中の元素分布分析に関する研究では、OLCL 試料より検出された金属種および金属状態より、口腔内で削合した切削片が粘膜に埋入したものではなく、口腔内に装着されている金属修復物からの溶出物が蓄積したものであることが示唆され、OLCL と口腔内金属修復物

との相関が示された。ただし、金属修復物の近傍にある病態の原因が必ずしも金属である訳ではないことも示され、OLPやOLCLの診断に際しては、SR-XRF、マイクロPIXE、XAFS分析手法の相補的使用が有効であると考えられた。また、これらの新たな高感度分析手法の導入により、これまでの金属接触性OLL（OLCL）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、原因金属を除去するという根治的な治療を可能にするものと期待された。これは、潜在的癌化リスクの軽減にも繋がるものと考えられた。

新規アレルギーパッチテストの開発に関する研究では、Niナノボールパッチテストから低濃度かつ持続的なNiイオンを徐放させることが可能であることを示し、これは実際の金属アレルギー発症機序に近似した環境であるといえた。さらに、様々な純金属および合金に対しても応用可能であることが示唆され、現行では困難とされているチタンなど、他の金属アレルギー診断への応用も期待された。

## 5 結論

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、鑑別診断が困難とされていたOLPとOLCLという口腔粘膜疾患に対する新たな診断方法を提案した。かねてより金属関与が指摘されていたにもかかわらず、病変部での金属分布を調査した報告はこれまでになく、本研究で得られた結果は金属関与を示した初のデータとなった。

また、金属ナノボールを用いた新規パッチテストを開発した。これは、現行のパッチテストが有する欠点を克服した理想的、かつ高い信頼性を有するパッチテストであり、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た。

SR-XRF、PIXE、XAFSという新たな微量元素分析技術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疾患の病態解明に応用されることが期待された。

## 論文審査の結果の要旨

杉山氏が用いた、口腔粘膜試料から歯科用材料由来する金属成分を検出する放射光蛍光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）などの新しい分析手法の導入によって、これまで困難とされてきた口腔粘膜疾患の新たな診断基準、そして治療法の確立が期待される結果が得られた。また、最先端の金属アレルギーパッチテストの開発も、現時点ではパイロット的ではあるが夢のある研究であり、医学領域において将来有用なツールになる可能性がある。

研究成果は複数の英文論文として公表されており、審査員全員一致で合格と判断された。

## 最終試験の結果の要旨

一次審査で指摘された点については、必要な事項が本文、考察、文献などに追記されていた。また、審査時に出されたすべての試問に対しても、的確な回答が示された。

申請者は本研究分野における十分な知識を有することが示され、またその真摯な態度も評価された結果、審査員全員一致で合格と判断された。