金属アレルギーの発現に関する実験的研究

赤 井 敬 子

九州歯科大学大学院歯学研究科歯科補綴学第2専攻 (指導: 内田康也教授)

九州歯科大学口腔細菌学講座 (指導: 内山長司教授)

平成2年10月26日受理

Experimental Study on the Expression of Allergic Reaction to Metals

Keiko Akai

Second Department of Prosthetic Dentistry (Director: Prof. Yasunari Uchida)

Department of Oral Bacteriology (Director: Prof. Choji Uchiyama)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

In recent years, increased attention has been given to allergy to dental metal materials. It has been assumed that the allergic reaction to metals was cell-mediated type hypersensitivity reaction. But it has not yet been clarified in detail. Several traditional techniques have failed to induce contact allergy to metals in the animal.

In this study, for the purpose of inducing the experimental allergy to nickel, rats were sensitized to peritoneal macrophages that engulfed nickel particles, as antigen. Rats were inoculated twice at one week interval with the antigen intraperitoneally. A week after the latest inoculation, the rats were inoculated again with the antigen into the gingiva. The rats were sacrificed on 6, 12 and 48 hours after the gingival inoculation. Using immunoperoxidase labeling technique, we examined the distribution of cells which bound anti-interleukin-2 receptor (IL-2R) monoclonal antibodies in the gingival tissues and submandibular lymph nodes, for the purpose of investigating the mechanism of the expression of allergic reaction to metals.

In submandibular lymph nodes, IL-2Rs were not or hardly observed 6 hours after the gingival inoculation. After 12 hours, however, IL-2Rs were slightly observed in medulla and were clearly observed after 48 hours. The result suggested that antigen signal was transmitted to submandibular lymph nodes, IL-2R appeared on the surface of T cells, B cells and macrophages, and then T cells proliferated.

In gingival tissues, polymorphonuclear leukocytes infiltrated after 6 hours. After 12 hours, mast cells characteristically were distributed and degranulated. The result suggested that antibody dependent type I hypersensitivity was involved in this reaction. After 48 hours, IL-2Rs were clearly observed. The result suggested that sensitized T cells were distributed in gingival tissues, and the cells responded to the antigen and secreted lymphokines.

These results suggested that type I hypersensitivity was involved in early experimental

allergic reaction to nickel, and type IV hypersensitivity was predominated after that.

Key words : Nickel / Interleukin-2 receptor (IL-2 R) / Type I hypersensitivity / Type IV hypersensitivity / Sensitized T cell

緒 言

湿疹、皮膚炎、口内炎、扁平苔癬、掌蹠膿疱症などの疾患の中には、時として歯科用金属がアレルゲンとなる場合がある。

近年このような歯科用金属アレルギーは、非常に頻度が高くなっている。その理由として中山ら (1987)¹⁾ は、水銀系殺菌剤中の Hg, アクセサリー中の Ni, 皮革のなめしに使用される Cr など、日常生活の中で様々な金属と接する機会が多く、歯科を受診したとき、すでに大勢の人々がこれらの金属で感作をされていることをあげている。そこで歯科診療において、アレルゲンとなり得る金属修復物を口腔内に装着し、それが何らかの理由でイオン化して溶出することがあれば金属アレルギーが歯科用金属によって誘発されるという事態が生じうると考えられている。しかし、その発現機序については、現時点では T 細胞による免疫応答が関与した遅延型アレルギーであると考えられているが、詳細には解明されていない。

Sinigaglia ら (1985)²⁾ や Karttunen ら (1988)³⁾ は、ニッケル過敏症患者の末梢血液リンパ球を nickel sulphate で刺激し、活性化を誘導したところ、特徴的に interleukin-2 (IL-2) の産生と IL-2 receptor (IL-2 R) 陽性細胞の発現が認められたと報告している。この IL-2 R は、T 細胞の活性化にともなって出現し、T 細胞の分裂増殖に必須の役割を演じていることから、このような IL-2 の産生や IL-2 R 陽性細胞の発現は、金属アレルギーの発現機序を検討する上で重要な、一つのマーカーであると考えられる。

また、金属を用いて動物に過敏症を引き起こす試みは、Möller (1984)⁴⁾ など過去数例行われているが、いずれも皮膚炎としての反応は弱く、実験モデルとして確立するまでには至っていない。これらの実験の多くは、金属をイオンの形にして抗原として用いている。これは、不完全抗原である金属イオンが、表皮や血清中のタンパクと結合して完全抗原となることを仮定した方法であると考えられるが、この結合に関してはまだ検討がなされていない。

そこで著者は、ラットに抗原として金属と担体タンパ

クの両者を用いる方法で、実験的金属アレルギーの発現を試みた。すなわち抗原として、Ni 微粒子を貪食したラット腹腔マクロファージを用い、ラット腹腔に免疫した後、再び歯肉に同一抗原を接種する方法を用いた。そして、歯肉組織と顎下リンパ節における IL-2 R モノクローナル抗体陽性細胞の分布を間接酵素抗体法を用いて検索した。さらにその結果から金属アレルギーの発現機序について検討し、興味ある知見を得たので報告する。

実験材料および方法

I. 実験材料

A. 動物

動物は体重約 150 g の Wistar 系ラットの雄を 1 週間以上飼育し、十分に環境に適応させた後実験に供した。

B. 金属

ニッケル試薬 (粉末, 和光純薬工業社) を乳鉢ですりつぶし、74, 37, 25 μm の金属メッシュで順次ふるいにかける。さらに無水アルコールと混合して、12, 5 μm のメンブレンフィルターを通し、3000 rpm で 20 分間遠心後、160°C で 30 分間乾熱滅菌して実験に供した。

C. 抗血清

1. 一次抗体

抗ラット IL-2 R モノクローナル抗体 (Serotec 社) は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 100 倍に希釈して使用した。

2. 二次抗体

ペルオキシダーゼ標識抗マウス Ig 抗体 (Cappel 社) は 0.02% ウシ血清アルブミン、1% ラット正常血清加 PBS で 200 倍に希釈して使用した。

3. 発色基質

0.02% 3, 3'-ジアミノベンジジン 4 塩酸塩 (DAB, 和光純薬工業社, 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 pH 7.6) を使用時に最終濃度 0.05% となるように過酸化水素水を添加し使用した。

II. 実験方法

A. 腹腔細胞の採取

1. 抗原の作製

a. マクロファージ抗原

10 units/ml ヘパリン加 Eagle's MEM 2 ml をラット

腹腔に接種し、15分後5%仔牛血清加Eagle's MEMで腹腔を3回洗浄し、腹腔細胞を採取した。採取した腹腔細胞は、直ちにプラスチックシャーレ (Falcon 社) に分注し、5% CO₂ インキュベーターで、37°C、30分間静置した。その後PBSで2~3回洗浄して、非付着細胞を除去した。さらに、5%仔牛血清加Eagle's MEMを3mlずつ分注し、5% CO₂ インキュベーターで、37°C、3時間静置した後、セル・スクレーパー (Greiner 社) で剥離した。PBSで細胞数を約1×10⁶個/mlに調製後、超音波発生装置 (トミー精工社) で細胞を破壊し、これを対照群の抗原として用いた。

b. ニッケル食食マクロファージ抗原

マクロファージ抗原と同様に5% CO₂ インキュベーターで、37°C、30分間培養して得られた付着細胞に、Ni微粒子 (I-B) と5%仔牛血清加Eagle's MEMの混合液を3mlずつ分注し、5% CO₂ インキュベーターで、37°C、3時間静置した。顕微鏡下で、付着細胞がNi微粒子を食食していることを確認後、セル・スクレーパーで剥離した。細胞数を調製後、超音波発生装置で細胞を破壊し、これを実験群の抗原として用いた (表1)。

表1 ニッケル食食マクロファージ抗原の作製

ラット腹腔細胞をプラスチックシャーレに分注し、37°C、30分間静置
↓
非付着細胞を除去 (PBSで2、3回洗浄)
↓
Ni微粒子を加え、付着細胞に37°C、3時間食食させる
↓
食食細胞をセル・スクレーパーで剥離
↓
さらに超音波発生装置で、細胞を破壊し、これを抗原とした

B. 抗原接種 (免疫) 方法

実験群では、ラット腹腔にニッケル食食マクロファージ抗原1mlを1週間間隔で2回接種した。その後1週間に再び同一抗原をラット下顎第一臼歯頰側歯肉に0.05ml接種した。その後、6、12、48時間後に歯肉組織と顎下リンパ節を採取し、病理標本作製した。また、対照群ではラット腹腔にマクロファージ抗原1mlを1週間間隔で2回接種した。その後1週間に再び同一抗原を

図1 抗原接種 (免疫) スケジュール

ラット下顎第一臼歯頰側歯肉に0.05ml接種し、48時間後に歯肉組織と顎下リンパ節を採取し、病理標本作製した (図1)。

C. 病理標本の作製

ラット顎下リンパ節は、採取後直ちに20% polyethylene glycol (PEG) 中で振盪 (4°C、15分間) した。その後、20% PEG中に包埋、凍結し、クリオスタットで8μmの凍結切片を作製して間接酵素抗体法の試料とした。歯肉組織は、歯牙および顎骨を含めて採取し、森ら (1986)⁶⁾ の方法を一部改変して、以下のように脱灰を行った。採取した組織は、直ちにperiodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) で固定 (4°C、24時間) した。ついで4°Cの冷PBSで洗浄し、10% EDTA-2 Na溶液中に浸漬 (4°C、30~40日間) した。脱灰終了後、試料を4°Cの10、15、20% sucrose加PBSで順次洗浄後、20% PEG中で振盪 (4°C、15分間) した。その後、20% PEG中に包埋、凍結した。クリオスタットで12μmの凍結切片を作製して間接酵素抗体法の試料とした。

D. 間接酵素抗体法による免疫学的検索

上記凍結切片は、室温で一夜乾燥後、4°C冷アセトンで10分間固定し、内因性ペルオキシダーゼ活性の除去とタンパクの非特異的吸着の防止を次の方法で行った。

内因性ペルオキシダーゼ活性除去のため、メタノール浸漬 (室温、30分間)、冷PBS洗浄 (5分間、3回)、0.03% 過酸化水素水加PBS浸漬 (室温、30分間)、冷PBS洗浄 (5分間、3回) を行った。さらに、ブロックエース浸漬 (雪印乳業、2倍希釈、室温、30分間)、冷PBS洗浄 (5分間、3回) を行った。

以上のようにして準備した試料と一次抗体を反応 (室温、1時間) させ、冷PBS洗浄 (15分間、3回) した。さらに二次抗体を反応 (室温、1時間) させ、冷PBS洗浄 (15分間、2回) し、冷PBS中に一夜浸漬した。その後発色基質と反応 (37°C、10分間) させ、蒸

留水で2～3回洗浄し、メチルグリーン核染色液で対比染色を行い、水洗して乾燥封入した(表2)。

表2 間接酵素抗体法

冷アセトン固定(4℃, 10 分間)
↓
メタノール浸漬(室温, 30 分間)
↓
0.03% H_2O_2 加 PBS(室温, 30 分間)
↓
ブロックエース(2 倍希釈)(室温, 30 分間)
↓
一次抗体と反応(室温, 1 時間)
↓
二次抗体と反応(室温, 1 時間)
↓
発色基質(DAB)と反応(37℃, 10 分間)
↓
対比染色(メチルグリーン核染色)

実験結果

I. 歯肉組織の IL-2 R の分布

A. 二次抗原接種 6 時間後の所見

歯肉頬移行部の粘膜下組織から筋層との境界に沿って著しい細胞浸潤が認められた。また、固有層や筋層においても線維の走行は乱れ、細胞が多数浸潤していた。浸潤していた細胞の多くは多形核白血球であった。血管周囲には、顆粒を含む肥満細胞やその脱顆粒が認められた。しかし、茶褐色に染まる IL-2 R 陽性細胞はほとんど認められなかった(写真1, 2)。

B. 二次抗原接種 12 時間後の所見

歯肉頬移行部の粘膜下組織から筋層との境界に沿って細胞浸潤が認められたが、その程度は6時間後の所見に比べて消退していた。またそこには、茶褐色に染まる IL-2 R 陽性細胞がわずかに認められた。血管周囲には、顆粒を含む肥満細胞が多数分布し、その脱顆粒が認められた(写真3, 4)。

C. 二次抗原接種 48 時間後の所見

歯肉頬移行部の粘膜下組織から筋層との境界に沿って著しい細胞浸潤が認められ、茶褐色に染色された IL-2

R 陽性細胞が多数観察された。その隣接部には、毛細血管の拡張、肥満細胞やその脱顆粒が認められた。また、固有層線維間にも陽性細胞が散在していた。拡大像では、血管周囲の細胞上に茶褐色に染まる強陽性部分が認められた(写真5, 6)。

D. 対照群の所見

刺入点である歯肉頬移行部の粘膜下組織に軽度の細胞浸潤と毛細血管の拡張が認められた。しかし、茶褐色に染色された IL-2 R 陽性細胞は、ほとんど認められなかった。また、血管周囲には、顆粒を持った肥満細胞が認められたがほとんど脱顆粒していなかった(写真7, 8)。

II. 顎下リンパ節の IL-2 R の分布

A. 二次抗原接種 6 時間後の所見

茶褐色に染色された IL-2 R 陽性細胞は、ほとんど認められなかった。

B. 二次抗原接種 12 時間後の所見

髓質に茶褐色の陽性部分がわずかに認められた。

C. 二次抗原接種 48 時間後の所見

髓質に著明な茶褐色に染まる陽性部分が認められた。拡大像では、細胞間隙に弱陽性部分が、細胞形質に強陽性部分が認められた(写真9, 10)。

D. 対照群の所見

髓質に茶褐色の陽性部分が認められた(写真11, 12)。

考 察

近年、日常生活で、あるいは職業上接する機会の多い金属が原因と考えられるアレルギー疾患が問題となっている。つまり、ネックレス、イヤリングなどアクセサリ中の Ni、マーズキュロなど水銀系消毒剤中の Hg、皮革製品のなめしに使われる Cr などに接触することにより、掻痒感を伴う紅斑、水疱、丘疹、びらんなどの皮膚症状を伴うアレルギー性接触皮膚炎を生じることである。

歯科領域においても金属は、補綴用修復材料としての使用頻度は高く、湿疹、皮膚炎、口内炎、扁平苔癬、掌蹠膿疱症などの疾患の中には、ときにこれらの歯科用金属がアレルギーとなる場合がある。このとき口腔内の金属を除去したり変更することにより症状が軽快、消失することがある。このような歯科用金属によるいわゆる“金属アレルギー”の症例は、1928年、Fleischmann⁹⁾の報告に始まり、最近では、アマルガム中の Hg や Sn、ニッケルクロム合金中の Ni や Cr、金

写真1 二次抗原接種6時間後の歯肉所見

写真2 写真1の拡大像(×100)

写真3 二次抗原接種12時間後の歯肉所見

写真4 写真3の拡大像(×100)

写真5 二次抗原接種48時間後の歯肉所見

写真6 写真5の拡大像(×100)

写真7 対照群の歯肉所見

写真8 写真7の拡大像(×100)

写真9 二次抗原接種 48時間後の顎下リンパ節所見

写真10 写真9の拡大像 (×100)

写真11 対照群の顎下リンパ節所見

写真12 写真11の拡大像 (×100)

銀パラジウム合金中の Pd, 金合金中の Au によるアレルギーの症例報告が皮膚科医, 歯科医を中心に行われている⁷⁻¹⁴⁾.

この金属アレルギーの発現機序は, T細胞による免疫応答が密接に関与した遅延型アレルギーであると考えられているが, 詳細には解明されていない。

口腔内の歯科用金属は様々なメカニズムによって腐食(溶出)し, 組成金属はイオン化する。おそらく金属イオンは, 歯質, 歯肉や扁桃, あるいは嚥下されて消化管から吸収されて生体内に移行すると考えられる。しかし, アレルゲンとしての金属は, そのままでは抗原となり得ず(不完全抗原, ハプテン), 皮膚や粘膜の担体タンパク(キャリアプロテイン)と結合して完全抗原となる^{15, 16)}。

このような金属を用いて動物に過敏症を引き起こす試みは, 過去数例行われているが, いずれも実験モデルとして確立するまでには至っていない。

Möller (1984)⁴⁾ は, nickel sulphate を抗原として

マウスに過敏症を起こさせるために皮膚に塗布したり, 皮内接種をしたり, 両者を組み合わせたりといろいろな方法を試みている。また, 単に抗原を接種するだけでなく Freund's complete adjuvant や cyclophosphamide や Tetramisol[®] で前もって刺激を与えていたり, picryl chloride で先に過敏症を起こさせておくということを試みている。このような試みのうち反応が著明に現れた方法は, 20% nickel sulphate をマウスの耳に5日に1度の塗布を3週間繰り返したものであった。しかし, 皮膚炎としての反応は弱く, コントロールに比較して3.8%の湿重量の増加をみたにすぎない。

このように金属は不完全抗原であり, 完全抗原となるためには担体タンパクが必要であること, マウスやラットでは皮膚が薄く, 皮膚における抗原の持続的な貯留が起りにくく, 皮膚で反応を惹起することが難しいことなどから, 動物実験モデルが確立していないものと考えられた。そこで著者は, ラットに抗原として金属と担体タンパクの両者を用いる方法で金属アレルギーの発現を

試み、金属による実験的アレルギーの発現機序について探求する目的で本研究を行った。

抗原となる可能性の高い金属元素としては、Ni, Co, Cr, Hg, Pdなどで、頻度は比較的少ないが、Au, Ptも含まれる。その中でも特にNiは、ネックレスやイヤープラスなどのアクセサリによく用いられ、歯科領域でも使用頻度の高いNi-Cr合金の主成分であるためしばしば問題になっている。そこで、本研究でもNiを抗原金属として用いることにした。

これまで金属感作を動物で行う場合には、塩類の形、つまりイオンの形にして抗原として用いた。Möller (1984)¹⁾は、皮膚にnickel sulphateの塗布や皮内接種を行ったが、いずれも弱い反応しか起こらなかった。これは、nickel sulphateが表皮のタンパクや血清中のタンパクと結合して完全抗原となることを仮定した方法であると考えられるが、これらの担体タンパクとの結合に関してはまだ十分に検討がなされていない。

そこで、歯肉に対する金属の影響に着目した研究について検索を行ったところ、次のような興味ある知見を得た。大須賀(1983)¹⁷⁾は、ラットの歯肉組織内に銀合金削片を埋入し、歯肉変色の過程について検索している。また、小城ら(1986)^{18, 19)}は、銀合金による支台築造体の削片が、いかなる条件下で歯肉に沈着を惹起するかを明らかにする目的で、成犬に実験的に銀合金築造体の装着実験を試みている。いずれの研究でも歯肉組織内に存在する金属周囲には組織球様細胞が多数認められると述べている。このように外来の異物である金属に対して、生体はまず食細胞によって排除しようとする。しかし、金属はタンパク抗原と異なり消化してしまうことはない。食細胞はダメージを受け、変質して、自己に対する新たな異物となり攻撃を受けることが考えられた。

そこで著者は、Niによる実験的アレルギーを起こすための抗原として、Ni微粒子を貪食したラット腹腔マクロファージを用いた。Ni微粒子は $5\mu\text{m}$ 以下としマクロファージが貪食可能な大きさとした。また、プラスチックシャーレ上の付着細胞にこのNi微粒子を分注し、さらに培養して経時的に観察したところ、付着細胞が偽足を伸ばして微粒子を取り込むところが観察された。3時間後には貪食したマクロファージがダメージを受け円形を呈したものが増加したため、それを剥離、採取した。さらに細胞にダメージを与え、抗原として生体が認識しやすくする目的で、超音波による破壊を行った。このように抗原としてNi微粒子とそれによって変化したラット腹腔マクロファージ(変質したタンパク)

の両者を接種することにより実験的アレルギーを発現できるのではないかと考えた。しかし、この方法は、ラット腹腔マクロファージに対する生体反応が起こることも考慮しなければならない。そこで、Niを貪食していないラット腹腔マクロファージのみを抗原として接種したものを対照群として比較を行った。

抗原接種部位については、先に述べたようにラットの皮膚では反応が惹起しにくいということと、歯科領域の金属アレルギーについての実験的研究であるということとを考慮して、腹腔に抗原を繰り返し接種し免疫した後で、局所歯肉に再び同一抗原を接種するという方法を用いた。

抗原接種(免疫)方法については、本実験に先立って次のような予備実験を行った。

実験群を2群に分け、第1群にはラット腹腔にニッケル貪食マクロファージ抗原のみを、第2群には Freund's incomplete adjuvant を混合して接種した。adjuvant とは、抗原とともに接種することにより、その抗原に対する免疫反応を増強させるような物質をいい、抗原液とよく攪拌し water in oil 状態にして接種することにより、抗原はゆっくりと拡散するので、抗原量は少量で反応が現れるといわれている²⁰⁾。各群とも腹腔に一次抗原接種を1週間間隔で繰り返し接種し、接種回数を2, 3, 4回の3通り行った。それぞれ、その後1週間目に歯肉に同一抗原を接種し、48時間後に歯肉組織と顎下リンパ節を採取した。それをパラフィン切片としH.E.染色を行った。

その結果、歯肉所見では、両群とも血管周囲と筋層の間に細胞浸潤が認められたが、第2群の方が第1群よりも強く現れた。リンパ節所見では、両群とも髄洞内に形質細胞やマクロファージ様細胞が認められたが、これらの反応は抗原接種した局所である歯肉の反応と異なり、第1群の方が第2群よりも強く現れた。また、この傾向や反応の程度は、一次抗原の接種回数を変えても変化はなく、腹腔に2回免疫することで反応が現れることがわかった。そこで、各群とも腹腔に2回免疫した後、歯肉に同一抗原を接種し48時間目に採取したラットの血清についてOuchterlony法を用いて抗原に対する抗体価を測定した。その結果は、第1群で64倍であったのに対し、第2群では128倍であった。

このように両群とも二次抗原接種48時間後で抗体価の上昇が認められ、とくに第2群ではadjuvantの効果が発現しているものと考えられる。また、第2群において局所歯肉で著しい細胞浸潤が認められたにもかかわら

ず、リンパ節では第1群の方が反応が強く現れた。これは、第1群では局所歯肉に接種した抗原が所属リンパ節に直接免疫応答を惹起させたのに対して、第2群では局所歯肉において抗体による免疫的な抑制があったものと考えられる。

以上の予備実験の結果から、腹腔に2回免疫した後歯肉に再び同一抗原を接種することで、局所歯肉や所属リンパ節に強い反応が起こることがわかった。また、この一連の反応には抗体による体液性免疫の関与が示唆された。

しかし、一般に金属アレルギーは、アレルギー性接触皮膚炎の一種と考えられ、Coombs & Gellらの分類した4つの基本型のうちIV型の細胞免疫型に含まれている。また、反応の出現までの時間が長いため、遅延型アレルギーとも呼ばれている。IV型アレルギー反応は、ある局所に存在する抗原と特異的に反応できる物質、あるいはその機序を有するように特異的に修飾された感作リンパ球との反応によって生じることが知られている。

生体内に侵入した抗原はマクロファージに貪食され、ペプチドまで分解される。このペプチドフラグメントは、MHCのクラスII分子(Ia抗原)と複合体を形成してマクロファージの細胞表面に発現され、T細胞に抗原提示される。この複合体をT細胞抗原レセプターを介して認識したT細胞が活性化される。この活性化の過程にはマクロファージより分泌されるinterleukin-1 (IL-1)、あるいはIL-6と呼ばれるサイトカインの存在が必須である。これらの分子がセカンドシグナルとして存在することによってT細胞は活性化され、IL-2を産生し、IL-2 receptor (IL-2 R)を発現するようになる。T細胞より産生されたIL-2は自己の増殖因子としてT細胞を増殖させ、ヘルパーT細胞、あるいはキラーT細胞へと分化させ、最終的な免疫機能を発現させる^{21, 22)}。

IL-2は、Morganら(1976)²³⁾によりリンパ球培養上清中に含まれるT細胞増殖因子としてその存在が定義された。その後、IL-2の精製、生化学的性状、機能に関する研究が進み、Taniguchiら(1983)²⁴⁾によりその遺伝子が単離され活性化T細胞によって産生される分子量15000の物質(アミノ酸133個)として構造が決定された。また、Robbら(1981)²⁵⁾は、IL-2がその機能を発揮する際にはT細胞膜表面にIL-2特異的受容体(レセプター)が存在し、このレセプターを介して活性化されると報告した。その後IL-2 Rは分子量55 kd (Tac抗原, α 鎖)と75 kd (β 鎖)の2種類のサブ

ユニットから成り立っている蛋白で、この2種類のサブユニットによりIL-2に対する親和性の調節が成り立っていることが判明した。このようにIL-2 Rは、T細胞の活性化にともなって出現し、T細胞の増殖分化に必須の役割を演じているため、生体内の免疫状態や免疫異常を引き起こす疾患と深く関わっていると考えられている。また、アレルゲンで誘導された活性化T細胞がIL-2に反応し分裂増殖して存続していく現象は、アレルギー疾患の病因を探る上で重要なことと考えられる。

Kobayashiら(1985)²⁶⁾は、Freund's complete adjuvantを混合した可溶性抗原で免疫したマウスからリンパ節細胞を採取し、さらに抗原を加えて培養したところ、培養上清にIL-1とIL-2の活性を見た。このinterleukinの誘導は、このマウスにおける*in vivo* (footpad response)と*in vitro* (lymphocyte proliferation)の反応の両者と関係しており、細胞媒介性免疫による免疫状態のもとで抗原で刺激した結果であると報告している。

金属アレルギーに関しては、Sinigagliaら(1985)²⁾がニッケル接触皮膚炎の患者の末梢血液リンパ球からNi-specific T lymphocyte clones (TLC)の分離に成功した。このTLCは、増殖するために抗原提示細胞とnickel sulphateを必要とし、ニッケルと抗原提示細胞の存在下で高レベルのIL-2とinterferon- γ (IFN- γ)を産生したと報告している。

また、Karttunenら(1988)³⁾は、ニッケル過敏症患者者とコントロールとして皮膚アレルギーのない人から採取した末梢血液リンパ球をnickel sulphateで刺激し、活性化を誘導した。ニッケル過敏症患者から採取した単核細胞はNiに対する反応としてコントロールよりも多くのDNAを合成し、IL-2を産生し、IL-2 Rを発現した。このIL-2 R陽性細胞の増加はCD4⁺ (helper/inducer) T細胞の活性化によると考察している。また、ニッケル過敏症患者の細胞培養上清には、IFN- γ は認められなかったがコントロール抗原として用いた精製ツベルクリン(PPD)では、DNAの合成と同様にIFN- γ が誘導された。つまり*in vitro*でNiによって活性化された末梢血液リンパ球は微生物抗原による活性化とIFN- γ 反応の有無の点で異なるとしており、Sinigagliaらの結果とくい違っている。

このように*in vitro*におけるnickel sulphateによる末梢血液リンパ球の活性化の誘導は、IL-2の産生とIL-2レセプター陽性細胞の発現によって特徴づけられると考えられる。そこで本研究では、腹腔に一次抗原接種

を2回繰り返した後、歯肉に再び同一抗原を接種し、6、12、48時間後の歯肉組織と顎下リンパ節の凍結切片を作製し、IL-2 Rモノクローナル抗体陽性細胞の分布を間接酵素抗体法を用いて検索した。

二次抗原接種6時間後の歯肉所見では、刺入点である歯肉頬移行部の粘膜下組織から筋層との境界に沿って著しい細胞浸潤が認められた。粘膜下組織深部には、Ni微粒子と思われる黒色の微小顆粒が観察され、その周囲には単核球が多数分布していた。また、筋層においても線維の走行は乱れ、細胞が浸潤していることから刺入が深く筋層に達していたと考えられる。細胞のほとんどは多形核白血球で、粘膜下組織の血管周囲には多数の顆粒を含む肥満細胞と一部その脱顆粒が観察された。しかし、茶褐色に染まるIL-2 R陽性細胞はほとんど認められなかった。PPDや血清タンパクを抗原とした実験の多くに、早期における好中球の浸潤が認められる。この好中球の浸潤は、抗原や変性細胞の処理に大きな役割を果たしていると考えられている。しかし、好中球の血中レベルを極度に低下させておいた動物では、その後の遅延型アレルギー反応の出現と進展とが著しく抑制されることが知られており、好中球が遅延型アレルギー反応の開始に重要な役割を果たしているとする考えもある²⁷⁾。

二次抗原接種12時間後の歯肉所見では、6時間後の所見と同様に粘膜下組織から筋層との境界に沿って細胞浸潤が認められたが、その程度はかなり消退していた。またそこには、IL-2 R陽性細胞の分布がわずかに認められた。粘膜下組織の血管周囲には、単核のマクロファージ様細胞や肥満細胞が分布していた。肥満細胞の分布は、動物種によって著しく異なるが、ラット歯肉では組織肥満細胞が発達しており、血管周囲性および結合組織性にほぼ平等にみられ、また点在性と散在性が同時に認められることを特徴としている²⁸⁾。12時間の所見では、この肥満細胞が、6、48時間の所見に比べて特徴的に分布し、その多くが脱顆粒していた。このことから、一次抗原接種によりB細胞が刺激されて抗原特異的なIgE抗体が産生されたと考えられる。それが、歯肉の肥満細胞の細胞表面に付着する。そこに二次抗原が接種されることによりIgE抗体と抗原の反応が生じ脱顆粒が起ったと推察される。このようにCoombs & GellらのいうI型アレルギーの関与が示唆された。野間ら(1987)²⁹⁾は、アレルゲンで活性化されたT細胞がIL-2に反応することによりさらに増大し、遅延型過敏反応を起こすT細胞として作用する他、IgE産生に関与するヘルパーT細胞として作用する可能性があると

報告している。また、肥満細胞は、substance P (SP)などの神経ペプチドに反応してヒスタミンを遊離する³⁰⁾が、ニッケルによるアレルギー性接触皮膚炎にSP拮抗薬spantideが有効であるとの報告もあり³¹⁾、接触皮膚炎の病態にSPが関与することが示唆された。

二次抗原接種48時間後の歯肉所見では、歯肉頬移行部の粘膜下組織から筋層との境界に沿って著しい細胞浸潤が認められ、そこには、茶褐色に染色されたIL-2 R陽性細胞の分布が広範囲に多数観察された。拡大像では、細胞上に茶褐色に濃染した強陽性部分が認められた。

それに対して、対照群では、同じ48時間の歯肉所見で軽度の細胞浸潤と多数の肥満細胞が認められたが、その脱顆粒はほとんど認められなかった。また、IL-2 R陽性細胞の分布もほとんど認められなかった。このことから二次抗原接種48時間後の所見で認められた多数のIL-2 R陽性細胞は、NiとNiを貪食して変質したタンパクに特異的な反応であると考えられると同時に、以下のように推察できる。

免疫ラットでは、図2に示すように腹腔で一次抗原を認識後、分裂、増殖したT細胞群の一部が歯肉に分布している。そこに二次抗原が接種されたために、歯肉の感作T細胞が活性化し、産生されたリンフォカインによる細胞の集積が起こる。そして、マクロファージのIL-1産生、T細胞のIL-2の産生とIL-2 Rの発現によって、マクロファージ、T細胞の活性化が確立する。また、IL-2 Rは、T、B細胞に発現することが知られているが、さらにPleauら(1989)³²⁾は、ラット単球、脾臓、肺マクロファージにもIL-2 Rが発現すると報告している。そのため、これらの細胞が浸潤および集積した部位にIL-2 R陽性細胞が多数分布する像がみられた。このようにIL-2 R陽性細胞の出現は、細胞性免疫による免疫状態のもとで抗原で刺激した結果であり、T細胞の関与するIV型アレルギーが示唆された。

一方、顎下リンパ節の二次抗原接種6時間後の所見では、IL-2 R陽性細胞の分布はほとんど認められなかった。しかし、12時間の所見では、髄質に茶褐色の陽性部分がわずかに認められ、48時間の所見では、歯肉に比べ少数ながら髄質に著明な陽性部分が認められた。さらに拡大像では、細胞形質に局在した強陽性部分が、細胞間隙に弱陽性部分が認められた。この場合細胞形質の強陽性部分は、細胞膜上に発現したIL-2 Rを、細胞間隙の弱陽性部分は、Rubinら(1985)³³⁾によって報告された可溶性の α 鎖であると考えられる。

図2 実験的金属アレルギーの発現機序

一般に抗原を皮膚に塗布する実験で、その抗原がリンパ節内に到達して接触過敏反応が誘導される場合には次の3つのルートが考えられる。すなわち、抗原を塗布したところの皮膚から、①表皮ランゲルハンス細胞、または、その関連細胞によって抗原がリンパ節内へ運搬される場合、②皮膚組織内のリンパ球によって持ち込まれる場合、および③抗原がリンパ流を介して直接にリンパ節内へ移動する場合である。森田ら(1989)³⁴⁾は、ルート②よりはルート①の可能性が高く、ルート③の場合も考えられるがその可能性は低いと考察している。

今回の実験では、粘膜内部に抗原を接種していることから抗原提示細胞はランゲルハンス細胞とは考えにくく、樹枝状細胞、あるいはマクロファージと考えられる。しかし、マクロファージの抗原提示機能には異論があり、樹枝状細胞が不可欠という指摘もある。徳永(1987)³⁵⁾は、貪食をおこなったマクロファージは、Ia抗原を発現すると同時に、活性酸素や prostaglandin など、免疫応答を抑制する物質を大量に産生放出する。そのため抗原提示を有効に行いえない可能性がある。し

かし、一方マクロファージ内に長時間滞留する抗原の場合には活性酸素などの放出は鎮静化し、抗原提示の条件が整い、遅延型アレルギーの成立に関与する可能性もあるとしている。いずれにせよ抗原および抗原情報が所属リンパ節に伝達され、T細胞がIL-2Rを発現し、その増殖が起こっていることは明らかである。

また、対照群の歯肉所見では、IL-2R陽性細胞の分布はほとんど認められなかったのに対して、リンパ節では髄質に著明に認められた。これは、ニッケルがマクロファージなどによって消化されずに比較的長く歯肉に留まっているのに対して、タンパクであるマクロファージ抗原は早期にマクロファージなどによって消化され局所歯肉から排除される。しかし、抗原および抗原情報は所属リンパ節に伝達されるためIL-2R陽性細胞の分布が現れたと考えられる。

以上のように、実験的金属アレルギーの発現には、抗体を中心とする体液性免疫の関与が示唆された。とくに、二次抗原接種後早期の歯肉所見では、多形核白血球の浸潤に加え、肥満細胞の脱顆粒が特徴的に認められ、

I型アレルギーが示唆された。二次抗原接種12時間後では、リンパ球やマクロファージ様細胞などの単核細胞が増加し始め、IL-2 R陽性細胞も出現してきた。さらに48時間ではIL-2 R陽性細胞の分布が著明に認められた。これは、一次抗原接種後、分裂増殖したT細胞が歯肉にも分布し、その感作T細胞が抗原と反応することによりリンフォカインの放出が起こったためと考えられる。

一方、コントロールでは、歯肉にIL-2 R陽性細胞の分布はほとんど認められなかったことから、実験的金属アレルギーの進展には、T細胞の関与する遅延型IV型アレルギーの関与が示唆され、その際、リンフォカインやモノカインなど液性因子のネットワーク³⁶⁻³⁸⁾が重要な役割を演じていると考えられる。

結 論

Niによる実験的アレルギーを起こすための抗原として、Ni微粒子を貪食したラット腹腔マクロファージを用いた。それをラット腹腔に免疫した後、再び歯肉に同一抗原を接種した。その後、6、12、48時間後の歯肉組織と顎下リンパ節の凍結切片を作製し、同部位におけるinterleukin-2 receptor (IL-2 R)陽性細胞の分布を間接酵素抗体法を用いて検索した。さらに、金属アレルギーの発現機序について検討し、以下の結論を得た。

1. 顎下リンパ節では、二次抗原接種6時間後、IL-2 R陽性細胞の分布は、ほとんど認められなかった。しかし、12時間後の所見では、髄質に陽性部分がわずかに認められ、48時間後の所見では、髄質に著明な陽性部分が認められた。このことから抗原および抗原情報が所属リンパ節に伝達され、T細胞、B細胞あるいはマクロファージ上にIL-2 Rが発現し、それによってT細胞の増殖が起こっていることが示唆された。

2. 歯肉組織では、二次抗原接種6時間後、多形核白血球の著明な浸潤が認められた。12時間後では肥満細胞が特徴的に分布し、その多くが脱顆粒していた。このことから体液性免疫の関与した即時型I型アレルギーが示唆された。

3. 歯肉組織では、二次抗原接種12時間後、リンパ球やマクロファージ様細胞などの単核細胞の増加が認められ、IL-2 R陽性細胞もわずかに出現した。さらに48時間後では、IL-2 R陽性細胞の分布が著明に認められた。このことから、一次抗原接種後、分裂増殖した感作T細胞が歯肉組織にも分布していることが示唆された。その感作T細胞が抗原と反応することによりリンフォ

カインの放出が起こる。そして、マクロファージのIL-1産生、T細胞のIL-2の産生とIL-2 Rの発現によって、マクロファージ、T細胞の活性化が起こる。このようにT細胞の関与する遅延型IV型アレルギーが生じていると考えられる結果が得られた。

実験的金属アレルギーの進展には、その早期に即時型I型アレルギーの関与が示唆されたが、その主体はT細胞の関与する遅延型IV型アレルギーであると考えられる。

稿を終るにあたり、終始懇篤な御指導と御校閲を賜った恩師内田康也教授ならびに九州歯科大学口腔細菌学講座内山長司教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また本研究に対し、終始懇切なる御教示、御助力を賜った補綴学講座および口腔細菌学講座の皆様に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は、平成元年9月3日、日本補綴歯科学会九州支部会、平成2年5月26日、第83回日本補綴歯科学会学術大会において発表した。

引用文献

- 1) 中山秀夫, 禾 紀子, 鈴木明宏, 堀内 聡: アレルギーと歯の金属. 日歯医師会誌 40 (8): 893-903, 1987.
- 2) Sinigaglia, F., Scheidegger, D., Garotta, G., Scherper, R., Pletscher, M. and Lanzavecchia, A.: Isolation and characterization of Ni-specific T cell clones from patients with Ni-contact dermatitis. J. Immunol. 135 (6): 3929-3932, 1985.
- 3) Karttunen, R., Silvennoinen-Kassinen, S., Juutinen, K., Andersson, G., Ekre, H-P. T. and Karvonen, J.: Nickel antigen induces IL-2 secretion and IL-2 receptor expression mainly on CD4⁺ T cells, but no measurable gamma interferon secretion in peripheral blood mononuclear cell cultures in delayed type hypersensitivity to nickel. Clin. exp. Immunol. 74: 387-391, 1988.
- 4) Möller, H.: Attempts to induce contact allergy to nickel in the mouse. Contact Dermatitis 10: 65-68, 1984.
- 5) 森 士朗, 手島貞一, 沢井高志, 京極方久: 硬組織に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色のための脱灰法の開発. 病理と臨床 4: 667-670, 1986.
- 6) Fleischmann, P.: Zur Frage der Gefährlichkeit Kleinsten Quecksilbermengen. Dt. Med. Wschr. 54: 304, 1928.
- 7) 中山秀夫, 村田真道, 中野直也, 高 雪恵: 金属アレルギーの観点から検討した掌蹠膿疱症. 皮膚臨床 16

- (5): 313-329, 1974.
- 8) Wiesenfeld, D., Ferguson, M. M., Forsyth, A. and MacDonald, D. G.: Allergy to dental gold. *Oral Surg.* 57 (2): 158-160, 1984.
 - 9) 木下三和子, 伊藤正俊, 細野久美子, 山田耕次: 金による歯肉口内炎の1例. *皮膚* 29増 (3): 174-177, 1987.
 - 10) 井上昌幸, 松村光明, 南 孝: 補綴物と金属アレルギー. *Dental Diamond* 5: 30-37, 1988.
 - 11) 中村正明, 大島 浩: 歯科材料とアレルギー—特に金属アレルギーについて—. *DE* 84: 31-38, 1988.
 - 12) 井上昌幸, 松村光明: 歯科用金属アレルギーの診断と治療. *補綴臨床* 22 (4): 553-563, 1989.
 - 13) 瀬尾令士: 歯科用金属によるアレルギー患者の一症例. *歯界展望* 73 (4): 863-876, 1989.
 - 14) 三輪悦子, 細井紀雄, 大貫直美: 歯科用金属アレルギーとの関連が疑われた掌蹠膿疱症の1例. *補綴誌* 34 (4): 651-659, 1990.
 - 15) 中山秀夫, 村田真道, 森戸百子: 歯科用金属による感作の可能性について. *歯界展望* 43 (3): 382-389, 1974.
 - 16) 禾 紀子: 金属アレルギー患者における口腔内電流測定による歯科金属溶出傾向の検討. *日皮会誌* 99 (12): 1243-1254, 1989.
 - 17) 大須賀 豊: 銀合金による歯齦変色に関する実験病理学的研究. *日歯周誌* 25 (3): 479-512, 1983.
 - 18) 小城辰郎, 徳永慶彦, 樺 雅行, 村上繁樹, 内田康也, 嶋村昭辰: 築造用銀合金が歯肉に及ぼす影響 (第1報). *九州歯会誌* 40 (3): 694-705, 1986.
 - 19) 小城辰郎, 金子利雄, 伊藤明彦, 徳永慶彦, 樺 雅行, 竹内敏洋, 松延彰友, 神田昭司, 中道正義, 村上繁樹, 内田康也: 築造用銀合金が歯肉に及ぼす影響 第2報特に歯肉変色について. *補綴誌* 30 (6): 1278-1286, 1986.
 - 20) 松橋 直, 成内秀雄, 臼井美津子: 生物化学実験法 15 免疫学実験入門. 学会出版センター, 東京, 1981, 45-50.
 - 21) 通堂 満: IL-2 レセプター. *臨床免疫* 21 (11): 1677-1685, 1989.
 - 22) 中村吉昭, 杉江勝治, 多賀谷 温, 増谷 弘, 山内清明, 小澤和恵, 淀井淳司: インターロイキン2 (IL-2) とインターロイキン2 レセプター (IL-2 R). *最新医学* 44 (8): 1657-1663, 1989.
 - 23) Morgan, D. A., Ruscetti, F. W. and Gallo, R.: Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193: 1007-1008, 1976.
 - 24) Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. and Hamuro, J.: Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302: 305-310, 1983.
 - 25) Robb, R. J., Munck, A. and Smith, K. A.: T cell growth factor receptors; Quantitation, specificity, and biological relevance. *J. Exp. Med.* 154: 1455-1474, 1981.
 - 26) Kobayashi, K., Cohen, S. and Yoshida, T.: Antigen-mediated interleukin production by mononuclear cells from delayed hypersensitive mice. *J. Exp. Pathol.* 2 (3): 191-209, 1985.
 - 27) 石坂公成, 林 秀男: 免疫科学8 アレルギーと炎症. 岩波書店, 東京, 1985, 133-227.
 - 28) 橋本紀三, 森本啓三: 口腔病変における組織肥満細胞の役割. *歯科ジャーナル* 12 (5): 559-568, 1980.
 - 29) 野間 剛, 吉沢いづみ, 川野 豊, 伊藤雅彦: 馬場実, 矢田純一: アレルゲンに対するアトピー患者リンパ球の応答性-年齢による変動, 健康児との比較及び診断的意義. *アレルギー* 36 (12): 1075-1085, 1987.
 - 30) 黒沢元博, 石塚 全: アレルギー反応発現における神経ペプチドの役割. *臨床免疫* 22 (5): 635-646, 1990.
 - 31) Wallengren, J. and Möller, H.: Some neuropeptides as modulators of experimental contact allergy. *Contact Dermatitis* 19: 351-354, 1988.
 - 32) Pleau, M. E. and Hancock, W. W.: Studies of the human and rat macrophage receptor for interleukin-2 (IL-2 R). *Transplantation Proceedings* 21: 140-141, 1989.
 - 33) Rubin, L. A., Kurman, C. C., Fritz, M. E., Biddison, W. E., Boutin, B., Yarchoan, R. and Nelson, D. L.: Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J. Immunol.* 135: 3172-3177, 1985.
 - 34) 森田秀樹, 湯 正明, 宮崎孝夫: 接触過敏反応の感作誘導期におけるリンパ節内の抗原提示細胞とTリンパ球との研究. *日皮会誌* 99 (10): 1075-1084, 1989.
 - 35) 徳永 徹: 遅延型アレルギーとリンフォカイン. *アレルギー* 36 (1): 1-6, 1987.
 - 36) 原まさ子: サイトカイン (IL-2, TNF, IFN γ). *臨床免疫* 21 (6): 889-899, 1989.
 - 37) Herrod, H. G.: Interleukins in immunologic and allergic diseases. *Ann Allergy* 63: 269-274, 1989.
 - 38) 桑原宏子, 宇多弘次: 遅延型アレルギーとマクロファージ. *臨床免疫* 22 (1): 13-24, 1990.