

- spores. *Adv. Appl. Microbiol.*, 23, 245-261.
- 16) Ray, B., and Speck, M. L. (1973b) Freeze-injury in bacteria. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 4, 161-213.
  - 17) Sinskey, T. J., and Silverman, G. J. (1970) Characterization of injury incurred by *Escherichia coli* upon freeze-drying. *J. Bacteriol.*, 101, 429-437.
  - 18) Russell, A. D., Ahonkhai, I., and Rogers, D. T. (1979) Microbiological applications of the inactivation of antibiotics and other antimicrobial agents. *J. Appl. Bacteriol.*, 46, 207-245.
  - 19) Brown, M. R. W., and Richards, R. M. E. (1964) Effect of polysorbate (Tween 80) on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to chemical inactivation. *J. Pharm. Pharm.*, 15, 51T-55T.
  - 20) Nadir, M.T., and Gilbert, P. (1979) Influence of potassium chloride upon the binding and antibacterial activity of chlorhesidine diacetate and (ethoxy) 5 octyl phenol (Triton X45) towards *Bacillus megaterium* KM. *Microbios.*, 26, 51-63.
  - 21) Maher, V. M., Miller, E. C., Miller, J. A., and Szybalski, W. (1968) Mutations and decreases in density of transforming DNA produced by derivatives of the carcinogens 2-acetylaminofluorine and N-methyl-4-aminobenzene. *Mol. Pharm.*, 4, 411-423.
  - 22) Beuchat, L. R. (1978) Injury and repair of gram-negative bacteria, with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane. *Adv. Appl. Microbiol.*, 23, 219-241.
  - 23) Busta, F. F. (1978) Introduction to injury and repair of microbial cells. *Adv. Appl. Microbiol.*, 23, 195-200.
  - 24) Hugo, W. B. (1976) Survival of microbes exposed to chemical stress. In *The Survival of Vegetative Microbes*, Gray, T. R. G., and Postgate, J. R. (eds) pp.383-413, Cambridge, Cambridge University Press.
  - 25) Peters, R. (1961) Further experiments on the inhibition of aconitase by enzymically prepared fluorocitric acid. *Biochem. J.*, 79, 261-268.
  - 26) Schnaitman, C. A. (1971) Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, Triton X-100, and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 108, 553-563.
  - 27) Cornet, L. B., and Shockman, G.D. (1978) Cellular lysis of *Streptococcus faecalis* induced with Triton X-100. *J. Bacteriol.*, 135, 153-160.
  - 28) Spratt, B. G. (1975) Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli*. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 72, 2999-3003.
  - 29) Tamaki, S., Nakajima, S., and Matsushashi, M. (1977) Thermosensitive mutation in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding proteins IB's and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis *in vitro*. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 74, 5472-5476.
  - 30) Spratt, B. G., and Pardee, A. (1975) Penicillin-binding proteins and cell shape in *Escherichia coli*. *Nature*, 254, 516-517.
  - 31) Suzuki, H., Nishimura, Y., and Hirota, Y. (1978) On the process of cell division in *Escherichia coli*. A series of mutants of *Escherichia coli* altered in the penicillin-binding proteins. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 75, 664-668.
  - 32) Spratt, B. G. (1977a) Temperature sensitive cell division mutants of *Escherichia coli* with thermolabile penicillin-binding proteins. *J. Bacteriol.*, 131, 293-305.
  - 33) Spratt, B. G. (1977b) Penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*: general properties and characterisation of mutants. *Microbiol.*, 1977: 182-190.
  - 34) Jeynes, M. H. (1957) Growth and properties of bacterial protoplasts. *Nature*, 180, 867.
  - 35) Jeynes, M. H. (1961) The growth and division of bacterial protoplasts. *Experiment. Cell Res.*, 24, 255-264.
  - 36) Bottone, E. J., Brandman, Z., and Schneirson, S. S. (1976) Spheroplasts of *Haemophilus influenzae* induced by cell-wall

- active antibiotics and their effects upon the interpretation of susceptibility tests. *Anti. Agents Chemo.*, 9, 327-373.
- 37) Shafa, F., and Salton, M.R.J. (1960) Disaggregation of bacterial cell walls by anionic detergents. *J. Gen. Microbiol.*, 23, 137-141.
  - 38) Gilbert, P., and Brown, M. R. W. (1980) Cell-wall-mediated changes in sensitivity of *Bacillus megaterium* to chlorhexidine and 2-phenoxyethanol, associated with growth rate and nutrient limitation. *J. Appl. Bacteriol.*, 48, 223-230.
  - 39) Hamilton, W. A. (1970) The mode of action of membrane active antibacterials. *FEBS Symposium*, 20, 71-79.
  - 40) Nikaido H. (1976) Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. *Biochem. Biophys. Acta*, 433, 118-132.
  - 41) Nikaido, H., and Nakae, T. (1979) The outer membrane of Gram-negative bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 20, 164-204.
  - 42) Scherrer, R., and Gerhardt, P. (1971) Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *J. Bacteriol.*, 107, 718-735.
  - 43) Asbell, M. A., and Eagon, R. G. (1966) Role of multivalent cations in the organisation, structure and assembly of the cell walls of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 92, 380-387.
  - 44) Eagon, R. G., and Asbell, M. A. (1966) Disruption of activity of induced permeases by Tris (Hydroxymethyl) aminomethane in combination with ethylenediaminetetra acetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24, 67-73.
  - 45) Leive, L., and Kollin, V. (1967) Controlling EDTA treatment to produce permeable *Escherichia coli* with normal metabolic processes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 229-236.
  - 46) Harold, F. M., and Baarda, J. R. (1968) Inhibition of membrane transport in *Streptococcus faecalis* by uncouplers of oxidative phosphorylation and its relation to proton conduction. *J. Bacteriol.*, 96, 2025-2034.
  - 47) Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of membranes. *Science*, 175, 720-731.
  - 48) Bolle, A., and Kellenberger, E. (1958) The action of sodium lauryl sulphate on *Escherichia coli*. *Schwei. Zeit. Pathol. Bakteriolog.*, 21, 714-740.
  - 49) Beckett, A. H., Patki, S. J., and Robinson, A. (1959) The interaction of phenolic compounds with bacteria I. Hexylresorcinol and *Escherichia coli*. *J. Pharm. Pharmacol.*, 11, 360-366.
  - 50) Judis, J. (1962) Studies on the mechanism of action of phenolic disinfectants. I. Release of radioactivity from carbon-14-labelled *Escherichia coli*. *J. Pharm. Sci.*, 51, 261-265.
  - 51) Silver, S., and Wendt, L. (1967) Mechanism of action of phenethyl alcohol. Breakdown of the cellular permeability barrier. *J. Bacteriol.*, 93, 560-566.
  - 52) Gilbert, P., Beveridge, E. G., and Crone, P. B. (1977a) The lethal action of 2-phenoxyethanol and its analogues upon *Escherichia coli* NCTC 5933. *Microbios*, 19, 125-142.
  - 53) Hugo, W. B., and Longworth, A. R. (1964) Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 16, 655-662.
  - 54) Salton, M. R. J. (1968) Lytic agents cell permeability and monolayer penetrability *J. Gen. Physiol.*, 52, 227-252.
  - 55) Rye, R. M., and Wiseman, D. (1964) Release of phosphorus-32 containing compounds from *Micrococcus lysodeikticus* treated with chlorhexidine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 16, 516-521.
  - 56) Gilbert, P., Beveridge, E. G., and Crone, P. (1977b) Effect of 2-phenoxyethanol on permeability of *Escherichia coli* NCTC 5933 to inorganic ions. *Microbios*, 19, 17-26.
  - 57) Broxton, P., Woodcock, P. M., and Gilbert, P. (1983) A study of the antibacterial activity of some polyhexamethylene biguanides

- towards *Escherichia coli* ATCC 8739. *J. Appl. Bacteriol.*, 54, 345-353.
- 58) Lambert, P. A., and Hammond, S. M. (1973) Potassium fluxes. First indications of membrane damage in micro-organisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 54, 796-799.
- 59) Pullman, J.E., and Reynolds, B.C. (1965) Some observations on the mode of action of phenol on *Escherichia coli*. *Aust. J. Pharm.*, 46, 580-584.
- 60) Braswell, J. R., and Hoadley, A. W. (1974) Recovery of *Escherichia coli* from chlorinated secondary sewage. *Appl. Microbiol.*, 28, 328-329.
- 61) Thompson, J., and DeVoe, I. W. (1972) Physiological and morphological effects of phenylethanol upon a gram-negative marine pseudomonad. *Can. J. Microbiol.*, 18, 841-852.
- 62) Silva, M. T., Sousa, J. C. F., Macedo, M. A. E., Polonia, J., Parente, A. M. (1976) Effects of phenethyl alcohol on *Bacillus* and streptococcus. *J. Bacteriol.*, 127, 1359-1369.
- 63) Nadir, M. T., and Gilbert, P. (1982) Injury and recovery of *Bacillus megaterium* from mild chlorhexidine treatment. *J. Appl. Bacteriol.*, 52, 111-115.
- 64) Lester, G. (1965) Inhibition of growth, synthesis and permeability in *Neurospora crassa* by phenethyl alcohol. *J. Bacteriol.*, 90, 29-37.
- 65) Elferink, J. G. R., and Boou, H. L. (1974) Interaction of chlorhexidine with yeast cells. *Biochem. Pharmacol.*, 23, 1413-1419.
- 66) Wiseman, D. (1964) The effect of chlorhexidine on the permeability and succinoxidase activity of *Micrococcus lysodeikticus*. *J. Pharm. Pharmacol. Supplement* 16, 56T-57T.
- 67) Daltrey, D. C., and Hugo, W. B. (1974) Studies on the mode of action of the antibacterial agent, chlorhexidine, on *Clostridium perfringens*. 2. Effect of chlorhexidine on metabolism and on the cell membrane. *Microbios*, 11, 131-146.
- 68) Miller, L. L., and Ordal, Z. J. (1972) Thermal injury and recovery of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol.*, 24, 878-884.
- 69) Tomlins, R. I., and Ordal, Z. J. (1971) Requirements of salmonella typhimurium for recovery from thermal injury. *J. Bacteriol.*, 105, 512-518.
- 70) Allwood, M. C., and Russell, A. D. (1970) Mechanisms of thermal injury in non-sporulating bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.*, 12, 89-119.
- 71) Jackson, R. W., and DeMoss, J. A. (1965) Effects of toluene on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 90, 1420-1425.

# 男女の金属接触皮膚炎

鶴田 京子\*, 松永 佳世子\*\*

*Kyoko Tsuruta, Kayoko Matsunaga*

\* 藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院皮膚科, \*\* 藤田保健衛生大学医学部皮膚科

## はじめに

接触皮膚炎は、皮膚科の外来診療においてよくみる疾患である。外来性の化学物質が皮膚に直接接触することによって引き起こされる皮膚の炎症であり、刺激性とアレルギー性とがある。原因となりうる化学物質は、日常生活でごく身近に存在する金属、植物、化粧品、外用薬や衣類など多岐にわたっており<sup>1)</sup>、それは時代の流行によっても変遷をくり返しているが、いずれも角層を通過可能な分子量 1,000 以下の物質である。

本稿では、金属の接触皮膚炎について、まずその臨床型を述べ、次に 1994 年から 2000 年の 7 年間に Japanese standard series のパッチテストを施行した 1,302 例 (男性 323 例, 女性 979 例) について、パッチテスト陽性頻度、性差、各アレルギーの年代別頻度について概説したい。

## 臨床型

金属の接触アレルギーは、局所型と全身型の 2 つのタイプが存在する。ネックレス、ピアス、イヤリング、指輪などの装飾品、時計、皮革製品、コイン、セメントや消毒薬などに含まれている金属が直接接触した皮膚に炎症をおこすタイプを、局所型の金属接触アレルギーという。

一方、食品、歯科金属や骨接合用金属に含まれている微量金属が、経口摂取や経気道吸収などの経皮吸収以外の経路により体内に吸収され惹起するタイプを、全身型の金属接触アレルギーという。Fisher は、接触感作が成立した個体に、原因アレルギーが経皮的以外の経路で吸収されて発症するものを systemic contact-type dermatitis と定義している<sup>2)</sup>。全身型接触アレルギーの発症様式がこれにあてはまる。中山らが提唱する歯科金属疹<sup>3)</sup>も全身型接触アレルギーである。

歯科金属疹は、皮疹型から①汗疱型、②パッチテスト部位の再燃現象、③汎発性紅斑丘疹小水疱、④多形紅斑および血管炎、⑤蕁麻疹の 5 型に分類されている<sup>2, 4)</sup>。この発疹型の中でもっとも頻度が高いのが①の汗疱型で

\* 〒 454-8509 名古屋市中川区尾頭橋 3-6-10

\* FAX: 052-322-4734

表 1 歯科金属アレルギーにより惹起された皮膚粘膜疾患

舌炎
口内炎
口唇炎
歯肉口唇炎
肉芽腫口唇炎
蕁麻疹
クインケ浮腫
口腔内扁平苔癬
皮膚扁平苔癬
皮膚痒疹症
浮腫性紅斑
掌蹠膿疱症
汗疱状皮膚炎
好酸球性膿疱性毛包炎
貨幣状湿疹
全身の皮膚炎 (pseudo-atopic dermatitis)

文献3より引用

あり、汗疱状湿疹、異汗性湿疹と診断される。



### 問 診

皮膚疾患のみならず診断をつけるには、患者をじっくり観察し(視診)、訴えのなかから診断を導くヒントを得る問診をとることが重要である。

長期間口腔内に存在している歯科金属に関しては、口腔粘膜に所見や自覚症状が存在することは稀である。また一般的に、口腔内に症状が存在しないために、長期間口腔内に装着されている歯科金属が、アレルギーであるはずがないと思われる。そこでその診断には、異味症、口腔内異和感、歯科治療歴や口臭の有無など、詳細な問診をとることが必要である。

当科では、口腔内のどの位置に何色の歯科金属が装着されているかをスケッチしている。金含有の歯科金属は、必ずしも黄金色をしているものばかりではなく、黄金色をしていなくても、合金として金が含有されている場合がある。

扁平苔癬や貨幣状湿疹など慢性、難治性の経過をたどる疾患のなかには、金属アレルギーが原因である場合もある。このように歯科金属アレルギーにより惹起される皮膚粘膜疾患には、扁平苔癬や貨幣状湿疹以外に表1に示すものがある。



### パッチテスト

金属アレルギーの検出法として、パッチテストは侵襲

が少なく簡便で有用な方法である。

#### ① 試験試料

日本接触皮膚炎学会企画の Japanese standard allergens (以下 JSA, 表 2) は、金属アレルギーのみならず、ほかの思いがけない接触アレルギーの原因検索としても有用である。

#### ② 貼付対象

1994年から2000年までに当科を受診した患者のなかで、なんらかの接触アレルギーの原因検索を必要と考えられた1,302例(男性323例, 平均年齢48.7歳, 女性979例, 平均年齢32.6歳)を対象としてパッチテストを施行した。対象者の男女別の年齢分布(図1)とパッチテスト施行時の皮膚疾患を図2に示す。

#### ③ 貼付方法と判定

皮疹のない背部にフィンチャンパー<sup>®</sup>、スキャンポールテープ<sup>®</sup>を用いて、48時間閉鎖貼付する。ユニット除去1時間後(D2)、24時間後(D3)、5日後(D7)に International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) 基準に従い判定する。金属アレルギーの反応には刺激反応や遅発反応があるので、D7の判定は必要不可欠である。

#### ④ 統計解析

Fisherの直接確率計算法に基づき、危険率5%以下を有意差ありと判定した。

#### ⑤ JSAの陽性率

足立ら<sup>5)</sup>の報告によると、JSA 24種についての1994年度の日本接触皮膚炎学会の集計では、上位10位中5種の金属アレルギーが含まれており、そのなかでも nickel sulfate は統計学的に女性に多く、potassium dichromate と ammoniated mercuric chloride は統計学的に男性に多い結果であった。

当科で1994年から2000年までの7年間に施行した1,302例(男性323例, 女性979例)のJSA 25種と gold sodium thiosulfate のパッチテスト結果を表3に示したが、当科でも上位10位内に金属アレルギーが7種も含まれ、いかに金属アレルギーが私たちの日常生活に密着したアレルギーであるかがうかがえる。また nickel sulfate と gold sodium thiosulfate は、統計学的にも女性に有意に多いアレルギーであった<sup>6-8)</sup>。

#### ⑥ 性差および年代別

陽性頻度の高かった金属アレルギーについて、それぞれ性別、年代別の比較では、cobalt chloride はいずれ

表2 Japanese standard allergens

1. Cobalt chloride	1.0%pet.	15. Lanolin alcohol	30.0%pet.
2. Nickel sulfate	2.5%pet.	16. PTBP-FR	1.0%pet.
3. Potassium dichromate	0.5%pet.	17. Ethylenediamin 2HCl	1.0%pet.
4. Thiuram mix	1.25%pet.	18. Primin	0.01%pet.
5. PPD black rubber mix	0.6%pet.	19. Urushiol	0.02%pet.
6. Mercapto mix	2.0%pet.	20. Thimerosal	0.1%pet.
7. Caine mix	7.0%pet.	21. Ammoniated mercury	1.0%pet.
8. Fradiomycin sulfate	20.0%pet.	22. Petrolatum	as is
9. Balsam of Peru	25.0%pet.	23. Formaldehyde	1.0%aq.
10. Rosin	20.0%pet.	24. Kathon CG	0.01%aq.
11. Fragrance mix	8.0%pet.	25. Gold sodium thiosulfate	0.5%pet.
12. Dithiocarbamate mix	2.0%pet.	26. Thimerosal	0.05%pet.
13. Paraben mix	15.0%pet.	27. Mercuric chloride	0.05%aq.
14. Paraphenylenediamine	1.0%pet.	28. Distilled water	as is

pet.:petrolatum, aq.:aqueous solution, PTBP-FR: p-tert-butylphenol formaldehyde resin

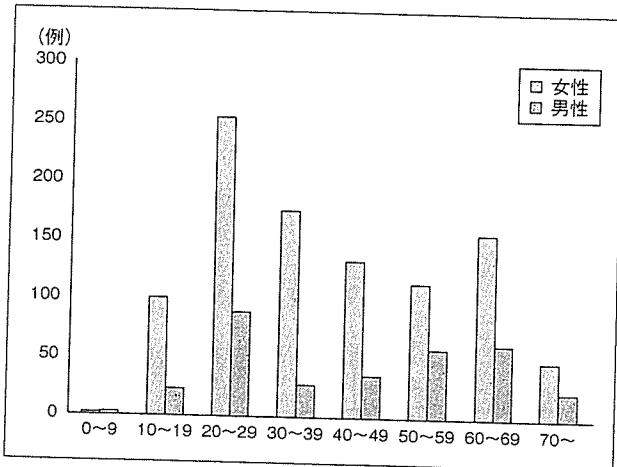


図1 パッチテスト対象者の男女別の年齢分布

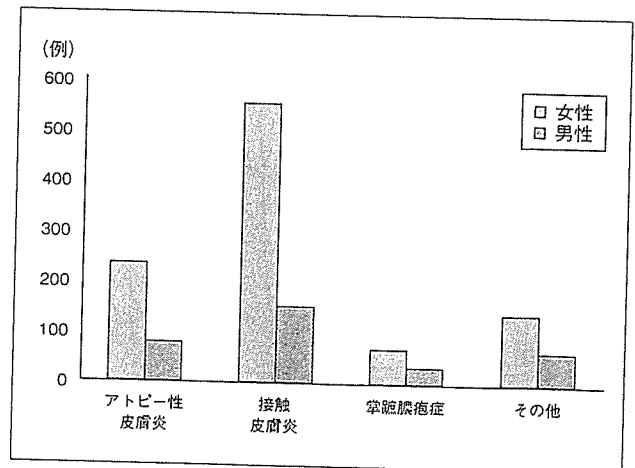


図2 パッチテスト施行時の皮膚疾患 (一部重複あり, [ex] アトピー性皮膚炎+接触皮膚炎)

の年代層においてもパッチテスト陽性率が高く、統計学的に性差に有意な差はみられなかったが、生活密着型アレルギーの様相を呈していると考えられる。

nickel sulfate は、20歳代の女性に有意に陽性率が高かった。これは、ピアスやイヤリングなどの装身具の使用頻度ももちろん関係するが、カーラー、ビューラー、ブラジャーのワイヤーなどのように、直接皮膚に接触する器具を連日使用する機会が男性より多いことも一要因と考えられる。

potassium dichromate は、30歳代以降はすべて男性の陽性率のほうが高く、とくに30歳代と70歳代以降に有意差がみられた。セメントの改良により、以前は

どセメント皮膚炎と診断する機会は少なくなっているが、職業性の関与が考えられる。

gold sodium thiosulfate は、従来の報告どおり女性のほうがパッチテスト陽性率が高く、とくに20、60歳代の女性に有意に陽性率が高かった。20歳代の女性に金感作が多いことは、ピアスの普及が一因をなしていると思われる。

mercuric chloride は60歳代以降の男性に有意に陽性頻度が高かった。mercuric chloride は、殺菌、消毒剤として、以前家庭で使用されてきた赤チンやマーキュロクロムに含有されていたが、幼少時に使用した可能性の高い世代の男性が、有意にパッチテスト陽性率が高い

表3 当科で施行したJSAのパッチテスト結果 1,302例の上位10種

rank	Total (n=1,302)		女性 (n=979)		男性 (n=323)	
		%		%		%
1	cobalt chloride	208 16.0	cobalt chloride	152 15.5	cobalt chloride	56 17.3
2	nickel sulfate	164 12.6	nickel sulfate	142 14.5*	potassium dichromate	50 15.5
3	gold sodium thiosulfate	142 10.9	gold sodium thiosulfate	128 13.1*	PPD	32 9.9
4	potassium dichromate	129 9.9	potassium dichromate	79 8.1	urushiol	32 9.9
5	fradiomycin sulfate	83 6.4	fradiomycin sulfate	60 6.1	thimerosal	26 8.0
6	PPD	78 6.0	PPD	46 4.7	fradiomycin sulfate	23 7.1
7	urushiol	72 5.5	urushiol	40 4.1	nickel sulfate	22 6.8
8	thimerosal	52 4.0	mercuric chloride	34 3.5	ammoniated mercuric chloride	18 5.6
9	ammoniated mercuric chloride	50 3.8	ammoniated mercuric chloride	32 3.3	gold sodium thiosulfate	14 4.3
10	mercuric chloride	48 3.7	thimerosal	26 2.7	mercuric chloride	14 4.3

\*: p < 0.05, 赤字は金属アレルギー

表4 年齢別・性別の金属アレルギー陽性頻度

陽性アレルギー	0~9		10~19		20~29		30~39		40~49		50~59		60~69		70~	
	女 n=2	男 n=4	女 n=99	男 n=21	女 n=253	男 n=89	女 n=174	男 n=28	女 n=132	男 n=36	女 n=114	男 n=59	女 n=156	男 n=63	女 n=49	男 n=23
cobalt chloride	0	0	4	9.5	18.2	16.9	13.8	35.7	22.7	36.1	20.1	18.5	12.8	6.3	10.2	4.3
nickel sulfate	0	0	5.2	0	21.2**	6.7	13.2	17.9	15.9	16.7	15.8	16.9	10.3	6.3	14.3	0
potassium dichromate	0	0	0	0	5.9	5.6	9.2	28.6***	9.1	25	14.9	22	7.1	15.9	10.2	30.4**
gold sodium thiosulfate	0	0	5.1	4.8	11.1*	3.4	9.2	0	9.8	8.3	16.6	8.5	14.1*	4.8	4.1	8.7
ammoniated mercuric chloride	0	0	4	0	4	5.6	2.9	14.3	3	8.3	4.4	13.6*	1.9	7.9*	4.1	17.3
mercuric chloride	0	0	2.6	0	3.6	4.5	2.9	0	4.5	0	4.4	6.8	2.6	9.5*	4.1	26.1**
thimerosal	0	50.0	5.1	9.5	5.1	6.7	4.6	14.3	4.5	8.3	6.1	3.4	1.9	7.9*	10.2	17.3

\*: p < 0.05  
 \*\*: p < 0.01  
 \*\*\*: p < 0.001

と思われる。

ammoniated mercuric chlorideは、50、60歳代の男性で有意に陽性頻度が高かった。また thimerosal は、60歳代男性に有意に陽性頻度が高かった(表4)。

以上、金属接触皮膚炎について、JSAのパッチテスト陽性率、性差、年代別に検討した結果を報告した。パッチテスト陽性上位アレルギーは時代とともに変遷してきている<sup>5)</sup>。当科のパッチテスト結果からみた大きな変化としては、金属アレルギーの陽性率が上昇し、従来の上位アレルギーに含まれていた香料系のアレルギーに変

わって、さらに金属アレルギーが増え、上位10種の中に7種も含まれていた。これにより、いかに金属アレルギーが日常生活に密着したアレルギーであるかがうかがえた。

#### 金属アレルギーの性差と性ホルモン

マウスモデルによって、金属アレルギーの性差は性ホルモンに関連していることが明らかになった。

金の女性有意の現象について、われわれは動物モデルを作成し、7週齢のB6C3F1雌雄マウスを用いて、

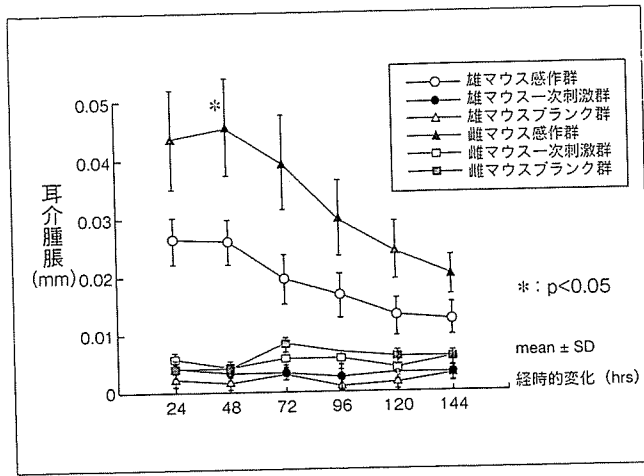


図3 金接触感作における B6C3F1 マウスの雌雄差  
B6C3F1 雌雄マウスを用いた 5% GST 溶液の感作試験はすべて成立した。惹起後の反応性に雌雄差がみられ、雌感作群では、惹起 48 時間後に反応のピークがみられ、その後反応は持続性であり、雄マウス感作群では、惹起 24 時間後に反応のピークがみられ、その後反応は軽減した。惹起 48 時間後において、雌マウスのほうが雄マウスよりも反応性が有意に強かった ( $p < 0.008$ )。

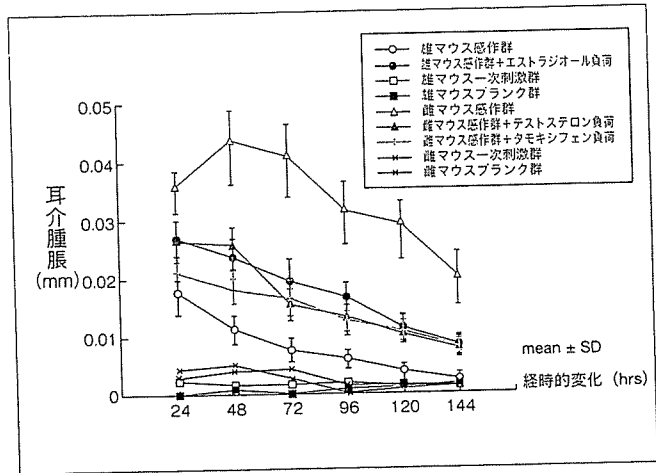


図4 金接触感作における性ホルモンの関与  
B6C3F1 雌雄マウスを用いた 5% GST 溶液の感作試験の雌雄差について、さらに性ホルモンの関与についてエストラジオール、テストステロン、タモキシフェンを負荷し検討した。その結果、金の接触感作反応は、エストラジオールによってその反応を増強される結果であった。

gold sodium thiosulfate 5% aq. にて感作後惹起し、マウスの耳介の厚さを経時的に測定した。その結果、惹起 48 時間後に雌のほうが雄よりも有意に強い耳介腫脹を示した。結論として、マウスモデルを用いた gold sodium thiosulfate の感作試験は成立し、その反応も雌のほうが雄よりも有意に強く、ヒトパッチテストの結果と同様であり、gold sodium thiosulfate の反応性に雌雄差があることを明らかにした(図3)<sup>8)</sup>。

その後、さらに性ホルモンの関与を検討した結果、金接触感作反応は、エストラジオールが反応の強さを増強する抗原の一つであると結論した(図4)<sup>8)</sup>。

おわりに

一般的に性差が認められている SLE, 橋本病, 強皮症などの自己免疫疾患<sup>9, 10)</sup>は、遺伝子の関与と性ホル

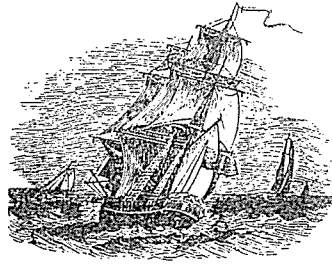
モンの関与が示唆されているが、いまだ明らかではない。われわれのマウスモデルによる金属アレルギーの性差の実験結果は、病因解明における重要な臨床的糸口であると考え、解明に向けて、今後もさらなる研究が必要であると思われる。

文献

- 1) 早川律子: 皮膚の科学 6: 537, 2003
- 2) Fisher AA: Contact Dermatitis 3<sup>rd</sup> ed., Lea & Febiger, Philadelphia, p.119, 1986
- 3) 中山秀夫ほか: 歯界展望 43: 382, 1974
- 4) 須貝哲郎: 皮膚 30: 8, 1988
- 5) 足立厚子: MB Derma 4: 7 1997
- 6) 鶴田京子: MB Derma 46: 13, 2001
- 7) Tsuruta K et al: Contact Dermatitis 44: 55, 2001
- 8) 鶴田京子: 藤田学園医学会誌 20: 479, 2001
- 9) 山口優美, 山本一彦: 治療 39: 53, 2005
- 10) 関川 巖: リウマチ科 34: 573, 2005



# 羅針盤



## 歯科と皮膚科の連携には 5 つの CO !

松永 佳世子

*Kayoko Matsunaga*

藤田保健衛生大学医学部皮膚科教授・Visual Dermatology 編集委員

本年9月13日から16日、ベルリンで第8回欧州接触皮膚炎学会学術大会が開かれました。いつも参加されておられた早川律子先生が4月に逝去され、日本接触皮膚炎学会理事長の私が欠席することは許されない状況となりました。本学会は、評判どおり学術情報、組織力、人脈の点でも接触皮膚炎の領域でNo.1の学会であると思えました。欧州各国から集まった皮膚科医、化学者、化粧品メーカーの研究者などが、質の高い最新の研究成果を講演し、一般演題も270題にのぼりました。

いま、キャンパスの秋をながめながら、これから欧州をはじめ世界の研究者と協力して社会のためにいい仕事をしていこうと、爽やかな気持ちで原稿を書いています。

さて、歯科金属アレルギーが原因となって生じる皮膚疾患としては、扁平苔癬、汗疱状湿疹(異汗性湿疹)、掌蹠膿疱症などが知られています。私の歯科との連携は金属アレルギーが出发点でした。その後、感染病巣として扁桃腺や歯性感染症が掌蹠膿疱症、乾癬、膿疱性乾癬、貨幣状湿疹などの皮膚疾患の原因となり得ることを経験し、積極的に歯科、耳鼻科と連携するようになりました。一昨年、名大皮膚科の後輩である福井良昌先生を通して、名古屋市で歯科医院を開業されている押村 進先生とお会いし、先生のお世話により昨年の8月、名古屋市で「皮膚科と歯科との懇談会」が開かれました。参加者は歯科医が14名、皮膚科医6名、内科医1名、歯科技工士2名、



この会で服部正巳教授ともお会いし、今回の特集の基盤ができたわけです。Face to faceで知りたいことを率直に聞き教え合う、連携の始まりには常に必要なことですが、大いなる信頼感を得ることができました。この特集「歯科と連携して治す皮膚疾患」は、皮膚科医と歯科医の連携に役立ち、患者さんがより良い診療を受ける機会になることを願って企画しました。

私は医師／研究者として必要な素養として5つのCOのつく言葉が必要だと考えています。それは① Communication (コミュニケーション)：思ったことを誤解のないように相手に伝える力、② Conscience (良心)：嘘をつかない、できないことや知らないことを正直に言う、あたりまえのことを素直にできる誠実さ、③ Consideration (思いやり)：すべての人を思いやれる強い心、④ Confirmation (確認)：思い込まず過信せず、必ず多方面から確認する姿勢、⑤ Cooperation (協力)：他と協調すること、和の尊重です。この5つのCOを持った人に生涯自己学習と研鑽が相まって、「この人にかかれば病気が治る」と患者さんに安心していただける医師になれると考えています。歯科と連携するには、お互いに5COsを基本にすることが大切です。できればお会いして、それが叶わなくても、電話あるいはメールなどによる密な連携を行い、質の高い医療を提供したいものです。

座談会

## 歯科との連携で治す皮膚疾患

今求められている皮膚科医と歯科医との連携・ネットワーク

押村 進

*Suzumi Oshimura*

おしむら歯科

×

服部 正巳

*Masami Habori*

愛知学院大学歯学部歯科補綴学第三講座

×

福井 良昌

*Yoshimasa Fukui*

福井皮フ科医院

司会

松永 佳世子

*Kayoko Matsumaga*

藤田保健衛生大学医学部皮膚科

### ◆1. 歯科と皮膚科が連携して治す皮膚疾患にはどのようなものがあるか

松永(司会)：今日は歯科からお二人、皮膚科からお一人の先生をお招きし、「歯科との連携で治す皮膚疾患」というテーマでお話したいと思っています。

私は大学病院に勤める皮膚科医ですが、掌蹠膿疱症や扁平苔癬を疑って歯科から紹介される患者さんが多いように思います。菌性感染症と金属アレルギーその他もあると思いますが、私自身アレルギーを専門としていますので、金属アレルギーからどういう皮膚疾患があるかを検討することが多いと思います。先生方はいかがでしょうか。

押村：私は名古屋市の中川区で歯科医院を開業しています。大学病院の皮膚科の先生からの依頼ということもありますが、来院される患者さんで多いのは、やはり接触皮膚炎と掌蹠膿疱症ですね。近ごろでは、アトピー性皮膚炎を歯科で治してほしいと言われる患者さんが多く、アトピーと歯科との関係をどう捉えたらいいのか悩んでいます。

服部：私は愛知学院大学歯学部附属病院で、口腔金属アレルギー外来の科長を勤めております。皮膚科の先生方

からの紹介もかなり多いので、掌蹠膿疱症や金属アレルギーは症例としては多いと思います。ただ扁平苔癬に関しては、口腔外科がメインになって患者さんを担当していますので、そちらと連携しています。金属アレルギーと関係があった扁平苔癬の患者さんは数例あるのみで、非常に少ないと思います。

福井：私は押村先生と同じ中川区で皮膚科を開業しています。今まで金属アレルギーなどについてはほとんど考えたことがありませんでした。押村先生が熱心に研究されていて、そこに半ば巻き込まれるような形で5年くらい前から金属アレルギーと皮膚疾患の関係を検討するようになりました。掌蹠膿疱症や汗疱、そういう昔から金属アレルギーが原因のひとつと考えられている疾患はもちろん検討しなければいけないし、アトピー素因も家族歴もないのに非常に難治性のアトピー性皮膚炎や、あるいは全身に広がるような難治性の貨幣状湿疹の患者さんには、念のためパッチテストをやってみる価値はあると、最近では思っています。

松永：それはアトピー性皮膚炎の典型例からちょっと外れますか。

福井：私の印象としてはそうでもありません。これから



押村 進 先生 (おしむら 歯科 院長)



服部 正巳 先生 (愛知学院 大学歯学部 歯科補綴学 第二講座 教授)

症例が集まってきてわかることで、今の段階ではなんとも言えません。

松永：わかりました。ありがとうございました。

◆ 2. 歯科医から皮膚科医へ 紹介状や経過報告書に書いてほしい情報

松永：歯科の先生方は皮膚科から紹介状や経過報告書というのをもらったことがあると思いますが、うまい書き方の紹介状、あるいは反対に困った紹介状や要望についてお話しいただければと思います。

服部：紹介状をいただいた際、「金属アレルギー」としか書いていないものがありまして、これには困りました。

松永：それは皮膚科医が自分で検査をしていないのでしょうか。

服部：はい。一瞥して「これは金属アレルギーだから」ということで送ってみるので困っております。紹介状には、検査をしたかどうかぐらいは書いていただきたいものです。投薬状況や初診からの経過についても教えてほしいですね。

松永：基本的なことも書いていない、短いものが多いということですね。

服部：皮膚科の先生にお伺いしたいのですが、症状からすぐ「金属アレルギー」と断定できるものでしょうか。

松永：「金属アレルギーがありそうな疾患」という点では掌蹠膿疱症と汗疱状湿疹、扁平苔癬、貨幣状湿疹があげられます。それ以外ですと、口腔違和感や唾液の分泌異常に金のアレルギーあった例を3例経験していますが、これらは非常に稀ですね。

福井：皮膚科から金属アレルギーとして紹介されるのはどういう患者さんですか。

服部：湿疹が出ていたり、顔全体がただれていると、「これは金属アレルギーだ」ということで、確定診断みたいな形で歯科に依頼されます。

松永：パッチテストや既往歴もしっかり調べないで送るんですね。同じ皮膚科医として恥ずかしいです。

服部：皮膚科の先生方からご依頼いただく際、検査をされているのはだいたい2~3割くらいですね。残りほとんど検査なしで、「これは金属アレルギーだ」と断定されています。そうすると口の中に入れた金属が原因だということ、歯科のほうが悪者になるんですね。ところが私もでも検査したり、特別な機械で金属溶出量を測ると、そうではないことが多い。そこで、患者さんには別の原因を探るということになってくるんですよ。

松永：断定するのではなくて、少なくともどうしてそう思ったかという検査結果と根拠をきちんと紹介状に書いてほしい、ということですね。

服部：それに、患者さんの経過も書いてほしいですね。患者さんは複数の皮膚科に通院していることが多く、たとえば2番目の皮膚科の先生は1番目の先生のことをたぶんお聞きにならないと思うんです。それが4軒5軒と重なると、まったくわからなくなってしまう。

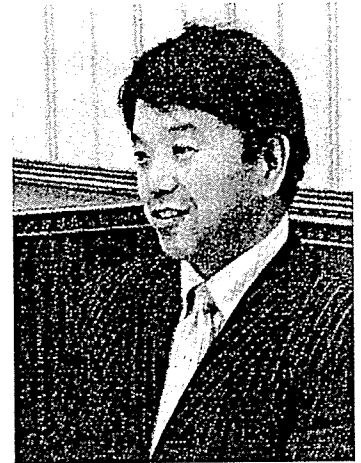
福井：そういう意味ではきちんと情報を共有して、「ではこの皮膚科でもう一度調べてください」とか、そういうのがわかるようになるといいですね。

松永：そうですね。押村先生の医院ではいかがですか。

押村：服部先生がおっしゃったように、金属アレルギーだと断定されてくる患者さんのなかには、金属が原因ではないことも多くあります。ですから、金属アレルギーだと断定せずに、「とりあえず歯科でも1回レントゲン



松永 佳世子 先生 (藤田保健衛生大学医学部皮膚科教授)



福井 良昌 先生 (福井皮膚科 院長)

を撮って口の中をみてもらってください」というふうに言っていたら、お互いに連携がとれるんです。

服部：「歯科で金属を外してもらってこい」と言われる患者さんも稀にいますよね。

松永・福井：信じられない……。

押村：それに、アマルガムはいけないものと言っている皮膚科の先生もいるし、銀色に光るものをすべてニッケル・クロムだと言われる先生がいて、これも困りますね。患者さんがそうだと思ってしまうんですね。餅は餅屋だから、そのあたりのことは私たち歯科医に任せてくださるとありがたいです。

福井：もちろんそうですね。

押村：また、診断名に「主婦湿疹」のような曖昧な病名が多く、困ってます。確定診断はむずかしいにしても、もう少し教科書に書いてあるような病名を、「疑い」でもいいですから言っていたら、こちらも対処の方法があるのですが……。

あとと思うのは、私たち歯科医はあくまでも側面的な治療をするので、その後の経過も、ぜひ教えてほしいのです。たとえば1回紹介して返信状を書いたらそれでおしまいではなくて、たとえば2カ月待って、「こういう状態になってきました」とか、「先生のところで金属を外してよくなりました」とか、「変わらないのでこう進めていきますか?」ということを教えていただくと、患者さんには一番いいんじゃないかと思います。

服部：私のところでは、自分が診察した患者さんは、もとの皮膚科や歯科の先生のところに戻っても、経過を報告してもらうために、1~2カ月後に必ず予約して、きていただくんですよ。

### ◆ 3. 皮膚科医から歯科医へ 紹介状や経過報告書に書いてほしい情報

松永：今度は逆に皮膚科医から歯科医に要望はありますでしょうか。

福井：この患者さんは治療を皮膚科でしてほしいのかどうかということを知りたいですね。先ほど服部先生から多くの皮膚科を渡り歩いた患者さんの話がありました。歯科では通院歴がわからないから教えてほしいとおっしゃいましたが、そういう人は前医のことを、皮膚科に来るともつと言わないんです。他科へのほうがまだ言いやすいと思うんです。ですから受診歴と、皮膚科での治療を望んでいるのか、それとも検査だけなのかということが、もしわかれば、書いていただくとありがたいですね。

松永：歯科の先生から皮膚科に対して紹介状が来るというのは、患者さん自身が能動的に歯科を受診されたということですか。

福井：普通では考えられないことですが、今、皮疹の治療のために、まず歯科に行かれる患者さんがいるんです。

押村：そうですね。先に皮膚科に行ったほうがいいよ、と言っているんですけどね。

松永：これはおそらく、インターネットや口コミで情報が広がっているんですよ。普通の地域で行うcommonな診療とは別のルートですね。

福井：もうひとつ、私が皮膚科医として紹介状でほしい情報といいますと、その患者さんが皮疹の治療目的でまず歯科に行ったのか、歯の治療をしている途中で皮疹に気がついたのか、皮疹の疑いがあった皮膚科へ紹介状を



	8	7	6	5	4	6	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8	備考
右	上顎	アマルガム赤 +439	アマルガム赤 +309	アマルガム赤 +354			MB 緑	MB 緑	MB 緑	MB 緑		MB 緑	アマルガム赤 +297				
	下顎	アマルガム赤 +283			MB 黄 +378								MB 黄 +292	MB 黄 +184	MB 黄 +343		アマルガム赤 +388
	特記事項																

g: 金属溶出傾向測定機 (DMA マーター) による歯科金属の検査結果. 緑: 安定, 黄色: 準安定, 赤: 活性. MB: 陶材焼付用白金加金合金. 数値: 電位差 (mV).  
 h: DMA マーターがどういうものかを説明するために, メーカーのパフレットを入れることもある. (提供: おしむら歯科 押村 進 先生)



読むと, 金属溶出傾向のデータが非常に大事だということがわかりました. (\*松永佳世子: 金属によるアレルギー性接触皮膚炎, Topics in Atopy Vol. 5, No.1, 2006 年など.)

服部: 金属溶出傾向とアレルギーの関係については全然信じてない先生方も多いですね.

福井: 金属溶出傾向とパッチテストの結果に関するデータはありますか.

押村: 溶出傾向とパッチテストのデータと症状との相関性については, 現在検討しているところですよ.

松永: 症状と溶出傾向の関係を証明するのも必要なのですが, 溶出量が多い人たちにパッチテスト陽性頻度が高いという証明も必要なんです. 逆に, 溶出量の低い人には陽性が少ないというデータもいるわけですが.

◆ 4. 皮膚科医がいつも疑問に思っている歯科への質問

松永: 金属溶出傾向の話が出ましたが, 皮膚科医のなかには金属を取り換えるとどのくらいの費用がかかるのか, 疑問に思っている人もいます.

押村: こういった溶出傾向測定機を使うことで, 溶出傾向の大きい金属だけを探り当て, 最小限の金属を取り換えるだけですみます. しかし皮膚科医の先生だけでなく患者さん側にも, こういった金属を除去する治療というのは非常にお金がかかるという, 間違った認識があるんですよ. 確かにお金がかかる場合もありますが, すべてがかかるわけではありません.

松永: 皮膚科医の中では車 1 台分くらいかかるんじゃないかと思っている人も多いですよ.

福井: 多いですね. そこで, 皮膚科医としていつも疑問

に思っていることなんです, 2 点お伺いしたいことがあります.

まず, 歯科医の先生に「この金属が怪しいから, 治療をしてください」と頼みたいと思ったとき, どこにいったらきちんと対処してくれるのかということと, もう一つはその時にかかる費用, 期間です.

松永: それが標準的にわかっていれば患者さんを紹介しやすいですよ.

服部: 外さなければいけない金属元素がなにかによって変わってくるんです. 自費がどうかにかかわりますので.

松永: アレルギーの頻度が高い金属は, 水銀, ニッケル, 金, クロム……その辺までですよ.

服部: 水銀はともかく, 歯科ではニッケルもクロムもほとんど使いません.

福井: 気軽に除去でき, 一番安くすむのは何の金属ですか.

服部: 何でも除去はできるのですが, 一番簡単に除去できるといえば, アマルガムです. アマルガム自体は大きな虫歯には使わず, 中に詰めるだけです. アマルガムの組成は水銀と銀とスズと, 銅も少し入っています.

松永: 銅やスズアレルギーは頻度として少ないですね.

福井: パラジウムはどうですか.

服部: パラジウムがダメと言われますと, きびしいです. もう金属を使わないようなメタルフリーの治療か, あるいは純チタンしかありません.

松永: パラジウムは, 非常にアレルギー出現頻度が低いです. 金は 7~14% くらいまでですから, 今のお話ですと, 金ではなく, パラジウムアレルギーがあるとダメだと言う理由は何ですか.



服部：パラジウムはほとんどすべての金属修復物に入っているんです。保険適応や自費の歯科用金属にも、卑金属にも、全部入っているんです。

押村：亜鉛もほとんどに入ってますね。亜鉛が入っていると加工がよくなるんです。そもそも、亜鉛の場合は刺激反応が多いですから、アレルギーは心配いりません。

松永：亜鉛アレルギーはこれまでに3例ぐらいしか経験したことがないですね。頻度的に非常に少ないです。

福井：金がダメだった場合はどうするんですか。

押村：チタンとか……。

服部：ポーセレンですね。いわゆるセラミック。

松永：相当値段がかかるんですか。

服部：だいたい1本7～8万円ぐらいです。

松永：10本あったら70～80万円。ご飯を食べられないよりはましですが、ちょっと手が出にくいですね。金属だったらどれぐらいの値段になるんですか。

押村：チタンだと大学病院などで5万円ぐらいです。ただ前歯には使えません。前歯が黒くなってしまいます。

服部：実はチタンにポーセレンを焼きつけたものもあり。治療は何とでもなるのですが、自費になるのでいかにせん高価です。

福井：こういった取り換える金属の価格がある程度、一覧表にでもなっていると非常にありがたいですよ。

松永：患者さんに「こんなものだけ」と目安を紹介できて、とても便利ですね。でも、どちらにしても一回歯科に診てもらわなければならないのですが……。

押村：金属アレルギーだと思って受診されても、たとえば掌蹠膿疱症で病巣感染が原因とわかった場合は、ほとんど保険診療でできます。虫歯を治せばいいんです。もちろん金属アレルギーがあれば金属を取り換えなければいけません。そうではない場合もたくさんあります。その時、たとえば病巣を治すのであれば、それは保険の範囲内で適応できます。そういうことも多いので、歯医者さんに行くとお金がかかるというふうに思われるのはちょっと遺憾だということです。

服部：掌蹠膿疱症自体の歯科での治療法というのがありますから。私が思っているのは金属アレルギーと、根尖病巣という菌性の病巣感染、そして歯周病も原因の一つです。この3つを歯科では対応できるので、それで治らなければ今度は皮膚科の先生のところへ戻っていただいたらよいわけです。

福井：それも、先ほどの歯科への要望と関連するのですが、ここの歯医者さんを紹介すればしっかり治療してくれる、ここだとちょっと……といった、歯科による対応のバラツキについて、非常に知りたいです。どこを紹介すればきちんとやっていただけるのか……。

服部：掌蹠膿疱症が根尖病巣でおこるっていうのがわからない歯科医もいるし、歯周病が原因だとわからない人もいます。

松永：そうすると逆に皮膚科から紹介するときには、「こういう病気にはこういうものが合併すると言われていすから、そういうものはいかがでしょうか？」って書いて、紹介状を書くというのが大事ですね。

服部：そう書いていただいたほうがよいですね。本来なら歯科医がわかってないといけないのですが……。「歯周疾患が原因でおこることがありますので」と書いていただければ、ありがたいです。

押村：歯周疾患と根尖病巣を見つけるのは、普通の歯医者さんにできると思っています。

福井：もちろんできるのでしょうが、それを仕方なくやってくださるのか、積極的にやってくださるのか、その差はありますよね。それは患者さんにも微妙にわかる。すぐにわかると思います。

押村：僕らも一般の歯科医の先生たちに、そういうこととの関連性をもっと啓発していかないといけないでしょうね。

一同：そうですね。

#### ◆5. 歯科医がいつも疑問に思っている皮膚科への質問

松永：反対に歯科医の先生方におうかがいしたいのですが、歯科医がいつも疑問に思っている皮膚科への質問というのはありますか。

押村：たとえば掌蹠膿疱症や接触皮膚炎で皮膚科に患者さんが来た場合に、歯科疾患という言葉の片隅に置かれていますでしょうか。

松永：おそらく一般的には、病巣感染については相当みなさんの頭の中から抜けていると思います。逆に歯科金属アレルギーは、接触皮膚炎学会なんかでよく発表されているので、頭の中にあると思います。実はもっと基本的に虫歯、つまり根尖感染病巣をきちんと治すことを教育されていないですね。

福井：そのとおりだと思います。

押村：たとえば掌蹠膿疱症の場合は1回歯科に、どこ

でもいいから送っていただきたいです。レントゲン1枚撮れば、その先生が関心あるなしにかかわらず、病巣感染あるなしの返答は得られると思うんです。だからぜひ、お願いしたいと思います。

福井：私の経験を思い返しても、歯科の病巣感染は頭に全然ありませんでした。金属アレルギーはかすかに、隅のほうにはありますけど、患者さんが来院されたときにすぐ「歯医者さんで一度病巣感染や金属アレルギーのことを検査してもらいましょう」とその場でお話することは、まずほとんどないと思います。

押村：でも、私が病巣感染が掌蹠膿疱症と関係があることに気づいたのは、福井先生が抗ストレプトキナーゼ(ASK)を測定してくれたからですよ。

福井：おそらく押村先生から紹介の患者さんだったからですね。そうなるとルーチンでやるわけです。ところがフリーできた患者さんにはASK測定は、開業医ではまず、負担が増えて検査できないと思います。患者さんを早く治してあげなくちゃと思うと、ASK測定などは一見すごく遠回りにみえるんです。でも、結局今こうやっていろんなことを勉強してみると、遠回りではなくてそっちのほうが本当はうんと近道だと、今では思っています。

松永：対症療法をしていたほうが遠回りなんですよ。皮膚科で10年間治療していて治らなかったのに歯科で治療してもらったらバシッと治ると、それまで何をしてたんだろうということになる。

福井：金属アレルギーや病巣感染について、われわれ皮膚科医はもっと真正面から考えないといけないです。

松永：きっと患者さんの気持ちに伝えるということが必要だと思います。すごく悩んでいる人、たとえば人前で手が出せないとか、足が痛くてなかなか歩けないとか、それを何年も続けているという患者さんがいて、その思いはすごく重いものがあると思うんです。

福井：そうです。その患者さんの思いに応じてあげなくてはいけないけれど、医者がその患者さんの思いを理解していないですね。

服部：私のところの大学病院にみえる方は、いろいろな皮膚科医のところを回ってきている方が多いのですが、その中で足が痛くて歩けないという症例がありました。金属アレルギーでしたが、治療で劇的に治りました。そういうこともあるので、私が歯科医として皮膚科の先生にいつもお聞きしたいのは、対症療法がかなり多いと思

うんですけど、原因というものがわかってやっているのかということですね。きちんと患者さんにお伝えしているのでしょうか。「こういう原因ですからこの薬を使います」と言わないと、薬も出せないと思うのですが……。

松永：そう、どう思ってこの治療をしているかというアカウンタビリティというか、説明をする義務や責任があるということですね。そう思います。

押村：掌蹠膿疱症にしても、対症療法だけで本当にいいのかと思うことがあります。

松永：一番に医師がやるべきことは、完全に治すことだと思うんですよ。医療費がいらぬ患者さんにしてあげること。

押村：それにはやっぱり患者さんに入り込んで、いろんなことを一緒に考えてあげないと、患者さんが中心にあるか、患者さんが中心ではないかの違いだと思います。

松永：患者さんに説教するのではなくて、いかに患者さんに役に立つ医療を提供できるかという視点で話さないといけませんね。

押村：とくに掌蹠膿疱症は、症状が手と足の裏じゃないですか。そうすると患者さんにはまさか、歯や扁桃腺に原因があるということに考えが及ばないんですよ。それを言ってもらうのは、やっぱり皮膚科の先生がいいかな、と思うんです。

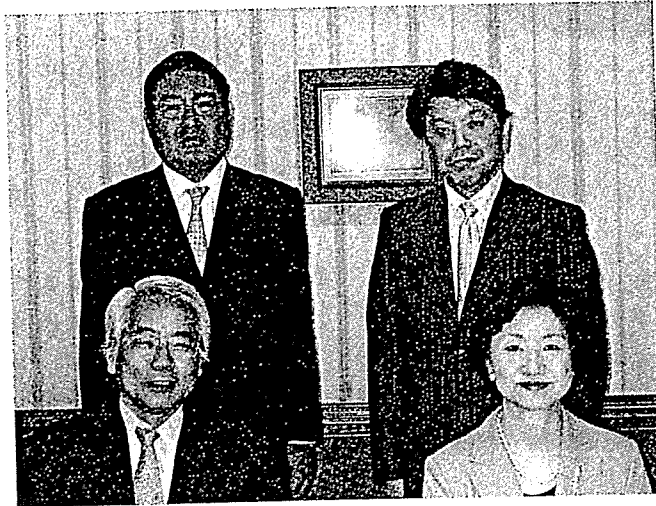
#### ◆6. 歯科と皮膚科でネットワークを作ろう

松永：今これまでの話で、非常に歯科にもバラつきがありますし、皮膚科にもバラつきがあって、ご紹介しても、心が通じ合わないという場合が多いです。そのためできるだけ患者さんに安心して診療いただけるネットワークをまずしっかり作ったあと、歯科は歯科で協力し、皮膚科は皮膚科で協力しながら、たまに合同で勉強し合って、コンセンサスを得ることが必要です。この点について、どういうふうにしていったらよいとお考えですか。

押村：まだ今の段階でFull Openにするのは危険だと思いますね。あくまでもこの疾患について最低限関心があって、勉強しようという人たちを集めるのがまず一つあって、あとやはり僕は服部先生とか松永先生という大学の先生が、やはりそういった同科の先生方を啓蒙・啓蒙していただいて、まずは小さいネットワークかもしれないけれど、それを広げていくことが大事だろうと思います。

松永：充分理解したと思われる人たちからネットにする





ということですね。

押村：はい。それをどう把握したらいいかが問題です。

松永：それはやっぱり医師が医師を把握するということですよ。そうすると非常に偏見がないとか、きちんとものが考えられて、知らないことを知っていると言わない、そういうきちんとしたグループをまずノミネートしなければなりません。パッチテストもできる、材料もあるという場所と人をまずネットにして、先生たちに情報提供するということになりますね。

服部：歯科の場合ほとんかく知らない人が多いので、金属が原因でおこる皮膚疾患があるということを知らせなくてはいけないんですけど、なかなかそれができません。現状では大学に患者さんがみえたときに、私の知っている歯科医に「ここここを治してくれ」という形でしか言えません。詳しく症状がどうのという段階までは踏み込んでいないです。でもネットワークがあるわけではないから、作らないといけないとは思いますが。

押村：当院へ来る遠くからみえる患者さんには、データとか私の考え方を全部書いて、「とりあえずかかりつけの歯医者さんにこれを持って行って、やってくれるか聞いてください」と言って帰します。それでその先生が考えてやってくれると、そこで1人増えるなど。それでもダメだったらまた戻ってきますけど、それでやってくれるようになった先生もいます。

松永：愛知県のなかできちっとやろうと思ったら、日本皮膚科学会中部支部東海地方会あるいは愛知県皮膚科医学会、そういう場で歯科の先生からお話をいただくだけでもいいし、皮膚科と歯科と半分ずつぐらい出して、「歯

科と連携する皮膚疾患」というテーマで1年に1回とか2年に1回とかでいいからシンポジウムをやるといいかもしれませんね。「あ、そんな話聞いたことがあるな」と皆が思うようになるまで続ける……。

押村：愛知県歯科医師会会長の宮村一弘先生にも、皮膚科と歯科とのネットワーク作りに協力していただけるとの力強いお言葉をいただいています。

松永：宮村先生は「歯科医が得になるような商売としては、このネットはやらないでほしい」という話を先日していらっしゃいました。そして、損得抜きで「患者さんの立場に立って、患者さんにとってメリットがあるという形でネットを組むのは僕は賛成だ」と言っていただきました。

服部：ただ、歯科のネットワークについて申し上げますと、現状ではまだ無理だと思いますね。知識がまず、そんなに広まってないですから。

たとえば、歯科医師会が主催する講演会に、皮膚科の先生方に来ていただいて、「こんな皮膚疾患が歯科治療で治った」とやっていただくと、それでびっくりすると思うんです。

松永：証拠があるんですね。まずはそれからやりましょう。

最後に、本当に困っているのは患者さんですので、患者さんが喜び、満足するような治療をやるために、これからも2つの科で協力していきましょう。

本日はどうもありがとうございました。

(2006年6月25日収録、於名鉄グランドホテル)

ORIGINAL ARTICLE

Rumi Sawada, PhD · Tomomi Ito  
Toshie Tsuchiya, PhD

## Changes in expression of genes related to cell proliferation in human mesenchymal stem cells during in vitro culture in comparison with cancer cells

**Abstract** We investigated the expression levels of several genes related to cell proliferation in human mesenchymal stem cells (hMSCs) during in vitro culture for use in clinical applications. In this study, we focused on the relationship between hMSC proliferation and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) signaling during in vitro culture. The proliferation rate of hMSCs gradually decreased and marked changes in hMSC morphology were not observed in 3 months of in vitro culture. The mRNA expressions of TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, and TGF $\beta$  receptor type I (TGF $\beta$ RI) in hMSCs increased with the length of cell culture. There had been no change in the TGF $\beta$ 3, TGF $\beta$ RII, and TGF $\beta$ RIII mRNA expressions by the 12th passage from the primary culture (at about 3 months). The mRNA expression of Smad3 increased, but those of c-myc and nucleostemin decreased with the length of hMSC in vitro culture. In addition, the expression profiles of the genes that regulate cellular proliferation in hMSCs were significantly different from those of cancer cells. In conclusion, hMSCs derived from bone marrow seldom underwent spontaneous transformation during 1–2 months of in vitro culture for use in clinical applications. In hMSCs as well as in epithelial cells, growth might be controlled by the TGF $\beta$  family signaling.

**Key words** Stem cells · Cell proliferation · TGF $\beta$  signaling · TGF $\beta$  receptors

### Introduction

Several recent studies demonstrated the potential of bioengineering using somatic stem cells in regenerative medicine.<sup>1,2</sup> Bone marrow includes both mesenchymal and

hematopoietic stem cells. Adult human mesenchymal stem cells (hMSCs) derived from bone marrow have the pluripotency to differentiate into cells of mesodermal origin, e.g., bone, cartilage, adipose, and muscle cells.<sup>1–5</sup> Moreover hMSCs also have the capacity to differentiate into myocytes,<sup>6,7</sup> hepatocytes,<sup>1,8</sup> and neural cells.<sup>3</sup> In addition, because they are comparatively easy to expand ex vivo, hMSCs have many potential clinical applications, not only in the field of orthopedic surgery but also for the treatment of cardiac infarction, cirrhosis, and diabetes. On the other hand, stem cells possess a self-renewal capability similar to that of cancer cells.<sup>9</sup> Recently Rubio et al.<sup>10</sup> reported spontaneous transformation of human adult stem cells derived from adipose tissue in long-term (4–5 months) in vitro culture. In practice, if hMSCs are to be used for clinical applications and tissue-engineered medical devices, they have to be expanded in vitro for about 1–2 months. The proliferation ability and the gene expression profile of hMSCs, however, might change during in vitro culture. In this study, we focused on the relationship between hMSC proliferation and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) signaling during in vitro culture. TGF $\beta$  is a multifunctional protein that regulates cellular proliferation, differentiation, apoptosis, development, extracellular matrix formation, immunosuppression, and tumorigenesis. In humans, three TGF $\beta$  isomers have been identified:  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 3. TGF $\beta$  signals through three high-affinity cell surface receptors: TGF $\beta$  type I (TGF $\beta$ RI), type II (TGF $\beta$ RII), and type III (TGF $\beta$ RIII) receptors. TGF $\beta$ RI and TGF $\beta$ RII are serine-tyrosine kinases. TGF $\beta$ RIII is known to be a betaglycan.<sup>11</sup> TGF $\beta$ s are first bound to TGF $\beta$ RII and TGF $\beta$ RIII.<sup>12</sup> It has been considered that TGF $\beta$ RIII regulates access to TGF $\beta$ RII,<sup>12–14</sup> and then TGF $\beta$  signal transduction in the cellular pathway is started through stimulation of TGF $\beta$ RI by TGF $\beta$ RII. After that, activated TGF $\beta$ RI phosphorylates Smad2 or Smad3, which are receptor-regulated Smads (R-Smad) activated by TGF $\beta$  and activin.<sup>15,16</sup> After Smad4, which is a common mediator Smad (C-Smad), is connected to phosphorylated R-Smads, the complex is transported to the cell nucleus and influences the transcription activity of TGF $\beta$ -dependent genes.<sup>15,16</sup> c-myc, which is one of the

Received: December 12, 2005 / Accepted: May 15, 2006

R. Sawada (✉) · T. Ito · T. Tsuchiya  
Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences,  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan  
Tel./Fax +81-3-3700-1487  
e-mail: rsawada@nihs.go.jp

TGF $\beta$ -dependent genes, is regarded as an oncogene and regulates cellular proliferation. In the present study, therefore, we investigated whether the gene expression levels of three TGF $\beta$  isomers (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, and TGF $\beta$ 3) and their receptors (TGF $\beta$ RI, TGF $\beta$ RII, and TGF $\beta$ RIII), Smad3 and c-myc were changed in hMSCs during in vitro culture.

Wnt-8B is related to cell self-renewal and tumorigenesis,<sup>9</sup> and Wnt proteins can act as stem cell growth factors.<sup>17</sup> Wnt signaling activates the genes that promote proliferation (c-myc and others) by accumulating  $\beta$ -catenin in some kinds of stem cells and cancer cells.<sup>9</sup> Nucleostemin is involved in proliferation in both stem cells and cancer cells.<sup>18</sup> Therefore we also investigated the gene expression levels of Wnt-8B and nucleostemin in hMSCs.

In addition to investigating the expression of these genes relating to cellular proliferation in hMSCs during in vitro culture, we compared them with those in two kinds of cancer cell lines, HeLa S3 (a human cervical cancer cell line) and HepG2 (a human hepatoma cell line).

## Materials and methods

**Cell culture.** Human mesenchymal stem cells (hMSCs) derived from bone marrow were purchased from Cambrex Bio Science (Walkersville, MD, USA). Their donor was an African American woman aged 19 years. The cells that we obtained from Cambrex Bio Science were second-passage cells. The hMSCs were cultured in mesenchymal stem cell basal medium (MSCBM; Cambrex Bio Science) supplemented with mesenchymal cell growth supplement (MCGS; Cambrex Bio Science), L-glutamine, and 100 U/ml penicillin-streptomycin at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cells were seeded at a density of 6000 cells/cm<sup>2</sup> and were subcultured when they were just subconfluent (approximately 90% confluent) up to the 10th passage, corresponding to the 12th passage from when the hMSCs were collected from the donor. The human cervical carcinoma cell line HeLa S3 (JCRB Cell Bank, Osaka, Japan) was

cultured using Ham's F-12 culture medium (Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Intergen, Purchase, NY, USA) and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The human hepatoma cell line HepG2 (Riken Bioresource Center, Tsukuba, Japan) was cultured using minimum essential medium (MEM) (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) containing 0.1 mM nonessential amino acids (NEAA) (Invitrogen), 10% FBS (Intergen), and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen).

**Preparation of total RNA.** Because the purchased hMSCs had been expanded in the manufacturing process as described above, we express the 1st passage of the hMSCs in this study as the 3rd from the primary culture. For quantitative real time-polymerase chain reaction (RT-PCR), total RNA was extracted from hMSC cultures during the 3rd, 5th, 7th, and 12th passages from the donor with Isogen (Nippon Gene, Toyama, Japan). Total RNA was also extracted from HeLa S3 and HepG2 cells once only with Isogen (Nippon Gene).

**Quantitative RT-PCR.** RNA was then reverse-transcribed into cDNA using a First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Primers and annealing temperatures for the c-myc oncogene, nucleostemin, Wnt-8B, transforming growth factor (TGF) $\beta$ 3, and TGF $\beta$ RIII are summarized in Table 1. Amplifications were carried out for 10s at 95°C, for 15s at each annealing temperature, and for 12s at 72°C for 40 cycles. Amplifications of TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ RI, TGF $\beta$ RII, and Smad3, plus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a housekeeping gene, were performed using Light Cycler Primer Sets (Roche Diagnostics). PCR was performed in Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) in a Roche Light Cycler (software version 4.0).

**Statistical analysis.** All results are shown as means  $\pm$  SD. The significance of the differences in mean values was evaluated by Student's *t* test.

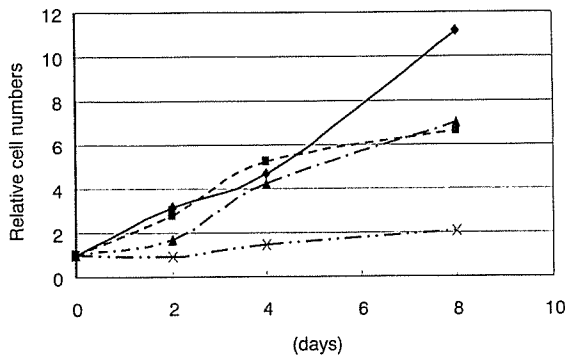
**Table 1.** Primers and annealing temperatures used for real-time PCR

Gene name	GenBank accession number	Primer orientation	Nucleotide sequence	Starting sequence position	Size for the PCR amplicon(bp)	Annealing temp. (°C)
c-myc	V00568	Forward	5'- GCG AAC ACA CAA CGT C -3'	1626	315	50
		Reverse	5'- CAA GTT CAT AGG TGA TTG CT -3'	1940		
nucleostemin	X91940	Forward	5'- CCA TTC GGG TTG GAG TAA -3'	782	284	50
		Reverse	5'- CTG TCG AGC ATC AGC C -3'	1065		
Wnt-8B	NM_014366	Forward	5'- AGT GAC AAT GTG GGC T -3'	331	244	60
		Reverse	5'- CGT GGT ACT TCT CCT TCA G -3'	574		
TGF $\beta$ 3	NM_003239	Forward	5'- AAA CAC CGA GTC GGA A -3'	535	284	60
		Reverse	5'- TGC CAC CGA TAT AGC G -3'	818		
TGF $\beta$ RIII	NM_003243	Forward	5'- TCC CTA TCC CGC AAG C -3'	2369	189	60
		Reverse	5'- AGA TTA TCG AGG CGT CC -3'	2557		

PCR, polymerase chain reaction; TGF $\beta$ 3, transforming growth factor  $\beta$ 3; TGF $\beta$ RIII, TGF $\beta$  receptor type III

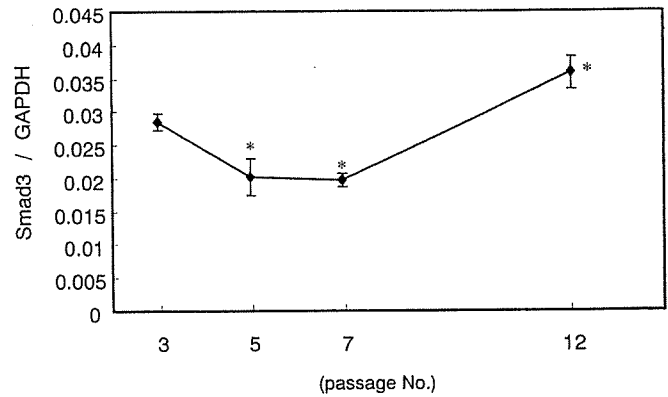
## Results

The proliferation rate of hMSCs decreased with the length of in vitro culture (Fig. 1). The effects of the in vitro culture term on hMSC proliferation and the mRNA expressions of three TGF $\beta$  isomers (TGF $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3) and their receptors type I, II, and III (TGF $\beta$ RI, RII, RIII) in hMSCs were investigated (Fig. 2). The mRNA expressions of TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, and TGF $\beta$ RI increased with the length of cell culture (Fig. 2A,B,D), but there had been no change in the



**Fig. 1.** Proliferation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) in the 3rd, 5th, 7th, and 12th passages. hMSCs were seeded at  $1.7 \times 10^5$  cells/F 60-mm dish (6000 cells/cm<sup>2</sup>), and cells were counted after 2, 4, and 8 days. The initial cell number (0 days) is expressed as 1, and the other cell numbers (2, 4, and 8 days) are expressed relative to that of day 0.  $n = 3$

TGF $\beta$ 3, TGF $\beta$ RII, and TGF $\beta$ RIII mRNA expressions by the 12th passage (at about 3 months) (Fig. 2C,E,F). In addition, the mRNA expression of Smad3, which is one of the R-Smads activated by TGF $\beta$  and activin, in hMSCs was investigated. The mRNA expression of Smad3 decreased in the 5th and 7th passages of hMSCs but increased in the 12th passage (Fig. 3). The mRNA expressions of c-myc in hMSCs were higher in the 5th and 7th passages than in the 3rd and 12th passages (Fig. 4A). The mRNA expressions of nucleostemin in hMSCs decreased with the length of cell culture (Fig. 4B).



**Fig. 3.** Effect of in vitro culture length on mRNA expression of Smad3 in hMSCs. The expression of Smad3 relative to GAPDH in confluent cultures of hMSCs in the 3rd, 5th, 7th, and 12th passages was investigated by quantitative RT-PCR. Mean values with SDs are presented. Asterisks denote statistically significant differences compared with the 3rd passage (\* $P < 0.05$ )

**Fig. 2.** Effect of in vitro culture length on mRNA expressions of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) (A), TGF $\beta$ 2 (B), TGF $\beta$ 3 (C), TGF $\beta$  receptor type I (TGF $\beta$ RI) (D), TGF $\beta$ RII (E), and TGF $\beta$ RIII (F) in hMSCs. Expressions of the four genes, relative to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), in confluent cultures of hMSCs in the 3rd, 5th, 7th, and 12th passages were investigated by quantitative real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). Mean values with SDs from three independent experiments are presented. Asterisks denote statistically significant differences compared with the 3rd passage (\* $P < 0.05$ )

