

マウスにおけるニッケルアレルギーの評価

丸山登久子, 片岡裕美,* 扇間昌規, 伊藤誉志男

Evaluation of Nickel Allergy in Mice

Tokuko MARUYAMA, Hiromi KATAOKA,* Masanori SEMMA, and Yoshio ITO

School of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University,
11-68 Koshien Kyuban-cho, Nishinomiya 663-8179, Japan

(Received March 10, 2003; Accepted May 15, 2003)

This study was performed to establish a convenient mouse model for the evaluation of nickel allergy. For sensitization, 0.2 g of nickel sulfate in petrolatum was applied 4 times every other day to the shaved dorsal skin. Seven days after the first application of the nickel sulfate salt sample, the antigen-specific metal allergy reaction was estimated based on the swelling response of the footpad injected with 20 μ l of nickel sulfate salt in saline. Percutaneously applied nickel powder in petrolatum, as well as the original nickel salt sample, induced a significant nickel allergy reaction. Therefore, it is suggested that this system is applicable for the evaluation of antimetal allergic substances.

Key words—nickel allergy; mouse model; footpad; metal allergy

はじめに

我々を取り巻く環境中には様々な金属が存在しており、中でも日常的に身に付けるアクセサリ、時計、補綴具などによってアレルギー性接触皮膚炎を起こすことがある。その代表的な金属アレルギーとして、ニッケル、クロム、コバルト、水銀、金などがよく知られている。^{1,2)}特にニッケルは、ニッケルメッキ、ニッケル合金として数多くの製品に使用されているので皮膚への接触機会も極めて多いことに加え、近年ピアスなどの普及によってニッケルアレルギーはさらに急増し、深刻な問題となっている。金属アレルギー発症の根本的な予防法は、金属に接触しないことであるが、金属の用途は幅広く金属との接触を完全に避けることは非常に困難である。そこで金属アレルギーの予防、抑制物質の開発のための簡便な評価方法が必要となる。

臨床的に金属アレルギーは金属が接触部位で汗や唾液などによってイオン化して起こるものであるが、金属アレルギーについての動物実験に用いられている試料はすべて金属塩であり、金属単体を使用した例は報告されていない。本研究では、金属塩だ

けでなく金属単体などの固体試料の感作性の評価、さらに金属アレルギー抑制物質の探索などに役立つ簡便な金属アレルギーの評価法を作製することを目的とし、今回は、ニッケルアレルギーについて検討した。

材料及び方法

1. 実験動物 5週齢の雄性 ddY 系マウスは日本エスエルシー株式会社から購入した。実験開始時の体重は 26—28 g であった。飼料は市販固形飼料 (CE-2, 日本クレア株式会社) を用い、飲料水は水道水を自由に与えた。なお、実験に際し動物は「武庫川女子大学動物実験指針」に基づいて取り扱われた。

2. 材料 硫酸ニッケル ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) はシグマ社から、塩化ニッケル ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、硫酸クロム ($\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)、ニッケル金属粉末 (Ni, 100 mesh, Lot No. SEK3913)、1-フェニル-3-ピラゾリドン (フェニドン) は和光純薬工業株式会社から購入した。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩 (EDTA) は株式会社同仁化学研究所製を、また、白色ワセリン (日本薬局方適合品) は丸石製薬株式会社製を用いた。本実験で使用した水はすべて超純水 (比抵抗 18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$) を用いた。

3. 感作用試料 乳鉢で硫酸ニッケルの結晶を粉碎し、10、15、及び20% (w/w) となるようにワセリンと混合して軟膏剤としたものを用いた。また、硫酸クロムはワセリンと混合して10% (w/w) に、ニッケル金属粉末は5% (w/w) に調製して軟膏剤としたものを用いた。

4. 惹起用試料液 金属塩を超純水で調製した生理食塩水に溶解した。(硫酸ニッケル：5、10、20、50、200、893 (0.4%) ppm；塩化ニッケル：0.4% (988 ppm)；硫酸クロム：0.2%)

5. 金属アレルギーの評価法

a) 感作 それぞれの感作用試料 (対照はワセリンのみ) 0.2 g をマウスの背部被毛をバリカンで刈った翌日から隔日に計4回、背部剃毛部に塗布した。

b) 惹起 最終感作日の翌日 (7日目) に、惹起用試料液 20 μ l を右後肢足蹠部 (footpad) に皮内近傍の皮下に注射した。マウスの左 footpad には生理食塩水のみを同様に投与した。

c) アレルギー性の評価 惹起後経時的に footpad の厚さを peacock dial thickness gauge (尾崎製作所) で測定し、footpad の腫脹率は、惹起直前の footpad の厚さに対する惹起後の増加率として下記の計算式により算出した (平均値 \pm 標準誤差)。

$$\text{footpad 腫脹率 (\%)} = (T - O) / O \times 100$$

T : 惹起後の footpad の厚さ

O : 惹起前の footpad の厚さ

6. 金属アレルギー抑制試験

a) 感作時同時塗布 硫酸ニッケルと EDTA を等モルに混合し、硫酸ニッケルが15% となるようにワセリンで調製したものを感作用試料 (陰性対照は、実験群と同量の EDTA をワセリンと混合したもの) とし 5. 項に記載した方法と同様に操作した。

b) 惹起前投与 5. 項と同法にて15%硫酸ニッケル感作用試料で感作し、0.4%硫酸ニッケル惹起用試料液で惹起する30分前に EDTA 水溶液を、またフェニドンの0.5%CMC \cdot Na 懸濁液は1時間前に経口投与した (EDTA : 100 mg/kg, フェニドン : 100 mg/kg 又は 200 mg/kg)。

7. 金属不純物の分析 各金属試料に混在する他金属は誘導結合高周波プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES) にて分析した (Liberty series II, バリ

アン社製)。

8. 統計処理 Figures 1, 3, 4 は、試験群と対照群との間で、Tukey の多重比較により有意差検定を行った。Figure 2 については Fisher の PLSD テストで検定後 Bonferroni の不等式に基づいて多重性を考慮した。なお、感作—金属試料投与群と無感作—金属試料投与群との間の有意差のみを記載した。また、Fig. 5 及び Fig. 6 (b) については Dunnett の多重比較により、Fig. 6 (a) は Tukey の多重比較により有意差検定を行い、試験群と陽性対照群間の有意差のみを記載した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

結 果

1. 硫酸ニッケルによるニッケルアレルギー誘導 10、15 及び 20% の濃度になるように調製した3種の硫酸ニッケル感作用試料でそれぞれマウスを感作後、0.4%硫酸ニッケル惹起用試料液で惹起した。その結果、20%硫酸ニッケル感作用試料を用いた場合は、塗布開始後3日目に8匹中3匹のマウスが死亡、6日目にはさらに2匹が死亡した。これに対して、10%の場合は有意なニッケルアレルギー反応が観察されなかった。一方、15%硫酸ニッケル感作用試料を用いた場合は、ニッケルアレルギーの有意な感作誘導が可能となり、さらに実験期間中には急性毒性を示すことはなかった。Figure 1 には、15%硫酸ニッケル感作用試料で感作後、0.4%硫酸ニッケル惹起用試料液で惹起したときの footpad の腫脹率の経時変化を示した。その結果、感作群、無感作群の両群ともに惹起直後から9時間目にかけての同程度の footpad 腫脹が認められた。その後、無感作群 (V-NS) の腫脹は徐々に減少したが、感作群 (NS-NS) は惹起後18時間目から96時間目にかけて有意で持続的な腫脹反応が観察された。

次に、有意なニッケルアレルギーを惹起し得る硫酸ニッケル濃度について検討した。Figure 2 に15%硫酸ニッケル感作用試料で感作し、5—893 ppm (0.4%) の濃度範囲の種々の硫酸ニッケル惹起用試料液で惹起後48時間目の腫脹率を示した。その結果、濃度依存的な腫脹の増強傾向が観察され、10 ppm 以上の硫酸ニッケルで有意なニッケルアレルギーの惹起が可能であった。

また、15%硫酸ニッケル感作用試料で感作したマウスに、0.4%塩化ニッケル惹起用試料液で惹起し

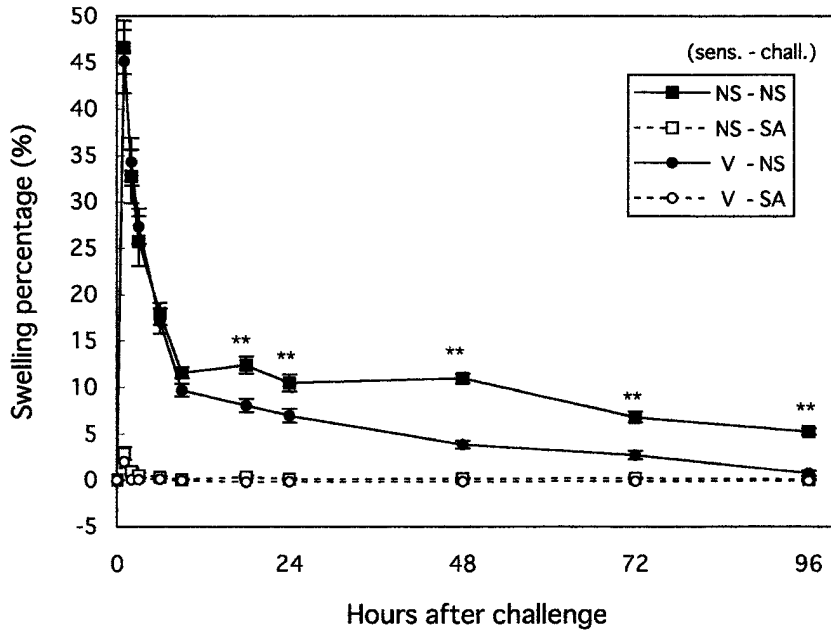


Fig. 1. Time-Course of Footpad Swelling Response in Mice Sensitized by NiSO₄ in Petrolatum and Challenged by NiSO₄ in Saline
 For sensitization, 15% NiSO₄ in petrolatum was applied 4 times every other day to the shaved dorsal skin of the mice in experimental group. Control experiment was performed with the petrolatum alone. Seven days after the first application of 15% NiSO₄ sample, 0.4% NiSO₄ in saline was injected to the right footpad of mice, and saline alone to the left footpad. Swelling percentages were calculated according to the procedure in "Materials and Methods". Each symbol and bar of swelling percentage represent the mean ± S.E. (n=7-8). NS: NiSO₄, SA: saline, V: petrolatum. **p<0.01 vs. V-NS.

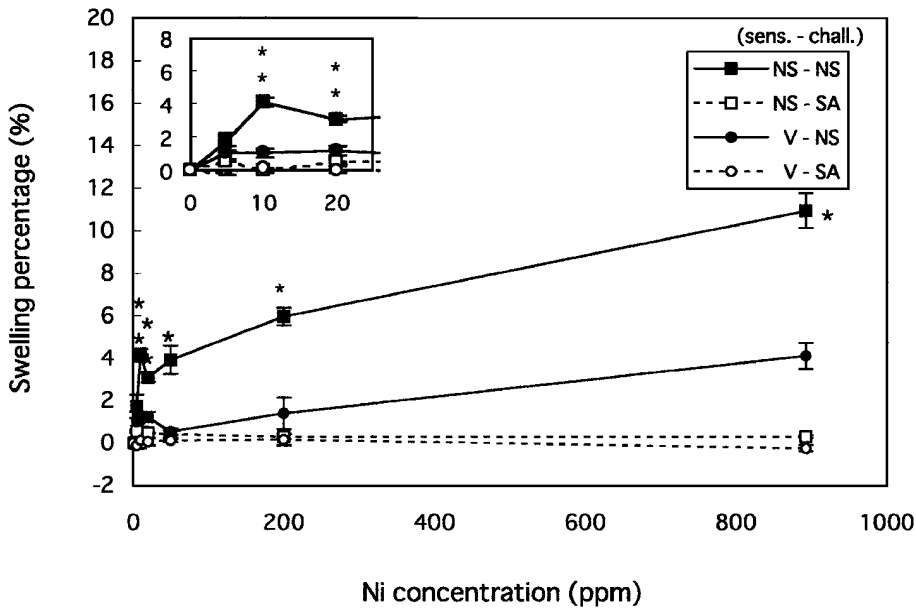


Fig. 2. Footpad Swelling Response in Mice Sensitized by NiSO₄ and Challenged by Various Concentrations of NiSO₄
 Mice were sensitized as in Fig. 1 with 15% NiSO₄ in petrolatum. Seven days after the first application of 15% NiSO₄, mice were injected with various concentrations of NiSO₄ in saline to the right footpad, and saline to the left footpad. The footpad swelling was measured at 48 hours after the challenge, and swelling percentages were calculated according to the procedure in "Materials and Methods". Each symbol and bar represent the mean ± S.E. (n=4). NS: NiSO₄, SA: saline, V: petrolatum. *p<0.05; **p<0.01 vs. V-NS.

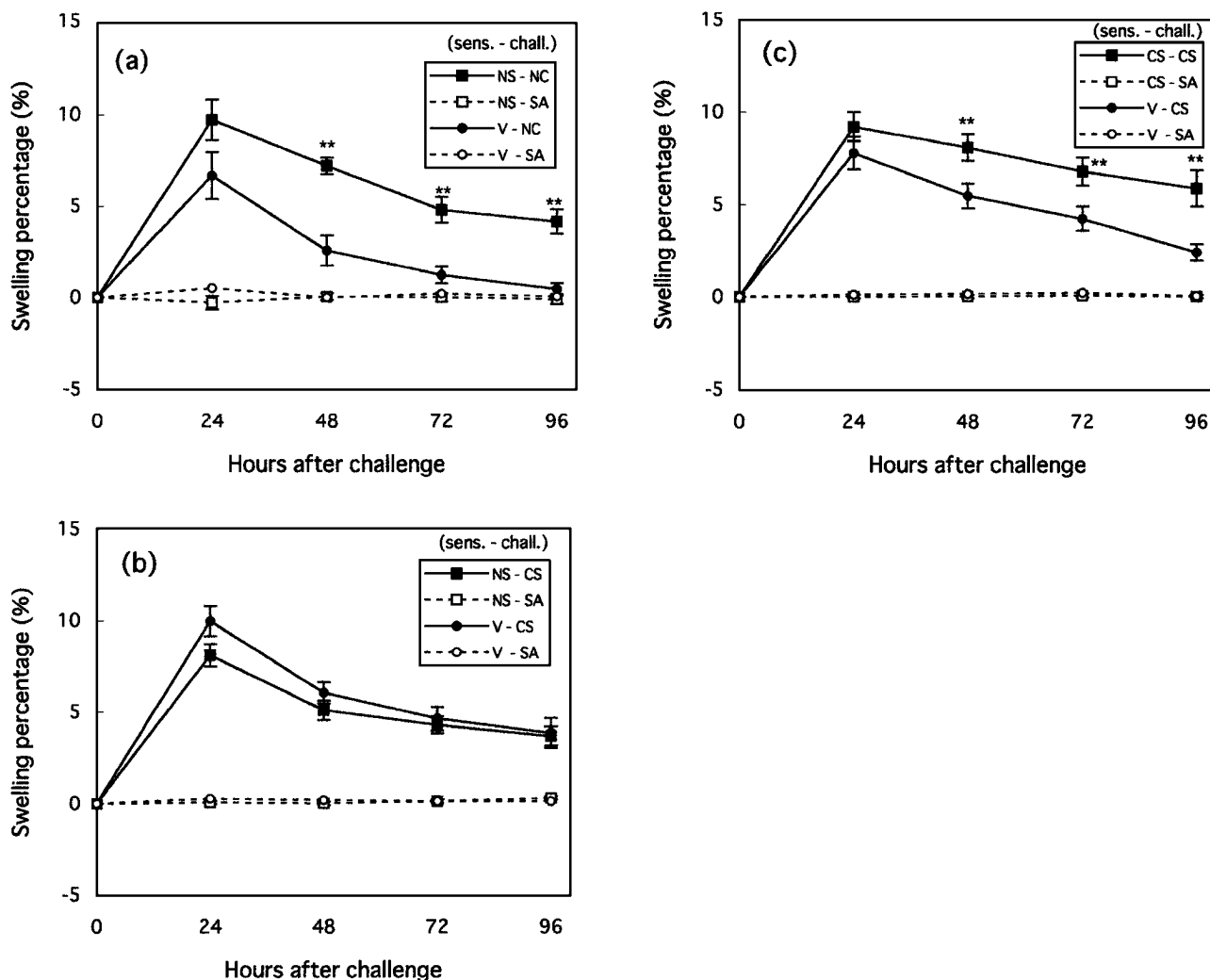


Fig. 3. Footpad Swelling Response in Mice which Were Sensitized by NiSO₄ or Cr₂(SO₄)₃ and Challenged by NiCl₂ or Cr₂(SO₄)₃. Mice were sensitized as in Fig. 1 with 15% NiSO₄ (a) and (b) or 10% Cr₂(SO₄)₃ (c). Seven days after the first application of 15% NiSO₄ or 10% Cr₂(SO₄)₃, mice were injected with 0.4% NiCl₂ (a) or 0.2% Cr₂(SO₄)₃ (b) and (c) in saline to the right footpad and saline to the left footpad. Swelling percentages were calculated according to the procedure in "Materials and Methods". Each symbol and bar of swelling percentage at 24, 48, 72, and 96 hours after the injection of 0.4% NiCl₂ or 0.2% Cr₂(SO₄)₃ solution represent the mean \pm S.E. ($n=7-8$). NS: NiSO₄, NC: NiCl₂, CS: Cr₂(SO₄)₃, SA: saline, V: petrolatum. ** $p < 0.01$.

た場合 (NS-NC) は、惹起後 48 時間目から 96 時間目にかけて有意なニッケルアレルギーが誘導されることを確認した (Fig. 3(a)). 一方、同様に 15% 硫酸ニッケルで感作したマウスに 0.2% 硫酸クロム惹起用試料液 (硫酸クロムは生理食塩水に難溶のため 0.2% を用いた) で惹起した場合には、有意な腫脹反応は観察されなかった (Fig. 3(b)). なお、0.2% 硫酸クロム惹起用試料液は、10% 硫酸クロム感作用試料で感作したマウスに惹起した場合、惹起後 48 時間目から 96 時間目にかけて有意なクロムアレルギーを誘導し得ることは、Fig. 3(c) に示したように確認済みである。

2. ニッケル単体によるニッケルアレルギーの誘導 Figure 4(a) に示したように 5% ニッケル金属粉末感作用試料で感作、0.4% 硫酸ニッケル惹起用試料液で惹起した場合も、15% 硫酸ニッケル感作用試料で感作した時と同様に有意なニッケルアレルギー反応が誘導されることを確認した。さらに、Fig. 4(b) には、15% 硫酸ニッケル感作時と同様に 0.2% 硫酸クロム惹起ではニッケルアレルギーが誘導されないことを示した。

3. ニッケルアレルギーの抑制試験 ニッケルアレルギーの抑制試験は、15% 硫酸ニッケル感作用試料で感作後、0.4% 硫酸ニッケル惹起用試料で惹

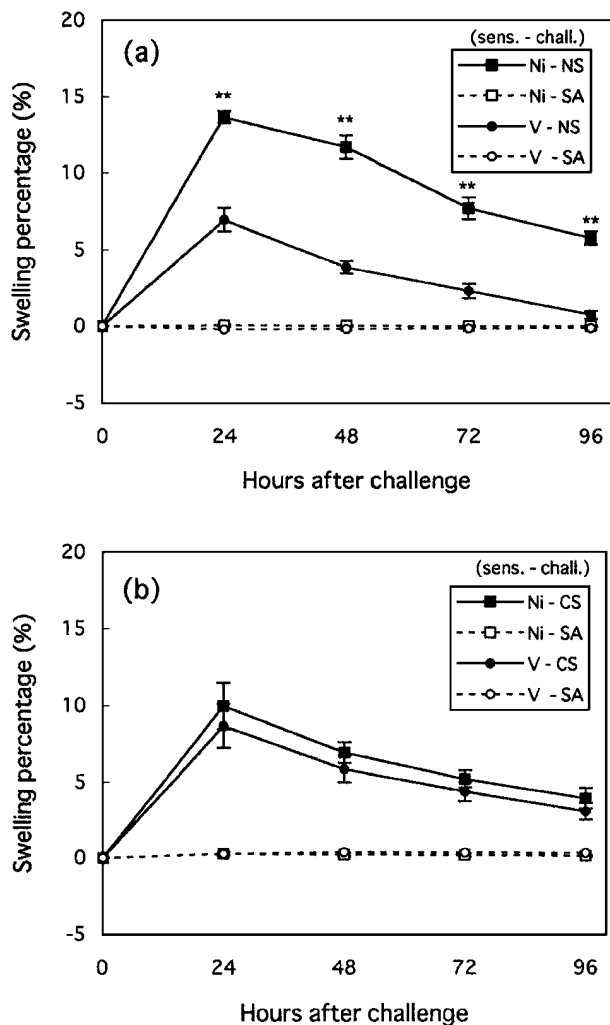


Fig. 4. Footpad Swelling Response in Mice which Were Sensitized by Metallic Ni Powder in Petrolatum and Challenged by NiSO_4 or $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$

For sensitization, 5% Ni powder in petrolatum was applied 4 times every other day to the shaved dorsal skin of the mice in experimental group. Control experiment was performed with the petrolatum alone. Seven days after the first application of 5% Ni powder sample, mice were injected with 0.4% NiSO_4 (a) or 0.2% $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ (b) in saline to the right footpad and saline to the left footpad. Swelling percentages were calculated according to the procedure in "Materials and Methods". Each symbol and bar of swelling percentage at 24, 48, 72, and 96 hours after the injection of 0.4% NiSO_4 or 0.2% $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ solution represent the mean \pm S.E. ($n=7-8$). Ni: Ni powder, NS: NiSO_4 , CS: $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, SA: saline, V: petrolatum. ** $p < 0.01$.

起した時に生じるニッケルアレルギー反応の48時間目のfootpad腫脹が有意に抑制されるかどうかで評価した。

まず、15%硫酸ニッケルにEDTAを混合した感作用試料で感作後、0.4%硫酸ニッケル惹起用試料液で惹起した場合(NS+E-NS)は、EDTAを混合していない陽性対照群(NS-NS)と比較して、有意なニッケルアレルギーの抑制反応が観察された

(Fig. 5). また、EDTAのみをワセリンに混合した試料を塗布後、0.4%硫酸ニッケル惹起用試料液をfootpadに注射した群(E-NS)には腫脹反応は認められなかった。

次にEDTA水溶液を惹起前に経口投与(100 mg/kg)した場合(NS-E-NS)にも有意な抑制効果が認められた(Fig. 6(a)). 同様にフェニドンの場合も100 mg/kg(NS-100p-NS)及び200 mg/kg(NS-200p-NS)を投与した両群で腫脹の有意な抑制が見られた(Fig. 6(b)).

4. 金属不純物の分析 0.1%の各金属試料に含まれる金属不純物を誘導結合プラズマ原子発光分析法にて分析した。その結果、Table 1に示したように試料中の金属不純物量は極微量であることが確認された。

考 察

金属によるアレルギー性接触皮膚炎は、ハプテンである金属イオンが経皮的に侵入後、表皮中の自己タンパク質(担体)と結合した後、完全抗原となって感作が成立し、再度同一ハプテンが侵入してから通常24-72時間後に炎症を生じる遅延型のアレルギー反応である。

現在、化学物質の感作性試験法として、MagnussonとKligmanにより提案されたモルモットのMaximization Test(GPMT)法があり、硫酸ニッケルの感作性も報告されている。³⁾

金属イオンの感作性、又は交差反応性などに関する多くの研究は、GPMT法、又はGPMT法を改良した種々の方法(感作段階の改良:フロイント完全アジュバント(FCA)を用いるかいないか、閉鎖型で行うか開放型で行うか、ラウリル硫酸ナトリウムを他の界面活性剤に変更する、被検物質濃度の変更など;惹起段階の改良:経皮投与であるか皮内、皮下、又は腹腔内投与であるか、それらを組み合わせで評価する、被検物質濃度の変更など)により行われている。⁴⁻¹²⁾例えば、Lammintaustaら⁷⁾は、ニッケルアレルギーの誘導法としてオリジナルのGPMT法、あるいは硫酸ニッケルを開放型で塗布した部位にFCAを皮内注射する方法の両者よりも、FCAを用いないで開放型で硫酸ニッケルを経皮的に塗布感作する方法が優れていること、さらに、経皮塗布惹起後、硫酸ニッケルの生理食塩水溶液を腹

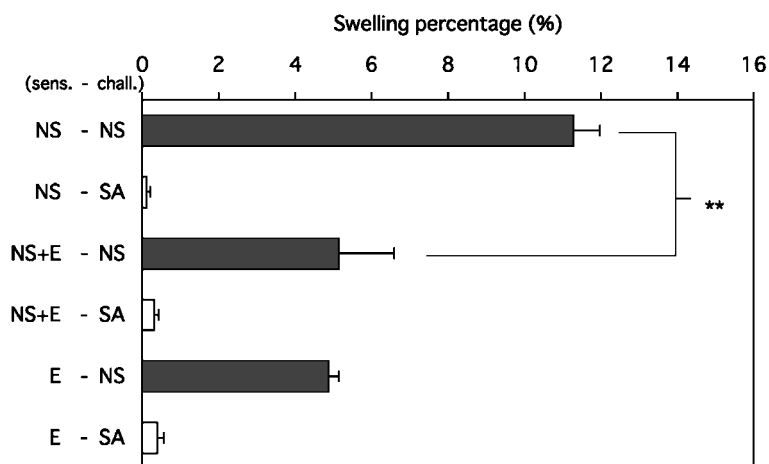


Fig. 5. Footpad Swelling Response in Mice which Were Sensitized by NiSO₄ with or without EDTA and Challenged by NiSO₄

For sensitization, 15% NiSO₄ mixed with equivalent molar of EDTA in petrolatum was applied 4 times every other day to the shaved dorsal skin of the mice in experimental group. Positive control experiment was sensitized with 15% NiSO₄ in petrolatum alone and negative control experiment was applied with EDTA in petrolatum alone. Seven days after the first sensitization, mice were injected with 0.4% NiSO₄ in saline to the right footpad of mice and saline to the left footpad. The swelling thickness measured at 48 hours after the challenge. Data represent the mean \pm S.E. ($n=5$). NS: NiSO₄, SA: saline, E: EDTA. ** $p<0.01$. See text for further details.

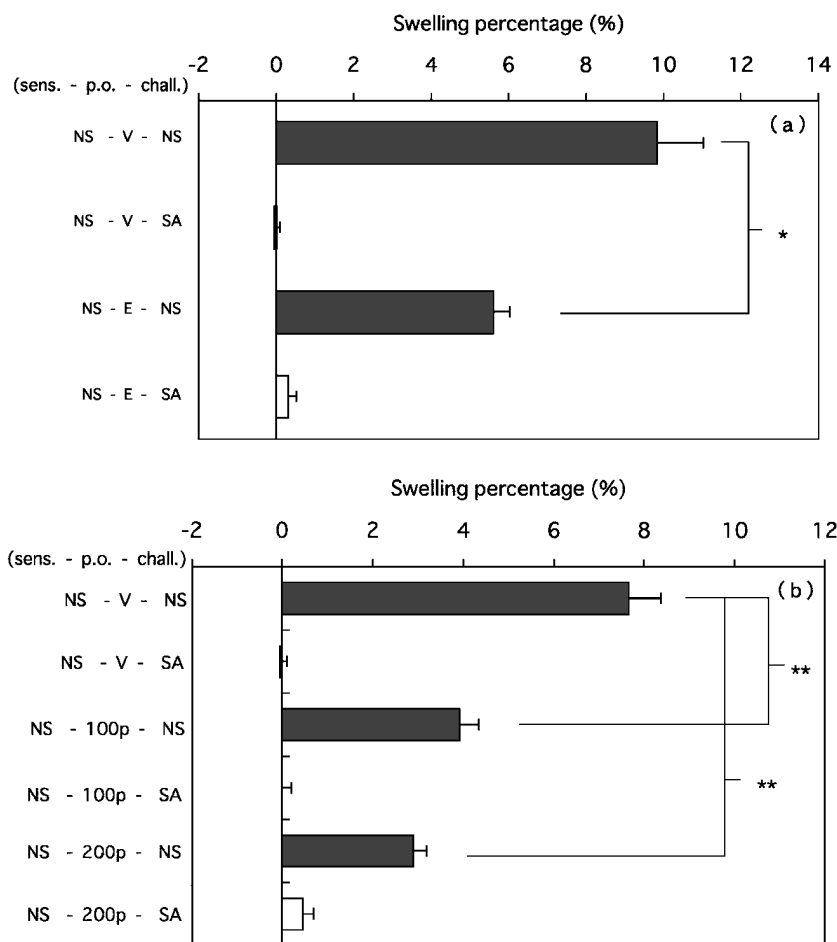


Fig. 6. Effect of Orally Administrated EDTA or Phenidone on Footpad Swelling Response in Mice which Were Sensitized and Challenged with NiSO₄

Sensitization and challenge were performed with the same conditions as in Fig. 1. EDTA dissolved in ultra pure water (a), or 0.5% CMC · Na suspension of phenidone (b) was administrated orally to mice at 0.5 or 1 hour before the challenge. Control experiments were performed with the vehicle alone used for the preparation of the each compound. The swelling thickness measured at 48 hours after the challenge. Data represent the mean \pm S.E. ($n=5$). NS: NiSO₄, V: vehicle, SA: saline, E: EDTA, P: phenidone. * $p<0.05$; ** $p<0.01$. See text for further details.

Table 1. ICP—AES Analysis of Contaminating Materials in Each Metallic Sample

Sample	Ag	Cd	Co	Hg	Cr	Ni
NiSO ₄ ·6H ₂ O (223.3) SIGMA	0.1 ↓	0.05 ↓	0.1 ↓	N.D.	0.05 ↓	
NiCl ₂ ·6H ₂ O (246.9) Wako	0.5 ↓	N.D.	0.5 ↓	N.D.	0.5 ↓	
Ni, Powder (1000) 100 mesh, Wako	0.05 ↓	0.05 ↓	0.1 ↓	N.D.	0.05 ↓	
Cr ₂ (SO ₄) ₃ ·nH ₂ O (0) Wako	0.01 ↓	0.1 ↓	0.1 ↓	N.D.		0.1 ↓

Each value in the parenthesis indicates the amount of nickel included in 0.1% metallic sample (ppm).
↓: less than the value, N.D.: Not detected.

腔内投与することで前述の塗布惹起部位に明確な再燃反応が誘導されることを報告している。

以上のようなモルモットにおける研究に対して、マウスを用いた方法としては、耳介浮腫法が報告されている。¹³⁾ また、Ishii ら,¹⁴⁾ Siller ら¹⁵⁾ はマウスに硫酸ニッケル水溶液で湿らせたガーゼ又はろ紙を貼付して感作した後、footpad に硫酸ニッケル水溶液を注射することによりニッケルアレルギーを惹起している。

本研究では、ニッケル塩やニッケル単体の感作性も簡便に試験できるように固体試料でも均一に練り込むことのできる軟膏剤を調製し、開放型で塗布した。軟膏基剤としては、刺激性がほとんどなく粘着性が強く、さらに寒暖による粘稠度に変化が少なく安定性の優れたワセリンを用いた。

1. 硫酸ニッケルによるニッケルアレルギーの誘導 0.4%の硫酸ニッケルは、皮内投与により一次刺激性が認められなかったと報告されていること、¹⁰⁾ また Ishii ら¹⁴⁾ が footpad に投与する際に 0.4%で行っていることから、本研究における硫酸ニッケルの惹起濃度を 0.4%に固定して硫酸ニッケルをワセリンで混合した試料で感作条件を検討した。その結果、急性毒性が観察されずに、有意な footpad 腫脹が再現性良く誘導される硫酸ニッケルの濃度を 15%に決定した。

15%硫酸ニッケル感作用試料で感作、0.4%硫酸ニッケル惹起用試料液で惹起したときの footpad 腫脹の経時変化を Fig. 1 に示した。その結果、惹起直後から 9 時間目にかけての腫脹は、感作群 (NS-NS) と無感作群 (V-NS) の両者とも、同程度の強度と腫脹パターンを示したので本即時相は、惹起用試料液による一次刺激が強く、ニッケルアレルギー

の即時相の評価に不相当であると考えられた。感作群に硫酸ニッケルを投与した右 footpad (NS-NS) の遅発相の反応は、生理食塩水のみを投与した左 footpad 反応 (NS-SA) と比較して、惹起後 18 時間目から 96 時間目まで持続した腫脹反応が観察された。一方、無感作群に硫酸ニッケルを投与した右 footpad の腫脹反応 (V-NS) は、時間の経過とともに減少し、惹起後 96 時間目には生理食塩水のみを投与した左 footpad の厚さ (V-SA) と同程度のレベルまで回復した。すなわち、感作群の腫脹パターン (NS-NS) と無感作群の腫脹パターン (V-NS) に、明らかな差異が観察されることから本法により誘導された惹起後 18 時間目から 96 時間目にかけての遅発相における footpad 腫脹は、ニッケル感作成立後のアレルギー反応によることが示唆された。

次に、有意なニッケルアレルギー反応を惹起し得るニッケルイオン濃度について詳細に検討した。15%硫酸ニッケル感作用試料で感作し、5—893 ppm (0.4%) の濃度範囲の種々の硫酸ニッケル惹起用試料液で惹起後 48 時間目の腫脹率を測定した。その結果、濃度依存的に腫脹反応が増強する傾向にあり、10 ppm 以上で有意なニッケルアレルギーの惹起が可能であることが認められた (Fig. 2)。

また、15%硫酸ニッケル感作マウスは、0.4%塩化ニッケルで 48 時間目以降に有意なニッケルアレルギー反応が惹起された (Fig. 3(a))。一方、硫酸ニッケル感作マウスは、硫酸クロムによりクロムアレルギーが誘導される (Fig. 3(c)) 惹起条件でニッケルアレルギーは誘導されなかった (Fig. 3(b))。これらのことから、本実験条件におけるニッケルアレルギーは、アニオンに影響されず、ニッ

ケルに特異的な反応であることが示唆された。

さらに本法による感作試料にニッケルとキレート結合する EDTA を添加した群で生じる footpad 腫脹 (Fig. 5) は、後述するように、EDTA を添加しない群の footpad 腫脹に対して有意に抑制されることから、本法によって生じる footpad 腫脹はニッケル感作成立後のアレルギー反応であると考えられる。

以上のことから、ニッケルアレルギーの評価は、15%硫酸ニッケル感作用試料で感作後 footpad に 0.4% 惹起用試料液を注射後、48 時間目に生じる footpad の厚さを指標とする方法が有用であると考察する。

2. ニッケル単体によるニッケルアレルギーの誘導 ニッケル塩だけでなく、ニッケル単体によりニッケルアレルギーの誘導が可能であるかを検討した。その結果、5%ニッケル金属粉末感作用試料を塗布後、硫酸ニッケル惹起 (Ni-NS) で有意な腫脹反応が認められることを確認した (Fig. 4(a))。さらに、ニッケル単体で感作されたマウスは、硫酸ニッケル感作時と同様に硫酸クロム惹起によりニッケルアレルギーは、誘導されないことを示した (Fig. 4(b))。なお、本実験に用いたニッケル単体は、外観が灰黒色粉末で 100 mesh (150 μm) 通過分が 99.9%、キレート滴定によるニッケル含量が 99.0% 以上との検査成績が製造元より提供されている。本実験では、購入したニッケル単体にニッケルイオンが多量に存在していないことが重要となる。本品のニッケルイオンに関するデータは、製造元より提供されていないが、仮に対イオンとして含有しているかもしれない陰イオン (例えば、硫酸イオン、塩素イオンなど) が存在すると、そのニッケル含量は対イオンに相当する分だけ小さな値になると考えられる。購入したニッケル単体の純度は、含量 99.0% 以上が保証されていることから、最大 1.0% の対イオンとなる化合物を含む不純物の存在は否定できない。これらのことから、ニッケル金属粉末中に存在する可能性のあるニッケルイオンは、1.0% 以下であると間接的に示唆される。

ニッケル金属は純水には不溶であるが塩素イオンなどを含む汗などの体液には溶出しやすい¹⁶⁾と報告されている。本結果はワセリンとともに塗布されたニッケル金属粉末がマウスの体表面でイオン化し経

皮的に侵入することで、感作を可能にしたものと推定される。ニッケル金属粉末がどのようなメカニズムで汗腺のないマウスの体表面でイオン化し得たのかの解明は今後の課題である。本結果は、*in vivo* 実験において塗布された固体のニッケル単体が体表面でイオン化後ニッケルアレルギー反応を示すという重要な知見を提供したものである。

3. 金属アレルギーの抑制試験 金属アレルギーの抑制物質の検索においては、アレルギーが金属であるという点に着目する場合、金属アレルギー反応により発症した種々の炎症過程の抑制効果に着目する場合に大別される。本研究では、前者の場合のモデル物質として金属イオンとキレート作用を示す EDTA を、後者のモデル物質としてアラキドン酸代謝を阻害するフェニドンを用いて本ニッケルアレルギーの評価法が抑制試験に有用であるかの確認を行った。

EDTA はその窒素又は酸素原子が 5 座ないし 6 座配位子として働いて多くの金属イオンと極めて安定な金属キレートを形成する。EDTA は、広く臨床的にも検討されており、例えばニッケルアレルギー患者に対してパッチテストをする前に EDTA クリームを塗布しておくとう有意な抑制効果を示すことなどが報告されている。¹⁷⁾

本研究ではまず、金属アレルギーの感作段階の抑制モデル実験を行った。すなわち、感作時に硫酸ニッケルと EDTA を混合して塗布した群は、EDTA を混合していない陽性対照群に対して有意に footpad 腫脹が抑制された (Fig. 5)。本結果は、感作用試料中のニッケルイオンが既に EDTA と錯体を形成しているため、表皮中の自己タンパクと結合して完全抗原となることができなかつた可能性が考えられる。

以上のことから、本手法により EDTA がニッケルアレルギーの感作段階を抑制することが証明された。しかし、一方で EDTA は、アレルギー性接触皮膚炎を引き起こすことが知られている。¹⁸⁾ 今後、本法を用いて有効な金属アレルギーの予防物質の検索が期待される。

次に、本法における惹起段階の抑制試験のモデル実験をした。その結果、前述の EDTA によっても、又はフェニドンによっても footpad 腫脹が有意に抑制された (Figs. 6(a), (b))。臨床的には金属

アレルギーの治療に金属のキレート剤である disulfiram, キレート作用のあるミノサイクリンの経口投与で金属アレルギーが軽快したとの報告¹⁹⁾があり, 本結果はそれを裏付けるものであった. フェニドンはシクロオキシゲナーゼ及び5-リポキシゲナーゼ阻害作用を有する薬物であり, ニッケルアレルギー反応に伴って生じた種々の炎症過程を抑制したものと考察する.

以上, 本ニッケルアレルギーの評価法は, 惹起段階においても種々の新規のニッケルアレルギーの抑制物質の検索に応用可能であることが示唆された.

4. 金属不純物の分析 被験物質中の不純物によって感作及び惹起が成立している可能性を検討するために, 各試料に含まれる金属不純物量を測定した. その結果, 各試料中の金属不純物量は極微量であり, これらの金属不純物は本研究に影響しなかったものと考えられる.

5. まとめ 15%硫酸ニッケルワセリン混合試料で経皮感作したマウスにニッケルとして10 ppm以上含有する硫酸ニッケル生理食塩水試料液でニッケル特異的なニッケルアレルギー反応の惹起が可能であった. また, ニッケル単体ワセリン混合試料を用いた場合でもマウス体表面でイオン化が起こり, 経皮的に感作を成立させることが可能であり, ニッケルアレルギー反応が誘発される可能性を示唆した. さらに, 本法は金属アレルギーの予防, 又は抑制物質の評価に有用であることを示した.

謝辞 本論文をまとめるにあたり, 種々の御助言を賜りました武庫川女子大学薬学部 市川厚教授に深謝いたします.

REFERENCES

- 1) Suzuki M., Hayakawa R., *HIFU*, **34**, 35-43 (1992).
- 2) Nishii K., Sugai T., Akai I., Nagao J., Tamizu S., *HIFU*, **42**, 11-17 (2000).
- 3) Magnusson B., Kligman A. M., *J. Invest. Dermatol.*, **52**, 268-276 (1969).
- 4) Wahlberg J. E., *Dermatologica*, **152**, 321-330 (1976).
- 5) Wahlberg J. E., Boman A., *Contact Dermatitis*, **4**, 128-132 (1978).
- 6) Maurer T., Thomann P., Weirich E. G., Hess R., *Contact Dermatitis*, **5**, 1-10 (1979).
- 7) Lammintausta K., Kalimo K., Jansen C. T., *Contact Dermatitis*, **12**, 258-262 (1985).
- 8) Zissu D., Cavellier C., Ceaurriz J. D., *Fd. Chem. Toxic.*, **25**, 83-85 (1987).
- 9) Katsumura Y., Sugiyama M., Hori Y., *Environ Dermatol.*, **3**, 8-15 (1996).
- 10) Yamanaka S., Ohta K., Nomura T., Takaesu Y., *J. Dent. Hlth.*, **49**, 186-194 (1999).
- 11) Wahlberg J. E., Liden C., *Contact Dermatitis*, **41**, 145-149 (1999).
- 12) Wahlberg J. E., Liden C., *Am. J. Contact Dermat.*, **11**, 42-48 (2000).
- 13) Gad S. C., Dunn B. J., Dobbs D. W., Reilly C., Walsh R. D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **84**, 93-114 (1986).
- 14) Ishii N., Ishii H., Ono H., Horiuchi Y., Nakajima H., Aoki I., *J. Invest. Dermatol.*, **94**, 673-676 (1990).
- 15) Siller G. M., Seymour G. J., *Australas J. Dermatol.*, **35**, 77-81 (1994).
- 16) Harada S., *Igaku No Ayumi*, **136**, 573-575 (1986).
- 17) Van Ketel W. G., Bruynzeel D. P., *Contact Dermatitis*, **11**, 311-314 (1984).
- 18) Bhushan M., Beck M. H., *Contact Dermatitis*, **38**, 183 (1998).
- 19) Adachi A., Horikawa T., *Rinshohifuka*, **46**, 883-889 (1992).