

Title	歯性病巣の関連する皮膚疾患におけるビオチンの効用
Author(s)	高橋, 慎一; 川島, 淳子; 森本, 光明; 山根, 源之
Journal	, (): -
URL	http://hdl.handle.net/10130/526
Right	

歯性病巣の関連する皮膚疾患における ビオチンの効用

課題番号 18592202

研究代表者番号 90197145

平成 18 年度～平成 19 年度科学研究費補助金
(基盤研究 C) 研究成果報告書

平成 20 年 3 月

研究代表者 高橋慎一 (東京歯科大学歯学部教授)

はしがき

本研究は以下の共同研究者および彼らの所属する東京歯科大学市川総合病院皮膚科、オーラルメディシン・口腔外科学教室のスタッフ、研究委託した三菱化学ピーシーエル（株）およびトランスジェニック（株）のスタッフの協力により施行したものである。

研究組織

- 研究代表者：高橋慎一（東京歯科大学市川総合病院皮膚科教授）
研究分担者：川島淳子（同 講師）
研究分担者：森本光明（東京歯科大学市川総合病院オーラルメディシン・歯科口腔外科 講師）
研究分担者：山根源之（同 教授）

交付決定額（配分額）（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	2,201,421	0	2,201,421
平成19年度	1,003,343	300,000	1,303,343
総計	3,204,764	300,000	3,504,764

研究発表

（1）雑誌論文

- 1) 高橋慎一、川島淳子、森本光明、山根源之 他：扁平苔癬 皮膚病診療 30:381-384, 2008. (査読 有)
- 2) 高橋慎一：歯科と金属アレルギー アレルギーの臨床 27:795-800, 2007. (査読 有)
- 3) 高橋慎一：皮膚科との連携を必要とする口腔粘膜疾患 日本歯科評論 増：196-202, 2007. (査読 有)
- 4) 高田篤史、森本光明、山根源之、高橋慎一 他：マウス遅延型過敏反応モデルを用いた歯科用金属アレルギーにおけるパッチテスト客観化 日本口腔科学会雑誌 56:226-233, 2007. (査読 有)

（2）学会発表

- 1) 矢部健太郎、森本光明、山根源之、高橋慎一 他：レジンに含まれる HEMA による接触粘膜炎と考えられた 3 例 第 17 回日本口腔粘膜学会総会・学術大会 2006 年 7 月 東京

- 2) 酒井克彦、森本光明、山根源之、高橋慎一 他：粘膜類天疱瘡に対し局所ステロイド薬密封療法を行った3例 第17回日本口腔粘膜学会総会・学術大会 2006年7月 東京
- 3) 伊東祥雄、高橋慎一、森本光明、山根源之 他：金属アレルギーが増悪因子となった Oral pemphigus の1例 第1回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 2007年12月 名古屋
- 4) 藤本 勝、森本光明、山根源之、高橋慎一、他：皮膚・口腔粘膜におけるニッケル感作マウスを用いた遅延型過敏反応に関する実験的研究 第282回東京歯科大学学会(総会) 2007年11月 稲毛
- 5) 高田篤史、森本光明、高橋慎一、山根源之 他：類天疱瘡の経過観察中に骨髄異形成症候群(MDS)を合併した1例 第16回日本口腔粘膜学会総会・学術大会 2006年7月 新潟
- 6) 森本光明、山根源之、高橋慎一 他：口腔扁平苔癬に対するタクロリムス軟膏の臨床的検討 第60回特定非営利活動法人 日本口腔科学会 2006年5月 名古屋
- 7) Kawashima. J., Takahashi. S., et al : Hemifacial trial of VitaminC sonopheresis in melasma 1st Congress of the international dermoscopy society 2006年4月 ナポリ

和文要旨

(1) ビオチン血中濃度測定法の検証とビオチン内服による血中濃度の変動

市販のビオチン測定キット(competitive enzyme-linked assay)を用いてその有用性を検証した。添付されているビオチン標準液を使用したところ、希釈直線性は相関係数が 0.998 で信頼性が高かった。血清中のビオチン濃度測定においては、測定下限、上限があることと凍結融解の影響や測定日間変動があることが判明した。ビオチン内服量はほぼ内服量に依存し、内服 9mg では血中濃度は非投与例に比べビオチン濃度が約 100 倍高値であった。内服 9mg と 12mg では有意差ないことから、9mg が適量であると結論された。

(2) 掌蹠膿疱症患者における骨関節炎、歯性病巣の合併、TNF- α 、IL-6、CD4/8 の変動およびビオチンの皮疹、骨関節炎、病巣感染などに対する臨床効果

18名の掌蹠膿疱症患者の調査で骨関節炎は7名、歯性病巣は10名と高率に合併していた。しかし、皮疹の重症度との関連については、歯性病巣とは関係なく、骨関節炎を有する症例の方が逆に軽症であった。また、CD4/8およびTNF- α の変化は認められなかったが、4例でIL-6が上昇していた。4例中3例で比較的重症の歯周炎があり、他の1例は腎盂炎を併発していた。しかし、皮疹の重症度との関連は認められなかった。IL-6高値例で特に関節炎の併発率が高率であったわけではないが、骨関節炎合併例では非合併例に比べ有意にIL-6が高値であった。また歯性病巣を伴う症例でも非合併例に比べ高い傾向があったが、有意差は認められなかった。

ビオチン投与は約78%の症例で有効で、内服前後の皮疹のスコアで有意に低下していた。また、ビオチン投与全例で骨関節炎が軽減し、IL-6値も有意に低下していた。ただし、歯性病巣自体には効果がなく、歯性病巣治療開始によりさらにスコアの改善を認めた。

以上の結果より、掌蹠膿疱症ではIL-6が重症の病巣感染の指標になる可能性があること、および皮疹および骨関節炎共にビオチン9mg内服が約3/4の症例で有用であり、合併する歯性病巣の治療を併用すると、さらにその治療効果を高められると考えられる。

英文要旨

We investigated 18 patients with pustular palmoplantaris (PPP) on the existence of osteoarthritis, periodontitis and the efficacy of biotin by scoring the severity of eruption with PPPASI (palmoplantar Pustular Psoriasis Area Severity Index). We also analyzed CD4/8 and plasma concentration of TNF- α , IL-6 and biotin before and after biotin treatment. Serum concentration of biotin was measured by competitive enzyme-linked assay.

We found osteoarthritis (39%), periodontitis (56%) very frequently in these patients. However, these complications did not correlate with severity of eruptions. Elevations of plasma concentrations of IL-6 was detected in 4 of our patients, although there was no significant changes of CD4/8 and TNF- α . In these 4 cases three patients had severe periodontitis and one had pyelonephritis.

Serum concentration of biotin was about 100 times higher in the patients with administration of 9 or 12mg of biotin daily than those without biotin treatment. There was no significant difference of serum biotin concentration between patients with 9mg daily and those with 12mg daily. This result means 9mg of biotin per day is enough for the treatment of the patients with PPP.

Biotin was very effective for 14 (78%) patients investigated. PPPASI of the patients was significantly lowered after biotin treatment ($p < 0.01$). Biotin was also effective for the osteoarthritis. Serum IL-6 concentration was significantly decreased after biotin treatment ($p < 0.01$). Furthermore, we confirmed synergic effect of dental treatment on eruptions and osteoarthritis of the patients with PPP.

These results indicate IL-6 may be a useful marker for severe periodontitis in the patients with PPP. We also suggest biotin (9mg daily) together with dental treatment for periodontitis is quite effective for PPP.

本報告書の構成

以下の構成となっている。

【 1 】はじめに

【 2 】対象と方法

【 3 】ビオチン投与前後のビオチン血中濃度の変動

【 4 】掌蹠膿疱症患者 17 名における歯性病巣、骨関節炎の合併率、喫煙率、
金属アレルギーの有無、ビオチンの皮疹、骨関節炎、歯性病巣に対する効果
と CD4/8、IL-6、TNF- α の治療前後の変動

【 5 】考察

【 6 】結論

【1】はじめに

歯性病巣と結節性紅斑やアナフィラクトイド紫斑などの皮膚疾患の関係については古くから指摘されているが、歯性病巣は特に掌蹠膿疱症や異汗性湿疹の発症に深く関与していると考えられている。我々の検討では、掌蹠膿疱症患者の約70%に治療を要する歯性病巣を認め、これらの治療を行うと約20%の患者は略治し、約30%の患者は軽快する(文献1)。また、他施設からも同様の報告がある。さらに掌蹠膿疱症患者血中の歯性病巣に関係のある *Actinobacillus actinomycetemcomitans* の熱ショック蛋白に対する抗体価を測定したところ、歯性病巣を有する患者に有意に高く、歯性病巣治療に伴い、有意に低下することを既に報告した(文献2)。これらの結果は、歯性病巣の関与を強く示唆する。しかし、歯性病巣治療により、いわゆる病巣感染における二次疾患としてのこれらの皮膚疾患が治癒ないし軽快する遠隔効果のおこる機序については不明な点が多く、これらの掌蹠膿疱症や異汗性湿疹の病態も十分には解明されず、治療も対症療法にとどまることが多い。むしろ、病巣感染は原因というより、素因として生じやすい合併症とも考えられる。

一方、乾癬の研究が精力的に行われているのに対し、掌蹠膿疱症は尋常性乾癬の一亜型とする説もあり、本症を独立に取り上げての研究はあまり行われていない。すなわち、海外においては乾癬の一亜型として乾癬が有効な治療法が本症でどうかという臨床研究や乾癬で指摘される病態が本症ではどうかといった乾癬追従型の研究が主体である。しかし、最近発見された乾癬の疾患感受性遺伝子である PSORS1 は掌蹠膿疱症患者では全く検出されないことより、独立した疾患と考えられ、難治な本症の病因解明、治療法の確立が望まれるところである。乾癬に有効なシクロスポリンなどの薬剤は別として、本疾患に特異的に有効な薬剤としてビオチン(ビタミンH)が注目されている。掌蹠膿疱症患者の血清アミノ酸分析でセリンが高値であることから、セリン代謝に関係するビオチンの血中濃度の測定がなされ、健常人に比べ低値であることが判明し、さらにビオチン欠乏ラットに皮膚炎が生じることから、約20年前にビオチン療法が提唱された(文献3)。ビオチンと本症の関係については、本症の一部の患者見られる胸肋鎖骨間骨化症の治療にビオチンが有用であるとの報告があるのみで(文献4)、本症全体についてはどうかについては多数例の検討は不十分で、その後ビオチンの作用機序などの研究は報告されていない。

当施設においては掌蹠膿疱症や異汗性湿疹にビオチンの大量療法を行い、既に少数例ではあるが、治癒ないし著効する症例が多いことを確認している。そこで、本研究では、ビオチン大量療法の有効率や標準的投与法を確立すると共に、高率に合併する歯性病巣がビオチン投与により治癒あるいは改善する可能性や歯性病巣を治療することによりビオチンの効果が高まる可能性などを検索する。同時に本症に関与するといわれている CD4陽性細胞、TNF- α 、IL-6の動態を合わせて測定することにより、歯性病巣がこれらの皮膚疾患の発症にどのように関与するかを明ら

かにすることにある。

文献

- (1) 高橋慎一、川島淳子、森本光明、山根源之 : 掌蹠膿疱症患者の歯性病巣感染とその治療効果
日本皮膚科学会雑誌, 111:426, 2001.
- (2) Takahashi S, Kawashima J, Morimoto M, Yamane G, Ishihara K, Okuda K : Remission of palmoplantar pustulosis after periodontal treatment : Role of oral bacterial heat shock proteins A nnales de Dermatologie et de Venereologie, 129(1S):768, 2002.
- (3) 牧野好夫、前橋 賢、古川勇次、佐藤隆夫 : ビオチン療法 皮膚科 MooK No2. 乾癬とその周辺疾患. 金原出版 237-244, 1985.
- (4) Maebashi M, Makino Y, Furukawa Y, Ohinata K, Kimura S, Sato T: Effect of biotin treatment on metabolic abnormalities occurring in patients with sternocostoclavicular hyperostosis
J. Clin. Biochem. Nutr. 15:65-76, 1993.

【3】ビオチン投与前後のビオチン血中濃度の変動

(これらの結果はトランスジェニック株式会社の協力による。)

(1) 市販のビオチン測定キットによる血中ビオチン濃度測定の有効性の検証

1) 試験材料及び方法

ヒト血清(ヒトのプール血清)、Biotin Enzyme-Linked Assay Kit
(Immundiagnostik GmbH)

測定方法

検体は使用直前に融解し、融解後に不溶解物の除去のため、遠心分離(1660×g, 4°C, 10分間)し、上清を検討に用いた。尚、標準曲線用試料(標準液)については、duplicate(n=2)で測定し。

ビオチン定量

ポリプロピレン製チューブに、ビオチン標準液(0, 37.5, 75, 150, 300, 600 ng/L)あるいは測定試料(検討試料)を入れ、さらにストレプトアビジン結合酵素液(horseradish peroxidase labeled streptavidin)を加えて攪拌した後、室温(25°C)で30分間静置した。尚、ビオチン標準液あるいは測定試料及びストレプトアビジン結合酵素液はそれぞれ等量混合した。

ビオチン結合アルブミンが固相化されたウェル中に、上記の混合溶液を100 µL分注し、室温で30分間静置した。ウェル中の混合溶液を吸引除去後、ウェルを洗浄液(300 µL)で5回洗浄後、基質発色液(TMB substrate)を100 µL加え、室温で10分間静置した。反応停止液100 µLをウェルに加えて酵素反応を停止させ、各ウェルの波長450 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー(GENios, TECAN Austria GmbH)で測定した。

濃度の算出

ビオチン濃度の算出は、濃度算出用ソフトウェア(LS-PLATEmanager 2004, 和光純薬工業株式会社)を用いて、標準液のduplicate測定の吸光度を基に標準曲線を作成し、各検討用試料の吸光度から濃度を求めた。定量下限値は0濃度を除く標準液の最低設定濃度とした。

添加回収・同時再現性

ヒト血清に、キットに添付されたビオチン標準液を添加し、「添加回収・同時再現性検討用試料」を3濃度(添加濃度0, 75, 150 ng/L)調製した。「添加回収・同時再現性検討用試料」をそれぞれn=3で調製し、それぞれn=1(single)で測定した。添加回収・同時再現性検討用試料は標準曲線用試料とともに測定し、平均定量値、標準偏差(SD)、相対変動係数(%CV)及び「平均定量値と理論値との相対誤差(%Relative Error: %RE)」を求めた。

$\%RE = [(\text{実測値} / \text{理論値}) - 1] \times 100$

希釈直線性

キットに添付された検体希釈液(sample dilution buffer)を用い、ビオチン標

準液を添加したヒト血清を 2 倍及び 4 倍希釈し、希釈性検討用試料(原液を含む：計 3 濃度)をそれぞれ n=3 で調製して、それぞれ n=1 (single) で測定した。希釈性検討用試料は標準曲線用試料とともに測定し、平均定量値、標準偏差 (SD)、相対変動係数 (%CV) 及び「平均定量値と理論値との%RE」を求めた。また、その平均定量値と希釈倍率との一次回帰式を求めた。

凍結融解

凍結融解安定性検討用試料を 2 濃度 (添加濃度 75, 150 ng/L) 調製し、調製直後、1 回、2 回及び 3 回凍結融解後 (計 4 条件) で、各濃度につき n=3 (triplicate) で測定した。凍結融解安定性検討用試料は超低温フリーザー (約 -80) で約 24 時間凍結した。融解は室温 (25) 下で行い、試料が完全に融解したことを確認後、さらに約 2 時間室温に放置した。

この「凍結・融解操作」を 1 回とした。凍結融解安定性検討用試料は標準曲線用試料とともに測定し、1 回、2 回及び 3 回凍結融解後の凍結融解安定性検討用試料の定量値 (平均値) を、調製直後の定量値 (平均値) と比較した。

ヒト血清検体の測定

ビオチンを投与あるいは非投与のヒトから得られた血清、それぞれ 3 検体 (計 6 検体) を各検体につき、n=1 (single) で測定した。ビオチン投与の血清については、キットに添付された検体希釈液で 20 倍に希釈して測定した。ビオチン非投与の血清については、2 倍に希釈して測定した。

判定基準

添加回収・同時再現性

具体的な判定基準値は設けず、目標値として %RE が $\pm 25\%$ 以内及び %CV が 15% 以内を設定した。添加濃度に対応した定量値の変化が認められた場合、評価が可能と判断した。

希釈直線性

具体的な判定基準値は設けず、目標値として %RE が $\pm 25\%$ 以内及び %CV が 15% 以内を設定した。希釈倍率に対応した定量値の変化が認められた場合、評価が可能と判断した。

凍結融解

1 回、2 回及び 3 回凍結融解後の凍結融解安定性検討用試料の定量値 (平均値) が、調製直後の定量値 (平均値) に対して $100 \pm 25\%$ 以内であるとき、安定であると判断した。

最終的に決定したヒト血清検体の測定法の概要

ヒト血清検体中ビオチン濃度の値を、測定時の希釈倍率で補正して測定値とした。尚、定量下限値未満の場合は <75.0 ng/L あるいは <750.0 ng/L と記載し、定量上限値を超える場合は >1200 ng/L あるいは >12000 ng/L と判断することとした。

2) 結果および考察

市販のビオチン測定キット (competitive enzyme-linked assay 法) を用い、ヒト血清中のビオチン定量法について検討を行った。

1 度目の検討では、添加回収・同時再現性について、添加濃度 0 の検討試料に大きな変動 (%CV 39.4%) が認められ、さらにビオチン標準液の最低設定濃度 (37.5 ng/mL) より低濃度のデータも認められたことから、再検討することとした (Reference data 1)。

また、希釈直線性について、原液 (希釈無し) を基準値 (平均濃度 267.4 ng/L) とする %RE は 15.4~47.2% で、%CV は 2.0~4.2% あり、希釈倍率が上がると理論値より高濃度に測定される傾向が認められた (Reference data 2)。そこで定量性能を高めるため、原液 (希釈無し) の基準値を高濃度 (500 ng/L 程度) に設定し、再検討することとした。さらに、凍結融解安定性について、凍結融解 1~3 回後の定量値 (平均値) は、ビオチン添加濃度 75 ng/L においては、調製直後の定量値 (平均値) に対して 68.2~83.6% を示し、ビオチン添加濃度 150 ng/L においては、調製直後の定量値 (平均値) に対して 93.0~95.0% であり、比較的安定である結果が得られたが (Reference data 3)、再現性の確認のため再検討することとした。

2 度目の検討では、添加回収・同時再現性について、試料の変動係数 (%CV) 及び相対誤差 (%RE) は、ビオチン添加濃度 75 ng/L において 2.7% 及び -11.4%、150 ng/L において 0.4% 及び -21.8% であった。ビオチン添加濃度 0 ng/mL の %CV は 2.0% であった。いずれの値も %CV 及び %RE の判定基準範囲内であった (Table 1)。

希釈直線性について、一次回帰式の相関係数は 0.998 であり、原液 (希釈無し) を基準値とする %RE は -13.9~ -3.5% で、%CV は 3.6~12.5% であった。いずれの値も希釈直線性の判定基準範囲内であった (Table 2, Figure 1)。

凍結融解安定性について、凍結融解 1~3 回後の定量値 (平均値) は、ビオチン添加濃度 75 ng/L においては、調製直後の定量値 (平均値) に対して 212.4~220.9% を示し、ビオチン添加濃度 150 ng/L においては、調製直後の定量値 (平均値) に対して 186.2~191.1% を示し、いずれも安定性の判定基準を大きく上回った。測定は調製直後に 1 回及び凍結融解 1~3 回後に 1 回、計 2 回の測定操作を実施しており、凍結融解 1~3 回後の定量値には特に変化は見られないことから、当結果は、計 2 回の測定間の変動 (日間変動) に起因する可能性も考えられた (Table 3)。

ヒト血清検体のビオチン測定について、ビオチン投与あるいは非投与のヒトから得られた血清 (それぞれ 3 検体、計 6 検体) を測定した。ビオチン非投与の血清については 2 倍希釈条件で測定し、119.9~191.6 ng/L であった。一方、ビオチン投与の血清についてはビオチン高濃度が予想されたため、20 倍希釈条件で測定したところ、いずれの検体も定量下限値未満 (<37.5 ng/L) であり、測定時の希釈倍率で補正して、<750.0 ng/L と記載した (Table 4)。

Table 1 Accuracy and precision for the determination of biotin in human serum (within-run precision)

Item	Repetition	Added concentration of biotin (ng/L)		
		0	75	150
Found (ng/L)	1	50.6	111.7	157.0
	2	50.6	113.2	156.5
	3	49.8	107.4	155.9
Mean (ng/L)		50.0	110.8	156.5
Standard deviation		1.0	3.0	0.6
Precision (%CV)		2.0	2.7	0.4
Expected concentration (ng/L)		-	125.0	200.0
Accuracy (%RE)		-	-11.4	-21.8

Expected concentration=mean concentration in adding 0 ng/L biotin+ added concentration

The %RE and %CV were calculated by the following equations, respectively.

%RE= [(mean concentration/expected concentration)-1] × 100

%CV= (standard deviation/mean concentration) × 100

Table 2 Dilution suitability for the determination of biotin in human serum

Item	Repetition	Dilution factor		
		neat #	1:2	1:4
Found (ng/L)	1	544.6	232.9	124.8
	2	549.2	276.2	124.6
	3	581.9	299.3	111.5
Mean (ng/L)		558.6	269.5	120.3
Standard deviation		20.3	33.7	7.6
%CV		3.6	12.5	6.3
Expected concentration (ng/L)		-	279.3	139.7
%RE		-	-3.5	-13.9

Expected concentration=mean concentration of 'neat'/dilution factor

The %RE and %CV were calculated by the following equations, respectively.

%RE= [(mean concentration/expected concentration)-1] × 100

%CV= (standard deviation/mean concentration) × 100

#: Biotin attached to the assay kit was added to the serum and used as the sample for dilution suitability.

Table 3 Stability of biotin in human serum after three freeze-thaw cycles

Number of freeze and thaw (cycle)	Item	Repetition	Added concentration of biotin (ng/L)	
			75	150
Initial	Found (ng/L)	1	64.9	131.2
		2	66.1	125.8
		3	62.5	117.8
	Mean (ng/L)		64.5	124.9
1	Found (ng/L)	1	144.2	238.4
		2	143.6	236.6
		3	139.7	240.0
	Mean (ng/L)		142.5	238.3
	Stability (%)		220.9	190.8
2	Found (ng/L)	1	143.9	233.4
		2	143.4	224.6
		3	123.6	240.0
	Mean (ng/L)		137.0	232.7
	Stability (%)		212.4	186.2
3	Found (ng/L)	1	142.9	241.0
		2	133.5	246.2
		3	143.9	229.0
	Mean (ng/L)		140.1	238.7
	Stability (%)		217.2	191.1

Stability (%) = (mean concentration after the freeze and thaw/mean concentration at the initial) × 100

Table 4 Serum biotin concentrations in human

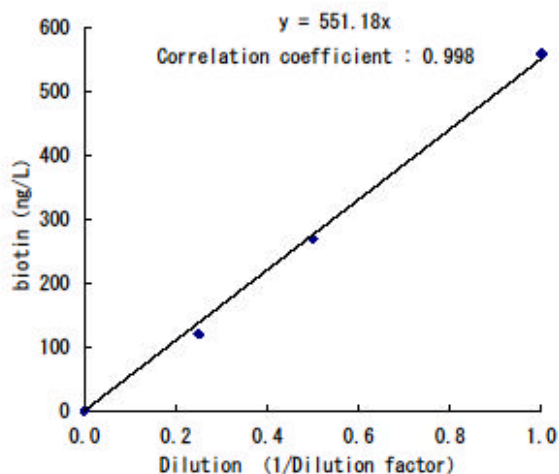
Sample No.	Biotin (ng/L)
1	<750.0*
2	<750.0*
3	<750.0*
4	181.1
5	119.9
6	191.6

*: Below the lower limit of quantification

※ Sample No.1-3 were serum obtained from human administered biotin, and sample No.4-6 were not.

So the former was measured under the condition of diluting by 20 times, and the latter was by 2 times.

Figure 1 Dilution suitability for the determination of biotin in human



Reference data 1 Accuracy and precision for the determination of biotin in human serum (within-run precision)

Item	Repetition	Added concentration of biotin (ng/L)		
		0	75	150
Found (ng/L)	1	27.0	119.6	225.7
	2	57.3	149.4	232.1
	3	35.1	125.5	205.4
Mean (ng/L)		39.8	131.5	221.1
Standard deviation		15.7	15.8	13.9
Precision (%CV)		39.4	12.0	6.3
Expected concentration (ng/L)		-	114.8	189.8
Accuracy (%RE)		-	14.5	16.5

Expected concentration=mean concentration in adding 0 ng/L biotin+ added concentration

The %RE and %CV were calculated by the following equations, respectively.

%RE= [(mean concentration/expected concentration)-1] ×100

%CV= (standard deviation/mean concentration) ×100

Reference data 2 Dilution suitability for the determination of biotin in human serum

Item	Repetition	Dilution factor		
		neat #	1:2	1:4
Found (ng/L)	1	264.7	157.7	102.7
	2	273.6	150.8	98.3
	3	264.0	154.4	94.5
Mean (ng/L)		267.4	154.3	98.5
Standard deviation		5.4	3.5	4.1
%CV		2.0	2.3	4.2
Expected concentration (ng/L)		-	133.7	66.9
%RE		-	15.4	47.2

Expected concentration=mean concentration of 'neat'/dilution factor

The %RE and %CV were calculated by the following equations, respectively.

%RE= [(mean concentration/expected concentration)-1] × 100

%CV= (standard deviation/mean concentration) × 100

#: Biotin attached to the assay kit was added to the serum and used as the sample for dilution suitability.

Reference data 3 Stability of biotin in human serum after three freeze-thaw cycles

Number of freeze and thaw (cycle)	Item	Repetition	Added concentration of biotin (ng/L)	
			75	150
Initial	Found (ng/L)	1	165.2	230.7
		2	169.3	228.1
		3	163.8	230.0
	Mean (ng/L)		166.1	229.6
1	Found (ng/L)	1	105.2	217.9
		2	127.1	223.4
		3	107.3	213.2
	Mean (ng/L)		113.2	218.2
	Stability (%)		68.2	95.0
2	Found (ng/L)	1	130.2	223.3
		2	135.3	212.1
		3	136.1	209.8
	Mean (ng/L)		133.9	215.1
	Stability (%)		80.6	93.7
3	Found (ng/L)	1	135.7	206.5
		2	138.5	219.3
		3	142.2	214.5
	Mean (ng/L)		138.8	213.4
	Stability (%)		83.6	93.0

Stability (%) = (mean concentration after the freeze and thaw/mean concentration at the initial) × 100

(2) 市販キットによる患者血清中のビオチン濃度測定結果およびビオチン
投与量とビオチン血中濃度の関係

1) 方法

検体は使用直前に融解し、融解後に不溶解物の除去のため、遠心分離 (1870 × g, 4 °C, 10 分間) し、上清を測定試料として用いた。各検体および標準液について、duplicate (n=2) で測定した。尚、測定に際しては、精度管理検体 (ヒト血清 1 濃度) を測定試料と同様に取扱い、測定した。

ビオチン測定

ポリプロピレン製チューブに、ビオチン標準液 (0, 37.5, 75, 150, 300, 600 ng/L) あるいは測定試料をそれぞれ 150 μL ずつ入れ、さらにストレプトアビジン結合酵素液 (horseradish peroxidase labeled streptavidin) をそれぞれ 150 μL 加えて攪拌した後、室温 (約 25 °C) で 30 分間静置した。

ビオチン結合アルブミンが固相化されたウェル中に、上記の混合溶液を 100 μL 分注し、室温で 30 分間静置した。ウェル中の混合溶液を吸引除去し、ウェルを洗浄液 (300 μL) で 5 回洗浄後、基質発色液 (TMB substrate) を 100 μL 加え、室温で 10 分間静置した。反応停止液 100 μL をウェルに加えて酵素反応を停止させ、各ウェルの波長 450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (GENios, TECAN Austria GmbH) で測定した。尚、検体を希釈する場合は、検体希釈液 (sample dilution buffer) を用いた。

濃度の算出

ビオチン濃度の算出は、濃度算出用ソフトウェア (LS-PLATEmanager 2004, 和光純薬工業株式会社) を用いた。標準液の duplicate 測定の吸光度を基に標準曲線を作成し、各試料の吸光度から濃度を求めた。測定時の希釈倍率で補正して血清中の濃度を算出した。

再測定

以下の実施基準に基づき、再測定を行った。尚、本試験では、サンプル No. 3, 9, 16 の計 3 検体について、下記の第 5 項に該当する事象、すなわち、定量値が標準曲線の設定範囲を外れたため、再測定を行った。その他の事象は発生しなかった。

再測定の実施基準

1. 標準液の duplicate 測定の吸光度がばらつきの許容範囲を外れたとき。
 2. 精度管理検体の duplicate 測定の吸光度がばらつきの許容範囲を外れたとき。
 3. 精度管理検体の定量値が許容範囲を外れたとき。
 4. 測定試料の duplicate 測定の吸光度がばらつきの許容範囲を外れたとき。
 5. 測定試料の定量値が標準曲線の設定範囲を外れたとき。
- 1~3 の場合は、全ての検体について再測定する。
4 の場合は、その該当する検体について再測定する。
5 の場合は、その該当する検体について希釈倍率を変えて再測定する (ただし、検体を希釈なしの条件で測定し、標準曲線の設定範囲の低濃度側に外れたときは定量下限値未満として取扱い、再測定は行わない)。

Duplicateのばらつきの許容範囲：平均吸光度の $100 \pm 20\%$ 以内
(ただし，吸光度が 0.2 以下の場合は $100 \pm 25\%$ 以内)

精度管理検体の定量値の許容範囲：基準値の $100 \pm 25\%$ 以内
(ただし，吸光度が 0.2 以下の場合は $100 \pm 25\%$ 以内)
(基準値は当試験前に得られたデータの平均値とした)

2) 試験結果及び考察

市販のビオチン測定キット (competitive enzyme-linked assay 法) を用い，試験委託者から提供されたヒト血清中のビオチン測定を行った (Table 1)。尚，測定結果の検体名称表示は，サンプル No.，サンプル名 (姓名の順でイニシャル表記した。例えば，日本太郎は NT とした。) および採取年月日を使用した。精度管理検体の測定値 (Table 2) は許容範囲内であり，測定操作に問題はなかったと考えられた。

Table 1 Serum biotin concentrations in human

Sample No.	Sample name	Date of sampling	Biotin (ng/L)
1	MA	2006/8/1	249
2	MA	2006/10/20	39006
3	ST	2006/7/4	9694 *
4	ST	2006/11/21	45231
5	ST	2007/8/28	26280
6	IK	2006/7/4	458
7	IK	2006/10/17	14548
8	TH	2006/10/31	20172
9	TH	2007/3/9	4866 *
10	YM	2006/11/7	141
11	YM	2007/2/23	49546
12	YM	2007/5/18	14672
13	FT	2006/7/11	170
14	FT	2006/11/7	16290
15	FT	2007/3/6	54907
16	SA	2006/7/4	7943 **
17	SA	2006/8/22	51094
18	SA	2006/11/14	38312
19	WI	2006/12/1	202
20	WI	2007/3/9	16807
21	IK	2007/4/13	154
22	IK	2007/7/17	33213
23	HY	2007/4/13	236
24	HY	2007/9/25	58932
25	GH	2007/6/5	219
26	GH	2007/9/14	16755
27	SM	2007/6/5	637
28	SM	2007/9/28	46485
29	IS	2007/7/20	156
30	IS	2007/10/12	54952
31	MT	2007/5/8	153
32	MT	2007/8/21	64113
33	YN	2007/6/21	168
34	YN	2007/9/21	28106
35	SR	2006/7/18	24134
36	SR	2006/11/10	11708
37	YS	2006/8/25	40144
38	YS	2007/2/2	46527
39	TT	2006/8/1	14104
40	TT	2006/11/21	13149

* : It was re-assayed value because concentration of the sample was below the range of a standard curve at the first assay.

** : It was re-assayed value because concentration of the sample was beyond the range of a standard curve at the first assay.

Table 2 Concentrations of biotin in the quality control sample

Lot No.	Item	Nominal value	Acceptable range (100±25%)	Assay No.		
				1	2	
human080109	Biotin (ng/L)	260	195 - 325	272	298	
				Date ^{a)}	Jan. 15, 2008	Jan. 17, 2008

a) Date of completion of assay

【4】掌蹠膿疱症患者 17 名における歯性病巣、骨関節炎の合併率、喫煙率、金属アレルギーの有無、ビオチンの皮疹、骨関節炎、歯性病巣に対する効果と CD4/8、IL-6、TNF- α の治療前後の変動

(1) 対象と方法

1) 対象の選定

東京歯科大学市川総合病院皮膚科および歯科・口腔外科外来を受診した掌蹠膿疱症患者のうち、以下の条件を満たす患者を今回の研究に参加させる。(外来担当：皮膚科 高橋、川島、森本、山根)

診断が掌蹠膿疱症である

ビオチン内服を行うことができる。

強力な免疫抑制効果のある薬剤の併用は行わない(ステロイド、免疫抑制剤など)。

歯周炎の病巣感染の検査を受ける。

金属アレルギーの検査を受ける(リンパ球幼若化試験あるいはパッチテスト)。

1ヶ月に一回程度の外来通院が可能である。

本研究が研究報告書および学会や論文で報告されることに同意する。

ただし、本人の希望でこの研究のいつの時点でも中止することができる。

2) 皮膚症状の観察と治療(高橋、川島)

ビオチン療法：9mg/日投与を行う。合わせて Miya BM を追加処方する(ビオチンの吸収を高めるため)。最低6ヶ月、可能なら1年間経過観察する。また途中で治癒した場合、その量で維持して経過観察する。尚、3ヶ月で効果が現れないときは12mgに増量する。

皮膚症状の観察とデジカメ撮影

経時的に(約1ヶ月に一回)皮疹を観察し、乾癬の重症度判定に用いられる PASI score の変法(PPPASI)を用いて皮疹をスコア化する。合わせて、デジカメ撮影し記録に残す。

3) 病巣感染の検索と治療と経過観察(森本、山根)

歯性病巣：歯周炎の有無、程度を視診で観察した後、パントモグラフィー撮影を施行する

病巣がある場合は、ビオチン投与後、約3ヶ月に一回の定期検診を行う。

扁桃：可能な限り、扁桃について通常の耳鼻科診察を受ける。

治療：ビオチン治療を一定期間施行し(9mg以上で3ヶ月以上)十分な効果が得られない場合、上記の病巣感染の治療適応があれば、治療を開始し、定期的に経過観察する。

4) 金属アレルギー検査と治療

パッチテスト：鳥居の金属シリーズ 4 8 時間後、7 2 時間後、7 日後に判定し、7 2 時間あるいは7 日後に + 以上の反応を示すものを陽性とする。(高橋、川島、森本、山根)

金属リンパ球幼若化試験：患者血中よりリンパ球を採取し、3 日培養後、NiSO₄, CoCl₂, PdCl₂, AuCl₂ と反応させ、³H-thymidine の取り込みにより計測した幼若化率を無添加のものと比較する。コントロールに対し何%かで表示し、200% 以上を陽性とする。(高橋、森本)

金属アレルギーの治療：ビオチン治療を一定期間施行し(9 mg 以上で3 ヶ月以上)、十分な効果が得られない場合で金属アレルギーがある場合、歯科金属分析し、適応があれば、歯科金属除去や食物の制限などを施行する。(森本、山根)

5) 血中ビオチン濃度、CD4/CD8 細胞数、血中 IL-6 の測定(高橋、森本)

ビオチン投与前、投与後増量毎、9 mg 以上では3 ヶ月に一回程度に以下の項目を検査する。

ビオチン：市販キットの competitive enzyme-linked assay 法を用いて、血中のビオチン濃度を測定する。

CD4/CD8 細胞：フローサイトメトリーを用いて測定する

TNF- α 、IL-6：ELISA により測定する

6) 臨床データ整理

上記の 2)？ 6) の観察事項および検査所見の経時的変化と比較検討することにより、以下の疑問点を明らかにする。

ビオチンの有効率(皮疹のスコア、骨関節炎とビオチン投与量や血中濃度の関係)

ビオチン投与による歯性病巣、扁桃、金属アレルギーが治癒ないし改善するか？

ビオチン投与量とビオチン濃度の関係

ビオチン濃度に対する喫煙、歯性病巣、金属アレルギーの有無の影響

骨関節炎と皮疹の重症度、歯性病巣との関係

皮疹の重症度や骨関節炎と CD4,8 細胞数、TNF- α 、IL-6 の関係

ビオチン投与と CD4,8 細胞数、TNF- α 、IL-6 の関係

(2) 結果

1) 研究対象患者(掌蹠膿疱症)の臨床的特徴

総数：18名

男女比：4(男):14(女)

年齢：平均51.2歳、32~71歳

骨関節炎：7名

扁桃炎：視診上の明らかな扁桃炎はなし(扁桃摘みは1名)

歯性病巣：中等症から重症が10名、軽症ないし無しが8名は無し

金属アレルギー：8名(パッチテスト陽性者数)/12名(パッチテスト受けた者)

2) 臨床解析の結果

ビオチンの有効率：ビオチン6ヶ月以上の投与により、18名中14例で皮疹が改善し、1例を除き骨関節炎も改善が認められた。PPPASIを投与前後で比較すると、有意に低下していた($p<0.01$)(図1)。

ビオチン投与前後のビオチンの血中濃度の推移：9mg/日投与でビオチン血中濃度は有意に上昇し、平均値では約100倍の増加であった。また、血中濃度の個人差は少なかった(図2)。すなわち、喫煙、病巣感染や金属アレルギーの有無の影響は明らかでなかった。しかし、9mg/日と12mg/日で血中濃度の有意差は認めず、投与量は9mg/日で十分であると考えられる(図3)。

ビオチン投与による病巣感染への影響：ビオチン投与3,6ヶ月後で歯性病巣の改善は確認されなかった。扁桃炎については合併症例が少なく、今回の研究では明らかではなかった。また、金属パッチテスト陽性反応の推移については確認できなかった。

皮疹の重症度と骨関節炎、歯性病巣の関係：骨関節炎の有無でPPPASIを比較すると、むしろ非合併例の方が皮疹の重症度は有意に重かった($p<0.05$, 図4)。また、皮疹の重症度と歯性病巣には明らかな相関は認められなかった(図5)。また、歯性病巣合併例の方が骨関節炎を有する症例が多い傾向があったが、有意差は認められなかった(図6)。

掌蹠膿疱症患者におけるCD4/8細胞数、TNF- α 、IL-6の変動：CD4/8およびTNF- α は全例で正常範囲内であった。しかし、18例中4例でIL-6が上昇していた。その4例中3例で比較的重症の歯周囲炎があり、他の1例は腎盂炎を併発していた。しかし、皮疹の重症度との相関は認められなかった(図7)。IL-6高値例で特に関節炎の併発率が高率であったわけではないが、骨関節炎合併例では非合併例に比べ有意にIL-6が高値であった($p<0.06$, 図8)。また歯性病巣を伴う症例でも非合併例に比べ高い傾向があったが、有意差は認められなかった(図9)。

ビオチン投与による IL-6 の変動：ビオチン投与後に IL-6 の低下が有意に認められた ($p < 0.01$ 、図 10)。

図 1

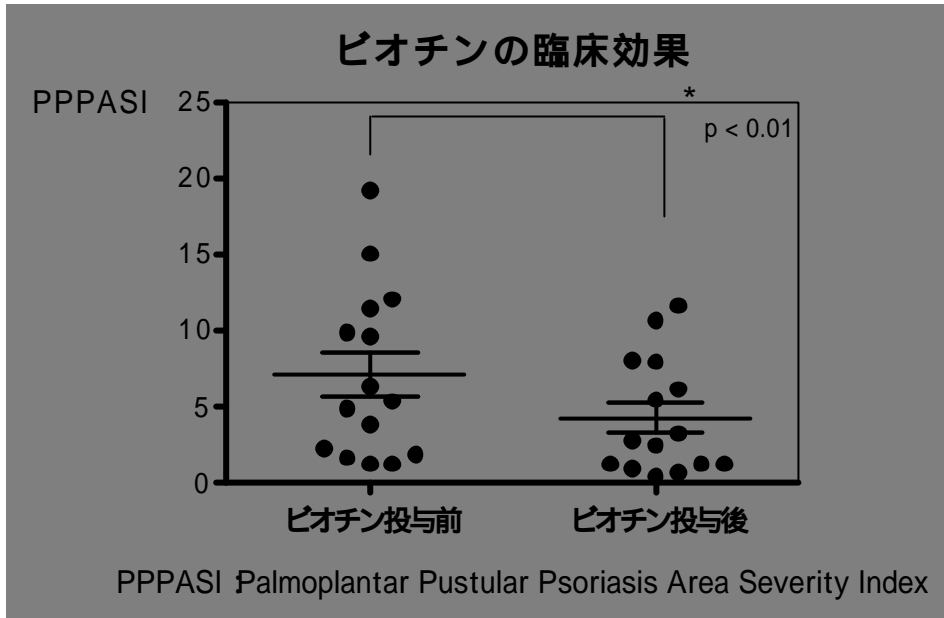


図 2

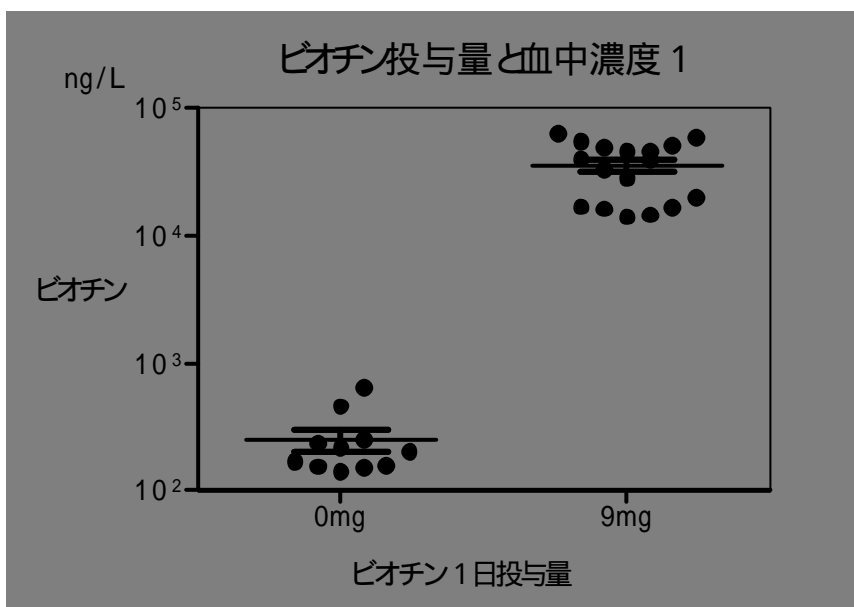


図 3

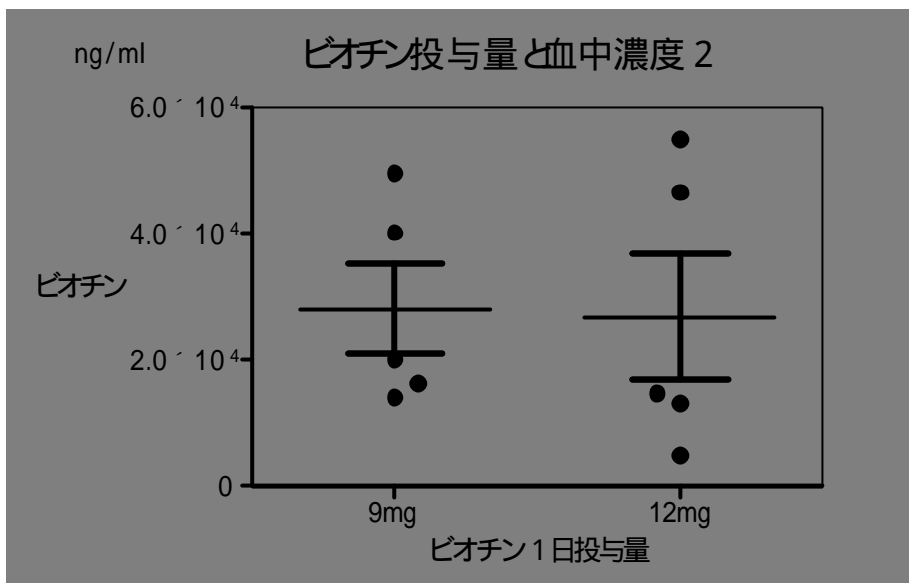


図 4

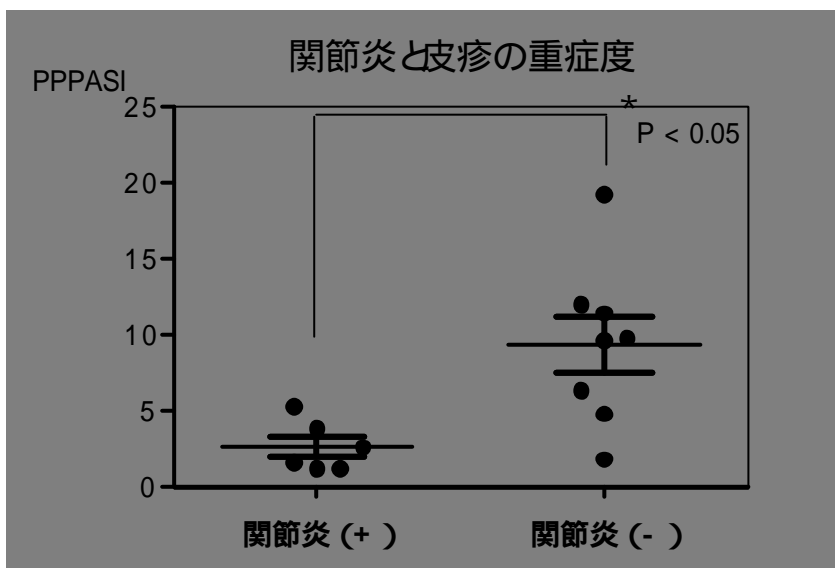


図 5

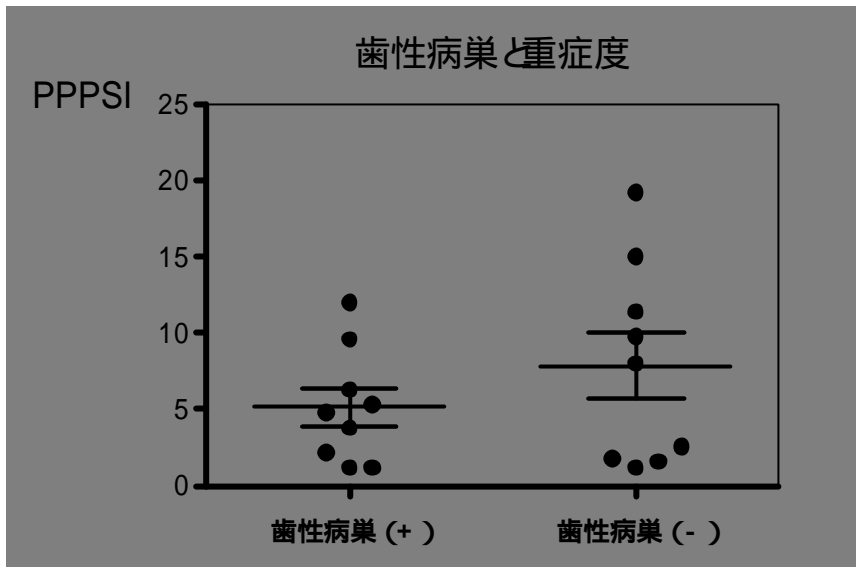


図 6

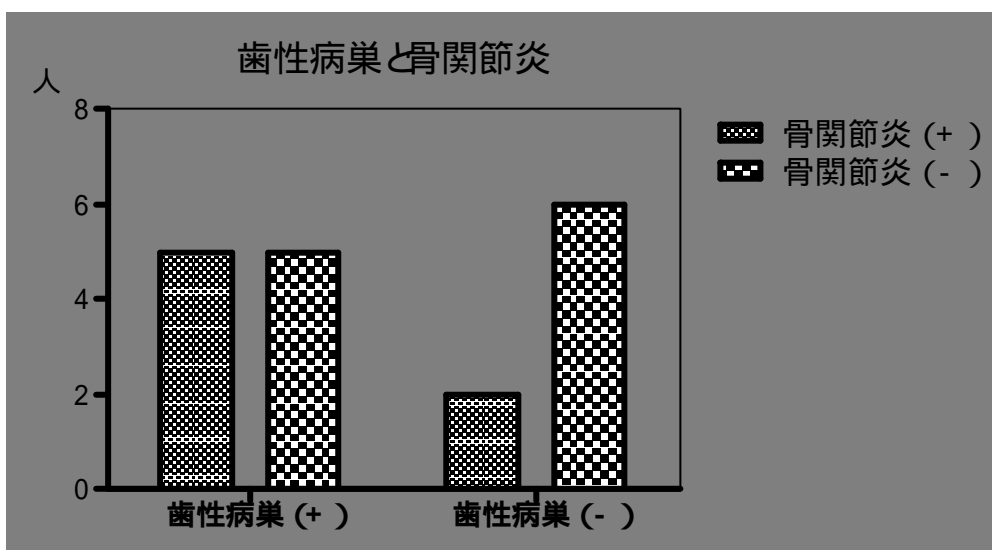


図 7

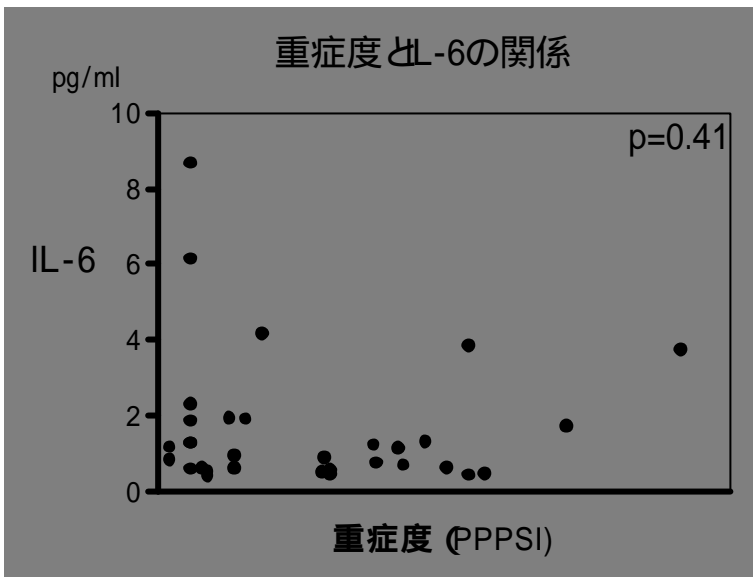


図 8

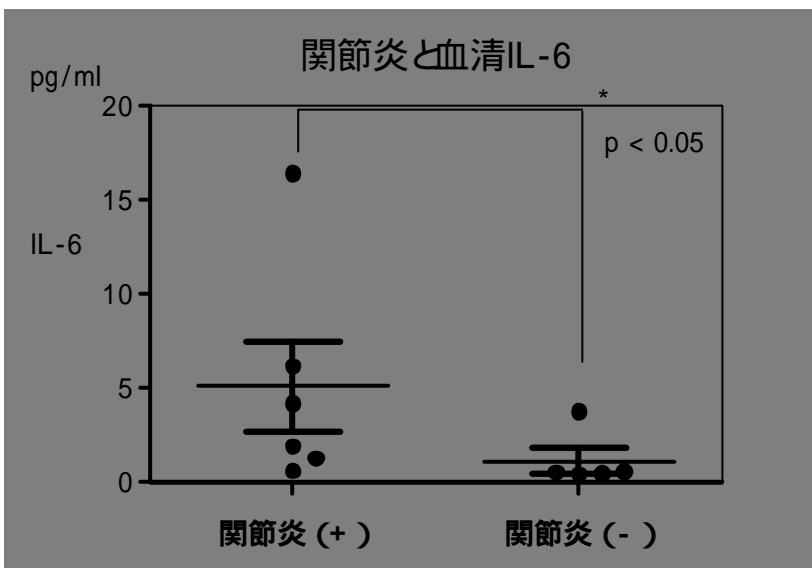


図 9

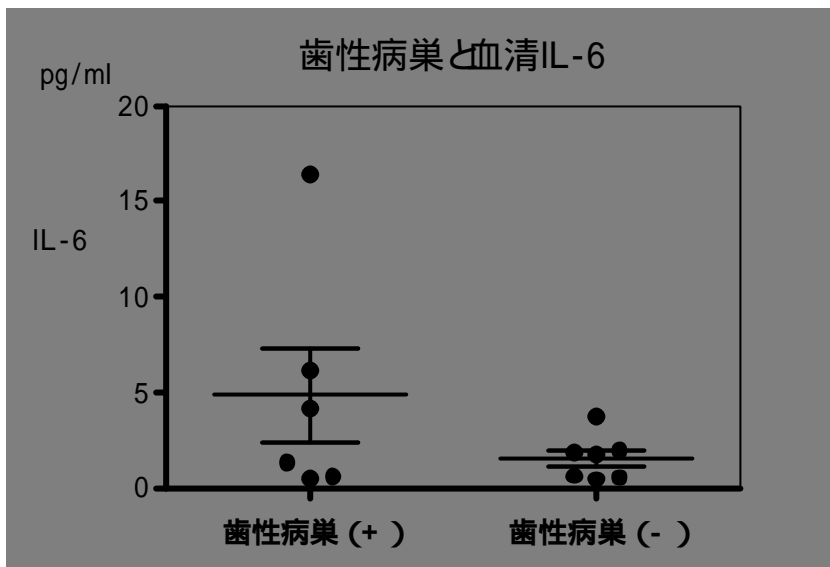
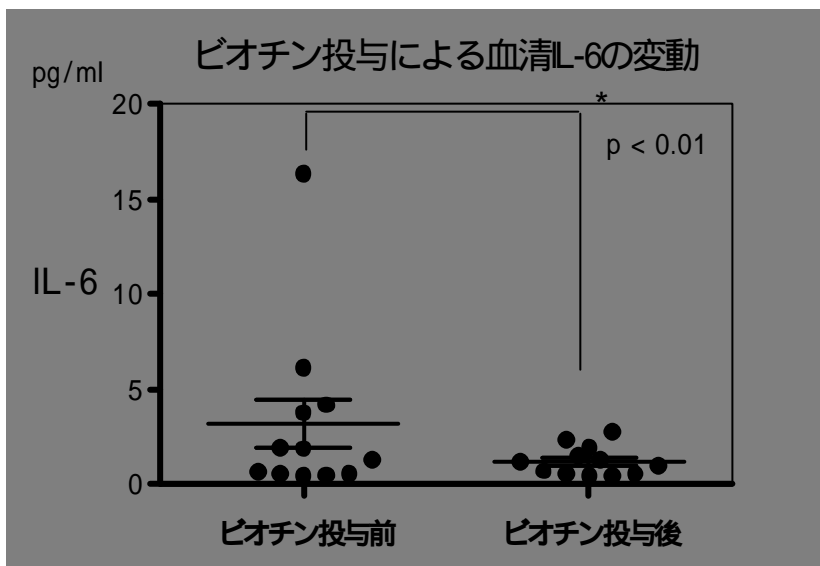


図 10



【5】考察

(1) ビオチン測定キット (competitive enzyme-linked assay 法) による血清中のビオチン濃度測定とその結果について

ビオチン測定について市販キットを検証したところ、【3】で示したように正確で再現性のある測定法であることが確認された。ただし、凍結融解に気をつけることと測定可能な濃度域を認識することが必要である。その上で実際の患者血清を測定した。血中濃度はビオチン投与量に依存し、個人の条件にはそれほど左右されないことが確認された。ビオチン療法の有効量である 9mg 内服では、非内服時の約 100 倍に血中濃度が上昇し、12mg 内服でも 9mg と殆ど変わらないことが判明した。

(2) 掌蹠膿疱症患者の病巣感染、骨関節炎、血中サイトカイン、CD4 / 8 細胞数の測定結果について

過去の報告にあるように、骨関節炎を高率 (38.9%) に合併していた。特に胸鎖関節炎が本症の特徴である。本研究では歯性病巣合併例で高率に認められ、IL-6 は骨関節炎合併例で有意に上昇していることが判明した。さらに、骨関節炎合併例の PPPASI は非合併例より有意に低いことは注目に値する。すなわち骨関節炎合併例では皮疹はむしろ軽い傾向があるが、病巣感染により注意する必要があり、IL-6 がその指標の一つであることを示唆している。

また、中等症以上の歯性病巣も高率 (55.6%) に合併していた。しかし、本症の発症年齢が 40~60 歳であるので、本症を有さない同年代の成人でも歯周病を有することが多く、必ずしも本症の特徴とは言えない。これまでの当施設での疫学研究および本邦の他施設の研究では歯性病巣治療が本症の治療法として有効であることを示しているが、前述の通り、骨関節炎の合併率が高くなることや IL-6 高値例では歯性病巣にも注意すべきである。ただし、皮疹の重症度では病巣感染の有無を推測できないことが示された。

過去の報告で CD4/8 数の変動や TNF- α の関与が示唆されていたため、この研究で末梢血を用いて検索したが、異常は認めなかった。ただし、血漿中の濃度測定のため、皮疹部や病巣感染局所での関与については本研究のみでは否定できない。また、本症で IL-6 が高値になるとの報告例や扁桃の研究において注目されているため、IL-6 測定したところ、約 20% の症例で上昇していた。さらに、前述のように、関節炎との関連や重度の病巣感染との関連が示唆され、本症で測定する臨床的な意義がある程度明らかとなった。

(3) 金属アレルギーについて

本研究において、12 例にパッチテスト施行したところ、8 例に陽性反応が認められた。金属シリーズのパッチテストは健常人においても比較的陽性率が高いが、2/3 の陽性率は有意に高いものと思われる。これは過去の報告に合致する

所見である。しかし、本研究では歯科金属除去の効果を判定できなかった。その臨床的意義については不明である。

(4) ビオチンの臨床的有用性について

ビオチン投与前後で有意に PPPASI が低下し、オープンスタディではあるが、ビオチンが有効な治療法の一つであることが示唆された。また(1)で述べたようにビオチンの血中濃度測定で 9mg と 12mg で差を認めないことより、9mg で十分であることが判明した。また、骨関節炎についてはほとんどの症例で軽快ないし消失しており、有効と考えられた。これは前橋らの報告を支持する所見である。さらに、血中 IL-6 濃度と PPPASI は相関しないにもかかわらず、ビオチン投与前後で有意に IL-6 が低下したことは、ビオチンが直接的に炎症性サイトカインを低下させる効果があったと考えられ、注目される。また、本研究の課題である歯性病巣への治療効果については、3-6ヶ月では効果が認められなかった。むしろ、ビオチン投与3ヶ月以降に歯性病巣治療を追加することにより、さらに PPPASI が低下する傾向にあったことから、本症においてはビオチン投与と歯性病巣治療により相乗効果が期待される。

【6】結論

- 1) ビオチン 9mg / 日投与は掌蹠膿疱症の有効な治療法であると推測される。
皮疹のみならず、合併する骨関節炎にも有効である。
- 2) 歯性病巣治療は掌蹠膿疱症のビオチンの治療効果を高める可能性が高い。
- 3) 血中の IL-6 測定は、掌蹠膿疱症における重度の病巣感染の指標になる可能性がある。ただし、病勢には相関しない。
- 4) 掌蹠膿疱症の皮疹の重症度と骨関節炎や病巣感染の有無は相関しない。