

研 究

ヒト歯周炎罹患歯肉におけるメルケル細胞の分布
および形態と神経支配について
—特に炎症との関連における解析—

上村 理, 立花 民子*

岩手医科大学歯学部歯科保存学第二講座

(主任: 國松 和司 教授)

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座*

(主任: 名和橙黄雄 教授)

(受付: 2005年9月27日)

(受理: 2005年11月7日)

Abstract : Oral mucosal Merkel cells are known to show polymorphism, but the biological significance of the polymorphism is not clear. To determine the biological significance, we analyzed effects of inflammation on numerical density, external figure and innervation of Merkel cells in human gingival mucosae from patients with chronic periodontitis by means of immunohistochemistry and electron microscopy. It was found that mildly inflamed gingival areas usually contained abundant Merkel cells and peripheral nerve fibers in their epithelia, whereas severely inflamed areas contained only small numbers of cells and nerve fibers. Merkel cells in mildly inflamed areas showed a high degree of polymorphism, and only oval- and round-shaped Merkel cells were in contact with nerve terminals. There were a number of Merkel cells atypically located in the prickle to granular cell layers in the mildly inflamed area. These results suggest that Merkel cells transiently disappear from gingival epithelia as a result of nerve fiber atrophy caused by severe inflammation but that these structures are regenerated as the inflammation abates. Electron microscopy revealed that some Merkel cells in the mildly inflamed epithelium make contact with lymphocytes and Langerhans cells. From these findings, it was speculated that some Merkel cells play a role in initiation or termination of gingival inflammation via the modulation of these cells.

Key words : periodontitis, gingiva, Merkel cell, peripheral nerve fiber, Langerhans cell

Distribution, morphology and innervation of Merkel cells in chronic human inflamed gingival tissues analyzed with special reference to the intensity of inflammation

Tadashi UEMURA, Tamiko TACHIBANA*

Department of Periodontology, School of Dentistry, Iwate Medical University

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Iwate Medical University*

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

緒 言

歯肉は歯周組織の一部として歯槽骨や歯根膜および歯根を外界から保護する役割を担っている。その上皮は外縁上皮とも呼ばれる歯肉口腔上皮と、内縁上皮と総称される歯肉溝上皮および付着上皮からなり、それぞれに性質の異なる特徴を有している。歯に面する内縁上皮は非角化重層扁平上皮に属し、口腔上皮に比べて物質透過性が高いため口腔環境からの侵襲を受けやすく、歯周疾患の原発となりやすい部位でもある。一方、外縁上皮は角化重層扁平上皮に属し、口腔からの物質透過に対する障壁となるほか、咀嚼時に歯肉に加わる様々な機械的刺激の受容にも与る知覚神経終末を含んでいる。

メルケル細胞は1875年 F. Merkel によってヒトや動物の表皮に発見された非角化細胞である¹⁻²⁾。この細胞は皮膚では Type I 知覚神経の終末と接合して遅順応性機械受容器であるメルケル細胞-神経複合体を形成している³⁻⁴⁾。ヒトや動物の歯肉口腔上皮にもメルケル細胞が含まれることは古くから報告されている⁵⁻⁹⁾が、近年、歯肉を含む口腔粘膜のメルケル細胞には末梢神経と接合しないものが含まれることが明らかになってきた¹⁰⁻¹³⁾。Tachibana ら¹²⁾は、齧歯類の口腔粘膜に見られるこのような細胞が分泌顆粒を含む細胞質突起を基底膜に向けて突出させていることから、内分泌または傍分泌に関与する可能性があるとして示唆している。また、Tachibana ら¹³⁾は、比較的炎症性細胞浸潤の多いヒトの歯肉や口蓋粘膜にはこのようなメルケル細胞が特に多いことから、これらの細胞が免疫機能に何らかの影響を与える可能性についても指摘している。しかしながら、これらの可能性を証明するような詳細な研究はまだ報告されていない。

歯周外科手術の一つである歯肉剥離搔爬術(F.O.)は、歯周基本治療終了後の歯周精密検査において深い歯周ポケットを有する部位を対象に行われる。手術施行時には歯肉の炎症は初診時に比べれば緩解に向かっているが、完全に炎

症が鎮静化しているわけではない。したがって、この手術によって得られた歯肉には炎症の度合いが異なる様々な領域が共存することが予想され、同一患者の標本を用いてメルケル細胞の分布密度や形態と炎症度の関係を解析することが可能であると考えられる。

そこで本研究では、歯肉における炎症とメルケル細胞の関係を明らかにすることを目的とし、歯周疾患患者から F.O. によって得られた歯肉標本を用いて、メルケル細胞の分布密度、細胞形態、および末梢神経との接合状態が炎症の度合いによってどのように変化するかを解析した。メルケル細胞のマーカーとしては抗サイトケラチン 8, 18, 20 が知られているが、本研究では最も信頼性が高いとされている抗サイトケラチン 20 抗体¹⁴⁾を用いて免疫組織化学的手法で細胞を検出した。一方、メルケル細胞と末梢神経の接合については、抗サイトケラチン 20 抗体と抗ニューロフィラメント抗体を用いた二重標識蛍光抗体法により解析したが、この過程で、一部のメルケル細胞が抗ニューロフィラメント抗体にも陽性反応を示すことに気付いたので、その陽性率や細胞形態との関連についても解析を行った。また、外形の異なるメルケル細胞の微細構造の異同や免疫系細胞との位置的關係についての透過電顕的観察を行った。

材料と方法

1. 材料

岩手医科大学附属病院歯科医療センター保存科歯周病診療室を受診した慢性歯周炎罹患患者を対象とし、歯周炎治療を目的として切除した歯肉組織を、患者に本研究の主旨を説明し同意を得た上で使用した。今回の研究に対して同意の得られた患者は男性11名、女性16名、平均年齢54.3歳である。本研究は岩手医科大学歯学部倫理委員会の審査を受け、承認された。

12人の患者から採取された歯肉は手術経過の都合上、唇頬側と舌口蓋側の区別を明確にすることは困難であったので、上下顎および前歯部、臼歯部のみを区別して使用した。材料は採

取後直ちに付着した血液を燐酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗い落とし、燐酸緩衝4%パラホルムアルデヒド溶液 (PFA) にて4°C2日間浸漬固定した。試料はPBSで十分洗浄後アルコール系列で脱水し、キシレンにて透徹後、歯軸に対して垂直方向に切れるようにオリエンテーションをつけてパラフィンに包埋した。

上記記載患者とは別に10人の患者から採取した歯肉は、前述のように部位を区別して、付着血液を除去した後、固定せずに歯軸と平行に切れるようにオリエンテーションをつけてOCTコンパウンド (Tissue-TEK, SAKURA, 東京) に包埋して液体窒素中にて急速凍結し、-80°Cで保存した。

別に採取した5人の患者の歯肉から実体顕微鏡下で外縁上皮部を切り出し、細切した後0.05 M カコジル酸緩衝2.5%グルタルアルデヒド液で4°C一晩固定した。同緩衝液にて洗浄後1%四酸化オスミウムで後固定し、通法に従いアルコール系列で脱水後、エポキシレジジン (Epon 812) に包埋した。なお、これらの材料の部位は特定していない。

2. 研究方法

1) 炎症度の判定

パラフィン包埋標本から8 μ mの連続切片を製作し、スライドガラス1枚につき5枚の切片を貼付した。各個体の連続切片から10枚に1枚ごとのスライドガラスを抜き出して、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H-E 染色) に供し、炎症度を顕微鏡的に強、中、弱に大別した。これら3段階の炎症度判定の適否を検証するために、炎症度の異なる各群から任意に5枚のスライドガラスを選択し、切片中の上皮結合組織中における任意の5箇所を選択し、100 μ m \times 100 μ mのマスキに含まれる円形細胞数を計測し、単位面積当りの細胞密度の平均値を算出して評価した。

2) メルケル細胞の分布および形態と炎症の関係についての解析

炎症度の判定後、炎症度「強」と「弱」の切片を含むスライドガラスの前後のスライドガラ

スを選択し、通法に従って脱パラフィンした後、0.3%過酸化水素水加メタノール溶液に30分間 (室温) 浸漬し、内因性ペルオキシターゼの除去を行った。蒸留水で洗浄後、0.2% Triton X-100加PBSに1時間浸漬し、細胞膜の界面活性処理を施した。PBSで洗浄後、切片を室温下において5分間トリプシンで消化して抗原性賦活を行った。PBSにて洗浄し、40倍に希釈したモノクローナル抗ヒトサイトケラチン20 (CK 20) 抗体 (Progen 社, Heidelberg) と4°C1晩反応させた。

抗原-抗体反応後の切片はニチレイ社製ヒストファイン・シンプルステイン MAX Po (MULTI) を用いてHRP法による反応産物の増幅後、ジアミノベンチジン反応により可視化し、ヘマトキシリン液で核染色を行った後、脱水、透徹、封入を行い、光学顕微鏡にて観察した。

メルケル細胞の分布密度の計測のため、染色した全切片について光学顕微鏡下で上皮巾を計測し、切片中の全メルケル細胞数を数えて単位上皮長あたりのメルケル細胞密度として算出した。各患者について炎症度の弱い領域と強い領域から得た切片のメルケル細胞密度の平均値をそれぞれ算出した。今回使用した歯肉標本の中には、同一標本中に炎症度の異なる領域が混在するものと、ほぼ均一な炎症度を示す標本が含まれていた。そこで、炎症度の不均一な5名分の標本については、炎症度の異なる部位間におけるメルケル細胞密度と細胞の多形性の違いを解析し、HULINKS社製KaleidaGraph[®]を用いたt検定により統計学的有意差を検定した。一方、炎症度がほぼ均一な標本については、炎症の度合いの異なる患者間での比較を行ったが、例数が少ないため統計学的分析は行わなかった。

また、炎症度の不均一な5名分の標本については、メルケル細胞の分布域について、基底層および基底上層にあるものとそれ以外の層にあるもの (異所性) を区別し、またメルケル細胞の形態を外形の平滑な球または楕円体形のもの

(類円形)と外形が不規則なもの(異型)の2つのタイプに分類して,全メルケル細胞に占めるそれぞれの細胞の比率を算出して炎症度との関係を解析した。計測誤差を可及的に少なくするため,計測は同一人が3回行い,その平均値を用いた。

3)メルケル細胞の神経支配とニューロフィラメント蛋白発現の解析

未固定で凍結保存した試料をクリオスタットにて10 μ mの連続切片とし,スライドガラスに貼付後4%PFAを用いて4 $^{\circ}$ C30分固定した。PBSで洗浄後,数枚置きに1枚の割合で選択したスライドガラスをH-E染色に供し,炎症度の判定を行った。炎症度「弱」および「強」と判定された切片に隣接する切片について,抗CK20抗体と抗ニューロフィラメント(NF)抗体による二重標識蛍光抗体法を施行した。切片は20倍に希釈した抗CK20抗体と4 $^{\circ}$ C1晩反応させ,PBSで洗浄後,Molecular Probes社(USA)製AlexaTM488標識抗マウスIgGを用いて37 $^{\circ}$ C90分反応させた。PBSにて洗浄した後,1000倍に希釈したAffiniti社(U.K.)製ウサギポリクロナール抗NF-M抗体または抗NF-H抗体を用いて,4 $^{\circ}$ C1晩反応させた。その後,切片はPBSにて洗浄し,Molecular Probes社(USA)製AlexaTM594標識抗ウサギIgGを用いて37 $^{\circ}$ C90分反応させた。反応後,PBSにて洗浄し親水性樹脂を用いて封入した。観察には紫外線蛍光顕微鏡(Olympus BX51),および共焦点レーザー走査顕微鏡(Zeiss LSM510-V3.0)を用いた。

この解析の途上,一部のメルケル細胞がNF抗体に陽性を示すのが認められたため,反応の真偽を確認するため,一部の隣接切片を抗CK20と抗NF-Mまたは抗NF-H抗体により単独染色した。結果的に偽陽性ではないことが確認されたので,神経支配の観察のために二重染色された全切片を用いて,蛍光顕微鏡下で類円形,異型,異所性の各メルケル細胞の数を計測し,その中に占めるNF陽性細胞の比率を算定した。

4)電子顕微鏡観察

エボン包埋標本から厚切り切片を作製し,トルイジンブルー染色を施して炎症度の低い粘膜部位を含む試料を選別して超薄切片を作製した。切片は酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色を施した後,透過型電子顕微鏡(Hitachi-H7100)で観察した。

結 果

1)メルケル細胞の分布と形態

全ての切片においてメルケル細胞は抗CK20抗体に陽性を示し,外縁上皮に限局して分布していた。

顕微鏡的に炎症度「弱」と判定された切片では20個/100 μ m²以下の円形細胞を含み,炎症度「強」と判定された切片では90個/100 μ m²以上の円形細胞を含んでおり,t検定の結果,この両者の間には統計学的有意差が認められた。それらの中間の円形細胞を含むものを炎症度「中」とした。メルケル細胞は炎症度「弱」の切片には豊富に観察されたが,炎症度「強」の切片では極めて少なかった(Fig. 1 a, b)。炎症度「弱」の歯肉部位では,メルケル細胞の大半は上皮稜先端部の基底層または基底層上層に集合的に分布したが,少数の細胞は有棘層やそれより表層にも散在性に分布していた(Fig. 1 a)。一方,メルケル細胞の外形には球形や楕円形で外形の平滑なものから紡錘形や多角体形で外形の不規則なものまで,様々な形状のものが認められた(Fig. 1 a, c)。これらの現象が8 μ mという切片によって同一形態の細胞が様々な部位で切断された結果でないことを凍結切片の共焦点顕微鏡像でも確認した。

炎症が不均一な患者においては,炎症度「弱」部におけるメルケル細胞密度は $2.34 \pm 0.39 \sim 5.23 \pm 0.98/\text{mm}$,炎症度「強」部では $0.32 \pm 0.12 \sim 1.02 \pm 0.33/\text{mm}$ となり,個体差は大きいものの,両部位間には明らかな有意差が認められた(Fig. 2)。一方,これら2つの領域に含まれる異型と異所性のメルケル細胞の密度の比較では,異型の細胞についてはいずれも,また異所

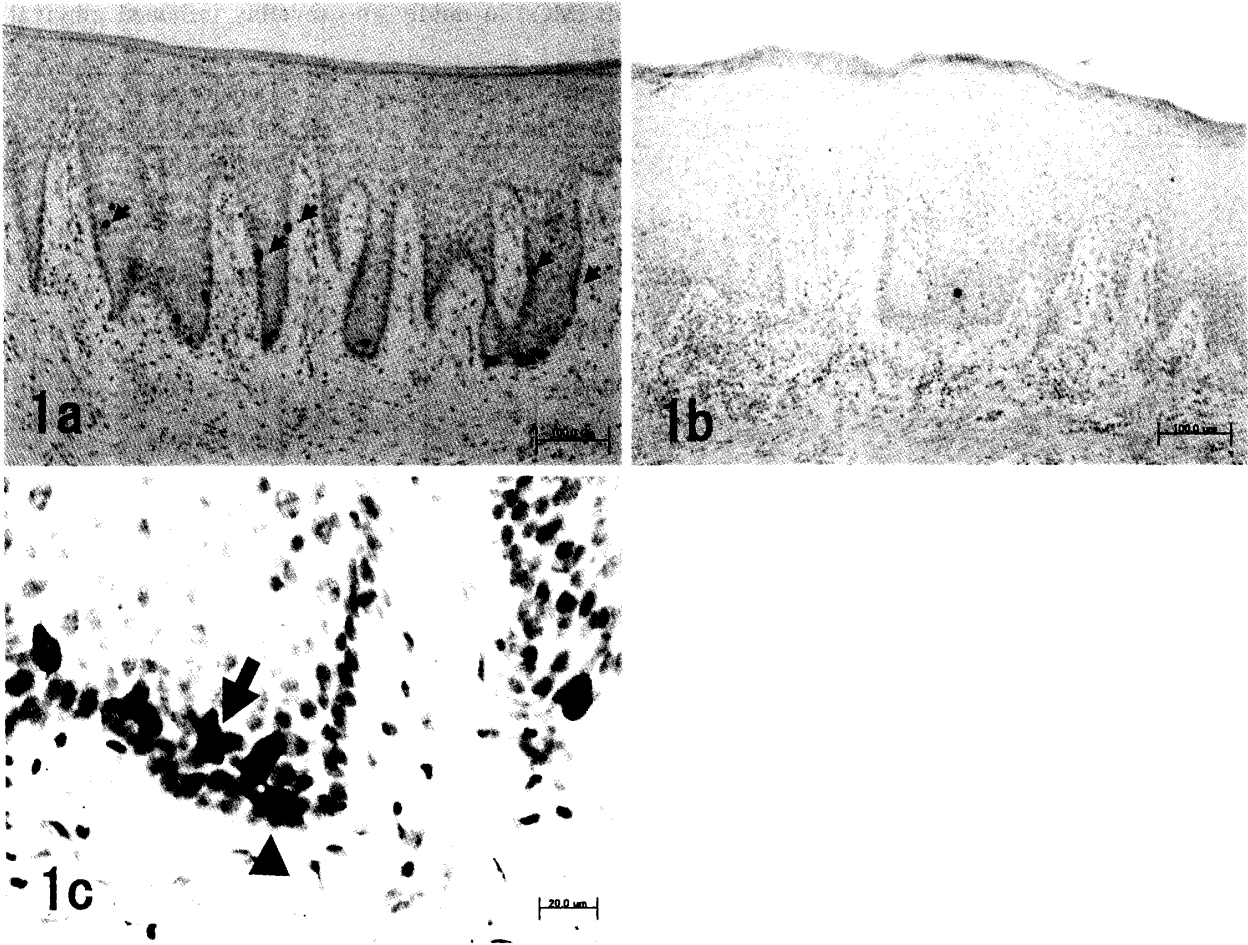


Fig. 1. Merkel cells in gingival areas with different severities of inflammation stained with anti cytokeratin 20 antibody.

In (1 a), which shows an area in which there is mild infiltration of inflammatory cells, many Merkel cells can be seen in epithelial ridges. Note that some cells reside in ectopic areas (arrows) but not in the tips of epithelial ridges. In (1 b), which shows an area with severe inflammation, partial destruction of epithelial ridges and only one Merkel cell can be seen. (1 c) shows an enlargement of epithelial ridges of a mildly inflamed area. Note that Merkel cells show various external figures from typical oval shapes to atypical shapes, including polygonal shape (arrow) and stellate shape (arrowhead).

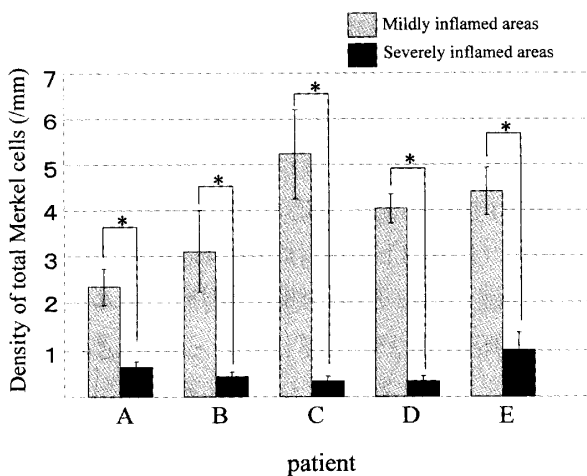


Fig. 2. Comparison of Merkel cell densities in mildly and severely inflamed areas of five patients' gingivae.

Patient A : 51 years old, male, lower molar area. Patient B : 55 years old, female, upper incisor area. Patient C : 58 years old, female, lower molar area. Patient D : 45 years old, male, upper molar and incisor areas. Patient E : 49 years old, male, upper molar and lower molar areas. Asterisks indicate that the difference is statistically significant ($p < 0.05$).

Table 1. Densities of atypical and ectopic Merkel cells (MCs) in mildly and severely inflamed gingival areas compared among patients shown in Fig.2.

| Patient | State of inflammation | Density of dendritic Merkel cells | Density of ectopic Merkel cells |
|---------|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| A | mild | 1.12 ± 0.26 | 0.02 ± 0.015 |
| | severe | 0.36 ± 0.09 | |
| B | mild | 2.22 ± 0.64 | 0.12 ± 0.07 |
| | severe | 0.26 ± 0.06 | |
| C | mild | 3.26 ± 0.69 | 0.11 ± 0.05 |
| | severe | 0.25 ± 0.09 | |
| D | mild | 2.27 ± 0.22 | 0.39 ± 0.12 |
| | severe | 0.21 ± 0.11 | |
| E | mild | 2.51 ± 0.31 | 0.18 ± 0.04 |
| | severe | 0.53 ± 0.19 | |

Asterisks show that the difference is statistically significant ($p < 0.05$).

Table 2. Density of Merkel cells in patients with different severity of inflammation.

| Patient | Age | Sex | Area | State of inflammation | Density of Merkel cells (/mm) |
|---------|-----|-----|-------|-----------------------|-------------------------------|
| a | 61 | f | UI | mild | 5.35 ± 0.85 |
| b | 54 | f | UM,LM | mild | 4.83 ± 0.56 |
| c | 51 | F | UI | intermediate | 4.68 ± 0.73 |
| d | 54 | f | UM | intermediate | 2.28 ± 0.44 |
| e | 46 | m | LI | severe | 0.41 ± 0.10 |
| f | 46 | f | UI | severe | 0.38 ± 0.17 |
| g | 53 | f | UM | severe | 0.74 ± 0.13 |

*UI : upper incisor area, UM : upper molar area, LI : lower incisor area, LM : lower molar area.

性の細胞については5例中2例において炎症度「弱」領域の上皮が炎症度「強」領域よりも有意に高い細胞密度を示した (Table 1)。しかし、それぞれの領域における全メルケル細胞中のこれらの細胞の存在比率には炎症度間での有意差が認められなかった (Table 1)。

炎症が均一な患者においては、炎症度「弱」の歯肉では「強」の歯肉に比べてメルケル細胞数が著しく多かったが、炎症度「中」の歯肉と炎症度「弱」の歯肉の間には大きな相違は認められなかった (Table 2)。

2) メルケル細胞の神経支配とニューロフィラメント蛋白の発現

炎症度「弱」の領域では、上皮中にCK20陽性を示すメルケル細胞が多数観察され (Fig. 3 a), 粘膜固有層浅層には多数の抗NF-Mや抗NF-H抗体に陽性反応を示す神経線維が観察された (Fig. 3 b)。これらの神経の末梢部が上皮内に侵入し、その一部が類円形のメルケル細胞に近接または密に接している像も認められた (Fig. 3 c)。異型のメルケル細胞の付近にも時折神経線維の断端が観察され、両者が近接する像も認められた。顆粒層や有棘層に存在する異所性のメルケル細胞の周囲には神経線維は全く

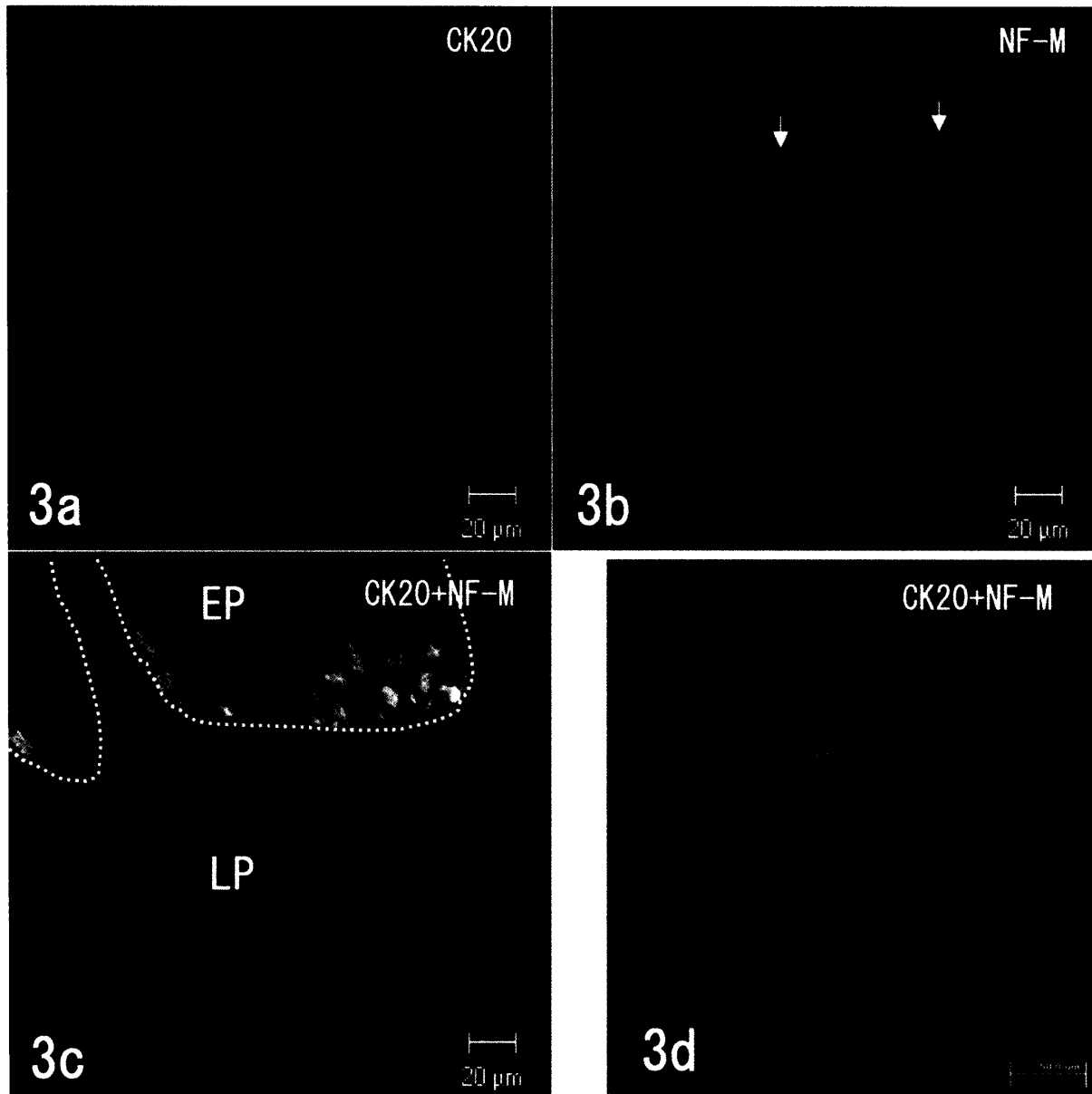


Fig. 3. Immunofluorescence histochemical image of human gingival mucosa dually stained with antibodies to cytokeratin 20 (green color) and neurofilament-M (red color). (3 a-3 c) show single track (3 a,3b) and multi track (3 c) confocal laser scanning images of a mildly inflamed gingival area. Merkel cells (green) show various shapes, and only a small number of Merkel cells are in contact with nerve fiber terminals. Note that not all but many Merkel cells show a positive immunoreactivity of NF-M (3 b, arrows). (3 d) shows a merged fluorescence image of a severely inflamed gingival area. No nerve fibers can be seen in the epithelium and subepithelial connective tissue. EP, epithelium; LP, lamina propria.

Table 3. Rate of NF-M- and NF-H-positive Merkel cells in mildly inflamed human gingival mucosa.

| | NF-M/CK20 | | | NF-H/CK20 | | |
|-------|-----------|---------|-------|-----------|--------|-------|
| | RMC | DMC | EMC | RMC | DMC | EMC |
| total | 369/727 | 164/991 | 1 /51 | 22/145 | 3 /178 | 0 /11 |
| % | 50.8 | 16.5 | 1.9 | 15.2 | 1.7 | 0 |

※RMC : roundish Merkel cell, DMC: dendritic Merkel cell, EMC : ectopic Merkel cell.

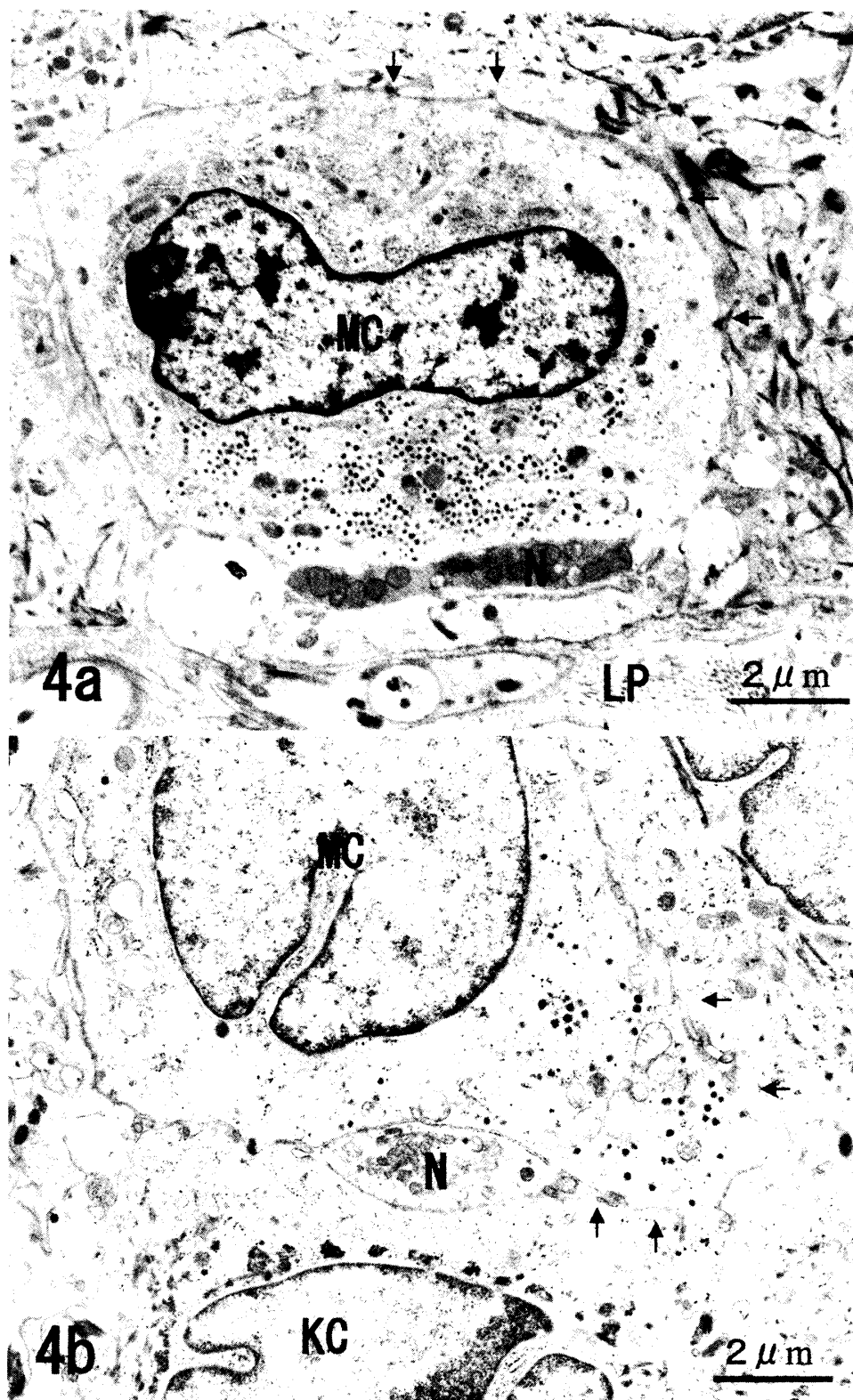


Fig. 4. Electron micrographs of Merkel cells (MC) depicted from specimens of mildly inflamed gingival mucosa.

(4 a) shows a typical oval-shaped MC having a synaptic contact with a mitochondria-rich nerve terminal (N). Short desmosomes (arrows) are seen between the MC and neighboring keratinocytes. LP: lamina propria. (4 b) shows an atypical MC with an irregular external figure. Note that although this MC is in contact with a small nerve terminal (N), Merkel cell granules have accumulated in a thick cytoplasmic process demarcated with arrows. KC: keratinocyte.

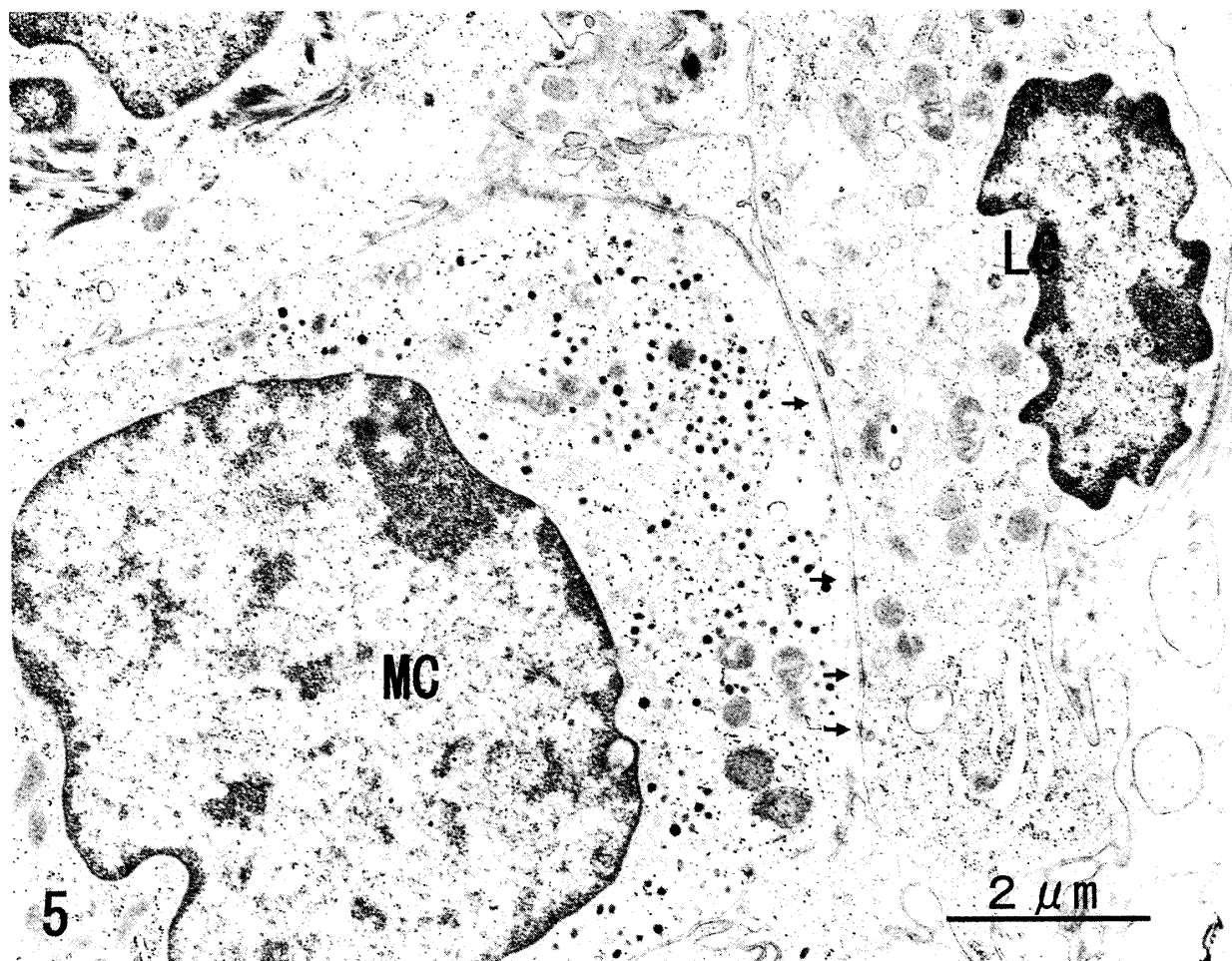


Fig. 5. Electron micrograph showing contact between a Merkel cell (MC) and a Langerhans cell (LC). The MC is devoid of synaptic contact with a nerve terminal but widely abuts on a Langerhans cell. Many focal contact-like membrane thickenings can be seen between these two cells (arrows).

認められなかった。これに対し、炎症度「強」の領域では、固有層深層には神経線維束が観察されたものの、上皮直下にまで達する線維はほとんど観察されなかった (Fig. 3 d)。この領域に僅かに観察されたメルケル細胞と神経線維の間には全く接触像を観察することができなかった。

一方、炎症の度合いには関わりなく、メルケル細胞の一部が抗 NF-M および抗 NF-H 抗体に陽性反応を示すのが観察された (Fig. 3 b 矢印, c)。抗 NF-M 抗体の場合の NF 陽性細胞の占める割合は 30.2%，抗 NF-H 抗体の場合の NF 陽性細胞の割合は 7.5% であった (Table 3)。

3) メルケル細胞の微細構造と免疫系細胞との接触

歯肉口腔上皮の上皮突起先端部の基底層および基底層上層に存在する類円形のメルケル細胞の一部の切片にはミトコンドリアに富む知覚神経終末の接合が認められた (Fig. 4 a)。このような細胞では、神経と接合する側の細胞質にメルケル細胞顆粒の集積を認めた (Fig. 4 a)。また、メルケル細胞とケラチノサイトとの間にデスモソーム結合が観察された (Fig. 4 a, 矢印)。

基底層上層には外形の不規則なメルケル細胞も多く分布していた。これらの細胞の切片には神経との接合が認められないものが多かったが、少数例において神経と狭い範囲で接している像が認められた (Fig. 4 b)。このような細胞

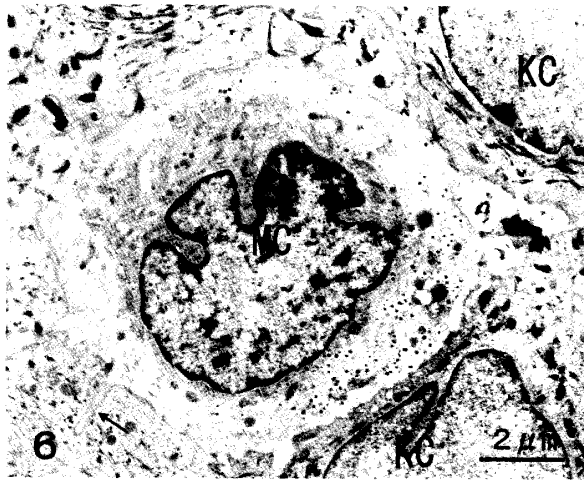


Fig. 6. Electron micrograph of an ectopic Merkel cell (MC).
The MC was located from in the spinous cell layer. Note the round shape of the MC and the presence of Merkel cell granules throughout the cytoplasm. The arrow shows a finger-like projection.

では、神経終末側の細胞質にわずかなメルケル細胞顆粒を認めたが、顆粒はむしろ太い細胞質突起内に多く集積していた (Fig. 4 b, 矢印)。これらの異型細胞でもケラチノサイトとの間には明瞭なデスモソーム結合が認められた (Fig. 4 b)。基底層上層に分布するメルケル細胞の中には、上皮内に侵入したリンパ球やランゲルハンス細胞と一部で接しているものが観察された。その中で、一例ではあるがランゲルハンス細胞とメルケル細胞が広い範囲で接触し、両者の間に focal contact 様の膜の肥厚部が多数形成されている像が観察された (Fig. 5, 矢印)。このメルケル細胞においてはメルケル細胞顆粒がランゲルハンス細胞との接触する側の細胞層に集積していた (Fig. 5)。

有棘層や顆粒層などに異所性に存在するメルケル細胞の断面はいずれも球ないし類円形の外形を呈し (Fig. 6), 一部の細胞には指状の細胞質突起が認められた (Fig. 6 矢印)。これらの細胞の核には変性の兆しは認められず、細胞質は明るく細胞内小器官の変性像も認められなかったが、基底層に存在する同様の細胞とは異なり、メルケル細胞顆粒は細胞質全体に分散して分布する傾向を示した (Fig. 6)。なお、上皮

の全層を通じて、メルケル細胞のアポトーシス像には遭遇しなかった。

考 察

歯肉は咀嚼粘膜に属し、機械的刺激に晒されやすい部位であるため、遅順応性機械受容器の構成要素であるメルケル細胞が多く含まれることは理に適った現象と受け止められてきた⁷⁾。しかし、歯肉を含むヒトの口腔粘膜には神経との関係が希薄なメルケル細胞が含まれることが Ramieri ら¹⁰⁾や Hillinges ら¹¹⁾によって示され、また Tachibana ら¹²⁾は、齧歯類の口蓋粘膜ではメルケル細胞に多形性があり、不規則な外形を示すメルケル細胞は知覚神経との関係が希薄であることを報告した。その後 Tachibana ら¹³⁾はメルケル細胞の多形性はヒトの口蓋や歯肉の粘膜にもみられ、僅かに炎症性細胞浸潤のみられる粘膜では正常な粘膜より多形性が高いことから、不整形なメルケル細胞と炎症の間に何らかの因果関係がある可能性を示唆した。

本研究では、メルケル細胞と炎症の関係を調べる目的で、歯周炎という形で炎症を起こしたヒトの歯肉を用いて、炎症の度合いの異なる領域間におけるメルケル細胞の密度や細胞形態を比較解析した。その結果、同一患者における炎症度の異なる領域の比較でも、炎症度の異なる患者間での比較でも、メルケル細胞密度は粘膜固有層に炎症性細胞の浸潤が少ない領域では高く、炎症性細胞浸潤の多い領域では低いという結果が得られた。従ってメルケル細胞の密度の相違は個体差の反映ではなく、明らかに炎症性細胞浸潤の多寡に関係していると思われる。一方、本研究の結果はメルケル細胞の多形性と炎症の強弱の間には相関性がないことを示唆した。歯肉の病変とメルケル細胞の関係についての報告は少なく、古くは Wilgram¹⁵⁾がアフタ性潰瘍への関与を、新しくは井上ら¹⁶⁾がメルケル細胞癌への関与を示唆しているが、炎症とメルケル細胞の関係について詳しい解析を行った例は国内外を通じて本研究が初めてであると考えられる。

本研究において、炎症度の強い歯肉部位と弱い歯肉部位におけるメルケル細胞密度に大きな相違がみられたことは興味深い。メルケル細胞は上皮系細胞であり、デスモソームによって周辺のケラチノサイトと結合しているため、炎症度の強い領域から弱い領域への細胞遊走が起こることは考えにくい。今回の観察では、炎症度のいかにかわからず、通常はメルケル細胞が分布しない有棘層や顆粒層に分布するメルケル細胞が観察されたが、そのような異所性メルケル細胞は特に炎症度の弱い領域に多かった。一方、炎症の強い領域では弱い領域に比べてNF抗体に陽性を示す神経線維の分布が極めて少なかった。Tachibanaら¹⁷⁾は、実験的にオトガイ神経を切除したウサギの口唇粘膜では一部のメルケル細胞が表層に移動して上皮から脱落することを報告している。一般に知覚神経終末と接合しているメルケル細胞は球ないし卵円形を呈する¹²⁾が、今回ヒト歯肉で観察された異所性のメルケル細胞はいずれも球または卵円形を呈していた。以上の点を考え合わせると、炎症の存在によって歯肉に分布していた神経終末に退縮が生じ、接続神経を失ったメルケル細胞が周辺ケラチノサイトとともに表層移動することによって失われた結果、炎症度の強い領域では極端に細胞密度が減少したのではないかと推測される。

しかしながら、今回の観察では炎症の強い領域の上皮には異型のメルケル細胞の絶対数も炎症の弱い領域より著しく少なかった。このことは、炎症の激化に伴って神経支配を受けていない異型のメルケル細胞もまた上皮から失われることを示している。最近、Halataら¹⁸⁾はNT-3遺伝子の欠如マウスでは出生後間もなくメルケル細胞の大半がアポトーシスによって失われることを報告している。今回の観察では粘膜固有層内には抗CK20抗体に陽性を示す細胞は観察されていないので、メルケル細胞が結合組織側に落下することは考えにくく、異型の細胞の外形が類円形に変化して表層に移動するか、またはアポトーシスにより消失する可能性を考

れなければならない。われわれの今回の電顕観察ではメルケル細胞のアポトーシス像は確認されていないが、今後実験的炎症の時間的経過の中で、異型のメルケル細胞がどのようにして上皮から脱落するかを観察する必要があると思われる。

近年、歯肉の炎症が神経原性に引き起こされる場合があることが知られ¹⁹⁾、このような場合には、炎症に先立ってサブスタンスP含有神経の分布が増加することが、ラットの実験的歯肉炎²⁰⁾やダウン症患者の炎症性歯肉²¹⁾によって報告されている。本研究では、神経線維の分布は炎症の弱い領域では多く、強い領域では少なかった。もしも我々が観察した炎症の弱い部位が炎症の初期段階を示しているとするれば、密度の高い神経線維は炎症の開始との関わりを示しているかも知れない。その場合、メルケル細胞もまた炎症の開始に関わっている可能性を否定できない。なぜならば、動物のメルケル細胞にはサブスタンスPの局在が免疫組織化学的に証明されている²²⁾からである。

しかしながら、今回我々が観察した炎症の弱い領域は炎症が鎮静化しつつある場所である可能性が高い。なぜならば、我々が使用した歯肉標本は、歯周基本治療を行った後に歯周治療の効果を上げる目的で行った歯周外科療法の一環として切除したものであり、歯肉全体としては炎症が消退している時期のものだからである。もしもこれらの部位が炎症の鎮静期を示しているとするれば、この領域にみられた多数の末梢神経とメルケル細胞は、再生による神経終末の再侵入とメルケル細胞の再生を示す可能性が高い。今回炎症の弱い領域には異型のメルケル細胞が極めて多く観察された。胎生期の表皮や皮膚付属器に出現するメルケル細胞は不整な外形を呈し、これらは知覚神経が到達する以前に出現するため、神経の誘導や上皮細胞の分化に関与すると考えられている²³⁾。歯肉の炎症が終息に向かうにつれてメルケル細胞が再生し、知覚神経終末の再生や上皮の修復に寄与するという可能性は十分に考えられることである。

一方、炎症が弱まった歯肉において再生され

たメルケル細胞のうち、神経と接合しなかったメルケル細胞が異型細胞となり、ランゲルハンス細胞の活動抑制を介して炎症の終息に寄与する可能性も考えられる。歯肉上皮には抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞が多数含まれており、最近 Kodali ら²³⁾はこれらの活性がカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) や血管作動性腸管由来ペプチド (VIP) によって抑制されることを報告しているが、動物のメルケル細胞もこれらのペプチドを含有するとされる²⁴⁻²⁵⁾。また毛胞の bulge 部ではメルケル細胞とランゲルハンス細胞が頻りに接触している像がみられる²⁶⁾。本研究では、1例ではあるがメルケル細胞とランゲルハンス細胞が広範囲で接触し、接触部に focal contact 様の膜肥厚を形成している電顕像が観察された。これまでにこのような像の報告は筆者らの渉猟する限り初めてであるが、メルケル細胞と免疫系との関連の可能性を強く示唆する事例として興味深い。今後、両細胞の接触頻度をより詳細に検討するとともに、ヒト歯肉のメルケル細胞が実際に CGRP や VIP を含むか否かを免疫組織化学的に検討することが必要であると思われる。

本研究において、歯肉における CK20陽性細胞の一部は抗 NF-H および NF-M 抗体にも陽性を示した。抗 NF-H および NF-M 抗体はそれぞれ NF の 200KD と 150KD サブユニット分子に対する抗体である。従来、ヒト胎児²⁷⁾、ウサギ²⁸⁾、およびマウス²⁹⁾のメルケル細胞は NF 蛋白を発現していないことが免疫組織化学的に示されてきたが、Narisawa ら³⁰⁾は成人皮膚のメルケル細胞の約5.9%が200KD NF 分子の抗体に陽性反応を示したと報告している。本研究では、200KD 蛋白抗体に陽性を示す細胞は類円形、異型を平均すると約7.5%となり、Narisawa ら³⁰⁾の皮膚の結果に類似している。一方、Moll ら²⁷⁾や Narisawa ら³⁰⁾はヒトの皮膚には160KD NF 蛋白を発現するメルケル細胞は存在しなかったとしているが、この蛋白サブユニットに相同な150KD 蛋白に対する抗体である抗 NF-M 抗体には今回平均で30%、類円形

細胞では50%ものメルケル細胞が陽性反応を示した。従来の研究者達が用いてきた抗体と我々が用いた抗体はそれぞれ異なるエピトープを認識しているためにこのような矛盾した結果が生じている可能性もあるが、用いている組織の相違による可能性も考えられる。今回の研究では、メルケル細胞における NF の発現率と炎症の強弱の関連は認められなかったが、類円形の細胞に比べて異型の細胞における NF 発現が著しく低かった。このことはメルケル細胞が NF 蛋白を発現するには、知覚神経との接続が必要である可能性を示唆しており、今後この点についての検討も必要であると考えられる。

結 語

本研究では、歯周炎罹患患者の歯肉を材料としてメルケル細胞の密度や細胞形態を調べ、1) 歯肉上皮のメルケル細胞密度は炎症の激化に伴って激減すること、2) メルケル細胞の多形性と粘膜の炎症の度合いとは相関していないことを明らかにした。また、3) メルケル細胞のみならず、上皮内神経終末も炎症によって激減すること、4) メルケル細胞の一部は NF 蛋白を発現すること、5) メルケル細胞とリンパ球やランゲルハンス細胞の間には明確な細胞接触があることも明らかにした。これらの結果から、メルケル細胞が炎症の進行に直接的に関与する可能性は低いが、炎症の開始または鎮静化には何らかの寄与をする可能性があることが推測された。本研究は患者の組織を使用しているため、炎症の時間的経過を追った詳細な解析はできなかったので、今後動物を用いて口腔粘膜に実験的炎症を創出し、時間的経過を踏まえた解析を行う必要があるものと考えている。

謝辞：稿を終えるにあたり、本研究に際し終始ご懇篤なる指導と校閲を賜りました歯科保存学第二講座の國松和司教授ならびに口腔解剖学第二講座の名和橙黄雄教授に深甚なる謝意を表します。また、材料入手に際し数々のご助言およびご協力をいただきました歯科保存学第二講座

の八重柏隆講師に心から感謝の意を表します。さらに、多くのご支援をいただきました口腔解剖学第二講座各位ならびに歯科保存学第二講座教室員各位に心より感謝いたします。最後に本研究に快くご協力いただきました患者各位に厚くお礼申し上げます。

本研究の要旨は、第46回歯科基礎医学会学術大会（2004年9月25日、広島）、および第47回秋季日本歯周病学会学術大会（2004年10月16日、仙台）において発表した。

なお、本研究の一部は文部科学省私立大学オープンリサーチセンター整備事業による研究助成により行われた。

文 献

- 1) Merkel, F.: Tastzellen und Tastkörperchen bei den Haustieren und beim Menschen. *Arch. Mikrosk. Anat.* 11 : 636-652, 1875.
- 2) Tachibana, T.: The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. *Arch. Histol. Cytol.* 58 : 379-396, 1995.
- 3) Iggo, A., Muir, A.R.: The structure and function of a slowly adapting touch corpuscle in hairy skin. *J. Physiol.* 200 : 763-796, 1969.
- 4) Ogawa, H.: The Merkel cell as a possible mechanoreceptor cell. *Prog. Neurobiol.* 49 : 317-334, 1996.
- 5) Nikai, H., Rose, G.G., Cattoni, M.: Merkel cell in human and rat gingiva. *Arch. Oral Biol.* 16 : 835-843, 1971.
- 6) Baptista, M.J.L., Tamayo, J.G.: Fine anatomy of neurosecretory cells in the human gingiva. *Oral Surg.* 38 : 928-933, 1974.
- 7) Turner, D.F.: The morphology and distribution of Merkel cells in primate gingival mucosa. *Anat. Rec.* 205 : 197-205, 1983.
- 8) Tazaki, M., Saito, T., Sakada, S.: Merkel cell-neurite complexes in the gingival and alveolar mucosa of cats. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 29 : 77-79, 1988.
- 9) Tazaki, M., Sakada, S.: Merkel cell and Merkel cell-neurite complexes in the gingival and alveolar mucosa of the newborn kittens. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 30 : 21-24, 1989.
- 10) Ramieri, G., Panzica, G., Panzica, C.V., Modica, R., Springall, R., Polak, J.M.: Non-innervated Merkel cells and Merkel -neurite complexes in human oral mucosa revealed using antiserum to protein gene product 9.5. *Arch. Oral Biol.* 37 : 263-269, 1992.
- 11) Hillinges, M., Astbäck, J., Wang, L., Arvidson, K., Johansson, O.: Protein gene product 9.5-immunoreactive nerve and cells in human oral mucosa. *Anat. Rec.* 245 : 621-632, 1996.
- 12) Tachibana, T., Yamamoto, H., Takahashi, N., Kamegai, T., Shibana, S., Iseki, H., Nawa, T.: Polymorphism of Merkel cells in the rodent palatine mucosa: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Arch. Histol. Cytol.* 60 : 379-389, 1997.
- 13) Tachibana, T., Kamegai, T., Takahashi, N., Nawa, T.: Evidence for polymorphism of Merkel cells in the adult human oral mucosa. *Arch. Histol. Cytol.* 61 : 115-124, 1998.
- 14) Moll, R., Franke, W.W., Schiller, L.: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31 : 11-24, 1992.
- 15) Wilgram, G.F.: A possible role of Merkel cell in aphthous stomatitis. *Oral Surg.* 34 : 231-238, 1972.
- 16) 井上 孝, 田崎雅和, 下野正基: 口腔粘膜病変とメルケル細胞に関する免疫組織化学的研究, 歯基礎医学会誌 41 : 108-112, 1999.
- 17) Tachibana, T., Sakakura, Y., Ishizeki, K., Iida, S., Nawa, T.: Migration of Merkel cells in the labial mucosa epithelium of adult rabbits following mental nerve resection. *Cell. Tissue. Res.* 223 : 659-664, 1982.
- 18) Halata, Z., Kucera, J., Kusera, T., Grim, M.: Apoptosis of Merkel cells in neurotrophin-3 null mice. *Anat. Embryol.* 209 : 335-340, 2005.
- 19) Fazekas, A., Vindisch, K., Pösch, E., Györfi, A.: Experimentally-induced neurogenic inflammation in the rat oral mucosa. *J. Periodontol. Res.* 25 : 276-282, 1990.
- 20) Györfi, A., Fazekas, A., Irmes, F., Jakab, G., Suto, T., Rosivall, L.: Role of substance P(SP) in development of symptoms of neurogenic inflammation in oral mucosa of the rat. *J. Periodontol. Res.* 28 : 191-196, 1993.
- 21) Agholme, M.B., Modeer, T., Luthman, J.: Immunohistological study of neuronal markers in inflamed gingiva obtained from children with Down's syndrome. *J. Clin. Periodontol.* 18 : 624-633, 1991.
- 22) Gauweiler, B., Weihe, E., Hartschuh, W., Yanai-hara, N.: Presence and coexistence of chromogranin A and multiple neuropeptides in Merkel cells of mammalian oral mucosa. *Neurosci. Lett.* 89 : 121-126, 1988.
- 23) Kodali, S., Ding, W., Huang, J., Seiffert, K., Wagner, J.A., Granstein, R.D.: Vasoactive intestinal peptid modulates Langerhans cell immune function. *J. Immunol.* 173 : 6082-6088, 2004.
- 24) Hartschuh, W., Weihe, E., Yanai-hara, N., Reinecke, M.: Immunohistochemical localization of

- vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in Merkel cells of various mammals: evidence for a neuromodulator function of the Merkel cell. *J. Investig. Dermatol.* 81 : 361-364, 1983.
- 25) Caballero, T.G., Gallego, R., Roson, E., Fraga, M., Beiras, A.: Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the neuroendocrine Merkel cells and nerve fibres of pig and human skin. *Histochemistry* 92 : 127-132, 1989.
- 26) Taira, K., Narisawa, Y., Nakafusa, J., Miyago, N., Tanaka, T.: Spatial relationship between Merkel cells and Langerhans cells in human hair follicles. *J. Dermatol. Sci.* 30 : 195-204, 2002.
- 27) Moll, R., Moll, I., Franke, W.W.: Identification of Merkel cells in human skin by specific cytokeratin antibodies: changes of cell density and distribution in fetal and adult plantar epidermis. *Differentiation* 28 : 136-154, 1984.
- 28) Saurat, J.H., Merot, Y., Didierjean, L., Dahl, D.: Normal rabbit Merkel cells do not express neurofilament proteins. *J. Investig. Dermatol.* 82 : 641-642, 1984.
- 29) Pasche, F., Merot, Y., Carraux, P., Saurat, J.H.: Relationship between Merkel cells and nerve endings during embryogenesis in the mouse epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 95 : 247-251, 1990.
- 30) Narisawa, Y., Hashimoto, K., Kohda, H.: Immunohistochemical demonstration of the expression of neurofilament proteins in Merkel cells. *Acta Derm. Venereol.* 74 : 441-443, 1994.