

研 究

口腔白板症上皮細胞におけるマイコプラズマ感染
—抗マイコプラズマ・ウサギポリクローナル抗体を用いた
蛍光免疫組織化学による検討—

長澤 大

岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任：水城 春美 教授)

(受付：2007年12月14日)

(受理：2008年1月4日)

Abstract : The etiology of oral leukoplakia has not been elucidated. A previous study using in situ staining with a DNA-binding fluorescent dye (Hoechst 33258) demonstrated numerous small granular structures in the cytoplasm of the epithelial cells in leukoplakia, suggesting that microorganisms were present. Furthermore, it was speculated that the microorganisms in the epithelial cells were oral mycoplasma. In this study, to examine intracellular infection by mycoplasma in epithelial cells with leukoplakia, fluorescent immunohistochemistry was performed using anti-mycoplasma rabbit polyclonal antibodies. Thirty-one formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of leukoplakia without epithelial dysplasia and 19 epithelial dysplasia specimens were examined. Normal appearing mucosa specimens were used as controls. In all specimens of leukoplakia without epithelial dysplasia, numerous small granular fluorescing structures were observed within the cytoplasm of epithelial cells. In 10 of 19 (52.3%) specimens with epithelial dysplasia, fluorescing structures were observed, but were not observed in the remaining 9 specimens. In normal-appearing mucosa specimens, a few or no fluorescing structures were observed. These findings strongly suggest that mycoplasma infection is related to hyperkeratosis of oral mucosa. However, the relation between mycoplasma infection and epithelial dysplasia could not be clarified.

Key words : oral leukoplakia, hyperkeratosis, fluorescent immunohistochemistry, oral mycoplasma, intracellular infection

Mycoplasma infection in the epithelial cells of oral leukoplakia: detection by fluorescent immunohistochemistry using anti-mycoplasma rabbit polyclonal antibody

Dai NAGASAWA

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University

(Chief : Prof. Harumi MIZUKI)

School of Dentistry, Iwate Medical University

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

緒 言

口腔白板症は、白色を呈する口腔粘膜の角化性病変のひとつで、通常擦っても容易に剥離しない白斑として認められ、1997年、WHOにより「他の診断可能ないかなる病変にも特徴づけられない口腔粘膜の主に白色を呈する病変」と定義されている¹⁾。その組織学的所見は、上皮の過形成で、上皮性異形成を伴う場合と、伴わない場合とがある²⁾。また、白板症は紅板症、リバーススモーク関連口蓋角化症とともに口腔前癌病変の1つとしてあげられており¹⁾、その癌化率は0.13~17.5%といわれている²⁾。

以上のように口腔白板症は臨床的に重要な疾患であるが、その病因あるいは発症機転は未だ解明されていない。従来より、主に喫煙が重要な因子として考えられているが^{3,4)}、白板症は非喫煙者にもしばしば認められる。また、かみタバコ (betel nut) の習慣がある地域では、それが白板症の発症と強く関連していると言われている⁴⁾。他の病因としてアルコール、機械的刺激、エストロゲンの欠乏、アレルギー、ビタミンAの欠乏、高コレステロール血症などがあげられている³⁾。さらに、微生物の感染も発症原因にあげられ、なかでもヒト乳頭腫ウイルス (HPV) の感染が白板症の発症要因として注目され、免疫組織化学や polymerase chain reaction (PCR), in situ hybridization によって白板症において HPV が検出されている⁵⁻¹¹⁾。しかし、その検出頻度は様々であり³⁾、HPV感染と白板症の発症との関連はまだ明らかでない。

Mizuki¹²⁾ は、DNA 特異的蛍光色素 (Hoechst 33258) を用いた検索により、口腔白板症の上皮細胞の細胞質に微細な蛍光像が観察されたことから、核とは異なる DNA の存在、とくに微生物の存在が示唆され、大きさや寄生性などの点から感染微生物はマイコプラズマと推測されると述べている。

マイコプラズマは人工培地に発育可能な最小の微生物 (0.2~0.8 μ m) で、細胞壁を持たず、その形状は多形態を示し¹³⁾、ヒト口腔にも常在し

ている。口腔内では、*Mycoplasma salivarium* ならびに *Mycoplasma orale* が優勢で^{14,15)}、歯肉溝やデンタルプラーク、唾液中などから検出されるが^{16,17)}、現在のところ病的意義はないといわれている¹⁸⁾。

そこで、口腔白板症の病因の解明を目標として、本研究では口腔白板症におけるマイコプラズマの細胞内感染の有無と局在を明らかにする目的で、口腔白板症組織を材料として、蛍光免疫組織化学により、白板症上皮層におけるマイコプラズマの感染の有無と状態を観察した。

材料および研究方法

1. 材 料

1999年1月から2005年12月までの7年間に岩手医科大学歯学部付属病院 (現歯科医療センター) を受診し、白板症との臨床診断により生検あるいは手術にて切除され、病理組織学的検査で、白板症 (過角化症、過形成あるいは上皮性異形成を含む) と診断された50例を検索に用いた。これら50例のうち男性が23名、女性が27名で、年齢は33歳から87歳 (66.84 \pm 12.66歳) であった (Table 1, 2)。部位別では歯肉が23例、舌が12例、頬粘膜が10例、口蓋が3例、口唇粘膜と口底がそれぞれ1例であった (Table 1, 2)。

対照には、粘液嚢胞などの疾患で切除されたもののうち、健常粘膜を含む19例を用いた。19例のうち男性が13名、女性が6名で、年齢は21歳から79歳 (48.53 \pm 16.81歳) であった (Table 3)。

2. 研究方法

1) 白板症組織の病理組織学的観察

白板症のホルマリン固定パラフィン包埋標本を厚さ4 μ mにて薄切し、脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、上皮性異形成を伴わないものと上皮性異形成を呈するものに組織分類した。さらに、上皮性異形成についてはWHOの診断基準¹⁾に準じ、その程度を軽度、中等度、高度に分類した。この分類は口腔外科医2名と口腔病理医1名によって

Table 1. Examined materials and immunofluorescent results of leukoplakia without epithelial dysplasia.

No.	Age	Sex	Location	Types of keratinization	Immunofluorescence
1	70	M	gingiva	hyperorthokeratosis	++
2	59	F	gingiva	hyperortho-and-parakeratosis	++
3	53	F	gingiva	hyperkeratosis	++
4	73	F	gingiva	hyperparakeratosis	++
5	44	M	gingiva	hyperkeratosis	++
6	71	F	gingiva	hyperkeratosis	++
7	59	F	gingiva	hyperortho-and-parakeratosis	++
8	75	F	gingiva	hyperorthokeratosis	++
9	78	F	gingiva	hyperorthokeratosis, hyperplasia	++
10	79	F	gingiva	hyperortho-and-parakeratosis	++
11	57	F	gingiva	hyperkeratosis	++
12	33	M	gingiva	hyperorthokeratosis	+
13	49	M	gingiva	hyperorthokeratosis	++
14	54	M	gingiva	hyperkeratosis	++
15	75	M	gingiva	hyperkeratosis	+
16	56	F	gingiva	hyperkeratosis	++
17	70	M	gingiva	hyperparakeratosis	+
18	75	F	gingiva	hyperkeratosis	+
19	70	M	cheek	hyperkeratosis	++
20	77	F	cheek	hyperparakeratosis	+
21	48	F	cheek	hyperparakeratosis	++
22	45	M	cheek	hyperortho-and-parakeratosis	++
23	67	M	cheek	hyperkeratosis	++
24	57	M	cheek	hyperkeratosis	++
25	47	F	tongue	hyperkeratosis	++
26	70	M	tongue	hyperkeratosis	++
27	75	M	tongue	hyperkeratosis	++
28	53	M	palate	hyperkeratosis	++
29	51	F	palate	hyperorthokeratosis	+
30	76	M	palate	hyperkeratosis	++
31	58	F	lip	hyperorthokeratosis	+

行った。

対照のホルマリン固定パラフィン包埋標本も同様に HE 染色後、過角化や過形成、上皮性異形成のないことを組織学的に確認した。

2) ポリクローナル抗体の作製

Mycoplasma salivarium の全菌体を抗原としてポリクローナル抗体を作製した。*M. salivarium* (ATCC 23064) を American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。マイコプラズマ基礎培地 (BD, Sparks, MD, USA) 2.1 g を 70 ml の蒸留水に溶解し、121°C、15 分間オートクレーブ滅菌後、30 ml の滅菌蒸留水に溶

解したマイコプラズマ エンリッチメント (BD, Cockeysville, MD, USA) およびペニシリン G50,000 単位を加え、PPLO 培地を作製した。菌を PPLO 培地で 37°C、5 日間培養後、4°C、30 分間 10,000 × g で遠心し、集菌した。その後、0.01M Ca, Mg 不含 Phosphate-Buffered Saline (PBS (-)) 溶液で 2 回洗浄後、0.5%ホルマリン PBS (-) 溶液に懸濁して、4°C で 4 日間処置した。さらに、遠心にて集菌後、PBS (-) 溶液で 2 回洗浄し、タンパク濃度で 1 mg/ml となるように PBS (-) 溶液に浮遊させ、-80°C にて保存した。

Table 2. Examined materials and immunofluorescent results of epithelial dysplasia.

No.	Age	Sex	Location	Degree of dysplasia	Immunofluorescence
1	56	M	tongue	mild dysplasia	++
2	87	M	tongue	mild dysplasia	+
3	82	F	tongue	mild dysplasia	-
4	46	F	tongue	mild dysplasia	-
5	72	F	gingiva	mild dysplasia	++
6	61	F	cheek	mild dysplasia	-
7	73	F	tongue	moderate dysplasia	-
8	60	F	tongue	moderate dysplasia	-
9	54	M	tongue	moderate dysplasia	-
10	74	F	gingiva	moderate dysplasia	+
11	66	F	gingiva	moderate dysplasia	+
12	64	M	gingiva	moderate dysplasia	+
13	78	F	cheek	moderate dysplasia	-
14	87	F	cheek	moderate dysplasia	-
15	69	M	tongue	severe dysplasia	+
16	71	M	tongue	severe dysplasia	+
17	78	M	gingiva	severe dysplasia	++
18	55	M	cheek	severe dysplasia	+
19	85	F	floor	severe dysplasia	-

抗体は、タカラバイオ株式会社（大津，滋賀）に依頼して作製した。日本白色家兎（12週齢，2.8kg）の背部皮下に初回，菌液0.25mlを complete Freund's adjuvant (CFA) に懸濁して注射した。初回免疫から14日目，28日目，42日目の計3回，同量を同様に注射し，追加免疫とした。初回免疫後35日目に部分採血し，ELISA法にて抗体の上昇を認めたため，52日目に全採血を行った。得られた血清を Streamline rProtein A (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, UK) を用いて抗マイコプラズマ抗体を精製した。抗体は1mlずつに分注し， -80°C にて保存した。

3) マイコプラズマ感染 Vero 細胞の作製と免疫組織化学

M. salivarium (ATCC 23064, 23557, 14277, 33130), *Mycoplasma orale* (ATCC 15539, 29802, 23714), *Mycoplasma buccale* (ATCC 23636), *Mycoplasma faucium* (ATCC 25293), *Mycoplasma fermentans* (ATCC 19989) および *Acholeplasma laidlawii* (ATCC 14192) を

ATCC から購入した。また，*Mycoplasma hominis* (GTC 0664) は岐阜大学大学院医学研究科から，Vero 細胞 (JCRB 0111) はヒューマンサイエンス研究資源バンクから分与を受けた。

各菌株を前述の PPLO 培地にて5日間培養した。Vero 細胞を25cm²の培養用フラスコにて5%仔牛血清 (CS) (Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA) 含有の advanced minimal essential medium (advanced MEM) (Invitrogen Corp.) を用いて，CO₂ インキュベータにて37°C，CO₂ 濃度5%の条件下で培養した。培養2日目にそれぞれのマイコプラズマ菌液200μlを各フラスコの Vero 細胞培養液中に添加し，さらに5日間培養した。その後，0.25%トリプシン処理にて細胞を剥離し，1,000rpm，5分間遠心して細胞を採取した。採取した細胞を PBS (-) 溶液に浮遊させ，集細胞遠心装置 (Shandon Cytospin 4, Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA) を用いてサイトスピン標本を作製した。陰性対照として，マイコプラズマを感染させていない Vero 細胞のサ

Table 3. Examined materials and immunofluorescent results of normal mucosa neighboring various lesions.

No.	Age	Sex	Lesions	Immunofluorescence
1	71	M	cavernous hemangioma	+
2	26	M	mucous cyst	-
3	54	M	squamous cell carcinoma	+
4	24	F	ranula	-
5	46	M	calcifying odontogenic cyst	+
6	42	M	irritation fibroma	-
7	79	M	pyogenic granuloma	-
8	67	M	squamous cell carcinoma	+
9	30	F	squamous cell carcinoma	-
10	51	M	pleomorphic adenoma	+
11	45	M	lipoma	+
12	53	M	inflammatory fibrous hyperplasia	-
13	65	F	epithelial dysplasia, moderate	-
14	65	M	fibrous hyperplasia	-
15	57	F	cavernous hemangioma	+
16	42	M	mucous retention in the mucosa	-
17	53	F	fibrous hyperplasia	-
18	21	F	mucous cyst	-
19	31	M	mucous cyst	-

イトスピン標本も同様に作製した。サイトスピン標本は使用するまで -80°C で保存した。Vero細胞におけるマイコプラズマの感染は、Hoechst 33258による染色¹²⁾にて確認した。

マイコプラズマ感染 Vero細胞のサイトスピン標本を、Catalyzed Signal Amplification (CSA) II Biotin-free Tyramide Signal Amplification System (Dako, Carpinteria, CA, USA) を用いて、免疫組織化学的染色を行った。サイトスピン標本を風乾後、中性緩衝ホルマリン水20 (健栄製薬, 大阪) に30分間浸漬し、細胞を固定した。ついで、 0.3M NaCl , 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich Co., St. Lois, MO, USA) 含有 0.05M トリス塩酸緩衝液 ($\text{pH}7.6$) (TBST) で洗浄後、 3% 過酸化水素水にて室温で5分間、内因性パーオキシダーゼのブロッキングを行った。次いで、TBSTにて5分間3回洗浄後、非血清タンパクにより室温で5分間反応させ、非特異タンパクのブロッキングを行った。TBSTによる洗浄は行わずに、作製したウサギポリクローナル抗体 ($2,000$ 倍希釈) を室温

で3時間反応させた。一次抗体の希釈には Tween20含有抗体希釈用緩衝液 (Dako) を用いた。TBSTにて5分間3回洗浄後、パーオキシダーゼ標識二次抗体 CSA II rabbit rink (5 倍希釈, Dako) を用い、室温で1時間反応させた。二次抗体は StabilZyme HRP (SurModics Inc., Eden Prairie, MN, USA) で希釈した。TBSTにて5分間3回洗浄後、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識タイラミド増幅試薬を室温、遮光下にて15分反応させた。TBSTにて5分間3回洗浄後、 0.1M リン酸緩衝液を用いて5倍に希釈した DAPI (Vysis, Downers Grove, IL, USA) にて対比染色し、カバーガラスを載せ、周囲を透明マニキュアで封入した。また、対照として、免疫前に採血した正常ウサギ血清を一次抗体に用い、同様の方法で免疫組織化学的染色を行った。さらに、マイコプラズマ非感染 Vero細胞も同様に染色した。

以上のように蛍光免疫組織化学的染色した標本を共焦点レーザー走査顕微鏡 LSM 510 META (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)

を用いて観察した。

4) 白板症組織の免疫組織化学的染色

パラフィン包埋標本を厚さ $4\mu\text{m}$ に薄切し、MAS コートスライドガラス (松浪硝子, 大阪) に貼付し、脱パラフィン後、アルコール系列にて脱水した。TBST で標本を洗浄後、CSA II システム (Dako) を用いて、マイコプラズマ感染 Vero 細胞における蛍光免疫組織化学と同様の方法で染色した。

なお、陰性対照として、免疫前に採血した正常ウサギ血清を一次抗体に用い、同様の方法で免疫組織化学的染色を行った。また、陽性対照として、マイコプラズマ感染 Vero 細胞のサイトスピン標本を用いた。

レーザー顕微鏡 LSM 510 META (Carl Zeiss) を用い、白板症組織標本と対照の健常粘膜標本における陽性反応の有無、局在について観察した。また、同一切片内の上皮性異形成の部分と健常部分を有する標本、さらに同一切での上皮性異形成の程度の違いによる陽性反応の比較検討も行った。

陽性反応の程度を蛍光像の数や強さによって、蛍光像が中等度～高度の場合を「++」、軽度の場合を「+」、ごくわずかあるいは全く認められない場合を「-」とした。

結 果

1. 白板症の病理組織所見

白板症50例のうち、上皮性異形成を伴わないものは31例、上皮性異形成を呈するものは19例であった。上皮性異形成の程度は、軽度が6例、中等度が8例、高度が5例であった (Table 1, 2)。

2. マイコプラズマ感染 Vero 細胞の免疫組織化学所見

M. salivarium 感染 Vero 細胞の蛍光免疫染色では、Vero 細胞の細胞質に微細な蛍光像が観察された (Fig. 1 a)。一方、対照として行った、一次抗体に正常ウサギ血清を用いたものでは、Vero 細胞の細胞質に蛍光像は観察されなかった (Fig. 1 b)。また、マイコプラズマ非感染 Vero 細胞でも細胞質に蛍光像は観察されなかった。

M. orale, *M. buccale*, *M. faucium*, *M. fermentans*, *M. hominis* および *A. laidlawii* の感染 Vero 細胞すべてにおいても、*M. salivarium* 感染 Vero 細胞と同様に細胞質に微細な蛍光像が観察された。

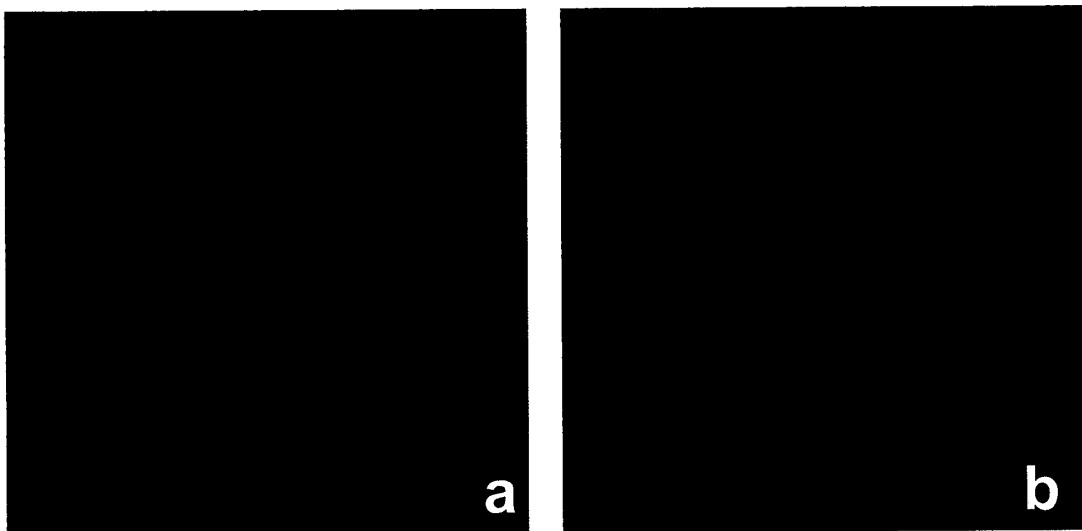


Fig. 1. Fluorescent immunohistochemistry of Mycoplasma-infected Vero cells ($\times 40$). (a) Anti-mycoplasma rabbit polyclonal antibody as primary antibody showing small granular fluorescing structures within the cytoplasm. (b) Normal rabbit serum as primary antibody showing no fluorescence.

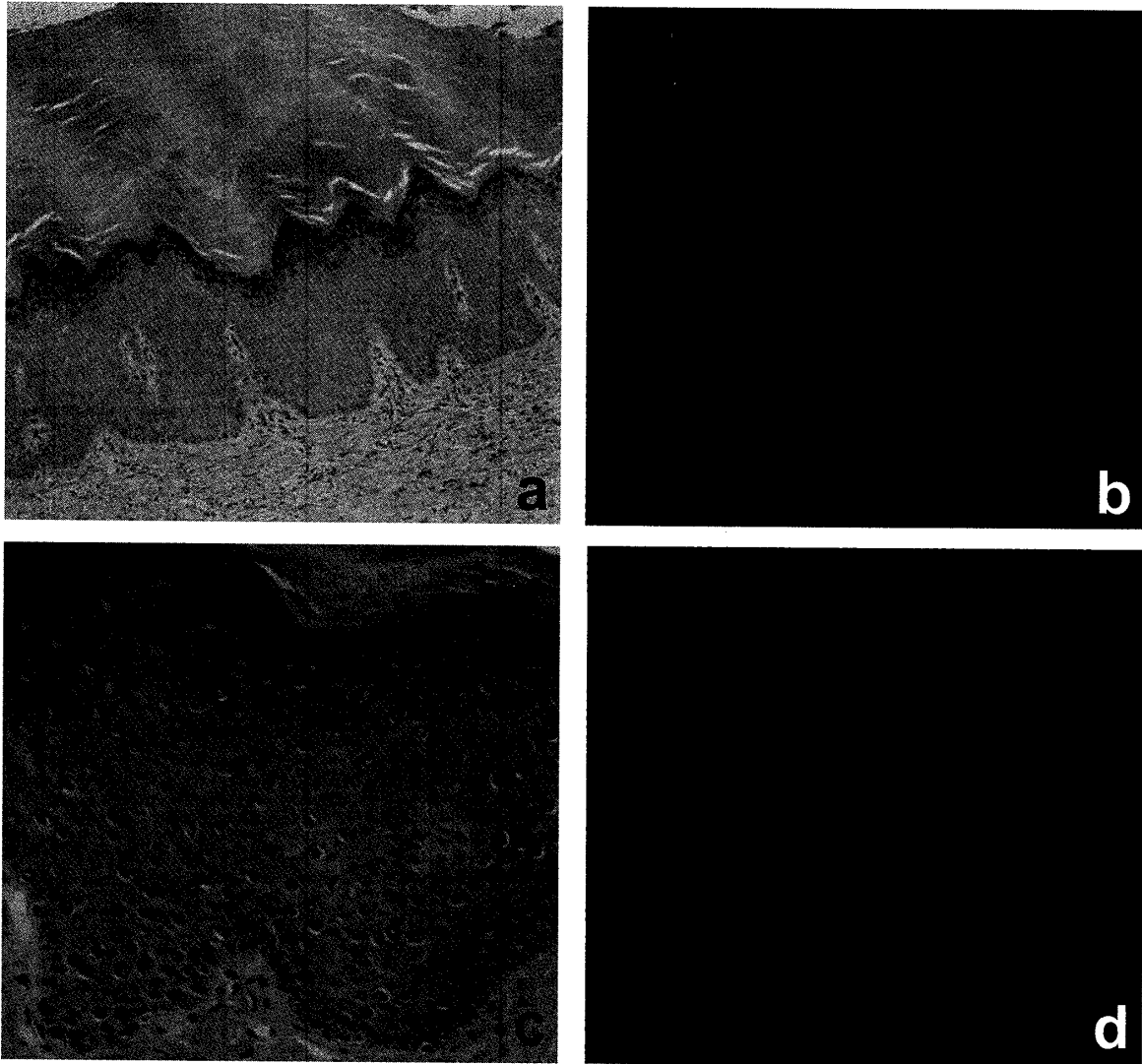


Fig. 2. HE staining (a, $\times 10$; c, $\times 20$) and fluorescent immunohistochemistry (b, $\times 10$; d, $\times 20$) of leukoplakia without epithelial dysplasia showing numerous small granular fluorescing structures in the cytoplasm of epithelial cells extending from the granular layer to the prickle cell layer.

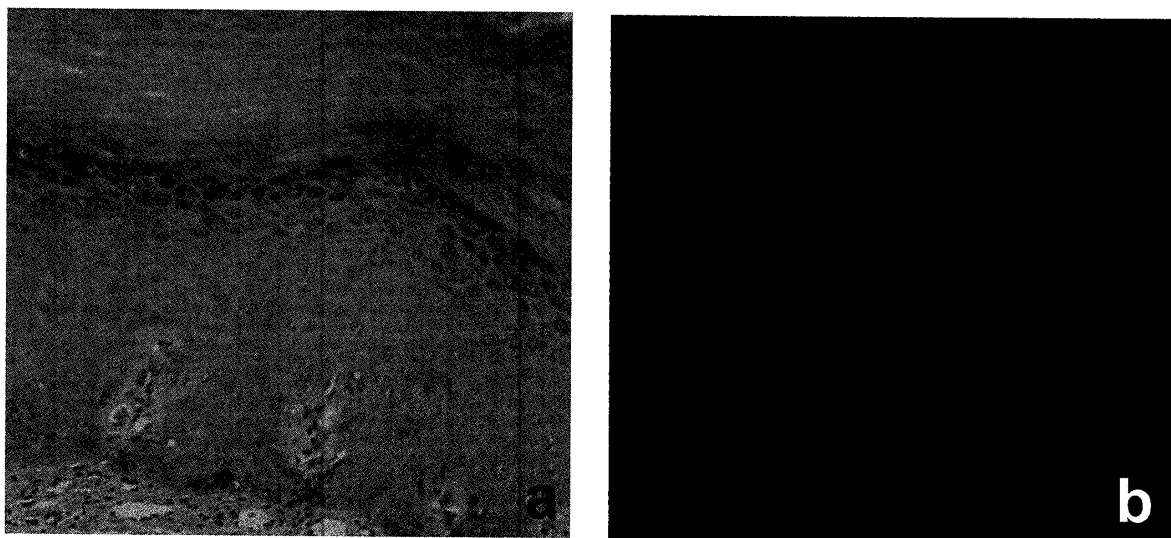


Fig. 3. HE staining (a, $\times 10$) and fluorescent immunohistochemistry (b, $\times 10$) of leukoplakia without epithelial dysplasia similar to that in Fig. 2. In addition, fluorescing structures were seen in a part of the cornified layer.

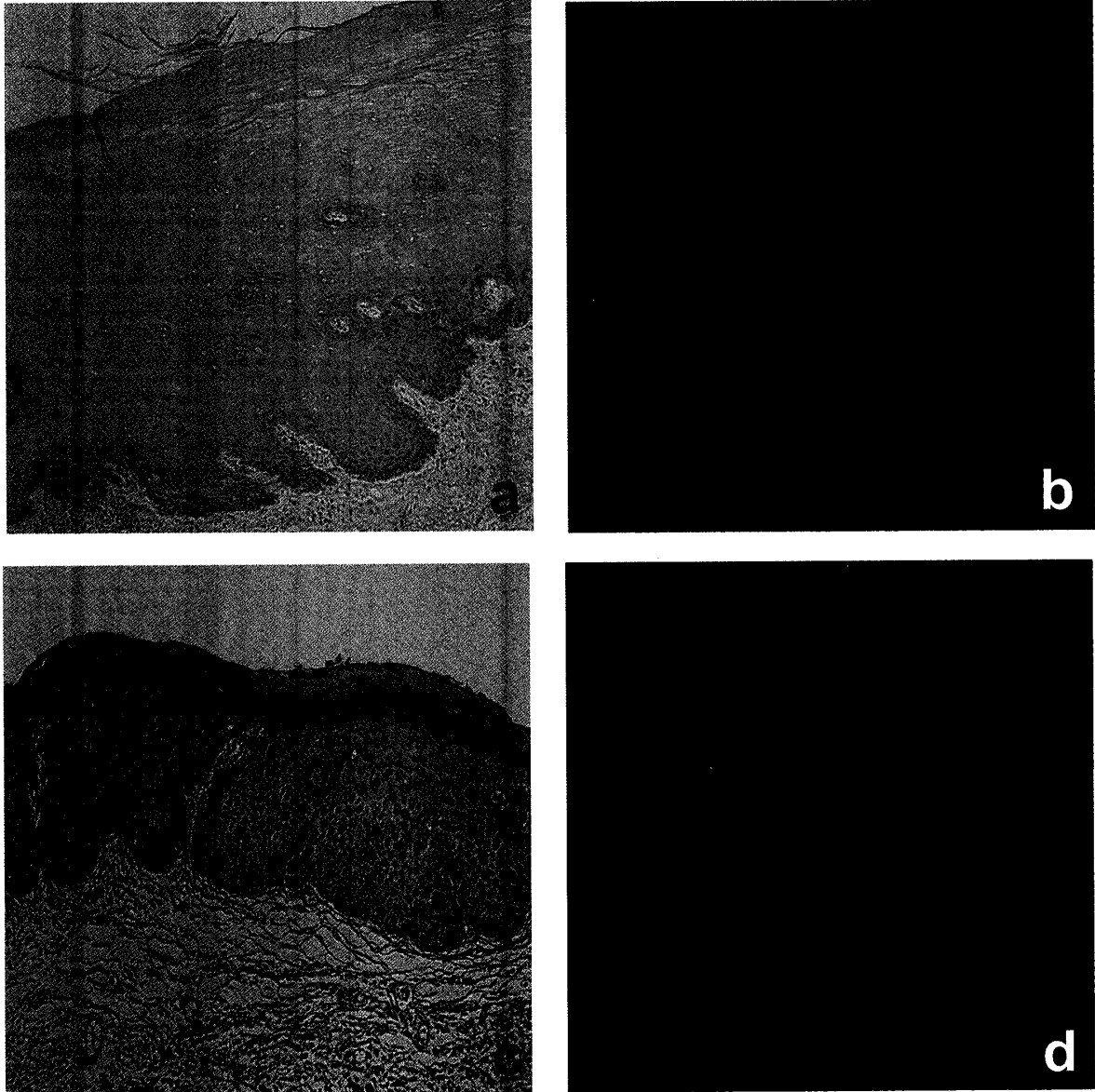


Fig. 4. HE staining (a, $\times 10$; c, $\times 10$) and fluorescent immunohistochemistry of leukoplakia with mild epithelial dysplasia showing small granular fluorescing structures in the epithelium with severe hyperkeratosis (b, $\times 10$), but not in the epithelium with slight to moderate keratinization (d, $\times 10$).

3. 白板症の免疫組織化学的所見

1) 上皮性異形成を伴わない例について

上皮性異形成を伴わない白板症31症例では、全例(100%)で上皮層の顆粒層から有棘層の上皮細胞の細胞質に微細な蛍光像が多数観察された (Table 1, Figs. 2 b, 2 d, 3 b)。陽性反応の程度では、「++」が24例(77.4%), 「+」が7例(22.6%)で、「-」例はなかった。

一方、角化層では蛍光像はほとんど観察されなかった (Figs. 2 b, 2 d) が、一部の標本においては角化層内にも蛍光像が観察された

(Fig. 3 b)。

基底層での蛍光像はほとんど観察されないか、認められても顆粒層や有棘層よりも陽性細胞数が少ないか、あるいは陽性反応の程度が弱かった (Figs. 2 b, 2 d, 3 b)。

2) 上皮性異形成を伴う例について

(1) 上皮性異形成のみの例について

19例中10例(52.6%)に上皮細胞の細胞質に蛍光像が観察された (Figs. 4 b, 5 b, 6 b)。異形成の程度別では、軽度で6例中3例(50%), 中等度で8例中3例(37.5%), 高度で

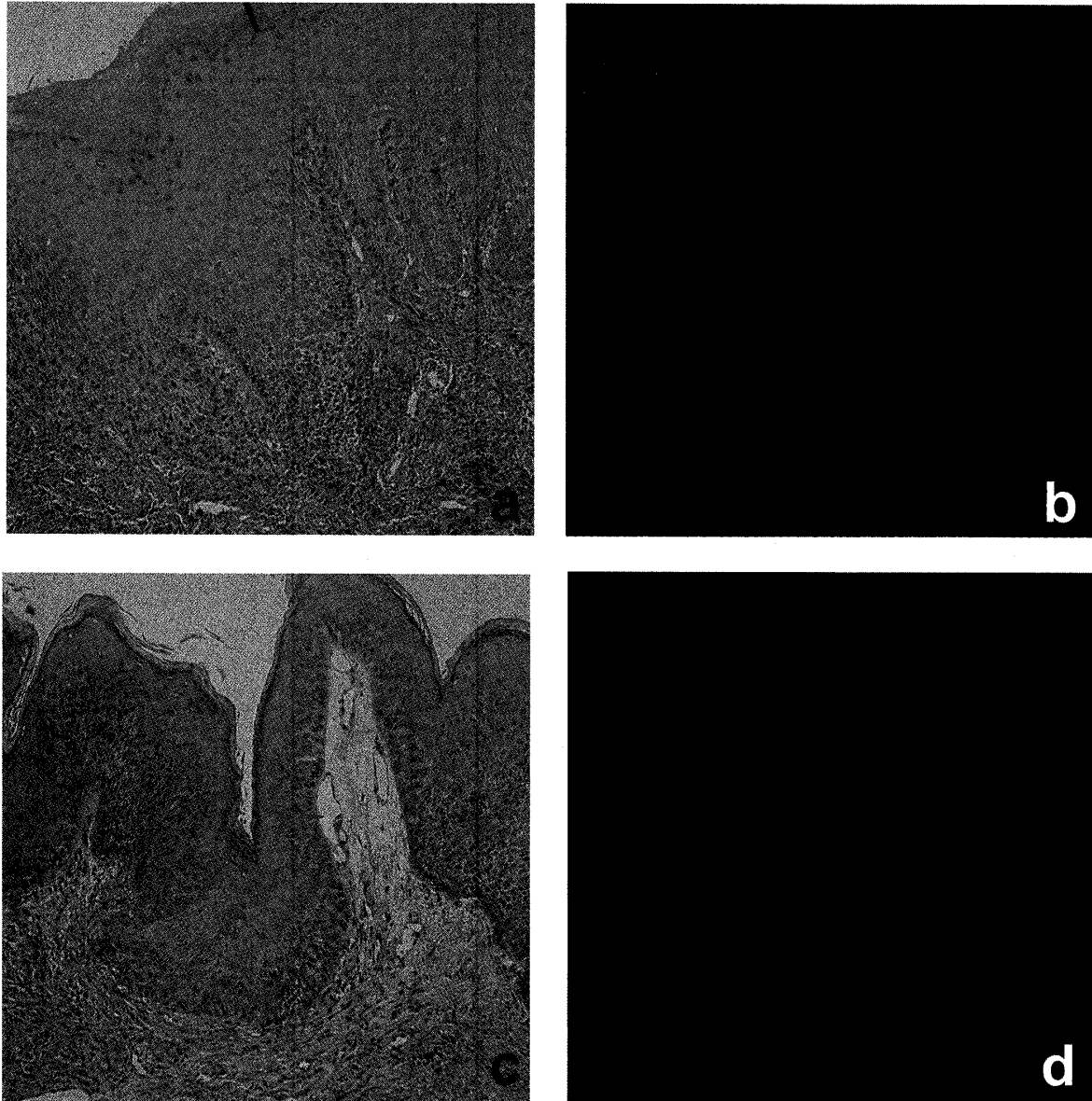


Fig. 5. HE staining (a, $\times 10$; c, $\times 10$) and fluorescent immunohistochemistry of leukoplakia with moderate epithelial dysplasia showing small structures similar to those in Fig. 4. (b, $\times 10$; d, $\times 10$).

5例中4例(80%)において、上皮細胞に蛍光像が観察された(Figs. 4-6, Table 2)。染色程度は、軽度異形成では、3例中2例が「++」、1例が「+」であった。中等度異形成では、陽性を示した3例とも「+」であった。さらに、高度異形成では、4例中1例が「++」、他の3例が「+」であった。なお、陽性所見のみられた10症例のすべてに上皮表層に明らかな角化亢進が認められた。

(2) 同一切片内に上皮性異形成巣と健常構造を含む例について

同一切片内に2か所の高度上皮性異形成巣と健常上皮部分を有する標本において、陽性反応の比較を行った。その結果、1か所の高度上皮性異形成巣ではわずかに蛍光像が認められた(Fig. 7 A-b)が、他の高度上皮性異形成巣(Fig. 7 B-b)と健常構造を呈する部分(Fig. 7 C-b)では蛍光像はほとんど認められなかった。陽性所見が認められた高度上皮性異形成巣について、蛍光像がほとんど認められなかった異形成部分と比較すると、前者では角化傾向が著しかった(Fig. 7 A-a)。

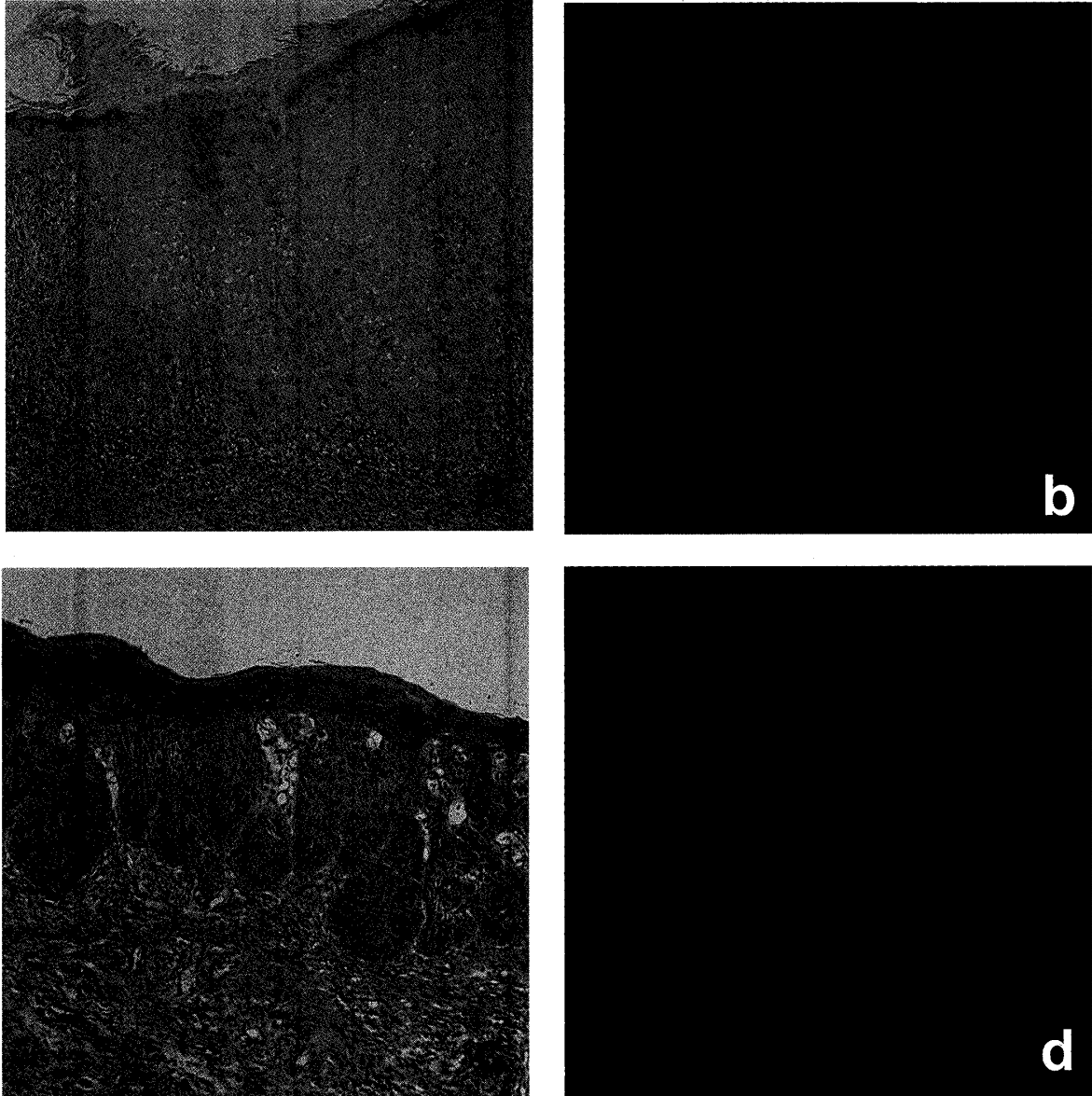


Fig. 6. HE staining (a, $\times 10$; c, $\times 10$) and fluorescent immunohistochemistry of leukoplakia with severe epithelial dysplasia similar to that in Fig. 4. (b, $\times 10$; d, $\times 10$).

3) 同一切片内に程度の異なる上皮性異形成巣を含む例について

同一切片内で軽度の上皮性異形成巣(1か所), 中等度の上皮性異形成巣(2か所), 高度の上皮性異形成巣(1か所)の計4か所の程度の異なる異形成を含む検体では, 異形成の高度な部分で上皮細胞の細胞質に微細な蛍光像がわずかに認められた(Fig. 8 D-b)。しかし, 他の部分では, 蛍光像はほとんどみられなかった。なお, 軽度ながら陽性所見が認められた部分は他の部分よりも上皮の角化が亢進していた

(Figs. 8 A-b, B-b, C-b)。

4. 健常粘膜における免疫組織化学的所見

対照とした健常粘膜群の19例においては, 上皮細胞に蛍光像はほとんどみられないか, あるいは「+」の陽性所見が認められるにすぎなかった。これらのうち「+」の陽性反応を呈したのは7例(36.8%)であり(Table 3), いずれも, 陽性反応は上皮層上部の表層近くに局限していた(Figs. 9 b, d)。また, 陽性反応の認められたものでは上皮の角化傾向が亢進していた。

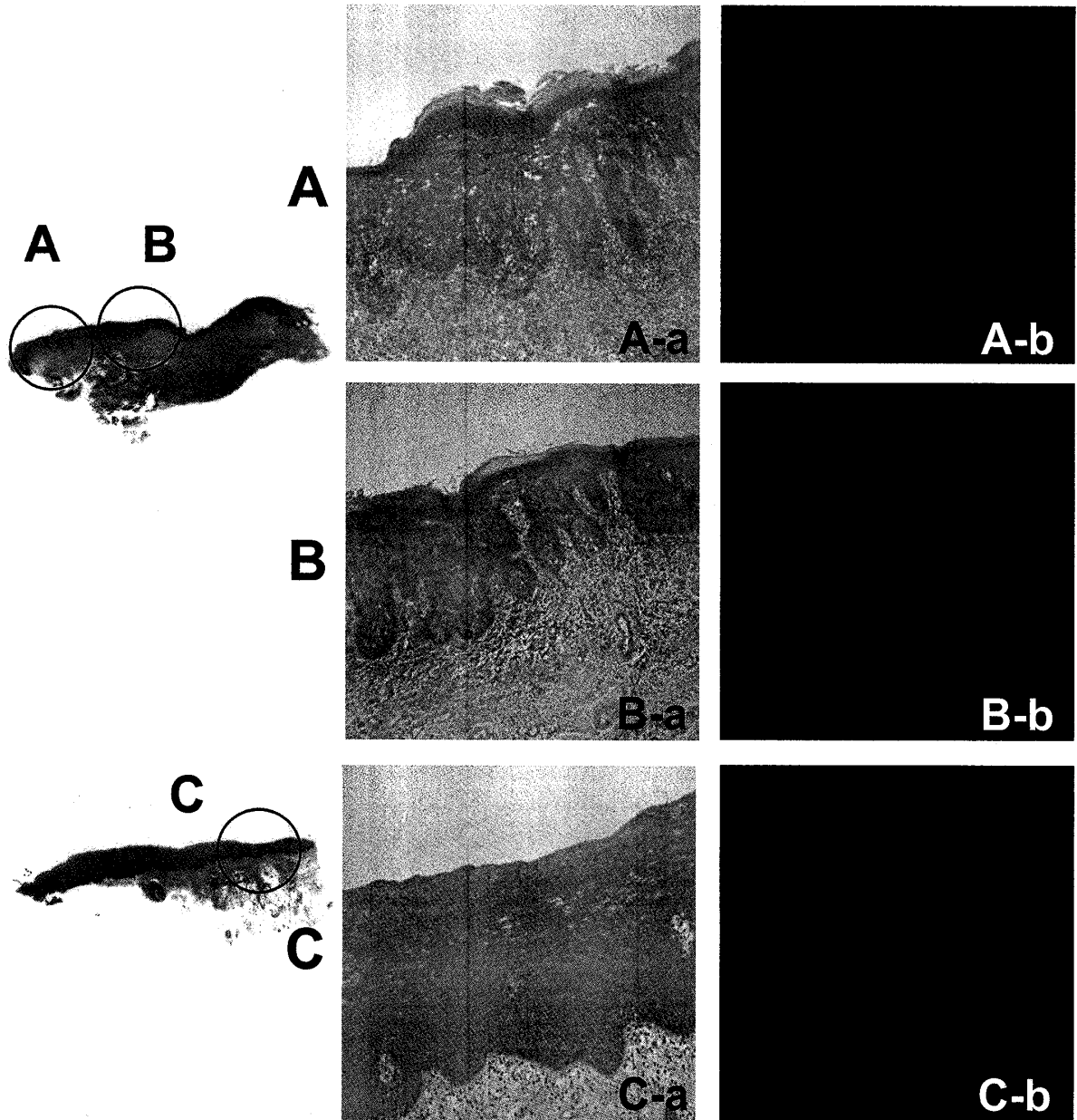


Fig. 7. HE staining and fluorescent immunohistochemistry of foci of epithelial dysplasia and normal epithelium in the same thin-sectioned material. (A,B) foci of severe epithelial dysplasia, (C) normal epithelium. HE staining of foci of severe epithelial dysplasia (A-a, $\times 10$; B-a, $\times 10$) and normal epithelium (C-a, $\times 10$), fluorescent immunohistochemical staining of foci of severe epithelial dysplasia (A-b, $\times 10$; B-b, $\times 10$) and normal epithelium (C-b, $\times 10$). Foci of severe epithelial dysplasia (A-b) showing a few small granular fluorescing structures in the cytoplasm of epithelial cells, while another foci of severe epithelial dysplasia (B-b) and normal epithelium showed few such structures (C-b).

考 察

白板症の病因あるいは発症機転は未だ解明されていないが、微生物の感染も重要な因子の一つであると推測されている。

近年、ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) が、口腔

癌および白板症などにおいて、免疫組織化学、PCRあるいは in situ hybridization により検出されており⁵⁻¹¹⁾、HPV と白板症および口腔癌との関連が注目されている。しかし、その発現頻度は5-80%と、報告者によって大きな違いがみられ³⁾、さらに子宮頸部での前癌病変では

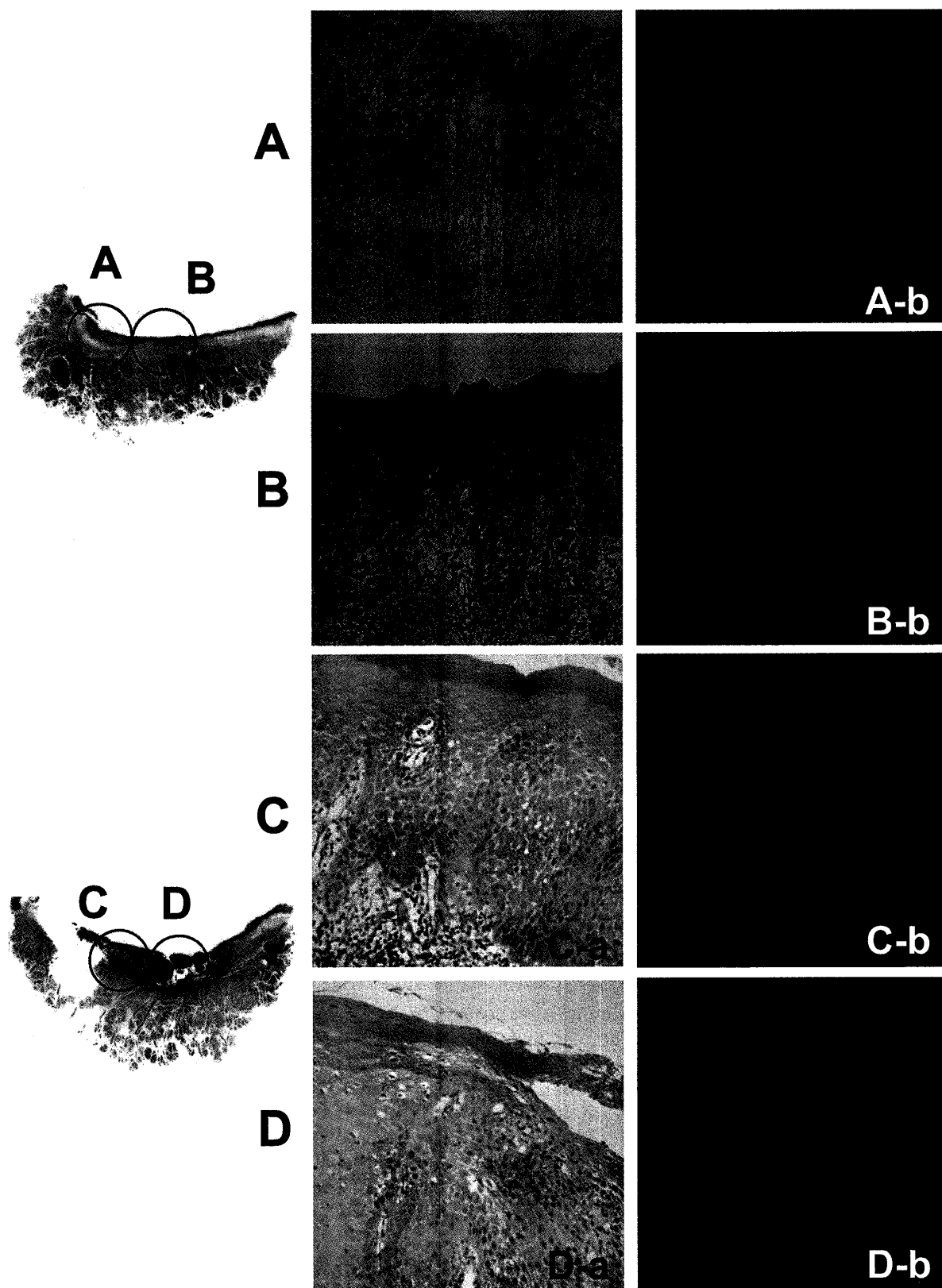


Fig. 8. HE staining and fluorescent immunohistochemistry showing various degrees of dysplasia in the same thin-sectioned material.

(A) foci of mild epithelial dysplasia, (B, C) foci of moderate epithelial dysplasia, (D) foci of severe epithelial dysplasia. HE staining (A-a, $\times 10$; B-a, $\times 10$; C-a, $\times 10$; D-a, $\times 10$), fluorescent immunohistochemical staining (A-b, $\times 10$; B-b, $\times 10$; C-b, $\times 10$; D-b, $\times 10$).

Foci of epithelial dysplasia showing a few fluorescing structures (D-b) or few that (A-b, B-b, C-b).

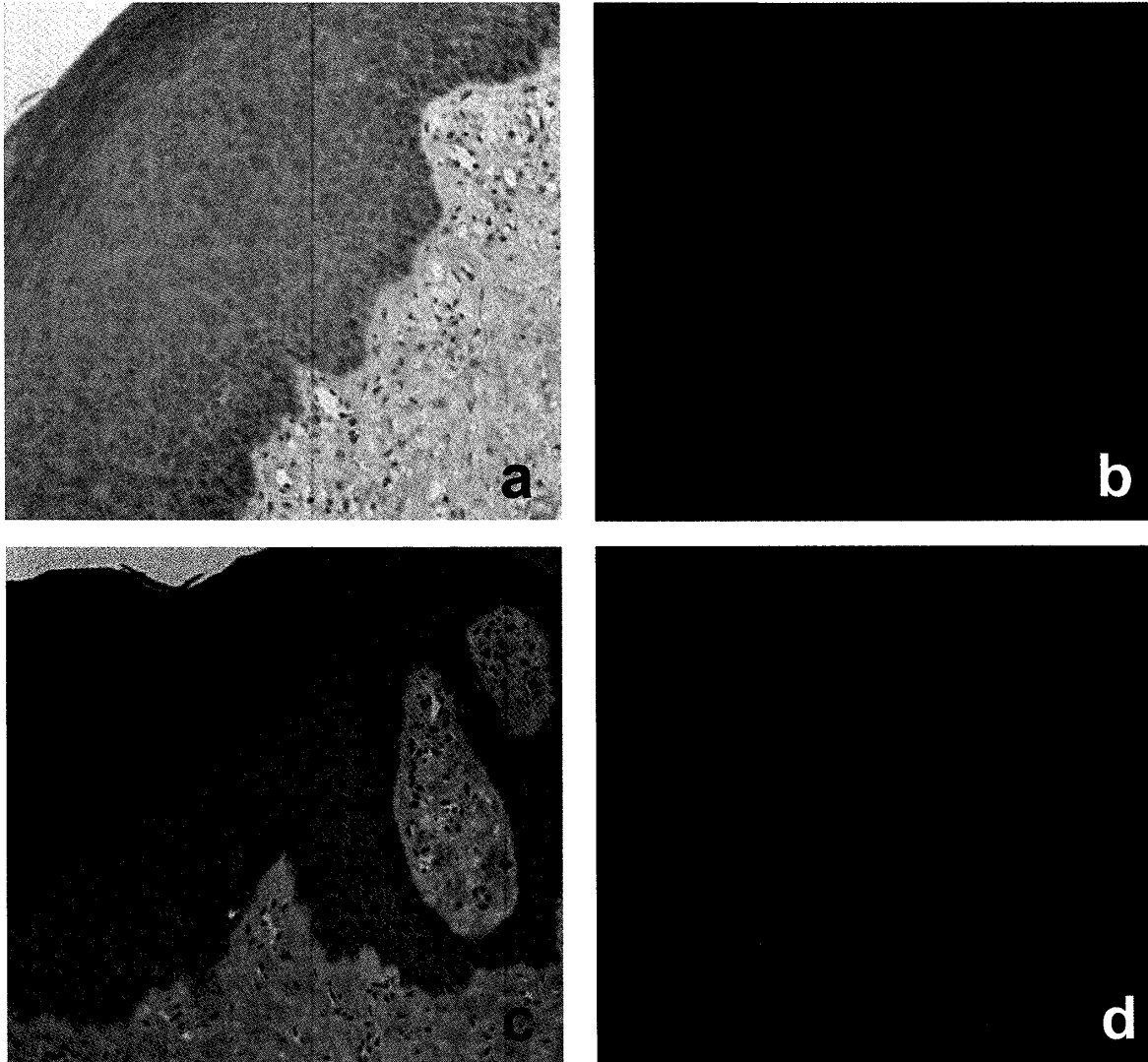


Fig. 9. HE staining (a, $\times 10$; c, $\times 20$) and fluorescent immunohistochemistry of normal-appearing mucosa showing few or no fluorescing structures (b, $\times 10$) or showing a few fluorescing structures above the epithelium (d, $\times 20$).

HPV のウイルス粒子が電子顕微鏡で観察されているのに対して^{19, 20)}, 白板症では, 電顕的にウイルス粒子はみられていない²¹⁾。

一方, Shimakage ら²²⁾は, in situ hybridization および PCR 法にて, 口腔扁平上皮癌と白板症において Epstein-Barr Virus (EBV) が検出されたと述べている。EBV は後天性免疫不全症候群に特徴的な毛状白板症との関わりがよく知られているが²³⁾, 白板症と EBV の関連は明らかでない。

また, *Candida albicans* がしばしば高度の白板症において認められる^{24, 25)}が, むしろ前駆した白板症にカンジダ症が続発するという考え方

が一般的である²⁶⁾。

著者は, 白板症を DNA 特異的蛍光色素剤 Hoechst 33258 で染色した Mizuki¹²⁾ の報告をもとに, 白板症における感染微生物がマイコプラズマと推測して, 白板症におけるマイコプラズマの存在の有無を免疫組織化学的に検討した。

免疫組織化学に先立ち, *M. salivarium* を抗原としてウサギポリクローナル抗体を作製し, その特異性についてマイコプラズマ感染 Vero 細胞を用いて検討したところ, Vero 細胞の細胞質において顆粒状の陽性反応を認めた。なお, この抗体は *M. salivarium* を抗原として作

製したが、ヒトから検出されるマイコプラズマの7種類を感染させたVero細胞を用いた検討では、いずれのマイコプラズマにも反応性を示した。このことは、今回作製した抗*M. salivarium*抗体の一部が他のマイコプラズマと交叉反応をきたすようなタンパクを含んでいるためと思われる。

この抗体を用いて行った口腔白板症組織の蛍光免疫染色では、上皮性異形成を伴わない白板症の全例(100%)において、顆粒層から有棘層の細胞で明らかな陽性所見が観察され、マイコプラズマの感染が示唆された。

一方、上皮性異形成を呈する例では、異形成の程度と陽性率に明らかな関連が認められなかった。また、異形成の程度にかかわらず、角化の傾向の著しい例では上皮細胞の細胞質に微細な蛍光像が観察されたのに対し、角化の乏しい例では蛍光像がほとんどみられなかった。

健常粘膜では上皮細胞の細胞質に蛍光像はほとんどみられないか、あるいは上皮層上部に限局して観察される程度で、とくに上皮性異形成を伴わない白板症群と健常粘膜上皮群とは明らかな相違が認められた。

なお、白板症ならびに健常粘膜の固有層において陽性所見が散見されたが、これらは細胞外であり、また、微細な顆粒状所見でないことから、非特異的な反応と思われた。

以上の結果から、マイコプラズマの感染は口腔粘膜上皮層の角化の亢進と強く関連していることが示唆された。

白板症は、正常粘膜からまず上皮性異形成を伴わない病変として発症し、次いで軽度の上皮性異形成に移行し、その後中等度、高度の上皮性異形成を経て、最終的に扁平上皮癌に進展すると考えられている²⁷⁾。今回の研究結果から、口腔粘膜の多段階発癌の過程において、上皮細胞におけるマイコプラズマの感染が、白板症の発症に深く関わっていることが示唆された。しかし、上皮性異形成例ではマイコプラズマの検出率が逆に低下することから、上皮性異形成とマイコプラズマ感染との関連は明らかでない

が、マイコプラズマは特定の細胞に対して強い親和性を示す²⁸⁾とされていることから、上皮性異形成を示す細胞との親和性は低いのではないかと推測される。しかし、両者の関連の有無については、今後さらに検討する必要がある。

マイコプラズマは、自己増殖可能な最小(0.2-0.8 μ m)の細菌で、細胞壁を欠き、そのため球状あるいは洋梨状、もしくは線維状あるいは螺旋形といったような多形態を呈する¹³⁾。また、マイコプラズマのゲノムサイズは580-1,380 kbpであり、他の微生物と比較してもきわめて小さく²⁹⁾、*M. salivarium*のゲノムサイズはおおよそ650kbpである³⁰⁾。ゲノムサイズが小さく、自己複製と生存に必要な最低限のタンパク合成・代謝能しかもちえないために、ほとんどのマイコプラズマは細胞寄生性を有し、増殖・生存のために宿主より様々な物質の取り込みを行っているといわれている²⁹⁾。

従来、マイコプラズマは宿主細胞表層に結合し、細胞内へは侵入しないと考えられていたが、近年の研究により、細胞内寄生性が知られるようになった^{28,29)}。すなわち、Taylor-Robinsonら³¹⁾は、*M. fermentans*と*M. hominis*とを感染させたHeLa細胞の免疫電顕による観察から、これらのマイコプラズマに細胞内侵入性があることを報告している。また、Jensenら³²⁾は、*Mycoplasma genitalium*を感染させたVero細胞の電子顕微鏡による観察で、*M. genitalium*がVero細胞の細胞核に近接する空胞の中に存在することを報告している。さらに、Andreevら³³⁾は、*Mycoplasma penetrans*はHeLa細胞の生死に関係なく細胞に付着するが、生存しているHeLa細胞のみに*M. penetrans*の侵入がみられたと報告している。

口腔咽頭領域では、*M. buccale*、*M. faucium*、*M. lipophilum*、*M. orale*、*M. salivarium*が常在しているが、その中で*M. salivarium*と*M. orale*が優勢で、それぞれの検出率は60~80%、30~60%で¹⁵⁾、歯肉溝やデンタルプラーク、唾液から検出される^{16,17)}。

今回の研究で陽性所見を示した多くの例で、

上皮層の顆粒層や有棘層の上部に陽性反応が認められたことから、上皮層内で検出されたマイコプラズマは、口腔に存在するマイコプラズマが上皮の表面から上皮層内に侵入し、さらに上皮細胞内に侵入したものと推測される。一方、角化層ではマイコプラズマがほとんど検出されていないが、これはマイコプラズマが生きている細胞にのみ寄生し、角化した細胞には寄生しないためと考えられる。

マイコプラズマの感染は、細胞培養においてしばしば、大きな問題となり³⁴⁾、培養細胞の増殖・形態、染色体、細胞の代謝、インターフェロン産生、リンパ球の幼若化反応、免疫反応、ウイルスの増殖などに影響を与えることが知られている³⁵⁻³⁷⁾。一方、ヒトの *in vivo* におけるマイコプラズマの細胞内寄生の影響は異型肺炎の原因菌である *Mycoplasma pneumoniae* や非淋菌性尿道炎の原因菌として疑われている *M. genitalium* などを除いてほとんど知られていないが、他のマイコプラズマの *in vivo* における感染でも培養細胞における変化と類似した現象が生じることも否定できない。今後、*in vivo* におけるマイコプラズマの細胞内感染による影響を調べ、白板症の発症および進展とマイコプラズマの細胞内感染との関連性をさらに検索する予定である。

結 論

口腔白板症におけるマイコプラズマの細胞内感染の有無を明らかにする目的で、50例の白板症のホルマリン固定パラフィン包埋材料について、HE染色ならびに抗マイコプラズマ・ウサギポリクローナル抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、以下の結果を得た。

1. 組織学的に上皮性異形成の有無についてみると上皮性異形成を伴わないものが31例、上皮性異形成を伴うものが19例であった。上皮性異形成を程度別に分けると6例が軽度、8例が中等度、5例が高度であった。

2. 上皮性異形成を伴わない白板症の蛍光免疫染色では、31例全例(100%)で上皮の顆粒層

から有棘層の細胞に微細な蛍光像が観察された。陽性反応の強度では中等度～高度が24例、軽度が7例であった。

3. 上皮性異形成を伴った例では、19例中10例(52.6%)で上皮細胞に蛍光像が観察された。軽度異形成では6例中3例(50%)、中等度異形成では8例中3例(37.5%)、高度異形成では5例中4例(80%)が種々の程度の陽性反応を示した。また、上皮性異形成の程度に関係なく、陽性所見のみられた10例全ては上皮に角化亢進が認められた。

4. 健常粘膜における免疫組織化学では、軽度の陽性反応を示したものが19例中7例(36.8%)あり、陽性部位は上皮層の上部に限局していた。

以上の結果から、口腔粘膜の上皮細胞におけるマイコプラズマの感染と上皮層角化の亢進とは強く関連していることが示唆された。しかし、上皮性異形成との関連は明らかでなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究において懇切丁寧なご指導を賜りました口腔外科学第一講座水城春美教授に心からお礼申し上げます。数々のご教示とご助言をいただきました口腔病理学講 武田泰典教授ならびに畠山節子准教授に深く感謝いたします。また、本学中央臨床検査部病理部門に保管された標本の使用にあたり、ご援助をいただいた中央臨床検査部病理部門中村眞一前教授ならびに職員各位に深謝いたします。さらに、種々のご協力をいただきました口腔外科学第一講座ならびに口腔病理学講座の諸先生に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第60回日本口腔科学会(平成18年5月11日～12日、名古屋市)において発表した。

この研究は一部、文部科学省ハイテクリサーチプロジェクト(平成17年度～平成21年度)の補助を受け実施した。

引用文献

- 1) Pindborg, J. J., Reichert, P. A., Smith, C.J., and van der Waal, I.: Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, pp21-29, 1997.
- 2) Gale, N., Pilch, B. Z., Sidransky, D., Westra, W. H., and Califano, J.: Epithelial precursor lesions. Barnes, L., Eveson, J. W., Reichart, P., and Sidransky, D.: Pathology and Genetics of head and neck tumours., IARC Press, Lyon, pp177-181, 2005.
- 3) 山本和彦, 桐田忠昭, 杉村正仁: 口腔白板症—特に悪性化潜在能についての最近の研究—, 日口粘膜誌, 2 : 1-21, 1996.
- 4) Amagasa, T., Yamashiro, M., and Ishikawa, H.: Oral leukoplakia related to malignant transformation. *Oral Science International* 3 : 45-55, 2006.
- 5) Young, S. K., and Min, K. W.: In situ DNA hybridization analysis of oral papillomas, leukoplakias, and carcinomas for human papillomavirus. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 71 : 726-729, 1991.
- 6) Miller, C. S., and White, D. K.: Human papillomavirus expression in oral mucosa, pre-malignant conditions, and squamous cell carcinoma. A retrospective review of the literature. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 82 : 57-68, 1996.
- 7) Sand, L., Jalouli, J., Larsson, P. A., and Hirsch, J. M.: Human papilloma viruses in oral lesions. *Anticancer Res.* 20 : 1183-1188, 2000.
- 8) Kumar, B.-U.: Study on the role of human papilloma virus in carcinogenesis of oral mucosa. 広大歯誌, 33 : 15-30, 2001.
- 9) 石橋美樹, 櫻井一成, 浦出雅裕: 口腔前癌病変及び口腔癌における Human Papilloma Virus (HPV) 16/18型感染に関する免疫組織化学的検討, 癌の臨床, 48 : 229-235, 2002.
- 10) Giovannelli, L., Campisi, G., Colella, G., Capra, G., Di, Liberto, C., Caleca, M. P., Matranga, D., D'Angelo, M., Lo Muzio, L., and Ammatuna, P.: Brushing of oral mucosa for diagnosis of HPV infection in patients with potentially malignant and malignant oral lesions. *Mol. Diagn. Ther.* 10 : 49-55, 2006.
- 11) Cianfriglia, F., Di Gregorio, D. A. Cianfriglia, C., Marandino, F., Perrone, Donnorso R., and Vocaturo, A.: Incidence of human papillomavirus infection in oral leukoplakia. Indications for a viral aetiology. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 25 : 21-28, 2006.
- 12) Mizuki, H.: In situ staining with DNA-binding fluorescent dye, Hoechst 33258, to detect microorganisms in the epithelial cells of oral leukoplakia. *Oral Oncology* 37 : 521-526, 2001.
- 13) Willett, H. P.: Mycoplasma, Joklik, W. K., Willett, H. P., Amos, D.B. and Wilfert, C.M.: Zinsser microbiology, 20th ed., Prentice-Hall International, London, pp730-737, 1992.
- 14) Watanabe, T., Matsuura, M., and Seto, K.: Enumeration, isolation, and species identification of mycoplasmas in saliva sampled from the normal and pathological human oral cavity and antibody response to an oral mycoplasma (*Mycoplasma salivarium*). *J. Clin. Microbiol.* 23 : 1034-1038, 1986.
- 15) Taylor, P.: Medical significance of mycoplasmas, Miles, R. and Nicholas, R.: Mycoplasma Protocols, Human Press, Totowa, pp 7-15, 2002.
- 16) Kumagai, K., Iwabuchi, T., Hinuma, Y., Yuri, K., and Ishida, N.: Incidence, species and significance of *mycoplasma* species in the mouth. *J. Infect. Dis.* 123 : 16-21, 1971.
- 17) Uchida, A.: Isolation and enumeration of mycoplasmas in dental plaques. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 28 : 117-123, 1981.
- 18) Blanchard, A. and Bebear, C. M.: Mycoplasmas of human, Razin, S. and Herrmann, R.: Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp45-71, 2002,
- 19) Ferenczy, A., Braum, L., and Shah, K. V.: Human papillomavirus (HPV) in condylomatous lesion of cervix. *Am. J. Surg. Pathol.* 5 : 661-670, 1981.
- 20) Toki, T., Oikawa, N., Tase, T., Sato, S., Wada, Y., Yajima, A., and Higashiiwai, H.: Immunohistochemical and electron microscopic demonstration of human papillomavirus in dysplasia of the uterine cervix. *Tohoku J. Exp. Med.* 149 : 163-167, 1986.
- 21) Kannan, S., Balaram, P., Pillai, M.R., Chandran, G.J., Nair, M.K., Kartha, C.C., Augustine, J., Sudha, L., and Mangalam, M. K.: Ultrastructural variations and assessment of malignant transformation risk in oral leukoplakia. *Path. Res. Pract.* 189 : 1169-1180, 1993.
- 22) Shimakage, M., Horii, K., Tempaku, A., and Sagawa, T.: Association of Epstein-Bar Virus with oral cancers. *Hum. Pathol.* 33 : 608-614, 2002.
- 23) Greenspan, J. S., Rabanus J.-P., Petersen V., and Greenspan, D.: Fine structure of EBV-infected keratinocytes in oral hairy leukoplakia. *J. Oral Pathol. Med.* 18 : 565-572, 1989.
- 24) Silverman, S., Gorsky, M., and Lozada, F.: Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 53 : 563-568, 1984.
- 25) Krogh, P., Hald, B., and Holmstrup, P.: Possi-

- ble mycological etiology of oral mucosal cancer: catalytic potential of infecting *Candida albicans* and other yeasts in production of N-nitrosobenzylmethylamine. *Carcinogenesis* 8 : 1543-1548, 1987.
- 26) Field, E. A., Field, J. K., and Martin, M. V.: Does *Candida* have a role in oral epithelial neoplasia? *J. Med. Vet. Mycol.* 27 : 277-294, 1989.
- 27) Bouquot, J. E., and Whitaker, S. B.: Oral leukoplakia ?rationale for diagnosis and prognosis of its clinical subtypes or "phase". *Quint. Int.* 25 : 133-140, 1994.
- 28) Rottem, S., and Naot Y.: Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends In Microbiology* 6 : 436-440, 1998.
- 29) Razin, S., Yogev, D., and Naot, Y.: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 : 1094-1156, 1998.
- 30) McGarrity, G. J., Phillips, D. M., and Vaidya, A. B.: Mycoplasmal infection of lymphocyte cell cultures: infection with *M.Salivarium*. *In vitro* 16 : 346-356, 1980.
- 31) Taylor-Robinson, D., Davies H. A., Sarathchandra, P., and Furr, P. M.: Intracellular location of Mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. *Int. J. Exp. Path.* 72 : 705-714, 1991.
- 32) Jensen, J. S., Blom, J., and Lind, K.: Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. *Int. J. Exp. Path.* 75 : 91-98, 1994.
- 33) Andreev, J., Borovsky, Z., Rosenshine, I., and Rottem, S.: Invasion of HeLa cells by *Mycoplasma penetrans* and the induction of tyrosine phosphorylation of a 145-kDa host cell protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 132 : 189-194, 1995.
- 34) Rottem, S., and Barile, M. F.: Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol.* 11 : 143-51, 1993.
- 35) McGarrity, G. J., Vanaman, V., and Sarama, J.: Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures: a review. *In Vitro* 20 : 1-18, 1984.
- 36) 佐藤国雄：マイコプラズマ汚染の細胞培養に及ぼす影響，尾形 学監修：マイコプラズマとその実験法，近代出版，東京，314-324ページ，1988.
- 37) McGarrity, G.J., Kotani, H., and Butler, G.H.: Mycoplasmas and tissue culture cells. Maniloff J., McElhaney R. N., Finch, L. R., and Baseman, J. B.: Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis., American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp445-454, 1992.