

研 究

口腔白板症上皮細胞へのマイコプラズマの侵入

川村 貴史

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25日)

(受理 : 2008年 2月23日)

Abstract : Oral leukoplakia is the most common premalignant lesion of the oral mucosa, although its etiology has not yet been elucidated. Hoechst 33258, DNA binding fluorescent dye, staining of epithelial cells from oral leukoplakia tissues has revealed small, granular, and fluorescent structures in the cytoplasm, which are suggestive of microorganism infection. The Hoechst 33258-stained particles have been speculated to be mycoplasmas. Some mycoplasmas, such as *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma orale*, form part of normal flora of the oral cavity, and can be detected in dental plaque and saliva. So, this study was performed to examine the location of mycoplasma in the epithelial cells of oral leukoplakia tissue by immunohistochemistry, immunoelectron microscopy, nested polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of nested PCR products. By immunohistochemistry, small, granular fluorescent structures in the cytoplasm of epithelial cells were observed. The results of immunoelectron microscopy demonstrated the presence of small (0.5-0.8 μ m in size) polymorphous, electron dense structures with definite borders. Their inner structures were relatively homogeneous and their borders were definite. And binding of gold particles was observed limitedly on the structures. The results of nested PCR and sequencing of PCR products showed the presence of *M. salivarium* in the epithelial cells of three leukoplakia tissues. From these findings, invasion of *M. salivarium* in the oral mucosal epithelial cells of leukoplakia is shown.

Key words : immunoelectron microscopy, *Mycoplasma salivarium*, oral leukoplakia, mouth mucosa

Invasion of mycoplasma in epithelial cells of oral leukoplakia

Takafumi KAWAMURA

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

(Chief : Prof. Harumi MIZUKI)

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一つで、通常擦っても容易に剥離しない白斑として認められ、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⁾。また、白板症は前癌病変の一つとされている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⁾。白板症の原因については、喫煙、アルコール、慢性の機械的な刺激、Vitamin A や β -carotene の欠乏、微生物の関与などが原因あるいは誘因にあげられている^{3, 4)}が、まだ十分に解明されていないのが現状である。

白板症と微生物感染との関連については、以前より、ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) が注目されてきた。HPV は一般に上皮に対して強い親和性を持つウイルスで、現在では100種類以上の型が報告されている。HPV はその型によって異なった疾患と関連するが、とくに HPV16型と HPV18型をはじめとするいくつかの型は子宮頸癌あるいは子宮頸部の前癌病変と関連があることが知られており、実際に電顕的観察でも子宮頸部の前癌病変で HPV のウイルス粒子が観察されている^{5, 6)}。白板症においてもその組織から HPV16型のゲノム DNA が検出されたとの報告⁷⁾をはじめ、HPV 感染との関連性を示唆する報告がある⁸⁻¹²⁾。しかし、両者の関連については未だ不明な点も多く¹³⁾、口腔白板症の電顕的観察でも HPV のウイルス粒子は確認されていない^{14, 15)}。

Mizuki は、2001年、DNA 特異的蛍光色素染色による白板症組織の研究から、白板症上皮細胞における微生物感染を報告した¹⁶⁾。その中で、その微生物がマイコプラズマであると推測している。マイコプラズマは、無細胞人工培地で発育可能な最小の微生物で、一般の細菌と異なり細胞壁を欠如し、多形性を有し、大きさも様々である¹⁷⁾。また、大きさが0.2~0.8 μ m と小さいことから、光学顕微鏡での検出は困難とされて

いる¹⁸⁾。現在、ヒトから15種類程度のマイコプラズマが検出されている¹⁹⁾が、これらのうち数種が口腔咽頭領域にも常在することが知られており、なかでも *Mycoplasma salivarium* と *M. orale* が優勢であると報告されている^{20, 21)}。口腔での定着部位は歯肉溝や歯周ポケット、歯垢、唾液中とされているが²⁰⁾、その病原性については明らかにされていない。

ヒトにおいて病原性を発揮するマイコプラズマとしては、異型肺炎の原因菌である *M. pneumoniae* がよく知られており^{19, 22)}、また *M. genitalium* も非淋菌性尿道炎で検出されることから、病原性を有することが示唆されている²³⁾。

マイコプラズマのゲノムサイズは約580~1,380kbp と小さい²⁴⁾が、人工培地で発育可能な微生物である。しかし、いくつかの種については、細胞内への寄生/侵入を起こしていることが報告されている²⁵⁻³¹⁾。口腔に常在するとされている *M. salivarium* および *M. orale* の細胞内への侵入についてはこれまで報告されていないが、上記の Mizuki の報告¹⁶⁾からすれば *M. salivarium* あるいは *M. orale* が口腔粘膜上皮細胞内に侵入し、かつ白板症の発症機序に何らかの役割を果たしている可能性がある。

そこで、本研究では、口腔マイコプラズマの上皮細胞内侵入と白板症の発症機序の関連の解明を目的に、白板症上皮細胞へのマイコプラズマの侵入について検討した。

マイコプラズマはそのサイズが非常に小さく、通常の染色により細胞内感染を観察するには光学顕微鏡では困難であるため、*M. salivarium* を抗原としてポリクローナル抗体を作製し、その抗体を用いた免疫電顕により、白板症の上皮細胞内における陽性反応の有無を検討した。さらに、免疫染色標本から laser microdissection system を用いて陽性部位を切り出し、DNA を抽出した後、マイコプラズマ検出のための nested PCR を行った。PCR 産物の塩基配列解析を行い、マイコプラズマであるか否かを検討した。

材料と方法

1. 抗マイコプラズマ・ポリクローナル抗体の作製

M. salivarium ATCC 23064株を American Type Culture Collection (ATCC) から購入し、PPLO 培地で培養した。PPLO 培地は、マイコプラズマ基礎培地 (BD, Sparks, MD, USA) 2.1 gを70mlの蒸留水に溶解し、121°C、15分間オートクレーブ滅菌後、30mlの滅菌蒸留水に溶解したペニシリン無添加マイコプラズマ・エンリッチメント (BD, Cockeysville, MD, USA) およびペニシリン G 50,000単位を加えて作製した。

M. salivarium ATCC 23064株を PPLO 培地で37°C、5日間培養後、4°C、30分間、10,000×gで遠心分離し、集菌した。次いで、0.01M PBS (-) 溶液で2回洗浄し、その後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、遠心分離にて集菌後、PBS (-) 溶液で2回洗浄し、タンパク濃度で1mg/mlとなるように PBS (-) 溶液に再浮遊させ、-80°Cにて保存した。

抗体作製は、タカラバイオ株式会社 (大津, 滋賀) に依頼した。上記 *M. salivarium* 保存懸濁液を抗原とし、日本白色家兎 (12週齢, 2.8kg) の背部皮下に初回、抗原の0.25mgを complete Freund's adjuvant (CFA) に懸濁して注射し、ついで14日目、28日目、42日目に同様に注射して追加免疫とした。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日目に全採血した。

得られた血清を Streamline rProtein A (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, UK) でアフィニティー精製を行い、抗体とした。精製した抗体は1mlずつ分注し、-80°Cにて保存した。なお、免疫前に採血した血清を免疫組織化学において対照として用いた。

2. 抗体の反応性の検討

1) *M. salivarium* 感染 3 T 6 細胞の作製

PPLO 培地にて *M. salivarium* を前述と同様の方法で5~7日間、37°Cで培養した。一方、3 T 6 細胞 (JCRB 9019) をヒューマンサイエンス研究資源バンクから譲り受け、25cm²の細胞培養フラスコで5%仔牛血清 (Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA) 含有の advanced MEM (Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA) を用いて、CO₂ インキュベーターにて37°C、CO₂ 濃度5%の条件下で培養した。2日後に PPLO 培地で培養したマイコプラズマの菌液100μl (1×10⁶CFU) をフラスコの advanced MEM 培養液5mlに添加し、さらに5日間培養した。なお、マイコプラズマを感染させない3 T 6 細胞を同様に培養し、陰性対照として用いた。培養後、0.25%トリプシン処理にて細胞を剥離し、1,000rpm、5分間遠心分離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作製した。マイコプラズマ感染の有無は、サイトスピン標本を DNA 蛍光色素剤 (Hoechst 33258) にて染色して確認した。サイトスピン標本は使用するまで-80°Cで保存した。

2) 免疫電顕による抗体の反応性の検討

作製したポリクローナル抗体の反応性を、*M. salivarium* 感染 3 T 6 細胞を材料として免疫電顕にて検討した。免疫電顕は凍結超薄切技法により行った³²⁻³⁴⁾。

M. salivarium 感染 3 T 6 細胞の懸濁液を遠心分離し、細胞塊を0.5~1mm²大に細切し、4%パラフォルムアルデヒドにて2時間固定した。その後、30% sucrose に室温で30分間浸漬し、次いで氷晶防止のため20% polyvinyl pyrrolidone-1.84M sucrose に室温で2時間浸した。その後、試料を液体窒素にて-185°Cに冷却された液化プロパンを冷媒とし急速凍結装置 KF-80 (Leica, Wetzlar, Germany) にて凍結し

た。EMUC 6/FC 6 (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて、チャンパー、ナイフ、試料の温度を $-110^{\circ}\text{C} \sim -100^{\circ}\text{C}$ に設定し、cutting speed $0.4 \sim 0.8\text{mm/s}$ にて凍結超薄切片を作製した。回収用ループで凍結切片を回収し、カーボン蒸着・親水処理したフォルムバル支持膜を張った Ni グリッド (#100; 日新 EM, 東京) に凍結切片を貼付した。

グリッドを 0.1M トリス塩酸緩衝液 (TBS) で 2 ~ 3 回洗浄し、10% 正常ヤギ血清 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) を室温で 1 時間反応させ、ブロッキングを行った。つぎに、0.1M TBS にて 2,000 倍に希釈した抗マイコプラズマ・ポリクローナル抗体を室温で 1 時間、 4°C で約 48 時間、さらに室温で 1 時間反応させた。

0.1M TBS で 10 ~ 15 分、4 ~ 5 回洗浄した後、直径 10nm 金コロイド標識抗ウサギ・ヤギ IgG 抗体 (Amersham, Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, UK) を 0.1M TBS にて 200 倍に希釈し、室温で 2 時間反応させた。その後、0.1M TBS で 15 分、3 回、さらに蒸留水で 15 分、3 回洗浄した。1% PVA (Polyvinyl alcohol) と 0.1% UA (Uranyl acetate) を 1:1 の割合で混合し、10 分間染色した。その後、余分な液を吸取り、防塵コンテナ内にて乾燥させた。観察は、透過型電子顕微鏡 H-7100, H-7650 (日立ハイテク, 東京) を使用して行った。

3. 白板症上皮細胞におけるマイコプラズマの有無の検討

1) 白板症組織の収集

岩手医科大学附属病院歯科医療センター第一口腔外科にて、臨床的に白板症と診断し、生検もしくは切除した 3 例の白板症組織の一部を試料として用いた。試料採取の際は、患者に本研究の主旨を説明し、切除組織の一部を本研究に用いることの同意を得た。なお、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 (受付番号: 01056)。

2) 免疫電顕試料の作製

採取した試料をただちに $0.5 \sim 1\text{mm}^3$ 大に細切り、4% パラフォルムアルデヒドにて 2 時間固定した。以後の操作は、*M. salivarium* 感染 3 T 6 細胞の免疫電顕試料作製と同様の方法で行った。

3) 光顕免疫組織化学による観察

免疫電顕による観察に先立ち、免疫電顕試料の一部で準超薄切片を作製し、抗マイコプラズマ・ポリクローナル抗体を用いて蛍光免疫組織化学を行った。免疫組織化学には、CSA (Catalyzed Signal Amplification) II システム (Dako, Carpinteria, CA, USA) を用いた。抗マイコプラズマ・ポリクローナル抗体は Tween 20 含有抗体希釈用緩衝液 (Dako) にて 2,000 倍に希釈し、室温で 3 時間反応させた。パーオキシダーゼ標識二次抗体 (CSA II rabbit rink) (Dako) は StabilZyme[®] HRP (SurModics Inc., Eden Prairie, MN, USA) にて 200 倍に希釈し、室温で 45 分間反応させた。Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識タイラミド増幅試薬は 15 分間反応させ、対比染色として DAPI (Vysis, Downers Grove, IL, USA) を 0.1M リン酸緩衝液にて 5 倍に希釈して使用した。観察には共焦点レーザー走査顕微鏡 LSM 510 META (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を使用して、上皮細胞における陽性反応の有無を観察した。

4) 免疫電顕による観察

光顕免疫組織化学で陽性反応の認められた試料の超薄切片を作製し、抗マイコプラズマ・ポリクローナル抗体を用いて *M. salivarium* 感染 3 T 6 細胞の免疫電顕における方法と同様の方法で免疫組織化学を行い、透過型電子顕微鏡 H-7100, H-7650 にて観察した。

5) PCR による白板症上皮細胞におけるマイコプラズマの有無の検討

3 例の白板症組織を試料として、それぞれ厚さ $4\mu\text{m}$ の凍結切片を作製し、アルミメンブレンスライド (Molecular Machines & Industries, Glattbrugg, Switzerland) に貼付した。免疫染色には、CSA II システム (Dako, Carpint-

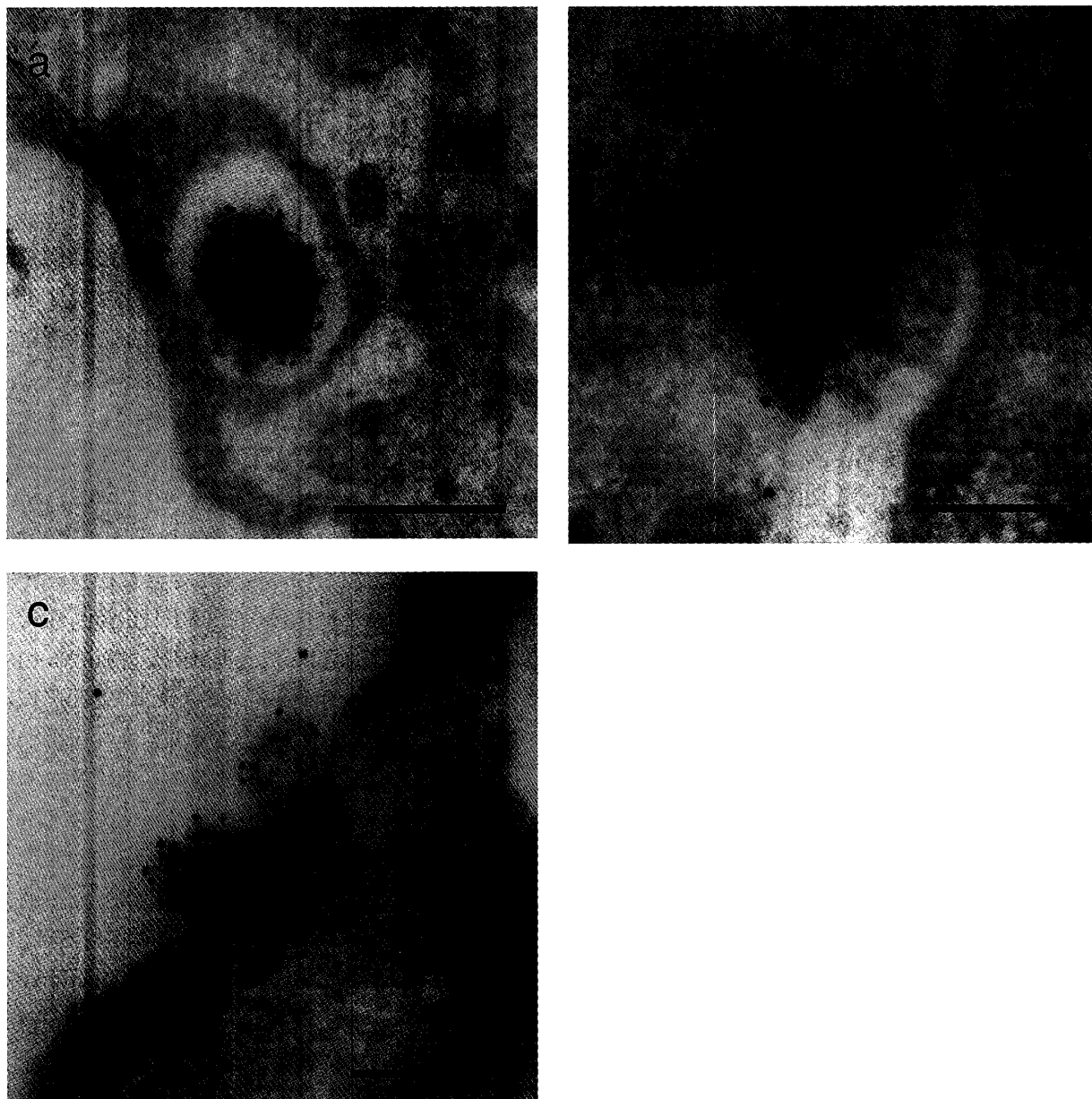


Fig. 1. Immunoelectron microscopy of *M. salivarium*-infected 3T6 cells. Polymorphous and electron dense structures (0.2-0.4 μ m in diameter) observed in the cytoplasm or intracellular vacuoles. Gold particles localized only on the electron dense structures. Scale bar = (a) 0.5 μ m, (b) and (c) 0.3 μ m. N = nucleus

eria, CA, USA) を用い、DAB 基質溶液にて発色させ、免疫染色により陽性反応のある部位を laser microdissection system (Molecular Machines & Industries) により切断し、回収した。なお、切断に際しては、粘膜表面に付着しているマイコプラズマを含まないように、上皮層の内部から上皮細胞を採取した。DNA Extractor WB Kit (和光, 大阪) を使用し、よう

化ナトリウム法により DNA を抽出し、TE buffer に溶解した。

TE buffer に溶解した DNA を鋳型として PCR Mycoplasma Detection Set (TaKaRa, 大津, 滋賀) と Taq DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて nested PCR を行った。First PCR にてセンスプライマー F1 (5'ACACCATGGGAGCTGGTAAT 3') とアン

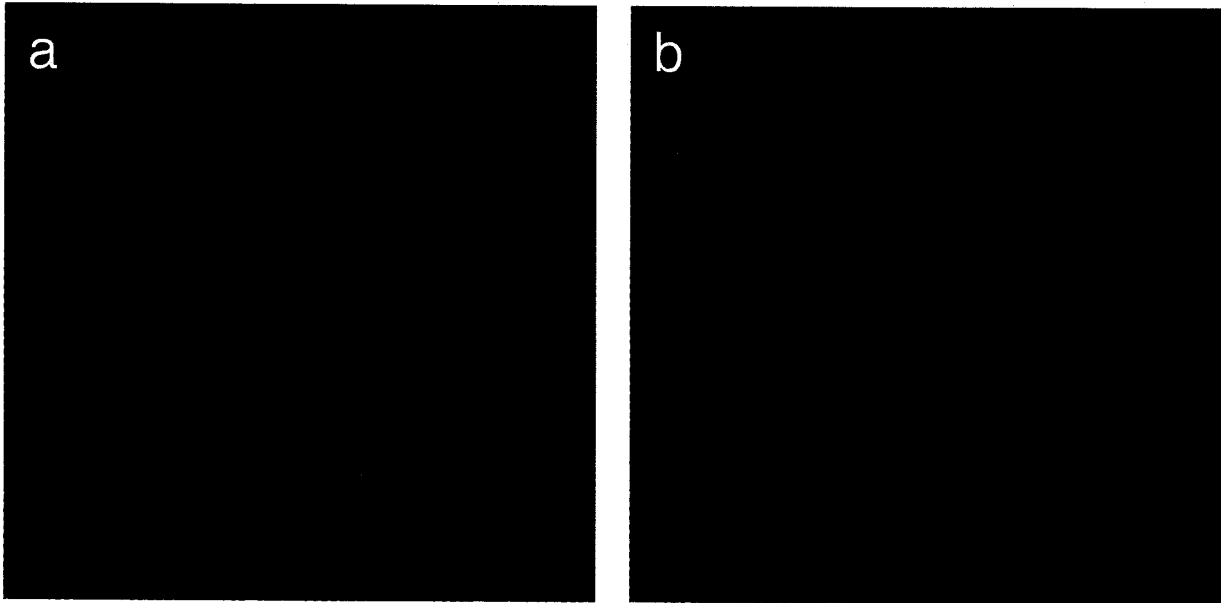


Fig. 2. Immunohistochemistry of thick frozen sections of leukoplakia tissues and normal oral epithelium using CSA II system. Small granular and green fluorescent structures were observed in cytoplasm of epithelial cells of oral leukoplakia (a). No fluorescence were observed in the normal oral epithelial cells (b). (a) and (b) : $\times 63$

チセンスプライマー R 1 (5' CTTCA (T) TCGACTTT (C) CAGA-CCCAAGGCAT 3') を用いて, 94°C, 30秒による変性後, 94°C, 30秒 (解離), 55°C, 2分 (アニーリング), 72°C, 1分 (伸長) を1サイクルとして35サイクル繰り返した。ついで, 1st PCR 産物の一部を鋳型として, センスプライマー F 2 (5' GTTCT-TTGAAA ACTGAAT 3') とアンチセンスプライマー R 2 (5' GCATCCACCAA (T) AA (T) ACTCT 3') を用いて, 1st PCR と同じ条件で 2nd PCR を行った。

2nd PCR 反応産物を3%アガロースにて電気泳動し, エチジウムブロマイド (1 μ g/ml) にて染色し, UV イルミネーターを用いて, PCR 産物の有無を観察した。

6) PCR 産物の塩基配列解析

白板症上皮細胞から検出された PCR 産物がマイコプラズマの DNA であるか否か, ならびに菌種を確認するために, 白板症3症例の 2nd PCR 産物の塩基配列解析を行った。塩基配列解析は BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) と 3730xl DNA analyzer (Applied

Biosystems) を使用し, サンガー法 (Dye-terminator 法) により行った。また, そのマイコプラズマ種の塩基配列の相同性の検索は NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を使用した。

結 果

1. 抗体の反応性の検討

M. salivarium 感染 3 T 6 細胞の免疫電顕による観察では, 3 T 6 細胞の細胞質内あるいは細胞質の小胞内に, 直径0.2~0.4 μ m, 周囲との境界が明瞭で, 内部構造がほぼ均一な電子密度の高い多形性構造物がみられた。一方, マイコプラズマ非感染 3 T 6 細胞の細胞質にはこのような電子密度の高い構造物は観察されなかった。

M. salivarium 感染 3 T 6 細胞の免疫電顕では, 電子密度の高い境界明瞭な構造物に一致して, 金コロイドの付着が認められた。一方, それらの構造物以外の細胞質やミトコンドリア, 核などには金コロイドの付着はほとんど認められなかった (Figs. 1-a~c)。

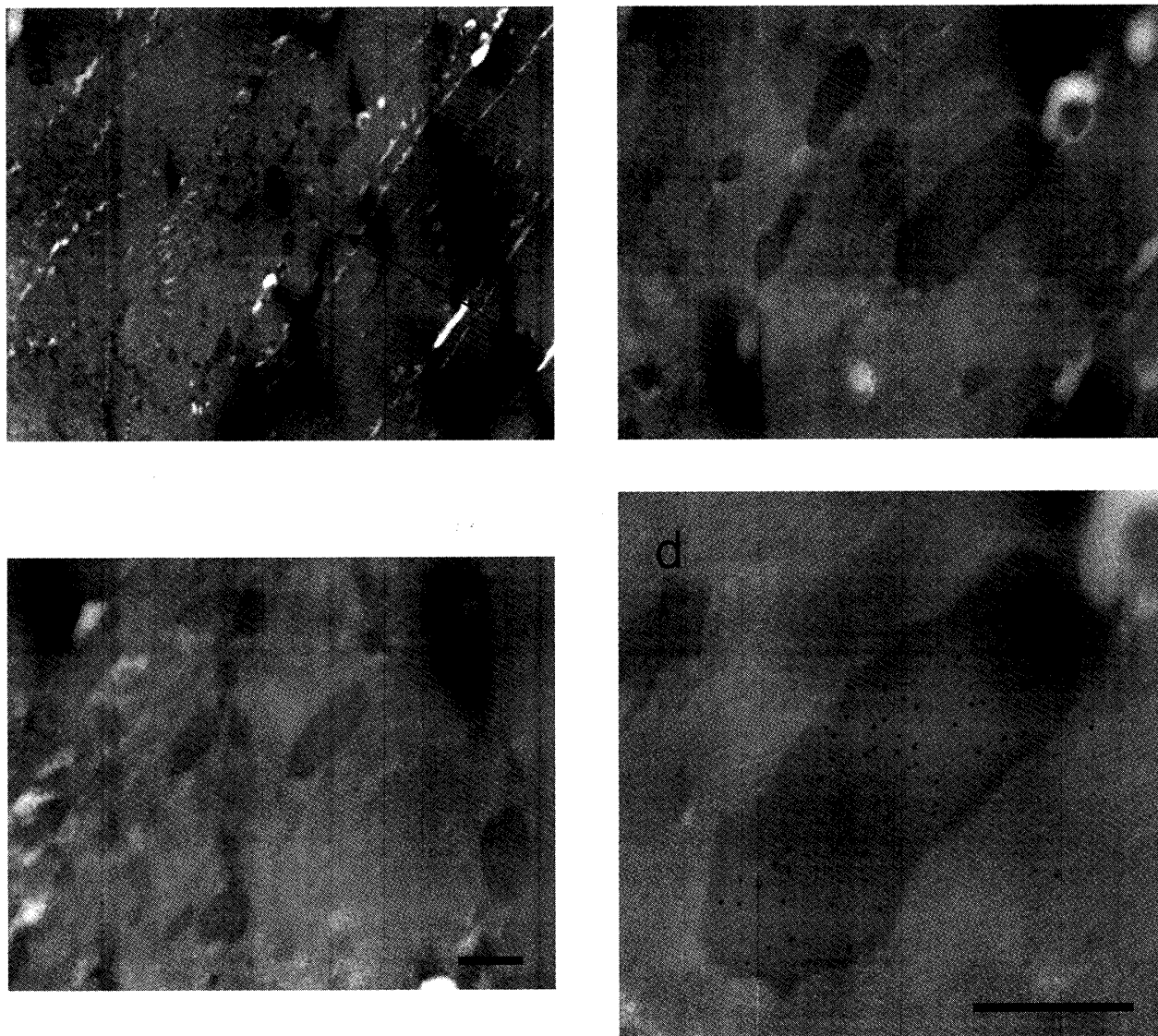


Fig. 3. Immunoelectron microscopy of oral leukoplakia specimens. Some polymorphous electron-dense structures ($0.5\text{-}0.8\mu\text{m}$ in size) were observed, from the stratum granulosum to the stratum spinosum, in the epithelial cell cytoplasm. Their inner structures were relatively homogeneous and their borders were definite. Binding of gold particles was observed in association with the electron-dense structures. Scale bar = (a) $2\mu\text{m}$, (b) and (c) $0.5\mu\text{m}$. (d) : high magnification of an image shown in (b); scale bar = $0.5\mu\text{m}$.

2. 白板症組織の免疫組織化学による観察

1) 光顕免疫組織化学による観察

白板症組織の準超薄切片での CSA II システムを用いた蛍光免疫組織化学では、上皮細胞の核の周囲に緑色の微細な蛍光像が観察された (Fig. 2-a)。一方、健常と思われる口腔粘膜上皮では、白板症組織にみられるような微細な蛍光像はほとんど観察されなかった (Fig. 2-b)。

2) 免疫電顕による観察

光顕免疫組織化学による観察で陽性反応の認められた試料の超薄切片を作製し、免疫電顕を行った結果、白板症上皮の顆粒層から有棘層上部の上皮細胞の細胞質に、電子密度の高い直径 $0.5\sim 0.8\mu\text{m}$ の大きさの多形性構造物が認められた。これらの構造物は内部構造が均一無構造で、周囲との境界は明瞭であった。また、それらの構造物に一致して、金コロイドが付着していた (Figs. 3-a~d)。

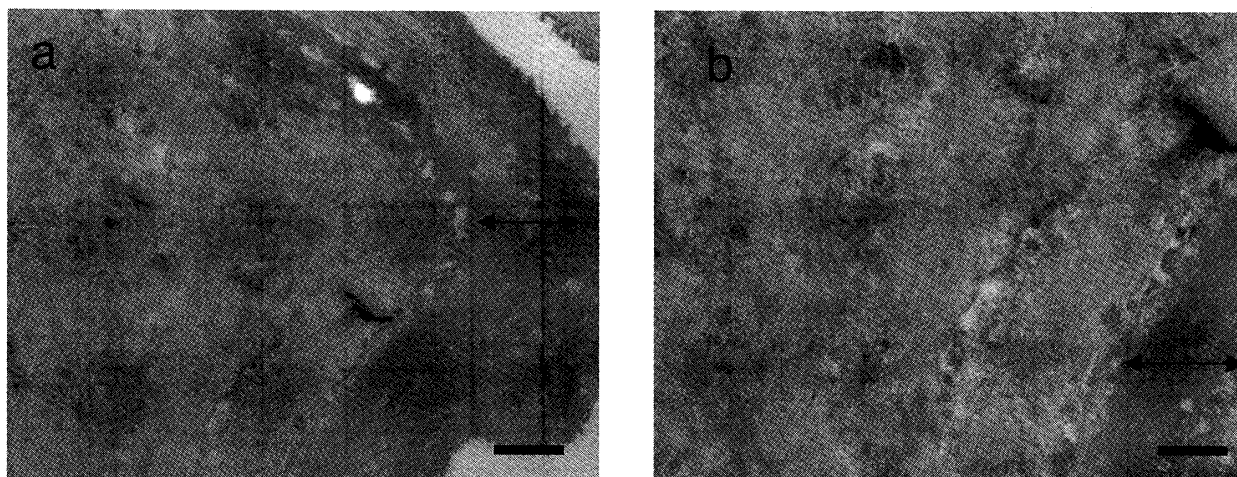


Fig. 4. Immunoelectron microscopy of normal oral mucosa. Few structures similar to those in epithelial cells of oral leukoplakia were observed in normal oral epithelial cells. Scale bar = (a) 2 μ m. (b) : high magnification of an image shown in (a) ; scale bar = 1.25 μ m Twist arrows : stratum corneum

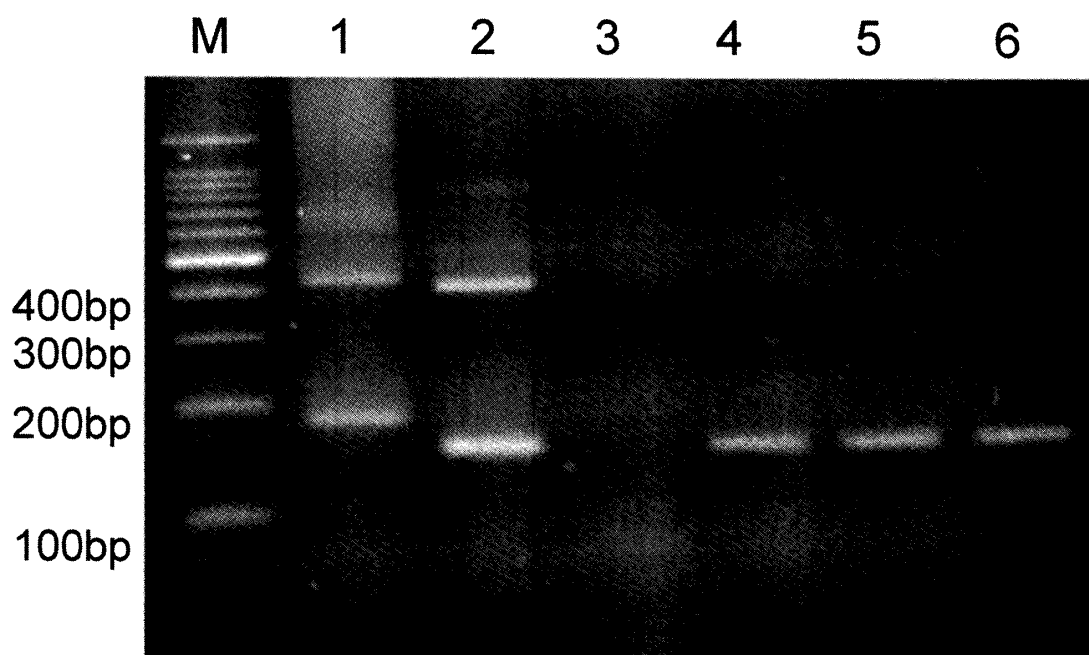


Fig. 5. Electropherogram of second PCR products of *M. salivarium*, *M. orale*, and three oral leukoplakia specimens on a 3% agarose gel stained with ethidium bromide. The second PCR products in three leukoplakia tissues were detected as bands of about 150bp. The location of fragments in the second PCR products was similar to those of *M. salivarium*. Lane M: 100bp DNA ladder; Lane 1 : *M. orale* suspension (positive control); Lane 2 : *M. salivarium* suspension (positive control); Lane 3 : no sample (negative control); Lanes 4 - 6 : leukoplakia.

一方、健全と思われる口腔粘膜上皮細胞では、白板症に認められるような構造物は調べた限りにおいては認められなかった (Figs. 4 - a, b)。

3. PCR による白板症上皮細胞におけるマイコプラズマの有無の検討

Laser microdissection にて採取した白板症上皮細胞から抽出した DNA の nested PCR を行った結果、白板症 3 例とも、2 nd PCR 産物が約150bp のバンドとしてのみ検出され、その位置は対照として用いた *M. salivarium* と一致し、他のバンドは検出されなかった (Fig. 5)。

<i>M. salivarium</i> *	GTTCTTTGAAAACCTGAATTAGACATTGAAAAATTATCAAATCAATATAATATTTCAAAGT	1-60
Sample.1	GTTCTTTGAAAACCTGAATTAGACATTGAAAAATTATCAAATCAATATAATATTTCAAAGT	1-60
Sample.2	GTTCTTTGAAAACCTGAATTAGACATTGAAAAATTATCAAATCAATATAATATTTCAAAGT	1-60
Sample.3	GTTCTTTGAAAACCTGAATTAGACATTGAAAAATTATCAAATCAATATAATATTTCAAAGT	1-60
<i>M. salivarium</i> *	TTAGATCAACCTATAGAATATTCTAATAGACAAACAATAGGTCATACATTATATTTATAC	61-120
Sample.1	TTAGATCAACCTATAGAATATTCTAATAGACAAACAATAGGTCATACATTATATTTATAC	61-120
Sample.2	TTAGATCAACCTATAGAATATTCTAATAGACAAACAATAGGTCATACATTATATTTATAC	61-120
Sample.3	TTAGATCAACCTATAGAATATTCTAATAGACAAACAATAGGTCATACATTATATTTATAC	61-120
<i>M. salivarium</i> *	TATTAATAAGCAAGAGT TT TTGGTGGATGC	121-151
Sample.1	TATTAATAAGCAAGAGTWTWTGGTGGATGC	121-151
Sample.2	TATTAATAAGCAAGAGTWTWTGGTGGATGC	121-151
Sample.3	TATTAATAAGCAAGAGTWTWTGGTGGATGC	121-151

Fig.6. Sequences of *M. salivarium* and the second PCR products of leukoplakia samples 1-3 shown in Fig. 5. The nucleotide length of the second PCR products was 151bp, and their sequences were the same in all three samples. Sequence similarity searching using NCBI BLAST indicated 98% similarity between the sequence of the samples and that of *M. salivarium*. *The sequence of *M. salivarium* is cited from *M. salivarium* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence of *M. salivarium* strain ATCC23064 (NCBI AY786574).

4. PCR産物の塩基配列解析

2 nd PCR産物の塩基配列について検討した結果、白板症3症例とも同一で、その塩基長は151 bpであった (Fig. 6)。BLAST searchingで検索した結果、2 nd PCR産物の塩基配列は *M. salivarium* のスペーサー領域と23S rRNA領域の一部の塩基配列と98%の相同性を示した。

考 察

M. salivarium 菌体を抗原として作製したウサギポリクローナル抗体を用いて、ヒトの口腔白板症の上皮細胞におけるマイコプラズマの細胞内への侵入の有無を免疫電顕にて検討した。免疫電顕は、抗原性の保持が良好な凍結切片法にて行った。また、今回作製した抗体は、*M. salivarium* 感染3T6細胞の免疫電顕による検討で、マイコプラズマに反応性を有し、一方、3T6細胞の細胞質や細胞内の小器官と反応しないことが確認できた。

白板症組織の免疫電顕による観察の結果、上皮細胞の細胞質内に、健常粘膜の上皮細胞では

ほとんどみられない構造物が多数観察された。それらの構造物は高電子密度で、大きさが直径0.5~0.8 μ m、多形性を呈し、内部構造が均一無構造で、マイコプラズマの形態的特徴^{17, 35)}によく一致していた。また、その構造物に一致して金コロイドの付着が認められたことから、白板症上皮細胞への侵入が強く示唆された。

なお、抗体は *M. salivarium* を抗原として作製したが、長澤³⁶⁾による種々のマイコプラズマを感染させたVero細胞を用いた蛍光免疫組織化学による検討では、種々のマイコプラズマに反応性を有することが示されている。従って、免疫組織化学の結果からではマイコプラズマか否か、またマイコプラズマの種類を特定できない。そこで、本研究では、白板症上皮の免疫染色にて陽性反応のある部位から laser micro-dissection system を用いて、上皮細胞を採取した。その上皮細胞から抽出した全DNAを材料として、マイコプラズマ検出セットを用いた nested PCR ならびに PCR産物の塩基配列解析を行った結果、*M. salivarium* と同定され、免疫組織化学で検出された構造物が *M. salivar-*

ium であることが明らかとなった。

マイコプラズマのゲノムサイズは580~1,380 kbp ときわめて小さく²⁴⁾、そのため通常の細菌がもつ合成、代謝経路のすべてはもちえないため、多くの栄養分を外界から取り込んで増殖する必要がある。従来、マイコプラズマは細胞表面に付着し、細胞内には侵入しないと考えられてきたが、最近、ある種のマイコプラズマが細胞内寄生性を有することを示唆する報告がなされている²⁵⁻³¹⁾。Taylor-Robinson ら²⁵⁾は、*M. fermentans*, *M. hominis* を感染させた HeLa 細胞の免疫電顕による観察で、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。Jensen ら²⁶⁾は、*M. 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。また、Andreev ら²⁷⁾は、*M. 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。

口腔から検出されるマイコプラズマは数種類あるが、*M. salivarium* と *M. orale* が優勢で^{20, 21)}、それぞれの検出率は60~80%、30~60%で、口腔常在菌叢の一部を形成し³⁷⁾、おもに歯肉溝や歯垢、唾液中に存在している²⁰⁾。本研究では、3例中3例の白板症の上皮細胞内への *M. salivarium* の侵入を明らかにした。これまで *M. salivarium* の細胞内侵入/寄生性に関する報告はないが、細胞内侵入/寄生性が報告されている他のマイコプラズマと同様に、*M. salivarium* も細胞内侵入/寄生性を有しているものと思われた。

口腔マイコプラズマの病的意義について、現在のところ病原性はないとされている¹⁹⁾が、培養細胞にマイコプラズマの感染が生じると、代謝ならびに増殖への影響、染色体の異常、サイトカイン産生の誘導などの諸変化をきたすことがよく知られている^{38, 39)}。In vivo においても、マイコプラズマが口腔粘膜上皮細胞内に侵入し、感染が成立した場合、培養細胞における変

化と同様の変化が口腔粘膜上皮細胞にも生じる可能性が推測される。事実、白板症にみられる染色体の異常⁴⁰⁾や白板症を有するヒトの唾液中に IL-6 や TNF- α などのサイトカインが検出されている⁴¹⁾が、それらはマイコプラズマ感染の可能性を示唆する。

過去の電顕による白板症の観察において、membrane-coating granules (MCG) と呼ばれる膜に包まれた微細顆粒が認められている^{42, 43)}が、いまだその本態は不明である。Silverman⁴⁴⁾は白板症の有棘細胞層上部の細胞質辺縁部に MCG を認め、正常粘膜の MCG とその構造が異なると述べている。また、小野⁴²⁾も白板症で MCG を認めたと報告している。さらに、Frithiof⁴⁵⁾は口腔粘膜の角化部のみに MCG が存在することから、角化との関連性が示唆されるとしている。本研究の結果から、多くの研究者が白板症での存在を報告している MCG の一部がマイコプラズマである可能性がうかがえるが、従来の電顕の研究は樹脂包埋法によってなされており、一方、本研究での免疫電顕では凍結切片法を用いているため、両者の所見を直接比較できない。これについては今後の研究にゆだねたい。

本研究により、白板症上皮細胞への *M. salivarium* の侵入が示されたが、白板症の発症ならびに進展にどのように関係しているかはまだ不明で、今後口腔粘膜の上皮細胞内に侵入した *M. salivarium* が上皮細胞に及ぼす影響についてより詳細に調べる必要がある。

結 語

口腔マイコプラズマの細胞内侵入と白板症の発症機序との関連性の解明を目的に、ヒト口腔白板症材料を用いて、抗マイコプラズマ・ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学、免疫電顕、laser microdissection により切除した上皮細胞から抽出した DNA の nested PCR、および PCR 産物の塩基配列解析を行い、以下の結果を得た。

1. 白板症組織の凍結切片法による免疫電顕を

行った結果、上皮の顆粒層から有棘層上部の上皮細胞の細胞質に、形態的にマイコプラズマの特徴を有した境界明瞭な構造物が多数観察され、それに一致して金コロイドの付着が認められた。一方、健常と思われる口腔粘膜上皮細胞では、その様な構造物は認められなかった。

2. 3例の白板症組織で、免疫組織化学により陽性を示した上皮細胞におけるマイコプラズマの存在を確認するために、nested PCRを行った結果、*M. salivarium*と同様の塩基長のバンドが検出された。また、2nd PCR産物の塩基配列解析を行った結果、3例のいずれもが151塩基対で、*M. salivarium*に98%の相同性を有していた。

以上の結果から、口腔マイコプラズマは口腔粘膜上皮細胞に侵入し得ることが明らかとなり、口腔マイコプラズマは白板症発症機序に深く関わっている可能性が強ク示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました口腔外科学第一講座 水城春美教授に厚くお礼申し上げます。また、数々のご指導とご協力を頂きました本学医学部バイオイメージングセンター 遠山稿二郎教授、石田欣二先生、本学歯学部口腔病理学講座 武田泰典教授、畠山節子准教授、口腔解剖学第一講座 野坂洋一郎教授、口腔微生物学講座 木村重信教授に深く感謝いたします。さらに、絶えず温かいご支援ならびにご協力をいただきました口腔外科学第一講座、口腔病理学講座、口腔解剖学第一講座、バイオイメージングセンターの諸先生に感謝いたします。最後になりましたが、快く本実験に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。

なお、本論文の要旨は第16回日本口腔粘膜学会（平成18年6月30日～7月1日、新潟市）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）の補助をうけ、実施した。

文 献

- 1) Pindborg, J. J., Reichart, 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) 水城春美：口腔粘膜の角化性病変—口腔白板症ならびに扁平苔癬の臨床病理と病因—, 岩医大歯誌, 27:67-73, 2002.
- 4) van der Waal, I., Schepman, K. P., van der Meij, E. H., and Smeete, L. E.: Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol.* 33 : 291-301, 1997.
- 5) 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.
- 6) Ferenczy, A., Braum, L., and Shah, K. V.: Human papillomavirus(HPV) in condylomatous lesion of cervix. *Am. J. Surg. Pathol.* 5 : 661-670, 1981.
- 7) D' Costa, J., Saranath, D., Dedhia, P., Sanghvi, V., and Mehta, A. R.: Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. *Oral Oncol.* 34 : 413-420, 1998.
- 8) 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.* 82 : 57-68, 1996.
- 9) Mao, E.-J., Scwartz, S. M., Dalin, J. R., Oda, D., Tickman, L., and Beckman, A. M.: Human papilloma virus and p53 mutation in normal, pre-malignant and malignant oral epithelia. *Int. J. Cancer.* 69 : 152-158, 1996.
- 10) Sand, L., Jalouli, J., Lasson, P. A., and Hirsch, J. M.: Human papilloma viruses in oral lesion. *Anticancer Res.* 20 : 1183-1188, 2000.
- 11) Campisi, G., Giovannelli, L., Arico, P., Lama, A., Liberto, C. D., Ammatuna, P., and D' Angelo, M.: HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 98 : 705-711,

- 2004
- 12) Zeuss, M. S., Miller, C. S., and White, D. K.: In situ DNA hybridization analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesion. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 71 : 714-720, 1991.
 - 13) 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.
 - 14) Kannan, S., Balaram, P., Pillai, M. R., Chandran, G. J., and Nair, M. K.: Ultrastructural variations and assessment of malignant transformation risk in oral leukoplakia. *Path. Res. Pract.* 189 : 1169-1180, 1993.
 - 15) Scully, C., Prime, S., and Maitland, N.: Papilloma-viruses: Their possible role in oral disease. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 60:166-174, 1985.
 - 16) Mizuki, H.: In situ staining with DNA-binding fluorescent dye, Hoechst 33258, to detect microorganisms in epithelial cells of oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 37 : 521-526, 2001.
 - 17) Willet, H. P.: Mycoplasma, Joklik, W. K., Willet, H. P., Amos, D. B., and Wilfert, C. M.: Zinsser microbiology, 20th ed. Prentice-Hall International, London, pp730-737, 1992.
 - 18) Carson, J. L., Hu, P. C., and Collier, A. M.: Cell structural and functional elements: Maniloff, J., McElhaney, R. N., Finch, L. R., and Baseman, J. B.: Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis, ASM press, Washington, DC, pp63-72, 1992.
 - 19) Blanchard, A. and Bebear, C. M.: Mycoplasmas of human, Razin, S and Herrman, R.: Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp45-71, 2002.
 - 20) Watanabe, T., Matsuura, M., and Seto, K.: Enumeration, isolation, and species identification of mycoplasma 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.
 - 21) 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.
 - 22) Cassel, G., and Cole, B. C.: Mycoplasmas as agents of human disease. *N. Engl. J. Med.* 304 : 80-89, 1981.
 - 23) Waites, K. B., Rikihisa, Y., and Taylor-Robinson, D.: Mycoplasma and Ureaplasma, Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. C., and Tenover, R. H.: Manual of clinical microbiology, ASM press, Washington, DC, pp972-990, 2003.
 - 24) Razin, S., Yogeve, D., and Naot, Y.: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1094-1156, 1998.
 - 25) Taylor-Robinson, D., Davies, H. A., Sarathchandra, P., and Furr, P. M.: Intracellular location of mycoplasmas in cultured cell demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. *Int. J. Exp. Path.* 72:705-714, 1991.
 - 26) 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. Pathol.* 75:91-98, 1994.
 - 27) 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.
 - 28) Tarshis, M., Yavlovich, A., Katzenell, A., Ginsburg, I., and Rottem, S.: Intracellular location and survival of *Mycoplasma penetrans* within HeLa cells. *Curr. Microbiol.* 49 : 136-140, 2004.
 - 29) Winner, F., Rosengarten, R., and Citti, C.: In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect. Immun.* 68:4238-4244, 2000.
 - 30) Yavlovich, A., Katzenell, A., Tarshis, M., Higazi, A. A., and Rottem, S.: *Mycoplasma fermentans* binds to and invades HeLa cells: involvement of plasminogen and urokinase. *Infect. Immun.* 72:5004-5011, 2004.
 - 31) Yavlovich, A., Tarshis, M., and Rottem, S.: Internalization and intracellular survival of *Mycoplasma pneumoniae* by non-phagocytic cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 233 : 241-246, 2004.
 - 32) Akagi, T., Ishida, K., Hanasaka, T., Hayashi, S., Watanabe, M., Hashikawa, T., and Tohyama, K.: Improved methods for ultracryotomy of CNS tissue for ultrastructural and immunogold analysis. *J. Neurosci. Methods* 153 : 276-282, 2006.
 - 33) Tokuyasu, K. T.: Use of polyvinylpyrrolidone and polyvinyl alcohol for cryoultramicrotomy. *Histochem. J.* 21 : 163-171, 1989.
 - 34) Tokuyasu, K. T.: A technique for ultracryotomy of cell suspension and tissues. *J. Cell. Biol.* 57 : 551-565, 1973.
 - 35) Takade, A., Amako, K., Moriya, T., and Nakamura, M.: Structure of *Mycoplasma salivarium* examined by the freeze substitution method. *Microbiol. Immunol.* 30:827-830, 1986.
 - 36) 長澤 大: 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—, 岩医大歯誌, 33 : 印刷中
 - 37) Taylor, P.: Medical significance of mycoplasmas, Miles, R., and Nicholas, R.: Mycoplasma Protocols. Human Press, Totowa, pp 7-15, 2002.
 - 38) Rottem, S., and Barile, M. F.: Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol.* 11:143-151, 1993.
 - 39) 渡邊継男: ヒト口腔マイコプラズマによる培養

- 細胞の汚染とその影響, 北海道歯誌, 21 : 155-157, 2000.
- 40) Takahashi, M., Shimada, K., Kurasawa, Y., Uzawa, K., and Tanzawa, H.: Chromosomal aberrations in oral precancerous lesion, leukoplakia. 千葉医学, 79 : 91-95, 2003.
- 41) Brailo, V., Vucicevic-Boras, V., Cekic-Arambasin, A., Alajbeg, I. Z., Milenovic, A., and Lukac, J.: The significance of salivary interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 42:370-373, 2006.
- 42) 小野富昭: 口腔粘膜における病的角化に関する電子顕微鏡的観察. 口病誌, 37 : 312-337, 1970.
- 43) Hayward, A. F.: Membrane-coating granules. *Int. Rev. Cytol.* 59:97-127, 1971.
- 44) Silverman, S., and Kearns, G.: Ultrastructural localization of acid phosphatase in human buccal epithelium. *Arch. oral Biol.* 15 : 169-177, 1970.
- 45) Frithiof, L., and Wersaell, J.: A highly ordered structure in keratinizing human oral epithelium. *J. Ultrastruct. Res.* 12:371, 1965.