

免疫組織化学による口腔扁平苔癬の上皮における マイコプラズマの局在の検討

松本 誠

岩手医科大学歯学部口腔外科学講座顎口腔外科学分野

(主任：水城 春美 教授)

(受付：2010年1月18日)

(受理：2010年2月15日)

Abstract : Oral lichen planus (OLP) is a chronic inflammatory oral mucosal disease of unknown etiology. The histology of OLP includes hyperkeratosis, degeneration of basal cells, and dense subepithelial infiltration of T cells. Leukoplakia is a typical hyperkeratosis lesion in oral mucosa, and a previous study of leukoplakia showed intracellular location of oral mycoplasma in the epithelial cells of leukoplakia. Then, this study was performed to examine intracellular location of mycoplasma in the epithelial cells of OLP similar to leukoplakia. Thirty-five formalin fixed, paraffin-embedded specimens of OLP were examined, and fifteen normal mucosa specimens were used as controls. To compare between OLP and leukoplakia, twenty-four specimens with leukoplakia were examined. In 32 of 35 (91.4%) specimens with OLP, fluorescing structures were observed, while 5 of 15 (33.3%) specimens with normal mucosa were positive. In OLP, positive reactions were observed in the lower part of the epithelium rather than in the upper part of the epithelium. Especially, a lot of fluorescing structures were observed in basal cells. However, few or no structures were detected in basal cells of leukoplakia. These findings suggest that intracellular localization of mycoplasma is related to onset and evolution in OLP as well as in leukoplakia. And the presence and amounts of mycoplasma in the basal cells are thought to be related to the difference between OLP and leukoplakia.

Key Words : oral lichen planus, fluorescent immunohistochemistry, oral mycoplasma, intracellular location

Detection of mycoplasma in the epithelial cells of oral lichen planus by immunohistochemistry
Makoto MATSUMOTO
Division of Maxillofacial Surgery, 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

口腔扁平苔癬 (oral lichen planus ; 以下 OLP と略す) は、粘膜にみられる慢性炎症性病変で、その発症に細胞性免疫が関与していると考えられているが、病因は不明である¹⁾。OLP は頬や歯肉、舌に好発し、しばしば両側性、対称性に、あるいは多発性に発症する²⁾。また、好発年齢は中高年で、性別では女性に多い^{1, 2)}。罹患率は 0.4~2.6%¹⁾ と報告者によって、あるいは人種や民族によって異なるが、本邦では Ikeda ら³⁾ が 0.5% と報告している。

OLP は、臨床的には線状、丘疹状、斑状などの白色病変と、発赤あるいはびらん、潰瘍などが混在した状態として認められる^{1, 2, 4)}。白斑を主体とする OLP では症状に乏しく、びらん、潰瘍を伴う症例では接触痛や灼熱感などの自覚症状を有する。病理組織学的には角化亢進、軽度の有棘細胞層の肥厚、顆粒層の出現、基底細胞の破壊、基底膜部の液化変性、上皮直下における帯状のリンパ球浸潤などを特徴とする^{1, 4, 5)}。

OLP の発症原因として、従来から、薬物、歯科用材料、慢性肝炎、精神的ストレスなどの情緒的因子、遺伝的素因、微生物感染、外科的侵襲を含む外傷などがあげられている^{1, 6)} が、病因は未だ不明である。一方、OLP では上皮直下の T リンパ球の浸潤が特徴的であることから、OLP の発症機序において細胞性免疫の異常が関与していることが推測されているが、T リンパ球の浸潤を引き起こす原因や病態形成のメカニズムは未だ明らかでない^{1, 4)}。

OLP の病因が不明であるのに対して、歯科用金属や薬物などに対するアレルギー反応が原因と考えられる苔癬様病変 (lichenoid lesion)⁷⁾ がある。しかし、苔癬様病変は OLP ときわめて類似していることから両者の鑑別は困難で、苔癬様病変の存在が OLP の病因解明や診断、治療を一層難しくしている。

口腔粘膜の過角化性変化を示す最も代表的な病変として白板症が知られている。口腔白板症

も OLP と同様に、その発症原因はまだ明らかでないが、当教室の川村⁸⁾ は、口腔白板症の上皮細胞内に *Mycoplasma salivarium* を検出し、口腔白板症の上皮細胞における口腔マイコプラズマの侵入/寄生を明らかにした。また、当教室の長澤⁹⁾ はウサギ・ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的検索を行い、口腔白板症の上皮細胞におけるマイコプラズマの侵入/寄生と粘膜上皮の過角化との間に強い関連のあることを示した。

OLP と口腔白板症は通常、臨床所見から両者を鑑別することは比較的容易であるが、ときに鑑別が困難な場合もあり、また両者とも過角化を呈し、好発年齢や好発部位などの類似点も少なくない。さらに、口腔白板症は従来から前癌病変に分類され、OLP も、癌化率は異なるが、口腔白板症と同様にときに癌化することのある疾患として扱われている¹⁰⁾。

そこで、本研究は OLP の病因の解明の一助となることを目的として、OLP と口腔白板症の類似点に着目し、OLP 組織における口腔マイコプラズマの侵入/寄生の有無を免疫組織化学により検討した。併せて、口腔白板症における免疫組織化学的所見との比較検討を行った。

材料と方法

1. 材料

1) Hoechst 33258 を用いた DNA 蛍光染色
DNA 蛍光染色の試料として、2008 年 9 月~2009 年 3 月に岩手医科大学附属病院歯科医療センター第一口腔外科を受診し、OLP と臨床診断され、診断確定の目的で生検を行った患者 4 名から採取した生検組織の一部を用いた。試料を採取した 4 例は、いずれも病理組織検査において OLP との診断を得た。

2) 抗マイコプラズマ抗体を用いた OLP の免疫組織化学

1999 年 1 月から 2008 年 12 月に本学附属病院歯科医療センター第一口腔外科を受診し、生検によって OLP と診断された 35 例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を OLP の蛍光免

疫組織化学の材料として用いた。35例の内訳は、男性が11名、女性が24名で、年齢は37~77歳(平均61.0 ± 13.0歳)であった。また、部位別では頬部が20例、歯肉が8例、口唇が4例、舌が3例であった(表1)。

表1：今回の研究に用いたOLP群の年齢、性別、発生部位、抗マイコプラズマ抗体を用いた免疫組織化学の結果および陽性所見の分布

番号	年齢	性別	部位	染色結果	染色分布
1	38	女	歯肉	+	上≒下
2	48	女	歯肉	+	上≒下
3	65	女	頬部	+	上≒下
4	73	男	舌	+	上<下
5	58	男	頬部	+	上<下
6	77	女	頬部	+	上≒下
7	71	女	口唇	+	上≒下
8	62	男	頬部	+	上<下
9	60	女	頬部	+	上<下
10	69	女	歯肉	+	上≒下
11	40	女	歯肉	+	上≒下
12	77	女	歯肉	+	上<下
13	46	男	歯肉	+	上<下
14	53	女	頬部	+	上≒下
15	75	男	歯肉	+	上<下
16	76	女	歯肉	+	上<下
17	75	女	口唇	+	上≒下
18	50	男	頬部	+	上<下
19	48	女	頬部	+	上<下
20	48	女	口唇	+	上<下
21	37	女	舌	+	上<下
22	74	女	頬部	+	上≒下
23	52	男	頬部	+	上>下
24	75	女	頬部	+	上>下
25	64	女	頬部	+	上<下
26	63	男	頬部	-	
27	59	女	頬部	-	
28	77	女	頬部	+	上>下
29	65	女	頬部	-	
30	61	女	頬部	+	上>下
31	31	男	頬部	+	上>下
32	67	男	頬部	+	上>下
33	64	女	頬部	+	上>下
34	75	女	舌	+	上>下
35	61	男	口唇	+	上>下

表2：今回の研究に用いた対照群の年齢、性別、病理組織診断および抗マイコプラズマ抗体を用いた免疫組織化学の結果

番号	年齢	性別	切除の原因となった疾患	染色結果
1	42	男	線維性過形成性	-
2	46	男	慢性炎症	+
3	44	女	脂肪腫	+
4	42	男	粘液嚢胞	-
5	48	女	小唾液腺	-
6	11	女	粘液嚢胞	-
7	31	男	粘液嚢胞	-
8	62	男	粘液嚢胞	-
9	25	男	多形腺腫	-
10	54	男	扁平上皮癌	+
11	67	男	扁平上皮癌	+
12	31	男	扁平上皮癌	-
13	57	女	海綿状血管腫	+
14	65	男	線維性過形成	-
15	46	男	石灰化上皮性歯原性腫瘍	-

表3：今回の研究に用いた口腔白板症群の年齢、性別、抗マイコプラズマ抗体を用いた免疫組織化学の結果および陽性所見の分布

番号	年齢	性別	染色結果	染色分布
1	53	女	+	上≒下
2	70	男	+	上≒下
3	73	女	+	上≒下
4	58	女	+	上≒下
5	51	女	+	上≒下
6	53	男	+	上≒下
7	44	男	+	上≒下
8	71	女	+	上≒下
9	47	女	+	上>下
10	78	女	+	上≒下
11	79	女	+	上≒下
12	70	男	+	上>下
13	57	女	+	上≒下
14	76	女	+	上>下
15	45	男	+	上≒下
16	77	女	+	上≒下
17	48	女	+	上≒下
18	70	男	+	上≒下
19	70	男	+	上≒下
20	54	男	+	上≒下
21	75	男	+	上≒下
22	56	女	+	上>下
23	57	男	+	上≒下
24	67	男	+	上≒下

3) 対照症例および白板症組織の免疫組織化学

健常対照として、粘液嚢胞などの疾患で手術摘出されたもののうち、健常粘膜を含む15例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた。15例の内訳は、男性が11例、女性が4例で、年齢は11~67歳(平均 44.7 ± 15.5 歳)であった。部位別では口唇粘膜が7例、歯肉が3例、舌が3例、頬粘膜が1例、口蓋粘膜が1例であった(表2)。

また、OLPにおける陽性反応の発現状態を口腔白板症におけるそれと比較することを目的に、2001年から2005年に本学附属病院歯科医療センター第一口腔外科にて、生検によって口腔白板症と診断された症例で、上皮性異形成を伴わない24例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた。24例の性別は男性が11例、女性が13例で、平均年齢は44~79歳(平均 62.5 ± 11.6 歳)であった(表3)。

なお、試料採取に際しては、患者に生検の前に本研究の趣旨を説明して、切除組織の一部を本研究へ使用することの同意を得た。また、試料の研究への使用およびパラフィン包埋標本の使用については、岩手医科大学歯学部倫理委員会の承認を得て行った(承認番号:01077および01089)。

2. 方法

1) Hoechst 33258を用いたDNA 蛍光染色

採取した試料は、未固定のままただちにOCTコンパウンドに包埋し、薄切するまで -80°C で保存した。Mizuki¹¹⁾が白板症組織で行ったのと同様の方法で染色した。すなわち、Hoechst 33258 5mg、滅菌蒸留水 90ml、1%チメロサル 10mlを混合し、30分間攪拌した後、孔径 $0.22 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターにてろ過し、Hoechst 33258 保存液を作製した。 4°C で保存し、使用時、Hoechst 33258 保存液 0.5mlを滅菌蒸留水 100mlで希釈し、染色液とした。

保存しておいた凍結標本をクライオスタットにて厚さ $5 \mu\text{m}$ に薄切し、MASコートスライドガラス(松浪ガラス)に貼付し、約30分間風

乾させた。切片を貼付したスライドガラスを酢酸とメタノールを1:3で混合した固定液に10分間浸漬し、固定した。再度風乾した後、Hoechst 33258 染色液に室温、30分間浸漬した。次いで蒸留水で3回洗浄し、風乾後、封入液(0.1Mクエン酸 22.2ml, 0.2Mリン酸二ナトリウム 27.8ml, グリセロール 50ml)で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

2) 抗マイコプラズマ抗体を用いた蛍光免疫組織化学

免疫組織化学に先立ち、OLPのパラフィン包埋標本をマイクロトームにて $4 \mu\text{m}$ に薄切し、脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、顕微鏡にて観察した。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、顕微鏡にて観察し、組織学的に健常粘膜であることを確認した。白板症標本もHE染色後、顕微鏡にて観察し、上皮性異形成を伴わないことを確認した。

これら標本の免疫組織化学では、薄切切片をMASコートスライドガラス(松浪ガラス)に貼付し、脱パラフィンの後に、アルコール系列による脱水を行った。トリス塩酸緩衝液(pH7.6)(TBST)にて標本を洗浄後、Catalyzed Signal Amplification (CSA) II Biotin-free Tyramide Signal Amplification System (Dako Cytomation)を用いて蛍光免疫組織化学を行った。すなわち、0.3M NaCl, 0.1%Tween20 (Sigma-Aldrich Co) 含有0.05Mの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。その後、抗マイコプラズマ・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。なお、使用した一次抗体は長澤⁹⁾ならびに川村⁸⁾が白板症におけるマイコプラズマの検出に用いた抗マイコプラズマ・ウサギポリクローナル抗体と同じものである。一次抗体の希釈にはTween20含有抗体希釈用緩衝液(DakoCytomation)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) (DakoCytomation) を用い, 室温で1時間反応させた. 二次抗体は StabilZyme HRP (SurModics Inc) 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. 遮光下で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 II (Vysis, Downers Grove) にて対比染色を行い, カバーガラスを

載せ, 周囲にマニキュアを滴下してカバーガラスを固定した. これらの標本を共焦点レーザー走査顕微鏡 LSM 510 META (Carl Zeiss) を用いて, それぞれの標本における陽性反応の有無, 局在について観察した.

3) 健常対照ならびに白板症組織の免疫組織化学染色との比較

まず, OLP 症例群と対照の健常粘膜群の上皮における陽性率の違いを χ^2 検定にて有意差の有無を検討した.

ついで, OLP 標本と白板症標本における蛍

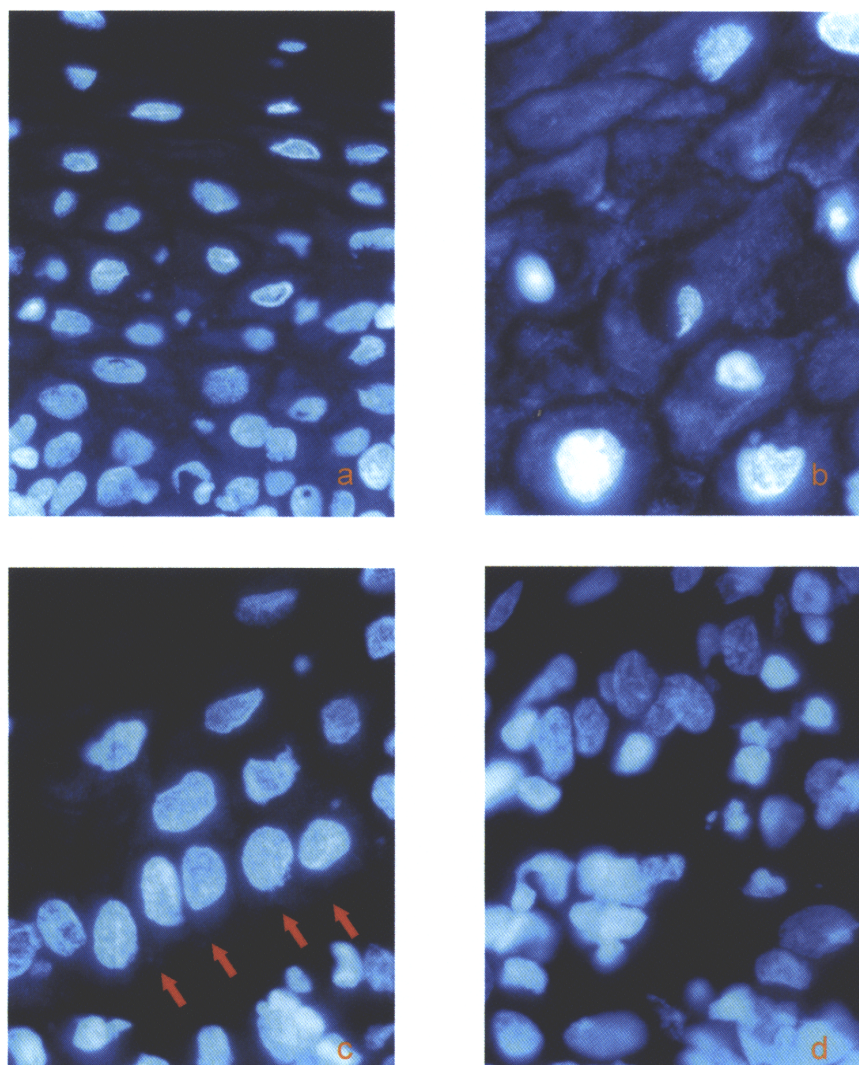


図1. OLP に対する Hoechst 33258 を用いた DNA 蛍光染色所見 (a, $\times 100$; b~d, $\times 400$;). 表層 (a 上方) には核周囲の蛍光像はほとんど見られないが, 深層 (a 下方) に行くに従い, 核周囲に蛍光像が認められる. 陽性所見を呈した有棘層下部では, 上皮細胞の核周囲に蛍光像が認められる (b). 基底細胞においても細胞質内に微細な蛍光像が観察される (c, 矢印) が, 固有層には核周囲の蛍光像は認められない (d).

光免疫組織化学の陽性反応の発現状態を比較した。両者の各標本の上皮層を上下におおよそ二等分し、上部（浅層）と下部（深層）の染色反応の有無と染色の強度を比較した。なお、上皮層を上下に分ける際に、免疫染色で陰性を呈する角化層は除外した。上皮層の上部と下部の陽性所見の発現状態によって、上皮層の上部が下

部よりも強く染色されているものを「上>下群」、上部から下部までほぼ均一に染色されているものを「上≒下群」、下部が上部よりも強く染色されているものを「上<下群」の3群に分け、陽性反応の分布の違いを χ^2 検定により検討した。

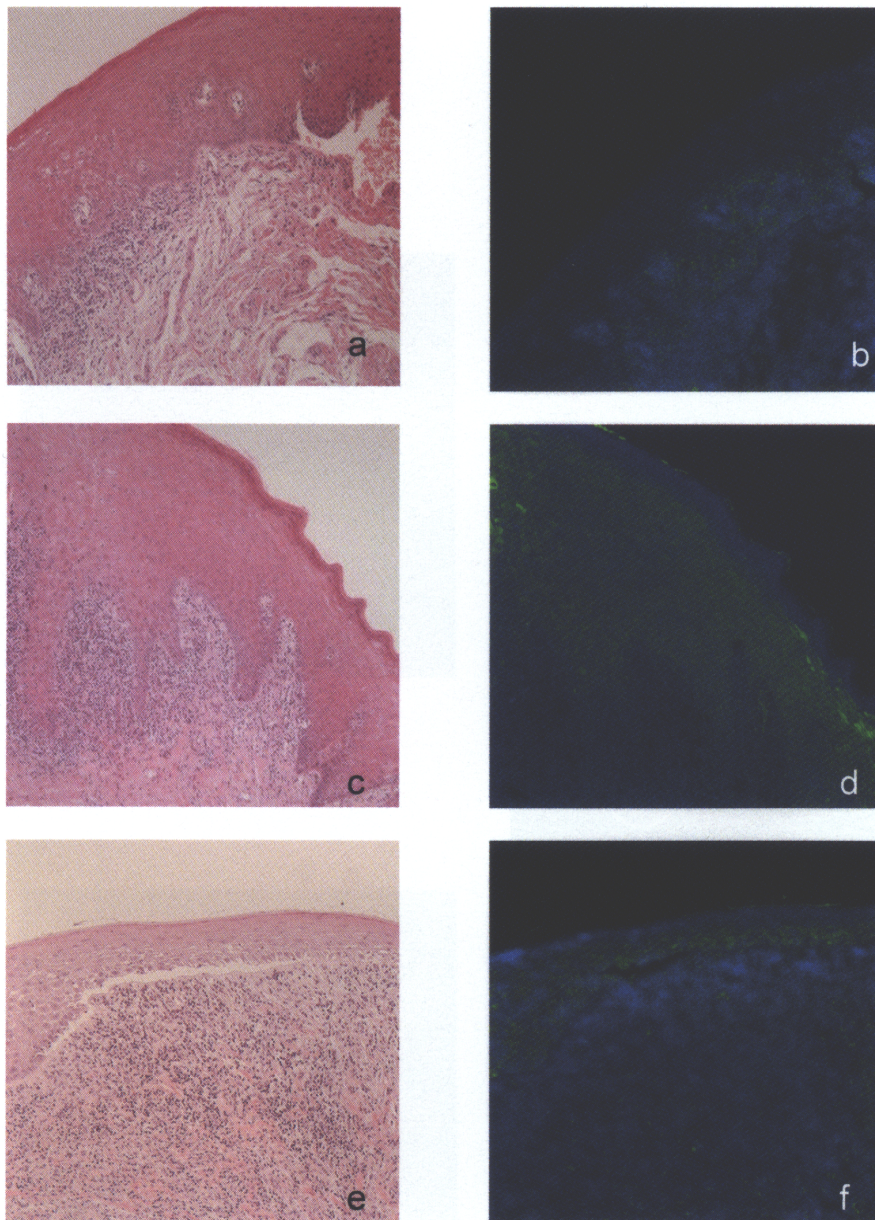


図2. OLP に対する HE 染色 (a, c, e, $\times 100$) と抗マイコプラズマ抗体を蛍光免疫組織化学所見 (b, d, f, $\times 100$). 免疫組織化学の所見では、上皮細胞に陽性所見が認められる。上皮層の有棘層下部から基底層が染色されるものも見られるが (b), 上皮層の全層にわたって陽性反応が認められる症例もある (d)。また、上皮が著しく委縮した症例においても上皮内に陽性反応が認められる (f)。

結 果

1. Hoechst 33258 を用いた DNA 蛍光染色による検討

4 例の Hoechst 33258 による DNA 蛍光染色の結果, 4 例とも OLP 病変の上皮細胞の核周囲の細胞質に微細な蛍光像が観察された (図 1 a~c). 陽性所見を呈する上皮細胞は上皮の上部よりも下部に多く観察され, 基底細胞でも蛍光像が観察された (図 1c). 固有層においては, 核のみに陽性所見が認められ, 細胞間や細胞質では微細な蛍光像はほとんど観察されなかった

(図 1d).

2. 抗マイコプラズマ抗体を用いた免疫組織化学的検討

35 例の OLP のうち, 陽性を呈したものは 32 例 (91.4%) であり, 3 例 (8.6%) が陰性であった. (表 1).

抗マイコプラズマ抗体に陽性を呈した OLP の弱拡大では, 表層の角化層は陰性で, 角化層を除いた上皮層全体あるいは有棘層下部から基底層にかけての上皮層の下部に緑色の蛍光が観察された (図 2 b, d, f). 強拡大では, 細胞間隙や上皮細胞の細胞質に微細な緑色の蛍光像が観

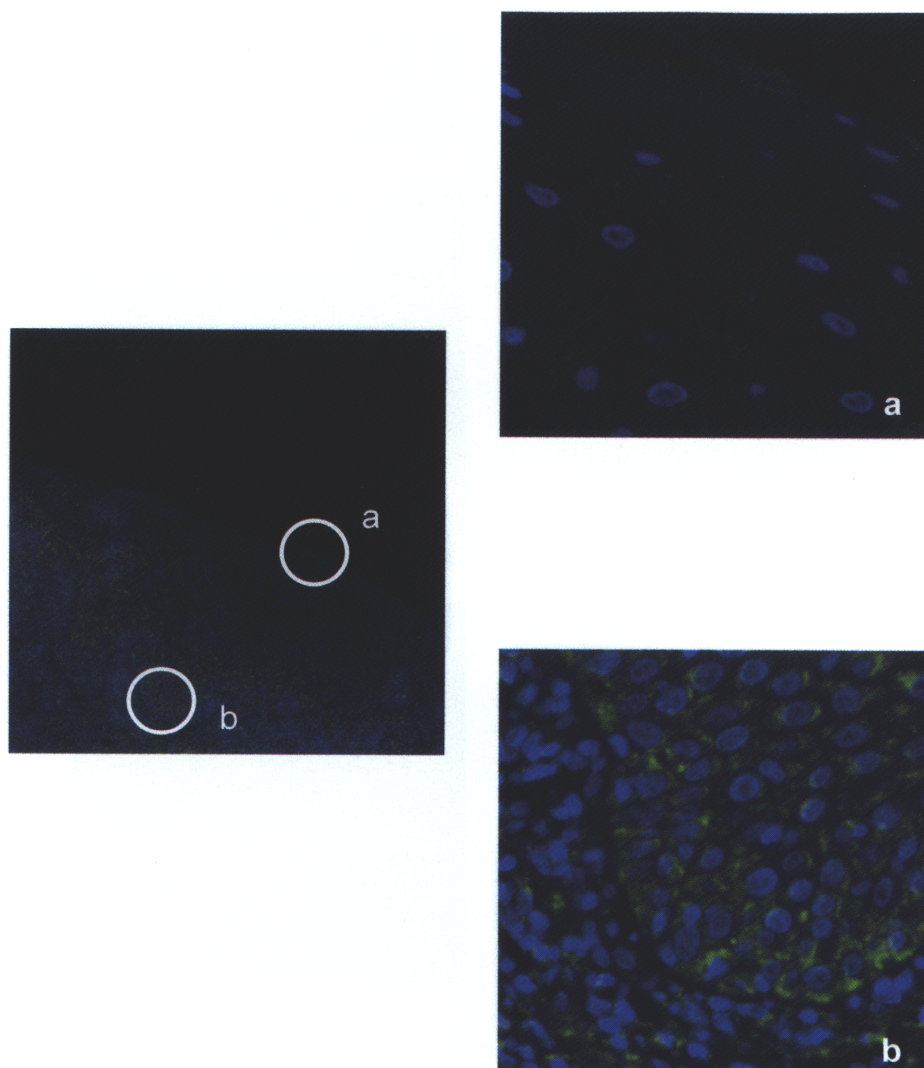


図3. OLP 組織に対する免疫組織化学の強拡大像. 顆粒層 (a; $\times 630$) と比較し, 有棘層下部から基底層 (b; $\times 630$) にかけて微細な顆粒状の蛍光像が多数観察される.

察されたが、上皮層における部位の違いによって蛍光の強度に違いが認められた(図3)。すなわち基底細胞層では陽性を呈する細胞が多く、とくに基底膜に沿って緑色の蛍光像が多く観察された(図3b)。

なお、症例によって、あるいは同一症例でも部位によって、固有層でも種々の程度に蛍光が

観察されたが、この蛍光は細胞質内よりも細胞間に多く認められた(図3b)。

同一切片内に OLP 組織と健常組織と思われる組織を含む症例においては、OLP 組織の上皮において陽性所見が認められたのに対し、健常部分の上皮では、陽性所見が全く認められないか、あるいはわずかに認められるにすぎない

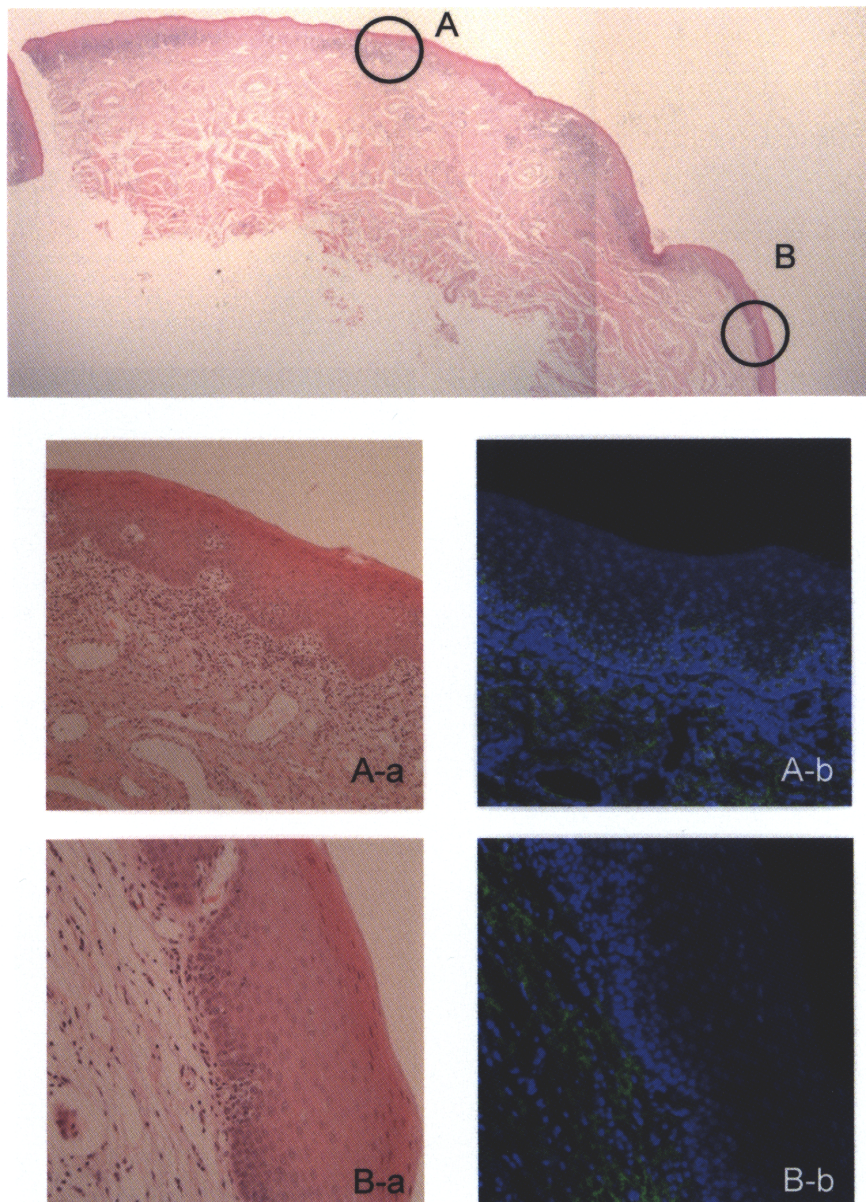


図4 OLP 組織の同一切片内における部位による陽性反応所見の差。

HE 染色を施した OLP (A-a, $\times 200$) と OLP に隣在する健常粘膜部位 (B-a, $\times 200$)。OLP の部位では免疫組織化学により上皮に蛍光像が見られる (A-b, $\times 200$)。一方、健常粘膜部では、蛍光像は観察されないか、あるいはごくわずかに観察されるにすぎない (B-b, $\times 200$)。

かった (図4 A-b, B-b).

3. 健常対照ならびに白板症組織の免疫組織化学染色との比較

対照とした健常粘膜15例においては、上皮細胞に蛍光像はほとんど認められないか、あるいは上皮層内にわずかに陽性所見が認められるにすぎなかった (表2, 図5b, d). これらのうちわずかに陽性を示したのは5例 (33.3%) であり、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 (図5d).

OLP群と対照群の抗マイコプラズマ抗体の陽性率を比較したところ、OLP群における陽性率 (91.4%) は対照群の陽性率 (33.3%) よりも有意に高かった ($P < 0.05$).

24例の上皮性異形成を伴わない口腔白板症

例に免疫染色を施したところ、全例において陽性所見が認められた (図6 b, d, f, 表3). しかし、基底細胞は陰性か、一部の基底細胞がわずかに陽性を呈する程度であった (図6).

上皮層で陽性を呈した32例のOLPについて、その発現部位をみると、「上>下群」が3例 (9.4%), 「上≒下群」が10例 (31.3%), 「上<下群」が19例 (59.4%) で、3群中「上<下群」がもっとも多かった (図7, $P < 0.05$).

一方、口腔白板症の24例では、「上≒下群」が20例 (83.3%), 「上>下群」が4例 (16.7%) で、「上<下群」はなかった (図7). 検定の結果、口腔白板症では3群中「上≒下群」が最も多く ($P < 0.05$), OLPにおける陽性所見の分布との違いが認められた (図7).

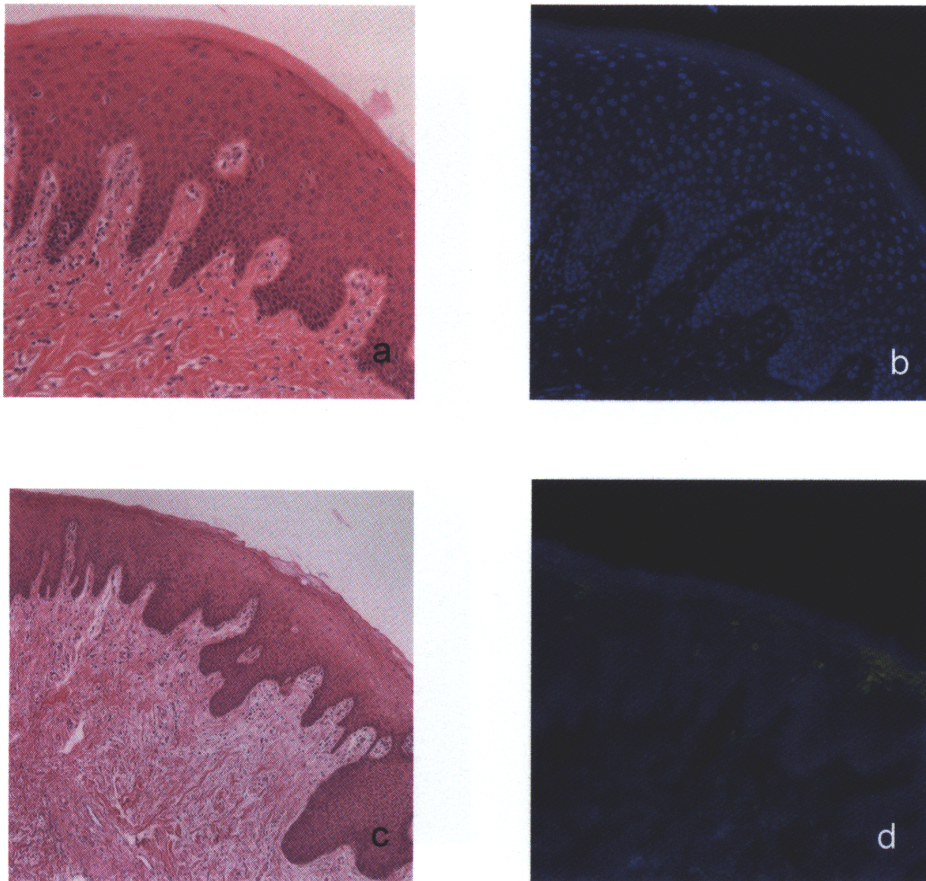


図5. 他の疾患によって切除された病変の正常粘膜部位に対するHE染色 (a, $\times 200$; c, $\times 100$) と、蛍光免疫組織化学 (b, $\times 200$; d, $\times 100$). 蛍光像はほとんど観察されないか (b, $\times 200$) 観察されてもわずかであり、また、陽性反応を呈する部位は上皮直下に限られていた (d $\times 100$).

また、OLP では基底細胞に陽性所見が多く認められたのに対して、口腔白板症では基底細胞は陰性かわずかに陽性を呈するのみで、基底細胞層における発現にも違いが認められた。

考 察

OLP は局所の免疫反応によると考えられているが、その病因および発症機序は未だ解明されていない^{1,4)}。OLP では、組織学的に上皮直下の帯状の T リンパ球の浸潤が特徴的であることから、微生物感染も重要な因子と推測されている^{4,6)}。Nagao ら¹²⁾ は HCV 感染例の慢性活動性肝炎および原発性胆汁性肝硬変症例に OLP の発症を見ることが多いと報告し、HCV 感染例を RT-PCR 法で検索した結果、OLP 患者 19 例中 13 例 (68.4%) に HCV が検出され、

OLP と HCV の関連性を示唆している。一方、Robae ら¹³⁾ は OLP と全身性の疾患はしばしば偶発的に併発するとし、HCV と OLP の関与を否定している。また、Karin ら¹⁴⁾ は HCV 感染 134 例中、OLP が認められたのは 2 例 (1.5%) に過ぎず、HCV と OLP に相関関係は認められないと報告している。従って、HCV 感染と OLP 発症との因果関係は明らかでない¹⁵⁻¹⁷⁾。一方、Cui ら¹⁸⁾ は、*in situ* hybridization 法により OLP 患者における Epstein-Barr virus (EBV) の感染を検討した。その結果、8 例中 7 例 (87.5%) に EBV のゲノムが認められ、EBV-encoded small RNAs (EBER) および *Bam*H fragment of lower standard frame (EHLF) 陽性リンパ球の labelling index が、他の疾患に比較して有意に高値を示し、OLP の病因に EBV

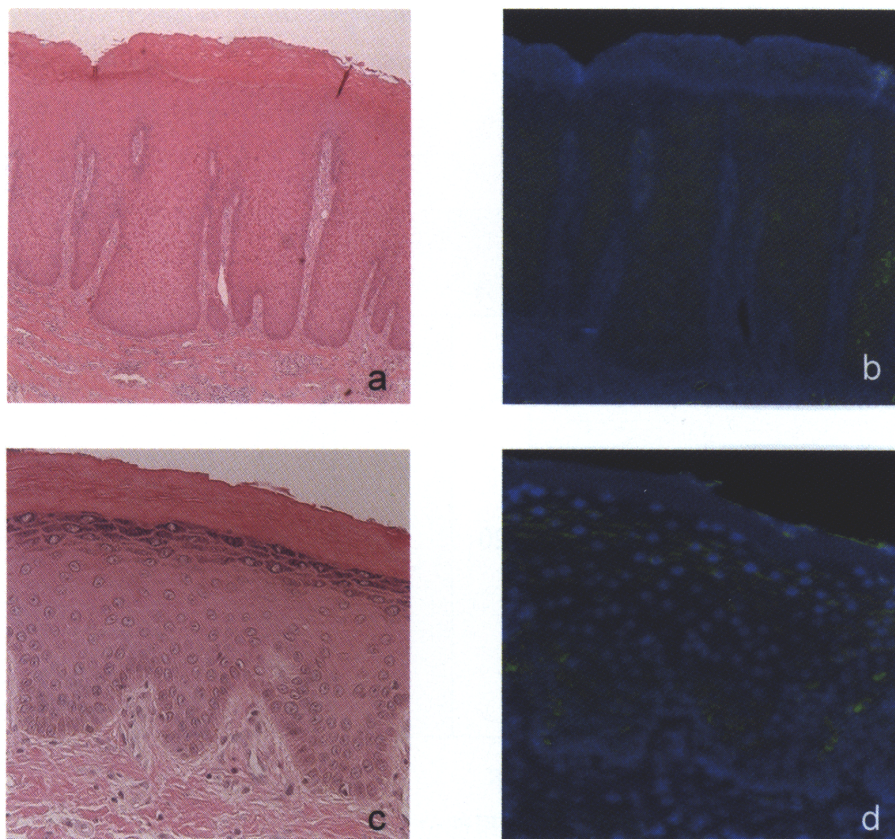


図6. 上皮異形成を伴わない口腔白板症組織の HE 染色 (a, $\times 100$; c, $\times 200$) と免疫組織化学所見 (b, $\times 100$; d, $\times 200$)。免疫組織化学では、上皮層の全層にわたって陽性反応が認められるもの (b) や、角化層直下から有棘層上部に陽性反応が認められるもの (d) があった。

が関与している可能性がある」と報告しているが、HCV 感染と同様、OLP の発症との関連は述べられていない。

本研究は、OLP と口腔白板症との類似点、とくに過角化性変化に着目して研究を行った。すなわち、川村⁸⁾ および長澤⁹⁾ による口腔白板症におけるマイコプラズマの有無の検討で、上皮細胞にマイコプラズマが検出され、さらに長澤⁹⁾ がマイコプラズマの存在と白板症における過角化とに強い関連を示唆したことから、OLP の上皮層におけるマイコプラズマの有無について、抗マイコプラズマ・ポリクローナル抗体による免疫組織化学によって検討を行った。その結果、OLP の上皮層においても、口腔白板症とほぼ同様に、35 例中 32 例、91.4% で陽性反応が認められた。健常粘膜上皮との比較では、健常粘膜上皮の陽性率は 33.3% であり、両群間に有意な差が認められた。

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^{8, 19-22)}。Taylor-Robinson ら²¹⁾ は、*Mycoplasma fermentans* と *Mycoplasma hominis* 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²²⁾ 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。また、川村⁸⁾ の口腔白板症を材料とした抗マイコプラズマ抗体を用いた免疫染色および免疫電顕による研究によって、粘膜上皮細胞内にマイコプラズマの存在が認められ、さらにその DNA 解析により細胞内に存在しているマイコプラズマは *M. salivarium* であることが明らかとなった。

最近、*Porphyromonas gingivalis*, *Tropone-ma denticola*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* の口腔粘膜上

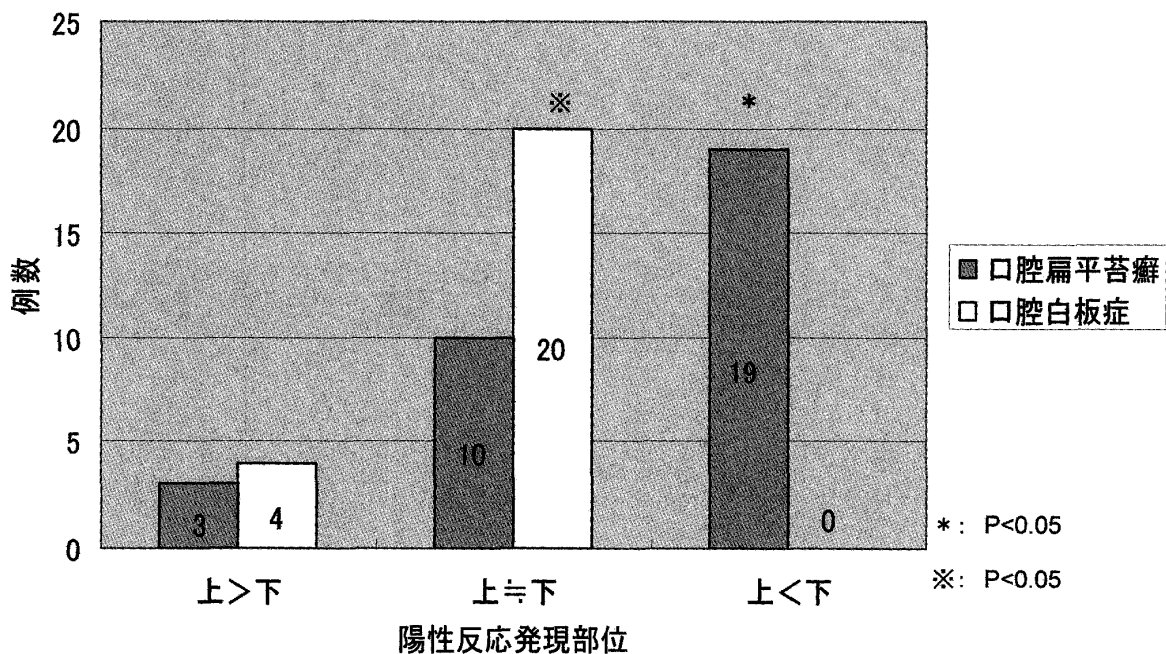


図7. OLP 組織および口腔白板症における抗マイコプラズマ抗体陽性所見発現部位の比較。OLP では3群中「上<下群」の割合が有意に高く (P < 0.05), 口腔白板症群では白板症では3群中「上≒下群」の割合が有意に高かった。(P < 0.05)。

皮細胞への侵入／寄生が報告されている²³⁻²⁷⁾が、これらの細菌はいずれも細胞壁を有していることやその形態から、電顕的に他の細胞内小器官と区別が可能と思われる。OLP を電顕的に観察した報告²⁸⁻³⁰⁾では、いずれにおいても上皮細胞内における細菌の存在についての記載は見当たらず、OLP における細胞壁を有したこれらの口腔細菌の侵入／寄生は考え難い。一方、Griffin ら²⁹⁾は、びらん型の OLP の頬粘膜を電顕的に観察し、多数の membrane-coating granule (MCG) が認められたと述べている。川村⁸⁾は一部の MCG が *M. salivarium* ではないかと推測しているが、Griffin らの記述も OLP におけるマイコプラズマの存在を示唆していた可能性がある。

OLP におけるマイコプラズマの局在について、口腔白板症と比較すると、口腔白板症では上皮の全層にわたって、あるいはおもに上皮の表層で抗マイコプラズマ抗体が陽性であったのに対し、OLP では有棘層下部から基底層で陽性反応が多く認められた。また、口腔白板症では基底層での陽性反応がわずかに認められる程度であったのに対して、OLP では基底層での陽性反応が多く認められた。

OLP では過角化により臨床的に白線状や白斑状を呈するが、長澤⁹⁾が口腔白板症では粘膜上皮細胞におけるマイコプラズマの侵入／寄生が上皮の角化の程度と深く関連していることを示唆していることから、OLP における過角化が白板症と同様に *M. salivarium* の侵入／寄生によって生じていることが推測される。

一方、OLP では粘膜上皮の過角化性変化とともに萎縮性変化がみられる。細胞培養におけるマイコプラズマの感染は、細胞増殖や染色体異常、核酸およびアミノ酸合成、代謝、膜変性など、種々の影響を与えることが報告されている³¹⁾。細胞増殖への影響については、細胞増殖の亢進と抑制がみられることが知られている³²⁾。このことから、口腔粘膜の上皮細胞にマイコプラズマが侵入／寄生した場合、上皮細胞の増殖の亢進と抑制の両方の変化が生じるもの

と思われ、このことは OLP の臨床病態とも一致する。

また、OLP では基底細胞の破壊がみられる。その機序として、ケラチノサイトがキラー T 細胞を活性化し、細胞傷害活性を発現させることによって基底細胞の破壊が生じることが推測されているが、その機序の詳細は明らかでない⁴⁾。一方、OLP では基底細胞の破壊に上皮細胞のアポトーシスの関わりが示唆されている³³⁾。マイコプラズマは、感染細胞にアポトーシスと抗アポトーシスの両方の効果を及ぼすことが知られている³⁴⁾。Zhang ら³⁵⁾は、IL-3 依存性に増殖するマウス骨髄由来の 32D 細胞に *M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. hominis*, *M. salivarium*, *M. genitalium* を感染させたところ、*M. fermentans*, *M. penetrans* はアポトーシスを抑制し細胞増殖をもたらしたのに対して、*M. salivarium* と *M. hominis* はアポトーシスを促進させたと報告している。

マイコプラズマが宿主細胞に対して病原性を示す原因の一つとして、ヌクレアーゼの存在が知られているが、小川ら³⁶⁾は *M. salivarium* には 25k Da のヌクレアーゼが存在し、核クロマチン DNA の断裂を引き起こすことを報告し、*M. salivarium* が宿主細胞内に存在していると、そのヌクレアーゼが宿主細胞の DNA に傷害を与え、その結果、宿主細胞にアポトーシスを誘発する可能性があるとして述べている。本研究で、OLP では基底細胞におけるマイコプラズマの存在が多く観察されたのに対して、口腔白板症では基底細胞におけるマイコプラズマの存在はほとんど観察されなかった。このことから、基底細胞におけるマイコプラズマの侵入／寄生の有無と程度が、OLP と口腔白板症の病態の相違と深く関わっていることが示唆される。

マイコプラズマが培養細胞に感染すると、培養細胞が腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) や種々の炎症性サイトカインの産生を誘導することが報告されている³⁷⁻³⁹⁾。山本ら⁴⁰⁾は、OLP 患者から分離したケラチノサイトは、健常歯肉から分離したケラチノサイトよりも多

量の IL-6, GM-CSF, TNF- α を産生したと報告しており, 培養細胞におけるマイコプラズマ感染によるサイトカイン産生の所見と一致する。しかし, OLP におけるサイトカイン産生に関する報告は少なく, 今後 OLP におけるサイトカインの局在について検索する必要があると思われる。

なお, 今回の研究で, 長澤⁹⁾ の白板症における研究と同様, OLP 標本の固有層においても陽性反応が散見されたが, その多くは細胞間に認められ, また蛍光像の大きさにもばらつきが大きいことから, 非特異的な反応と思われた。

本研究によって, 免疫組織化学により約 90% の OLP で上皮は抗マイコプラズマに陽性を呈し, またその局在の傾向が明らかとなった。今後, OLP におけるマイコプラズマの侵入/寄生や局在を一層明らかにするために, 電顕による観察や PCR, *in situ* hybridization などによるマイコプラズマの検出, 確認が必要である。

結 語

口腔扁平苔癬 (OLP) 上皮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, OLP 病変に対して Hoechst 33258 を用いた DNA 蛍光染色と抗マイコプラズマ・ウサギポリクローナル抗体を用いた蛍光免疫組織化学的所見によるマイコプラズマの局在の検討を行い, また口腔白板症組織における蛍光免疫組織化学的所見と比較し, 以下の結果を得た。

1. Hoechst 33258 による DNA 蛍光染色で, OLP の上皮細胞の細胞質あるいは細胞間隙に微細な蛍光像を確認した。
2. OLP 上皮の蛍光免疫染色では, 抗マイコプラズマ抗体に陽性所見を示したものは 35 例中 32 例 (91.4%) で, 棘細胞層から基底層に多くみられる傾向にあった。一方, 健常粘膜では軽度の陽性反応を示したものが 15 例中 5 例 (33.3%) で, 陽性部位はいずれも上皮層の上部に限局していた。OLP 群と健常粘膜群の陽性率を検定したところ, OLP 群の陽性率が有意に高かった。

3. 上皮性異形成を伴わない口腔白板症組織 24 例に同様の抗体を用いて蛍光免疫組織化学的検索を行ったところ, 全例が陽性所見を呈した。

4. 上皮層における陽性所見の分布は, OLP では, 「上>下群」が 3 例 (9.4%), 「上 \equiv 下群」が 10 例 (31.3%), 「上<下群」が 19 例 (59.4%) で, 「上<下群」がもっとも多かった ($P < 0.05$)。一方, 口腔白板症では「上 \equiv 下群」が 24 例中 20 例 (83.3%), 「上>下群」が 24 例中 4 例 (16.7%) で, 「上<下群」はなく, 「上 \equiv 下群」がもっとも多かった ($P < 0.05$)。

5. OLP と口腔白板症の上皮層における抗マイコプラズマ抗体陽性所見の分布の比較では, 口腔白板症では上皮層内の全層にわたって, あるいはおもに上皮層の表層で陽性であったのに対し, OLP では有棘層下部から基底層で陽性反応が多く認められた。また, 口腔白板症では基底細胞での陽性反応がわずかに認められる程度であったのに対して, OLP では基底細胞での陽性反応が多く認められた。

以上の結果から, OLP の発症にマイコプラズマの上皮細胞内への侵入/寄生が関連していること, 基底細胞におけるマイコプラズマの侵入/寄生の有無と程度が OLP の病態と関連していることが示唆された。

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講座顎口腔外科学分野 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態制御学講座口腔病理学分野 武田泰典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の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講座顎口腔外科学分野の諸先生に感謝いたします。

なお, 本論文の要旨は, 第 18 回日本口腔粘膜

学会総会・学術集会（平成20年9月19日～20日，東京）において発表した。

この研究の一部は，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) Ismail, S. B., Kumar, S. K. S., and Zain, R. B.: Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J. Oral Science* 49: 89-106, 2007.
- 2) Scully, C., and Carrozzo, M.: Oral mucosal disease: Lichen planus. *Brit. J. Oral Maxillofac. Surg.* 46: 15-21, 2008.
- 3) Ikeda, N., Ishii, T., Iida, S., and Kawai, T.: Epidemiological study of oral leukoplakia based on mass screening for oral mucosal diseases in a selected Japanese population. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 19: 160-163, 1991.
- 4) Sugerma, P.B., Savage, N.W., Walsh, L.J., Zhao, Z. Z., Zhou, X.J., Kham, A., Seymour, G.L., and Bigby, M.: The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13: 350-365, 2002.
- 5) Mollaoglu, N.: Oral lichen planus: a review. *Brit. J. Oral Maxillofac. Surg.* 38: 370-377, 2000.
- 6) Scully, C., Beyli, M., Ferreiro, M.C., Ficarra, G., Gill, Y., Griffiths, M., Holmstrup, P., Mutlu, S., Porter, S., and Wray, D.: Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9: 86-122, 1998.
- 7) Al-Hashimi, I., Schifter, M., Lockhart, P.B., Wray, D., Brennan, M., Migliorati, C.A., Axell, T., Bruce, A. J., Carpenter, W., Eisenberg, E., Epstein, J. B., Holmstrup, P., Jontell, M., Lozada-Nur, F., Nair, R., Silverman, B., Thongprasom, K., Thornhill, M., Warnakulasuriya, and S., van der Waal, I.: Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 103: S25, e1-12, 2007.
- 8) 川村貴史：口腔白板症上皮へのマイコプラズマの侵入。岩医大歯誌，33: 18-30, 2008.
- 9) 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: 1-17, 2008.
- 10) van der Waal, I.: Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 45: 317-323, 2009.
- 11) Mizuki, H.: In situ staining with DNA-binding fluorescent dye, Hoechst 33258, to detect microorganisms in the epithelial cells of oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 37: 521-526, 2001.
- 12) Nagao, Y., Sata, M., Noguchi, S., Seno'o, T., Kinoshita, M., Kameyama, T., and Ueno, T.: Detection of hepatitis C virus RNA in oral lichen planus and oral cancer tissues. *J. Oral Pathol. Med.* 29: 259-266, 2000.
- 13) Robaee, A. A., and Zolibani, A. A.: Oral lichen planus and hepatitis C virus: is there real association? *Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica Adriat.* 15: 14-19, 2006.
- 14) Cunha, K.S.G., Monso, A.C., Cardoso, A.S., Paixao, J.B.A., Coelho, H.S.M., and Torres, S.R.: Prevalence of oral lichen planus in Brazilian patients with HCV infection. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 100: 330-333, 2005.
- 15) Carrozzo, M.: Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 2: lichen planus and other diseases. *Oral Diseases* 14: 217-228, 2008.
- 16) Ali, A.A., and Suresh, C. S.: Oral lichen planus in relation to transaminase levels and hepatitis C virus. *J. Oral Pathol. Med.* 36: 604-608, 2007.
- 17) Carrozzo, M., Brancatello, F., Dametto, E., Arduino, P., Pentenero, M., Rendine, S., Porter, S. R. Lodi, G. Scully, C., and Gandolfo, S.: Hepatitis C virus-associated oral lichen planus: is the geographical heterogeneity related to HLA-DR6?. *J. Oral Pathol. Med.* 34: 204-208, 2005.
- 18) Cui, S., Maruoka, Y., Ando, T., Kobayashi, M., and Ogiuchi, H.: Role of Epstein-Barr virus infection in oral diseases. 東女医大誌，71: 7-15, 2001.
- 19) Rottem, S., and Naot, Y.: Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends Microbiol.* 6: 436-440, 1998.
- 20) McGarrity, G.J., Phillips, D.M., and Vaidya, A.B.: Mycoplasmal infection of lymphocyte cell cultures: infection of *M. salivarium*. *In vitro* 16: 346-356, 1980.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) Colombo, A.V., da Silva, C.M., Haffajee, A., and Colombo, A.P.V.: Identification of intracellular oral species within human crevicular epithelial cells from subjects with chronic periodontitis by fluorescence in situ hybridization. *J. Periodont. Res.* 42: 236-243, 2007.
- 24) Rudney, J. D., Chen, R., and Sedgewick, G. J.: Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivaris* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect. Immun.* 69: 2700-2707, 2001.

- 25) Han, Y.W., Shi, W., Huang, G.T.-J., Haake, S.K., Park, N.-H., Kuramitsu, H., and Genco, R. J.: Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect. Immun.* 68: 3140-3146, 2000.
- 26) Dorn, B.R., Leung, K.-P., and Progulsk-Fox, A.: Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect. Immun.* 66: 6054-6057, 1998.
- 27) Madianos, P.N., Papanou, P.N., Nannmark, U., Dahlen, G., and Sandros, J.: *Porphyromonas gingivaris* FDC381 Multiplies and Persists within human oral epithelial cell in vitro. *Infect. Immun.* 64: 660-664, 1996.
- 28) Jungell, P., Malmstroem, M., Wartiovaara, J., Kontinen, Y., and Sane, J.: Ultrastructure of oral leukoplakia and lichen planus. I. Basal region and inflammatory cells. *J. Oral Pathol.* 16: 170-178, 1987.
- 29) Griffin, C.J., Jolly, M., and Smythe, J.D.: The fine structure of epithelial cells in normal and pathological buccal mucosa. III. Pathological changes in spinous, transitional and superficial cells in the erosive type of lichen planus. *Aust. Dent. J.* 25: 93-100, 1980.
- 30) 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.
- 31) Langdon, S.P.: Cell culture contamination, An overview. *Methods Mol. Med.* 88: 309-317, 2004.
- 32) Dong, L., Shibata, K., Sawa, Y., Hasebe, A., Yamaoka, Y., Yoshida, S., and Watanabe, T.: Transcriptional activation of mRNA of intercellular adhesion molecule 1 and induction of its cell surface expression in normal human gingival fibroblasts by *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans*. *Infect. Immun.* 67: 3061-3065, 1999.
- 33) Yamamoto, T., Yoneda, K., Ueta, E., and Osaki, T.: Cellular immunosuppression in oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med.* 19: 464-470, 1990.
- 34) Lo, S.-C.: Apoptotic, antiapoptotic, clastogenic and oncogenic effects. Razin, S. and Herrmann, R.: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 403-416, 2002.
- 35) Zhang, S., and Lo, S.-C.: Effect of mycoplasmas on apoptosis of 32D cells is species-dependent. *Curr. Microbiol.* 54: 388-395, 2007.
- 36) 小川恵子, 加茂政晴, 水城春美, 客本斉子: *Mycoplasma salivarium* におけるヌクレアーゼの存在とその特性. 岩医大歯誌, 33: 109-122, 2008.
- 37) Shibata, K., Hasebe, A., Into, T., Yamada, M., and Watanabe, T.: The N-terminal lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of inter-cellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *J. Immunol.* 165: 6538-6544, 2000.
- 38) Arai, S., Furukawa, M., Munakata, T., Kuwano, K., Inoue, H., and Miyazaki, T.: Enhancement of Cytotoxicity of Active Macrophages by Mycoplasma: Role of Mycoplasma - Associated Induction of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in Macrophages. *Microbiol. Immunol.* 34: 231-243, 1990.
- 39) Sugama, K., Kuwano, K., Furukawa, M., Himeno, Y., Satoh, T., and Arai, S.: Mycoplasma induce transcription and production of tumor necrosis factor in a monocytic cell line, THP-1, by a protein kinase C-independent pathway. *Infect. Immun.* 58: 3564-3567, 1990.
- 40) 山本哲也, 畑邊知子, 米田和典, 尾崎登喜雄: 口腔扁平苔癬における単核球の浸潤機序に関する生物学的検討. 口科誌, 48: 10-24, 1999.