

## 口腔扁平苔癬の病態形成におけるアポトーシスの 関与に関する免疫組織化学的研究

根田 智恵子

岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任：工藤 啓吾 教授)

岩手医科大学歯学部口腔病理学講座

(指導：佐藤 方信 教授)

(受付：1999年10月15日)

(受理：1999年11月16日)

**Abstract** : The expression of apoptosis (AP) in oral lichen planus (OLP) was examined immunohistochemically, and the involvement of AP in the pathogenesis of OLP was evaluated. Moreover, the expression of Fas and FasL in lymphocytes that infiltrated in and under the mucosal epithelium was studied, and their roles as AP-inducing factors were also evaluated.

The materials were 30 specimens obtained from 30 patients clinically and histopathologically diagnosed to have OLP at the First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Iwate Medical University School of Dentistry during the past 16 years (1982-1997). Sixteen specimens of normal oral mucosa (NOM) were used as a control group. The TUNEL method was used for the detection of AP-cells, and the percentage of positive cells in 1,000 or more epithelial cells based on this method was defined as the apoptotic index (AI). Fas and FasL were detected by the immunohistochemical technique. The localization pattern of Fas and FasL in the mucosal epithelium was classified into 4 types (Total type, Partial type, Non detected type and Complex type), and the frequency of AP-positive cells among epithelial cells and lymphocytes infiltrating under the epithelium was categorized into 4 grades (Grade 0, I, II, III). The relationships of the localization pattern of Fas and FasL and the frequency of AP-positive cells with AI were evaluated.

While AP was expressed sparsely from the upper layer of the stratum spinosum to the stratum granulosum in NOM, it was expressed through the full thickness of the mucosal epithelium in OLP and particularly densely from the stratum basale to the lower layer of the stratum spinosum. In mucosal epithelial cells, AI was significantly increased in OLP compared with NOM. Concerning the relationship between histological findings and AI, AI tended to increase as more lymphocytes infiltrated.

The expression patterns of Fas and FasL in the mucosal epithelium were more diverse in OLP than in NOM. Also, AI tended to be higher in the whole type than in the partial type. However, no close relation was observed between the degree of expression of Fas and FasL in the mucosal epithelium and AI, and no clear correlation was noted between the degree of expression of Fas in the mucosal epithelium or of FasL in lymphocytes infiltrating into the proper layer and AI.

From these results, AP is estimated to be involved in histological changes in OLP. Although lymphocytes infiltrating under the mucosal epithelium were suggested to be involved in the expression of AP, an involvement of AP-inducing factors other than Fas and FasL is also suspected.

**Key words** : oral lichen planus, histological change, apoptosis, Fas/FasL

---

Immunohistochemical study on histological change and apoptosis in the pathogenesis of oral lichen planus

Chieko NEDA

The first Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020-8505 Japan

The Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020-8505 Japan

## 緒 言

扁平苔癬は皮膚および粘膜に発症する慢性炎症性疾患で1869年、Wilsonにより臨床的に、Dubreuilhにより組織学的に初めて記載された<sup>1)</sup>。口腔扁平苔癬 (oral lichen planus, 以下OLP) は、口腔粘膜病変の中では比較的発現頻度の高い疾患であり、皮膚の扁平苔癬に比較すると経過が長く、多くは口腔粘膜の自発痛や刺激痛などを伴い、ときには悪性化の報告もみられる<sup>2, 3)</sup>。OLPは肉眼的には周囲粘膜に発赤を伴う白色の丘疹が癒合して斑状、環状、線状、網状等の種々の形態の白斑として両側性に生じるが、これにびらんや水疱を伴い複雑な様相を呈する。病理組織学的には上皮固有層の帯状のTリンパ球浸潤と上皮の種々の程度の肥厚ないし菲薄化を伴う角化亢進および上皮基底層の変性・破壊が特徴である。その上、同一病変内に肥厚と萎縮という相反する所見が混在するなどきわめて多彩な病態を呈するが、これらの組織学的特徴の発現機構については十分に解明されていない。

今日、壊死とは発生機構や形態的变化を異にするもう一つの細胞死としてアポトーシス apoptosis が注目されている。アポトーシスは1972年 Kerr ら<sup>4)</sup>によって名づけられ、生体の発生や正常な組織の細胞動態に重要であるだけでなく、その異常が自己免疫疾患<sup>5, 6)</sup>およびリンパ増殖性疾患<sup>7, 8)</sup>の原因となり、また、劇症肝炎における肝細胞の傷害<sup>9)</sup>、HIV感染症におけるCD4<sup>+</sup> T cellの減少<sup>10)</sup>、臓器移植後のgraft-versus-host disease (GVHD)<sup>11)</sup>など、多くの疾患においてその発症や病態の形成に関与していることが明らかにされてきた。その上、細胞のアポトーシスと増殖あるいは分化とのバランスの不均衡は組織の萎縮や過形成を伴う疾患の病態形成に深く関わっている<sup>12)</sup>。

アポトーシスの発現はFas/FasL, TNF, perforin/granzyme, p53, bcl-2などの種々の誘導および抑制因子によって制御されているが、なかでもFas/FasLはFasを発現する細

胞にアポトーシスを誘導する経路として重要であり、Fasは上皮細胞に<sup>13)</sup>、FasLは上皮細胞や活性化リンパ球において<sup>14)</sup>その発現が確認されている。

そこで、著者はOLPの上皮におけるアポトーシスの発現とその局在性を追究し、組織学的病態形成におけるアポトーシスの関与について究明して、この疾患の多彩な組織学的様相の一端の解明を試みた。

### 材料および研究方法

#### 1. 材料

1982年4月から1997年3月までの過去16年間に岩手医科大学歯学部第1口腔外科を受診し、臨床的および病理組織学的にOLPと診断された22歳から80歳までの男性12例、女性18例、計30例の30標本(頬粘膜23例、舌下粘膜3例、歯肉1例、口唇粘膜3例)を対象とした。また、抜歯および良性腫瘍切除などの外来の小手術で切除され、OLPに罹患していない正常な口腔粘膜(Normal oral mucosa, 以下NOM)のうち、性別、年齢の類似する16例(頬粘膜13例、口唇粘膜3例)を対照とした。

#### 2. 研究方法

##### 1) 病理組織学的観察

生検および切除標本は、直ちに10%ホルマリンにて固定、パラフィン包埋した。標本をマイクロームにて3 $\mu$ mに薄切し、通法によって脱パラフィン後、hematoxylin-eosin (H-E)染色を施し、組織学的に観察した。この時、OLPの病理組織学的特徴<sup>15)</sup>とされる①錯角化あるいは過角化症、②基底細胞の水症変性および基底膜の部分的不明瞭化あるいは消失、③粘膜上皮固有層の帯状の慢性炎症性細胞浸潤、④上皮脚の鋸歯状化とその延長ないしは扁平化を診断の基準とした。

##### 2) アポトーシス細胞の検出および検討方法

アポトーシス細胞の検出にはGavrieliら<sup>16)</sup>の方法に従いterminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labelling method (TUNEL法)を用いた。切片は通法に

より脱パラフィン後、リン酸緩衝食塩水に Tween-20を加えた溶液 (PBS-T) にて洗浄した。これを20 $\mu$ g/mlの proteinase K で処理 (室温, 10分間), PBS-T にて洗浄後, 0.3% $H_2O_2$  (室温, 20分間) により内因性ペルオキシダーゼ反応を阻止した。PBS-T にて洗浄後, 100mM sodium cacodylate (pH 7.0), 1 mM  $CoCl_2$ , 50/ml gelatin, 10nM/ml Biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim), 100U/ml terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT, Takara Biomedicals) の混合液で37 $^{\circ}C$ , 1時間反応させた。PBS-T にて洗浄後, peroxidase 標識 streptavidin (室温, 20分間) で処理した。発色には0.02% diaminobenzidine を用い, Mayer's hematoxylin で対比染色を行った。

アポトーシス細胞の算定は, 各切片の OLP として組織学的に典型的所見を呈する部位から無作為に4視野以上を選択し, 顕微鏡撮影装置 (OLYMPUS 社製, VANOX-S) を用い, 200倍で写真撮影した。この写真上で1000個以上の上皮細胞を算定し, この中に占める茶褐色の陽性細胞数を求め, その割合を Apoptotic Index (AI) とし, 各観察群ごとに平均値を求めた。OLP と NOM の AI, OLP の病理学的所見と AI を比較検討するとともに, アポトーシス細胞の局在についても観察した。病理組織学的所見に関しては, 固有層のリンパ球浸潤の程度および基底層破壊の程度と AI の関連について比較検討した。固有層のリンパ球浸潤の程度と AI についての検討にあたっては, リンパ球浸潤の程度を上皮基底層直下に局限してびまん性に浸潤する通常程度な群と広範に密に浸潤する高度な群に分けて検討した。上皮基底層破壊の程度と AI についての検討では, 主に基底細胞の水症変性が見られるものを軽度, 基底細胞の水症変性ととも部分的に基底膜の破壊・消失が明瞭に見られるものを中等度, 組織全体にわたって基底細胞の水症変性や基底膜の破壊・消失が明瞭に見られるものを高度とし, それぞれを比較検討した。

### 3) Fas および FasL の免疫組織化学的染色

#### および検討方法

標本は通法のごとく脱パラフィン後, 蒸留水で5分間洗浄した。3% $H_2O_2$  (室温, 8分) 処理により内因性ペルオキシダーゼを阻止し, PBS-T にて洗浄後, 10%ヤギ正常血清 (室温, 15分) にて非特異的染色をブロッキングした。PBS-T で洗浄後, 一次抗体として抗 Fas モノクローナル抗体 (Fas, Transduction Laboratories,  $\times 100$ ), 抗 FasL 抗体 (抗ラット Fas リガンド, ウサギ, 和光純薬工業,  $\times 800$ ) を4 $^{\circ}C$ にて13時間反応させた。PBS-T で洗浄後, 二次抗体として Fas にはビオチン標識ヤギ抗マウス IgG (Pathostain ABC kit (M), 和光純薬), FasL にはビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG (Pathostain ABC kit (R), 和光純薬) を, 37 $^{\circ}C$ で30分間反応させた。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを室温で20分間反応させた後, 0.02% diaminobenzidine を用いて発色させ, Mayer's hematoxylin で対比染色を行った。

上皮における Fas および FasL の発現はその局在性と染色性の違いによって分類し, これらと AI との関連性を比較検討した。

また, 上皮および上皮浸潤細胞における Fas および FasL の発現は, 各切片の典型的所見を呈する部位から無作為に4視野以上を選択し, 顕微鏡撮影装置 (OLYMPUS 社製, VANOX-S) を用いて200倍で写真撮影した。この写真上で1000個以上の上皮細胞を算定し, この中に占める細胞質が茶褐色に染色される陽性細胞数の割合を求め, その割合を Schifter ら<sup>17)</sup>の方法に準じて4段階に分類した。すなわち, Grade 0: 全く発現しない, Grade I:  $\sim 10\%$  に発現する, Grade II:  $\sim 50\%$  に発現する, Grade III: 51%以上に発現する, とした。固有層の浸潤細胞における FasL の発現についても, 陽性細胞数の頻度により上記の分類に準じて Grade 0 $\sim$ Grade III の4段階に分類した。その上で上皮内および固有層の浸潤細胞の各々における Fas と FasL の発現頻度および AI との関係から, 上皮のアポトーシスにおけるアポ

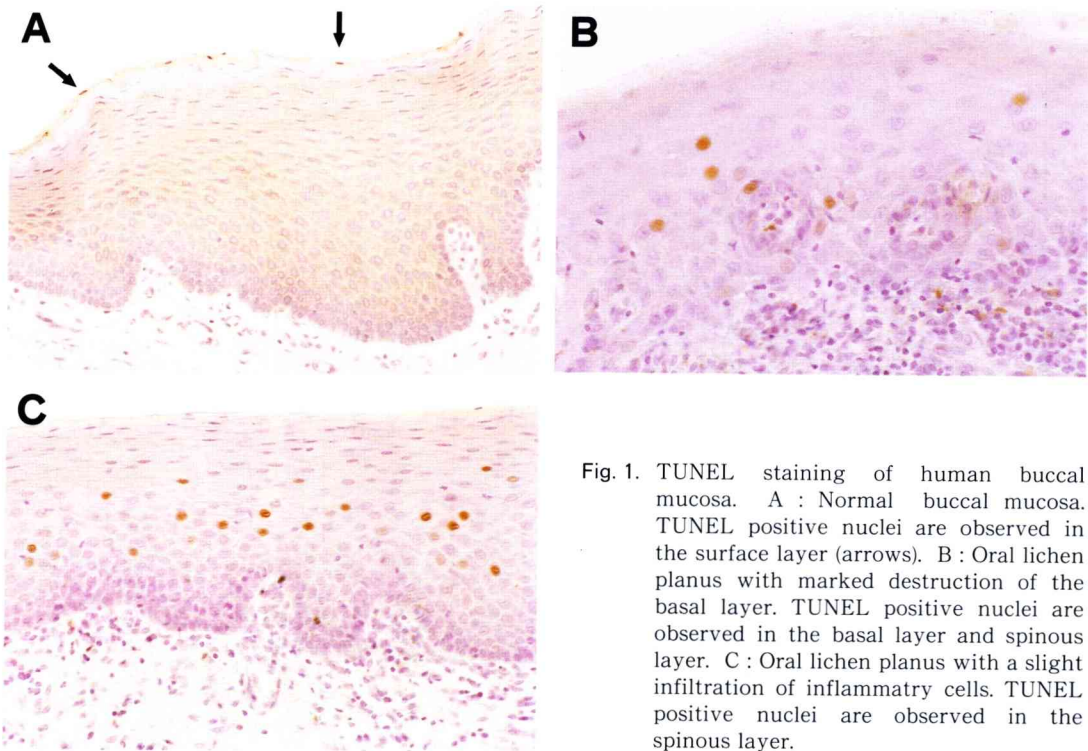


Fig. 1. TUNEL staining of human buccal mucosa. A : Normal buccal mucosa. TUNEL positive nuclei are observed in the surface layer (arrows). B : Oral lichen planus with marked destruction of the basal layer. TUNEL positive nuclei are observed in the basal layer and spinous layer. C : Oral lichen planus with a slight infiltration of inflammatory cells. TUNEL positive nuclei are observed in the spinous layer.

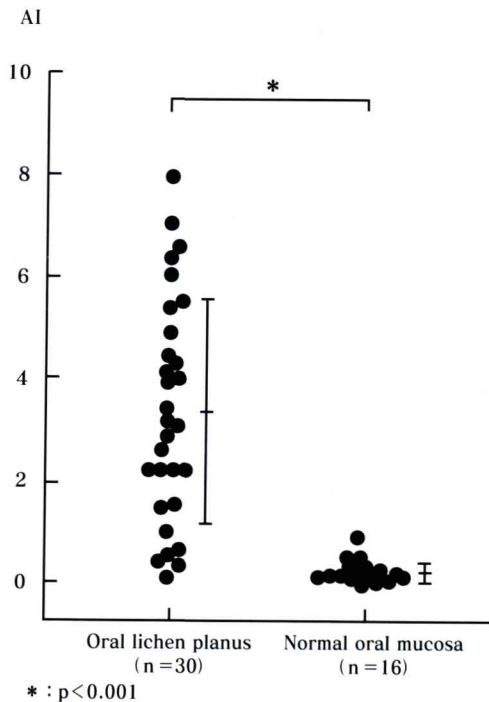


Fig. 2. Apoptotic index (AI) in the epithelium of oral lichen planus and normal oral mucosa

アポトーシス誘導因子としての役割を検討した。

#### 4) 統計処理

AIの有意差の検定には統計用ソフト StatView-J4.5® (Abacus Concepts) を用いた。各群の AI 値は棄却検定法により検定し、危険率0.5%で棄却される値は除外した。検定は2群間の比較には t 検定を用い、3群以上の比較には分散分析を用いた後、Fisher's Protected Least Significant Difference 法を用いた。

### 結 果

#### 1. 上皮におけるアポトーシス細胞

##### 1) アポトーシス細胞の局在性 (Fig. 1)

NOMにおけるアポトーシス細胞は有棘層の上層から錯角化層にかけて、少数散在して認められた。これに対して、OLPにおけるアポトーシス細胞は上皮全層にわたり認められた。特に基底層の破壊が顕著な部位では主に基底層から有棘層下層に発現し、固有層のリンパ球浸潤や上皮基底層の破壊が軽度な部位では主に有棘層

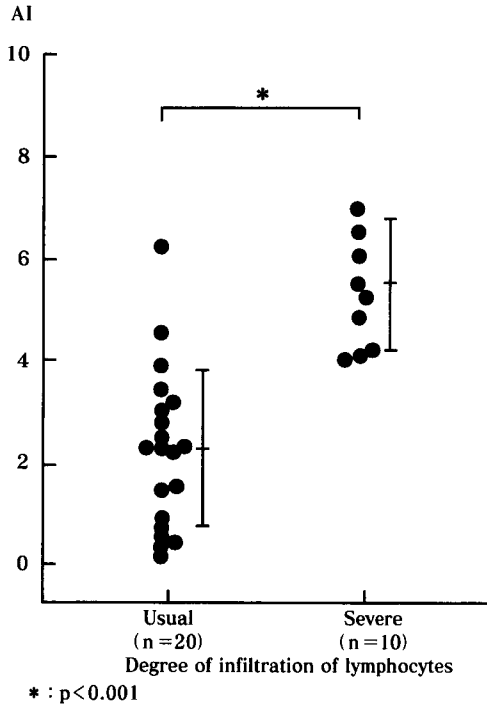


Fig. 3. Correlation between the degree of infiltration of lymphocytes in the lamina propria and the apoptotic index (AI) in the epithelium of oral lichen planus

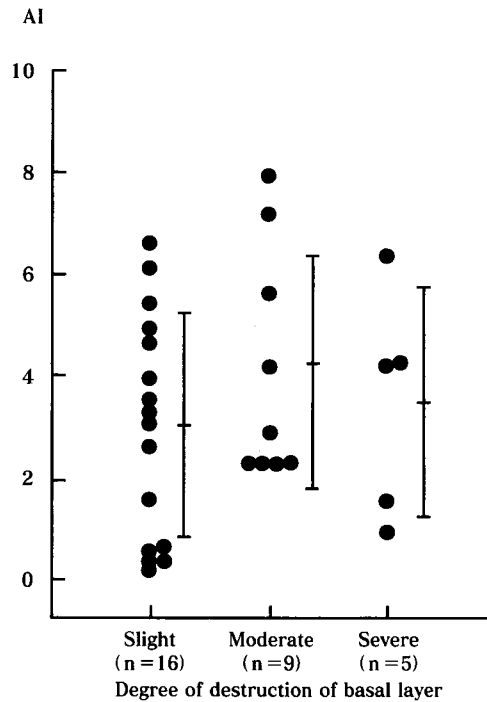


Fig. 4. Correlation between the degree of destruction of the basal layer and the apoptotic index (AI) in the epithelium of oral lichen planus

に発現していた。

## 2) OLP と NOM における AI の比較

(Fig. 2)

NOM の AI は  $0.2 \pm 0.2$  であったが、OLP の AI は  $3.4 \pm 2.2$  であり、OLP の AI は NOM と比較して有意に高値を示した ( $p < 0.001$ )。

## 3) OLP の病理組織像とアポトーシス

### (1) AI と固有層の細胞浸潤

OLP における固有層の細胞浸潤の程度と AI (症例数) の関連を検討した (Fig. 3)。その結果、固有層のリンパ球浸潤が通常程度の群の AI は  $2.28 \pm 1.60$  (20) であり、高度なリンパ球浸潤をみる群では  $5.58 \pm 1.32$  (10) であった。すなわち、固有層のリンパ球浸潤が著明な群で AI が有意に高値を示した ( $p < 0.001$ )。

### (2) AI と上皮基底部の破壊 (Fig. 4)

上皮基底部の破壊の程度により AI (症例数) は若干変動していた。すなわち、上皮の破壊が






軽度な群では  $2.97 \pm 2.18$  (16)、中等度の群では  $4.07 \pm 2.22$  (9)、高度な群では  $3.42 \pm 2.21$  (5) であった。上皮基底部の破壊の程度と AI の間には明らかな傾向はみられなかった。

## 2. 上皮における Fas および FasL の発現

### 1) Fas および FasL の局在

上皮における Fas および FasL の発現の様相は多様であった。そこで、これらの発現の局在性から症例を 4 型とその亜型に分類した (Fig. 5, 6, 7)。すなわち、①基底層から顆粒層まで上皮全体に発現する全体型 (Total type, Fig. 5 A)、②上皮に部分的な発現がみられる部分型 (Partial type, Fig. 5 B)、③上皮における発現がみられない非発現型 (Non detected type, Fig. 5 D)、④これらの発現様相が複雑で、特定の型に分類できない混在型 (Complex type, Fig. 5 C) に分けた。そして、全体型は 1) 上皮全層に均等に発現するびまん

Fig. 5. The detected pattern of Fas/FasL protein in the epithelium of oral lichen planus and normal oral mucosa.

A. Total type	The Fas/FasL protein is detected throughout the epithelium.
a) Diffuse pattern	
	Equally in all layers.
b) Granuler layer pattern	
	Strongly in the granular layer.
c) Basal layer pattern	
	Strongly in the basal layer.
B. Partial type	The Fas/FasL protein is detected in part of the epithelium.
a) Upper layer pattern	
	Detected from the upper prickle-cell layer to the granular layer.
b) Lower layer pattern	
	Detected from the basal layer to the lower prickle-cell layer.
C. Complex type	The detected pattern is not classified exactly.
a) Total type only	Complex of the total type subgroup.
b) Total and Partial	Complex of the total and the partial type.
c) Total and Non detected	Complex of the total and the non detected type.
d) Partial and Non detected	Complex of the partial and the nondetected type.
D. Non detected type	The Fas/FasL protein is not detected throughout the epithelium.

型 (Diffuse pattern, Fig. 5 Aa)), 2) 顆粒層に特に強く発現する顆粒層型 (Granuler layer pattern, Fig. 5 Ab)) 3) 基底層での発現が特に強い基底層型 (Basal layer pattern, Fig. 5 Ac)) の3亜型に、部分型は1) 有棘層上層から顆粒層にかけて発現する上方型 (Upper layer pattern, Fig. 5 Ba)) と、2) 基底層から有棘層下層にかけて発現する下方型 (Lower layer pattern, Fig. 5 Bb)) の2亜型に分類した。その上で、混在型は全体型の亜型のみが混在するもの (Total type only, Fig. 5 Ca)), 全体型および部分型の亜型が混在するもの (Total and Partial, Fig. 5 Cb)), 全体型の亜型および非発現型が混在するもの (Total and Non detected, Fig. 5 Cc)), および部分型の亜型と非発現型が混在するもの (Partial and

Non detected, Fig. 5 Cd)) に分けた。

(1) OLPとNOMにおける局在性

OLPとNOMのいずれにおいてもFasはFasLに比較して強染する傾向にあった。また、今回検討した組織中の特にOLPの固有層における血管内や結合組織中に可溶性FasおよびFasLと思われる所見が散見された。基底層型と下方型が単独で発現する症例はなく、すべて混在型の一部としての発現であった(データは示さない)。

上皮細胞におけるFasおよびFasL発現の局在性をOLPとNOMとで比較した (Table 1)。

Fasの発現についてみると、NOMで全体型を呈した症例は75.0%、OLPのそれは60.0%であり、NOMではOLPよりも全体型の割合が



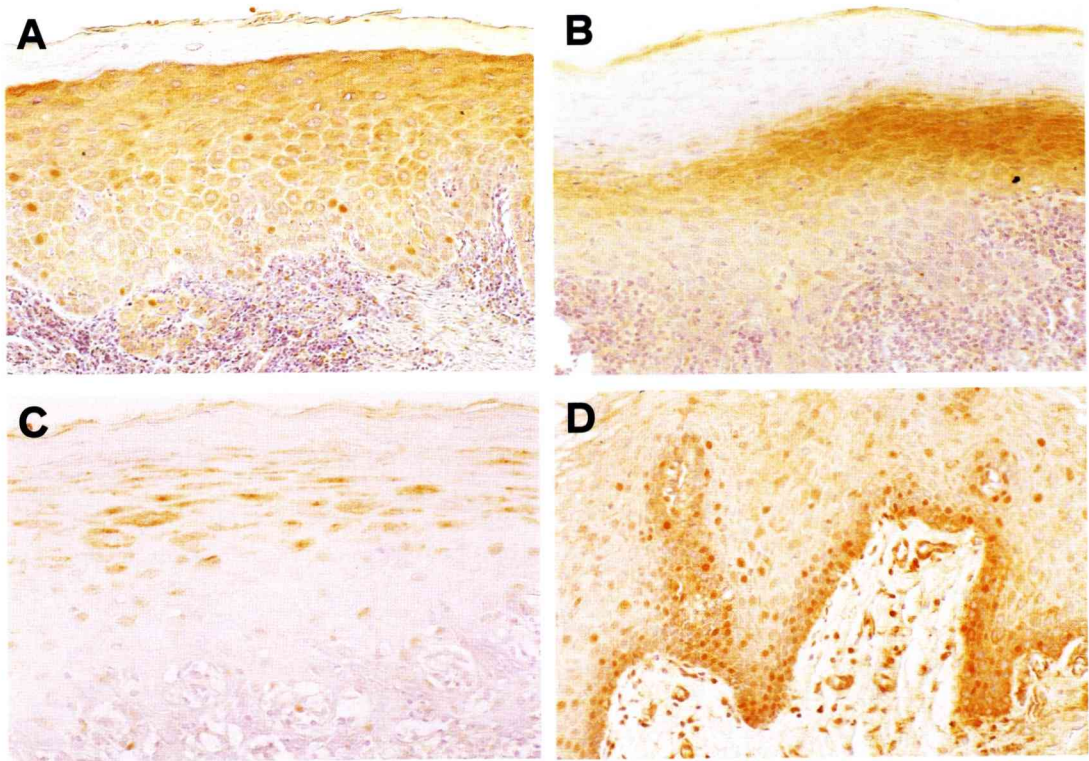


Fig. 6. Immunohistochemical localization of the Fas antigen in the human buccal mucosa of oral lichen planus. A : Total type (Diffuse type) ; moderate immunoreactivity is observed in the cytoplasm throughout the epithelium. B : Total type (Granular layer type) ; intense immunoreactivity is observed in the granular layer, and moderate immunoreactivity is observed from the basal layer to the spinous layer. C : Partial type (Upper type) ; moderate immunoreactivity is observed from the upper part of spinous layer to the granular layer. D : Total type (Basal layer type) ; intense immunoreactivity is observed in the basal layer, and moderate immunoreactivity is observed from the spinous layer to the granular layer.

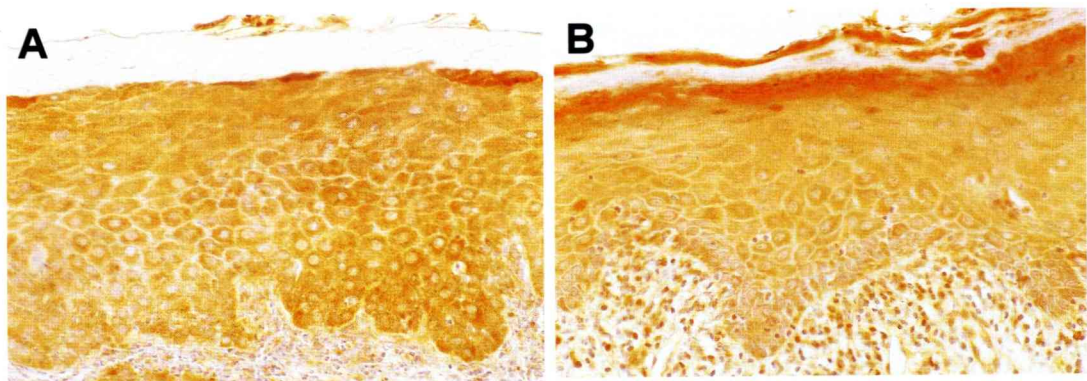


Fig. 7. Immunohistochemical staining for FasL in the lichen planus of oral buccal mucosa. A : Total type (Diffuse type) ; expression of FasL proteins is seen on membranes of keratinocytes throughout the epithelial cell. B : Total type (Granular layer type) ; intense immunoreactivity is observed in the granular layer, and moderate immunoreactivity is observed from the basal layer to the spinous layer.

**Table 1.** Percentage (No. of cases) according to the detected pattern of Fas/FasL protein in the epithelium of oral lichen planus and normal oral mucosa

Detected pattern	Fas		FasL	
	OLP (30)	NOM (16)	OLP (30)	NOM (16)
Total type	60.0 (18)	75.0 (12)	30.0 (9)	31.3 (5)
Diffuse pattern	43.3 (13)	56.3 (9)	30.0 (9)	31.3 (5)
Granular layer pattern	16.7 (5)	18.8 (3)	0	0
Partial type	6.7 (2)	12.5 (2)	36.7 (11)	56.3 (9)
Upper pattern	6.7 (2)	12.5 (2)	36.7 (11)	56.3 (9)
Complex type	33.3 (10)	12.5 (2)	33.3 (10)	6.3 (1)
Total type only	20.0 (6)	12.5 (2)	13.3 (4)	0
Total and Partial type	13.3 (4)	0	6.7 (2)	0
Total and Non detected	0	0	0	6.3 (1)
Partial and Non detected	0	0	13.3 (4)	0

OLP : oral lichen planus, NOM : normal oral mucosa

**Table 2.** Correlation between the detected pattern of Fas and the apoptotic index in the epithelium of oral lichen planus

Detected pattern of Fas	Percentage (No. of cases) according to Apoptotic index			
	0~2	~4	~6	~8
Total type	10.0 (3)	16.7 (5)	23.3 (7)	10.0 (3)
Diffuse pattern	10.0 (3)	13.3 (4)	16.7 (5)	3.3 (1)
Granular layer pattern	0	3.3 (1)	6.7 (2)	6.7 (2)
Partial type	3.3 (1)	3.3 (1)	0	0
Upper pattern	3.3 (1)	3.3 (1)	0	0
Complex type	13.3 (4)	13.3 (4)	0	6.7 (2)
Total type only	0	13.3 (4)	0	6.7 (2)
Total and Partial	13.3 (4)	0	0	0
Total	26.7 (8/30)	33.3 (10/30)	23.3 (7/30)	16.7 (5/30)

若干高かった。しかし、部分型を呈した症例は NOM が12.5%であるのに対して OLP は6.7%と減少し、混在型を呈した症例は NOM が12.5%であるのに対して、OLP では33.3%と増加していた。

FasL の発現では、全体型を呈した症例の頻度は NOM と OLP でほぼ同じ割合であった。しかし、部分型では NOM が56.3%であったが、OLP では36.7%に若干減少し、混在型の症例では NOM が6.3%であるのに対して OLP では33.3%と高くなっていった。なお、NOM の1例では FasL が検出されなかった。

すなわち、NOM に比較して OLP では Fas および FasL の発現型が混在型を示す症例の割合が高くなり、上皮におけるこれらの局在は多

様な様相を呈していた。

(2) OLP 上皮における Fas の発現型と AI (Table 2)

OLP において、上皮における Fas の発現が全体型あるいは全体型の亜型のみを混在型 (Total type および Total type only) である24例中、AI が4以下のものは12例 (50.0%)であった。それに対して、部分型あるいは部分型を含む混在型 (Partial type および Total and Partial) では6例全ての AI が4以下であった。従って、上皮における Fas の発現が部分型を含まない症例では部分型を含む症例よりも AI 値が高くなる傾向にあり、上皮における Fas の発現と AI との関連性が推察された。

(3) OLP 上皮における FasL の発現型と AI



Table 3. Correlation between the detected pattern of FasL and the apoptotic index in the epithelium of oral lichen planus

Detected pattern of FasL	Percentage (No. of cases) according to Apoptotic index			
	0~2	~4	~6	~8
Total type	10.0 (3)	10.0 (3)	10.0 (3)	0
Diffuse pattern	10.0 (3)	10.0 (3)	10.0 (3)	0
Granular layer pattern	0	0	0	0
Partial type	6.7 (2)	10.0 (3)	6.7 (2)	13.3 (4)
Upper pattern	6.7 (2)	10.0 (3)	6.7 (2)	13.3 (4)
Complex type	10.0 (3)	13.3 (4)	6.7 (2)	3.3 (1)
Total type only	0	3.3 (1)	6.7 (2)	3.3 (1)
Total and Partial	6.7 (2)	0	0	0
Partial and Non detected	3.3 (1)	10.0 (3)	0	0
Total	26.7 (8/30)	33.3 (10/30)	23.3 (7/30)	16.7 (5/30)

Table 4. Correlation between the apoptotic index and the detection grades of Fas and FasL protein in the epithelium of oral lichen planus

Fas	Grading of detection		Apoptotic index mean±SD (n)
	Fas	FasL	
Grade II		Grade II	3.42±2.56 ( 3)
		Grade III	0.20 ( 1)
Grade III		Grade I	3.36±2.07 ( 9)
		Grade II	4.64±2.53 ( 6)
		Grade III	2.98±1.91 (11)

OLPの上皮におけるFasLの発現型とAIとの関連を検討した (Table 3)。上皮におけるFasLの発現型が全体型あるいは全体型の垂型のみである (Total typeおよびTotal type only) 13例中, AIが4を越えるものは6例 (46.2%)であったのに対して, 部分型 (上方型) を含むもの (Partial type, Total and Partial, およびPartial and Non detected) 17例中でAIが4を越えるものは6例 (35.3%)であり, 若干低下していた。また, 部分型と非発現型との混在型4例のAIは全てが4以下であった。したがって, 上皮におけるFasLの発現が全体型あるいは全体型の垂型のみ症例では部分型や非発現型を含む症例に比較してAIが高くなる傾向にあり, 上皮におけるFasLの発現とAIとの関連が推察された。

#### 2) FasおよびFasLの発現程度とAI

上皮におけるFasおよびFasLの発現程度とAIとを比較した (Table 4)。Fasの発現が

Grade IIIで, FasLの発現がGrade IIであった病変のAIは4.64±2.53 (6)で, 最も高値を示した。しかし, そのほかのFasおよびFasLの発現程度の組合せ別にみた症例のAIは1例 (AI=0.20)を除いて2.98±1.91から3.42±2.56の範囲にあった。これらの値に有意差はみられなかった。

#### 3. 浸潤細胞におけるFasLの発現

##### 1) OLPとNOMにおける発現程度

上皮浸潤細胞におけるFasLの発現程度 (症例数) をNOMとOLPで比較した (Fig.8)。OLPでは80.0% (24), NOMでは81.3% (13)の症例でリンパ球におけるFasLの発現が認められなかった。しかし, OLPではGrade IIIが3.3% (1), Grade IIが6.7% (2)と少数例ではあるが, 多数のリンパ球にFasLが発現していたのに対して, NOMではGrade IIおよびGrade IIIの症例は認められなかった。また, 組織球には, OLPの80.0% (24), NOMの81.3% (13)の症例でFasLの発現が認められなかつ

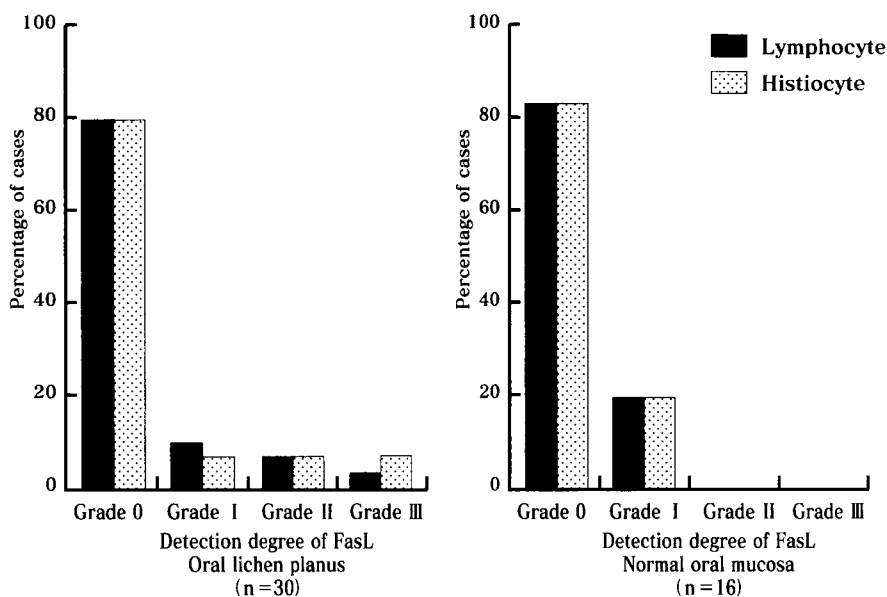


Fig. 8. The frequency of detection of FasL in the subepithelial infiltrating cells of oral lichen planus and normal oral mucosa

Table 5. Correlation between the apoptotic index in the epithelium of oral lichen planus and detection of Fas in the epithelial cell and FasL in the subepithelial lymphocyte

Fas detection in epithelial cell	FasL detection in subepithelial lymphocyte	Apoptotic index mean ± SD (n)
Grade II	Grade 0	2.96 ± 3.12 ( 3 )
	Grade I	3.43 ± 2.15 (21)
Grade III	Grade I	3.31 ± 2.62 ( 3 )
	Grade II	2.41 ± 2.14 ( 2 )
	Grade III	5.53 ( 1 )

た。しかし、OLPではGrade I, II, およびⅢの症例がそれぞれ2例(6.7%)ずつみられたのに対して、NOMではGrade IIおよびGradeⅢの症例は認められなかった。

以上のように、OLPでは固有層に浸潤したリンパ球や組織球におけるFasLの発現程度がNOMと比較して高い症例が少数みられた。また、OLPではNOMに比較して強染する傾向があった。

2) 上皮におけるFasと上皮浸潤リンパ球におけるFasLの発現程度とAI

上皮細胞におけるFasの発現程度および固有層浸潤リンパ球におけるFasLの発現程度とAIとの関連性を検討した (Table 5)。Fasと

FasLの発現程度がいずれもGradeⅢであった1症例ではAIが5.53で、他の発現程度別組合せ群のAIよりも高値を示した。また、上皮におけるFasの発現がGradeⅢ、浸潤リンパ球におけるFasLの発現がGradeⅡの2症例ではAIが2.41 ± 2.14で若干低値を示した。しかし、そのほかの発現程度の組合せ別にみた症例のAIは2.96 ± 3.12から3.43 ± 2.15の間にあり、これらの間に有意差は認められなかった。

考 察

1. 口腔扁平苔癬の上皮細胞におけるアポトーシス  
アポトーシスはKerrら(1972)<sup>4)</sup>によって提

唱された生理的な環境で起こる能動的な細胞死である。したがって、アポトーシスは単に形態発生時にもみられる特殊なものではなく、全ての細胞に備わり細胞の増殖および分化とともに生体を構成する組織の細胞動態、ひいては恒常性の維持に必要不可欠なものである。そして、アポトーシスの異常によりさまざまな病態が引き起こされることが明らかにされつつある。

アポトーシスの検出法としては形態学的方法、組織化学的方法、生化学的方法などがあるが、その中でTUNEL法はアポトーシスの際に生じるDNA鎖切断端を可視化し組織切片上でアポトーシスを検出する方法で、Gavrieliら(1992)<sup>16)</sup>によって報告され、アポトーシスの組織内における局在の観察や定量化を可能にした。TUNEL法では壊死によって生じるDNA鎖切断端をも検出する可能性があるが、その形態的特徴や発現の様相からこれらの区別は容易である。病理組織学的様相とアポトーシスとの関連を追究するには、組織切片上での発現を検出することが大切である。この点からもTUNEL法は有用な検出法であり、今回、著者はTUNEL法により上皮細胞のアポトーシスを追究した。

口腔領域でのアポトーシスと疾患との関りについては、白板症や前癌状態、上皮内癌などにおける上皮細胞のアポトーシスについて検索され、これらの悪性化や組織浸潤との関りが推察されている<sup>18)</sup>。しかし、OLPの組織所見とAIとの関連を考察した文献は著者の渉猟した限りではこれまでにみられない。著者の今回の検索ではOLPの上皮におけるAIはNOMに比較して有意に増大し、さらに粘膜固有層のリンパ球浸潤が高度な症例ではAIの上昇する傾向が認められた。このような所見からリンパ球浸潤の程度と口腔扁平苔癬の上皮におけるアポトーシス発現との間に密接な関連のあることが示唆された。

OLPでは粘膜上皮のなかで増殖能を持つ基底細胞層と有棘層下層に多数のアポトーシスが発現していた。このことは組織を構成する細胞

数の減少、ひいては上皮組織の萎縮を引き起こし、OLPの組織学的様相の改変にアポトーシスが関与していることを示唆する特徴と推察される。OLPの病態は上皮の萎縮、肥厚、過角化、びらん形成などが同一病変内に混在し、まれにはあるが悪性化の報告もみられるなど、その多様性が指摘されている。この病変の形成機序については、従来より上皮初発説<sup>19)</sup>と上皮下固有層初発説<sup>15)</sup>とがあったが、現在では遅延型皮膚粘膜アレルギー反応がlichenoid lesionと呼ばれるOLPと類似した病態を呈する<sup>20)</sup>ことから、同様な過程を経て発症するという考え方が主流である。すなわち、上皮下のリンパ球浸潤がOLPの病態形成に不可欠であると考えられている<sup>21)</sup>。今回、OLPでは経過とともに上皮下のリンパ球浸潤が増加し、それに伴って上皮の破壊やアポトーシスが発現する傾向にあった。また、OLPにおける上皮の肥厚は軽度でしかも部分的であり、ほとんどが萎縮傾向を示したことから、典型的なOLPの組織像を呈するものではリンパ球浸潤により上皮細胞のアポトーシスが誘導され、上皮の萎縮を生じるものと考えられた。

上皮の肥厚は、BCL2ファミリー<sup>7)</sup>、あるいはEpstein-Barr virusやAdenovirusなどの感染によるアポトーシスの抑制<sup>22)</sup>が一因になっているものと考えられる。最近、Dekkerら<sup>23)</sup>やSchifterら<sup>17)</sup>はOLPの上皮基底層から傍基底層の細胞に野生型p53が高頻度に発現することを報告している。OLPはびらんを伴い、経過が長期に及ぶにも関わらず悪性化率が低い。これはOLPに罹患した組織がDNAレベルで生じた異常を認識し、これらを修復あるいは排除するアポトーシス誘導機構が正常に機能していることによるものと推察される。組織におけるアポトーシスの抑制は、その結果として浸潤リンパ球による傷害が上皮細胞内に蓄積され、発生頻度こそ少ないがOLPの悪性化の原因の一つになることが推察される。

## 2. 組織におけるFasおよびFasLの発現

アポトーシスの誘因として種々の内的および外

的要因があげられており、その誘導機構は複雑である。1989年、YONEHARA ら<sup>23)</sup>による Fas 抗体の発見によってアポトーシスが細胞間相互作用によっても誘導されることが明らかにされた。Fas は tumor necrosis factor (TNF) / nerve growth factor (NGF) 受容体スーパーファミリーに属する I 型細胞膜貫通蛋白質である。FasL は TNF スーパーファミリーに属する II 型膜貫通蛋白質であり、Fas を発現する細胞は FasL が結合することによりアポトーシスが誘導される<sup>24, 25)</sup>。この Fas を介するアポトーシスは免疫系における自己寛容の成立とホメオスタシスの維持に不可欠で生体にとって必要ではあるが、その発現の異常は自己免疫疾患<sup>6)</sup>や骨髄移植後の GVHD<sup>10)</sup>などの、さまざまな疾患の病態発現に深く関わっている。OLP の病態が細胞性免疫機構の異常を示唆し、また、Fas および FasL の発現が上皮細胞や活性化 T 細胞に認められることから、OLP におけるアポトーシスの誘導にもこの Fas/FasL 経路の関与が考えられてきた<sup>26, 27)</sup>。Sayama ら<sup>28)</sup>は扁平苔癬や多形性紅斑などの皮膚病変の特に細胞融解が盛んに起こっている部分に近接した Keratinocyte に Fas の発現が著しく増強していると述べている。今回検討した 30 症例の OLP では基底層の細胞に Fas が強く発現した症例は 1 例のみであった。また、村木ら<sup>27)</sup>は OLP では高範囲の有棘層に高率に Fas の発現が認められるとし、Fas の過剰な発現によるアポトーシスの誘導によって上皮のびらんが生じやすくなると考察している。

Fas/FasL に関するこの研究の結果では、OLP における Fas および FasL の発現はその強さおよび局在性ともに正常口腔粘膜に類似しているとする Dekker ら<sup>22)</sup>の報告とほぼ類似した所見であった。今回、OLP における固有層のリンパ球浸潤の増加に伴って上皮層のアポトーシスの発現が増加したことから、両者間の密接な関連性が示唆された。しかし、上皮基底層の変性・破壊と AI とは明らかな関連性を示さなかったことから、リンパ球によるアポトーシ

の誘導には細胞の傷害だけではなく、リンパ球の放出する TNF あるいはアポトーシスを誘導する Fas および FasL や p53 などの誘導因子の関与が示唆された。

最近、OLP に類似した口腔粘膜病変を引き起こす GVHD の発症には Fas / FasL, perforin/granzyme, TNF- $\alpha$  など多数の因子がそれぞれ異なった組織の病変に関与していることが報告されている<sup>10, 28, 29)</sup>。これまでにアポトーシスは極めて多彩な因子によって誘導あるいは抑制され、その発現が制御されていることが明らかにされている。実際に CD 8 + Tcell の放出する granzyme<sup>30)</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>31)</sup>, heat shock proteins<sup>32)</sup>などが皮膚の扁平苔癬や OLP におけるアポトーシスや病態形成に関与するという報告もある。また、今回検討した OLP の固有層に可溶性 Fas および FasL の発現を示唆する所見が散見された。この可溶性 Fas および FasL は Fas/FasL によるアポトーシスの誘導を抑制するとされており<sup>33, 34)</sup>、このことが Fas および FasL とアポトーシスとの発現に密接な相関性が得られなかった理由の一つと考えられた。

## 結 語

口腔扁平苔癬の粘膜上皮におけるアポトーシスの発現およびその誘導因子として Fas/FasL の発現を免疫組織化学的に検索し、以下の結論を得た。

1. 口腔扁平苔癬の粘膜上皮におけるアポトーシス発現は正常粘膜に比べ有意に増大していた。このことから、口腔扁平苔癬における粘膜上皮の組織学的様相の改変にはアポトーシスの異常が関与していることが示唆された。
2. 口腔扁平苔癬の粘膜上皮における Apoptotic Index は固有層における浸潤リンパ球の増加とともに有意に増加していた。このことから、アポトーシスの発現には固有層における浸潤リンパ球の関与が示唆された。
3. 口腔扁平苔癬の粘膜上皮における Fas および FasL の発現の局在性は正常粘膜に比較し

て多様であった。

4. 粘膜上皮細胞および固有層の浸潤細胞における Fas および FasL の発現の程度と上皮細胞の AI との間に一定の傾向がみられなかった。このことから、OLP の上皮におけるアポトーシスの誘導・発現には Fas/FasL 経路のみでなく、他の誘導因子の関与が推察された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なる指導と校閲を賜りました工藤啓吾教授、岩手医科大学歯学部口腔病理学講座佐藤方信教授、ならびに、ご校閲とご助言をいただきました岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座名和橙黄雄教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究の遂行にあたり数々のご教示とご助言をいただきました口腔病理学講座教室員諸兄に深く感謝いたします。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の諸先生に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、第51回日本口腔科学会総会(1997年4月、新潟市)、第8回日本口腔粘膜学会総会(1998年7月、盛岡市)、第24回岩手歯学会総会(1998年11月、盛岡市)、第9回日本口腔粘膜学会総会(1999年6月、横須賀市)において発表した。

## 文 献

- 1) Regezi, J. A., and Scibba, J.: Oral pathology; 2nd ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp 114-119, 1993.
- 2) 稲村彦衛門, 領家 和男, 渡部 隆夫, 森田 ますみ, 岡本 和巳, 道田 章仁, 永見 輝生, 谷尾 和彦, 三上 有史, 小川 隆嗣, 浜田 駿: 舌扁平苔癬の悪性化例ならびに文献的考察, 日口外誌, 33: 156-162, 1987.
- 3) 鹿嶋 光司, 猪ヶ倉 徳孝, 小村 光広, 濱田 真人, 有馬 良治, 迫田 隅男, 芝 良祐: 口腔扁平苔癬からの癌化が強く疑われた扁平上皮癌の4症例, 口腔腫瘍, 6: 238-245, 1994.
- 4) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A. R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257, 1972.

- 5) Emlen, W., Niebur, J., and Kadera, R.: Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 152: 3685-3692, 1994.
- 6) Jodo, S., Kobayashi, S., Kayagaki, N., Ogura, N., Feng, Y., Amasaki, Y., Fujisaku, A., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., & Koike, T.: Serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 107: 89-95, 1997.
- 7) Yang, E., and Korsmeyer, S. J.: Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL 2 family and cell death. *Blood* 88: 386-401, 1996.
- 8) Drappa, J., Vaishnaw, A. K., Sullivan, K. E., Chu, Jia-Li, and Elkon, K. B.: Fas gene mutations in the Canale-Smith Syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N. Engl. J. Med.* 335: 1643-1649, 1996.
- 9) Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., & Nagata, S.: Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364: 806-809, 1993.
- 10) Badley, A. D., McElhinny, J. A., Leibson, P. J., Lynch, D. H., Alderson, M. R., and Paya, C. V.: Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J. Virol.* 70: 199-206, 1996.
- 11) Braun, M. Y., Lowin, B., French, L., Acha-Orbea, H., and Tschopp, J.: Cytotoxic T cells deficient in both functional Fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* 183: 657-661, 1996.
- 12) Thompson, C. B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462, 1995.
- 13) Yoshioka, C., Muraki, Y., Fukuda, J., Haneji, T., and Kobayashi, N.: Identification of the Fas antigen in human gingiva. *J. Dent. Res.* 75: 1353-1357, 1996.
- 14) Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S.: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75: 1169-1178, 1993.
- 15) 池村 邦男: 口腔粘膜の扁平苔癬に関する臨床的ならびに病理学的研究, 日口外誌, 21: 555-581, 1972.
- 16) Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501, 1992.



- 17) Schifter, M., Jones, A. M., and Walker, D. M.: Epithelial p53 gene expression and mutational analysis, combined with growth fraction assessment, in oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med.* 27 : 318-324, 1998.
- 18) Birchall, M.A., Winterford, C.M., Allan, D.J., and Harmon, B.V. : Apoptosis in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of the oropharynx and oral cavity : a preliminary study : *Oral Oncol. Eur. J. Cancer* 31B : 380-383, 1995.
- 19) Johnson, F. R., and Fry, L. : Ultrastructural observations on lichen planus. *Arch. Dermatol* 95 : 596-607, 1967.
- 20) Laine, J., Konttinen, Y.T., Beliaev, N., Happonen, R-P : Immunocompetent cells in amalgam-associated oral lichenoid contact lesions. *J. Oral Pathol. Med.* 28 : 117-121, 1999.
- 21) 伊東大典, 南雲正男 : 口腔扁平苔癬—基礎的研究の進歩—, 日口粘膜誌, 1 : 1-16, 1995.
- 22) Dekker, N. P., Lozada-Nur, F., Lagenaur, L. A., MacPhail, L. A., Bloom, C. Y., and Regezi, J. A.: Apoptosis-associated markers in oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med.* 26 : 170-175, 1997.
- 23) Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. : A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 169 : 1747-1756, 1989.
- 24) Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. : Molecular cloning and expression of the Fas Ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75 : 1169-1178, 1993.
- 25) Nagata, S. : Apoptosis by death factor. *Cell* 88 : 355-365, 1997.
- 26) Sayama, K., Yonehara, S., Watanabe, Y., and Miki, Y. : Expression of Fas antigen on keratinocytes in vivo and induction of apoptosis in cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 103 : 330-334, 1994.
- 27) 村木祐孝, 吉岡千尋, 福田仁一, 羽地達次 : 抗 Fas 抗体 (Fas D) を用いた免疫組織化学的研究—口腔白板症, 扁平苔癬, 扁平上皮癌における Fas 抗原の検出—, 日口外誌, 43 : 693-698, 1997.
- 28) Braun, M. Y., Lowin, B., French, L., Acha-Orbea, H., and Tschopp, J.: Cytotoxic T cells deficient in both functional Fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* 183 : 657-661, 1996.
- 29) Hattori, K., Hirano, T., Miyajima, H., Yamakawa, N., Tateno, M., Oshimi, K., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. : Differential effects of anti-Fas ligand and anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  antibodies on acute graft-versus-host disease pathologies. *Blood* 91 : 4051-4055, 1998.
- 30) Shimizu, M., Higaki, Y., Higaki, M., Kawashima, M. : The role of granzyme B-expressing CD 8 -positive T cells in apoptosis of keratinocytes in lichen planus. *Arch. Dermatol. Res.* 289 : 527-532, 1997.
- 31) Suger mann, P. B., Savage, N. W., Seymour, G. J., and Walsh, L. J.: Is there a role for tumor necrosis factor- $\alpha$  ( TNF- $\alpha$ ) in oral lichen planus? *J. Oral Pathol. Med.* 25 : 219-224, 1996.
- 32) Chaiyarit, P., Kafrawy, A. H., Miles, D. A., Zunt, S. L., Van Dis, M. L., and Gregory, R. L.: Oral lichen planus : an immunohistochemical study of heat shock proteins (HSPs) and cytokeratins (CKs) and a unifying hypothesis of pathogenesis. *J. Oral Pathol. Med.* 28 : 210-215, 1999.
- 33) Suda, T., Hashimoto, H., Tanaka, M., Ochi, T., and Nagata, S. : Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas Ligand blocks the killing. *J. Exp. Med.* 186 : 2045-2050, 1997.
- 34) Jodo, S., Kobayashi, S., Kasahara, H., Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Kayagaki, N., Okumura, K., and Koike, T.: The mechanisms of apoptosis inhibition by soluble Fas.: *Arthritis Rheum.* 41(Suppl.): S75, 1998.