

# 口腔扁平苔癬の発症メカニズムに関する基礎的研究

前 田 耕 作

## A Study on the Pathogenesis of Oral Lichen Planus

Kohsaku Maeda

(平成16年2月3日受付)

### 緒 言

口腔扁平苔癬（以下、OLP）は、口腔粘膜に生じる角化異常を伴う難治性の慢性炎症性疾患で、組織学的には、上皮の錯角化または過角化、基底細胞層の液化変性、基底細胞直下の帯状のリンパ球浸潤を特徴的所見とする。リンパ球浸潤のほとんどがCD4陽性やCD8陽性のT細胞であることから、細胞性免疫の異常が関与していると考えられ、病変の特殊性が断面的に明らかになりつつある。しかし、正常な免疫機構がなぜ破綻し、いかなる病的過程を経て最終的な病変を形成するようになるのかを一つの流れとして説明するには未だ至ってはいない<sup>1)</sup>。このため、OLPが皮膚扁平苔癬を併発したり、またC型肝炎ウイルス抗体陽性者に有意に多いとされることから、全身疾患の一分症ではないかとの疑問にも結論が出されていない<sup>2)</sup>。また、生理的な口腔粘膜の維持機構が明らかになっていないこともOLPの解明を遅らせている。

OLPと全身との関わりを示唆し、かつOLP解明の糸口になると考えられる疾患に移植片対宿主病（GVHD）がある。GVHDは、ドナー由来のT細胞がレシピエントの細胞を異物として認識して生じる全身の免疫反応であり、各種の多くの臓器が障害される。このため口腔組織も例外ではなく、臨床的に、口腔粘膜にOLP類

似病変を引き起こすことが知られている<sup>3)</sup>。組織学的にも、口腔粘膜の上皮層の肥厚、基底細胞の変性・壊死や粘膜固有層にリンパ球の浸潤を認める。OLPとGVHDのOLP様病変の発症メカニズムに共通点があるならば、OLP患者にも、GVHDが他臓器に示す病態的变化を生じているはずである。

GVHDの標的臓器の1つに、唾液腺があげられる。唾液腺は、種々のサイトカインを唾液中に産生し<sup>4-6)</sup>、シェーグレン症候群の患者では、唾液中のある種のサイトカイン濃度が上昇していることが知られている<sup>5)</sup>。

以上の観点から、OLP患者の唾液腺にGVHDと同様の変化が生じているか否かを検討すべく、以下のごとき研究を行った。まず、OLP罹患口腔粘膜にも発現が認められ、シェーグレン症候群でも検索されているIL1 $\alpha$ 、IL2、IL6、IL8、TNF $\alpha$ の5種類の炎症性サイトカインの発現と局在様相を、正常唾液腺で免疫組織学的に確認し、唾液中に産生・放出されるサイトカインに関して、OLP患者と健常者のもので比較検討した。さらに、OLP患者の口唇腺における組織変化を観察することにした。

一方、OLP病変部の口腔粘膜にも様々なサイトカインが発現し、OLPの発症に関わっていることが報告されている。例えば、ケラチノサイトから産生されるIL1 $\beta$ 、IL6、TNF $\alpha$ 、G-CFSなどのサイトカインは、浸潤するT細胞を活性化し、また浸潤T細胞はIL1 $\beta$ 、IL2、IL6、IFN $\gamma$ などのサイトカインを産生し、これらはautocrineあるいはparacrine的に作用して、OLP病変が形成されると考えられている<sup>7,8)</sup>。

サイトカインには、多くのものが知られており、それらはネットワークを形成し、作用の多様性、重複性を示すため、極めて複雑な様相を呈している。このため、OLP病変部である口腔粘膜にも、いままで検討されていないサイトカインネットワークも存在すると考

広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻顎口腔頭部医科学講座（旧 口腔外科第二）（主任：石川武憲教授）、三菱三原病院 歯科口腔外科

本研究の一部は、平成10年度科学研究費補助金（奨励研究（A）課題番号09771760）によって行われた。

本論文の要旨の一部は、第40回日本口腔外科学会総会（平成7年10月、東京）、第8回日本口腔粘膜学会総会（平成10年7月、盛岡市）、第13回日本口腔粘膜学会総会（平成15年7月、名古屋市）において口演発表した。

えられる。

近年、消化管粘膜において、上皮細胞間リンパ球 (intraepithelial lymphocyte: IEL) や粘膜固有層リンパ球 (lamina propria lymphocyte: LPL) などの粘膜内リンパ球と腸管上皮細胞との生理的相互作用の存在が明らかになり、それぞれの分化や増殖においてサイトカインやホルモン、増殖因子などの液性因子を介して、生理的な維持がなされていることが知られるようになってきた。その中で、特に、IL7やKGFなどのサイトカインが注目され、腸管や皮膚などで盛んに研究されるようになった。

以上から、正常口腔粘膜における上皮-粘膜固有層(主にリンパ球)間の生理的相互作用を、IL7とKGFのサイトカインについて検討し、そのシステムの破綻との観点から、OLPの発症メカニズムに焦点をあて検討することにした。

### 材料ならびに方法

#### 1. OLP患者の唾液腺変化に関する検討

##### 1) 正常唾液腺のサイトカイン発現

インフォームドコンセントを得た頭頸部外科手術を受けた患者から、組織学的に正常な唾液腺(耳下腺, 顎下腺, 舌下腺)を得た。試料は直ちに分割し, 半分を10%中性ホルマリンで固定後, パラフィン包埋した。残りの半分はOCT compoundに包埋し, 液体窒素で凍結し,  $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片は, マウスモノクローナルIL6抗体(Genzyme, Cambridge, MA)を一次抗体として用いて, ABC法で免疫染色を行った。

凍結材料はcryostatで $6\mu\text{m}$ に薄切し, アセトンで10分間固定後, マウスモノクローナルIL1 $\alpha$ , IL2, IL8, TNF $\alpha$ 抗体(Genzyme, Cambridge, MA)を用いて, ABC法で免疫染色を行った。

##### 2) 唾液中と血清中のサイトカイン濃度の測定

OLPと臨床診断された36名の患者(男性12名, 女性24名)と口腔疾患のない健康な36名のボランティア(男性18名, 女性18名)から, 無刺激下の全唾液, 顎下腺舌下腺唾液, 耳下腺唾液および血液を採取した。顎下腺舌下腺唾液と耳下腺唾液は, それぞれワルトン氏管とステノン氏管の開口部にラスリーカップを静置し, 低圧吸引によって採取した。唾液と血清は, 採取後直ちに $-20^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に保存した。唾液中サイトカイン濃度の測定時に, 試料の各1つを溶解し,  $400\text{g}$ で10分間遠沈をし, 上清を使用した。唾液と血清の被採取者の年齢や性を表1-aに, OLP患者の臨床病型を表1-bに記載した。

サイトカイン濃度測定は, R & D社から購入した

表 1-a 唾液と血清の被採取者

	検索例数	男性	女性	年齢 (平均 $\pm$ SD)
OLP	36	12	24	56.9 $\pm$ 13.0
Control	36	18	18	24.1 $\pm$ 4.4

表 1-b 唾液と血清を採取した OLP 患者の臨床視診型

病 型	び ら ん	
	あ り	な し
網 状	1	7
線 上	0	8
環 状	3	4
斑 状	1	5
萎 縮	3	2
丘 疹	1	1

ELISA kitを用いて, 全唾液, 顎下腺舌下腺唾液, 耳下腺唾液および血清中のIL1 $\alpha$ , IL2, IL6, IL8, TNF $\alpha$ を測定した。

サイトカイン濃度の分析は, マンホイットニーのU検定を用い, p値が0.05以上のものを統計学的に有意差ありと判定した。

##### 3) 口唇腺の組織学的検索と培養上清中のサイトカイン濃度の測定

インフォームドコンセントを得た10名のOLP患者から, 病変部の試切時に口唇腺を採取した。各患者から採取した試料の半分をホルマリンで固定後, パラフィン包埋し, 残りの半分を湿重量測定後, RPMI-1640培地無血清下で $37^{\circ}\text{C}$ 24時間培養し, その上清を測定まで $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。対照とした口唇腺は, 下唇粘液嚢胞の患者8名から, 組織学的に正常なものを採取し, 上記と同様の操作を行った。なお,  $37^{\circ}\text{C}$ で24時間の培養後の口唇腺には組織学的に異常のないことを確認した。

口唇腺の被採取者は, すべて組織学的にOLPであったが, これらの年齢・性・臨床病型については表2-a, bに記載した。

組織学的検索は, 通常のHE染色およびCD3, CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, CD20の各抗体(DAKO)

表 2-a 口唇腺の被採取者

	症例数	男性	女性	年齢 (平均 $\pm$ SD)
OLP	10	3	7	55.0 $\pm$ 13.6
Control	8	2	6	26.3 $\pm$ 14.3

表 2-b 口唇腺検索 OLP 患者の臨床視診型

病 型	び ら ん	
	あ り	な し
網 状	0	1
線 状	0	2
環 状	2	4
斑 状	1	0
萎 縮	0	0
丘 疹	0	0

によって免疫染色を行った。

サイトカイン濃度の測定は、R & D社から購入した ELISA kit を用いて、培養上清中の IL1 $\alpha$ 、IL2、IL6、IL8、TNF $\alpha$  について行った。

## 2. OLP での上皮と粘膜固有層（主にリンパ球）間相互作用の変化に関する検討

### OLP 病変部の上皮と粘膜固有層におけるサイトカインの発現

インフォームドコンセントを得た3名の OLP 患者から、生検時に病変の一部を採取した。試料は直ちに OCT compound に包埋、液体窒素で凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫に保存した。一部は PLP (periodate-paraformaldehyde) 固定後、同様に OCT compound に包埋し、液体窒素で凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。対照は、インフォームドコンセントを得た3名の下顎埋伏智歯患者から組織学的に正常な頬粘膜を抜歯時に採取し、上記と同様の操作を行った。

無固定凍結材料は cryostat で  $6\ \mu\text{m}$  の薄切片とし、一部はアセトンによる10分固定後、ABC 法でマウスモノクローナル IL7R 抗体 (Genzyme)、ヤギポリクローナル KGFR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) の免疫染色を行った。また一部は薄切後、アセトン10分および4% PFA (paraformaldehyde) 5分固定後、ABC 法によってヤギポリクローナル KGF 抗体 (R & D) の免疫染色を行った。

PLP 固定凍結材料は、cryostat で  $6\ \mu\text{m}$  の薄切片にした後、ABC 法でマウスモノクローナル IL7 抗体 (Genzyme) の免疫染色を行った。

また、IL7R および KGF 染色後、一部はクエン酸緩衝液中で  $99^{\circ}\text{C}$  10分熱処理後、マウスモノクローナル CD3 抗体 (Immunotech) によって二重染色をおこなった。

## 実 験 結 果

### 1. 正常唾液腺（耳下腺、顎下腺、舌下腺）における IL1 $\alpha$ 、IL2、IL6、IL8 と TNF $\alpha$ の発現様相と局在（図1）

IL1 $\alpha$ 、IL2、IL6、IL8 と TNF $\alpha$  のどのサイトカインもすべての唾液腺に発現していた。IL8 と TNF $\alpha$  は導管（介在部、線状部）および腺房に、IL6 と IL1 $\alpha$  は導管に、IL2 は腺房に局在していた。

### 2. 唾液と血清中の IL1 $\alpha$ 、IL2、IL6、IL8 と TNF $\alpha$ の濃度（図2）

OLP 患者の唾液（全唾液、顎下腺舌下腺唾液、耳下腺唾液）中の IL1 $\alpha$ 、IL6、IL8、IL2、TNF $\alpha$  の濃度は、いずれも、対照群に比較して上昇していた。特に、IL1 $\alpha$ 、IL6、IL8 は、有意の上昇を示した。対照的に、血清中のサイトカイン濃度は、いずれも OLP 患者と対照群の間で有意差はみられなかった。

### 3. 口唇腺の HE 像と CD3、CD4、CD8、CD45RO、CD45RA や CD20 の発現（図3、表3）

OLP 患者の口唇腺には、び漫性のリンパ球浸潤、導管周囲のリンパ球浸潤、腺房の萎縮や変性などが、腺組織全体に観察された。特に、び漫性のリンパ球浸潤は全例に認められた。これらのリンパ球は、主に CD3陽性、CD45RO 陽性、CD45RA 陰性の T 細胞からなっており、CD20陽性 B 細胞はほとんど認めなかった。これら T 細胞は、CD4 より CD8 がやや優勢であった。

### 4. in vitro における口唇腺のサイトカイン産生（表4）

OLP 患者と対照群の口唇腺から、サイトカインの発現を検索するため、培養上清中への IL1 $\alpha$ 、IL6、IL8、IL2、TNF $\alpha$  の各分泌量を測定した。OLP 患者の IL1 $\alpha$ 、IL6、IL8、IL2、TNF $\alpha$  の各濃度は対照群よりも高く、特に IL8 濃度は有意に高かった。

### 5. 口腔粘膜の IL7、IL7R、KGF と KGFR の発現（図4、5）

IL7 は、正常口腔粘膜では基底膜や有棘層より上層部の細胞質に発現していたが、OLP では基底膜以外にはいずれも発現が低下していた。

IL7R は、正常口腔粘膜では固有層の一乳頭部につき約5～6個認められるにすぎなかったが、OLP では基底細胞直下に浸潤したリンパ球の約30～40%に発現がみられた。また、二重染色により、IL7R 陽性のリンパ

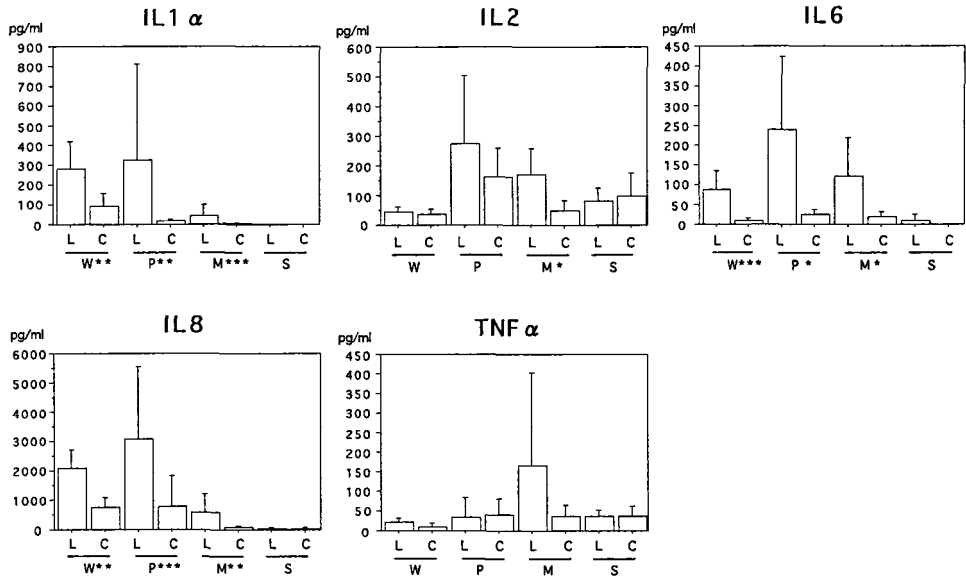


図2 OLP患者と対照群における唾液と血清中のサイトカイン濃度  
 OLP患者の全唾液、顎下舌下腺唾液、耳下腺唾液中のIL1α、IL6やIL8濃度は有意に高値を示した。  
 L: OLP, C: コントロール, W: 全唾液, P: 耳下腺唾液, M: 顎下腺舌下腺唾液, S: 血清  
 (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001)

表3 OLP患者10例の口唇腺の組織学的所見

組織所見	例数
び慢性リンパ球浸潤	- 0 + 8
導管周囲のリンパ球浸潤	++ 2 + 4
腺房の萎縮および/または破壊	- 5 + 5

+ : 1小葉内の50%未満, ++ : 1小葉内の50%以上

表4 OLP患者と対照者の培養上清中のサイトカイン産生

Cytokines (ng/mg/h)	OLP	Control
IL1α	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2
IL8*	202.2 ± 143.4	28.0 ± 35.4
IL6	31.4 ± 38.9	22.3 ± 28.4
IL2	7.2 ± 6.8	6.0 ± 5.9
TNFα	6.4 ± 6.6	5.4 ± 3.3

\*: p<0.05で統計学的有意差あり

球はCD3陽性T細胞であることが確認された。

KGFは、正常口腔粘膜では、主に基底細胞と固有層の線維芽細胞の核に局在していたが、OLPの基底細胞層では、KGFの発現は低下し、基底細胞直下に浸潤集積した多くのリンパ球の核に発現していた。基底細胞層でのKGF発現の低下は、空胞変性などによるものであり、KGF陽性リンパ球は二重染色の結果、CD3陽性T細胞であることが確認された。

KGFRは、正常口腔粘膜では、固有層乳頭部に近接した基底細胞層内に認められた。

以上の結果、OLP病変部においては、粘膜上皮のIL7の発現は低下し、基底細胞直下に浸潤集積したT細胞には、KGFやIL7Rを強発現するものが認められた。

なお、正常口腔粘膜の固有層乳頭部に接した基底細胞層内には、CD3陽性のT細胞が認められたが、OLPでは同部にみられるT細胞は消失し、基底細胞直下に浸潤していた(図6)。

### 考 察

#### 1. OLPと全身の関係について

OLPは、上皮直下に浸潤するリンパ球のほとんどがCD4陽性やCD8陽性のT細胞であることから、細胞性免疫の異常が関与していると考えられているが、病因について本質的なことはほとんどわかっていない<sup>1)</sup>。

口腔粘膜にOLP類似病変を引き起こすGVHDは、OLPの解明の糸口になると考えられ、GVHDの標的臓

器の1つに唾液腺があげられる。

OLP 患者の唾液腺に関しては、唾液中中コルチゾール濃度の上昇<sup>9)</sup>、唾液中の IgA や IgG サブクラスの上昇<sup>10)</sup>、唾液中の好中球食作用の増加<sup>11)</sup> など異常を指摘する報告が多いが、唾液腺機能に変化はないとする報告<sup>12)</sup> もある。その中で、OLP 患者の口唇腺組織を検索した報告<sup>13)</sup> が唯一みられ、本研究結果と同様にリンパ球の浸潤や腺房の萎縮・変性などを認めているが、リンパ球の免疫学的検索や、GVHD との関連性には触れられていない。

正常唾液腺は各種のサイトカインを産生し、唾液中に分泌している事実が知られている<sup>14-16)</sup>。これらサイトカインの機能については明らかでない面も多いが、口腔粘膜の生理的な維持<sup>15,17)</sup> や唾液腺機能の維持<sup>18)</sup> に関わっていると考えられている。シェーグレン症候群の患者の唾液中には、IL1 $\alpha$ 、IL6、IL10、IFN $\gamma$  などのサイトカインが上昇していることが報告され<sup>5)</sup>、これは組織内に浸潤したリンパ球の影響によると考えられる<sup>5)</sup>。

著者は、OLP と唾液腺の関わりを検討する前準備として、まず、正常唾液腺での IL1 $\alpha$ 、IL2、IL6、IL8、TNF $\alpha$  の5種類のサイトカインの発現を免疫組織学的に確認した。この結果、IL6と IL1 $\alpha$  は導管（介在部、線状部）に、IL8と TNF $\alpha$  は導管および腺房に、IL2 は腺房に発現しているのが観察された。

次に、全唾液、顎下腺舌下腺唾液および耳下腺唾液中のサイトカイン濃度を ELISA 法で測定した結果、OLP 患者の唾液中には、対照群に比べ、IL1 $\alpha$ 、IL6、IL8の濃度が有意に上昇していることが判明した。この結果は、OLP 患者の唾液腺（特定の唾液腺ではなく、唾液腺全般において）には、何らかの変化が生じていることを示していた。なお、唾液中のサイトカイン濃度測定は、他疾患においても検討する必要がある、各種疾患の診断に有用な検査法となる可能性もある。

次に、OLP 患者の唾液中サイトカイン濃度の上昇を説明するために、同患者の口唇腺を検討すると、全例の口唇腺にび慢性的リンパ球が浸潤しており、これによって、いくつかの症例では、腺房の変性や破壊をきたしていた。さらに、免疫組織学的に検討したところ、これらの浸潤リンパ球は CD4とそれよりやや優勢な CD8 陽性の CD3 陽性 T 細胞からなっていた。以上の所見は、導管周囲のリンパ球浸潤を特徴とし、それらリンパ球は CD4 陽性 T 細胞が優勢で、B 細胞も含まれるシェーグレン症候群よりむしろ、び慢性的リンパ球浸潤を特徴とし、それらリンパ球は CD4 とそれよりやや優勢な CD8 陽性の CD3 陽性 T 細胞からなる GVHD の像<sup>3)</sup> に類似していた。

さらに、OLP の口唇腺培養上清中のサイトカイン濃度を検討すると、IL8のみが有意に上昇していたが、他のサイトカインも上昇していたことから、唾液中のサイトカイン濃度の上昇の結果と併せて考えると、口唇腺での組織学的変化は、大唾液腺にも生じていることが推測された。

つまり、OLP 患者の唾液中サイトカイン濃度の上昇は、リンパ球浸潤による唾液腺上皮細胞の変化の結果であると考えられた。すなわち、OLP 患者においては、口腔粘膜と同様に、唾液腺にもリンパ球浸潤によって特徴づけられる免疫学的反応が生じており、これらの所見は GVHD に類似していることから、OLP は全身的な免疫異常がその発症に関わっていると考えられ、口腔粘膜病変はその一分症にすぎない可能性を示唆している。

さらに、浸潤する T 細胞が抗原特異的であるか否かを知ることは興味あることである。現在一般に考えられているように<sup>1)</sup>、OLP 特異抗原が存在するならば、口腔粘膜病変部と唾液腺での T 細胞は同一抗原を認識している可能性がある。しかし、GVHD との類似性から判断すると、OLP 特異抗原は存在しないと予測され、このことは T 細胞レセプターの解析で明らかになるであろう<sup>19)</sup>。

## 2. OLP と口腔粘膜維持機構の関係について

OLP 病変部である口腔粘膜については、これまで局所のサイトカインの関与<sup>7,8)</sup> や接着分子<sup>20,21)</sup> との関係など多くの報告があり、一般的には、OLP ではケラチノサイトで産生されたサイトカインによって、血管内皮細胞や単核球の接着分子の発現が増強され、その結果、単核球の浸潤が促され、活性化した単核球が上皮下へ浸潤すると考えられている<sup>22)</sup>。

近年、主に消化管や皮膚などの局所免疫システムが研究されるにつれ、上皮と局所に存在するリンパ球の相互作用の存在が少しずつ明らかになってきた。すなわち、それぞれの分化・増殖に対して、サイトカインやホルモン、増殖因子などの液性因子を介して、生理的な維持がなされているというものである。正常口腔粘膜の固有層には、V $\delta$ 1 の  $\gamma$ 8 T 細胞の存在することが知られており<sup>23)</sup>、上皮と粘膜固有層（主にリンパ球）間に種々の生理活性物質を介しての生理的分化相互作用の存在が推測される。

これら因子の候補としては、IL7 や KGF、また KGF との関連が指摘され、CD8 T 細胞上にそのレセプターの存在するエストロゲンなどがあげられる<sup>24,25)</sup>。実験的にも卵巣摘出後のエストロゲン欠乏状態のマウスに口腔粘膜の萎縮が観察されている。

IL7はIL7Rを発現するリンパ球前駆細胞の増殖・生存過程には必須因子である。また、IL7/IL7Rのシグナルが未熟なT細胞におけるT細胞受容体 $\beta$ 遺伝子のV(D)J再構成を誘導すること<sup>26)</sup>、B細胞における免疫グロブリン遺伝子の再配列の誘導に不可欠であることが示され、T細胞やB細胞の増殖のみならず、初期分化にも重要であることが判明している。当初、IL7は胸腺に発現していることが知られていたが、最近では、ヒト大腸粘膜上皮やマウス皮膚ケラチノサイトにも発現していることが報告されるようになってきた<sup>27,28)</sup>。

一方、KGFは線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーであり、上皮細胞の成長を促進する因子として知られるようになった。KGFは線維芽細胞だけではなく、他の細胞によっても産生される。近年、腸管の上皮間 $\gamma\delta$ T細胞が、KGFを産生していることが報告され<sup>29)</sup>、 $\gamma\delta$ T細胞を抗体の投与によって除去すると、腸粘膜の萎縮の生じることが判明しており、線維芽細胞や $\gamma\delta$ T細胞によって産生されたKGFが、消化管粘膜の構築の維持にも一定の役割を果たしている可能性が示されている。

本実験では、ヒト正常口腔粘膜上皮は、IL7を産生し、口腔粘膜固有層のリンパ球の一部はIL7Rを発現していた。このことは、粘膜固有層内には未熟なT細胞が存在し、粘膜上皮から産生されるIL7により、TCR $\beta$ 遺伝子の再構成などの初期分化の行われている可能性が示唆される。また、基底細胞や粘膜固有層の線維芽細胞やリンパ球はKGFを産生し、上皮幹細胞が存在すると考えられている粘膜下固有層乳頭部に接する基底細胞層にKGFRが発現していることから、KGFによる上皮細胞の分裂制御の可能性が推測される。さらに、粘膜下固有層乳頭部に接する基底細胞層内にCD3陽性細胞がみられることから、上皮内T細胞が上皮幹細胞へ作用する可能性が推測される(図7)。

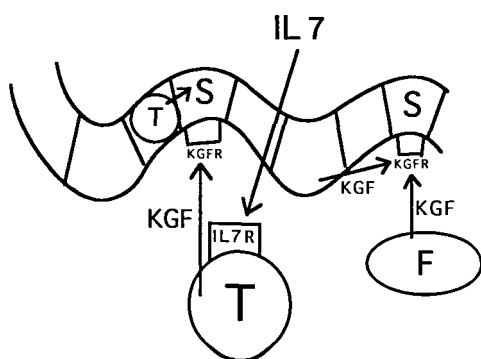


図7 正常口腔粘膜の上皮と粘膜固有層間の相互作用 (T: T細胞, F: 線維芽細胞, S: 上皮幹細胞)

OLP病変部では、粘膜上皮のIL7や基底細胞のKGFの発現は低下し、基底細胞直下に浸潤したリンパ球の多くは、KGFやIL7Rを強発現しており、これらのリンパ球はT細胞であった。また、正常口腔粘膜でみられた粘膜下固有層乳頭部に接する基底細胞層内のT細胞は消失していた。このことは、KGFやIL7を介したケラチノサイトと粘膜固有層や上皮内T細胞の相互作用による生理的な口腔粘膜上皮の維持が、OLPにおいては基底細胞直下の未熟なT細胞の浸潤によって変化していると考えられた。つまり、上皮下に浸潤したT細胞がKGFを強発現することにより、KGFRを発現していると考えられる上皮幹細胞や分裂初期の細胞は、分裂・分化が促進され、また、粘膜下固有層乳頭部に接する基底細胞層内のT細胞の消失により、上皮幹細胞や分裂初期の細胞は、影響を受け、結果的に上皮の角化異常が起ると考えられる。一方、IL7は上皮での発現が低下するため、上皮下に浸潤するIL7Rの発現の増加した活性化T細胞を除去できず、さらに上皮の修復が障害されるために、炎症が慢性化すると考えられる。

これらの結果は、自己免疫疾患と考えられている潰瘍性大腸炎の報告<sup>27,30,31)</sup>に類似しており、同様の発症メカニズムが疑われ、今後の検討が必要である。

上皮変化の見られないOLP病変部周囲の上皮下にも、リンパ球の集簇がみられることから<sup>32)</sup>、リンパ球の集簇という粘膜固有層の変化が、基底細胞層の液化変性や上皮の錯角化や過角化などの上皮変化をきたすものと考えられる。これは、GVHDとの類似性から考えても妥当であり、今後は、発症過程の上流部であるT細胞の集簇原因を明らかにする必要がある。これには前述した唾液腺に浸潤するT細胞の解析が、解明の一つの糸口になると思われる。

## 結 論

1. OLP患者36名の全唾液、顎下腺舌下腺唾液および耳下腺唾液中のIL1 $\alpha$ 、IL6、IL8のサイトカイン濃度は、健常者のものに比較して有意に上昇していた。また、OLP患者10名の口唇腺を組織学的に検討すると、GVHDと同様に、腺組織全体に及びリンパ球のび慢性浸潤や腺房の萎縮や変性などの病的所見が観察され、浸潤するリンパ球は、CD4やそれより優勢なCD8陽性のCD3陽性T細胞であった。

これらの結果から、OLP患者では、口腔粘膜のみならず唾液腺にも、リンパ球浸潤を特徴とする免疫学的反応の生じていることが推定され、OLPは全身的な免疫異常の一分症であり、発症メカニズムがGVHDに類似している可能性のあることが明らかになった。さら

に、口腔粘膜病変部と唾液腺でのT細胞レセプターの解析により、OLP 特異抗原の存在の有無を明らかにすることができ、また、唾液中のサイトカイン濃度の測定が、OLP の治療時の有用な指標になると考えられた。

2. 3名の正常口腔粘膜上皮におけるサイトカインの発現を免疫組織学的に検討したところ、いずれもIL7を発現し、口腔粘膜固有層のリンパ球の一部はIL7Rを発現していた。また、基底細胞および粘膜固有層の線維芽細胞やリンパ球はKGFを産生していた。一方、3名のOLP患者の病変部には、いずれも粘膜上皮のIL7の発現は低下し、基底細胞直下に浸潤した多くのT細胞は、KGFやIL7Rを強発現していた。

これらの結果から、OLPではKGFやIL7を介したケラチノサイトと粘膜固有層の相互作用による口腔粘膜上皮の生理的な維持機構が変化し、上皮の角化異常をもたらす可能性が考えられた。特に、上皮幹細胞の分裂制御に異常をきたしていると思われる。

以上より、OLPは口腔粘膜に限局した疾患ではなく、全身的な免疫異常がその発症に関与する可能性と、OLPに特徴的な口腔粘膜の異常角化は、粘膜維持機構の変化によるものである可能性の二つが明らかとなった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、研究の遂行に終始懇切なるご指導とご校閲を賜った広島大学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔頸部医科学講座(旧 口腔外科学第二)石川武憲教授に深甚なる謝意を表すとともに、貴重なるご助言、ご校閲を賜った本研究科・病態探究医科学講座(旧 歯科薬理学)土肥敏博教授ならびに本研究科・先進医療開発科学講座(旧 口腔病理学)高田隆教授に深謝します。

さらに本研究の遂行にあたり、ご指導、ご助言を賜りました本学顎口腔頸部医科学講座(旧 口腔外科学第二)杉山 勝助教授をはじめとする同講座の諸先生方に感謝します。

また、本研究に快く御協力くださった多くの患者の皆様およびボランティアとして惜しめない御協力をいただいた元医局員の先生方、元本学歯学部学生の皆様、元本学歯科衛生士学校の生徒の皆様にご心よりお礼申し上げます。

最後に影ながら心配してくれた父そして亡母に感謝します。

## 参 考 文 献

- 1) 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.
- 2) 池田憲昭: 口腔粘膜疾患の疫学—口腔白板症と口腔扁平苔癬—. 日口粘膜誌 2, 83-89, 1996.
- 3) Seiji Nakamura, Akiko Hiroki, Masanori Shinohara, Hisashi Gondo, Yukiko Ohyama, Takefumi Mouri, Masanori Sasaki, Kanemitsu Shirasuna, Mine Harada, Yoshiyuki Niho: Oral involvement in chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82, 556-63, 1996.
- 4) P. Oxholm, T.E. Daniels, K. Bendtzen: Cytokine expression in labial salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome. *Autoimmunity* 12, 185-191, 1992.
- 5) Robert I. Fox, Ho-Il Kang, Dale Ando, John Abrams, Eva Pisa: Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol* 152, 5532-39, 1994.
- 6) D. Boumba, F. N. Skopouli, H. M. Moutsopoulos: Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 34, 326-333, 1995.
- 7) Tetsuya Yamamoto, Tokio Osaki, Kazunori Yoneda, Eisaku Ueta: Cytokine production by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 23, 309-315, 1994.
- 8) Tetsuya Yamamoto, Tokio Osaki: Characteristic Cytokines Generated by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Invest Dermatol* 104, 784-788, 1995.
- 9) Koray M., Dulger O., Ak G., Horasanli s., Ucock A., Tanyeri H., Badur S.: The evaluation of anxiety and salivary cortisol levels in patients with oral lichen planus. *Oral Dis* 9, 298-301, 2003.
- 10) Sistig S., Vucicevic-Boras V., Lukac J., Kusic Z.: Salivary IgA and IgG subclasses in oral mucosal diseases. *Oral Dis* 8, 282-286, 2002.
- 11) Lukac J., Mrvak-Stipetic M., Knezevic M., Vrcek J., Sistig S., Ledinsky M., Kusic Z.: Phagocytic functions of salivary neutrophils in oral mucous membrane diseases. *J Oral Pathol Med* 32, 271-274, 2003.
- 12) Gandara BK, Izutsu KT, Truelove EL, Mandel ID, Sommers EE, Ensign WY.: Sialochemistry of whole, parotid, and labial minor gland saliva in patients with oral lichen planus. *J Dent Res* 66, 1619-1622, 1987.
- 13) Lundstrom IM, Anneroth KG, Bergstedt HF: Salivary gland function and changes in patients

- with oral lichen planus. *Scand J dent Res* 90, 443–458, 1982.
- 14) Regina Gandour-Edwards, Silloo B. Kapadia, Paul H. Gumerlock, Leon Barnes: Immunolocalization of interleukin-6 in salivary gland tumors. *Hum Pathol* 26, 501–03, 1995.
  - 15) Anne P. Jones, Louise M.C. Webb, Arthur O. Anderson, Edward J. Leonard, Antal Rot: Normal human sweat contains interleukin-8. *J Leukoc Biol* 57, 434–37, 1995.
  - 16) Motoko Ino, Koichi Ushiro, Chiyonori Ino, Toshio Yamashita, Tadami Kumazawa: Kinetics of epidermal growth factor in saliva. *Acta Otolaryngol Suppl.* 500, 126–30, 1993.
  - 17) Pammer J., Weninger W., Mild M., Burian M., Wojta J., Tschachler E.: Vascular endothelial growth factor is constitutively expressed in normal human salivary glands and is secreted in the saliva of healthy individuals. *J Pathol* 186, 186–191, 1998.
  - 18) Brennan MT., Fox PC.: Cytokine mRNA expression in the labial salivary glands of healthy volunteers. *Oral Dis* 6, 222–226, 2000.
  - 19) Isao Matsumoto, Kazuo Tsubota, Yoshiyuki Satake, Yasuhiko Kita, Ryutarō Matsumura, Hideyuki Murata, Takashi Namekawa, Kusuki Nishioka, Itsuo Iwamoto, Yasushi Saitoh, Takayuki Sumida: Common T cell receptor clonotype in lacrimal glands and labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 97, 1969–1977, 1996.
  - 20) Walton L.J., Thronhill M.H., Farthing P.M.: VCAM-1 and ICAM-1 are expressed by Langerhans cells, macrophages and endothelial cells in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 23, 262–228, 1994.
  - 21) Joseph A. Regezi, Nusi P. Dekker, Laurie A. MacPhail, Francina Lozada-Nur, Timothy H. McCalmont: Vascular adhesion molecules in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 81, 682–90, 1996.
  - 22) 山本哲哉, 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.
  - 23) L.F. Pepin, T. Roger, J. Morisset, M. Seman: Preferential V $\delta$ 1 expression among TcR  $\gamma/\delta$ -bearing T cells in human oral epithelium. *Scand J Immunol* 37, 289–94, 1993.
  - 24) Sari Siegfried, Fredrika Pekonen, Tuulikki Nyman, Martti Ämmälä: Expression of mRNA for keratinocyte growth factor and its receptor in human endometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand* 74, 410–417, 1995.
  - 25) M. Cutolo, A. Sulli, B. Seriola, S. Accardo, A.T. Masi: Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clinical and Experimental rheumatology* 13, 217–226, 1995.
  - 26) Muegge K, M.P. Vila, S.K. Durum: Interleukin-7; A cofactor for V(D)J rearrangement of the T cell receptor gene. *Science* 261, 93, 1993.
  - 27) Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, Aiso S, Hibi T, Ishii H.: Interleukin-7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest* 95, 2945, 1995.
  - 28) Christine Heufler, Gerda Topar, Alfred Grasseger, Ursula Stanzl, Franz Koch, Nikolaus Romani, Anthony E. Namen, Gerold Schuler: Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J Exp Med* 178, 1109–14, 1993.
  - 29) Boismenu R, Havran WL.: Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial  $\gamma\delta$  Tcells. *Science* 266, 1253–55, 1994.
  - 30) Maria Brauchle, Marianne Madlener, Anna Dorothea Wagner, Karin Angermeyer, Ulrich Lauer, Peter Hans Hofschneider, Michael Gregor, Sabine Werner: Keratinocyte growth factor is highly overexpressed in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 149, 521–529, 1996.
  - 31) Mona Bajaji-Elliott, Emma Breese, Richard Poulson, Peter D. Fairclough, Thomas T. MacDonald: Keratinocyte growth factor in inflammatory bowel disease. Increased mRNA transcripts in ulcerative colitis compared with Crohn's disease in biopsies and isolated mucosal myofibroblasts. *Am J Pathol* 151, 1469–1476, 1997.
  - 32) 鈴木克年, 後沢孝和, 市川光大, 茂木健司, 松田登: 口腔扁平苔癬および白板症の病変部と周辺部の病理組織学的検討. *日口外誌* 37, 1122–1128, 1991.



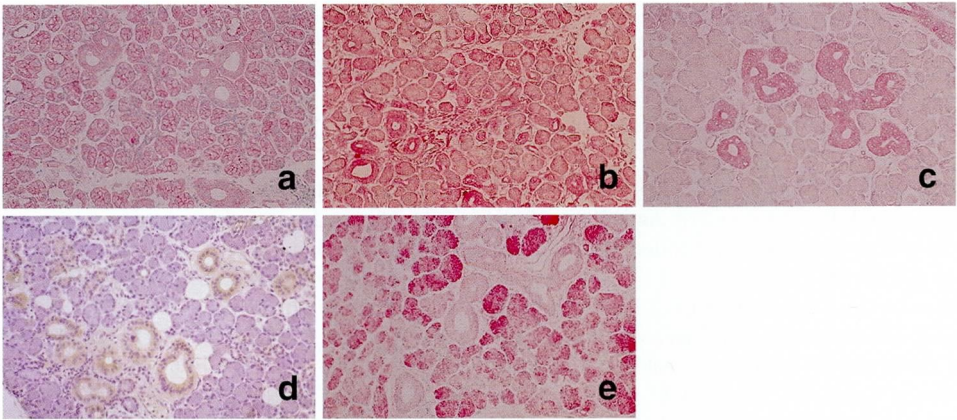


図1 正常顎下腺における IL1 $\alpha$ , IL2, IL6 と TNF $\alpha$  の発現や局在様相  
(a: IL8, b: TNF $\alpha$ , c: IL1 $\alpha$ , d: IL6, e: IL2)

IL8 と TNF $\alpha$  は導管 (介在部, 線状部) や腺房に, また IL1 $\alpha$  や IL6 は導管に, また IL2 は腺房に局在していた。

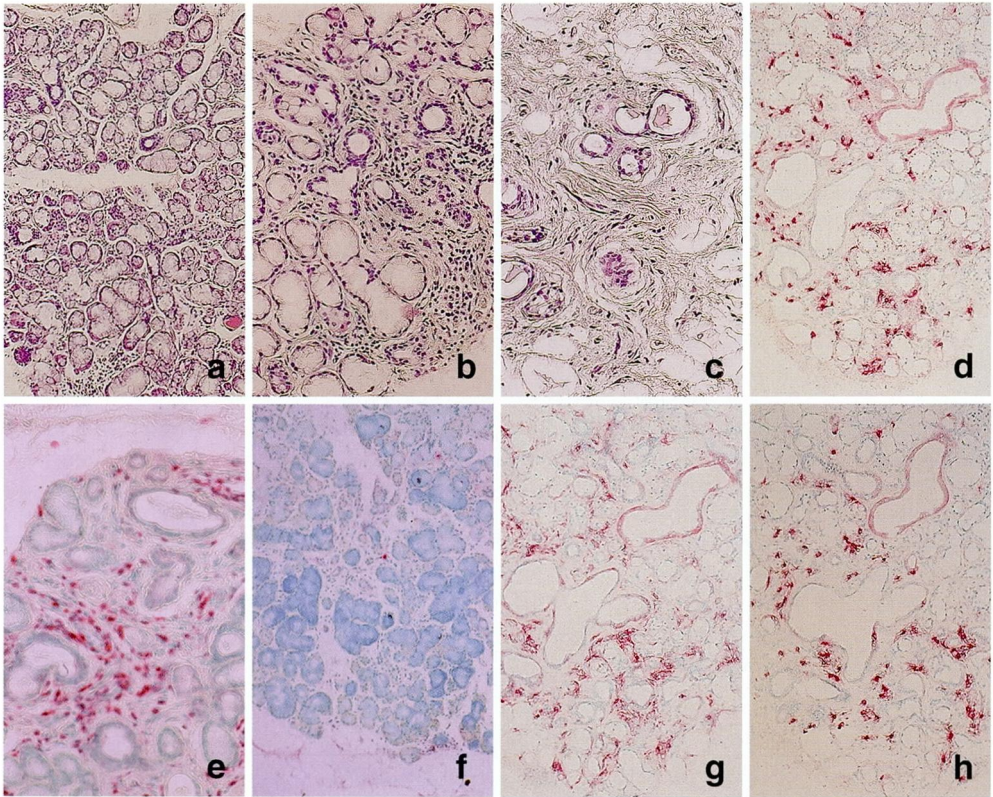


図3 OLP 患者の口唇腺の組織所見

(a, b, c: HE 染色, d: CD3, e: CD45RO, f: CD20, g: CD4, h: CD8 の各免疫染色)

腺組織全体にび慢性リンパ球浸潤, また導管周囲にはリンパ球浸潤や腺房の萎縮, また変性が認められる (a, b, c). 浸潤リンパ球は, 主に CD3 陽性, CD45RO 陽性を示す T 細胞であり, CD20 陽性の B 細胞はまれである (d, e, f). 浸潤 T 細胞は, CD4 より CD8 が優位を示した (g, h).



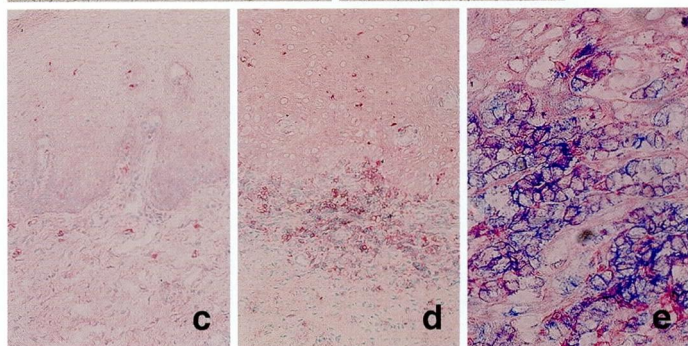
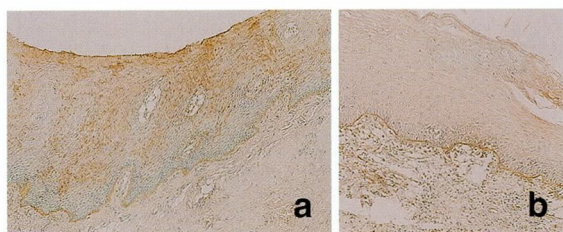


図4 正常口腔粘膜と OLP 病変部の IL7 ならびに IL7R の免疫染色 (a: 正常口腔粘膜の IL7, b: OLP の IL7, c: 正常口腔粘膜の IL7R, d: OLP の IL7R, e: OLP の IL7R (赤) と CD3 (青) の二重染色)

IL7 は、正常口腔粘膜では、基底膜や有棘層の上層の細胞質に発現していたが、OLP では、基底膜以外での発現はいずれも低下している (a, b)。

IL7R は、正常口腔粘膜では、固有層の一乳頭域に数個程度認められたが、OLP では、基底細胞直下に浸潤したリンパ球の約 30~40% にその発現が認められる (c, d)。IL7R 陽性リンパ球は、CD3 陽性 T 細胞であることが確認できた (e)。

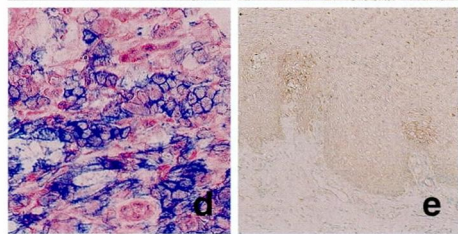
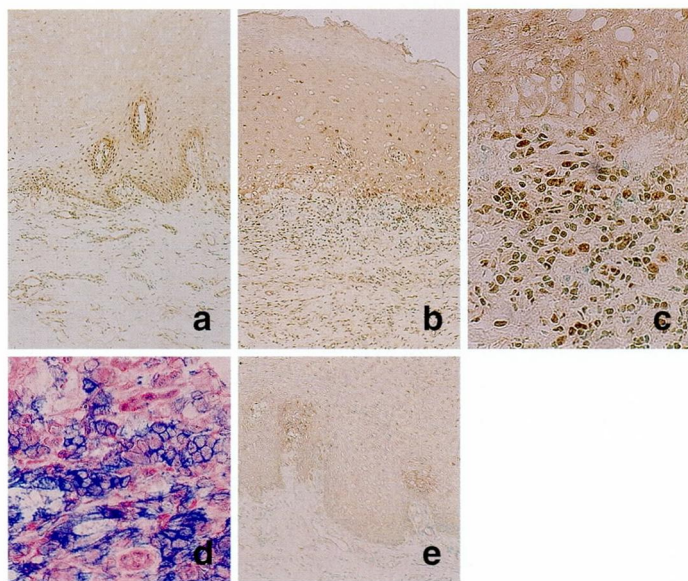


図5 正常口腔粘膜と OLP 病変部の KGF ならびに正常口腔粘膜の KGF の免疫染色

(a: 正常口腔粘膜の KGF, b, c: OLP の KGF, d: OLP の KGF (赤) と CD3 (青) の二重染色, e: 正常口腔粘膜の KGF)

KGF は、正常口腔粘膜では、主に基底細胞と固有層の線維芽細胞の核に局在していたが、OLP では、基底細胞層では少なく、基底細胞直下に浸潤した多くのリンパ球の核に発現している (a, b, c)。KGF 陽性リンパ球は、CD3 陽性 T 細胞であることが確認できた (d)。

KGFR は、正常口腔粘膜では、固有層乳頭部に近接した基底細胞層内に認められた (e)。

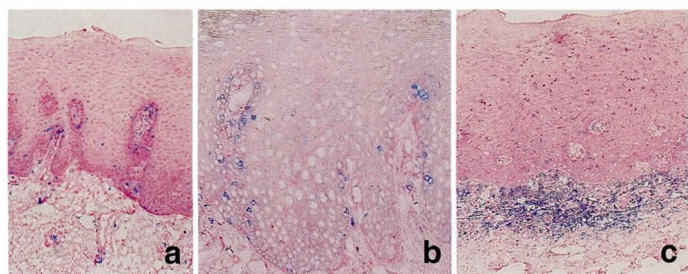


図6 正常口腔粘膜と OLP 病変部における CD3 陽性細胞の局在 (a, b: 正常口腔粘膜, c: OLP)

正常口腔粘膜では、CD3 陽性 T 細胞は固有層乳頭部に接した基底細胞層内に認められたが、OLP では、同部にみられる T 細胞は消失し、基底細胞直下に浸潤している。